

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

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

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2018

N° d'ordre : 201806



## THESE DE DOCTORAT

Spécialité : génétique des populations

Présentée par :

**Mme NDEYE SAKHA BOB NIANG**

# Facteurs d'émergence du virus de la fièvre de la Vallée du Rift en Afrique de l'Ouest

Soutenue le 24 Janvier 2018 devant le jury composé de :

<b>Président :</b>	Mady NDIAYE	Professeur titulaire	FST/UCAD
<b>Rapporteurs :</b>	Ibrahima DIA	HDR	IPD/Dakar
	Malick FALL	Maître de Conférences	FST/UCAD
	Noël TORDO	HDR	IPG/Conakry
<b>Examineurs :</b>	Modou Moustapha LO	Chargé de recherche	ISRA/LNERV
	Gamou FALL	Assistante de recherche	IPD/Dakar
<b>Directeur de thèse :</b>	Pape Mbacké SEMBENE	Professeur titulaire	FST/UCAD
	Amadou Alpha SALL	Directeur de recherche	IPD/Dakar

## QUELQUES DEFINITIONS

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

**Arbovirus** : *Arthropod borne-virus*, se dit des virus dont la transmission biologique se fait par l'intermédiaire d'un arthropode (exemple : moustiques, tiques, etc....). Dans le cas des arbovirus transmis à l'homme, les moustiques sont les plus impliqués.

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

**Epidémie/épizootie** : 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.

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

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

**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

asymptomatique).

**Maladie endémique** : présence permanente ou à une certaine période d'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.

**Réassortiment** : échange de segments génomiques entre deux virus proches à génomes segmentés

**Recombinaison** : la recombinaison est un échange d'information génétique entre deux génomes

**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** : sensible à l'infection et capable de s'infecter

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

**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 sensible.

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

**Virion** : C'est un virus, ou particule virale, éjecté avec ses congénères de la cellule infectée dont la machinerie génétique a été détournée pour les fabriquer.

**Génotype**: c'est l'information portée par le génome d'un organisme, contenu dans chaque cellule sous forme d'acide désoxyribonucléique (ADN) ou d'acide ribonucléique (ARN).

**Protéine** : macromolécules biologiques présentes dans toutes les cellules vivantes. Elles sont formées d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques. Chacune de ces chaînes est constituée de l'enchaînement de résidus d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. Les protéines assurent une multitude de fonctions au sein de la cellule vivante et dans les tissus

**Effet cytopathogène** : changement dans l'architecture confluent des cellules d'un système de culture en présence d'un agent pathogène. Ceci se manifeste par un épaissement et un rétrécissement de leur noyau (pynose), la formation de corps d'inclusion et de cellules géantes (syncytia), déplacement nucléolaire, réarrangement et marginalisation de la chromatine nucléaire et une vacuolisation.

**Sialome** : représente l'ensemble des protéines de glandes salivaires d'arthropodes

**Lignée** : distincts groupes génétiques partageant un ancêtre commun

## LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

**aa** : acides aminés

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**ADNc** : ADN complémentaire

**Ae**: *Aedes*

**An**: *Anopheles*

**ARN**: Acide Ribonucléique

**BET**: bromure d'éthidium

**BSSVS**: *Bayesian Stochastic Search Variable*

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

**CRORA** : Centre collaborateur OMS de référence et de Recherche pour les arbovirus et virus de fièvres hémorragiques

**CV**: *Cache Valley*

**Cx** : *Culex*

°C : Degré Celsius

**DNTP** : désoxyribonucléotides triphosphate

**ECP** : effet Cytopathogène

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

**ELISA**: Enzyme *link immunoabsorbant assay*

**ESS**: taille de la population effective

**FST** : Faculté des Sciences et Techniques

**FVR** : Fièvre de la vallée du Rift

**GS** : Glandes Salivaires

**GTR +Y+ I** : *generalized time-reversible* avec une catégorie gamma discrète et une proportion de sites invariables

**IgG** : Immunoglobuline G

**IgM** : Immunoglobuline M

**IPD** : Fondation Institut Pasteur de Dakar

**IPD** : Institut Pasteur de Dakar

**IPP** : Institut Pasteur Paris

**Jpi** : jours post-infection

**Kb** : kilobases

**Kda** : kilodalton

**L**: *large*

**M**: *medium*

**MCC**: Maximum de crédibilité des clades

**MCMC**: *Markov Chain Monte Carlo*

**NGS**: *next-generation sequencing*

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**Pb** : paires de bases

**PBS**: Phosphate buffered saline

**PCR** : *Polymerase chain reaction*

**pfu**: *Plaque Forming Unit*

**PIE** : Période d'Incubation Extrinsèque

**PRNT**: *Plaque Reduction Neutralization Test*

**RNP**: Ribonucléoprotéine

**RT**: transcription inverse

**RT-PCR** : *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*

**S**: *Small*

**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

**VFVR** : Virus de la Fièvre de la Vallée du Rift

**WHO** : *World Health Organisation*

## **TABLES DES MATIERES**

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>14</b>
<b>PREMIERE PARTIE : GENERALITES SUR LA FIEVRE DE LA VALLEE DU RIFT.....</b>	<b>20</b>
<b>I.1 Historique.....</b>	<b>20</b>
<b>I.2 Le virus de la fièvre de la vallée du Rift.....</b>	<b>24</b>
1.2.1. Classification .....	24
1.2.2. Morphologie .....	26
1.2.3. Propriétés physiques et chimiques du virion.....	26
1.2.4. Organisation du génome et protéines virales .....	27
1.2.5. Cycle de multiplication .....	29
1.2.6. Variabilité génétique .....	30
<b>I.3. Epidémiologie .....</b>	<b>35</b>
1.3.1. Hôtes et symptômes.....	35
1.3.2. Vecteurs .....	37
1.3.3. Cycles et modes de transmission.....	38
1.3.4. Facteurs d'émergence .....	41
1.3.5. Distribution géographique.....	43
<b>I.4. Diagnostic.....</b>	<b>44</b>
<b>I.5. Traitement .....</b>	<b>46</b>
<b>I.6. Prévention.....</b>	<b>46</b>
<b>DEUXIEME PARTIE : FACTEURS D'EMERGENCE ET DE TRANSMISSION DU VIRUS DE LA FIEVRE DE LA VALLEE DU RIFT EN AFRIQUE DE L'OUEST .....</b>	<b>48</b>

<b>Problématique .....</b>	<b>48</b>
<b>CHAPITRE 1 : EPIDEMIOLOGIE DU VFVR EN AFRIQUE DE L'OUEST : IMPACT DE LA VARIABILITE GENETIQUE DES SOUCHES ET DE LA PLUVIOMETRIE.....</b>	<b>50</b>
<b>I.Introduction .....</b>	<b>50</b>
<b>II. Matériels .....</b>	<b>51</b>
<b>III. Méthodologie .....</b>	<b>55</b>
<b>III.1 Préparation de stock viral à partir de souriceaux nouveau-nés.....</b>	<b>56</b>
<b>III.2. Préparation des stocks viraux à partir de cellules.....</b>	<b>56</b>
III. 2. 1. Entretien des cellules.....	56
III. 2. 2 Infection des cellules .....	57
<b>III.3 Extraction d'ARN.....</b>	<b>57</b>
<b>III.4 Amplification par RT-PCR.....</b>	<b>58</b>
<b>III.5 Séquençage et analyse des séquences.....</b>	<b>61</b>
<b>III.6 Analyse des recombinaisons, de la Phylodynamique et de la Phylogéographie des souches de VFVR d'Afrique de l'Ouest.....</b>	<b>62</b>
<b>III.7 Analyses des données de pluviométrie .....</b>	<b>63</b>
<b>IV. Résultats .....</b>	<b>63</b>
<b>IV.1 Mise en évidence de recombinaisons .....</b>	<b>63</b>
<b>IV.2 Faible distance génétique entre les différentes souches d'Afrique de l'Ouest.....</b>	<b>66</b>
<b>IV.3 Mutations non conservatives au niveau de la NSs .....</b>	<b>68</b>
<b>IV.4 Phylodynamique et Phylogéographie du VFVR en Afrique au cours des 80 dernières années.....</b>	<b>69</b>
<b>IV.5 Impact de la Pluviométrie sur la survenue des épidémies.....</b>	<b>75</b>
<b>V. Discussion.....</b>	<b>79</b>

<b>VI. Conclusion .....</b>	<b>85</b>
<b>CHAPITRE 2 : EXPLORATION DU ROLE DE LA SALIVE DU MOUSTIQUE DANS LA TRANSMISSION ET LA PATHOGENESE DU VFVR CHEZ L'HOMME .....</b>	<b>87</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>87</b>
<b>II. Matériels et Méthodes .....</b>	<b>89</b>
<b>II.1 Matériels .....</b>	<b>89</b>
II.1.1 Sérums utilisés.....	89
II.1.2 Glandes salivaires de moustiques: Aedes vexans et Culex poicilipes .....	90
II.1.3 Anticorps polyclonaux anti-glandes salivaires de moustiques .....	91
<b>II.2. Méthodologie .....</b>	<b>91</b>
II.2.1 Production d'anticorps polyclonaux anti Aedes/Culex .....	91
II.2.2 Infection des moustiques et Collecte de glandes salivaires .....	92
<b>II.3 Détection des protéines de glandes salivaires et d'anticorps anti - protéines de glandes salivaires dans les sérums humains .....</b>	<b>95</b>
<b>II.4 Test de compétition.....</b>	<b>99</b>
<b>II.5 Coloration au bleu de coomassie.....</b>	<b>99</b>
<b>II.6 Identification des Protéines par spectrometrie de masse .....</b>	<b>100</b>
<b>III. Résultats .....</b>	<b>100</b>
<b>III.1 Détection des protéines totales de glandes salivaires par coloration au bleu de Coomassie et <i>Western blot</i>.....</b>	<b>100</b>
<b>III.2 Détection des protéines de glandes salivaires circulant dans les sérums humains</b>	<b>102</b>
III.2.1 Déplétion de l'albumine contenue dans les sérums humains .....	102
III.2.2 Détection des protéines de glandes salivaires par Western blot.....	103

III.2.3 Spécificité des protéines de glandes salivaires détectées dans les sérums humains : test de compétition.....	104
III.2.4 Sous-expression des protéines de glandes salivaires en présence du virus .....	105
<b>III.3 Détection d'anticorps anti-protéines de glandes salivaires de moustique dans les sérums humains.....</b>	<b>106</b>
III.3.1 Réponse anticorps entre sérums de patients infectés et non infectés.....	106
III.3.2 Réponse anticorps différente selon l'année de l'infection .....	107
<b>III.4 Identification des protéines circulantes et des protéines reconnues par les anticorps par spectrométrie de masse .....</b>	<b>108</b>
<b>IV. Discussion .....</b>	<b>116</b>
<b>V. Conclusion .....</b>	<b>123</b>
<b>VI. Perspectives générales .....</b>	<b>124</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>127</b>
<b>ANNEXES.....</b>	Erreur ! Signet non défini.

## **LISTE DES PUBLICATIONS SOUMISES ET ACCEPTEES**

## **LISTE DES PUBLICATIONS EN COURS**

## **LISTE DES FIGURES**

<b>FIGURE 1:</b> LA FAMILLE DES BUNYAVIRIDAE ET LES VECTEURS ASSOCIES (BOULOY ET WEBER, 2010) .....	25
<b>FIGURE 2:</b> MORPHOLOGIE (A) ET STRUCTURE DU VIRUS (B) DE LA FIEVRE DE LA VALLEE DU RIFT (IKEGAMI 2012) .....	26
<b>FIGURE 3:</b> LES DIFFERENTS SEGMENTS DU VIRUS DE LA FIEVRE DE LA VALLEE DU RIFT (MANSFIELD K.L, 2015) .....	29
<b>FIGURE 4:</b> MANIFESTATIONS CHEZ L'ANIMAL, NECROSE HEPATIQUE (A) ET AVORTON (B) (MANSFIELD K.L, 2015) .....	36
<b>FIGURE 5:</b> MANIFESTATIONS CHEZ L'HOMME (PETECHIES ET HEMORRAGIES) (PAWESKA, 2010) .....	37
<b>FIGURE 6:</b> CYCLE DE TRANSMISSION DU VIRUS DE LA FIEVRE DE LA VALLEE DU RIFT.....	41
<b>FIGURE 7:</b> DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DU VIRUS DE LA FIEVRE DE LA VALLEE DU RIFT EN AFRIQUE ET EN CHINE (ADAPTE DE MANSFIELD <i>ET AL.</i> , 2015 ET DE WIWANITKIT, 2016).....	44
<b>FIGURE 8:</b> SCHEMA GLOBAL DE LA METHODOLOGIE .....	55
<b>FIGURE 9:</b> ANALYSE DES RECOMBINAISSONS AVEC LE LOGICIEL RDP.....	65
<b>FIGURE 10 :</b> CREDIBILITE MAXIMALE DE LA CLADE (MCC) BASE SUR 180 SEQUENCES COMPLETES DU SEGMENT S ISOLEES DANS 21 PAYS ENTRE 1944 ET 2016 .....	71
<b>FIGURE 11:</b> DIFFUSION DU VFVR A TRAVERS L'AFRIQUE DURANT LES 80 DERNIERES ANNEES .....	74
<b>FIGURE 12:</b> PLUVIOMETRIE ET APPARITION DU VFVR AU SENEGAL.....	76
<b>FIGURE 13:</b> PLUVIOMETRIE ET APPARITION DU VFVR EN MAURITANIE .....	77
<b>FIGURE 14:</b> PLUVIOMETRIE ET APPARITION DU VFVR AU MALI .....	78

<b>FIGURE 15:</b> MECANISME D'EMERGENCE D'UNE ZOOSE (WILLIAM <i>ET AL.</i> , 2012).....	88
<b>FIGURE 16:</b> SCHEMA GLOBAL DE LA METHODOLOGIE ADOPTEE .....	91
<b>FIGURE 17:</b> INFECTION DE MOUSTIQUE PAR VOIE ORALE.....	93
<b>FIGURE 18:</b> ELECTROPHORESE SUR GEL ACRYLAMIDE .....	96
<b>FIGURE 19:</b> TRANSFERT DES PROTEINES SUR UNE MEMBRANE DE NITROCELLULOSE AVEC LA METHODE << SANDWICH >> .....	97
<b>FIGURE 20:</b> DETECTION DES PROTEINES DE GLANDES SALIVAIRES DE MOUSTIQUE APRES UNE COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE .....	101
<b>FIGURE 21:</b> DETECTION DES PROTEINES DE GLANDES SALIVAIRES DE MOUSTIQUE PAR LA TECHNIQUE DE <i>WESTERN BLOT</i> .....	102
<b>FIGURE 22:</b> TEST DE DEPLETION DE L'ALBUMINE .....	103
<b>FIGURE 23:</b> DETECTION DES PROTEINES DE GLANDES SALIVAIRES DANS LES SERUMS DE PATIENTS ET PERSONNES SAINES VIVANT DANS LE MEME ZONE .....	104
<b>FIGURE 24:</b> SPECIFICITE DES PROTEINES DE GLANDES SALIVAIRES DETECTEES DANS LES SERUMS DES MALADES .....	105
<b>FIGURE 25:</b> DETECTION DES PROTEINES DE GLANDES SALIVAIRES DE MOUSTIQUE INFECTES OU NON INFECTES AVEC LE VFVR .....	106
<b>FIGURE 26:</b> REPOSE ANTICORPS SELON L'ETAT DE LA PERSONNE (MALADE VERSUS SAIN) .....	107
<b>FIGURE 27:</b> REPOSE ANTICORPS ENTRE PATIENTS DE 2010 ET 2012.....	108
<b>FIGURE 28:</b> PROTEINES RECONNUES PAR LES ANTICORPS ANALYSEES EN SPECTROMETRIE DE MASSE .....	110
<b>FIGURE 29:</b> PROTEINES ANALYSEES EN SPECTROMETRIE DE MASSE VISIBLE AU COOMASSIE. ....	110
<b>FIGURE 30:</b> IDENTIFICATION DES PROTEINES DE MOUSTIQUES DANS LES SERUMS HUMAINS..	111
<b>FIGURE 31:</b> CLASSIFICATION DES PROTEINES DE GLANDES SALIVAIRES D' <i>Aedes vexans</i> SELON LA LOCALISATION ET LA FONCTION BIOLOGIQUE .....	115
<b>FIGURE 32:</b> CLASSIFICATION DES PROTEINES DE GLANDES SALIVAIRES DE <i>Culex</i> <i>poicillipes</i> SELON LA LOCALISATION ET LA FONCTION BIOLOGIQUE .....	115

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>TABLEAU 1:</b> ORIGINE DES SOUCHES UTILISEES .....	52
<b>TABLEAU 2:</b> MILIEUX DE CULTURE UTILISES POUR LES CELLULES DE MOUSTIQUES ET LES CELLULES DE MAMMIFERES .....	54
<b>TABLEAU 3:</b> LISTE DES AMORCES UTILISEES .....	58
<b>TABLEAU 4:</b> COMPOSITION DU MELANGE REACTIONNEL DE LA PCR .....	60
<b>TABLEAU 5:</b> PROGRAMMES UTILISES POUR LA PCR.....	61
<b>TABLEAU 6:</b> DISTANCE GENETIQUE PAR PAIRE ENTRE LES DIFFERENTES SOUCHES DE VFVR D'AFRIQUE DE L'OUEST AU NIVEAU DE LA PROTEINE NSS.....	67
<b>TABLEAU 7:</b> MUTATIONS NON CONSERVATIVES DE LA NSS .....	68

## INTRODUCTION GENERALE

L'humanité a fait face au cours de son existence sur Terre à différents fléaux, dont les maladies infectieuses. L'avènement de l'antibiothérapie et de la vaccination ont suscité beaucoup d'espoir. Elles ont permis, avec les bonnes mesures d'hygiène, la maîtrise des maladies infectieuses et par conséquent de la santé humaine et animale dans le monde. Malheureusement, on assiste aujourd'hui à une recrudescence des maladies infectieuses et à l'émergence de nouveaux agents infectieux. D'une part, des maladies infectieuses déjà connues réapparaissent sous une forme différente, souvent plus sévère du fait de l'adaptation très rapide de l'agent pathogène, ou gagnent de nouvelles régions géographiques. D'autre part, des maladies réellement nouvelles ou d'étiologies auparavant inconnues, explosent du fait de conditions socio-économiques, écologiques et climatiques changeantes.

Ces maladies infectieuses émergentes et ré-émergentes sont pour la plupart des zoonoses et les rapports entre les hommes et les animaux créent un environnement propice à leur émergence. Ces zoonoses demeurent une menace en santé humaine et vétérinaire tant dans les pays industrialisés que dans les pays en développement. Récemment, il a été enregistré une recrudescence des maladies dues à des arbovirus ou virus de fièvre hémorragique. Des épidémies de Dengue ont ainsi été notifiées en Ethiopie (WHO, 2016a) et au Burkina Faso (WHO, 2016b) entre 2013 et 2016. Une épidémie de maladie à virus Ebola a fait des ravages de décembre 2013 à juin 2016, principalement en Sierra Léone, au Libéria, et en Guinée avec plus de 28646 cas confirmés et plus de 11323 décès (WHO, 2016c). En 2015, des épidémies de Zika au Brésil (Rosario *et al.*, 2016) et au Cap Vert (WHO, 2015a), de Chikungunya au Sénégal (WHO, 2015b), du virus de la fièvre de la vallée du Rift en Mauritanie (Boushab *et al.*, 2015, Bob *et al.*, 2017) ont également été notifiées. Leur capacité à provoquer d'importantes mortalités chez l'Homme a fait de ces infections virales émergentes des préoccupations majeures de santé publique.

La Fièvre de la vallée du Rift (FVR) est une zoonose émergente de grande importance économique et médicale. Elle est causée par le virus de la fièvre de la Vallée du Rift (VFVR) qui a été isolé pour la première fois en 1931 au Kenya (Daubney *et al.*, 1931). La FVR entraîne des avortements et une mortalité néonatale élevée chez les ovins, les bovins et les caprins (Daubney *et al.*, 1931). Chez les humains, l'infection

se caractérise généralement par un syndrome pseudo-grippal qui peut évoluer dans 1 à 3% des cas vers une forme sévère (hépatites, syndromes hémorragiques, encéphalites, et des pathologies oculaires) associée à 50 % de mortalité (Ikegamie *et al.*, 2011). Cette arbovirose endémique et très répandue en Afrique a été mise en cause dans plusieurs épizooties. Longtemps considérée d'intérêt essentiellement vétérinaire, la FVR est devenue aujourd'hui une préoccupation majeure de santé publique.

En effet, la première grande épidémie particulièrement sévère était survenue en Egypte en 1977 et avait causé 200 000 infections humaines dont 598 fatales (Hoogstraal, 1978). Depuis cette date, plusieurs épidémies majeures se sont déclarées dans de nouvelles localités confirmant ainsi le potentiel d'émergence du virus dans une population d'hôtes sensibles.

La première manifestation du VFVR hors du continent africain a été rapportée en septembre 2000 dans la péninsule Arabique notamment en Arabie Saoudite et au Yémen (Al-Afaleq, 2003). Les pertes en animaux domestiques y ont été très importantes et le nombre d'infections humaines fut estimé à 2071 et les décès à 245 (Shoemaker *et al.*, 2002).

Les facteurs de risque liés à cette émergence sont probablement les commerces d'animaux qui sont courants entre l'Afrique de l'Est et l'Arabie Saoudite. D'autres facteurs d'émergence de la FVR ont été aussi identifiés à travers les différentes épidémies en Afrique notamment la modification génétique du virus, les facteurs climatiques globaux à l'instar des maladies à transmission vectorielle, les changements des pratiques agricoles, les modifications de l'environnement survenues suite aux aménagements hydro-agricoles et les fortes pluies persistantes accompagnées d'inondations durables (Morvan *et al.*, 1992; El Akkad, 1978; Jouan *et al.*, 1988; Ksiazek *et al.*, 1989). Au regard des changements climatiques globaux prédits du fait du réchauffement de la planète, des mouvements des populations animales et humaines (commerce, tourisme, missions humanitaires, etc.) à l'échelle mondiale ainsi que les bouleversements écologiques associés au développement de l'agriculture en Afrique, d'autres flambées sont malheureusement à craindre.

Le VFVR est un virus à ARN segmenté (trois segments : *Small*, S ; *Medium*, M et *Large*, L) et appartient au genre *Phlebovirus* de la famille des *Bunyaviridae* (Shope *et al.*, 1980 ; Shimshony & Barzilai, 1983). Des études antérieures sur la diversité génétique du VFVR ont permis d'identifier différentes lignées dont 2 lignées

initialement décrites sur la base de la protéine NSs, puis 3 lignées en intégrant Gn et L (Sall *et al.*, 1997 ; 1999). Une autre étude basée sur 33 génomes complets de souches de VFVR provenant d’Afrique et d’Arabie Saoudite a mis en évidence 7 lignées (Bird *et al.*, 2007). Enfin, une étude plus récente a décrit 15 lignées (nommées d’A à O) en utilisant le segment M de 203 souches d’Afrique et d’Arabie Saoudite (Grobbelaar *et al.*, 2011). La lignée C est la plus répandue et la plus associée aux épidémies majeures de FVR (Zimbabwe en 1978, Madagascar en 1991, Kenya, Tanzanie, Somalie en 1997-1998, Arabie Saoudite en 2000-2001 et Kenya en 2007). Globalement, la différence antigénique entre ces différentes lignées de VFVR détectées durant plusieurs années à travers l’Afrique est faible (Meegan & Bailey, 1988). Des différences de 2,8% en nucléotides et 5,4% en acides aminés ont été trouvées entre ces différentes lignées (Grobbelaar *et al.*, 2011). Toutefois, le phénomène de réassortiment (échange de segments génomiques entre deux virus à génomes segmentés proches) peut générer de nouveaux virus avec une virulence plus ou moins élevée que les souches d’origine et jouer ainsi un rôle important dans la variabilité génétique des souches de VFVR.

L'analyse des virus isolés pendant les épizooties et les épidémies a révélé deux tendances concernant la répartition de ces différentes lignées décrites récemment par Grobbelaar et collaborateur (2011). La première tendance est trouvée dans la « patrie ancestrale » du virus, en Afrique de l’Est et Centrale, où les analyses ont montré la circulation concomitante de plusieurs lignées différentes et qui sont maintenues en permanence dans la région grâce à une circulation enzootique entre les réservoirs et les espèces locales de moustiques (Ikegami, 2012). La deuxième tendance est trouvée dans des pays tels que l’Egypte, Madagascar et la Mauritanie où le VFVR a commencé à circuler récemment. En effet, les virus isolés lors des épizooties/épidémies dans ces régions sont étroitement liés à deux ou 3 lignées d’Afrique de l’Est et Centrale (lignées A et/ou C essentiellement) avec une faible diversité génétique (Ikegami, 2012). Cela indique que ces nouveaux foyers de FVR ont résulté de l’introduction d’une souche virale provenant d’Afrique de l’Est ou Centrale, suivie d’une propagation du virus par les moustiques chez les animaux et humains sensibles (Grobbelaar *et al.*, 2011 ; Ikegami, 2012). Une analyse phylodynamique du VFVR en Afrique de l’Ouest utilisant les souches de 1983 à 2003 a confirmé cette tendance avec 5 voies d’introduction du VFVR au Sénégal et en

Mauritanie durant cette période, essentiellement à partir d'Afrique du Sud, du Zimbabwe et du Kenya (Soumaré *et al.*, 2012). Concernant les épidémies récentes survenues entre 2010 et 2013 en Afrique de l'Ouest, cette tendance a également été confirmée. En effet, les analyses phylogénétiques basées sur des séquences partielles du génome ont montré soit une réémergence de souches ayant déjà circulé, soit une introduction de virus proches des souches de VFVR d'Egypte, du Zimbabwe ou du Kenya (Faye *et al.*, 2014 ; Sow *et al.*, 2014 ; 2016).

Du fait des analyses phylogénétiques limitées (basées sur des séquences partielles) lors des épidémies antérieures, des émergences fréquentes du VFVR et de sa propagation en Afrique de l'Ouest (FVR notifiée en 2015 en Mauritanie, au Sénégal et au Mali et en 2016 au Niger), il est important de séquencer les génomes complets des souches et d'étudier la phylodynamique et la phylogéographie. Cela permettrait d'identifier avec plus de précision les lignées de VFVR circulant en Afrique de l'Ouest, de connaître leur origine et surtout de mieux comprendre la diversité génétique des souches et leur dynamique entre la « patrie ancestrale » et l'Afrique de l'Ouest.

Dans le but de mieux comprendre l'épidémiologie de la FVR en Afrique de l'Ouest, il serait également important d'analyser l'impact des autres facteurs d'émergence de la FVR décrits, comme la pluviométrie afin de pouvoir prédire la survenue des épidémies et d'anticiper la riposte (Linthicum *et al.*, 1999).

Dans un contexte plus global, ces différentes analyses nous permettraient de mieux comprendre les mécanismes d'émergence et de réémergence de la FVR en Afrique de l'Ouest ainsi que les épidémies causées dans les différents pays.

Lors des épidémies de FVR dans une zone donnée, les humains s'infectent par contact avec des animaux ou tissus d'animaux infectés, aérosols, ou par piqûre de moustiques du genre *Aedes spp* ou *Culex spp*. De nombreux travaux ont permis de démontrer l'implication des moustiques (Diptères) hématophages (*Culex*, *Aedes*, *Mansonia*) dans la transmission du VFVR (Smithburn, 1949 ; Fontenille *et al.*, 1995 ; Diallo *et al.*, 2000 ; Ba *et al.*, 2012). De plus, plusieurs espèces de moustiques (*Culex poicilipes*, *Culex antennatus* et *Aedes ochraceus*) ont été trouvées en association avec le VFVR dans la nature durant les épidémies de 2003 et 2010 en Mauritanie et 2013 au Sénégal, suggérant un rôle des moustiques dans la transmission du virus (Faye *et al.*, 2007 ; Faye *et al.*, 2014 ; Sow *et al.*, 2016). La transmission des Hommes via les moustiques

n'est pas la voie majeure décrite pour le VFVR, mais elle peut jouer un rôle important dans la transmission animal-homme ou inter-humaine et donc dans la propagation du virus en cas d'émergence. La compétence vectorielle, c'est-à-dire la capacité du moustique à s'infecter, disséminer et à transmettre le virus après un repas sanguin infectieux, dépend de facteurs intrinsèques du moustique comme l'ARN interférence, qui est la principale réponse antivirale innée contre les virus à ARN, (Franz *et al.*, 2006 ; Khoo *et al.*, 2010) mais également du virus comme la diversité génétique (Ndiaye *et al.*, 2016). En effet, au Sénégal, une étude a montré que les espèces *Aedes vexans*, *Culex poicilipes* et *Culex quinquefasciatus* étaient compétentes pour transmettre le VFVR avec un rôle plus important d'*Aedes vexans* (Ndiaye *et al.*, 2016). D'autres facteurs liés au moustique, comme la salive injectée lors du repas sanguin, peuvent également jouer un rôle important dans la transmission du virus à l'hôte vertébré et le développement de l'infection (Osorio *et al.*, 1996). De nombreuses études ont ainsi été menées pour explorer le rôle des protéines de la salive du moustique dans la transmission des pathogènes. Différentes études utilisant les virus de la Dengue, *West Nile*, *Cache Valley* et VFVR ont montré un rôle important de la salive du moustique dans la transmission du virus, la facilitation et la sévérité de l'infection chez l'hôte vertébré (Surasombatpattana *et al.*, 2012 ; Schneider *et al.*, 2010 ; Edwards *et al.*, 1998 ; Le Coupanec *et al.*, 2013). Récemment le développement de la protéomique a permis d'identifier des protéines de glandes salivaires de moustiques qui interviennent dans la modulation de la réponse immune de l'hôte vertébré, dans la régulation de la coagulation sanguine et dans la prise du repas de sang. Toutefois, aucune molécule active jouant un rôle de facilitation de l'infection n'a été identifiée pour le moment, et ce rôle n'a pas encore été prouvé chez l'Homme. Il serait ainsi important d'utiliser des approches protéomiques (spectrométrie de masse) pour analyser ce phénomène de facilitation de l'infection chez l'Homme par les protéines de glandes salivaires du moustique afin de pouvoir mettre en place des stratégies de contrôle.

Le risque d'émergence de la FVR dans des pays d'Afrique où il n'a jamais circulé, en Europe et en Asie est bien réel, avec des conséquences économiques et sanitaires qui pourraient être considérables. Toutefois, la maîtrise ou le contrôle de cette maladie infectieuse est un défi qui peut être gagné car son développement dépend de facteurs d'émergence et de transmission connus ou identifiables sur lesquels peuvent se

construire des stratégies de contrôle très efficaces. Ces stratégies consisteront à mettre sur pied un ensemble de systèmes efficaces de prédiction d'épidémie, de détection précoce pour une meilleure prise en charge du patient, de prévention de l'infection par la vaccination, et de blocage de la transmission du virus par le vecteur ou d'atténuation de l'infection chez l'Homme.

Les mécanismes d'émergence et de transmission de la FVR sont mieux connus en Afrique de l'Est et du Sud, au point que des modèles prédictifs sont déjà opérationnels (Mark *et al.*, 2015), toutefois bien des choses restent encore non élucidées en Afrique de l'Ouest où les conditions d'émergence, de réémergence et de transmission à l'Homme restent encore à étudier et à comprendre.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse dont les objectifs principaux consistent à :

- Analyser l'épidémiologie moléculaire du VFVR et l'impact de la pluviométrie afin de mieux comprendre les facteurs d'émergence en Afrique de l'Ouest particulièrement au Sénégal, en Mauritanie, au Mali et au Ghana.
- Comprendre les mécanismes de transmission du VFVR en étudiant le rôle de la salive du moustique dans la transmission du VFVR à l'Homme et dans la pathogénèse.

## **PREMIERE PARTIE : GENERALITES SUR LA FIEVRE DE LA VALLEE DU RIFT**

La Fièvre de la Vallée du Rift (FVR) est considérée comme une zoonose majeure, et elle est inscrite sur la liste des maladies épizootiques à déclaration obligatoire de l'Office Internationale des Epizooties (O.I.E) ([http://www.oie.int/fr/fr\\_index.htm](http://www.oie.int/fr/fr_index.htm)) et de l'Institut National des allergies et des maladies infectieuses (NIAID) ([http://www.niaid.nih.gov/biodefense/bandc\\_priority.htm](http://www.niaid.nih.gov/biodefense/bandc_priority.htm)). Elle est également connue sous le nom d'hépatite enzootique du mouton, en raison des lésions caractéristiques d'hépatite observées et de la sensibilité particulière des ovins à cette infection. C'est un véritable fléau économique qui entraîne de lourdes pertes de bétail et des interdictions d'exportations d'animaux dans les pays touchés.

Longtemps considérée comme une affection humaine relativement secondaire, son introduction dans de nouvelles régions comme ce fût le cas en 2000 dans la Péninsule Arabique a considérablement relancé l'intérêt porté à ce virus. L'ampleur des dernières flambées épidémiques survenues en Egypte (1977-1978, 1993), au Kenya (1997-1998, 2006-2007), en Tanzanie (2007) en Somalie (2007), en Arabie Saoudite et au Yémen (2000-2001), au Soudan (2007), à Mayotte (2008), en Mauritanie (2010, 2012 et 2015), au Sénégal (1987, 2013, 2015), au Mali (2015) (Mark *et al.*, 2015; WHO), en Afrique du Sud en 2010 et 2011 (Archer *et al.*, 2013), en Namibie en 2010 (Monaco *et al.*, 2013), au Niger et en Ouganda en 2016 WHO media center, 2016) révèle un problème majeur de santé publique dans les zones où elle sévit.

### **I.1 Historique**

La FVR est l'une des premières arboviroses et zoonoses connues, bien avant l'introduction de ces termes. Le VFVR doit son nom au fait qu'il a été isolé pour la première fois dans la Vallée du Rift au Kenya. Une enquête sur une épidémie touchant les moutons dans une ferme située près du Lac Naivasha au Kenya, a permis d'identifier pour la première fois, en 1931, le virus de la fièvre de la Vallée du Rift (Daubney *et al.*, 1931). Toutefois, des manifestations cliniques de la FVR avaient déjà été décrites en 1910 chez des ruminants dans la même région où 90 % des agneaux moururent (Stordy, 1913 ; Montgomery & Stordy, 1912-1913 ; Kabete, 1910). Sa

transmission à l'Homme fût par la suite constatée chez plusieurs éleveurs en contact avec les animaux infectés. Entre 1948 et 1949, Smithburn et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence l'implication des moustiques dans la transmission du VFVR après isolement à partir de lots d'*Eretmapodites sp* (Smithburn *et al.*, 1948).

Plusieurs épizooties de petits ruminants entraînant des avortements et de la mortalité néonatale chez les ovins ont été rapportées en Afrique de l'Est et du Sud pendant les années de fortes pluies. Entre 1950 et 1951, l'Afrique du Sud a connu une première épidémie majeure qui a tué environ 100 000 ovins et bovins et causé environ 20 000 infections chez l'Homme (Gear *et al.*, 1951).

Des pertes similaires furent enregistrées dans le cheptel au Zimbabwe et en Zambie. De 1953 à 1976, des flambées plus ou moins importantes ont été rapportées en Afrique de l'Est et dans les hauts plateaux d'Afrique du Sud, témoignant d'une circulation enzootique du VFVR dans ces régions (Shimshony & Barzilai, 1983). En Afrique de l'Est la mort d'un patient atteint de FVR en 1975 due à une thrombophlébite compliquée d'infarctus pulmonaire, avait incité certains militaires à envisager son utilisation comme arme biologique. Cependant, les infections sont restées mineures dans le sub-Sahara et ne concernaient que des éleveurs, vétérinaires ou personnels de laboratoire effectuant des autopsies. Elles se manifestaient généralement par une affection fébrile d'évolution bénigne. Toutefois, la situation a brutalement évolué dans les années 1970 avec la sortie du virus de sa région d'endémicité traditionnelle. Après un premier foyer apparu dans le district du Nil Blanc au Soudan (Eisa *et al.*, 1977), une épidémie s'est déclarée en Egypte. Au cours de l'été 1977, les premiers cas ont été signalés en Haute Egypte, dans le département d'Assouan ; et en septembre l'épidémie a éclaté au Nord, dans le delta du Nil, où elle s'est montrée particulièrement meurtrière chez les humains (Meegan *et al.*, 1979). On estime à 20000 le nombre d'humains contaminés et à 600 le nombre de décès suites à de sévères complications (fièvre hémorragique, formes neurologiques avec encéphalite...). Des études sérologiques rétrospectives ont permis de montrer que la maladie animale (moutons, chameaux, chèvres) a précédé les cas humains de quelques mois en Egypte. La FVR a eu un impact dévastateur sur la production de bétail à cause des avortements et de la morbidité enregistrés (Hoogstraal *et al.*, 1978). Depuis, la FVR persiste en Egypte sous forme d'enzootie, avec des résurgences régulières chez le bétail (1978, 1993 et 2003) et quelques cas humains. En 1979, le

VFVR fut mis en évidence à Madagascar à partir d'échantillons de moustiques sans impact observé sur la santé humaine ou animale. Toutefois, entre 1990 et 1991, le VFVR a provoqué plusieurs épizooties marquées par des avortements massifs chez les bovins.

En 1983, Meegan et collaborateurs ont démontré que le virus Zinga (Digoutte, 1981), arbovirus non classé, isolé en République Centrafricaine (RCA) était identique au VFVR, ce qui permet d'étendre la distribution de ce virus au Sénégal, à la Guinée, au Burkina, à la RCA et à Madagascar, établissant ainsi une très large diffusion du VFVR sur le continent Africain (Meegan *et al.*, 1983).

Les fortes pluies qui ont eu lieu dans la corne de l'Afrique en 1997-1998 (Soudan, Ethiopie, Kenya, Somalie) avaient pour conséquence des inondations, une pullulation de moustiques, et des flambées de nombreuses pathologies vectorielles parmi lesquelles la FVR. L'ampleur de l'infection humaine et l'impact économique de la flambée de FVR ont été très importants. Les premières indications avaient fait croire à une épidémie virale d'Ebola, mais cette hypothèse a été par la suite infirmée. Les mortalités animales et humaines enregistrées ont montré qu'il s'agissait de la poussée la plus importante de FVR qui ait été signalée en Afrique orientale et la première à être officiellement enregistrée en Somalie (CDC, 1998). Les enquêtes ont estimé à 27500 les infections humaines dans le district de Garissa, au Nord-Est du Kenya. Les surveillances ont aussi fait état de cas de fièvres hémorragiques, d'encéphalites et de 1000 décès (Woods *et al.*, 2002). Environ 10 ans plus tard, une recrudescence de la maladie, associée à une importante pluviométrie et à une pullulation de moustiques, est notée en Afrique de l'Est et du Sud. En effet, en Décembre 2006, une nouvelle alerte de FVR a eu lieu au Kenya, en Tanzanie, en Somalie et au Burundi (Hassan *et al.*, 2011, Bird *et al.*, 2008, Murithi *et al.*, 2011). Au Kenya, la présence du virus a été observée dans 25 districts faisant environ 200 décès (Bird *et al.*, 2008). Des pertes de bétail allant jusqu'à 70 % chez les ovins et caprins, et de 20-30 % chez les bovins et chameaux, entraînant ainsi la fermeture des principaux marchés de bétail et l'instauration d'interdictions de circulation des animaux. La faune sauvage ne fût pas non plus épargnée : 84 % d'anticorps dirigés contre le VFVR furent trouvés chez les lions, girafes et zèbres testés. À la mi-octobre 2007 les autorités soudanaises déclarèrent la survenue d'un foyer épidémique de FVR dans les provinces du Nil Blanc, de Sinnar et de Gazira avec 698 cas confirmés, dont 211 morts à la date du 15

Janvier 2008 (OMS, 2007). A la même période, une épizootie de FVR avait été signalée chez la population de buffles d'Afrique du Sud (Mpumalanga) (Grobbelaar *et al.*, 2011). En Juin 2008, une manifestation du FVR a aussi été signalée dans des troupeaux de bovins au Swaziland (Grobbelaar *et al.*, 2011).

Ces observations ont incité la surveillance épidémiologique du VFVR dans les régions d'Afrique de l'Ouest et Centrale. Une étude séro-épidémiologique avait mis en évidence une importante circulation du VFVR dans le Sud de la Mauritanie. Ainsi, 17.8 % des petits ruminants présentaient des anticorps contre le virus et 13.3 % des éleveurs se sont révélés positifs (Jouan *et al.*, 1988). C'est dans ce contexte qu'une alerte sur le risque potentiel de manifestations en relation avec l'aménagement du fleuve Sénégal avait été donnée, en souvenir de l'épidémie survenue après la mise en eau du barrage d'Assouan en Egypte en 1977. C'est malheureusement ce qui s'était produit en octobre-décembre 1987 pendant laquelle on avait noté une importante poussée épidémiologique et épizootique à la frontière Sénégalo-Mauritanienne, dans la région de Rosso, nouvellement irriguée par la mise en fonction du barrage de Diama (Digoutte *et al.*, 1987). Cette flambée fût la première manifestation épidémique de FVR notifiée en Afrique de l'Ouest où la présence du virus pourrait remonter au début des années 1930 (Stephanopoulo, 1933 ; Curasson, 1934 ; Findlay, 1936). Au Sénégal, le VFVR, initialement décrit sous le nom de Zinga, a été isolé pour la première fois en 1974 à partir d'un moustique *Aedes dalzieli* à Kédougou. La première manifestation épidémique rapportée a eu lieu à la frontière Sénégalo-Mauritanienne en 1987 avec 1500 infections humaines et plus de 200 morts (Jouan *et al.*, 1988). Depuis cette date, plusieurs foyers de FVR (1993-1994, 1998-1999, 2002-2003, 2010, 2012 et 2015) ont été rapportés au Sénégal et en Mauritanie avec de graves conséquences en zone pastorale où l'élevage est la base du système de production (Faye *et al.*, 2014 ; Sow *et al.*, 2014).

Au Mali, l'infection décrite en 1931 et connue sous le nom de « dioundé » chez les humains et « hépatite nécrosante infectieuse » chez le bétail en 1934 avait été assimilée par la suite à la FVR. Un cas sporadique y a également été notifié en 2015 dans le cas de la surveillance de la Fièvre jaune (CRORA).

Des enquêtes sérologiques et entomologiques ont montré la présence du virus dans de nombreux pays d'Afrique : Mali (Diallo, 2001), RCA (Meegan *et al.*, 1983), Nigéria, Guinée (Boiro *et al.*, 1987), Niger (Akakpo *et al.*, 1991), Burkina Faso (Gonzalez *et*

*al.*, 1992), Cameroun, Bénin, Togo (Zeller, 1993), Tchad (Durand *et al.*, 2003), et Gambie (Thiongane & Martin, 2002). Récemment au Niger en 2016, une épidémie de FVR a été notifiée causant 28 décès (WHO, 2017).

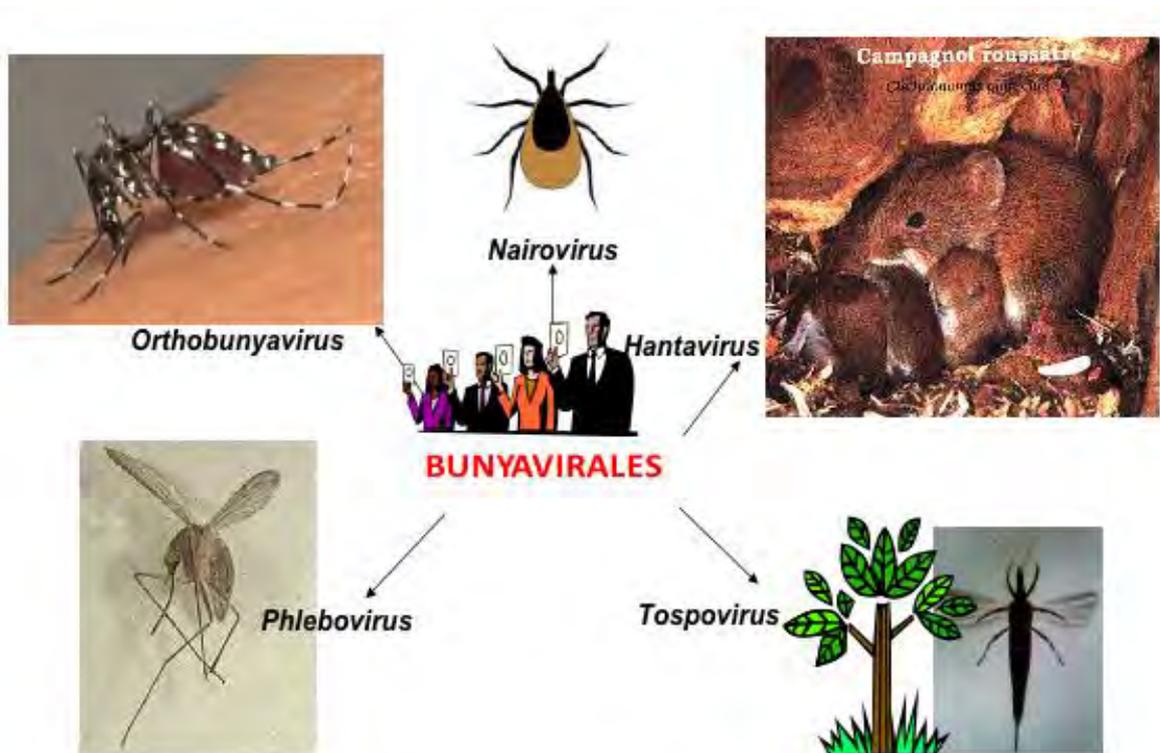
La FVR a été retrouvée aussi hors du continent Africain où elle était restée confinée jusqu'en 2000. En effet, les Ministères de la Santé du Royaume d'Arabie Saoudite et du Yémen reçurent le 10 Septembre 2000, des rapports signalant des cas de fièvres hémorragiques inexpliquées chez les humains et une importante mortalité animale à la frontière entre l'Arabie Saoudite avec le Yémen (*Morbidity and Mortality Weekly report Outbreak of Rift Valley Fever — Saudi Arabia, August–October, 2000 October 13, 2000/Vol. 49/No. 40*). Le 15 Septembre 2000, le CDC (Centers for Disease Control and Prévention- Atlanta, Georgia) confirme le diagnostic de la FVR par isolement du virus, par PCR, immunohistochimie et détection d'antigène et d'IgM par ELISA. L'épidémie a été particulièrement grave dans le bassin versant supérieur du barrage de Jizan, causant ainsi respectivement 884 cas et 124 morts en Arabie Saoudite (dans les provinces de Jizan et d'Azir) et 1087 cas et 121 morts au Yémen. Les pertes en animaux domestiques ont été très importantes (2699 avortements et 943 morts en deux semaines). L'analyse génétique de ces souches virales suggérait une origine d'Afrique de l'Est, et notamment du Kenya à partir duquel l'Arabie saoudite importe des petits ruminants à l'occasion du pèlerinage annuel. 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 à Mayotte en 2008 (Sissokho *et al.*, 2009). En effet, en Septembre 2008, un cas de FVR a été diagnostiqué à Mayotte (Iles Comores) et concernait un enfant de 12 ans dont les premiers symptômes auraient débuté au mois de mai. Les conditions de contamination restent indéterminées, toutefois une suspicion d'épizootie de FVR avait été signalée par les vétérinaires de la région.

## **I.2 Le virus de la fièvre de la vallée du Rift**

### **1.2.1. Classification**

La classification de l'agent pathogène, appelé virus de la FVR (VFVR), a posé problème pendant plusieurs décennies. Il a d'abord été classé dans le groupe des virus de la Fièvre jaune et de la Dengue à cause de la similitude de leurs signes cliniques (Daubney, 1931). Cependant l'absence d'immunité croisée a poussé la communauté

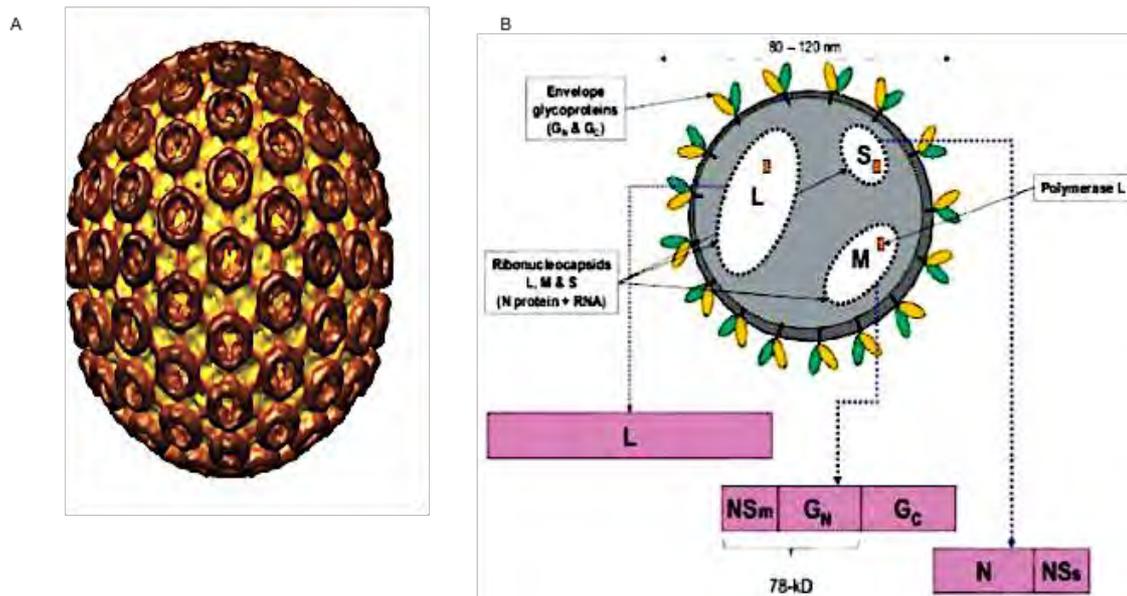
scientifique à réfuter cette hypothèse. Dans les années 1980, des études sérologiques et biochimiques ont permis de le classer dans la famille des *Bunyaviridae* et le genre *Phlebovirus* (Shope *et al.*, 1980, Shimshony & Barzilai, 1983). La famille des *Bunyaviridae* comprend 5 genres : *Phlebovirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Hantavirus* et *Tospovirus* (Figure 1). Les *Bunyaviridae* comptent environ 350 virus qui sont largement répandus. Ils sont pour la grande majorité des arbovirus transmis par des tiques, moustiques ou phlébotomes, à l'exception des *Hantavirus* qui ne sont pas transmis par des arthropodes mais par l'intermédiaire des excréments de rongeurs. Ces virus sont responsables de sérieux dommages chez les humains tels que des fièvres hémorragiques, syndromes pulmonaires, encéphalites etc... En plus du VFVR, on retrouve dans le genre des Phlébovirus, d'autres virus comme *sandfly fever Naples*, *sandfly fever Sicilian*, *Punta Toro*... Recement une nouvelle classification a été proposée et VFVR appartient à l'ordre des Bunyvirales, la famille des Phenuiviridae et au genre Phlebovirus (Roger Hewson., 2017).



**Figure 1: L'ordre des Bunyvirales et les vecteurs associés ( adaptée de Bouloy & Weber, 2010)**

### 1.2.2. Morphologie

La particule du VFVR présente au microscope électronique une structure sphérique de 80 à 120 nm de diamètre, à symétrie hélicoïdale, pourvue d'une enveloppe lipidique d'origine cellulaire (Figure 2). Le virion présente à sa surface 350 à 375 projections de 5 nm de diamètre et de 10 à 18 nm de longueur, formées de deux glycoprotéines G1 ou Gc et G2 ou Gn (Murphy *et al.*, 1973 ; Ellis *et al.*, 1988).



**Figure 2: Morphologie (A) et structure du Virus (B) de la Fièvre de la Vallée du Rift (Ikegami, 2012)**

### 1.2.3. Propriétés physiques et chimiques du virion

Le virus peut être inactivé par les solvants des lipides (éther, chloroforme) et les désinfectants usuels (formol,  $\beta$ -propionolactone, désochylate de soude, solution forte d'hypochlorite de sodium avec plus de 5 ppm de chlore résiduel).

Il peut être détruit également par les solutions à pH acide comme l'acide acétique et inactivé à une température de 56°C pendant 2 heures. Il est stable à des pH compris entre 6,2 et 8 et à 37°C pendant 21 jours (Brès, 1981). Il peut se maintenir plus d'un mois à +4°C tout en gardant ses propriétés antigéniques quand il est stocké en suspension dans du sang ou du sérum (Craig *et al.*, 1967). Le virus résiste bien dans le milieu extérieur et est aussi stable dans les aérosols (Miller *et al.*, 1963).

#### 1.2.4. Organisation du génome et protéines virales

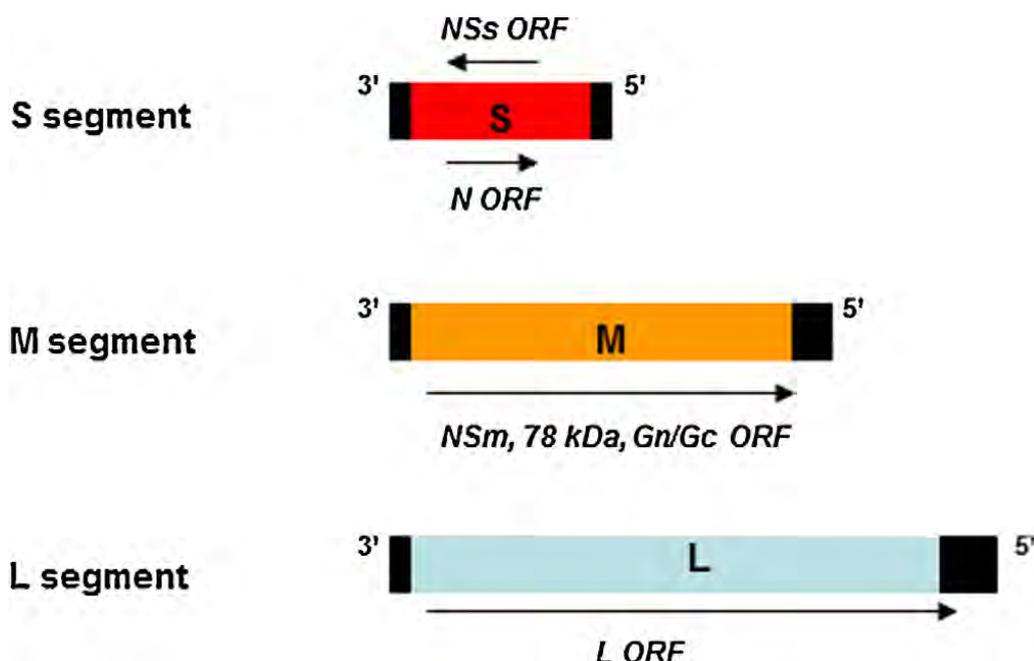
Le génome du VFVR est constitué de trois segments d'ARN simple brin qui sont appelés selon leur taille relative, L, M et S pour *Large*, *Medium* et *Small* respectivement (Figure 3). Chaque fragment d'ARN se trouve sous forme de ribonucléoprotéine (RNP) constituée d'un brin d'ARN, de la nucléoprotéine (N) et de la polymérase ARN-dépendante (L). Les segments apparaissent sous forme circulaire car les extrémités non codantes 3' et 5' ont des séquences complémentaires et par conséquent peuvent s'apparier (Ikegami, 2007). Les segments L et M sont de polarité négative c'est-à-dire qu'ils doivent être préalablement transcrits en ARN messager par l'ARN polymérase avant d'être traduits en protéines. En revanche le segment S présente une polarité ambisens ; la partie 3' du segment est de polarité (-) et la partie 5' de polarité (+). Ces deux portions sont séparées par une région inter génique riche en Guanidine (G).

Le segment L est constitué de 6404 nt (Muller, 1994 ; Bird, 2007), il code dans le sens antigénomique pour la polymérase L (237.49 kDa) qui permet au virus de transcrire son génome. Le segment M (3885 nt ; 1197 aa) code pour une polyprotéine qui subit un clivage co-translationnel pour donner les deux glycoprotéines d'enveloppe (G1/Gc et G2/Gn) ainsi que deux protéines non structurales accessoires NSm et NSm' respectivement de 78 et 14 kDa (Ikegami, 2005). Les glycoprotéines Gn et Gc (respectivement de 65 et 56 kDa) seraient responsables de la fixation du virus à la surface des cellules hôtes. L'analyse des propriétés antigéniques de ces glycoprotéines met en évidence divers épitopes cibles d'anticorps neutralisants et hémagglutinants du VFVR (Keegan & Marc, 1986).

La fonction des protéines non structurales est méconnue. Cependant, un VFVR recombinant qui n'exprime pas NSm et NSm' se réplique normalement comme le virus sauvage. Ce qui suggère que NSm et NSm' ne sont pas indispensables pour la réplication du virus. En revanche, certains travaux ont montré qu'elles pourraient intervenir dans la pathogénicité du VFVR (Ikegami *et al.*, 2007). Une étude sur la souche ZH501 dépourvue de NSm avait montré un retard de trouble neurologique et la mort des rats seulement 13 jours post - infection avec un taux de mortalité allant de 50 à 70 % alors que les rats infectés par la souche sauvage ZH501 avaient développé une hépatite aigue avec un taux de mortalité de 100 % à 3 jours post - infection. Ces résultats suggèrent que les protéines Nsm jouent un rôle mais ne sont pas un facteur

essentiel de virulence et de létalité (Bird *et al.*, 2007). Il a été montré aussi qu'un recombinant VFVR de la souche MP-12 dépourvues des protéines Nsm et Nsm', entraîne une accentuation de l'apoptose comparée à la souche MP-12 sauvage en culture cellulaire et que l'expression de Nsm inhibe significativement le clivage des caspase-8 et -9 produites par la Staurosporine (Won *et al.*, 2007). Ceci montre que la protéine Nsm supprime l'apoptose de la cellule hôte infectée et favorise ainsi la pathogénicité du virus.

Le segment S (1690-1692 nt ; 563-564 aa) exprime deux protéines selon une stratégie ambisens. Ces protéines sont traduites à partir de deux ARNm de polarité opposée : l'ARNm codant pour la nucléoprotéine N est de sens anti-génomique et l'ARNm codant pour une protéine non structurale appelée NSs est de sens génomique. Pour une raison encore mal connue, la protéine NSs s'accumule sous forme de filaments, observables au microscope, dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau des cellules infectées alors que le cycle viral se déroule entièrement dans le cytoplasme (Struthers & Swanepoel, 1982 ; Ellis 1988 ; Yadani *et al.*, 1999 ; 2000). Cette localisation nucléaire est particulière à la protéine NSs du VFVR puisque toutes les protéines NSs des autres *phlebovirus* connus sont présentes uniquement dans le cytoplasme (Goldbach & Peters, 1996). Cette phosphoprotéine synthétisée peu de temps après l'infection (environ 5 heures plus tard) (Ikegami, *et al.*, 2005) joue un rôle majeur dans la virulence du VFVR *in vivo* et la cytotoxicité en cultures cellulaires. En effet, l'analyse génétique du mutant Clone 13 atténué, pour lequel a été observée une grande délétion (70 %) de la protéine NSs, a permis de montrer qu'elle bloque la réponse antivirale de l'hôte en empêchant la production d'interféron (IFN alpha et bêta) (Vialat *et al.*, 2000 ; Bouloy *et al.*, 2001 ; Billecocq *et al.*, 2004 ; Le May *et al.*, 2004). En effet, la protéine NSs empêche la transcription des gènes de l'hôte en même temps que la transcription des interférons de type I et ISGs (*interferon stimulated genes*), limitant ainsi la réponse antivirale. La protéine NSs entraîne aussi la dégradation de la protéine kinase R (PKR), empêchant ainsi la production de eIF2 alpha de l'hôte et entraînant la synthèse efficiente de protéines virales (Yang *et al.*, 1995, Frese *et al.*, 1996).



**Figure 3: Les différents segments du virus de la Fièvre de la Vallée du Rift (Mansfield, 2015)**

### 1.2.5. Cycle de multiplication

Le VFVR infecte préférentiellement les hépatocytes. Les divers types de cellules capables d'être infectés expérimentalement par le virus (Filone, 2006) ainsi que l'éventail de tissus trouvés infectés chez les animaux et les insectes laissent supposer un tropisme très diversifié du virus. L'interaction initiale du virus avec la cellule passe par la fixation des glycoprotéines virales G1 et G2 (Schmaljohn, 1996) à la surface des cellules hôtes. Ce large tropisme du VFVR pourrait être expliqué soit par la présence ubiquitaire de récepteurs spécifiques sur la membrane de diverses cellules, soit par la multitude de récepteurs capable d'interagir avec ces glycoprotéines G1 et G2. Cependant, aucun récepteur impliqué dans l'attachement du virus aux cellules n'a encore été identifié pour les *phlebovirus* (Elliott *et al.*, 1991). Des observations au microscope électronique ont montré que le VFVR pénètre dans les hépatocytes et les cellules Véro (cellules de rein de singe) par fusion avec la membrane plasmique suivie d'endocytose (Filone *et al.*, 2006). Les structures virales sont ensuite dégradées, à l'exception du génome qui se trouve libéré dans le cytoplasme où ont lieu la transcription, la traduction et la réplication. Comme pour tous les virus à ARN

négatif, le cycle de synthèse des ARN viraux se fait en deux étapes. D'une part, la transcription primaire permet la synthèse des ARNm coiffés en 5' mais non polyadénylés en 3' (Gauliard, 2006), grâce à la protéine L associée aux particules infectantes. D'autre part, il y a la transcription secondaire au cours de laquelle les matrices de réplication (ARNc ou anti-génomique) sont synthétisées et vont être à leur tour transcrites en génomes par l'ARN polymérase. De façon générale, chaque segment contient une phase de lecture ouverte à partir d'un ARNm monocistronique, sauf le segment S qui code pour deux protéines (la nucléoprotéine N et la petite protéine non structurale NSs) non chevauchantes. Les glycoprotéines de l'enveloppe subissent différentes étapes de maturation en passant le réticulum endoplasmique puis au Golgi où a lieu la formation des particules virales par bourgeonnement (Gerrard & Stuart, 2002). Il a été observé aussi, que les virions peuvent se former au niveau de la membrane plasmique des hépatocytes infectés (Anderson & Smith, 1987). Environ 13 heures après infection, les particules virales matures néo-synthétisées peuvent être détectées dans le cytoplasme des cellules hôtes, avant la lyse de ces dernières (Ellis, 1988). Cependant, il a été montré que certaines cellules infectées peuvent établir une infection persistante (Bilcocq, 1996).

#### **1.2.6. Variabilité génétique**

Le VFVR présente une variabilité génétique due à des mutations du génome lors de la réplication (Battle & Dalrymple, 1988). Les mécanismes de variation du génome peuvent aller des changements intramoléculaires (mutations ponctuelles, insertions, délétions) à des échanges de segments (réassortiment). Aucune recombinaison n'a encore été décrite (Bird *et al.*, 2007). Ces mutations peuvent intervenir sur la pathogénicité du VFVR puisque l'analyse des propriétés antigéniques du VFVR a révélé un groupe de souches d'Égypte très virulentes et résistantes à l'interféron A et B chez les rats Wistar-Furth et un groupe de souches d'Afrique Subsaharienne peu pathogènes chez ces mêmes hôtes (Anderson *et al.*, 1988 ; Saluzzo *et al.*, 1989). Le regroupement des souches selon l'origine géographique a permis de les classer en lignées.

### ❖ La classification de Sall et collaborateurs

D'abord deux lignées ont été identifiées après alignement des séquences de NSs de 18 souches différentes collectées sur une période de plus de 38 ans et dans diverses localités en Afrique (Sall *et al.*, 1997 ; 1999). La NSs a été choisie par ce que c'est la zone la plus variable des *phlebovirus*, elle est donc considérée comme étant soumise à une faible pression évolutive. La NSs varie de 9,6% au niveau nucléotidique et 9,5% au niveau des acides aminés. Les analyses phylogénétiques ont permis aux auteurs de décrire 2 lignées majeures :

- la lignée I (sub-saharienne),
- la lignée II qui regroupe les souches d'Égypte de 1977 à 1993.

Durant l'épidémie de Mauritanie de 1987 les auteurs ont introduit les gènes Gn et L dans l'analyse phylogénétique et ont constaté que la lignée Ia est localisée en Afrique de l'Est mais également en Afrique centrale. La lignée Ib est localisée en Afrique de l'Ouest et la lignée II en Égypte (Sall *et al.*, 1999) ce qui leur a permis de décrire 3 lignées :

- la lignée Ia qui regroupe les souches d'Afrique de l'Est et Centrale,
- lignée Ib qui regroupe les souches d'Afrique de l'Ouest,
- la lignée II qui regroupe les souches d'Égypte de 1977 à 1993.

### ❖ La classification de Bird et collaborateurs

Le développement récent du séquençage à haut débit a permis d'avoir plus de données disponibles pour des analyses phylogénétiques plus importantes. Bird et ses collaborateurs (2007) ont mis en place la première étude phylogénétique sur des génomes complets de VFVR en utilisant 33 souches isolés de 1944 à 2000 dans 10 différents pays d'Afrique et en Arabie Saoudite (Bird *et al.*, 2007c). Le maximum de différences par paire pour les segments S, M et L était respectivement de 4%, 5% et 4% au niveau nucléotidique et de 1% 2% et 1% au niveau des acides aminés. Ces 33 souches pouvaient ainsi être séparées en 7 lignées (A-G).

- A (isolée au Zimbabwe en 1974, en Égypte en 1977, 1978 et 1979, à Madagascar en 1979)
- B (isolée au Kenya en 1983 et 1998, en République Centrafricaine (RCA) en 1973 et en Arabie Saoudite en 2000)
- C (isolée en Guinée en 1981 et 1984, en République Centrafricaine en

1969, 1973 et 1974 et au Zimbabwe en 1978)

- D (isolée au Kenya en 1965, au Zimbabwe en 1970, en Afrique du Sud en 1975, au Burkina Faso en 1983 et en Mauritanie en 1987)
- E (isolée en Uganda en 1944 et au Zimbabwe en 1974)
- F (un isolat de Zimbabwe en 1974)
- G (un isolat d'Afrique du sud en 1951).

#### ❖ **La classification de Grobbelaar et collaborateurs**

La plus large étude phylogénétique connue de nos jours a été effectuée par Grobbelaar et ses collaborateurs qui ont utilisé une séquence partielle du segment M de 203 souches isolées dans 10 différents pays d'Afrique et en Arabie Saoudite entre 1944 et 2010 (Grobbelaar *et al.*, 2011). Le maximum de différence par paire observé est de 2.8% au niveau nucléotidique et de 5,4% au niveau des acides aminés. Cette étude a permis de distinguer 15 lignées (A-O)

- A (isolée au Zimbabwe en 1974 et 1978, en Egypte en 1977, 1978, 1979 et 1993, et à Madagascar en 1979, suggérant que les épidémies qui sont survenues en Egypte et à Madagascar sont le résultat d'importations venant de Zimbabwe)
- B (isolée au Kenya en 1972)
- C (isolée au Zimbabwe en 1976, 1978, 1979 et 1998, au Kenya en 1977, 1983, 1997, 1998 et 2007, en Arabie Saoudite en 2000, en Somalie en 1998, en Afrique du Sud en 1999, 2008 et 2009, à Madagascar en 1991 et 2008, et en Mauritanie en 2003, suggérant que les épidémies d'Arabie Saoudite, d'Afrique du sud, de Madagascar, et Mauritanie sont le résultats d'importations à partir du Zimbabwe ou du Kenya).
- D (isolée en République Centrafricaine en 1973)
- E (isolée au Zimbabwe en 1975 et 1978, en République Centrafricaine en 1973 et 1974, et en Zambie en 1985)
- F (isolée en Afrique du sud en 1981)
- G (isolée en République Centrafricaine en 1969 et 1985, en Guinée en 1981 et 1984, au Sénégal en 1993 et au Zimbabwe en 1978)
- H (isolée en Afrique du sud en 2009 et 2010)
- I (isolée en Afrique du sud en 1955 et 1956)

- J (isolée au Zimbabwe en 1974)
- K (isolée d'Ouganda en 1944, du Kenya en 1951, 1962 et 1963, d'Afrique du Sud en 2010 et l'isolat 2373/74 du Zimbabwe en 1974, plus la souche Smithfield neurotropic (SNS) et la souche vaccinale 95EG)
- L (isolée en Egypte en 1995, du Kenya en 1963 et 1964, d'Afrique du sud en 1971, 1974 et 1975 et du Zimbabwe en 1969 et 1970)
- M (isolée d'Ouganda en 1955 et d'Afrique du sud en 1955)
- N (isolée en Mauritanie en 1987 et 1988, au Sénégal en 1975, 1983 et 1993 et au Burkina Faso en 1983.
- O (isolée d'Afrique du Sud en 1951).

Cette étude comparée à celle de Bird (Bird *et al.*, 2007c) a réarrangé les anciennes lignées B et C pour créer C, D, E et F et l'ancienne lignée D a été revisitée pour donner les nouvelles lignées L et N.

#### ❖ **Recombinaisons et réassortiments**

En plus de l'existence de plusieurs lignées, le réassortiment et la recombinaison qui est un phénomène rare pour les virus à ARN négatif, peuvent intervenir dans cette diversité génétique du VFVR. Le phénomène de réassortiment (échange de segments génomiques entre deux virus proches à génomes segmentés) est courant chez les virus à ARN segmenté et a été décrit pour la première fois chez VFVR par Sall et collaborateurs qui ont trouvé en 1987 en Mauritanie un virus dont le segment S appartient à la lignée Ia et les segments M et L à la lignée Ib (Sall *et al.*, 1999). De même en 1984 au Sénégal, une souche présentait un segment S appartenant à la lignée II et les segments M et L à la lignée Ib (Sall *et al.*, 1999). En Guinée en 1984, une souche de VFVR a été décrite avec le segment S appartenant à la lignée Ib et les segments M et L à la lignée Ia (Ikegami, 2012). Ces combinaisons de segments à partir de virus appartenant à des lignées différentes indiquent que les réassortiments résultent de la coïnfection de l'hôte par deux virus différents. Cependant, Bird et collaborateurs n'ont pas trouvé de réassortant dans leur étude avec les 33 génomes complets (Bird *et al.*, 2007c) alors que dans une autre étude qu'ils ont menée au Kenya en 2006-2007, ils ont pu détecter un réassortant (Bird *et al.*, 2008). Grobbelaar et collaborateurs ont également trouvé un réassortant entre la souche vaccinale Smithburn et un virus de la lignée H dû à une coïnfection accidentelle chez l'homme

(Grobbelaar *et al.*, 2011). Cependant aucune recombinaison n'a été décrite pour le VFVR.

#### ❖ Circulation concomitante de plusieurs lignées en Afrique

En Afrique de l'Est, les analyses phylogénétiques montrent une circulation concomitante de plusieurs de ces lignées. Selon l'analyse la plus récente, les virus du Kenya appartiennent aux lignées B, C, K et L, la majorité étant de la lignée C, confirmant ainsi que des lignées multiples circulent en parallèle entre les espèces réservoirs locales (Grobbelaar *et al.*, 2011). En effet, une analyse de génomes complets de 16 souches de VFVR isolées à partir d'humains, d'animaux et de moustiques durant l'épidémie de 2006-2007 au Kenya, a révélé la circulation de 3 lignées distinctes qui présentent une similarité avec les souches des épidémies du Kenya de 1980, 1998 et de l'Arabie Saoudite de 2000 (Nderitu *et al.*, 2011). De plus, on observe peu de divergences de séquences au cours du temps : les virus isolés d'une vache en 1977 et d'*Aedes mcintoshi* en 1983 sont étroitement liés aux virus responsables des poussées en 1997-1998 et 2006-2007 au Kenya (Bird *et al.*, 2008 ; Grobbelaar *et al.*, 2011).

En Afrique de l'Ouest, plusieurs épidémies ont été notées entre 1987 et 2016 notamment en Mauritanie. Durant l'épidémie de 1989 les souches isolées appartiennent à la lignée Afrique de l'Ouest tandis qu'en 2003 l'épidémie était due à la lignée Afrique Est/Centrale (Faye *et al.*, 2007). Les souches identifiées durant cette épidémie de 2003 en Mauritanie sur la base de séquences partielles de génomes, partagent un ancêtre commun avec les souches de Madagascar 1991, Kenya 1997, Tchad 2001 et Arabie saoudite 2001 appartenant à la lignée de l'Afrique de l'Est/Centrale correspondant à la lignée C (Faye *et al.*, 2007 ; Grobbelaar *et al.*, 2011). Cette lignée C comprend également des souches isolées au Zimbabwe depuis 1976-1979, ce qui suggère que les virus originaires du Zimbabwe pourraient être responsables de foyers en Mauritanie, au Kenya, en Afrique du Sud et à Madagascar (Bird *et al.*, 2007c, Carroll *et al.*, 2011). Concernant les épidémies de 2010 et 2012 en Mauritanie, les études phylogénétiques basées sur des séquences partielles du segment S des souches isolées, ont montré une réémergence de la lignée d'Afrique de l'Ouest (Faye *et al.*, 2014, Sow *et al.*, 2014). En 2013, un cas sporadique de FVR et un

moustique positif de VFVR ont été enregistrés au Sénégal et les analyses préliminaires des séquences partielles ont montré une proximité avec des souches ayant circulé en Egypte en 1977-1978 (Sow *et al.*, 2016).

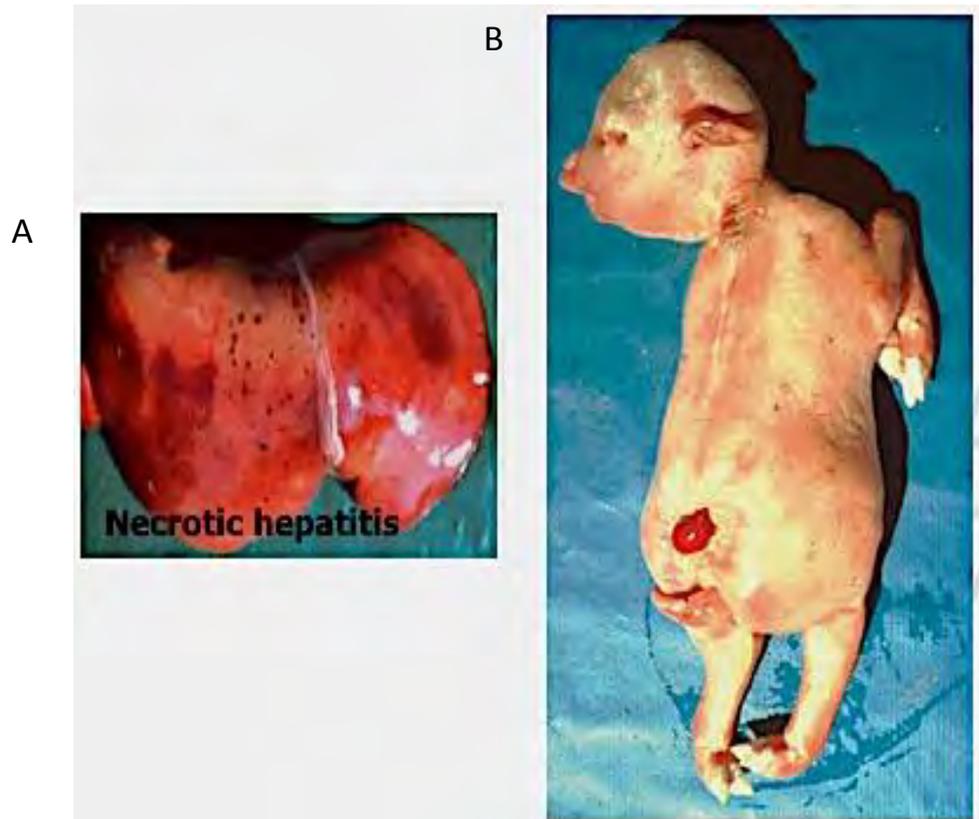
De façon générale, malgré l'existence de toutes ces lignées, il apparaît une faible différence antigénique entre les souches de VFVR collectées durant plusieurs années à travers l'Afrique (Meegan & Bailey, 1988). Les souches présentent une faible diversité génétique de l'ordre de 4 % au niveau nucléotidique et de 1 % au niveau protéique (Pepin *et al.*, 2010).

### **I.3. Epidémiologie**

#### **1.3.1. Hôtes et symptômes**

Le virus de la FVR peut infecter les animaux domestiques (ovins, caprins, bovins, camélidés), sauvages (gnous, antilopes, buffles), certaines espèces de rongeurs ainsi que l'Homme (McGavran & Easterday, 1963 ; Peters & Anderson 1981 ; Shimshony & Barzilai, 1983 ; Peters *et al.*, 1988 ; Anderson 1988). Cependant l'expression clinique varie selon l'espèce et l'âge des hôtes.

Parmi les animaux, les dromadaires, les ovins, caprins et bovins et en particulier les femelles gestantes et les nouveau-nés semblent être les plus vulnérables à la maladie. Le taux d'avortement chez les femelles infectées atteint près de 100 %. Le plus souvent, une épizootie de FVR se manifeste d'abord par une vague d'avortements inexplicables dans le cheptel et cela peut être l'un des signes annonciateurs d'une épidémie (Easterday, 1965 ; Shimshony & Barzilai, 1983). Les avortements précoces sont probablement le résultat de la forte fièvre associée à la phase aiguë de la maladie, tandis que les avortements tardifs sont le plus souvent le résultat direct de l'infection du fœtus, qui entraîne une nécrose hépatique (Swanepoel & Coetzer, 2004). Plus de 90 % des jeunes animaux (agneaux par exemple) infectés par la FVR meurent avec un tableau de nécrose hépatique (Figure 4).



**Figure 4: Manifestations chez l'animal, nécrose hépatique (A) et avorton (B) (Mansfield, 2015)**

Chez l'Homme, la période d'incubation varie de 2 à 6 jours. Le tableau clinique de l'infection humaine se caractérise généralement par un syndrome pseudo-grippal avec une fièvre d'apparition brutale, des céphalées, des douleurs musculaires et des vomissements, lesquels sont suivis dans la majorité des cas d'une guérison du patient. Cependant, la maladie peut évoluer dans 1 à 3 % des cas vers une forme sévère, associée à 50 % de mortalité. Chez ces patients, il a été observé des hépatites avec ictère, des syndromes hémorragiques (selles sanglantes, saignement des gencives, vomissement de sang), des lésions hémorragiques (pétéchies) (Figure 5), des encéphalites, des méningo-encéphalites et des pathologies oculaires pouvant entraîner une cécité temporaire ou définitive (Ikegamie, 2011).



**Figure 5: Manifestations chez l'Homme (pétéchies et hémorragies) (Paweska, 2010)**

### 1.3.2. Vecteurs

De nombreux travaux ont démontré l'implication des moustiques (Diptères) hématophages (*Culex*, *Aedes*, *Mansonia*) dans la transmission du VFVR (Smithburn, 1949). Plus de 30 espèces de moustiques ont été trouvées associées à ce virus, témoignant de son caractère opportuniste (Smithburn, 1949 ; House *et al.*, 1992 ; Turell *et al.*, 1996; Fontenille *et al.*, 1998; Jupp *et al.*, 2000). Ce manque de spécificité laisse penser que le VFVR est susceptible de s'adapter à différents vecteurs. En Afrique de l'Ouest, le VFVR 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* (Fontenille *et al.*, 1998). Au Sénégal il a été montré que les espèces *Aedes vexans*, *Culex poicilipes* et *Culex quinquefasciatus* sont compétentes pour transmettre le VFVR avec un rôle plus important pour *Aedes vexans* (Ndiaye *et al.*, 2016). En dehors des moustiques, d'autres arthropodes comme les cératopogonidés, les tiques et les simulies ont été trouvés naturellement infectés par le VFVR. Par ailleurs, il a été démontré expérimentalement que *Phlebotomus duboscqi* est compétent pour la transmission du VFVR (Turell & Perkins, 1990).

### 1.3.3. Cycles et modes de transmission

L'épidémiologie de la FVR repose sur un schéma à trois phases de transmission que sont la maintenance, l'amplification et l'épizootie ou l'épidémie suivant la population affectée (Figure 6).

- Le cycle de maintien se déroule chez les femelles des moustiques du genre *Aedes* par la transmission verticale du virus dans leurs œufs qui résistent bien à la dessiccation (Romoser *et al.*, 1992). Ce mode de transmission permet la survie du virus pendant les périodes inter-épizootiques. Les œufs ainsi infectés peuvent persister pendant plusieurs années dans la nature avant d'éclore et de donner des adultes également infectés.

- Le cycle d'amplification du VFVR qui se développe lorsque les conditions écologiques favorisent la pullulation de moustiques infectés. Le virus circule alors d'un ruminant contaminé à un autre sain par l'intermédiaire des vecteurs lors de la prise de repas de sang. On assiste alors à une rapide augmentation des sources d'infection (animaux virémiques en grand nombre) pour les différentes espèces de moustiques. La contamination indirecte par piqûre d'insectes hématophages est la principale voie de transmission chez les animaux.

- Le cycle épizootique ou épidémique qui se développe lorsque le cycle d'amplification s'étend à une importante population animale et/ou humaine. Ainsi, l'homme peut se contaminer soit par :

- \***Contact direct avec du sang, des tissus infectés**, des avortons ou des liquides physiologiques d'animaux morts ou malades en périodes d'épidémie lorsque ces derniers sont virémiques. Les fermiers, les bergers, le personnel des abattoirs, les bouchers et les vétérinaires se contaminent fréquemment au cours de l'abattage ou de la découpe, pendant les mises-bas, les interventions vétérinaires ou lors de l'élimination des carcasses ou des fœtus (Chambers & Swanepoel, 1980 ; Pepin *et al.*, 2010).

- \***Aérosols ou inhalation de particules virales** : ce mode de transmission a été rapporté dans les infections de laboratoires (Gear *et al.*, 1951).

- \***Piqûre de moustique infectés** : le virus contenu dans la salive de moustique est transmis à l'Homme lors d'un repas sanguin (Styer *et al.*, 2011, Tchankouo-Nguetcheu *et al.*, 2012, Girard *et al.*, 2010, Le Coupanec *et al.*, 2013). La compétence vectorielle dépend de facteurs intrinsèques du moustique comme l'ARN

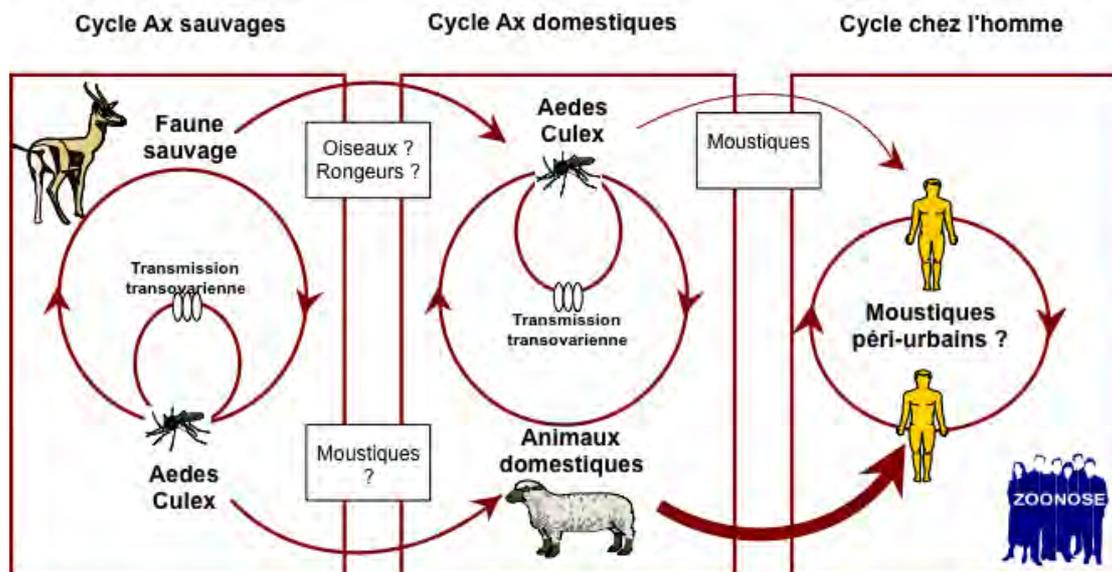
interférence (Franz *et al.*, 2006 ; Khoo *et al.*, 2010) et du virus comme la variabilité génétique (Ndiaye *et al.*, 2016). D'autres facteurs du moustique comme la salive injectée lors du repas sanguin peuvent également jouer un rôle dans la transmission du virus à l'hôte vertébré et la pathogenèse chez l'hôte vertébré. En effet lors d'un repas sanguin le moustique est confronté à plusieurs obstacles tels que l'hémostase et la réponse immunitaire de l'hôte et c'est dans ce contexte qu'intervient la salive en jouant plusieurs rôles. Il a ainsi été montré avec le virus de la Dengue que la co-injection du virus avec la salive du moustique augmente l'infection virale chez l'hôte vertébré (Surasombatpattana *et al.*, 2012). Il a aussi été observé une plus longue virémie chez les biches et les tamias infectés par piqûre de moustique contenant le virus La Crosse en comparaison à l'infection avec une seringue (Osorio *et al.*, 1996). Concernant le VFVR, des études antérieures ont montré que les extraits de salive d'*Aedes aegypti* et d'*Aedes vexans vexans* entraînent une accentuation de la FVR chez la souris (Le Coupanec *et al.*, 2013). L'ensemble de ces études a montré donc que cette salive des arthropodes, injectée à l'hôte vertébré lors d'un repas de sang, joue un rôle crucial dans la capacité du vecteur à transmettre efficacement les pathogènes, ainsi que dans la pathogenèse. Il a été montré aussi que la salive de moustique induit une augmentation du taux de cytokines de type Th2 et diminue le taux de cytokine de type Th1 (Zeidner *et al.*, 1999) qui ne sont pas favorables à une réponse immune effective contre une infection virale (Yang *et al.*, 2001 ; Shrestha *et al.*, 2008). Les protéines contenues dans la salive de moustique pourraient ainsi moduler la réponse immune de l'hôte et faciliter l'infection virale. Le développement de la protéomique a permis d'identifier des protéines de glandes salivaires de moustiques qui interviennent dans la modulation de la réponse immune de l'hôte vertébré parmi lesquelles on peut citer la famille D7 (Calvo *et al.*, 2006a), l'adénosine deaminase (Hasko *et al.*, 2000), l'apyrase (Sun *et al.*, 2006) et l'allergène de 30kDa (Ribeiro *et al.*, 2007). Les membres de la famille des serpins ont été identifiés et seraient impliqués dans la régulation de la coagulation sanguine (Gettins, 2002). Les protéines de surface des glandes salivaires (SGS) ont été décrites comme étant très immunogènes et seraient impliquées dans la prise du repas sanguin (King *et al.*, 2011). D'autres protéines dont la fonction dans la salive est inconnue comme les Vitellogenine-C et Vitellogenine-B (Ribeiro *et al.*, 2007) ont aussi été identifiées. La protéomique des glandes salivaires de moustique a été effectuée pour certaines espèces comme *Aedes albopictus* (Arca *et*

*al.*, 2007), *Anopheles gambiae* (Kalume *et al.*, 2005, Choumet *et al.*, 2007), *Anopheles stephensi* (Valenzuela *et al.*, 2003), et *Culex pipiens quinquefasciatus* (Ribeiro *et al.*, 2004). Toutefois aucune protéine n'a été identifiée à ce jour comme jouant le rôle de facilitateur de l'infection virale chez l'hôte vertébré.

#### **\* Infection verticale**

Durant l'épidémie d'Arabie Saoudite, il a été rapporté un cas potentiel d'infection verticale concernant une femme enceinte qui présentait de la fièvre, des maux de tête, des vertiges, des myalgies 4 jours avant son accouchement, et qui présentait des IgG spécifiques de VFVR (Arishi *et al.*, 2006). Le bébé a développé des anticorps IgM contre le VFVR avec de la jaunisse et est décédé 6 jours après sa naissance (Arishi *et al.*, 2006). Bien qu'il n'y ait pas d'évidence que le bébé soit mort de FVR, il est possible qu'une infection verticale utérine soit survenue dans ce cas. Récemment l'implication de VFVR dans les avortements de femmes enceintes a été montré au Soudan (Baudin *et al.*, 2016).

L'Homme est généralement considéré comme un « cul-de-sac épidémiologique », car la transmission d'Homme à Homme (ou de l'Homme à une autre espèce réceptive) n'a jamais pu être observée. A ce jour, il n'y a jamais eu de cas documenté de transmission interhumaine du VFVR. Il n'a été signalé aucun cas de contamination des agents de santé lorsque les précautions normales de lutte anti-infectieuse ont été prises. De nombreuses investigations ont été menées sur l'implication de la faune sauvage vertébrée (principalement les rongeurs, les oiseaux et les primates) dans le cycle de transmission du VFVR (Saluzzo *et al.*, 1986 ; Pretorius *et al.*, 1997 ; Diop *et al.*, 2000). Toutefois, à ce jour, le rôle de ces espèces dans l'épidémiologie du VFVR n'est toujours pas élucidé.



Ax : Animaux

**Figure 6: Cycle de transmission du Virus de la Fièvre de la Vallée du Rift**

#### 1.3.4. Facteurs d'émergence

Il est essentiel de connaître les facteurs responsables de l'émergence du VFVR afin d'identifier les mesures de contrôle qu'il est nécessaire d'instaurer pour prévenir sa réémergence. L'analyse de l'histoire naturelle du VFVR a conduit à la description de plusieurs facteurs qui pourraient être impliqués dans l'émergence de la maladie. Ces facteurs incluent :

- **Introduction d'une espèce d'hôte sensible en zone d'endémie**

La première épizootie de FVR de 1930-1931 avait fait suite à l'importation de moutons à laine d'Europe au Kenya. Il a été avancé l'hypothèse selon laquelle l'émergence du VFVR aurait eu pour origine l'introduction d'une nouvelle race de moutons dans cette région endémique (Johnson, 1993).

- **Modification génétique du virus**

L'épidémie égyptienne de 1977 s'était montré particulièrement sévère pour les Hommes. Les souches virales isolées dans ce foyer ont été testées chez des animaux de laboratoire et s'étaient révélées plus pathogènes que celles d'Afrique subsaharienne (Anderson *et al.*, 1988). Cette virulence accrue pourrait être due à une modification génétique du virus. Des études phylogénétiques (Sall *et al.*, 1999) classent ces souches égyptiennes dans un même groupe et semblent renforcer cette hypothèse.

#### ▪ **Phénomènes climatologiques**

La dynamique des populations des vecteurs est intimement liée aux changements climatiques. En Afrique Orientale et Australe, des corrélations significatives entre les inondations intervenues suite aux changements climatiques (probablement liés à l'effet El Niño) et de nombreuses épizooties rapportées ont été démontrées (Grobbelaar *et al.*, 2011). En Afrique de l'Est par exemple, les foyers de VFVR sont associés à de fortes pluies persistantes accompagnées d'inondations durables et d'une forte circulation de moustiques, qui sont potentiellement vecteurs. En Afrique de l'Ouest, un changement épidémiologique du VFVR a été noté dans les années 1980. Ce changement serait dû aux variations climatiques entraînant l'émergence et la propagation de moustiques compétents des genres *Aedes* et *Culex* dans les populations de ruminants au Sénégal et en Mauritanie (Mark *et al.*, 2015). A titre d'exemple, les poussées épizootiques enregistrées au Kenya en 1997-1998 et en 2006-2007 ont toutes été précédées par des pluies abondantes. L'inondation des *damboes*, niches écologiques des moustiques, aurait favorisé l'éclosion massive d'œufs d'*Aedes*, réservoirs du VFVR, et par conséquent l'initiation du cycle de la transmission du VFVR (Imadeldin *et al.*, 2013). Il a été rapporté aussi que les vents faibles à modérés peuvent transporter les insectes sur de grandes distances. Sellers et collaborateurs (1982) soutiennent l'hypothèse d'un transport par le vent de moustiques infectés ayant pu introduire le VFVR en Egypte depuis le Soudan (Sellers *et al.*, 1982).

#### ▪ **Modifications de l'écologie du milieu**

Les épidémies/épizooties apparues en Egypte en 1977 et à la frontière Sénégal-Mauritanienne en 1987 sont associées à la construction des barrages sur le Nil et dans la vallée du fleuve Sénégal respectivement (Digoutte *et al.*, 1989). De même, des changements dans les pratiques agricoles à Madagascar sont incriminés dans la survenue de flambées en 1991 (Andriamandimby *et al.*, 2010). Les aménagements hydro-agricoles sont souvent accompagnés de développement de nouveaux gîtes de moustiques et d'autres arthropodes vecteurs de la FVR. Une très forte densité de moustiques particulièrement de *Culex* avait été observée durant l'épidémie de 1977 et de 1993 dans les régions irriguées en Egypte.

#### ▪ **Mouvement d'hôtes infectés en zones exemptes du VFVR**

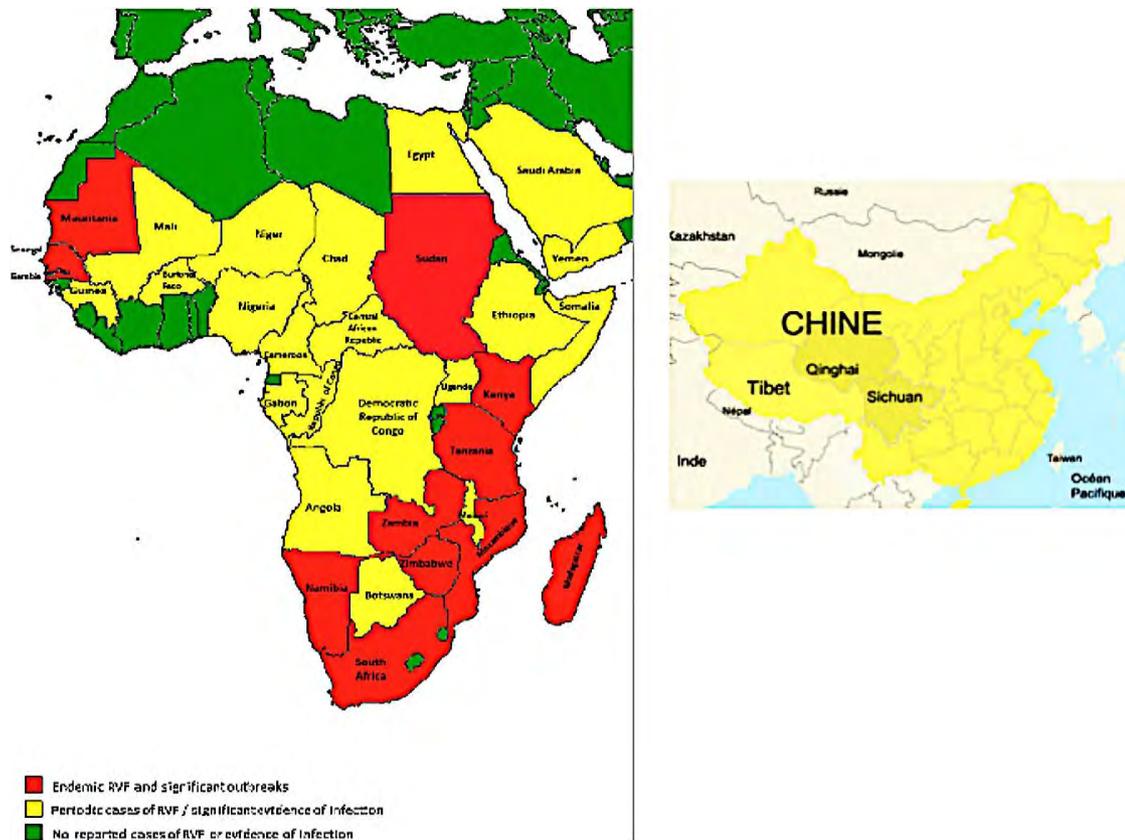
La FVR a été à l'origine d'une épidémie en 2000 en Arabie Saoudite et au Yémen où aucune activité du virus n'avait été observée auparavant (Miller *et al.*, 2002). L'Arabie Saoudite importe plusieurs millions d'ovins et de caprins chaque année à partir du Soudan et de l'Afrique de l'Est. L'hypothèse émise suggère que le VFVR proviendrait de moustiques infectés ou de ruminants en phase d'incubation virale importés. Le virus aurait trouvé sur place des conditions favorables à sa multiplication et dissémination (écosystème et/ou populations d'hôtes sensibles non immunisées). L'analyse génétique des souches isolées durant cette épidémie milite en faveur d'une introduction de la maladie à partir de l'Afrique de l'Est. En effet les variantes génétiques retrouvées dans ces deux zones sont classées dans le même groupe phylogénétique que les souches isolées au Kenya en 1997-1998 (Miller *et al.*, 2002 ; Shoemaker *et al.*, 2002).

Le risque lié au mouvement des populations humaines ou animales avait déjà été relevé. En effet, il a été émise l'hypothèse selon laquelle le commerce de moutons et de chameaux potentiellement infectés, aurait permis l'introduction du VFVR dans le Nord de l'Egypte depuis le Soudan où des foyers de la maladie avaient été signalés depuis 1971. La détection d'anticorps contre le VFVR dans des échantillons prélevés sur des chameaux à la frontière entre ces deux pays soutient cette hypothèse. De même en 1979, une Canadienne a contracté la FVR lors d'un séjour au Kenya, puis a poursuivi son voyage en Arabie Saoudite et au Canada où une rétinite a été diagnostiquée chez elle comme étant causée par le VFVR. Par ailleurs, cette même année, des troupes suédoises de retour du Sinaï ont présenté des anticorps spécifiques du VFVR. Ces cas mettent en évidence le risque de propagation du virus suite à des contacts entre des sujets indemnes et les environnements sauvages de la maladie. Il est important de noter que ces différents facteurs peuvent intervenir de façon concomitante et complexe. Leur contribution et impact ont été montré par Wilson et ses collaborateurs en 1994 (Wilson *et al.*, 1994).

#### **1.3.5. Distribution géographique**

Le VFVR est présent dans toute l'Afrique subsaharienne, en Egypte, en Arabie Saoudite, au Yémen, à Mayotte, aux Comores et Madagascar (Figure 7). En 2015 une épidémie a été déclarée en Mauritanie ainsi que des foyers au Sénégal et au Mali. En

2016 une épidémie a eu lieu au Niger et un cas importé a été signalé en Chine chez un patient qui venait d'Angola (Wiwanitkit, 2016).



**Figure 7: Distribution géographique du Virus de la Fièvre de la Vallée du Rift en Afrique et en Chine (adapté de Mansfield *et al.*, 2015 et de Wiwanitkit, 2016).**

#### **I.4. Diagnostic**

Le diagnostic repose dans un premier temps sur les observations cliniques : avortement en masse des femelles gestantes, importante mortalité de jeunes animaux dans un délai court, lésions hépatiques chez les petits ruminants, rétinites et cécité temporaire ou définitive chez les humains. Ces signes ne sont pas spécifiques de la FVR, c'est pourquoi d'autres approches comme l'isolement viral, la recherche d'anticorps (IgG, IgM, neutralisants), d'antigènes spécifiques du VFVR et/ou du génome viral (PCR) sont nécessaires pour confirmer le diagnostic.

L'histopathologie permet, dans les zones où la chaîne de froid fait défaut, de détecter des lésions hépatiques caractéristiques du VFVR et la coloration permet d'identifier les antigènes de VFVR présents dans les tissus (Coetzer, 1982).

L'isolement du virus par inoculation des prélèvements à des souriceaux nouveau-nés ou à des cultures cellulaires est le diagnostic de référence. Le virus peut être isolé du sang, du sérum, ou de certains organes (foie, rate, reins, tissus fœtaux). Cependant cette méthode n'est efficace que pendant la période de virémie chez l'animal ou l'Homme.

Les tests sérologiques les plus courants sont : la fixation du complément (FC), l'immunofluorescence (IF), le test de séroneutralisation (*Plaque Reduction Neutralisation Test*, PRNT), l'inhibition de l'héماغlutination (HI) et enfin l'*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA). Les anticorps anti-VFVR apparaissent très précocement (4 jours pour les IgM) et peuvent être détectés dans le sang ou le sérum pendant plusieurs mois après l'infection. Les tests sérologiques ont en plus l'avantage d'être simples, rapides, sensibles et spécifiques. Toutefois, ils présentent un certain nombre d'inconvénients tels que l'utilisation de virus actif (antigène cellulaire), les réactions croisées (absence de PRNT), l'impossibilité de préciser le moment de la survenue de l'infection.

Les techniques de biologie moléculaire et l'amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), appliquées à la recherche des acides nucléiques du VFVR, apportent une contribution nouvelle au diagnostic de la maladie. Les méthodes à base de PCR sont utilisées pour une détection rapide et spécifique du VFVR (Sall *et al.*, 2001 ; 2002).

Récemment, des tests faits avec des antigènes recombinants ont été développés pour améliorer le diagnostic sérologique de la FVR (Fafetine *et al.*, 2007). Des techniques moléculaires très sensibles ont également été développées comme la transcription inverse - réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) nichée (Sall *et al.*, 2002), la RT-PCR quantitative (RT-qPCR) (Bird *et al.*, 2007 ; Smithburn *et al.*, 1949 ; Odentaal *et al.*, 2014), la PCR multiplexe basée sur les macroarray assays (Venter *et al.*, 2014), l'amplification isothermale RT-LAMP (Bird *et al.*, 2007) et l'amplification par une polymérase recombinante *RPA* (Euler *et al.*, 2012). Elles permettent non seulement de confirmer la circulation active du virus mais aussi une identification rapide des lignées génétiques donnant ainsi la source de la pathogénicité de la souche

virale impliquée dans l'épidémie (Bird *et al.*, 2007).

Bien que les techniques de biologie moléculaire aient beaucoup aidé durant les épidémies, la courte durée de la virémie (3-4 jours), l'équipement et le personnel spécialisés posent des problèmes quant à leur applicabilité sur le terrain. Ces techniques de biologie moléculaire spécifiques et sensibles permettent également de détecter l'ARN viral dans des lots de moustiques, contribuant ainsi à la surveillance et au contrôle de la maladie mais aussi à l'identification des vecteurs (Jupp *et al.*, 2002 ; Mwaengo *et al.*, 2012 ; Lutomiah *et al.*, 2014).

## **I.5. Traitement**

Lorsque la maladie est déclarée, il n'y a pas de traitement spécifique établi. Chez les malades atteints de la forme grave de la maladie, le traitement est symptomatique. Des travaux ont montré que l'interféron ou les inducteurs d'interféron administrés à faibles doses au début de l'exposition pouvaient diminuer la virémie et protéger contre les formes fulminantes d'hépatite (Morrill *et al.*, 1989). La ribavirine, agent antiviral à large spectre, peut aussi avoir un rôle dans la thérapie des fièvres hémorragiques en général et de la FVR en particulier (Sydwell *et al.*, 1988 ; Huggins, 1989). Elle s'est montrée efficace chez les singes et les souris infectés par le VFVR en réduisant la virémie et les lésions hépatiques (Peters *et al.*, 1987). Elle a cependant l'inconvénient de présenter de nombreux effets secondaires.

Une autre approche envisageable serait l'utilisation de plasma de convalescents contenant des anticorps neutralisants pour prévenir ou traiter la fièvre hémorragique. En effet, cette stratégie s'est avérée efficace pour limiter ou arrêter la virémie et faciliter ainsi la guérison des macaques rhésus infectés (Peters *et al.*, 1988).

## **I.6. Prévention**

La prévention par la vaccination des animaux et des Hommes a été préconisée pour les protéger des effets néfastes des épizooties. Deux types de vaccin (inactivé et atténué) ont été mis au point pour prévenir la FVR.

Le premier vaccin inactivé NDBR103 correspond au 184<sup>ème</sup> passage de la souche Entebbe (Randal *et al.*, 1962). Ce vaccin a été testé sur 963 soldats des Nations Unies à raison de 3 doses (1ml administré à 0,7-10 et 28-30 jours). La majorité a eu une séroconversion avec un titre maximum atteint en 6 semaines post vaccination

(Niklasson *et al.*, 1985). Une autre version améliorée de ce vaccin nommée TSI-GSD-200 (*formalin-inactivated Salk Institute-Government Services Division*) à usage humain a été mis au point, mais il n'est pas homologué et n'est pas proposé dans le commerce (Pittman *et al.*, 1999; WHO, 1983). Son utilisation est restée expérimentale pour protéger les vétérinaires, le personnel de laboratoire et les troupes militaires déployées en zone d'endémie confrontés à un risque élevé d'exposition à la FVR. Deux vaccins atténués, les souches MP12 et SNS (*Smithburn neurotropic Strain*), sont disponibles (Smithburn, 1949). Toutefois, ils présentent des effets secondaires. Le vaccin SNS entraîne des avortements et des effets tératogènes chez les femelles gestantes. Il est de surcroît neurotrophe. La souche atténuée MP12, inoculée à des petits ruminants (Baskerville *et al.*, 1992 ; Morill *et al.*, 1991 ; 1997a et 1997b) et à des Hommes (Peters *et al.*, 1994), s'est montrée efficace bien qu'elle induise également des avortements chez les femelles gestantes et des effets tératogènes (Hunter *et al.*, 2002). Les tests d'innocuité ont révélé que ce vaccin est neurovirulent chez le singe (Morill *et al.*, 2003). D'autres candidats vaccins atténués, le clone 13 (Muller *et al.*, 1995), et plus récemment le vaccin R566 (Bouloy *et al.*, unpublished data) de l'Institut Pasteur est en essais.

En plus des vaccins recombinants sont en cours d'essais (Wallace *et al.*, 2006, Soi *et al.*, 2010). D'autres méthodes de lutte préventive consistent au traitement des gîtes larvaires par des hormones inhibitrices de croissance des larves de moustiques (Methropène) ou des toxines bactériennes (*Bacillus thuringiensis*). Ces techniques peuvent être efficaces mais nécessitent un suivi très régulier et une bonne localisation géographique des gîtes. Elles sont utilisées pendant les flambées si les conditions permettent l'accès aux gîtes larvaires. En revanche, la lutte contre les vecteurs adultes par l'emploi d'insecticides ne peut être envisagée à grande échelle ou dans le long terme à cause de la résistance des insectes aux insecticides utilisés, au coût élevé et à la toxicité pour l'environnement. Une protection humaine par moustiquaire imprégnée ou par pulvérisation d'insecticides en milieu domestique est souvent recommandée. Un système d'alerte précoce a été mis au point pour l'Afrique, le Moyen-Orient et la Péninsule Arabique, le *Rift Valley Fever Monitor* basé sur des données de végétation satellitaire. Il est maintenu par l'USDA (United States Department of Agriculture) et la NASA (National Aeronautics and Space Administration) et est mis à jour mensuellement (Linthicum *et al.*, 2016).

## DEUXIEME PARTIE : FACTEURS D'EMERGENCE ET DE TRANSMISSION DU VIRUS DE LA FIEVRE DE LA VALLEE DU RIFT EN AFRIQUE DE L'OUEST

### **Problématique**

Au cours des 25 dernières années, plusieurs études effectuées sur la diversité génétique du VFVR ont été publiées. Actuellement, 15 lignées génétiques différentes, nommées d'A à O ont été décrites à travers les épidémies notifiées dans toute l'Afrique. Ces lignées ont une faible variabilité au niveau nucléotidique de 2,8% et au niveau des acides aminés de 5,4% (Grobbelaar *et al.*, 2011). Toutefois, le ré-assortiment génétique entre les souches, phénomène très fréquent chez les virus à ARN segmenté, pourrait renforcer cette diversité génétique et générer de nouvelles souches plus ou moins pathogènes que les souches d'origine. En Afrique de l'Ouest où plusieurs épidémies ont été notifiées entre 1987 et 2015, la dynamique de circulation des lignées de VFVR est moins bien connue, comparée à l'Afrique de l'Est et du Sud. Durant ces épidémies, différentes lignées de VFVR ont émergé et leur variabilité génétique, ainsi que les facteurs climatiques comme la pluviométrie, ont probablement joué d'importants rôles dans l'épidémiologie de la FVR.

Lors de l'émergence du VFVR, la transmission aux humains peut se faire par différentes voies dont les piqûres de moustiques. Il a été montré que la salive du moustique inoculée lors de la piqûre, peut jouer un rôle important dans la transmission du virus et la pathogénèse chez l'hôte vertébré. Dans le cas du VFVR, l'impact de la salive dans l'infection a été étudié en utilisant les souris C57BL/6NRJ et la souche ZH548 isolée en Egypte en 1977. Les résultats ont montré une augmentation du taux de mortalité de même que le titre du virus mesuré dans le sang et dans les différents organes des souris (Le Coupanec *et al.*, 2013). Cependant, ce rôle de facilitation de l'infection reste à être élucidé chez l'Homme et les protéines impliquées ne sont pas encore identifiées.

Etant donné l'existence de plusieurs lignées différentes du VFVR en Afrique, des phénomènes de ré-assortiments possibles, des recrudescences des épidémies de VFVR en Afrique de l'Ouest, des changements climatiques et de l'implication très importante du moustique dans la transmission du virus, il s'avère important de mieux

comprendre la dynamique des lignées, les mécanismes d'émergence, de transmission du VFVR ainsi que la pathogenèse chez l'Homme pour guider la mise en place des stratégies de contrôle. C'est dans ce contexte que nous avons mené ce travail de thèse qui comporte deux chapitres.

**Le premier chapitre** vise d'abord à analyser l'épidémiologie moléculaire du VFVR en Afrique de l'Ouest particulièrement au Sénégal, en Mauritanie, au Mali et au Ghana. Pour cela, nous allons séquencer des souches de VFVR isolées en Afrique de l'Ouest de 1998 à 2015. Les distances génétiques, l'existence de motifs particuliers, la présence d'éventuelles recombinaisons et de réassortiments entre les différentes souches seront étudiées. Enfin la phylodynamique et la phylogéographie des différentes souches seront étudiées afin de déterminer l'origine et la dispersion du VFVR en Afrique. Cela permettra d'avoir plus de précision sur l'origine et les lignées d'appartenance des souches de l'Afrique de l'Ouest, et surtout de mieux comprendre les introductions du virus à partir d'autres régions ainsi que les propagations en Afrique de l'Ouest. Dans un contexte global, l'impact de cette variabilité génétique dans l'épidémiologie de la FVR sera analysé. Nous allons ensuite analyser dans ce premier chapitre, l'impact de la pluviométrie dans l'épidémiologie de la FVR en Afrique de l'Ouest.

**Le deuxième chapitre** vise à explorer le rôle de la salive de moustique dans la transmission du VFVR et la facilitation de l'infection chez l'Homme. Dans cette partie, nous nous intéressons particulièrement aux vecteurs anthropophiles du VFVR en contact avec l'Homme, *Aedes vexans* et *Culex poicilipes*. Pour cela, nous allons rechercher la présence de protéines de glandes salivaires de moustique dans le sang des personnes infectées ou non avec le VFVR, détecter les protéines des glandes salivaires de moustique qui ont induit une réponse anticorps chez les humains, et enfin, identifier ces protéines par des approches protéomiques. Afin de mieux comprendre ce mécanisme, l'effet des protéines d'intérêt sur la transmission du VFVR sera analysé *in vivo*. Ainsi, l'identification des mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces processus de facilitation de l'infection virale par les protéines salivaires, est susceptible de fournir des outils utiles, notamment des vaccins pour la lutte contre la fièvre de la Vallée du Rift.

# **CHAPITRE 1 : EPIDEMIOLOGIE DU VFVR EN AFRIQUE DE L'OUEST : IMPACT DE LA VARIABILITE GENETIQUE DES SOUCHES ET DE LA PLUVIOMETRIE**

## **I.Introduction**

Durant ces dernières années, plusieurs épisodes de FVR ont été notés en Afrique de l'Ouest, notamment en Mauritanie, au Sénégal, au Mali, au Ghana et au Niger.

La Mauritanie est à l'heure actuelle, le pays qui paie le plus lourd tribut à la FVR en Afrique de l'Ouest, avec plusieurs épidémies de grande ampleur, enregistrées entre 1987 et 2015. Les études phylogénétiques basées sur des séquences partielles du segment S des souches isolées, ont montré que la lignée de l'Afrique de l'Ouest était à l'origine des épidémies de 2010 et 2012 (Faye *et al.*, 2014, Sow *et al.*, 2014a) alors que l'épidémie de 2003 était causée par la lignée d'Afrique de l'Est/Centrale (Faye *et al.*, 2007).

Au Sénégal, un cas sporadique de FVR a été enregistré en 2012 à Kedougou et l'analyse d'une séquence partielle du segment S a montré que la souche est proche de celle qui a causé l'épidémie de Mauritanie en 2012 (Sow *et al.*, 2014b). Sachant que le patient n'avait pas voyagé avant sa maladie et qu'aucune circulation du VFVR n'avait été signalée dans la zone les deux années précédant sa maladie, l'hypothèse d'une infection suite à un contact avec des animaux importés de la Mauritanie a été retenue. En effet, les habitants ont confirmé la présence de ruminants importés de la Mauritanie, une mortalité et des avortements chez le bétail dans la zone. Ceci montre encore une fois comment le VFVR peut se propager à travers les différents pays d'Afrique avec notamment le déplacement du bétail. Entre la fin de l'année 2013 et le début de l'année 2014, une épidémie de FVR a été signalée au Sénégal. Durant cette épidémie, il ya eu 11 cas humains confirmés et 52 animaux positifs au VFVR dans des localités de Saint-Louis, Dakar, Linguère, Mbour et Kédougou (Sow *et al.*, 2016). Toutefois, aucun cas grave ni décès chez les humains n'a été signalé durant cette épidémie. Les études phylogénétiques toujours basées sur des séquences partielles des segments S, M et L ont montré la circulation d'une souche différente de celle de 2012. Cette nouvelle souche est proche d'une souche qui avait déjà circulé au Sénégal en 1984 et des souches d'Afrique de l'Est et de Zimbabwe 1974 (Sow *et al.*, 2016).

Enfin en 2015, un cas sporadique de FVR a été enregistré au Sénégal (Bokidiawe dans la région de Matam) dans le cadre d'un programme de surveillance syndromique (Réseau 4S, Surveillance Sentinelle Syndromique au Sénégal) mené à l'Institut Pasteur de Dakar. D'autres cas sporadiques ont été détectés au Ghana en 2006 et au Mali en 2015 dans le cadre de la surveillance de la fièvre jaune. Ces cas sporadiques ont été diagnostiqués à l'Institut Pasteur de Dakar, au Centre Collaborateur OMS pour les Arbovirus et Virus des Fièvres Hémorragiques (CRORA).

Récemment en 2016, une épidémie a été enregistrée au Niger avec 266 cas suspects incluant 32 décès et 17 cas confirmés (WHO, 2016 ; 2017).

On remarque ainsi une circulation importante du VFVR en Afrique de l'Ouest ces dernières années causant des épidémies importantes en Mauritanie et au Niger, moins sévères ou des cas sporadiques au Sénégal, au Ghana et au Mali. Différentes lignées ont émergé en Afrique de l'Ouest et ont été responsables de ces différents épisodes.

Par ailleurs, il a été montré que les épisodes de FVR sont souvent associés à de fortes pluies et des inondations durables (Morvan *et al.*, 1992 ; El Akkad, 1978 ; Jouan *et al.*, 1988 ; Ksiazek *et al.*, 1989).

Pour une meilleure prise en charge de ce virus et pour la mise en place d'une politique de surveillance et de riposte efficace, une meilleure connaissance des mécanismes d'émergence et de ré-émergence du VFVR s'impose. Dans cette étude nous nous proposons d'étudier le rôle de la variabilité génétique des souches et la pluviométrie dans l'épidémiologie de la FVR en Afrique de l'Ouest.

## **II. Matériels**

### **II.1 Echantillons biologiques utilisés**

Pour cette étude, nous avons utilisé 25 souches de VFVR isolées entre 1998 et 2015, dans différents pays (Mauritanie, Sénégal, Ghana et Mali) (Tableau 1).

Les échantillons (sérums humains, animaux et pools de moustiques) à partir desquels les souches virales utilisées ont été isolées, font partie de la banque de ressources biologiques du CRORA de l'Institut Pasteur de Dakar.

Ces sérums humains et animaux et les moustiques ont été collectés soit dans un contexte de surveillance soit lors d'investigations d'épidémies de FVR.

**Tableau 1: Origine des souches utilisées**

<b>Souches</b>	<b>Origine</b>	<b>Année</b>	<b>Pays</b>	<b>Localités</b>	<b>Contexte</b>
SA133709	Chèvre	1998	Mauritanie	Hodh el Garbi	Epidémie
PM141967	Moustique	2000	Mauritanie	NP	Epidémie
PM165878	Moustique	2002	Sénégal	Barkédji	Surveillance
PM165879	Moustique	2002	Senegal	Barkédji	Surveillance
SH172775	Humain	2003	Mauritanie	Makhtar lahjar	Epidémie
PM171151	Moustique	2003	Sénégal	Barkedji	Surveillance
SH172805	Humain	2003	Mauritanie	Makhtar Lajar	Epidémie
SH183719	Humain	2006	Ghana	NP	Surveillance
SH211994	Humain	2010	Mauritanie	Atar	Epidémie
SH211993	Humain	2010	Mauritanie	Atar	Epidémie
SH212008	Humain	2010	Mauritanie	Aoujeft	Epidémie
SH211977	Humain	2010	Mauritanie	Aoujeft	Epidémie
SH211995	Humain	2010	Mauritanie	Atar	Epidémie
SH211991	Humain	2010	Mauritanie	Aoujeft	Epidémie
SH227607	Humain	2012	Mauritanie	Moudjeria	Epidémie
SH227593	Humain	2012	Mauritanie	Hodh el Garbi	Epidémie
SH227602	Humain	2012	Mauritanie	Nbeika	Epidémie
SH239199	Humain	2012	Sénégal	Kedougou	Surveillance
SH252937	Humain	2013	Sénégal	Dahra	Surveillance
PM260524	Moustique	2013	Sénégal	Barkedji	Surveillance
SH272655	Humain	2015	Mauritanie	Makhtar lahjar	Epidémie
SH272660	Humain	2015	Mauritanie	Toueila (KIFFA)	Epidémie

SH272659	Humain	2015	Mauritanie	Chnn Nouakchott	Epidémie
SH277396	Humain	2015	Senegal	Matam	Surveillance
SH277022	Humain	2015	Mali	Makana	Surveillance

**SH : sérum humain**

**SA : sérum animal**

**PM : pool de moustiques**

**NP : non précisée sur la fiche de renseignements rattachée au prélèvement**

## **II.2 Souriceaux nouveaux-nés**

Des isollements de virus à partir de souriceaux nouveaux-nés ont été effectués. Les souriceaux nouveaux-nés appartiennent à la lignée Swiss, et sont entretenus en élevage à la ferme de l'Institut Pasteur de Dakar (à Mbao, situé à environ 25 km du campus de l'IPD) et sont utilisés en routine au CRORA pour l'isolement viral à partir de sérums ou de pools de moustiques. Les souriceaux nouveaux-nés sont placés dans des cages métalliques à paroi pleine avec un couvercle sous forme de grillage. Ils reçoivent une alimentation à base de céréale et de l'eau. Il est indispensable de maintenir des précautions d'hygiène rigoureuses dans l'animalerie, une température comprise entre 22 et 24°C, de désinfecter et stériliser les cages après utilisation mais aussi de désinfecter périodiquement les locaux.

## **II.3 Cellules utilisées**

Les cellules de moustiques C6-36 (*Aedes albopictus*) ou de mammifères Vero (Cellules épithéliales rénales du singe vert africain *Cercopithecus aethiops*) qui sont des lignées continues ont été utilisées aussi pour l'isolement viral. Les cellules C6-36 ont été fournies par des partenaires à l'Institut Pasteur de Paris (*Unité des Interactions Moléculaires Flavivirus-Hôtes*) et les Vero ont été achetées chez ATCC (*American, Type Culture Collection, The Global Bioresource Center*).

Les cellules C6-36 ont été cultivées dans une étuve à 27°C tandis que les cellules Vero ont été cultivées dans une étuve à 37°C. Chaque type cellulaire a un milieu de croissance pour l'entretien des cellules et un milieu de survie pour l'infection (Tableau 2). Les constituants des milieux de croissance et de survie pour les cellules

ont été commandés chez *GIBCO® by life technologies™*; USA sauf le tryptose phosphate commandé chez *Becton Dickinson and Compagny Sparks, USA*.

**Tableau 2: Milieux de culture utilisés pour les cellules de moustiques et les cellules de mammifères**

Cellules de moustiques		Cellules de mammifères	
Milieu de croissance	Milieu de survie	Milieu de croissance	Milieu de survie
Leibovitz's-15	Leibovitz's-15	Leibovitz's-15	Leibovitz's-15
10% tryptose-phosphate	10% tryptose-phosphate	-	-
10 % sérum de veau foetal	5 % sérum de veau foetal	10 % sérum de veau foetal	5 % sérum de veau foetal
Pénicilline-Streptomycine 1%	Pénicilline-Streptomycine 1%	Pénicilline-Streptomycine 1%	Pénicilline-Streptomycine 1%
0,05% Fungizone	0,05% Fungizone	0,05% Fungizone	0,05% Fungizone

### III. Méthodologie

La méthodologie selon le schéma ci-dessous a été adoptée.

Les sérums humains et animaux ont été amplifiés sur souriceaux nouveaux nés. Ce passage sur souriceaux permet une amplification très efficace du VFVR. Toutefois, le broyat de cerveau, contenant beaucoup d'autres éléments en plus du virus, n'a pas permis une amplification optimale du génome viral par RT-PCR conventionnelle de certaines souches. Pour ces dernières, les broyats de cerveaux de souriceaux ont ensuite été passés sur cellules de moustiques ou de mammifères avant de faire les tests de RT-PCR pour séquencer les génomes complets. Les pools de moustique ont été amplifiés directement sur cellules Vero ou C636 (Figure 8).

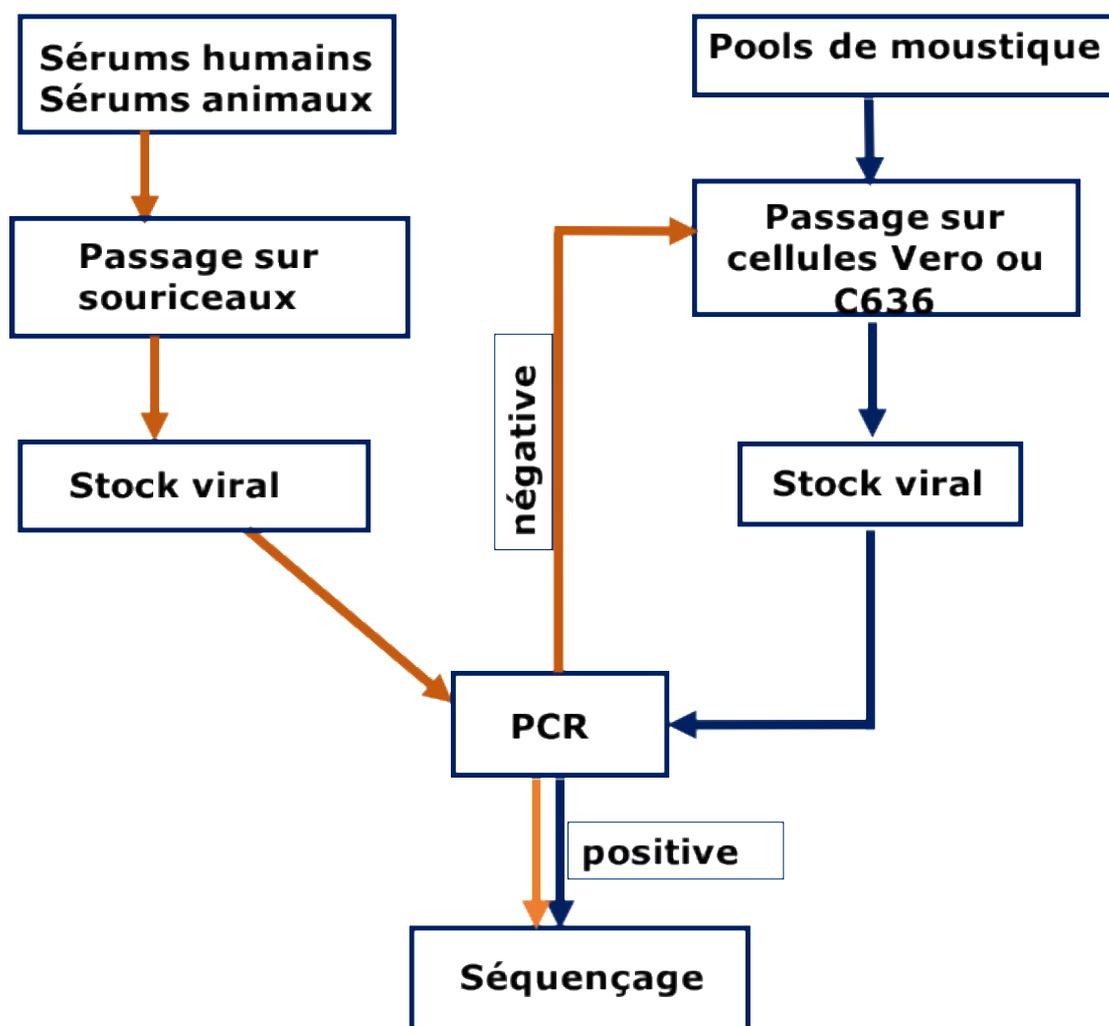


Figure 8: Schéma global de la méthodologie

### **III.1 Préparation de stock viral à partir de souriceaux nouveau-nés**

Les sérums humains et animaux ont été amplifiés sur souriceaux nouveaux nés selon le protocole suivant : les souriceaux nouveau-nés (âgés d'un à 2 jours) sont utilisés pour l'isolement viral. Une seringue de 1ml montée d'une aiguille de 2,5 cm de long, est utilisée pour l'inoculation. Après avoir bien homogénéisé l'échantillon, 20µl sont prélevés avec la seringue et inoculés par voie intra-cranienne aux souriceaux. Pour ce faire, la tête du souriceau est maintenue entre le pouce et l'index du manipulateur, puis l'aiguille est piquée en dehors de la ligne médiane du cerveau. Après l'inoculation, les souriceaux sont remis dans la cage avec leurs mères et placés en salle de surveillance. Une fiche d'observation est rédigée pour chaque sérum à tester. Chaque jour, une visite est effectuée pour observer le nombre de souriceaux vivants et leur état. Les cerveaux des souriceaux présentant des signes, le plus souvent une paralysie, sont récoltés pour une détection de l'ARN viral.

### **III.2. Préparation des stocks viraux à partir de cellules**

#### **III. 2. 1. Entretien des cellules**

Les cellules sont cultivées dans des flacons de 25 ou 80 cm<sup>2</sup> en utilisant les milieux de croissance, indiqués dans le Tableau 2. Lorsque les cellules sont confluentes, un passage est effectué, et le flacon initial est divisé en plusieurs nouveaux flacons.

- Pour les cellules Vero, le tapis cellulaire est d'abord lavé avec 2ml de PBS 1X stérile, puis incubé avec 3 ml de trypsine pour les flacons de 80cm<sup>2</sup> pendant une à deux minutes à 37°C. La trypsination est complète lorsque la couche cellulaire se détache de la surface du flacon. La suspension cellulaire est ensuite ramenée à 10ml avec du PBS 1X stérile, puis centrifugé à 1000 tours/minute, pendant 5 minutes, puis le surnageant est retiré. Le culot cellulaire est ensuite repris dans 5 ml de milieu de croissance.
- Concernant les cellules de moustique C6-36, le milieu de culture est retiré puis un grattoir est utilisé pour détacher les cellules. Ensuite on ajoute 5ml (pour les flacons de 80cm<sup>2</sup>) de milieu de croissance pour mettre les cellules en suspension.

Dans les deux cas, la suspension cellulaire de 5 ml doit être homogénéisée. Pour cela, il est absolument essentiel de pratiquer 3-4 séries d'aspiration et de refoulement avec

une pipette de 5 ml, afin que toutes les cellules soient dispersées et isolées. Ce stade est capital car si les cellules ne sont pas bien séparées, la subculture contiendra de nombreuses micro-colonies qui entraîneront ultérieurement la mort de la culture ou un ralentissement de la croissance du tapis cellulaire.

On ajoute enfin 10 ml de milieu de croissance approprié et les 15ml sont distribués dans 15 flacons de 25cm<sup>2</sup> à raison de 1ml/flacon. Quatre millilitres de milieu de croissance approprié sont ensuite rajoutés dans chaque flacon de 25cm<sup>2</sup>, puis les flacons sont incubés à 28 °C pour les cellules C6-36 ou à 37 °C pour les cellules Vero.

### **III. 2. 2 Infection des cellules**

Les flacons de culture confluent à 70-80 % sont placés sous la hotte pour les infections à partir des broyats de cerveaux de souriceaux nouveaux-nés ou de pools de moustiques. L'inoculum est préparé en diluant l'échantillon au 10<sup>ème</sup>, puis passé sur un filtre de 0,22 µm afin de ne pas contaminer le tapis cellulaire.

Le tapis cellulaire est ensuite lavé avec 2ml de PBS. Puis on met 150µl de l'inoculum et le flacon de culture est incubé pendant 1h à 37°C pour les Vero et à 28 °C pour les C6-36.

Après 1h d'incubation, on ajoute 5ml de milieu de survie approprié (Tableau 2). A l'aide d'un marqueur, on indique sur la boîte la date d'inoculation et le numéro de la souche. Ensuite les boîtes sont remises à 37°C pour les Vero et à 27°C pour les C6-36 pendant 3 à 4 jours.

### **III.3 Extraction d'ARN**

L'extraction de l'ARN viral est faite en utilisant le kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN, Heiden, Germany) selon les recommandations du fabricant. Les surnageants cellulaires et les broyats de cerveaux (100µl) sont soumis à une lyse en utilisant 400µl de tampon AVL. Après 10 minutes d'incubation du mélange, on ajoute 400µl d'éthanol absolu 100% pour précipiter le matériel génétique. Le lysat cellulaire est ensuite mis dans une colonne de silice et centrifugé à 8000 tours par minute, pendant 1 minute. La colonne est ensuite lavée avec 500µl de solution AW1 à 8000 tours par minute, pendant 1 minute. Un second lavage est effectué avec 500µl de AW2 à 12000 tours par minute, pendant 3 minutes. Une centrifugation à vide est effectuée pour

enlever les résidus. L'ARN est enfin élué dans 60µl de solution d'éluion et gardé à -80 °C.

### III.4 Amplification par RT-PCR

Une première étape de Reverse Transcription (RT) est effectuée pour obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) en utilisant le kit RT-MLV de Promega selon les recommandations du fabricant. Brièvement, on mélange 10µl d'ARN, 1 µl de *random primer* p(Dn)6, 1µl H<sub>2</sub>O et 1µl désoxyribonucléotides (dNTPs). Le mélange est chauffé à 65°C pendant 5 minutes. Après cette étape, on remet le mélange dans la glace et on y rajoute 4µl de tampon, 1µl de DTT, 1µl de Rnasin et 1µl d'enzyme M-MLV RT. Le mélange est chauffé à 37°C pendant 50 minutes puis à 70°C pendant 15 minutes. L'ADNc ainsi obtenu peut-être gardé à 4°C ou utilisé directement pour l'amplification par PCR. L'amplification de l'ADNc est effectuée en utilisant la GoTaq G2 FLexi DNA polymérase (Promega) ou la One Step (Roche) selon les recommandations des fabricants. Les amorces utilisées pour amplifier les 3 segments de génome (S, M et L) sont présentés dans le Tableau 3.

**Tableau 3: Liste des amorces utilisées**

Nom	Protéine	Position	Seq	TM°c	Orientation
NSng	S	31-48	TATCATGGATTACTTTCC	48	Sens
NScA	S	841-824	CCTTAACCTCTAATCAAC	50	Anti-sens
NPF	S	582-601	AGTTCCAAACTCAGCCCTCA	53	Sens
NPR	S	1646-1665	ATCAAGAGCTTGCGATCCAG	52.7	Anti-sens
M1F	M	22-Mar	ACAAAGACCGGTGCAACTTC	53.9	Sens
M1R	M	1120-1140	CCAYGCAAAGGGTATGCAAT	53.2	Anti-sens
M2F	M	1035-1054	TGAGGACTCTGAATTRCACCT	48.7	Sens
M2R	M	2395-2415	TCCAGAGAGTTGAGCCTTGC	53.3	Anti-sens

MRV1a	M	3050-3068	CAAATGACTACCAGTCAGC	44.6	Anti-sens
MRV2g	M	2262-2292	GGTGAAGGACTCTGCGA	52.5	Sens
M3F	M	2979-2998	CAGTCCTCAGTGAGCYCATA	46.1	Sens
M3R	M	3763-3782	TCTCGGTTCTGGRGTGTGAA	52.5	Anti-sens
L1F	L	09-28-	ACCGCCAATATTGTAGCAC	53	Sens
L1R	L	1288-1308	AGATGGTGATCACGTTGTRCC	52	Anti-sens
L1A	L	1121-1140	CTCTCCAGATCCCAACTCCA	52	Sens
L1B	L	2663-2683	GGGGTGGGTCATTCTCCTTA	53.4	Anti-sens
L2F	L	2641-2660	CCAGGGTCATTCCACTTCAG	53.1	Sens
L2R	L	3933-3953	GAAGGAGGCRGTGCAATCAT	50.2	Anti-sens
L3F	L	3799-3819	TCTCRTTRAAGTTGCTYGTG	44.3	Sens
L3R	L	5107-5127	TGGAAAGAAGCARAAAGCAG	48.6	Anti-sens
L4F	L	4988-5009	TCATCTGTTGCCACAAGTC	51.9	Sens
L4R	L	6376-6395	CGCCAATCATGGATTCTA	50.5	Anti-sens
N1F	S	10-730	GCTCATCACTYCCYAGCATG	51,7	Sens
N1R	S	619-1639	AGAGCTTGCTTGCGATCCAGTTTG	57,0	Anti-sens
N2F	S	680-701	TTGYTCTTATGGAGGAGAGCY	52,0	Sens
N2R	S	1564-1584	TGGGTCCGAGAGTTTGCTTA	56,8	Anti-sens
LAF	L	39-59	CARCTGGTTGACAAGACTGG	52,8	Sens
LAR	L	1306-1327	TCCTGTYTCTCATTTGYTGCA	54,7	Anti-sens
LBF	L	1189-1210	ACAGRCCAGATGAGAGAAACA	50,6	Sens
LBR	L	2449-2470	GATTGCARGCCTCCTTCAAGT	57,4	Anti-sens
LCF	L	2322-2342	GAGCCTTCRTCCCTTTCTGG	56,8	Sens

LCR	L	3664-3684	YTGRCGGGCYACTAGTGTTT	52,5	Anti-sens
LDF	L	3503-3523	GAAGAAGGARCTGGGAGTGT	51,9	Sens
LDR	L	5012-5033	ACGTTTGACACTGAGCTTAGG	54,5	Anti-sens
LEF	L	4883-4903	YCTYCGAGGTGTRGAAGACC	53,8	Sens
LER	L	6376-6396	MCCSCCCAATATTGTAGCAC	50,9	Anti-sens

Seq= séquence Tm=température d'annihilation

Les mélanges réactionnels et les programmes utilisés pour les deux méthodes sont présentés dans les Tableaux 4 et 5 respectivement.

**Tableau 4: Composition du mélange réactionnel de la PCR**

Reactifs	Go Taq	One Step
Tampon	10 µl	10µl
dNTPs	5µl	-
Amorce sens (10nmol)	5µl	5µl
Amorce anti-sens (10nmol)	5µl	5µl
Mgcl <sub>2</sub>	3µl	-
Go Taq	0,5µl	1µl
H <sub>2</sub> O	16,5µl	21µl
ADNc/ARN	5µl	8µl

**Tableau 5: Programmes utilisés pour la PCR**

Programmes	Go Taq	One Step
RT	-	50°C 30 minutes
Dénaturation initiale	95°C 5 minutes	94°C 2 minutes
Dénaturation	95°C 1 minute	94°C 45 secondes
Hybridation	Thyb 1 minute	Thyb 45 secondes
Elongation	72°C x minutes	68°C x minutes
Elongation finale	72°C 10 minutes	68°C 10 minutes

} X 45 cycles

La température d'hybridation (Thyb) dépend de la température de fusion des amorces, et la durée de l'élongation (x) dépend de la taille du produit à amplifier (environ 1 minute pour 1000 paires de bases).

L'électrophorèse des produits de PCR se fait sur un gel d'agarose à 1% dans du tampon TAE (Tris Acétate EDTA) 1X, soumis à un courant électrique de 100 volts. Le Bromure d'Ethidium (BET) (2 à 3 gouttes) est utilisé dans la préparation du gel pour la visualisation de l'ADN. Après migration, le gel est visualisé en utilisant le Gel Dock EZ imager (Biorad). Les produits de PCR avec la taille attendue sont ensuite purifiés sur gel en utilisant le QIAquick gel extraction kit de Qiagen selon les recommandations du fabricant.

### III.5 Séquençage et analyse des séquences

Les produits de PCR purifiés sont envoyés à séquencer chez Genewiz (Hope end, Takeley CM22 6TA Essex United Kingdom). Les Séquences obtenues ont été analysées et assemblées en utilisant les logiciels Merger emboss et Revseq (Carver *et al.*, 2003). Les alignements et les calculs de distances génétiques par paire de séquences ont été faits avec Muscle v3.831 (Edgar, 2004) et MEGA version 6 (Tamura *et al.*, 2013).

### **III.6 Analyse des recombinaisons, de la phylodynamique et de la phylogéographie des souches de VFVR d'Afrique de l'Ouest.**

Ces analyses ont été effectuées à l'Université Sao Paulo de Brésil (*Laboratory of Molecular Evolution and Bioinformatics, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil*).

Pour cela, nous avons introduit dans l'analyse d'autres séquences d'Afrique de l'Ouest (Burkina, Mali, Guinée, Mauritanie, Sénégal) mais aussi des séquences d'autres pays d'Afrique de l'Est, du Centre, du Sud et de Madagascar disponibles dans Genbank. Des séquences de Mayotte, d'Arabie Saoudite et de la Chine ont également été utilisées dans l'analyse. Ceci va nous permettre d'étudier la phylodynamique et la phylogéographie du VFVR en Afrique de l'Ouest et de voir les liens avec les autres VFVR d'Afrique et d'autres régions du monde où le virus a été isolé. Les codes décrits pour les différents pays

([http://www.nationsonline.org/oneworld/country\\_code\\_list.htm](http://www.nationsonline.org/oneworld/country_code_list.htm)) ont été utilisés.

Nous avons d'abord recherché d'éventuelles recombinaisons avec le program RDP4 beta 4.8 qui comprend RDP, GENECONV, Chimaera, Maxchi, Bootscan, SiScan et 3Seq (Martin *et al.*, 2010). Seules les recombinaisons qui ont été trouvées par 3 méthodes ou plus et avec une p-value  $\leq 0,05$  ont été considérées en utilisant la correction de Bonferroni pour éviter les faux positifs. Étant donné que les dates d'isolement pour chaque séquence de VFVR étaient disponibles, le taux de substitution par site et par année ( $\mu$ ) a été estimé en utilisant Path-O-Gen v1.4 (Rambaut & Pybus, 2016).

Les arbres phylogénétiques ont ensuite été générés en utilisant le critère du maximum de vraisemblance (ML) avec le logiciel GARLI v0.96 (Ziwicki, 2006). Ce logiciel utilise un algorithme stochastique pour estimer simultanément la meilleure topologie, les longueurs de branches et les paramètres du modèle de substitution qui maximisent le log-vraisemblance (lnL). La confiance des arbres ML a été obtenue par la convergence des scores lnL de dix répétitions indépendantes. Nous avons utilisé un modèle général de substitution à temps réversible (GTR) (Tavare, 1986) avec une variation gamma distribuée ( $\gamma$ ) (Yang, 1995) et une proportion de sites invariables (I). De plus, nous avons déduit les arbres de la crédibilité maximale de la clade (MCC) en

utilisant une approche bayésienne de la chaîne de Markov de Monte Carlo (MCMC) sous GTR +  $\gamma$  + I et une horloge moléculaire relaxée (non corrélée lognormal) (Drummond et *al.*, 2006) en utilisant BEAST v1.8.4 Drummond et *al.*, 2012). La convergence MCMC a été obtenue pour deux essais indépendants avec 50 millions d'étapes. Ceci a été suffisant pour obtenir une convergence, telle qu'indiquée par des valeurs d'échantillons effectifs (ESS) supérieures à 200 pour tous les paramètres. Cette convergence peut être observée à l'aide de Tracer v1.5 (Drummond et *al.*, 2012). Pour les reconstitutions phylogéographiques, nous avons utilisé un modèle discret attribuant des caractères d'état représentant le pays d'isolement à l'algorithme de recherche stochastique (Bayesian Stochastic Search Variable : BSSVS) (Lemey et *al.*, 2009) et mis en œuvre dans BEAST. Cette méthode estime l'état le plus probable à chaque nœud dans les arbres MCC, permettant la reconstruction des positions ancestrales plausibles sur ces nœuds.

### **III.7 Analyses des données de pluviométrie**

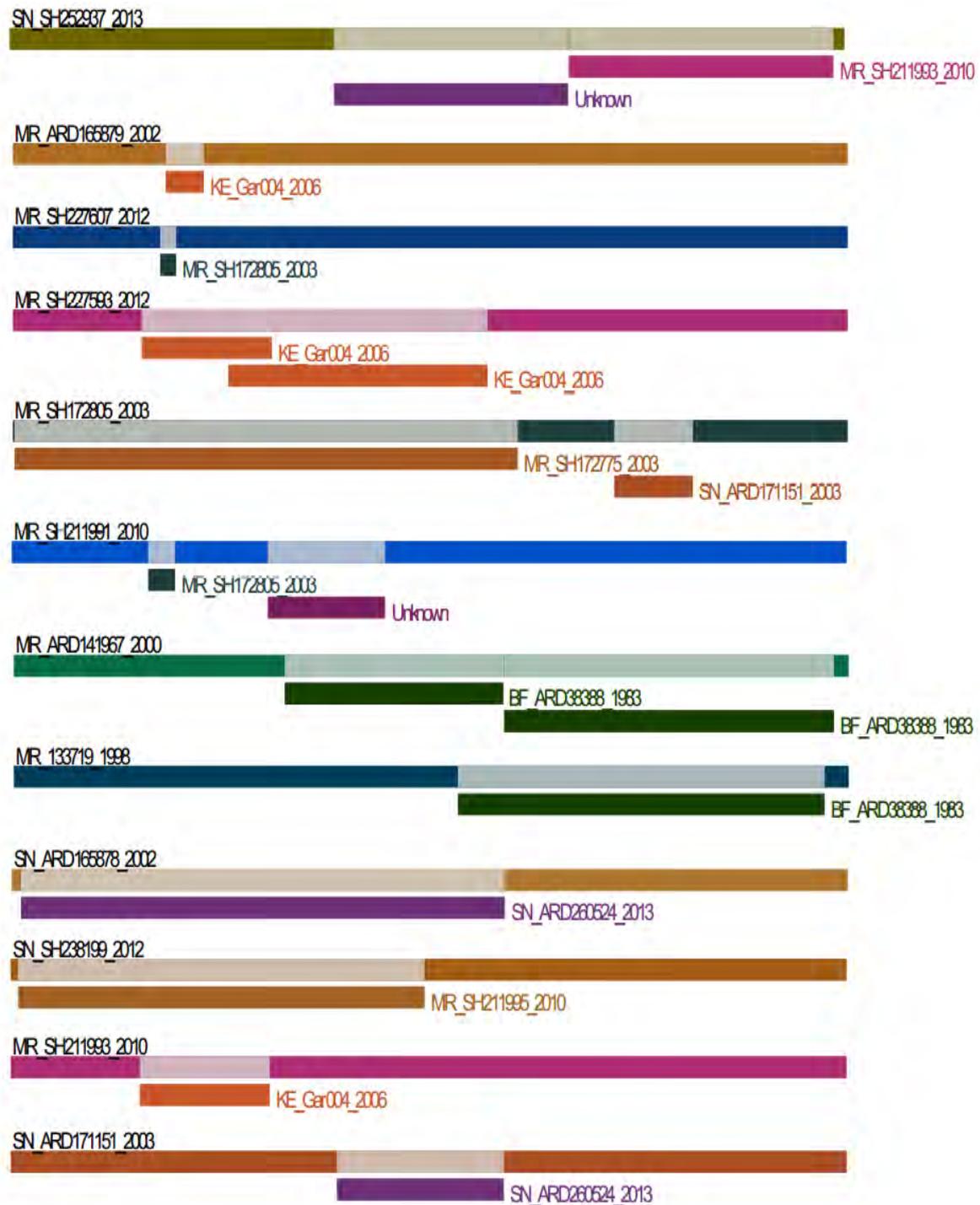
Les données pluviométriques enregistrées pour chaque site d'étude au Sénégal, au Mali et en Mauritanie ont été utilisés pour l'analyse. La provenance de l'échantillon du Ghana n'étant pas sur la fiche du patient, ces données de pluviométrie n'ont pas pu être obtenues. Les données quotidiennes sur les précipitations de NOAA ([http://iridl.ldeo.columbia.edu/expert/SOURCES/.NOAA/.NCEP/.CPC/.UNIFIED\\_P\\_RCP/.GAUGE\\_BASED/.GLOBAL/.v1p0/.REALTIME/.rain/](http://iridl.ldeo.columbia.edu/expert/SOURCES/.NOAA/.NCEP/.CPC/.UNIFIED_P_RCP/.GAUGE_BASED/.GLOBAL/.v1p0/.REALTIME/.rain/)) sur une période d'un an ont été utilisées. Ces données concernent les zones où les cas de VFVR ont été répertoriés et ont été collectées pour les années 2010, 2012 et 2015 (Mauritanie), 2012, 2013 et 2015 (Sénégal), 2015 (Mali). Les données pluviométriques ont été regroupées tous les 15 jours pour une période d'un an. Pour chaque année épidémique la moyenne des précipitations des sites concernés a été calculée et ceci pour chaque pays. La représentation graphique a été faite avec le logiciel R (R Core Team, 2013).

## **IV. Résultats**

### **IV.1 Mise en évidence de recombinaisons**

Nous avons fait l'extraction, l'amplification et le séquençage du génome complet de 25 souches de RVFV isolées de 1998 à 2015 en Afrique de l'Ouest.

L'analyse de ces séquences a montré la présence de 14 phénomènes de recombinaisons dans les segments M et L de 12 souches en utilisant le logiciel Rdp4. Les souches ayant montré des recombinaisons, les souches avec lesquelles elles ont recombinié et les positions sont indiquées dans la Figure 9. La recombinaison étant un phénomène rare chez les virus à ARN négatif, les souches de VFVR concernées sont actuellement en cours de séquençage à haut débit (*Next Generation Sequencing*, NGS) à l'Institut Pasteur de Dakar, afin de confirmer ces événements de recombinaison.



**Figure 9: Analyse des recombinaisons avec le logiciel Rdp4.**

Les 12 souches qui ont montré des recombinaisons sont représentées. Le trait horizontal représente le génome total (avec les 3 segments). Les noms des souches sont indiquées au-dessus du trait, à gauche. Les noms des souches ayant recombiné avec les souches étudiées et les zones de recombinaison sont indiqués en bas de chaque souche.

## **IV.2 Faible distance génétique entre les différentes souches d'Afrique de l'Ouest**

Nous avons calculé le maximum de distance génétique par paire de séquences du segment S en utilisant nos séquences et d'autres séquences disponibles dans Genbank pour pouvoir mieux évaluer la diversité entre les souches de VFVR. Pour cela, nous avons utilisé la NSs puisqu'elle a été décrite comme étant la protéine la plus variable chez les *phlebovirus*. Nous avons trouvé une distance génétique moyenne au niveau nucléotidique (nt) de 5% et au niveau des acides aminés (aa) 3%. Chaque année est représentée par une couleur différente. Jusqu'en 2003, la distance génétique trouvée n'excédait pas 4 % (nucléotides) par contre de 2003 à 2015 cette distance passe de 4 à 6 %, ce qui montre une légère augmentation. Par contre, la distance génétique en aa reste comparable sur toute la durée de l'étude.

Les séquences disponibles dans Genbank utilisées dans notre étude, présentent aussi une faible diversité génétique entre elles et avec les 25 séquences d'intérêt (Tableau 6).

**Tableau 6: Distance génétique par paire entre les différentes souches de VFVR d'Afrique de l'Ouest au niveau de la protéine NSs.**

	Nucléotides																																	Moyenne	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33		
2 ArD133719/Mauritanie/_1998	3%		3%	0%	2%	2%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	4%	3%	2%	3%	3%	3%	4%	5%	5%	4%	4%	5%	5%	4%	3%	3%	5%	3%	3%	3%	4%	<b>3%</b>	
3 ArD141967/Mauritanie/_2000	3%	0%		3%	4%	4%	3%	3%	4%	4%	5%	4%	4%	5%	5%	5%	3%	3%	4%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	2%	4%	3%	2%	2%	3%	<b>4%</b>
5 ARD165878/_Mauritanie/_2003	3%	1%	2%	1%		0%	4%	4%	2%	2%	2%	2%	4%	2%	2%	2%	2%	3%	4%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	4%	3%	5%	3%	3%	3%	5%	<b>3%</b>
6 ARD165879/_Mauritanie/_2003	3%	1%	2%	1%	0%		4%	4%	2%	2%	2%	2%	4%	2%	2%	2%	2%	3%	4%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	4%	3%	5%	3%	3%	3%	5%	<b>3%</b>
7 SH172775/_Mauritanie/_2003	3%	2%	2%	2%	3%	3%		0%	4%	4%	4%	4%	2%	5%	4%	4%	4%	1%	3%	4%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	1%	1%	4%	1%	1%	1%	3%	<b>3%</b>
8 SH172805/Mauritanie/_2003	3%	2%	2%	2%	3%	3%	0%		4%	4%	4%	4%	2%	5%	4%	4%	4%	1%	3%	4%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	1%	1%	4%	1%	1%	1%	3%	<b>3%</b>
4 SH183719/_Ghana/_2006	3%	0%	0%		2%	2%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	4%	3%	2%	3%	3%	3%	3%	4%	5%	5%	4%	4%	5%	5%	4%	3%	5%	3%	3%	4%	<b>3%</b>
9 SH211991/_Mauritanie/_2010	4%	1%	2%	1%	1%	1%	3%	3%		0%	0%	0%	4%	1%	0%	1%	1%	3%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	4%	4%	5%	4%	3%	3%	5%	<b>2%</b>
10 SH211993/Mauritanie/_2010	4%	1%	2%	1%	1%	1%	3%	3%	0%		0%	0%	4%	1%	0%	1%	1%	3%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	4%	4%	5%	4%	3%	3%	5%	<b>2%</b>
11 SH211977/Mauritanie/_2010	4%	1%	2%	1%	1%	1%	3%	3%	0%	0%		0%	4%	1%	1%	1%	1%	3%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	4%	4%	6%	4%	4%	3%	5%	<b>2%</b>
12 SH211994/_Mauritanie/_2010	4%	1%	2%	1%	1%	1%	3%	3%	0%	0%	0%		4%	1%	0%	1%	1%	3%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	4%	4%	5%	4%	3%	3%	5%	<b>2%</b>
13 SH211995/_mauritanie/_2010	4%	3%	2%	3%	3%	3%	2%	2%	2%	2%	2%		4%	4%	4%	4%	1%	4%	5%	5%	5%	4%	4%	5%	5%	4%	1%	3%	5%	2%	2%	2%	4%	<b>4%</b>	
14 SH212008/_Mauritanie/_2010	4%	2%	3%	2%	2%	2%	4%	4%	1%	1%	1%	1%	3%		1%	1%	1%	4%	5%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	5%	4%	6%	4%	4%	4%	5%	<b>3%</b>
15 SH227607/Mauritanie/_2012	3%	1%	1%	1%	0%	0%	2%	2%	0%	0%	0%	0%	3%	1%		0%	0%	3%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	4%	4%	5%	4%	3%	3%	5%	<b>3%</b>
16 SH238199/_Senegal/_2012	3%	1%	1%	1%	0%	0%	2%	2%	0%	0%	0%	0%	3%	1%	0%		0%	3%	5%	5%	5%	5%	5%	6%	5%	5%	4%	4%	5%	3%	3%	3%	5%	<b>3%</b>	
17 SH227593/_Mauritannie/_2012	3%	1%	1%	1%	0%	0%	2%	2%	0%	0%	0%	0%	3%	1%	0%	0%		4%	5%	5%	5%	5%	5%	6%	5%	5%	4%	4%	5%	4%	4%	3%	5%	<b>5%</b>	
18 SH227602/_Mauritannie/_2012	3%	2%	1%	2%	2%	2%	1%	1%	2%	2%	2%	2%	1%	3%	2%	2%	2%		3%	4%	4%	4%	4%	4%	4%	4%	4%	0%	2%	4%	1%	1%	1%	3%	<b>4%</b>
19 ARD260524/Barkdji/Senegal/2013	2%	1%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	2%	2%	1%	1%	1%	1%		2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	3%	2%	4%	3%	2%	2%	3%	<b>2%</b>
20 SH252937/_Senegal/_2013	4%	2%	1%	2%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	4%	4%	3%	3%	3%	3%	3%	2%		1%	1%	1%	3%	3%	1%	4%	3%	6%	4%	3%	3%	3%	
21 SH272655/Mauritanie/2015	4%	1%	1%	1%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	4%	2%	2%	2%	2%	2%	1%	0%		0%	0%	3%	3%	0%	3%	5%	3%	3%	3%	3%	
22 272660/Mauritanie/2015	4%	1%	1%	1%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	4%	2%	2%	2%	2%	2%	1%	0%	0%		0%	3%	3%	0%	3%	3%	5%	3%	3%	3%	3%
23 272659/Mauritanie/2015	4%	1%	1%	1%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	4%	2%	2%	2%	2%	2%	1%	0%	0%		3%	3%	0%	3%	3%	5%	3%	3%	3%	3%	
24 277022/Mali/2015	3%	2%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	3%	3%	2%	2%	2%	2%	2%	1%	3%	2%	2%	2%	2%	2%	3%	4%	3%	5%	3%	3%	3%	4%
25 SH277396/SEN/2015	3%	1%	1%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	3%	1%	1%	1%	1%	0%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	3%	3%	3%	5%	3%	3%	3%	4%	
26 NC_014395.1_Egypt_1977	4%	1%	1%	1%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	4%	2%	2%	2%	2%	2%	1%	0%	0%	0%	0%	2%	2%		3%	3%	5%	3%	3%	3%	3%	
27 EU574082.1_Kenya_2007	3%	2%	1%	2%	2%	2%	1%	1%	2%	2%	2%	2%	1%	3%	2%	2%	2%	2%	0%	1%	3%	2%	2%	2%	2%	1%	2%		2%	4%	1%	1%	1%	3%	
28 gij1680134771_VRL2230ZIM78	3%	1%	1%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	3%	1%	1%	1%	1%	0%	2%	2%	2%	2%	1%	1%	2%	1%		4%	1%	1%	1%	2%	
29 JF784388.1_SA_1974	4%	3%	3%	3%	4%	4%	3%	3%	4%	4%	4%	4%	4%	3%	4%	3%	3%	2%	2%	2%	4%	4%	4%	4%	3%	3%	4%	2%	3%		4%	4%	3%	5%	
30 gij168013453[gb]EU31212SPU38400	3%	2%	1%	2%	2%	2%	1%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	3%	3%	2%	2%	2%	1%	1%	3%	2%	2%	2%	1%	2%	1%	2%	1%		3%		1%	3%	
31 gij168013447[SPU12002SOM98	2%	1%	1%	1%	2%	2%	1%	1%	2%	2%	2%	2%	1%	3%	1%	1%	1%	0%	0%	2%	2%	2%	2%	1%	1%	2%	0%	1%	3%	0%		0%	2%		
32 gij168013444[SPU204ANGL85	3%	1%	1%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	1%	3%	1%	1%	1%	0%	0%	2%	2%	2%	2%	1%	1%	2%	0%	1%	2%	1%	1%		2%		
33 gij168013435[SPU1662CAR85	3%	1%	1%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	3%	1%	1%	1%	1%	0%	2%	2%	2%	2%	1%	1%	2%	1%	1%	3%	1%	1%	1%			
Moyenne	3%	1%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	1%	2%	2%	2%	3%	3%	1%	2%	2%	2%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	2%	0%							
	Acides aminées																																		

### IV.3 Mutations non conservatives au niveau de la NSs

Nous avons aligné les séquences protéiques de la NSs, décrite comme étant très variable, des 25 souches que nous avons séquencées et seules 7 mutations non conservatives (changement de la nature de l'acide aminé) ont été trouvées. Ces mutations sont au niveau des positions de la NSs : 153 et 210 pour une souche de la Mauritanie isolée en 2010, 233 pour une souche du Sénégal isolée en 2013, 240 pour les souches du Mali et du Sénégal isolées en 2015, 246 pour 2 souches de la Mauritanie isolées en 2000 et 2003, 248 pour 2 souches de la Mauritanie isolées en 2003 et 249 pour presque toutes les souches sauf 4 souches de la Mauritanie isolées en 2003, 2010 et 2012. (Tableau 7).

**Tableau 7: Mutations non conservatives de la NSs**

	L E D S	S A L	N N W	P P I P D	E M E S G
KX096940.1/NSs/kenya/2006					
SH211991/_Mauritanie/_2010				V	E
ARD260524/Barkdji/Senegal/2013					E
ARD165878/_Mauritanie/_2003				V	P E
SH227607/Mauritanie/_2012				V	E
SH211977/Mauritanie/_2010				V	E
SH183719/_Ghana/_2006					E
SH172775/_Mauritanie/_2003					E
ARD165879/_Mauritanie/_2003				V	P E
SH211993/Mauritanie/_2010				V	E
ArD133719/Mauritanie/_1998					E
ArD141967/Mauritanie/_2000					E
SH172805/Mauritanie/_2003					E
SH252937/_Senegal/_2013			T		E
SH238199/_Senegal/_2012				V	E
SH212008/_Mauritanie/2010	H	P		V	E
SH211994/_Mauritanie/_2010				V	E
SH227602/_Mauritanie/_2012				V	E
SH227593/_Mauritanie/_2012				V	E
SH211995/_mauritanie/_2010					E
SH272655/Mauritanie/2015					E
272660/Mauritanie/2015					E
272659/Mauritanie/2015					E
277022/Mali/2015				Q	E
SH277396/SEN/2015				Q	E

↑ 153aa      ↑ 210aa      ↑ 233aa      ↑ 240aa      ↑ 246aa- 248 et 249aa

#### **IV.4 Phylodynamique et phylogéographie du VFVR en Afrique au cours des 80 dernières années**

Puisque le segment S n'était pas concerné par les recombinaisons, nous l'avons utilisé pour étudier la phylodynamique des souches du VFVR en Afrique de l'Ouest. Nous avons utilisé les 25 séquences que nous avons générées et inclus d'autres séquences disponibles dans Genbank. Au total nous avons analysé 180 séquences isolées dans 21 pays entre 1944 et 2016.

##### **a) 5 lignées circulent en Afrique de l'Ouest**

A partir des 180 séquences nous avons inféré un arbre phylogénétique qui nous a permis de voir la représentation de 13 lignées circulant en Afrique parmi les 15 décrites précédemment par Grobbelaar (2011) (Figure 9). En effet nous avons eu la :

- lignée **A** qui regroupe les souches d'Égypte de 1977, 1978 et 1979, de Madagascar 1979 et du Zimbabwe 1974
- lignée **C** qui regroupe les souches de Madagascar 1991, de l'Afrique du sud de 2000, du Kenya de 2007 et 2008, de Madagascar et Mayotte 2008, de la Tanzanie 2007, de la Mauritanie de 2003 et du Sénégal de 2002 et 2003
- lignée **D** qui regroupe les souches de la République Centrafricaine de 1973
- lignée **E** qui correspond aux souches du Zimbabwe de 1975
- lignée **F** représentée par les souches d'Afrique du sud de 1981
- lignée **G** qui correspond aux souches de la Guinée de 1981, de la Mauritanie de 1987 et du Zimbabwe de 1978
- lignée **I** qui abrite les souches de l'Afrique du Sud de 1955 et 1956.
- lignée **J** représentée dans notre étude par la souche 226974 de Zimbabwe de 1974
- la lignée **K** formée par les souches 237374 de Zimbabwe de 1974 et du Kenya de 1951
- la lignée **L** représentée par les souches d'Afrique du Sud de 1971, 1974 et 1975
- la lignée **M** représentée par les souches d'Afrique du Sud de 1955
- la lignée **N** qui regroupe les souches de Mauritanie 1987, du Sénégal de 1981 et 1993 et du Burkina Faso de 1983.
- La lignée **O** représentée par la souche d'Afrique du sud de 1951.

Les 25 séquences analysées sont regroupées dans 4 lignées. Les souches de Mauritanie et du Sénégal de 2002 et 2003 et les souches de la Mauritanie de 2010 et 2012 se retrouvent dans la lignée **C**. Certaines souches de 2003, 2010 et 2012 et les souches de 1998 de la Mauritanie de même que la souche du Sénégal de 2012 se retrouvent dans la lignée **K**. La souche de moustique de Mauritanie 2000 appartient à la lignée **N**. Les 5 souches, du Sénégal, de la Mauritanie et du Mali de 2015 appartiennent à la lignée **A**. Les souches ayant provoqué les cas sporadiques au Sénégal et Mali en 2015 appartiennent au même groupe phylogénétique que les souches de VFVR ayant circulé en 2013 au Sénégal et sont plus proches des souches de Zimbabwe 1974. Les souches ayant provoqué l'épidémie de FVR en Mauritanie en 2015 sont proches de celles d'Égypte 1977-78 (Bob *et al.*, 2017).

Tenant bien compte des 25 souches analysées et de toutes les autres souches d'Afrique de l'Ouest incluses dans l'étude (souches du Burkina Faso, Sénégal, Mauritanie et Guinée disponibles dans Genbank), nous avons au total 5 lignées de VFVR (**A, C, G, N, et K**) qui circulent en Afrique de l'Ouest (Figure 10).

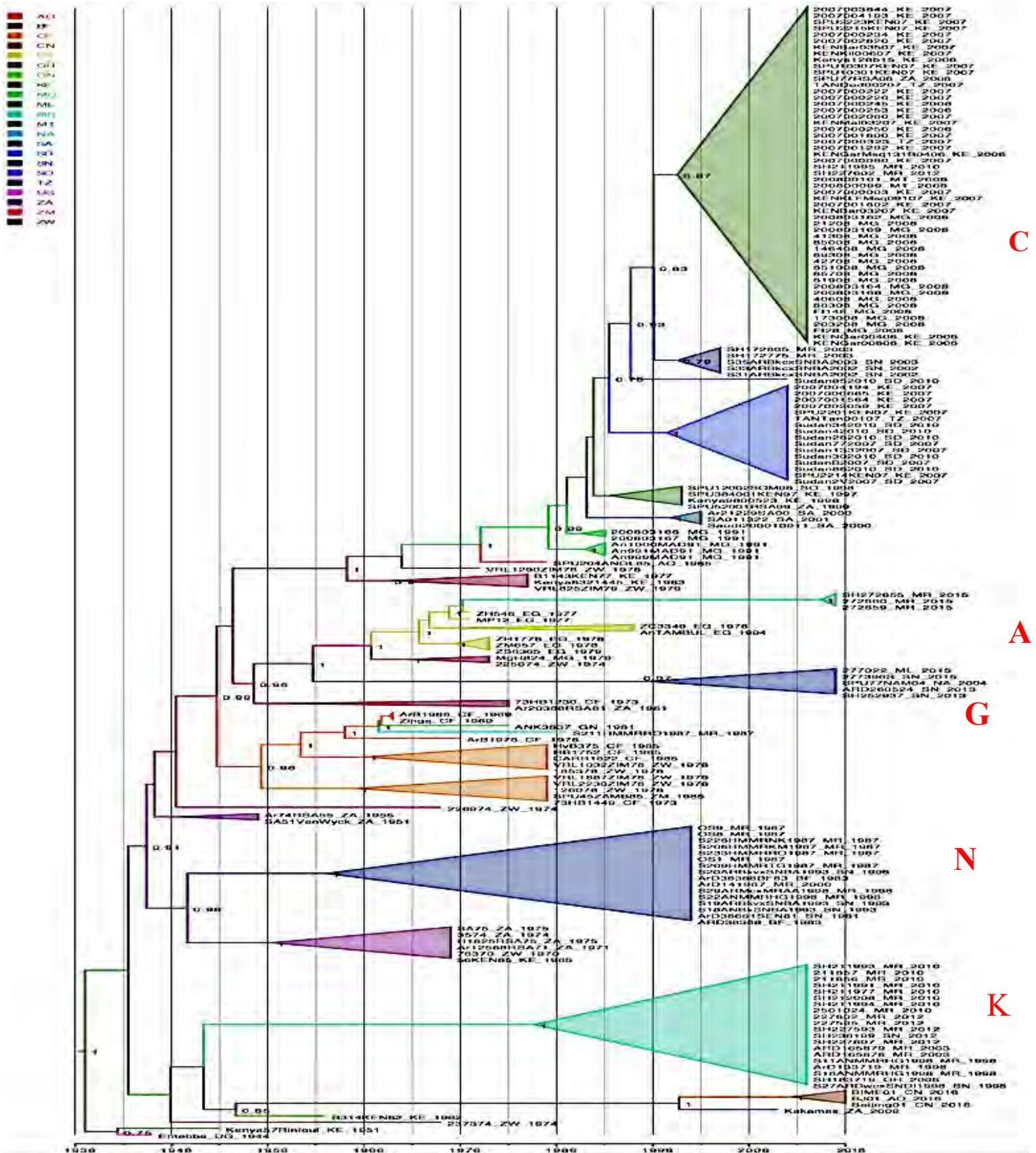


Figure 10 : Crédibilité maximale de la clade (MCC) basé sur 180 séquences complètes du segment S isolées dans 21 pays entre 1944 et 2016

Les branches ont été échelonnées sur plusieurs années et codées par couleur selon le pays d'isolement du virus, dont le code à deux lettres est indiqué dans la légende (AO, Angola, BF, Burkina Faso, CF, République centrafricaine, CN, Chine, EG, Egypte, GN, Guinée, GH, Ghana KE, Kenya, MG, Madagascar, ML, Mali, MR, Mauritanie, MT, Mayotte, NA, Namibie, SA, Arabie saoudite, SD, Soudan, SN, Sénégal, SO, Somalie, Tanzanie, UG, Ouganda, ZA, Afrique du Sud, ZM, Zambie, ZW, Zimbabwe). L'échelle de temps en années est indiquée dans l'axe des abscisses. Les nombres sur les noeuds sont les probabilités postérieures supérieures à 0.7. Les branches ont été condensées pour améliorer la visibilité des mouvements migratoires vers l'Afrique de l'Ouest. Les asterix rouges représentent les différentes lignées d'Afrique de l'Ouest.

#### **b) Diffusion du VFVR de l'Afrique du Sud et de l'Est vers l'Afrique de l'Ouest au cours des 80 dernières années.**

Sachant que la phylogénie a montré 5 lignées présentes en Afrique de l'Ouest, nous avons étudié leurs origines et déplacements à travers tout le continent Africain.

Les analyses ont montré que le VFVR a été introduit 7 fois en Afrique de l'Ouest en provenance d'autres parties de l'Afrique au cours du XX<sup>e</sup> siècle.

Nous avons constaté que toutes les lignées de VFVR ont partagé un ancêtre commun autour de 1937 (l'intervalle de densité postérieure la plus élevée était de 95% de 1928 à 1943). Au cours des 20 premières années (1936 - 1956) de l'histoire du VFVR (Figure 10 a, flèches bleues), le virus est apparu au Kenya (KE) et s'est déplacé vers l'Ouganda (EG), le Zimbabwe (ZW) et l'Afrique du Sud (ZA) vers 1940 (Figure 11a, flèches bleues).

Plus tard, le RVFV de ZW s'est déplacé en République Centrafricaine (CF) et le VFVR de ZA s'est déplacé au Sénégal (SN) en Afrique de l'Ouest ce qui donne la première introduction de VFVR dans la région Ouest Africaine (Figure 11a, flèches bleues). Cette **première introduction** est liée aux virus isolés au Sénégal et en Mauritanie après 1980 (la souche isolée au Sénégal en 1981 appartenant à la lignée N est issue de cette première introduction et certaines souches de l'épidémie de Mauritanie 1987).

Le VFVR a ensuite été transféré du ZW vers la Mauritanie vers 1950, ce qui a constitué la deuxième introduction de ce virus en Afrique de l'Ouest. Cette **deuxième**

**introduction** est liée aux virus isolés en 1998 (souches de l'épidémie de 1998 appartiennent à la lignée K) en Mauritanie (MR) et qui ont réémergé en 2010 et 2012 (Faye et *al.*, 2014 ; Sow et *al.*, 2014) dans la même localité. Ce virus est aussi à l'origine du cas sporadique de FVR notifié à Kedougou (Sénégal) en 2012 (Figure 11 a, flèches bleues).

Durant les 20 années suivantes (1956 -1976), une souche de VFVR est passée de ZA à ZW, puis à Madagascar (MG), KE, et Egypte (EG). Ces souches sont à l'origine de la grande épidémie d'Egypte de 1977 qui a causé 200.000 cas humains dont 600 morts.

L'introduction de cette souche appartenant à la lignée A cette fois ci, du ZW au SN constitue la **troisième introduction** en Afrique de l'Ouest et est liée aux souches qui ont été isolées en 1984, 2013 et 2015 au Sénégal (Figure 11b, flèches bleues).

Ensuite le VFVR est passé de l'EG (lignée A) à la Mauritanie provoquant ainsi la **quatrième introduction** en Afrique de l'Ouest. L'épidémie importante de VFVR de Mauritanie en 2015 est liée à cette souche (Figure 11b, flèches bleues).

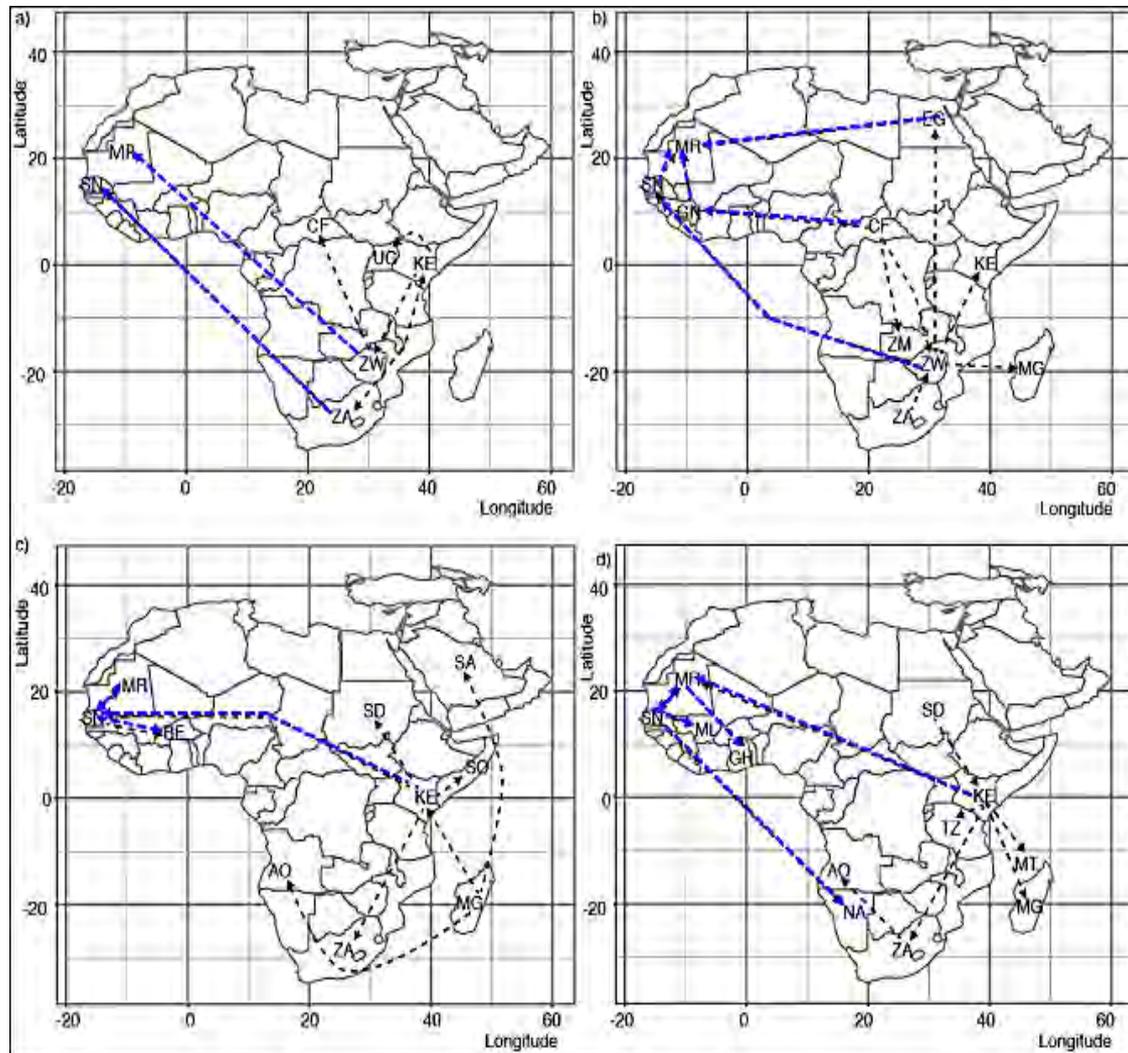
Le VFVR de CF (lignée G) s'est déplacé en Guinée (GN) en 1981 et 1984 et MR (Rosso en 1987) (Figure 11b) formant la **cinquième introduction** en Afrique de l'Ouest. Cette introduction est liée aux souches de Guinée 1981 et de l'épidémie de Mauritanie 1987. Il s'est également déplacé vers le sud de CF à Zambie (ZM) et ZW (Figure 11b, flèches bleues).

Au troisième intervalle de 20 ans (1976-1996), le Kenya dans l'Est a servi de centre de diffusion à d'autres endroits en Afrique (Figure 11c). En effet du Kenya, le VFVR s'est déplacé vers le ZA, la Somalie (SO), le Soudan (SD) et le SN (souches de 1981, 1993 appartenant à la lignée N) formant ainsi la **sixième introduction** du virus. Du Sénégal, le virus a déménagé au Burkina Faso (BF) et en MR (lignée N) (Figure 11c, flèches bleues).

Au cours des 20 dernières années (1996 - 2016), le VFVR a également été diffusé du KE en Tanzanie (TZ), Mayotte (MT), MG et MR (souches de 2003, 2010 et 2012) constituant la **septième introduction** en Afrique de l'Ouest et puis est diffusé en ZA (Figure 11d, flèches bleues). A partir de l'Afrique du Sud (ZA), le virus appartenant à la lignée C s'est déplacé vers AO et a été récemment importé en Chine (CN) (Liu et *al.*, 2016).

Au cours de ces 20 dernières années, les virus de la 3<sup>ème</sup> introduction sont passés du SN au Mali (ML) en 2015 (Figure 11d, flèche bleue) et s'étaient également déplacés

vers le sud en direction de la Namibie (NA) en 2004 (Figure 11d, flèche noire). Durant cette même période les virus de la 2<sup>ème</sup> introduction sont passés de MR au Ghana (GH).



**Figure 11: Diffusion du VFVR à travers l'Afrique durant les 80 dernières années.**

A- Mouvements de migration de VFVR entre 1936 et 1956. B- Mouvements de migration de VFVR entre 1957 et 1976. C- Mouvements de migration de VFVR entre 1977 et 1996. D - Mouvements de migration de VFVR entre 1997 et 2016. Les flèches indiquent la direction du mouvement de la souche. Les flèches bleues indiquent les introductions et les déplacements en Afrique de l'Ouest et les flèches noires représentent les déplacements dans les autres parties de l'Afrique. Les pays sont identifiés par un code de 2 lettres (AO, Angola ; BF, Burkina Faso ; CF, Central African Republic ; EG, Egypt ; GN, Guinée ; GH, Ghana ; KE, Kenya ; MG, Madagascar ; ML, Mali ; MR, Mauritanie ; MT, Mayotte, NA, Namibie ; SA, Saudi Arabia ; SD, Sudan ; SN, Senegal ; SO, Somalia ; TZ, Tanzania ; UG, Uganda ; ZA, South Africa ; ZM, Zambia ; ZW, Zimbabwe).

### **c) Emergence de la lignée A en Afrique de l'Ouest**

Les études phylodynamiques ont montré que le virus a été introduit 7 fois en Afrique de l'Ouest en provenance d'autres parties de l'Afrique au cours du XXe siècle. Cependant les virus isolés en 2015 (souches de 2015) dans les pays voisins du Sénégal, le Mali et la Mauritanie ont des origines géographiques différentes (Figures 10 et 11b). En effet, les souches de VFVR isolées en 2015 au Sénégal et au Mali partagent un ancêtre commun avec une souche du Zimbabwe vers 1974 (Figure 9). Cependant les virus qui ont causé l'épidémie de 2015 en Mauritanie partagent un ancêtre commun avec les souches d'Egypte vers 1975 (Figure 10). L'analyse de la phylodynamique et de la phylogéographie montre que ces épisodes ont été liés à deux introductions indépendantes de souches appartenant à la lignée A à partir du Zimbabwe et de l'Egypte (Figures 11b).

### **IV.5 Impact de la pluviométrie sur la survenue des épidémies**

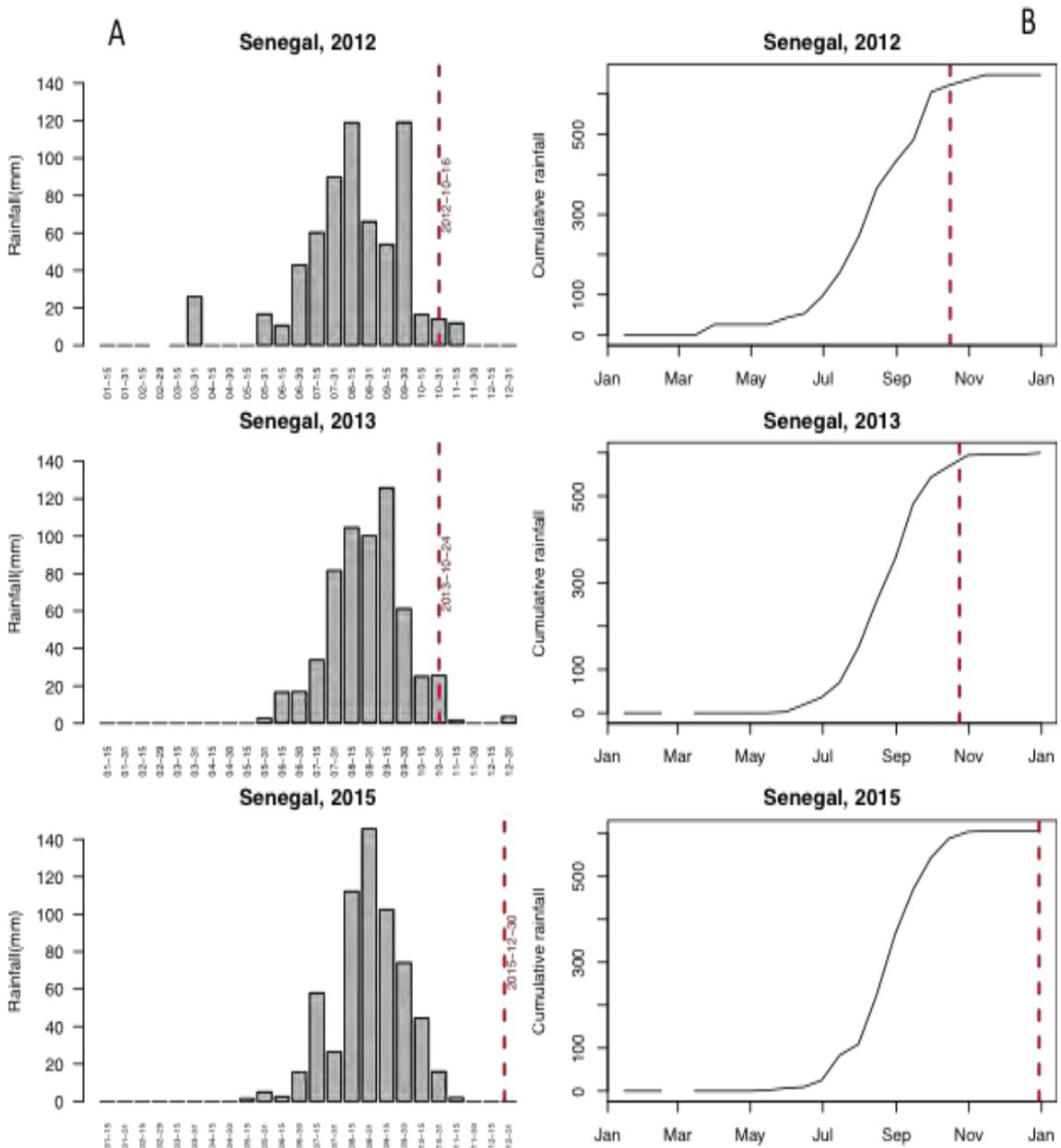
Nous avons étudié la relation entre la pluviométrie et les différentes épidémies de FVR en Mauritanie et les cas sporadique au Sénégal et au Mali. Les premiers cas humains dans chaque pays sont représentés par des pointillées rouges. Nous avons observé dans tous les pays une variabilité intra-saisonale des pluies, avec une alternance de périodes de fortes et faibles pluies. Si on considère la pluviométrie tous les 15 jours, en Mauritanie (Figure 12), les épidémies (avec plusieurs cas humains) de 2010 et 2012 ont démarré après ou pendant une forte pluviométrie ( $> 25$  mm) précédée d'une période de faibles pluies ( $< 15$  mm). Toutefois, le profil observé en 2015 a varié car l'épidémie a démarré pendant les périodes de baisse progressive des pluies, précédées de fortes pluies allant jusqu'à 50 mm.

Au Sénégal, le cas sporadique détecté au mois d'octobre 2012 présente le même profil que l'épidémie de 2012 de la Mauritanie. Cependant les cas sporadiques de 2013 et 2015 et le cas sporadique du Mali ont globalement les mêmes profils que l'épidémie de 2015 de la Mauritanie (Figure 13,14).

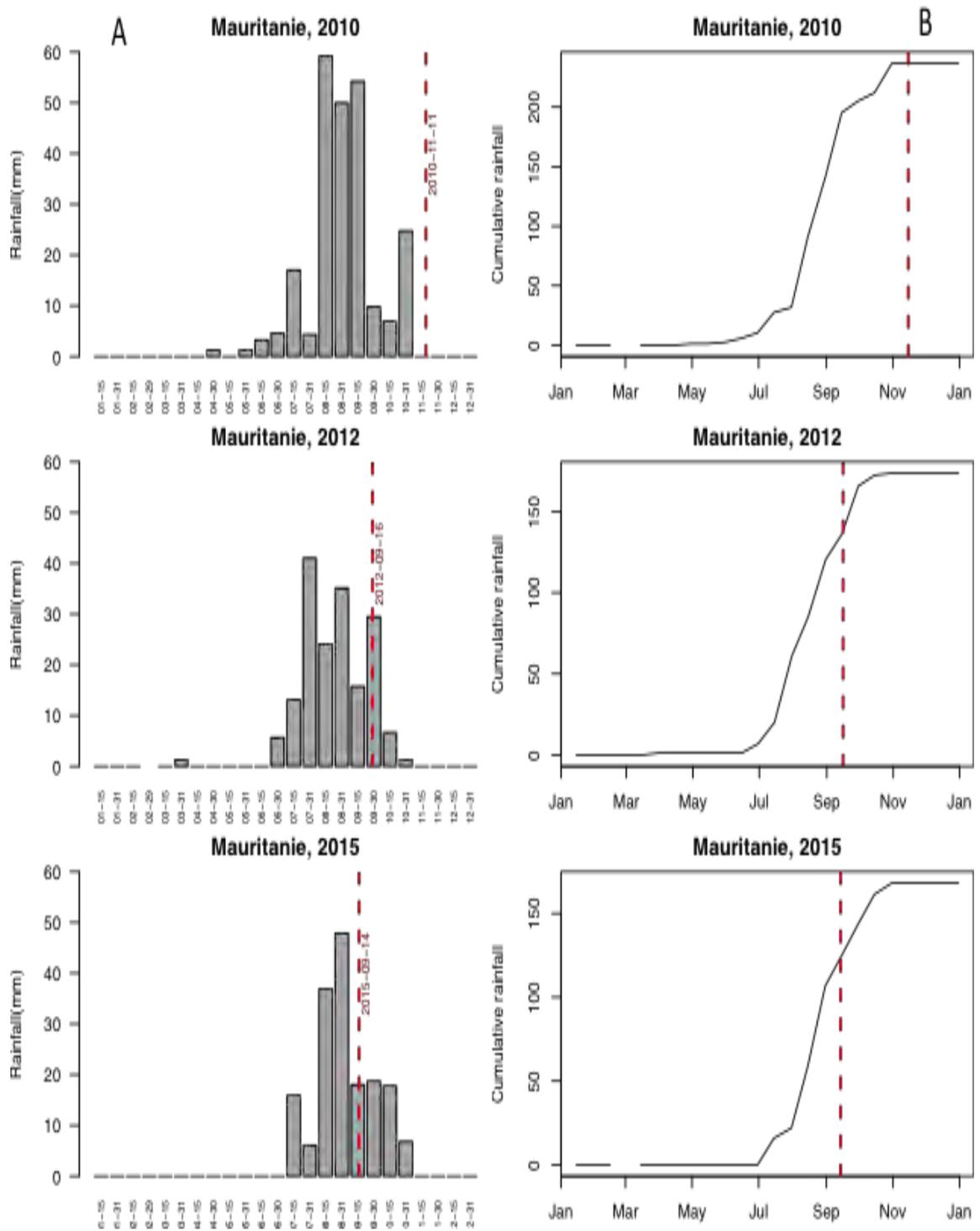
Quel que soit le profil observé dans les différents pays, cette période d'apparition des cas correspond généralement à la fin de la saison des pluies (Figure 12A, 13A, 14A). Si on considère le cumul de la pluviométrie, les cas de FVR se produisent quand le maximum de pluviométrie est presque atteint (Figure 12B, 13B,14B), généralement

entre septembre et novembre. Cependant au Sénégal le cas s'est produit bien après que le maximum soit atteint contrairement à la Mauritanie en 2015.

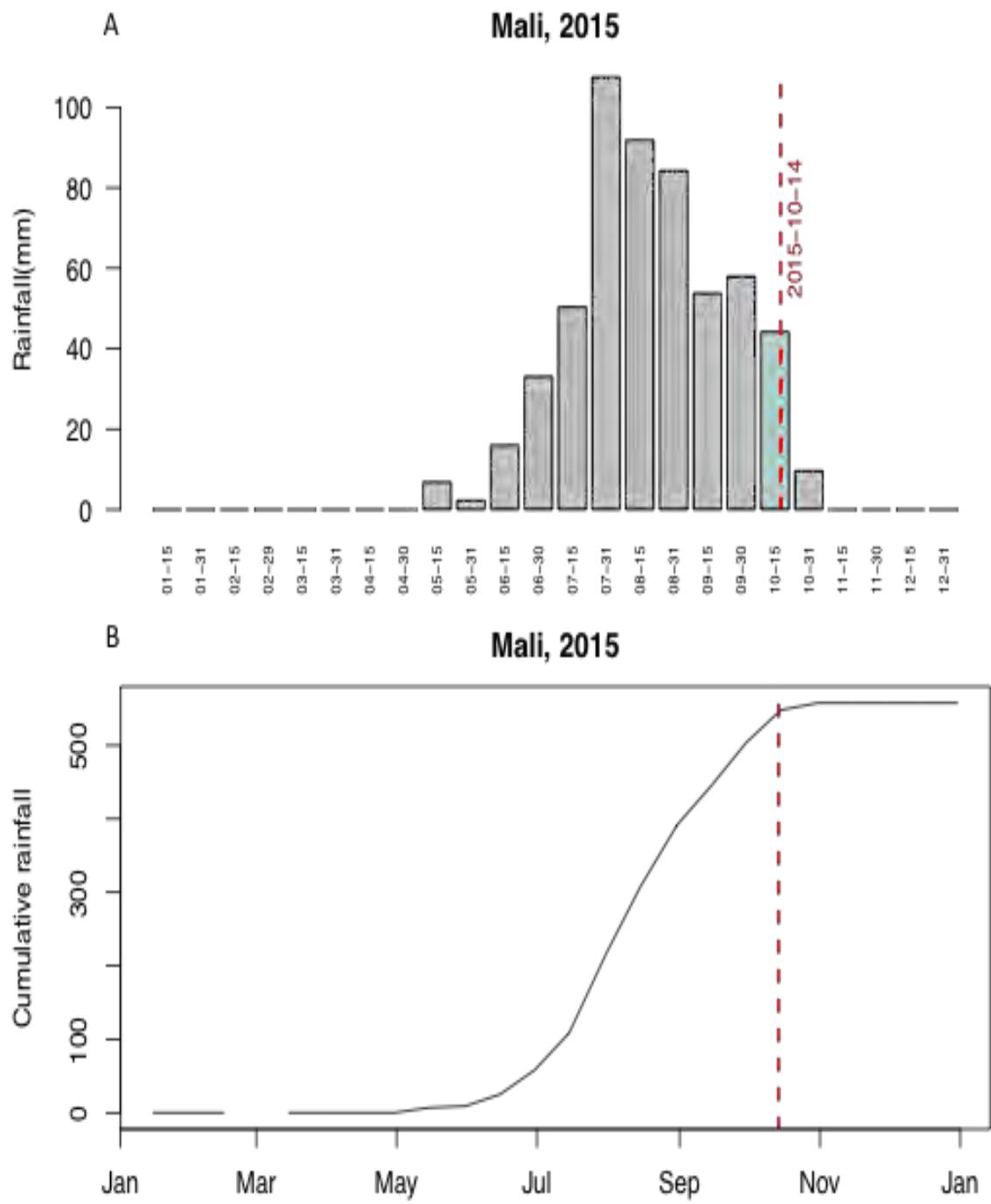
Les histogrammes représentent la pluviométrie (pris tous les 15 jours) dans les zones concernées. La courbe représente le cumul de la pluviométrie dans les mêmes zones.



**Figure 12: Pluviométrie et apparition du VFVR au Sénégal**



**Figure 13: Pluviométrie et apparition du VFVR en Mauritanie**



**Figure 14: pluviométrie et apparition du VFVR au Mali**

## V. Discussion

Dans cette étude nous avons analysé la diversité génétique, la phylodynamique, la phylogéographie du VFVR en Afrique de l'Ouest, la pluviométrie et leur impact dans l'épidémiologie.

L'étude a montré des recombinaisons au niveau des segments M et L, qui ne sont pas à ce jour décrites dans la littérature pour le VFVR. Des vérifications par d'autres techniques de séquençage (NGS) sont donc nécessaires pour confirmer ces événements de recombinaisons. Chez les virus à ARN positif, les recombinaisons sont plus fréquentes (Holmes *et al.*, 1999 ; Tolou *et al.*, 2001 ; Perez-Ramirez *et al.*, 2009 ; Carvalho *et al.*, 2010) et jouent un rôle important dans la variabilité génétique des souches. La présence de ces phénomènes chez le VFVR, pourrait de la même façon, jouer un rôle dans la variabilité génétique du virus et avoir un impact dans la virulence.

L'utilisation des 3 segments de génomes, après la vérification des événements de recombinaisons, permettrait d'analyser l'existence de réassortants parmi nos souches analysées. Les phénomènes de réassortiment sont très fréquents chez les virus segmentés. Chez le VFVR, un réassortiment entre les virus sauvages et les souches vaccinales atténuées peuvent augmenter la diversité génétique (Ikegamie, 2012) et avoir aussi un rôle dans la virulence.

L'étude de la diversité génétique réalisée que sur le segment S a trouvé de façon globale une diversité génétique au niveau nucléotidique (nt) de 5% et au niveau des acides aminés (aa) 3% entre les souches d'Afrique de l'Ouest analysées. Cette diversité pourrait être expliquée par l'existence de mutations ponctuelles et des réassortiments entre souches virales. En effet, l'introduction des vaccins atténués comme le Smithburn, peut entraîner des phénomènes de réassortiments entre souches sauvages et vaccinales lors des flambées, et augmenter ainsi la diversité génétique (Grobbelaar *et al.*, 2011). De plus, les vaccins non atténués, due à une mauvaise atténuation, participeraient à une augmentation de la diversité génétique du VFVR en causant une ré-introduction de virus vivants chez le bétail (Ahmed Kamal, 2011). Au Kenya, la similitude génétique des isolats de 1977, 1983 et 1997-1998, 2006-2007 avec le vaccin Smithburn a indiqué l'introduction du virus par la vaccination à l'aide de vaccins vivants (Grobbelaar *et al.*, 2011). Toutefois, cette diversité génétique des souches de VFVR analysées semble globalement faible, comparée à d'autres

arbovirus. Des études antérieures ont montré que la diversité génétique du VFVR de toutes les lignées est assez limitée, avec des différences maximales par paire pour les segments partiels de S et M de 4% et 5,4% pour la séquence nucléotidique et 1% et 2,8% pour la séquence d'acides aminés. Une telle diversité limitée pourrait être due en partie à la contrainte évolutive imposée aux arbovirus par leur réplication alternée entre mammifères et arthropodes (Coffey *et al.*, 2008 ; Moutailler *et al.*, 2011). Cependant, la diversité du VFVR est beaucoup plus étroite que celle d'autres Bunyavirus transmis par les arthropodes aussi, tels que le virus de la fièvre hémorragique de Crimée Congo, identifié pour la première fois en 1944 en Union soviétique (Chinikar *et al.*, 2016). De plus, il y'a d'autres arbovirus (avec cette réplication alternée mammifères-arthropodes) qui présentent une grande diversité comme le virus *West Nile*, isolé pour la première fois en 1937 en Ouganda (Smithburn *et al.*, 1940 ; Mackenzie & Williams 2009 ; Fall *et al.*, 2014). Cela suggère que d'autres facteurs sont probablement impliqués dans la proximité phylogénétique entre les lignées de VFVR. En effet, l'émergence récente d'un VFVR ancestral d'Afrique de l'Est et son expansion uniquement en Afrique jusqu'en 2015 a probablement contribué à cette faible diversité contrairement à un virus comme le *West Nile* qui depuis sa découverte en Afrique s'est propagé dans tous les continents (Hubalek, Halouzka, 1999 ; Rossi *et al.*, 2010).

Malgré cette faible diversité du segment S, nous avons trouvé dans notre étude quelques mutations non conservatives dans la NSs. La protéine NSs est indispensable pour l'infection létale chez la souris et est considérée comme un facteur majeur de virulence (Bouloy *et al.*, 2001 ; Vialat *et al.*, 2000). Ces différentes mutations pourraient donc avoir un impact dans la virulence du virus et jouer ainsi un rôle important dans l'infection virale et l'épidémiologie de la FVR en Afrique de l'Ouest. Des études de génétique reverse, avec une production de clones infectieux, permettrait d'investiger le rôle de ces différentes mutations trouvées dans la virulence du VFVR. Les analyses phylodynamiques toujours réalisées avec le segment S ont montré que le VFVR a été introduit 7 fois en Afrique de l'Ouest en provenance d'autres régions distantes de l'Afrique. Les travaux précédents de Soumaré et collaborateurs publiés en 2012 avaient montré 5 introductions du VFVR en Afrique de l'Ouest. Les auteurs avaient évalué la phylodynamique du VFVR par des modèles bayésiens en utilisant 48 isolats de VFVR collectés de 1983 à 2003 à partir de 18 sites au Sénégal et en Mauritanie et dans 15 autres pays (Soumaré *et al.*, 2012). Avec des séquences

partielles (NSs, Gn et la polymerase), ils avaient établi au Sénégal et en Mauritanie, cinq itinéraires d'introductions distincts à partir d'Afrique du Sud et du Zimbabwe. Notre étude qui s'est étendue jusqu'en 2015 et a utilisé le segment S complet, a montré 2 introductions supplémentaires par rapport à la 1<sup>ère</sup> étude. Ces 7 introductions trouvées sont à l'origine de la circulation de 5 lignées de VFVR (N, A, G, C, et K) en Afrique de l'Ouest. Deux études phylogénétiques antérieures avaient décrit la circulation de 2 et 3 lignées de VFVR en Afrique de l'Ouest (Bird *et al.*, 2007c; Grobbelaar *et al.*, 2011). Notre étude montre donc une augmentation du nombre de lignées (5 lignées) circulant l'Afrique de l'Ouest. Ces lignées de VFVR ont été introduites à partir de l'Afrique du Sud, l'Est et d'Egypte, probablement avec les mouvements de bétail ou d'humains infectés. Cette propagation importante du VFVR, et la multiplication des épidémies en Afrique de l'Ouest devrait inciter la mise en place d'une surveillance appropriée dans les différents pays et surtout une meilleure gestion des déplacements de bétail entre l'Afrique de l'Ouest et d'autres parties d'Afrique.

Notre étude a montré une ascendance commune entre toutes les souches de VFVR analysées autour de 1937 alors que les études antérieures ont montré un ancêtre commun autour de 1880 et 1892 respectivement (Bird *et al.*, 2007c ; Grobbelaar *et al.*, 2011). Ces différences pourraient être dues aux modèles de substitution utilisés. En effet, des études ont montré que les modèles de substitution basés sur les codons donnent un ancêtre commun beaucoup plus ancien comparé au modèle de substitution basé sur les nucléotides que nous avons utilisé dans notre étude (Wertheim & Kosakovsky, 2011). Ainsi, leurs résultats suggèrent une circulation du VFVR qui beaucoup plus ancienne que la découverte du virus en 1930 au Kenya.

Par ailleurs, notre étude a montré l'apparition de lignées différentes entre deux épidémies successives en Mauritanie entre 2012 et 2015. En effet, les souches responsables des épidémies de 2010 et 2012 en Mauritanie appartenaient à la lignée K alors que les souches à l'origine de l'épidémie de 2015 en Mauritanie appartiennent à la lignée A. Cela avait déjà été observé lors de la flambée Mauritanienne de 2003 (Faye *et al.*, 2014) où il y'avait une émergence de la lignée C alors que lors de la flambée de 2010, les souches isolées appartiennent à la lignée K. Cela montre qu'il y'a une forte dynamique des lignées entre les différents pays d'Afrique.

L'étude a montré aussi que deux lignées différentes peuvent circuler au cours de la même épidémie dans le même pays. En effet, durant les épidémies de 2010 et 2012 en

Mauritanie, avec la classification de Grobbelaar et collaborateurs, nous avons vu la circulation des lignées C et K issues de différentes introductions (Grobbelaar *et al.*, 2011). De même, pour l'épidémie de 2003, nous avons observé que les virus isolés d'arthropodes appartiennent à la lignée K alors que les souches humaines appartiennent à la lignée C. Cela suggère que nous pouvons avoir une réémergence de plusieurs lignées, avec probablement des propriétés antigéniques différentes, au même endroit et en même temps. Ceci pourrait ainsi avoir un impact important dans l'épidémiologie du VFVR.

L'étude a enfin montré la circulation de la même lignée au Sénégal et en Mauritanie, à la même année mais issue d'introductions indépendantes. En effet, les souches du Sénégal et du Mali partagent un ancêtre commun avec une souche isolée au Zimbabwe en 1974. De 1971 à 1977, il n'y a pas eu d'épidémie majeure au Zimbabwe mais juste la persistance d'une activité enzootique confirmée par des isolements de virus ou des détections d'antigènes viraux. De plus, ces souches du Zimbabwe de 1974 n'ont pas été à l'origine d'épidémie d'une grosse ampleur dans d'autres parties d'Afrique. Cela pourrait ainsi expliquer le fait que le Sénégal n'ait pas connu d'épidémie majeure en 2015 avec la même souche. Cependant les virus qui ont causé l'épidémie de 2015 en Mauritanie partagent un ancêtre commun avec les souches d'Egypte de 1977 qui appartiennent également à la lignée A. Cette épidémie d'Egypte était d'une grosse ampleur avec 200 000 cas humains et 600 morts (Meegan, 1979). De plus, des études de pathogenèse virale ont montré que les VFVR d'Egypte de 1977 étaient plus virulents que les autres virus testés chez les rats Wistar Furth (Anderson & Peters, 1988). Cela pourrait ainsi expliquer pourquoi l'épidémie de Mauritanie en 2015 causée par la même souche a eu une ampleur importante avec 57 cas humains et 12 morts (Bob *et al.*, 2017).

Cela suggère qu'au sein d'une même lignée, il existerait des virus hautement pathogènes et d'autres moins pathogènes. La lignée A paraît plus variable d'après l'arbre phylogénétique réalisé, et que cela pourrait expliquer l'existence de souches avec des degrés différents de virulence.

L'analyse des séquences complètes (après vérification des recombinaisons), permettra de confirmer si des différences liées à la génétique du virus pourraient expliquer les différents profils épidémiologiques observés en Mauritanie et au Sénégal en 2015 ou si cela doit être attribué à la génétique de l'hôte ou aux vecteurs dans les deux pays.

Notre étude a également montré que ces souches de 2015 partagent un ancêtre commun avec des souches très anciennes et ont été introduites en Afrique de l'Ouest depuis très longtemps (1960 et 1975). Cela montre que ces souches circulaient silencieusement en Afrique de l'Ouest. Une émergence de la même souche a été notée en 1984 au Sénégal chez un moustique, toutefois, des cas humains n'ont pas été enregistrés. Cette circulation silencieuse des souches a dû être maintenue dans la nature par une transmission verticale chez les moustiques ou dans les réservoirs. 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 permettent pas de le considérer comme unique mécanisme de maintien et suggère ainsi des études approfondies pour élucider cette circulation silencieuse. L'émergence récente de ces souches dans la population humaine en 2015 a donc été favorisée par des phénomènes écologiques ou climatiques particulières. En effet, les facteurs 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 et les hôtes. La pluviométrie est un des éléments clés du développement des moustiques (Hennessy & Whetton, 1997) puisque les pontes ainsi que les larves et les nymphes de moustiques ont besoin d'eau pour se développer. Nous avons dans cette optique, analysé l'impact de la pluviométrie dans la survenue des épidémies de VFVR en Afrique de l'Ouest. Les résultats ont montré que la pluviométrie pourrait jouer un rôle important dans la survenue des épidémies de VFVR. Des études précédentes avaient montré que l'émergence du VFVR est observée après une période de fortes pluviométries qui entraîneraient des conditions favorables pour l'émergence de moustiques potentiellement compétents pour la transmission du VFVR (Faye *et al.*, 2007, Miller *et al.*, 2002). En effet, il a été montré qu'une forte pluviométrie (> 60 mm) dans des zones arides avait favorisé l'avènement d'une épidémie de VFVR en Mauritanie en 2010 (Faye *et al.*, 2014).

Concernant la Mauritanie et le Sénégal, nos résultats des épidémies de 2010 et 2012 confirment les travaux précédents de Caminade et collaborateurs (Caminade *et al.*, 2014). En effet, ces auteurs avaient montré que jusqu'en 2012, la survenue d'épidémies de VFVR en Afrique de l'Ouest était favorisée par une période de fortes pluies précédée d'une période de faibles pluies d'au moins d'une semaine. Cette

période de faibles pluies pourrait avoir un impact sur la population de vecteurs *Aedes* (Caminade *et al.*, 2014). Toutefois entre 2013 et 2015, les profils d'émergence du VFVR en fonction des pluies ont varié en Afrique de l'Ouest. Cela est probablement dû à l'apparition de ces souches nouvelles appartenant à la lignée A. De façon globale les cas apparaissent à la fin de la saison des pluies en Afrique de l'Ouest (Ndione *et al.*, 2003).

De façon globale, nos résultats et ceux de Caminade et collaborateurs mettent en évidence l'importance de la variabilité intra-saisonale (faible/forte pluie ou fortes pluies suivies d'une baisse progressive) plutôt que l'ampleur globale des pluies dans l'émergence du VFVR en Afrique de l'Ouest. Cependant en Afrique de l'Est, il a été montré que ce sont plutôt des précipitations successives anormalement élevées qui jouent un rôle important dans l'émergence (Linthicum *et al.*, 1999).

L'ensemble de ces données montre un rôle important de la pluviométrie qui peut ainsi être considérée comme un indicateur de survenue d'épidémie de VFVR. Il serait donc important de mettre en place des moyens de riposte durant les saisons présentant une variabilité de pluviométrie en Afrique de l'Ouest, notamment par une lutte antivectorielle efficace afin d'éviter la propagation des populations de moustiques, potentiellement vecteurs et porteurs du virus. Pour cela, les acteurs de la santé devraient collaborer avec les services météorologiques pour une meilleure surveillance de la FVR en Afrique de l'Ouest.

Dans un contexte global, l'analyse de l'épidémiologie de la FVR en Afrique de l'Ouest montre différents profils et le pays le plus touché reste la Mauritanie. En effet, la Mauritanie est souvent frappée par de grosses épidémies de VFVR avec des conséquences désastreuses sur le bétail et la santé humaine. Le Sénégal et le Mali sont marqués par des cas sporadiques de VFVR. Récemment, le Niger a connu aussi une épidémie avec plusieurs cas confirmés et des décès. Les facteurs qui font que l'impact du VFVR soit plus important en Mauritanie peuvent être diverses. Les souches introduites en Mauritanie peuvent être plus virulentes à l'instar de la souche d'Egypte qui a provoqué l'épidémie de 2015 en Mauritanie. Toutefois, en 2012, la même souche de VFVR a circulé au Sénégal et en Mauritanie, et les profils épidémiologiques étaient différents avec une épidémie grave en Mauritanie et un cas sporadique au Sénégal. De plus, la pluviométrie est globalement plus faible en Mauritanie que dans les autres pays analysés dans l'étude. Cela suggère que la diversité génétique du virus et la pluviométrie à elles seules, ne permettent pas

d'expliquer les différents profils épidémiologiques observés en Afrique de l'Ouest. Cela suggère que plusieurs facteurs sont à l'origine de l'épidémiologie différente dans les différents pays d'Afrique de l'Ouest et que des études complémentaires sont nécessaires pour mieux la comprendre.

L'ensemble des données de cette étude montre également une forte dynamique des lignées de VFVR entre les différents pays d'Afrique et une augmentation du nombre de lignées circulant en Afrique de l'Ouest et des épisodes liés au VFVR. Il serait ainsi intéressant de renforcer la surveillance dans les pays d'Afrique de l'Ouest avec une approche "une seule santé" qui consisterait à surveiller les moustiques, les animaux, les humains et l'environnement (les pluies par exemple). Cette surveillance devrait être génotypique et phénotypique dans le but de détecter les infections rapidement notamment les cas sévères de la maladie, d'identifier les virus surtout ceux avec un potentiel épidémique important afin de pouvoir mettre en place des stratégies de lutte ou ré-orienter celles existantes.

Une meilleure gestion du transport de bétail entre les différents pays d'Afrique devrait également être mise en place. Enfin, vue également la propagation rapide du virus, il serait important de mettre en place une veille au niveau international, et de mettre en place un vaccin contre la FVR car à l'instar de la maladie à virus Ebola, la FVR est une fièvre hémorragique virale qui pourrait engendrer des pertes considérables en cas de pandémie.

## **VI. Conclusion**

Les souches de VFVR qui ont causé des épizooties et des épidémies depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle semblent dériver des virus qui ont émergé d'un réservoir local quand l'élevage à grande échelle de moutons et de bétail a été introduit en Afrique. Plusieurs introductions du virus en Afrique de l'Ouest venant d'autres pays de l'Afrique ont été observées. De façon intéressante, dans la même année 2015, nous avons noté une circulation du virus en Mauritanie et au Sénégal, issue de deux introductions indépendantes du virus.

Nous avons montré aussi que les souches de VFVR en Afrique de l'Ouest présentent une faible diversité génétique. L'existence de plusieurs lignées qui circulent et l'augmentation du nombre de lignées dans la zone, montrent une forte dynamique et une propagation importante du virus. Il est donc urgent d'avoir des médicaments antiviraux et un vaccin humain sûr et efficace contre l'infection par le VFVR, en

addition à des vaccins vétérinaires existants. En conséquence du haut degré de conservation des séquences des gènes du segment M codant pour les glycoprotéines de surface du virion, un seul vaccin pourrait être capable d'obtenir une immunité protectrice contre tous les virus actuellement en circulation. De même, le haut degré de conservation du segment L, y compris les régions qui codent les motifs fonctionnels de l'ARN polymérase ARN-dépendante, suggère qu'un médicament antiviral ciblant l'enzyme pourrait également être efficace contre toutes les souches virales. Dans le même temps, l'existence d'une base de données de séquences de grande taille aidera à identifier le virus et à déterminer sa source géographique en cas de nouveaux foyers. Il faudrait encourager activement la collecte continue et l'analyse du génome entier des isolats viraux afin de mieux comprendre comment le VFVR circule dans sa « patrie ancestrale », comment elle se propage à l'extérieur de cette région et comment elle établit une présence enzootique dans de nouvelles zones. Selon le virus, la disponibilité du vecteur, la climatologie, la concentration humaine, la modification des activités humaines, les éventuels bouleversements écologiques en cours (déforestation, assèchement des zones humides, urbanisation galopante, etc.), l'homme sera en contact plus ou moins proche et répété avec cet arbovirus. On constate ainsi des cas sporadiques (FVR des éleveurs et des forestiers comme au Sénégal), des épidémies plus ou moins étendues (épidémies à VFVR au Niger 2016), voire l'installation de zones d'endémie stable (Mauritanie). Les troupeaux itinérants infectés pourraient jouer un rôle important dans l'introduction et à la dispersion des souches de VFVR à travers l'Afrique (LaBeaud *et al.*, 2011). Parce que les moustiques ne peuvent pas voler plus de quelques centaines de mètres au cours de leur vie, leur rôle dans la diffusion dans le temps et dans l'espace peut être limitée, (Ba *et al.*, 2005). Cependant, dans une zone donnée, les moustiques compétents peuvent jouer un rôle très important dans la transmission du VFVR en piquant des hôtes infectés et en transmettant le virus à d'autres hôtes à travers les repas sanguins. Lors de cette piqûre de moustique, le virus est injecté à l'homme en même temps que la salive qui semble jouer un rôle de facilitation de l'infection chez la souris. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de la salive du moustique dans la transmission du VFVR chez l'Homme. Cela devrait permettre de mieux comprendre les interactions entre le virus et le moustique vecteur afin de mettre en place des stratégies de contrôle de la FVR liées aux vecteurs.

## CHAPITRE 2 : EXPLORATION DU ROLE DE LA SALIVE DU

### MOUSTIQUE DANS LA TRANSMISSION ET LA

### PATHOGENESE DU VFVR CHEZ L'HOMME

#### **I. Introduction**

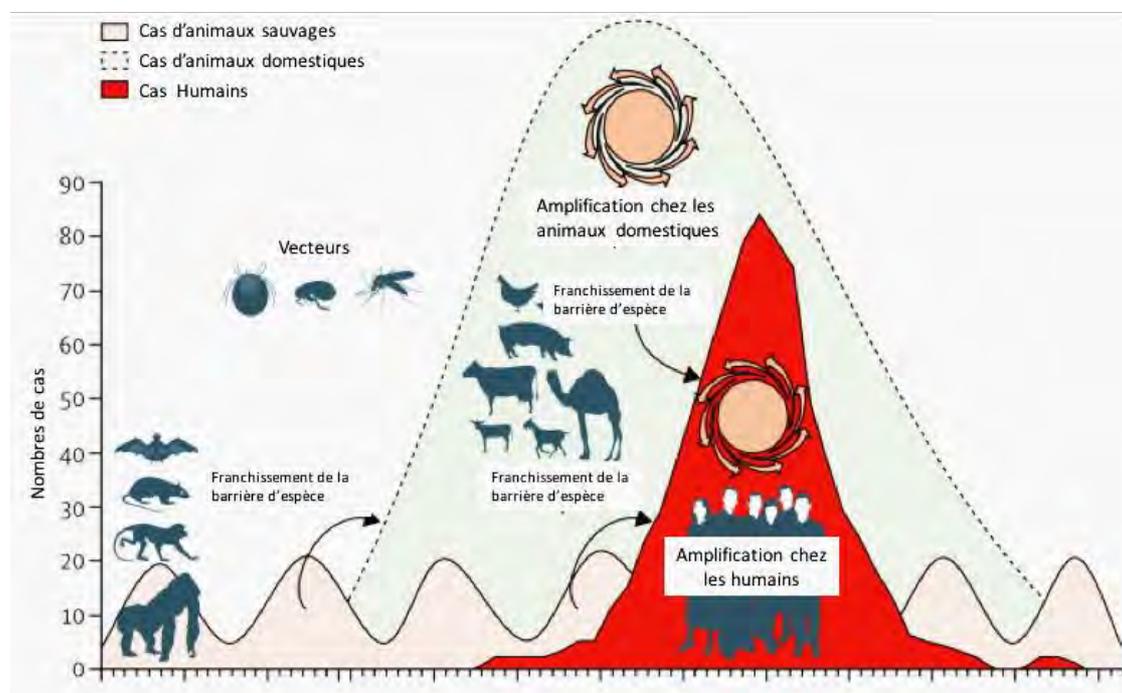
Plus de 60% des maladies infectieuses humaines sont des zoonoses, causées par des agents pathogènes qui circulent aussi chez des animaux sauvages et/ou domestiques (Figure 15). De telles maladies comprennent la leptospirose, la rage, la maladie de Chagas, la Grippe de type A, la maladie à virus Ebola, le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) et la fièvre de la vallée du Rift (William *et al.*, 2012 ; Kilpatrick & Raudolph, 2012).

La connaissance de la dynamique de circulation de ces agents pathogènes chez les animaux sauvages pourrait servir de système d'alerte précoce qui permettrait de mieux informer sur le risque d'une épidémie chez le bétail ou les personnes et réduire ainsi le nombre de cas de maladie humaine.

La transmission à l'Homme de ces agents pathogènes provenant d'autres espèces (Figure 15), est un produit naturel de notre relation avec les animaux et l'environnement. Ainsi, l'émergence d'une zoonose dépend de plusieurs facteurs qui agissent souvent simultanément en modifiant la dynamique des agents pathogènes, y compris les facteurs environnementaux, les changements dans l'utilisation des terres, le climat, la croissance de la population humaine, les changements de comportement humain, les voyages internationaux ou le commerce. Le risque de cette transmission à l'Homme peut varier selon la géographie et les saisons (Smolinski *et al.*, 2003). Concernant les zoonoses vectorielles, l'écologie des vecteurs intervient également et rend ainsi la dynamique de transmission plus complexe (Kilpatrick & Raudolph, 2012).

La FVR est une zoonose vectorielle qui peut être transmise aux humains par contact avec des animaux ou tissus infectés, aérosols, ou par piqûre de moustiques. La transmission via les moustiques peut jouer un rôle très important dans la transmission animal-homme ou inter-humaine. De nombreux travaux ont permis de démontrer l'implication de plusieurs espèces de moustiques (Diptères : *Culicidae*) hématophages

des genres *Culex*, *Aedes* et *Mansonia* dans la transmission du VFVR à l'Homme (Smithburn, 1949 ; Lutomiah *et al.*, 2014 ; Arum *et al.*, 2015 ; Ndiaye *et al.*, 2016).



**Figure 15: Mécanisme d'émergence d'une zoonose (William *et al.*, 2012)**

Transmission de l'infection et amplification chez les humains (en rouge) se produit après qu'un pathogène provenant d'animaux sauvages (en rose) se déplace chez les animaux domestiques pour provoquer une épidémie (en vert clair) qui augmente ainsi la capacité de transmission des agents pathogènes aux humains.

La compétence vectorielle des moustiques dépend de facteurs intrinsèques du moustique et du virus. Au-delà de cette capacité à pouvoir transmettre, d'autres facteurs intrinsèques du moustique comme la salive injectée lors du repas sanguin, peuvent jouer un rôle dans la mise en place et la facilitation de l'infection chez l'hôte vertébré.

Ainsi, différentes études utilisant les virus de la Dengue, *West Nile*, *Cache Valley* et VFVR ont montré un rôle important de la salive du moustique dans la transmission du virus, la facilitation et la sévérité de l'infection chez la souris (Surasombatpattana *et al.*, 2012 ; Schneider *et al.*, 2006 ; Edwards *et al.*, 1998 ; Le Coupanec *et al.*, 2013). Cependant, ce rôle n'est pas démontré chez l'Homme et aucune protéine de glandes salivaires jouant un rôle dans la facilitation de l'infection chez l'hôte vertébré n'a été identifiée à ce jour.

Pour contrôler la propagation des arbovirus, des méthodes traditionnelles sont employées comme la vaccination d'hôtes susceptibles et la lutte anti-vectorielle. Cependant dans certains cas, ces mesures ne sont pas disponibles ou sont inefficaces. Il est ainsi crucial de développer de nouvelles stratégies de lutte contre les arbovirus comme la mise en place d'un mécanisme pour bloquer la transmission du virus par le moustique ou empêcher la facilitation de l'infection par les protéines de glandes salivaires. Le développement de telles stratégies nécessite une meilleure connaissance des interactions entre le virus et son vecteur (Tchankouo-Nguetcheu *et al.*, 2012). En effet, l'étude de ces interactions virus/vecteur pourrait permettre l'identification de facteurs clés dans la transmission du virus par le vecteur ou dans la facilitation de l'infection et de pouvoir ainsi permettre la mise en place de stratégies de contrôle.

Dans cette partie du travail nous explorons le potentiel rôle de la salive de moustiques d'*Aedes vexans* et de *Culex poicilipes* (vecteurs anthropophiles) dans la facilitation de l'infection au VFVR chez l'Homme en Afrique de l'Ouest. Pour cela nous avons utilisé des approches protéomiques pour rechercher des protéines de glandes salivaires et d'anticorps spécifiques dans les sérums humains, identifier ces protéines d'intérêt afin d'étudier les possibles rôles qu'elles peuvent jouer dans la facilitation de l'infection virale chez l'Homme. L'identification des mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces processus de facilitation de l'infection virale par ces protéines salivaires, peut se révéler très utile notamment dans la mise en place d'outils thérapeutiques comme des vaccins « altruistes », qui permettraient de limiter les formes sévères de la FVR. Dans le cas où le mécanisme serait conservé entre les différents genres ou espèces de pathogènes et/ou de moustiques, ces vaccins pourraient de façon intéressante lutter contre de nombreuses maladies vectorielles.

## **II. Matériels et Méthodes**

### **II.1 Matériels**

#### **II.1.1 Sérums utilisés**

Durant les épidémies de FVR survenues en Mauritanie en 2010 et 2012, des investigations ont été menées par les équipes de surveillance du Ministère de la Santé de la Mauritanie en collaboration avec l'IPD.

En 2010, durant la période d'octobre à décembre les critères d'inclusion pour les cas suspects étaient la fièvre avec ou sans hémorragie, la jaunisse et les symptômes

neurologiques. Concernant les sujets contact, les critères d'inclusion étaient toute personne saine vivant à proximité d'un individu ou d'un animal qui a été confirmé positif au VFVR. D'octobre à décembre 2010, 80 sérums dont 36 avec suspicion de FVR et 44 sujets contact ont été recueillis à Atar, Aoujeft, Chingetti, Kobeni, Tintane et Moughatas. Parmi les cas suspects, 30 ont été confirmés positifs au VFVR par RT-PCR et ELISA.

En 2012, durant la période du 1<sup>er</sup> septembre au 29 novembre les critères d'inclusion étaient pour les cas suspects la fièvre, état grippal avec ou sans hémorragie ou de troubles neurologiques. Les sujets contact représentaient les membres de la famille ou les voisins proches des cas confirmés de VFVR. De septembre à fin novembre, 288 sérums ont été recueillis dont 47 cas suspects de FVR, et 218 sujets contact à Tagant, Brakna, Trarza, Assaba et Hodh-El-Gharbi. Parmi les cas suspects, 23 ont été confirmés par RT-PCR et ELISA.

Ces sérums ont été testés en Mauritanie durant les investigations, puis acheminés au CRORA, à l'IPD pour des tests de confirmation. Pour la présente étude, nous avons sélectionné 22 sérums de patients infectés durant les épidémies de 2010 et 2012 et 6 sérums parmi les sujets contacts négatifs de la même période. La sélection des positifs dans la biobanque du CRORA a été faite selon deux critères principaux : la disponibilité des sérums (volume suffisant) et le statut du patient (positif en IgM, en PCR ou aux 2).

### **II.1.2 Glandes salivaires de moustiques : *Aedes vexans* et *Culex poicilipes***

Nous avons utilisé les glandes salivaires de moustique d'*Aedes vexans* et de *Culex poicilipes*. Les moustiques ont été collectés dans la commune de Barkédji par l'équipe de l'Unité d'Entomologie Médicale de l'IPD en 2014 et 2015. Les captures de moustiques ont été effectuées au village de Barkédji (14° 53' 0'' N et 15° 55' 0'' W) principalement autour de la mare de Niakha (14° 53' 56''.17 W et 15° 17' 50''.02 N) située à 7 km du village de Barkédji et la mare de Fourdou (14° 51' 59''.2 W et 15° 15' 31''.7 N). Dans ces deux lieux, *Aedes vexans* a été majoritairement collecté. La capture de *Culex poicilipes* a été principalement faite autour de la mare de Kangedji (14° 50' 38''.46 W et 15° 16' 23''.42 N) située à 4 km du village de Barkédji. Des dissections pour récupérer les glandes salivaires ont été réalisées par cette même

équipe sur deux catégories de moustiques : des moustiques expérimentalement infectés avec le VFVR et des moustiques non infectés.

### II.1.3 Anticorps polyclonaux anti-glandes salivaires de moustiques

Les anticorps polyclonaux utilisés dans notre étude et dirigés contre les protéines de salive de moustiques des genres *Aedes* et *Culex*, ont été produits à l'Institut Pasteur de Paris par l'équipe de l'Unité Environnement Risques Infectieux Groupe Arbovirus

## II.2. Méthodologie

La méthodologie globale adoptée est décrite dans la figure suivante :

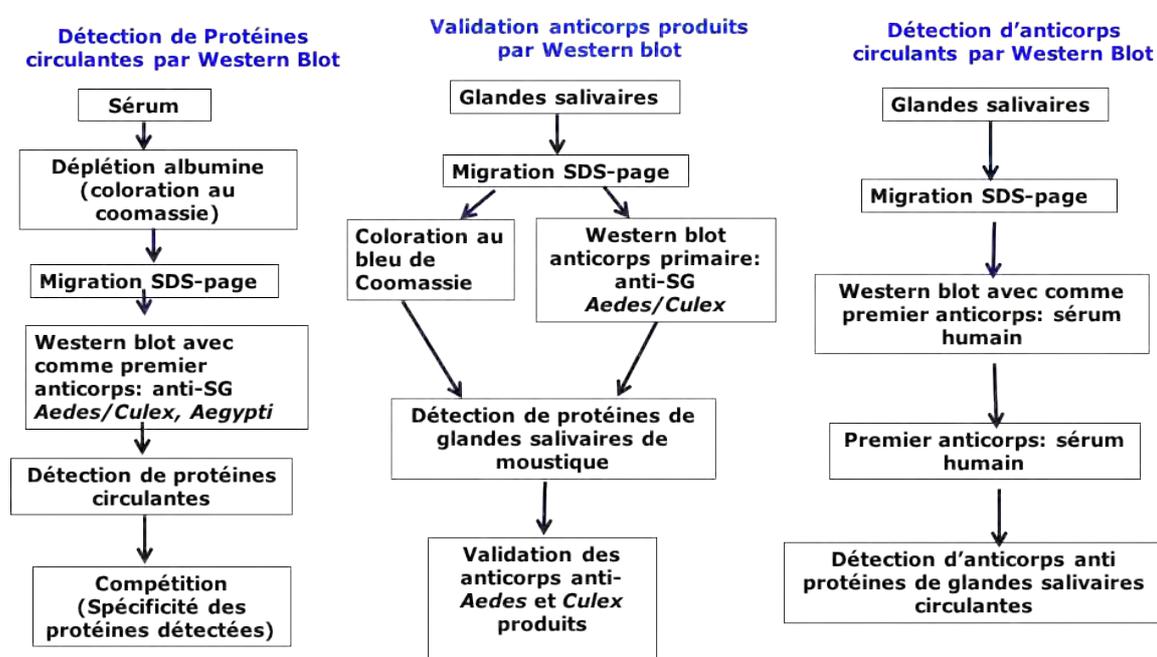


Figure 16: Schéma global de la méthodologie adoptée

### II.2.1 Production d'anticorps polyclonaux anti *Aedes/Culex*

Deux lapins ont été utilisés pour gorger des moustiques du genre *Aedes* et *Culex* (*Aedes aegypti* et *Culex pipiens*) pendant 3 mois à raison de 2 repas de sang par semaine. Les sérums de lapins ont été prélevés à différentes périodes après le début des repas de sang et titrés par la méthode ELISA en utilisant comme revêtement de la plaque, des extraits de glandes salivaires de *Culex* et *Aedes*. Lorsque le titre des anticorps atteint un plateau, environ 12 ml de sérum a été récolté et aliquoté. La

purification des immunoglobulines de type G (IgG) a ensuite été faite en utilisant une colonne du kit Melon (Melon Gel IgG Spin Purification Kit-Thermo Fisher Scientific). Les IgG purifiés ont été utilisés dans notre étude comme anticorps primaires pour la détection des protéines de glandes salivaires par immuno-empreinte (*Western blot*).

### **II.2.2 Infection des moustiques et collecte de glandes salivaires**

*Ae. vexans* et *Cx. poicilipes* ont été choisis du fait du rôle important que ces deux espèces pourraient jouer dans la transmission de la FVR. Elles ont été régulièrement trouvées associées au virus de la FVR en Afrique de l'Ouest (Fontenille *et al.*, 1995, Diallo *et al.*, 2000, Ba *et al.*, 2012). Leur abondance, et interaction étroite avec les hôtes vertébrés du VFVR confortent leur capacité vectorielle.

Pour des raisons liées aux difficultés d'élevage en laboratoire, la progéniture (F0) de moustiques adultes *Culex poicilipes* collectés du terrain a été utilisée tandis que chez *Aedes vexans*, la génération F1 a été utilisée.

#### **➤ Collecte de glandes salivaires des moustiques non infectés**

Des femelles âgées de 3 à 4 jours ont été utilisées. Les glandes salivaires ont été extraites suivant les techniques classiques sur lame porte objet contenant une goutte de PBS\_1X à l'aide d'une loupe binoculaire. Pour chaque espèce, 100 individus ont été disséqués et les 100 glandes salivaires récupérées mises ensemble dans un tube Eppendorf contenant 100µl de PBS-1X ou d'un tampon [constitué d'urée (7M), de thiourea (2M) et de 4% CHAPS (4% w/v) et de DTT à 40 mM] puis conservées à – 80°C.

#### **➤ Collecte de glandes salivaires des moustiques infectés au VFVR**

**Le virus.** Une souche humaine de FVR isolée d'un homme en Mauritanie en 2003 (SH172805) a été utilisée. Elle a été choisie du fait des taux importants de répllication et de dissémination obtenus avec les deux espèces de moustiques susmentionnés lors d'une étude de compétence vectorielle. Dans cette étude, elle a été l'unique souche transmise par les moustiques (Ndiaye *et al.*, 2016).

**Les moustiques.** Des femelles âgées de 3 à 4 jours et nourries de jus sucré, ont été utilisées pour les infections orales. Elles ont été mises dans des pots d'élevage

cylindriques en carton couverts à leur extrémité supérieure par un morceau de tulle moustiquaire. Elles ont été affamées par privation de jus sucré pendant 48 heures. Seul un coton imbibé d'eau leur a été présenté pour leur éviter les conditions extrêmes de soif ou de déshydratation qui pourraient les affaiblir et impacter négativement sur le pourcentage de moustiques gorgés.

**Procédure expérimentale.** Les moustiques ont été infectés dans l'insectarium de niveau de sécurité 3 (I3) de l'unité d'Entomologie Médicale de l'IPD suivant les procédures déjà décrites par Ndiaye *et al.*, 2016. Le système de repas artificiels sur membrane décrit par Rutledge a été utilisé (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 humain) à partir d'un bain- marie (Figure 17). Le gorgeur a été recouvert dans sa partie inférieure d'une peau de poulet ou de souris à travers laquelle le moustique peut piquer et aspirer le sang mis à son contact.



**Figure 17: Infection de moustiques par voie orale**

Nous avons dans notre étude, utilisé dans un premier temps du sang de lapin. Devant la faiblesse du pourcentage de moustiques gorgés, nous l'avons substitué par du sang de mouton. Le prélèvement de sang a été fait au plus 24 heures avant le repas

infectant dans un tube à hémolyse contenant de l'héparine à 2%.

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 ont été utilisées. Ainsi, le sang a été centrifugé à 1200 tours/mn pendant 5 minutes à 4°C, puis le sérum a été prélevé et éliminé. Les hématies ont ensuite été lavées après avoir été mises en suspension dans du PBS 1X puis centrifugées à nouveau dans les mêmes conditions que précédemment. Cette opération de lavage a été répétée 3 fois avant de conserver les hématies à + 4°C.

Le repas de sang artificiel est constitué d'1/3 d'hématies lavées au PBS 1X, 1/3 de la suspension virale et 1/3 d'un mélange de sérum de veau fœtal, d'ATP à 0,005 M et d'une solution de sucrose à 10%.

Une fois constitué, le repas de sang a été transféré dans les gorgeurs et les moustiques affamés depuis 48 heures ont été admis à se gorger.

Après 60 minutes d'exposition au repas artificiel, les moustiques ont été anesthésiés au froid et ceux qui sont entièrement gorgés ont été récupérés et remis dans des pots d'élevage pour y être incubés à  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , 75-80% d'humidité relative et une photopériodicité de 12 heures. Pendant toute la durée de l'incubation, les moustiques sont nourris uniquement de jus sucré pour éviter tout contact avec des anticorps pouvant gêner le processus de réplication du virus. 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.

**Traitement des moustiques.** Après 15 jours d'incubation les moustiques sont tués au froid et les glandes salivaires de chaque individu disséqués sur une lame contenant 1 goutte de PBS 1x. Après dissection, les glandes salivaires de chaque individu sont récupérées dans un tube contenant 1µl de PBS 1x ou d'un tampon [constitué d'urée (7M), de thiourea (2M) et de 4% CHAPS (4% w/v) et de DTT à 40 mM]. Les tubes contenant les glandes salivaires sont conservés à -80°C. Le corps correspondant (à chaque glande salivaire) est aussi récupéré dans un tube et conservé à -80°C pour des tests de détection du virus FVR par RT-PCR à temps réel. Seules les glandes salivaires d'individus dont les corps sont testés positifs à l'infection au VFVR sont prises en considération et groupées dans un même tube.

## **II.3 Détection des protéines de glandes salivaires et d'anticorps anti - protéines de glandes salivaires dans les sérums humains**

### **➤ Préparation des échantillons**

La méthode de détection des protéines par immuno-empreinte ou *Western blot* a été utilisée dans notre étude.

Les sérums humains ou des préparations de glandes salivaires ont été utilisées respectivement pour la détection des protéines de glandes salivaires ou d'anticorps anti-protéines de glandes salivaires circulant.

Compte tenu du taux élevé d'albumine dans les sérums humains, une première étape de déplétion de l'albumine a été faite avec le kit Pierce Albumin déplétion Kit (Thermo scientific).

Les glandes salivaires préalablement décongelées sont homogénéisées par congélation/décongélation pour rompre les membranes. Les échantillons (sérums ou glandes salivaires) ont ensuite été chauffés pendant 5 minutes à 95°C dans une solution tampon contenant du Tris, un colorant, un composant sulfhydryl (typiquement du beta-mercaptoéthanol ou du dithiothréitol ou plus simplement DTT), un détergent anionique lipophile (sodium dodécyl sulfate ou SDS) et du glycérol pour augmenter la poussée d'Archimède. Pour nos *Western blots*, nous avons utilisé un tampon commercial (Novex NuPAGE LDS sample Buffer 4X plus Novex NuPAGE sample Reducing agent 10X, Life Technologies).

### **➤ L'électrophorèse sur gel d'acrylamide**

Les protéines de l'échantillon (sérum humain ou préparation de glandes salivaires) sont séparées par SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Les échantillons sont chargés l'un à côté de l'autre dans les différents puits du gel. Un courant électrique est appliqué au gel qui permet de séparer les protéines selon leurs poids moléculaires. Une colonne est réservée à un « marqueur de poids moléculaire » ou « échelle standard » correspondant à une mixture de protéines possédant des poids moléculaires définis, disponibles dans le commerce (Novex Sharp-Stained protein standard, Invitrogen).

Les sérums (10µl) ou les préparations de glandes salivaires (5µl) préalablement dénaturés par chauffage, sont déposés sur les gels (Novex NuPAGE 10% ou 12% Bis

Tris gel invitrogen). Les gels sont ensuite placés dans une cuve d'électrophorèse (Invitrogen) contenant du tampon de migration (Novex NuPAGE MES SDS running buffer, Life Technologies) et soumis à un courant électrique de 100 mA (Figure 18).

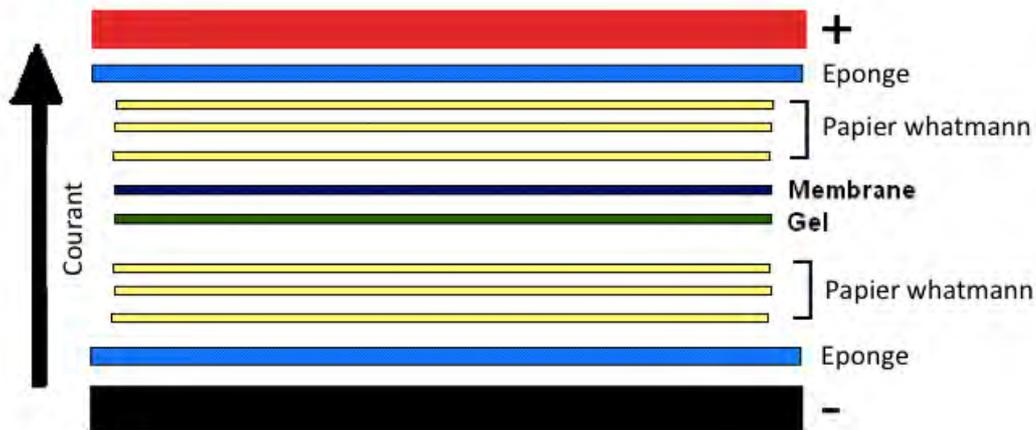


**Figure 18: Electrophorèse sur gel acrylamide**

Les échantillons ont été déposés dans les puits du gel avec du tampon, Novex NuPAGE LDS sample Buffer (en vert) et les marqueurs de poids moléculaires à gauche (en bleu). Le gel a été placé dans la cuve de migration contenant le tampon de migration, puis soumis à un courant électrique.

### ➤ Transfert sur membrane de nitrocellulose

Afin de rendre les protéines accessibles à la détection par anticorps, elles ont été transférées depuis le gel sur une membrane de nitrocellulose (Biorad). Un système en « sandwich » est effectué en utilisant des éponges, du papier Whatman, le gel et la membrane de nitrocellulose (Figure 19). La membrane est placée face-à-face avec le gel, et un courant électrique de 50 volts est appliqué pendant 2 heures. La cuve de transfert est remplie d'une solution de transfert (Novex Nupage transfert buffer, Life Technologies). Les protéines chargées négativement durant la SDS-PAGE, migrent vers le pôle positif, depuis le gel vers la membrane en conservant la même organisation relative que sur le gel.



**Figure 19: Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose avec la méthode << sandwich >>**

### ➤ La saturation des sites non spécifiques sur la membrane de nitrocellulose

La membrane de nitrocellulose ayant des propriétés de liaison non-spécifique, des précautions doivent donc être prises pour minimiser les fixations non spécifiques. Pour cela, la membrane est saturée avant détection des protéines d'intérêt. Le blocage des sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps est réalisé en plongeant la membrane dans une solution de lait sans matières grasses (Régilait dilué à 5 % dans du PBS 1X) en présence de détergent, typiquement du Tween 20 à 0,05%), pendant une heure à température ambiante. Les protéines dans la solution

diluée se lie à la membrane dans tous les sites non-occupés par les protéines préalablement transférées. Ainsi lorsque les anticorps sont appliqués lors de l'étape suivante, ils ne pourront (idéalement) s'attacher à la membrane que sur les sites de liaison de leur protéine-cible, ce qui réduit le « bruit de fond » dans le produit final ce qui donne des résultats plus clairs, et élimine les faux positifs.

### ➤ **La détection de la protéine cible sur nitrocellulose**

Au cours de la détection, la protéine cible est d'abord reconnue par des anticorps spécifiques (anticorps primaires), puis ces derniers sont liés à un conjugué (anticorps secondaires) couplé à une enzyme émettant un signal photométrique ou colorimétrique. Pour plusieurs raisons, cette détection se produit classiquement en deux étapes, bien que des méthodes en une étape soient disponibles pour certaines applications.

**Fixation des anticorps primaires.** Les anticorps polyclonaux anti-protéines de salives d'*Aedes* et *Culex* produits chez le lapin, ou les sérums humains ont été utilisés comme anticorps primaires. Trois approches différentes ont été utilisées :

La première approche consistait à valider les anticorps anti- protéines de salives d'*Aedes* et *Culex* produits chez le lapin, et pour cela, ces anticorps ont été utilisés comme anticorps primaires sur une membrane de nitrocellulose contenant des protéines totales de glandes salivaires.

La deuxième approche consistait à détecter des protéines de glandes salivaires de moustique qui circulent dans les sérums humains, pour cela, les anticorps anti-*Aedes* et *Culex* ont également été utilisés comme anticorps primaires.

Enfin pour la troisième approche, les sérums humains ont été utilisés comme anticorps primaires pour la détection des anticorps anti-protéines de glandes salivaires qui y circulent.

Les anticorps primaires ont été dilués au 1/200 dans du PBS contenant 5% de lait sans matières grasses (Regilait). La membrane a été incubée dans la dilution d'anticorps primaires pendant 1 heure à température ambiante, sous faible agitation.

La membrane a ensuite été lavée 3 fois pendant 5 minutes avec une solution de lavage (PBS 1X-Tween 0,05%) pour enlever les anticorps primaires non liés.

**Fixation des anticorps secondaires.** La membrane a ensuite été exposée à un autre anticorps espèce-spécifique, dirigé contre une portion de l'anticorps primaire. Nous

avons utilisé l'anticorps secondaire 2<sup>nd</sup> *antibody solution Alkaline-phosphatase conjugated anti-rabbit* (Invitrogen) avec une incubation de 30 minutes à 1 heure dans le cas de la détection des protéines de glandes salivaires de moustique circulant dans les sérums humains. Dans le cas de la détection des anticorps anti-protéines de glandes salivaires de moustique, nous avons utilisé l'anticorps secondaire *Alkaline-phosphatase Goat anti-Human IgG +A+M* (Invitrogen).

La membrane est ensuite soumise à un rinçage 3 fois pendant 5 minutes avec une solution de lavage (PBS 1X-Tween 0,05%).

**Révélation des protéines cibles sur la membrane de nitrocellulose.** Après rinçage des anticorps secondaires non-liés, une étape de révélation est réalisée pour détecter les protéines d'intérêt. Nous avons utilisé le Novex AP Chromogenic substrat NBT/BCIP (Invitrogen) qui est un substrat de la phosphatase alcaline pour la révélation des protéines. Après apparition des bandes de protéines, une vérification du poids moléculaire est réalisée en comparant les bandes marquées à celles des marqueurs de la gamme étalon.

#### **II.4 Test de compétition**

Un test de compétition a été réalisé pour vérifier la spécificité des protéines de glandes salivaires de moustiques détectées dans les sérums humains des malades. Pour cela, nous avons pré-incubé une dilution d'anticorps anti-glandes salivaires d'*Aedes* et *Culex* (1/200) avec des quantités croissantes de protéines de glandes salivaires mesurées au Nanodrop (10, 20 et 50 µg), pendant une nuit à 4 °C. Puis nous avons fait migrer sur gel les sérums des malades et avons utilisé le mélange pré-incubé comme anticorps primaire. Comme anticorps secondaire, nous avons utilisé les anticorps anti - IgG+A+M humain (Invitrogen). La révélation a été faite avec le NBT/BCIP.

#### **II.5 Coloration au bleu de coomassie**

Pour la détection des protéines totales, nous avons fait migrer des glandes salivaires infectées et non infectées d'*Aedes vexans* et de *Culex poicilipes*, puis les gels ont été lavés avec de l'eau distillée pendant 5 minutes (3 fois) et colorés au bleu de Coomassie (Bio-Safe coomassie G-250 Stain, Biorad) pendant 30 minutes. Les gels ont ensuite été décolorés avec de l'eau distillée.

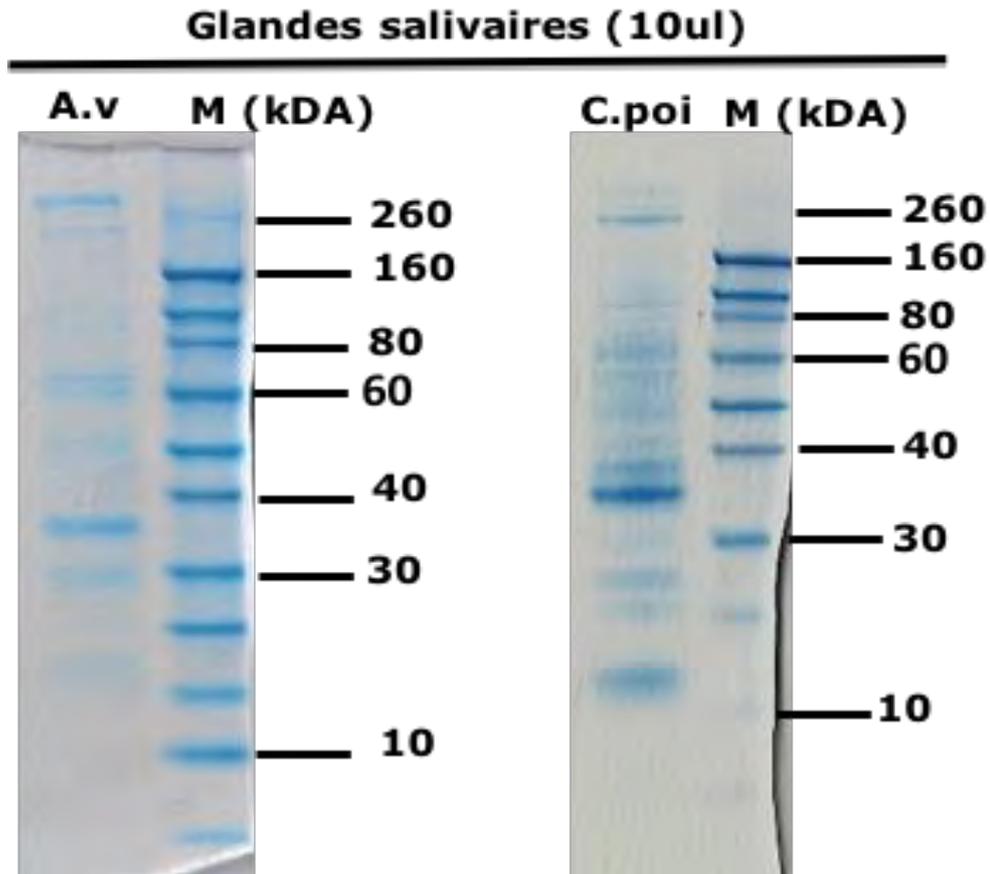
## **II.6 Identification des Protéines par spectrometrie de masse**

Les protéines de glandes salivaires ont été séparées par SDS-PAGE, puis le gel a été coloré au bleu de Coomassie. Les bandes d'intérêt (protéines de glandes salivaires qui circulent dans les sérums humains ou reconnues par les sérums humains) ont été découpées puis envoyées à l'Institut Pasteur de Montevideo pour analyse. Les bandes de gel ont été traitées en spectrométrie de masse comme précédemment décrit (Lima *et al.*, 2011).

## **III. Résultats**

### **III.1 Détection des protéines totales de glandes salivaires par coloration au bleu de Coomassie et *Western blot***

La coloration au bleu de coomassie nous a permis de détecter des protéines de glandes salivaires avec différents poids moléculaires (entre 280 et 18 kDa). Plus de protéines ont été détectées chez *Culex poicilipes* comparé à *Aedes vexans*. Il a également été observé des bandes protéiques de poids moléculaires identiques sur les deux profils de séparation (environ 260, 60 et 35 kDa) chez les deux espèces (Figure 20).



**Figure 20: Détection des protéines de glandes salivaires de moustique après une coloration au bleu de coomassie**

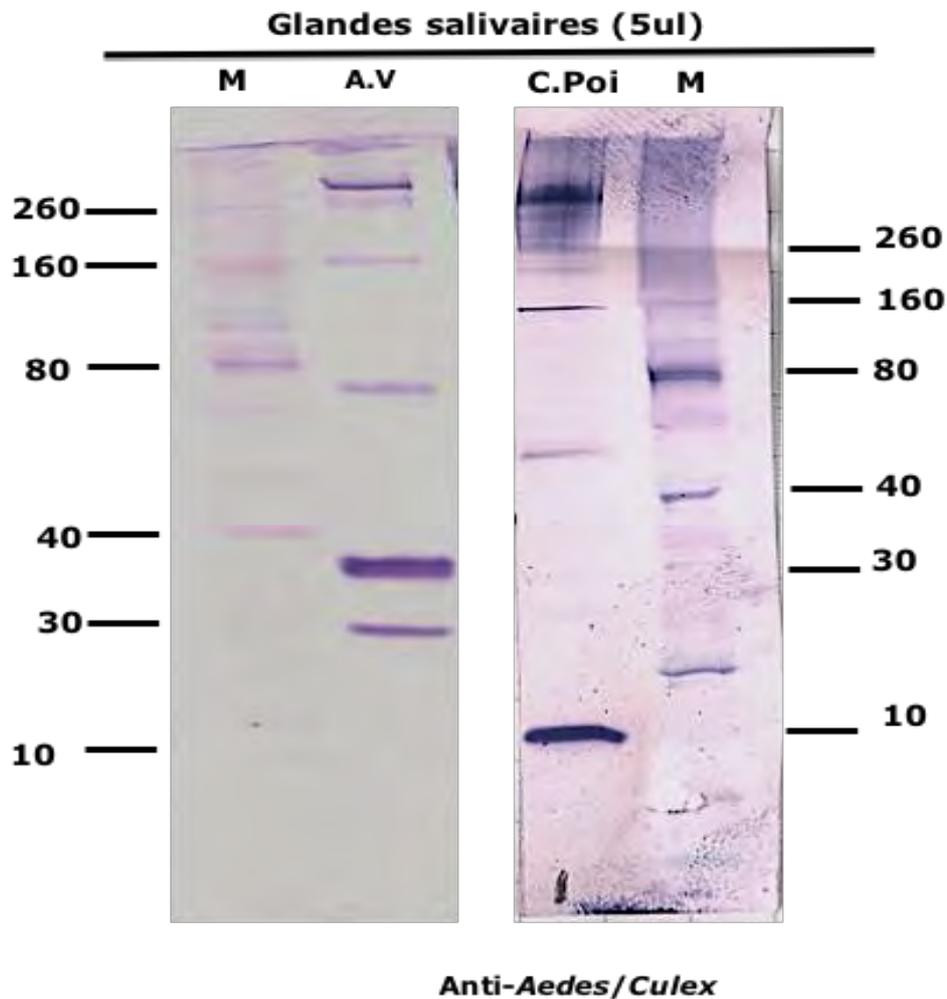
AV= *Aedes vexans*

C.poi= *Culex poicilipes*

M= Marqueur de Poids moléculaire

En *Western blot*, des bandes protéiques communes à environ 260 et 160 kDa ont été détectées chez les deux espèces de moustiques. La bande à 35 kDa détectée chez les espèces de moustique après coloration au bleu de Coomassie, n'a été détectée en *Western blot* que chez *Aedes vexans*. Des bandes protéiques d'intensité faible, ont été détectées entre 260 et 160 kDa chez *Culex poicilipes* de même qu'une protéine à 10 kDa. Une protéine à 70 kDa a été détectée pour *Aedes vexans* et une protéine à 50 kDa a été reconnue pour *Culex poicilipes*.

Globalement, les profils protéiques obtenus en *Western blot* sont différents entre les deux espèces. De plus, plusieurs bandes de protéines observées après coloration au bleu de Coomassie n'ont pas été reconnues par les anticorps (Figure 21).



**Figure 21: Détection des protéines de glandes salivaires de moustique par la technique de *Western blot***

A. V= *Aedes vexans*

C.poi= *Culex poicillipes*

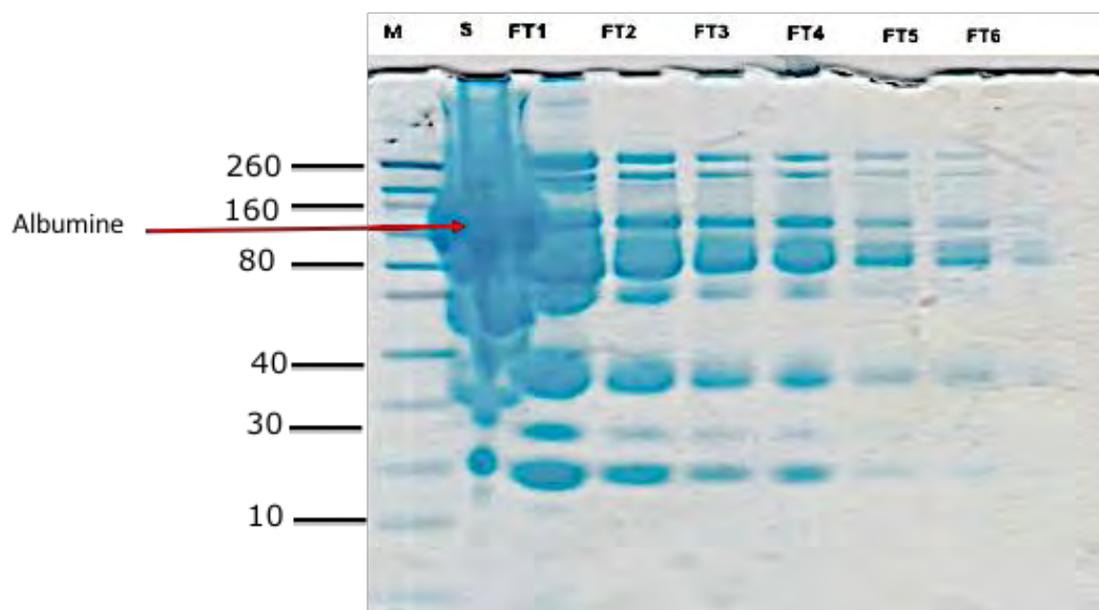
M= Marqueur de Poids moléculaire

### III.2 Détection des protéines de glandes salivaires circulant dans les sérums humains

#### III.2.1 Déplétion de l'albumine contenue dans les sérums humains

Les résultats montrent que l'albumine a été déplétée de façon efficace dans les fractions 2 à 6, la fraction 1 contenant encore beaucoup d'albumine. Les autres protéines du sérum sont bien représentées dans les fractions 1 et 2, et leurs intensités

diminuent au fur et à mesure dans les fractions 3 à 6. La fraction 2 contenant moins d'albumine et d'autres protéines de sérum bien représentées, a été utilisée pour la suite des analyses (Figure 22).



**Figure 22: Test de déplétion de l'albumine et coloration au bleu de coomassie**

S = sérum

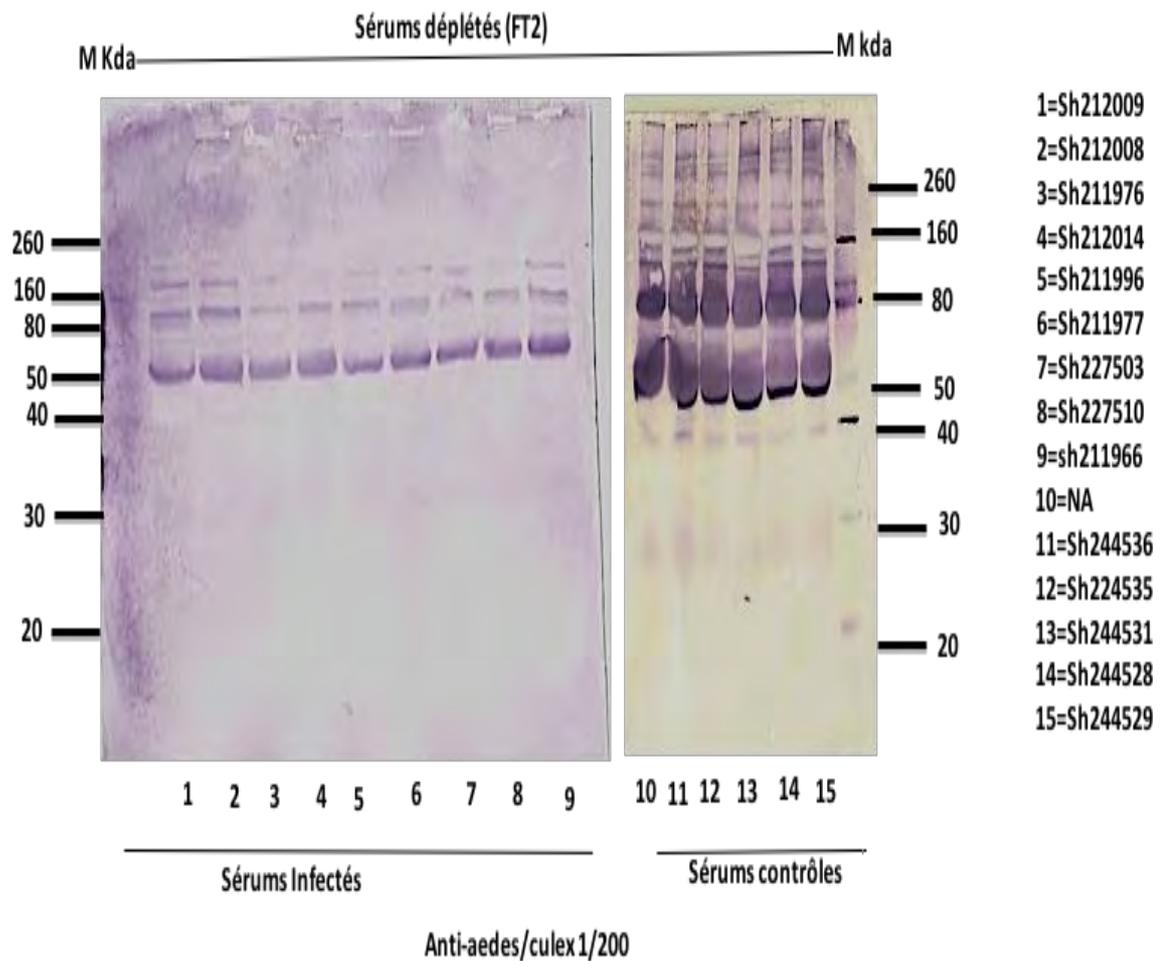
M = Marqueur de poids moléculaire

FT= fraction

### III.2.2 Détection des protéines de glandes salivaires par

#### Western blot

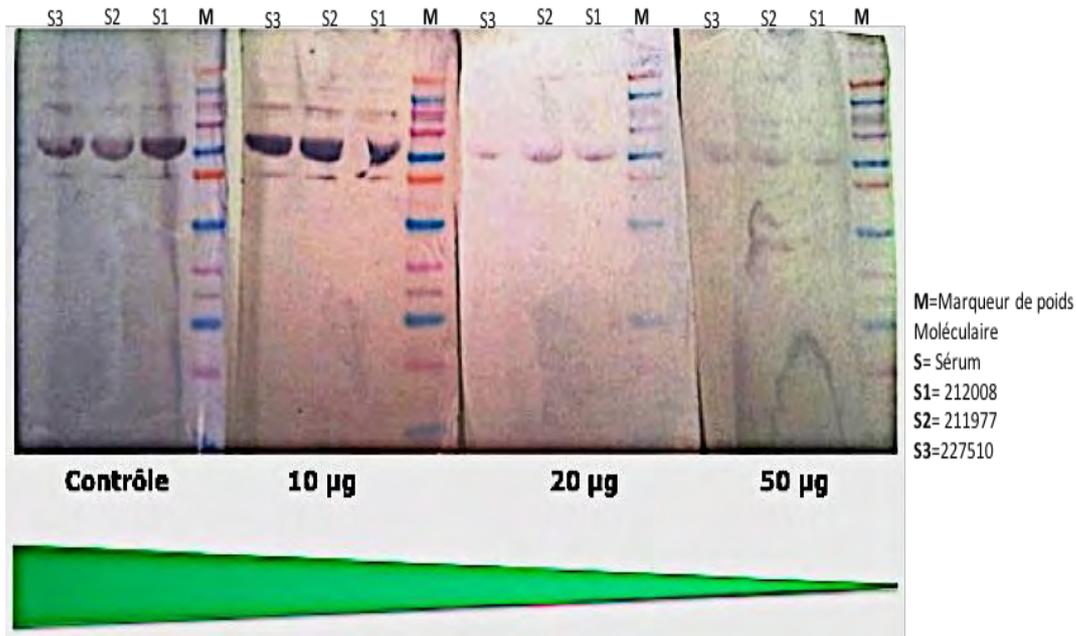
Les sérums déplétés (fraction 2) ont été utilisés pour la détection des protéines de glandes salivaires circulant dans les sérums humains. Les anticorps anti-*Aedes/Culex* ont été utilisés comme anticorps primaires. Le profil est différent selon que le patient soit infecté par le VFVR ou non. En effet, nous avons trouvé 3 protéines de glandes salivaires circulant (160 kDa, 80 kDa, et 50 kDa) chez les patients infectés par le VFVR. Cependant, chez les personnes saines, plusieurs protéines de glandes salivaires circulantes (de 40 à plus de 260 kDa) ont été détectées et ceci est observé dans tous les sérums de 2010 et 2012 testés. En résumé nous avons observé ainsi donc moins de protéines de glandes salivaires de moustiques chez les malades de FVR que chez les personnes saines (Figure 23).



**Figure 23: Détection des protéines de glandes salivaires dans les sérums de patients et personnes saines vivant dans la même zone par western blot**

### III.2.3 Spécificité des protéines de glandes salivaires détectées dans les sérums humains : test de compétition

Pour vérifier que les protéines détectées dans les sérums des malades sont spécifiques des glandes salivaires, nous avons fait une expérience de compétition en utilisant 3 sérums de malades (Figure 24). Les résultats montrent que plus la concentration de protéines de glandes salivaires dans la solution de pré-incubation est élevée, plus l'intensité des bandes protéiques au *Western blot* diminue et ceci pour tous les sérums testés.

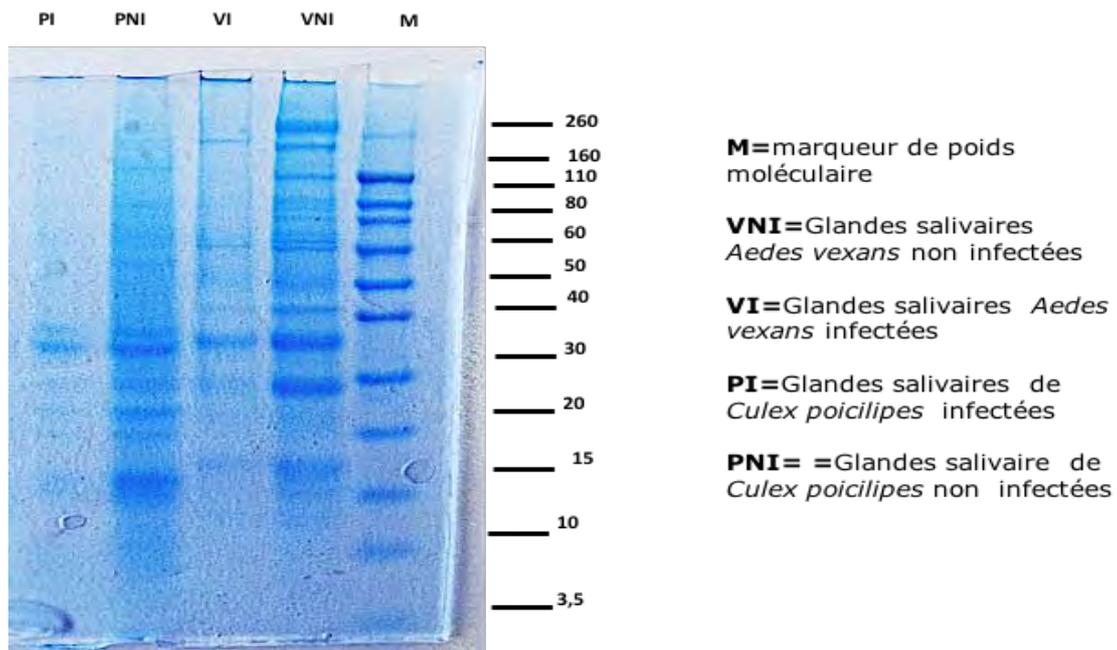


**Figure 24 : Spécificité des protéines de glandes salivaires détectées dans les sérums des malades par western blot**

### **III.2.4 Sous-expression des protéines de glandes salivaires en présence du virus**

Nous avons vérifié si la présence du virus chez le moustique entraîne ou non une sous-expression des protéines de glandes salivaires. Ceci pourrait ainsi expliquer le fait que les malades de FVR aient reçu moins de protéines de glandes salivaires dans leurs sérums comparés aux personnes saines.

A nombre de paires de glandes salivaires égal, nous avons observé moins de bandes de protéines dans les glandes salivaires infectées comparées aux non infectées (Figure 25) et ceci est valable pour les deux espèces de moustiques *Aedes vexans* et *Culex poicilipes*.



**Figure 25: Détection des protéines de glandes salivaires de moustique infectés ou non infectés avec le VFVR (Coomassie)**

### **III.3 Détection d'anticorps anti-protéines de glandes salivaires de moustique dans les sérums humains**

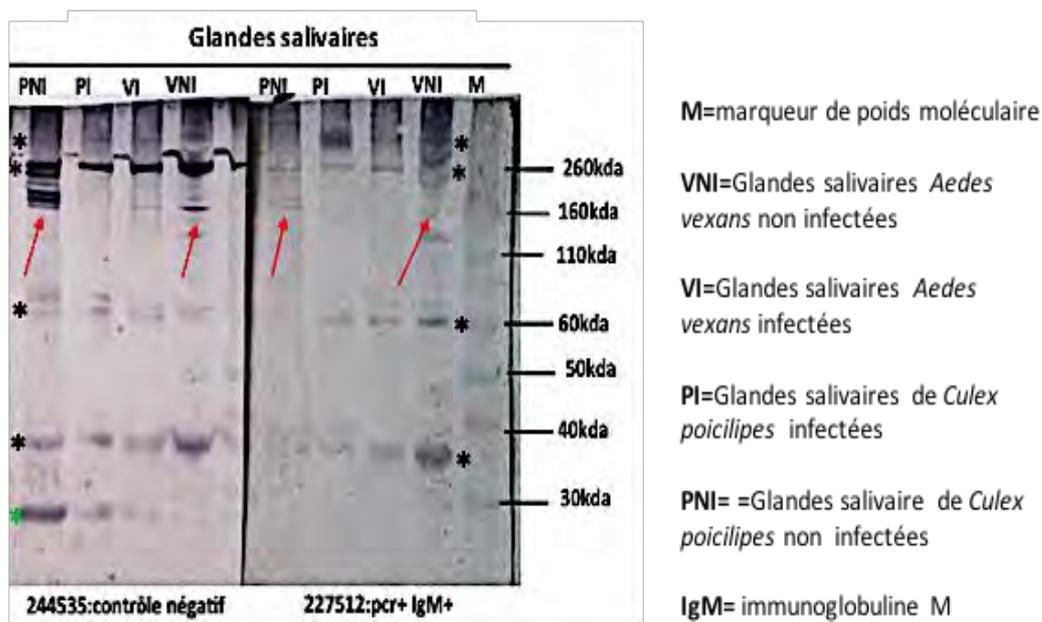
Des préparations de glandes salivaires de moustiques ont été soumises à une électrophorèse sur gel d'acrylamide et les sérums humains ont été utilisés comme anticorps primaires. Le profil des protéines obtenu correspond donc à la réponse anticorps humaine contre les protéines de moustiques injectées à l'Homme lors du repas de sang.

#### **III.3.1 Réponse anticorps entre sérums de patients infectés et non infectés**

Nous avons remarqué que quelque soit le statut de la personne (malade ou saine) on a une réponse anticorps contre les protéines de glandes salivaires des moustiques testés. Cependant il y'a des protéines reconnues uniquement dans les glandes salivaires non infectées, notamment des bandes protéiques entre 160 et 260 kDa. Ces bandes sont plus fortes chez les personnes saines comparées aux malades (Figure 26, flèches rouges).

De plus, pour une même préparation de glandes salivaires, nous avons remarqué plus de protéines reconnues et des intensités de détection plus fortes avec les sérums des personnes saines comparés aux sérums des malades. Ceci est plus accentué pour *Culex poicilipes*. Par exemple, avec les glandes salivaires de *Culex poicilipes* non infecté, nous avons plus de protéines détectées par le sérum de la personne saine (contrôle négatif) qu'avec celui du malade. De plus, la bande à 25 kDa n'est présente que chez la personne saine (Figure 26, étoile verte). Ces observations sont valables aussi bien pour les sérums collectés durant l'épidémie de 2010 et 2012.

Enfin, des bandes communes à 35, 60, 260, 280 kDa qui apparaissent sur tous les blots avec les glandes salivaires de moustiques infectés ou non infectés par le VFVR, chez les personnes saines comme chez les malades, ont été observées (Figure 26, étoiles noires).



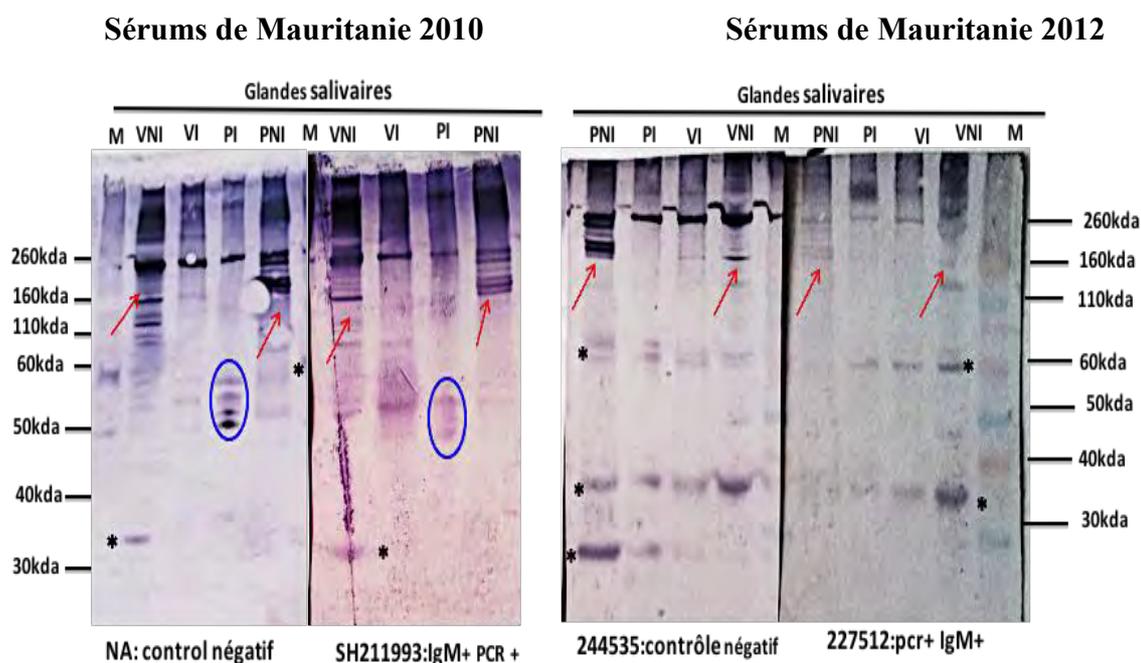
**Figure 26: Réponse anticorps selon l'état de la personne (malade versus saine) par western blot**

### III.3.2 Réponse anticorps différente selon l'année de l'infection

Les profils des Western blots effectués avec les sérums collectés durant l'épidémie de 2010 et de 2012 sont différents. Nous avons observé globalement plus de protéines

reconnues dans les glandes salivaires infectées avec les sérums de 2010 comparés aux sérums de 2012.

En effet, les bandes protéiques observés entre 50 et 60 kDa chez *Culex poicilipes* infectés avec les sérums de 2010 sont absentes avec les sérums de 2012 (Figures 27, lasso bleu). De plus, les bandes protéiques entre 160 et 260 kDa précédemment décrites sont plus visibles avec les sérums collectés en Mauritanie durant l'épidémie de RVF en 2010 (Figure 27, flèches rouges). Toutefois, les bandes communes à 35 et 60 kDa décrites précédemment sont plus visibles avec les sérums collectés en Mauritanie durant l'épidémie de RVF en 2012. De plus, une protéine à 25 kDa est visible seulement avec les sérums de 2012 (Figure 27 étoile noires).



**Figure 27: Réponse anticorps entre patients de 2010 et 2012 par western blot**

### III.4 Identification des protéines circulantes et des protéines reconnues par les anticorps par spectrométrie de masse

L'analyse protéomique a été faite avec les bandes de protéines reconnues par les sérums humains et les bandes de protéines circulantes détectées chez les malades.

Etant donné que les 22 sérums de malades présentent le même profil en western blot, 3 sérums humains ont été choisis (SH212009, SH227511 et SH211993) et les bandes à 50, 80 et 160 kDa ont été analysées. Ces 3 bandes correspondent aux protéines spécifiques aux malades.

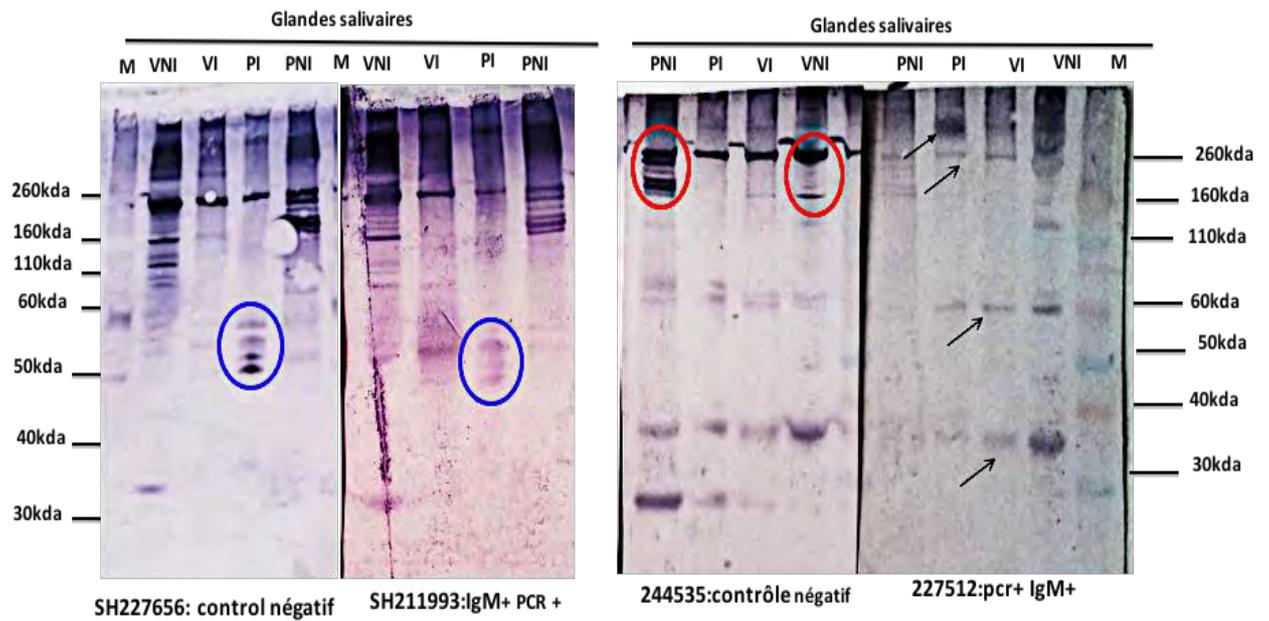
Concernant les protéines de glandes salivaires reconnues par les anticorps, nous avons analysé les bandes protéiques comprises entre 160 et 260 kDa détectées uniquement dans les glandes salivaires non infectées des deux espèces de moustique, reconnues par les sérums de toutes les personnes saines et plus ou moins bien par les sérums de malades (Figure 28 lasso rouge, figures 26 et 27 flèches rouges).

En plus nous avons étudié les protéines détectées à 260, 60, 35 et 280 kDa (Figure 28 flèches noires, et Figures 26 et 27 étoiles noires) pour les deux espèces de moustique quelque soit le statut des glandes salivaires (infectées ou non infectées), et quel que soit le statut de la personne (malade ou saine). Ce sont les bandes communes avec les glandes salivaires infectées comme non infectées des deux espèces, reconnues par les malades comme les personnes saines, et sur les deux années d'étude.

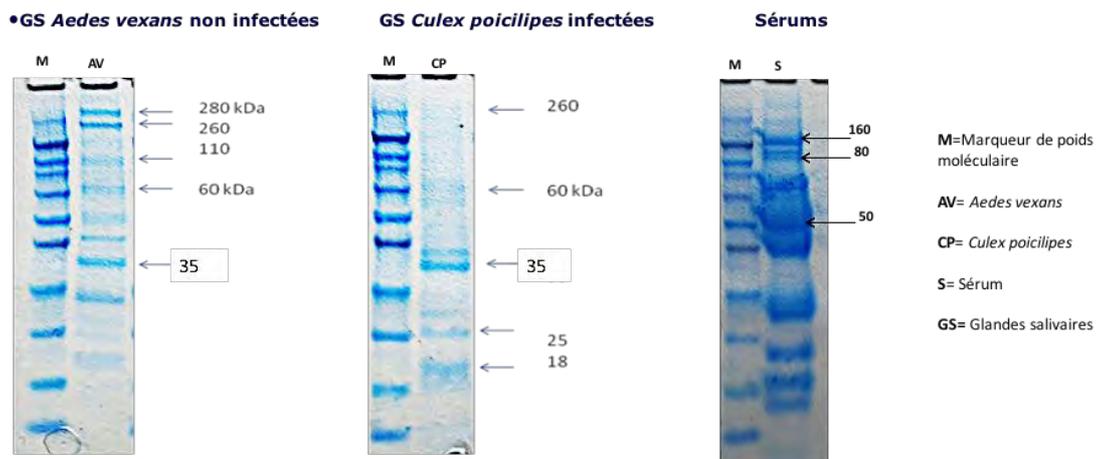
Nous avons inclus dans l'analyse les protéines reconnues uniquement dans les glandes salivaires infectées de *Culex poicilipes* formant un ensemble de bandes entre 50 et 60 kDa avec les sérums de 2010 (Figure 27 lasso bleu).

Les protéines spécifiques à l'espèce ont été aussi étudiées notamment la protéine à 110 kDa pour *Aedes vexans* non infecté et les protéines de 18 et 25 kDa pour *Culex poicilipes* infecté visibles à la coloration au bleu de coomassie (Figure 29).

Ainsi, nous avons utilisé les glandes salivaires de *Culex poicilipes* infectées et d'*Aedes vexans* non infectées pour l'identification des bandes communes (35, 60, 260, 280 kDa). L'identification des bandes détectées uniquement avec les glandes salivaires infectées (entre 60 et 50) en 2010 et les bandes spécifiques à l'espèce (18 et 25 kDa) a été faite avec les glandes salivaires de *Culex poicilipes*. L'identification des protéines comprises entre 160 et 260 kDa visibles dans les glandes salivaires non infectées et la bande à 110 kDa d'*Aedes vexans* a été faite avec les glandes salivaires d'*Aedes vexans* non infectées (Figure 29).



**Figure 28: Protéines reconnues par les anticorps analysées en spectrométrie de masse**

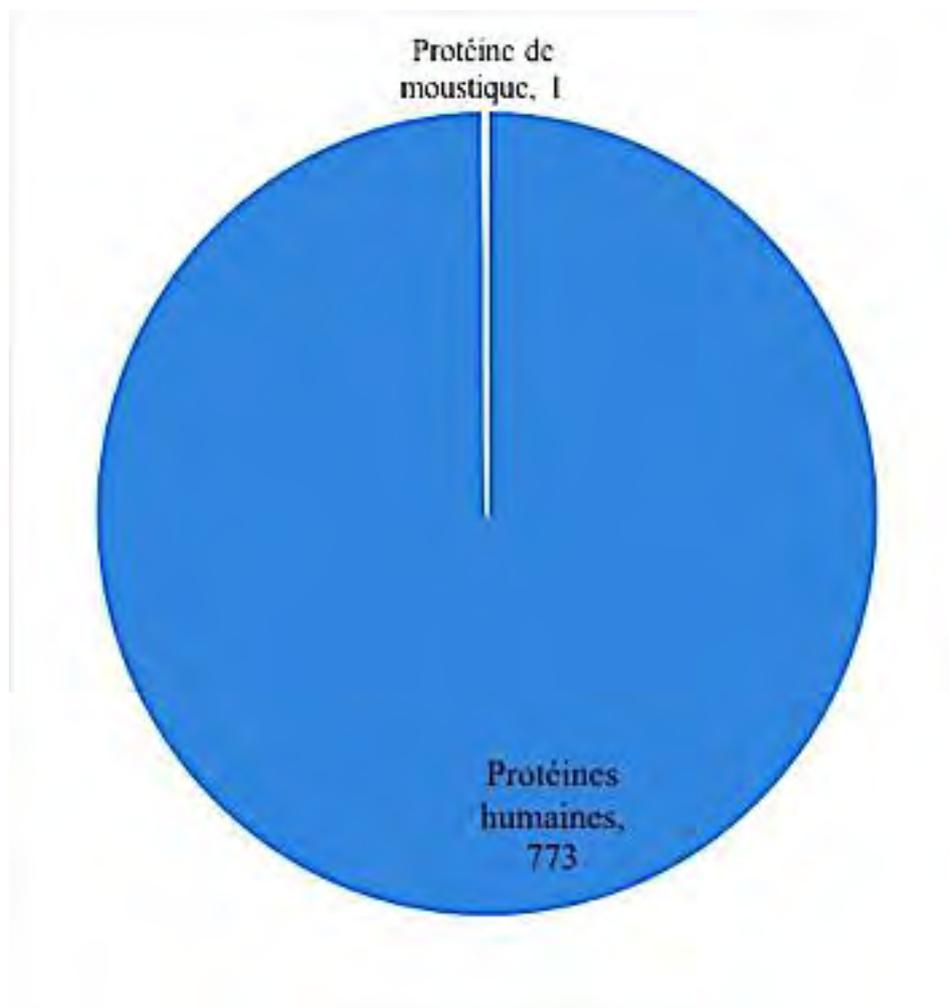


**Figure 29: Protéines analysées en spectrométrie de masse visible apres coloration au coomassie**

L'identification et les analyses ont été effectuées avec les bases de données d'*Aedes aegypti*, de *Culex quinquefasciatus* et d'*Homo sapiens sapiens*.

L'identification des protéines de glandes salivaires circulant dans les sérums de patients a été faite sur 3 sérums en utilisant les bases de données d'*Homo sapiens sapiens* et d'*Aedes aegypti*. Les résultats de la spectrométrie de masse ont donné 241,

276 et 256 protéines humaines pour le sérum 1, 2 et 3 respectivement. Parmi ces protéines il a été identifié des protéines du métabolisme humain (plasma protéase), des molécules d'adhésion, des vitamines, des facteurs de coagulation et quelques contaminants (kératine). De façon intéressante, nous avons eu une protéine de moustique à 41,5 kDa (Gn : AAEL005961) détectée dans le sérum 3. Cette protéine de moustique correspond à un précurseur d'actine d'après la banque de protéines Uniprot (<http://www.uniprot.org/uniprot>). Les résultats sont représentés à la figure 30.



**Figure 30: Identification des protéines de moustiques dans les sérums humains par spectrométrie de masse**

Concernant les protéines reconnues par les anticorps contenus dans les sérums humains, elles sont classées en fonction de leur localisation cellulaire connue ou

prédite et/ou de leur fonction biologique. L'identification des protéines a été faite en utilisant les bases de données d'*Aedes aegypti* et de *Culex quinquefasciatus*. Cependant l'identification des protéines de *Culex poicilipes* a été aussi faite avec la base d'*Aedes aegypti* pour voir l'existence de protéines communes entre moustique de genres différents.

Pour les 5 bandes de gel envoyées à Montevideo, 230 protéines ont été identifiées avec les glandes salivaires d'*Aedes vexans* et 231 protéines Chez *Culex poicilipes* infectés. Pour chaque bande de gel, plusieurs protéines ont été identifiées et ceci est valable pour les deux espèces.

L'identification des protéines comprises entre 160 et 260 kDa détectées dans les glandes salivaires non infectées a été faite avec *Aedes vexans*. Ces protéines représentent des transporteurs, des protéines membranaires, des facteurs d'élongation et des protéines ribosomales.

L'analyse des bandes « communes » aux deux espèces de moustique a été faite avec les glandes salivaires d'*Aedes vexans* et de *Culex poicilipes*.

Chez *Aedes vexans* la bande à 35 kDa a montré une protéine salivaire secretée et non caractérisée à 35,7 kDa (*Aedes aegypti* GN=AAEL003600). Une autre protéine salivaire à 34,4 kDa, D7Bclu1 (*Aedes aegypti* GN=AAEL006833) déjà décrite comme jouant un rôle dans la modulation de la réponse immune ou d'anticoagulant a été également trouvée. En plus, des protéines membranaires, mitochondriales et ribosomales ont été identifiées pour cette bande ainsi que des facteurs d'élongation.

Les résultats de la bande à 60 kDa ont montré une protéine secretée à 58,2 kDa (*Aedes aegypti* GN=AAEL009081). Une protéine impliquée dans la prise du repas de sang, l'Apyrase (GN=APY) a été identifiée à 62 kDa. En plus de ces protéines, nous avons des transporteurs, des protéines membranaires, des protéines impliquées dans les processus d'oxydo-réduction et de glycosilations et des protéines mitochondriales.

La bande à 260 kDa a donné essentiellement des protéines membranaires et des transporteurs.

La bande à 280 kDa est constituée essentiellement de protéines membranaires et de protéines impliquées dans les phénomènes de protéolyse. Des contaminants ont été détectés comme la kératine et l'albumine.

Chez *Culex poicilipes* la bande à 35 kDa est composée d'une protéine salivaire secretée à 29 kDa (GN=CpipJ\_CPIJ018300) appartenant à la famille des antigènes 5. Cette protéine a été identifiée dans presque toutes les bandes de *Culex poicilipes*

envoyées pour la spectrométrie de masse.

D'autres protéines ont été identifiées dans la bande à 35 kDa comme les membres de la famille des protéines D7 à 36 kDa (GN=CpipJ\_CPIJ014551) et à 22,4 kDa (GN=CpipJ\_CPIJ014549). Toujours dans la bande à 35 kDa, nous avons identifié une protéine salivaire secretée, la Vitellogenine (GN=CpipJ\_CPIJ015385) à 41 kDa, et la protéine de salive de 30 kDa (GN=CpipJ\_CPIJ002646) à 27 kDa déjà décrites dans la littérature (Almeras *et al.*, 2010). En plus de ces protéines, nous avons identifié des protéines membranaires, mitochondriales, ribosomales et des protéines intervenant dans le métabolisme énergétique. Des contaminants comme le BSA et la kératine ont été aussi présents.

La bande à 60 kDa est constituée de la protéine à 29 kDa, de l'Apyrase à 63 kDa (GN=CpipJ\_CPIJ011010) et 59 kDa (GN=CpipJ\_CPIJ019253) et une protéine non caractérisée à 72 kDa (GN=CpipJ\_CPIJ004454). En plus, nous avons les protéines du métabolisme énergétique, des protéines membranaires, mitochondriales et ribosomales. Des contaminants comme la kératine et l'albumine bovine ont été aussi identifiés.

La bande à 260 kDa est constituée de la protéine déjà décrite dans la littérature (Almeras *et al.*, 2010) [1, SGS1 (GN=CpipJ\_CPIJ007816) dont le rôle est inconnu. Une protéine non caractérisée à 30 kDa (GN=CpipJ\_CPIJ016429) et des protéines membranaires, des transporteurs, des facteurs d'élongation et des contaminants.

La bande à 280 kDa, n'étant pas visible à la coloration au bleu de coomassie, n'a pas été analysé pour *Culex poicilipes*.

Pour les bandes visibles uniquement chez *Culex poicilipes* infectées avec les sérums de 2010, comprises entre 50 et 60 kDa, aucune protéine n'a été identifiée.

Concernant les autres bandes spécifiques à l'espèce et visibles uniquement après coloration au bleu de coomassie, l'identification des protéines de la bande à 18 kDa de *Culex poicilipes* a montré la même protéine salivaire secretée de 29 kDa (GN=CpipJ\_CPIJ018300). Des contaminants comme la kératine, le BSA et des protéines ribosomales ont été identifiées. La bande de gel à 25 kDa est constituée d'une protéine de salive à 23 kDa (GN=CpipJ\_CPIJ003615), la protéine à 29 kDa, et des protéines non caractérisées à 22, 23, 24 et 119 kDa (GN=CpipJ\_CPIJ004888, GN=CpipJ\_CPIJ013250, GN=CpipJ\_CPIJ004082, GN=CpipJ\_CPIJ003589). La protéine D7 (GN=CpipJ\_CPIJ014551) et la Ferritine à 23, 24, 21 et 25 kDa (GN=CpipJ\_CPIJ008454, GN=CpipJ\_CPIJ004070, GN=CpipJ\_CPIJ014287,

GN=CpipJ\_CPIJ018123) ont également été identifiées. En plus, des protéines de transport, ribosomales et membranaires étaient présentes de même que les contaminants comme la kératine et le BSA.

Enfin la bande à 110 kDa spécifique à *Aedes vexans* est composé essentiellement de transporteurs et de facteurs de transcription.

L'identification des bandes de gel de *Culex poicilipes* en utilisant la base de données d'*Aedes aegypti* pour voir les protéines entre genre a donné au total 165 protéines et 73 contaminants. Les protéines identifiées appartiennent essentiellement aux gènes de ménage. Nous avons plusieurs protéines qui représentent des enzymes du métabolisme énergétique comme l'ATP synthetase, des transporteurs et des facteurs d'élongation. Aucune protéine salivaire ou secrétée n'a été décrite avec la base de données d'*Aedes aegypti*.

En résumé, cette étude nous a permis d'identifier dans les bandes analysées, une protéine de moustique qui circule dans un sérum humain (Actine) et des protéines salivaires qui ont induit une réponse anticorps dans les sérums. Parmi elles, nous avons des protéines secretées déjà décrites dans la littérature dont l'allergène de 30 kDa, les D7, l'Apyrase, la ferritine, la Vitellogenine et les SGS1. Quelques protéines salivaires pas encore caractérisées et dont les rôles restent inconnus à ce jour, ont été également trouvées. Des protéines qui interviennent dans la synthèse ou dans les modifications post-traductionnelles des protéines, comme les protéines ribosomales, les facteurs d'initiation, de transcription et les glycosyltransférases ont été trouvées. Des protéines associées avec le processus de sécrétion ont aussi été identifiées comme les protéines transmembranaires. Des protéines associées à la digestion du repas sucré comme l'Amylase et le maltase précédemment décrites (Francischetti *et al.*, 2002b ; Valenzuela *et al.*, 2003 ; Charlab *et al.*, 1999 ; Ribiero *et al.*, 1999) chez les *Anopheles* et chez *Lutzomyia* ont été aussi identifiées. Une forte présence de lysozymes a aussi été notée.

Les protéines identifiées pour chaque espèce de moustique ont été classées en fonction de leur fonction biologique et localisation et les résultats sont présentés dans les figures 31 et 32.

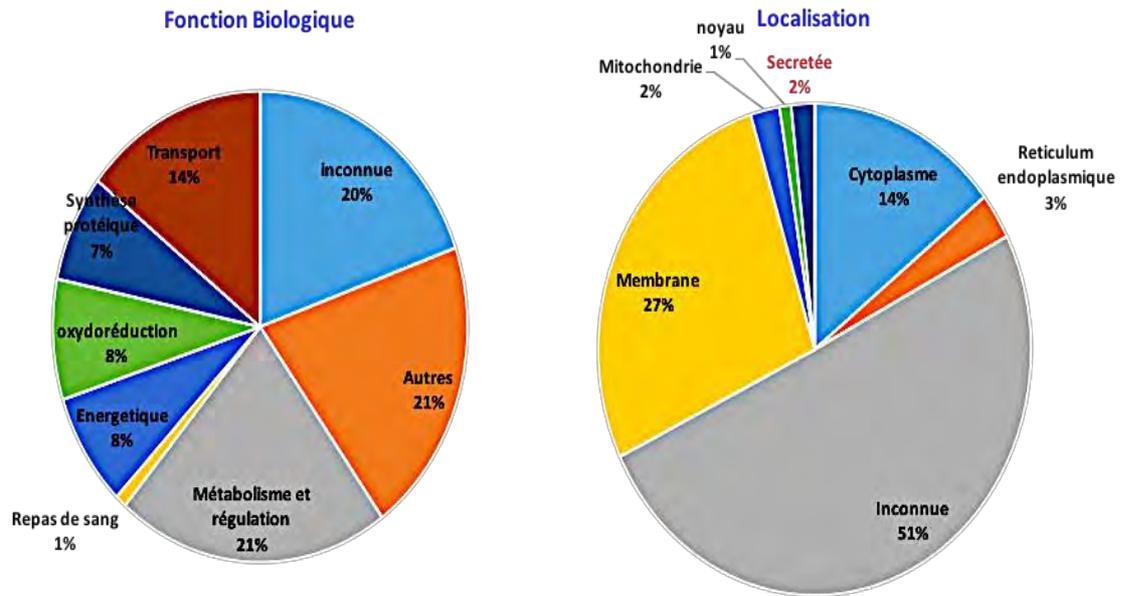


Figure 31: Classification des protéines de glandes salivaires d'*Aedes vexans* selon la localisation et la fonction biologique.

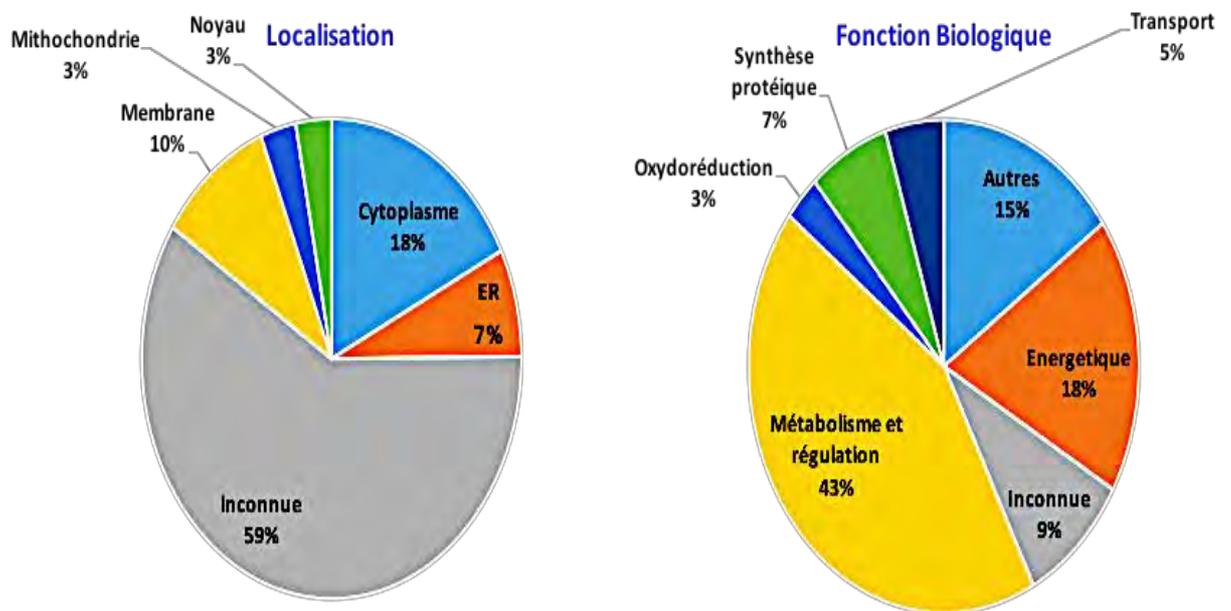


Figure 32: Classification des protéines de glandes salivaires de *Culex poicillipes* selon la localisation et la fonction biologique.

#### IV. Discussion

La protéomique ou l'analyse de l'ensemble des protéines d'un tissu, organe, ou liquide biologique donné est un processus très complexe qui dépend du moment de l'analyse et de la méthode de détection utilisée. Dans notre étude nous avons utilisé une électrophorèse 1D et la méthode de *western blot* pour analyser l'expression des protéines de glandes salivaires du moustique en présence ou l'absence du VFVR, leur présence dans les sérums humains et leur capacité à induire une réponse anticorps. Enfin, les protéines d'intérêt, notamment celles pouvant jouer un rôle dans la transmission du virus et la facilitation de l'infection ont été identifiées par spectrométrie de masse.

L'analyse globale par coloration de Coomassie des protéines de glandes salivaires nous a permis de voir que deux espèces de moustiques différentes, *Aedes vexans* et *Culex poicilipes*, non infectées, ont des profils protéiques identiques même si des bandes de protéines additionnelles ont été détectées chez *Culex poicilipes*. Cela suggère que cette dernière espèce de moustique exprime plus de protéines dans les glandes salivaires, toutefois, des études complémentaires doivent être réalisées pour confirmer cette observation préliminaire. D'autres espèces des genres *Culex* et *Aedes* devraient également être testées pour vérifier si de façon générale, les moustiques du genre *Culex* expriment plus de protéines dans les glandes salivaires que les moustiques du genre *Aedes*.

Les anticorps qui ont été produits contre les protéines de salives d'*Aedes* et de *Culex* ont permis de détecter les protéines des deux espèces de moustiques testées en *Western blot*. Cependant, nous avons observé moins de protéines totales de glandes salivaires au *Western blot* comparé à la coloration au bleu de Coomassie. La technique de *Western blot* étant normalement plus sensible que celle de la coloration au bleu de Coomassie, ce résultat est probablement dû au fait que les anticorps utilisés ont été produits en utilisant la salive de moustique et pas les glandes salivaires totales. De plus, les espèces de moustique utilisées pour produire ces anticorps, à savoir *Culex pipiens* et *Aedes aegypti*, sont différentes de celles utilisées dans notre étude. Ces anticorps bien qu'étant moins sensibles, ont permis de confirmer les profils protéiques comparables entre *Aedes vexans* et *Culex poicilipes* et aussi de voir les protéines espèce-spécifiques. Nous les avons ainsi validés et utilisés pour la suite de notre étude.

Ces anticorps nous ont permis de détecter des protéines de glandes salivaires circulant dans les sérums de patients malades et de personnes saines. Les mêmes bandes de protéines ont été détectées dans les sérums collectés durant les épidémies de FVR en Mauritanie en 2010 et 2012. De plus, nous avons remarqué qu'il y'a moins de protéines de glandes salivaires détectées chez les malades comparés aux personnes saines. Cela suggère deux possibilités chez le moustique infecté par le VFVR, soit une sous-expression des protéines au niveau des glandes salivaires soit une baisse du nombre de protéines sécrétées dans la salive. Afin de vérifier la première hypothèse, nous avons comparé les profils protéiques des glandes salivaires de moustiques infectés et non infectés avec le VFVR. Les résultats ont montré la présence de moins de protéines dans les glandes salivaires de moustiques infectés. Ces résultats militent en faveur d'une sous-expression des protéines de glandes salivaires en présence du VFVR. En effet, il a déjà été décrit que les virus sont capables de moduler la quantité de protéines au niveau des glandes salivaires de moustique (Ribeiro, 1995 ; Ribeiro & Francischetti, 2003). Par exemple, la modulation des protéines contenues dans la salive d'*Aedes aegypti* infecté par le Virus Chikungunya a été décrite. Avec ce modèle, les auteurs ont montré une augmentation de la traduction de 13 protéines à 3 jours post-infection et de 20 protéines à 5 jours post-infection. Ces protéines dont l'expression est en hausse en présence du virus Chikungunya étaient impliquées dans la prise du repas de sang ou dans la réponse immune de l'hôte (Tchankouo-Nguetcheu *et al.*, 2012). D'autres études ont montré par contre une diminution des protéines salivaires durant l'infection au virus *West Nile*. Ceci suggère que la présence du virus *West Nile* altère la composition de la salive de moustique (Girard *et al.*, 2010). Une autre étude a montré aussi une diminution des protéines de glandes salivaires d'*Aedes aegypti* en présence du virus de la Dengue-2 (Chisenhall *et al.*, 2014). Les auteurs ont trouvé une diminution de l'expression des protéines structurales, du métabolisme et des protéines secretées dans la salive.

Dans notre étude, la présence du virus après 15 jours d'incubation post-infection, a été vérifiée uniquement en utilisant le moustique entier après extraction des glandes salivaires. Cela ne permet donc pas de vérifier si le virus a pu traverser la membrane péritrophique de l'intestin du moustique pour aller dans les glandes salivaires ou la salive. Des études complémentaires comme l'électrophorèse bidimensionnelle, la vérification de la présence du virus dans les glandes salivaires ou la salive, doivent

être faites pour confirmer cette sous-expression observée et corrélérer cela avec la présence du VFVR dans les glandes salivaires.

La détection de protéines de glandes salivaires de moustiques dans un sérum humain n'a jamais été décrite auparavant dans la littérature à notre connaissance. Ces protéines circulant dans les sérums des patients pourraient jouer d'importants rôles dans la réponse immune de l'hôte, la facilitation de l'infection et la pathogenèse virale. La spectrométrie de masse a identifié parmi ces protéines de glandes salivaires circulant dans les sérums des malades, une protéine de moustique (précurseur d'actine). L'actine joue plusieurs rôles et se lie à l'ATP (Adénosine Triphosphate) pour la production d'énergie dans les cellules. L'actine est un acteur extrêmement actif dans la pathologie infectieuse de la plupart des pathogènes intracellulaires. Des études plus poussées sont donc nécessaires pour investiguer le rôle de cette protéine identifiée (actine) dans la facilitation de l'infection au VFVR. Pour cela, une protéine recombinante pourrait être produite, puis des tests d'infection de la souris avec ou sans la protéine seront réalisés afin de voir l'effet dans l'infection virale et la pathogenèse.

Notre étude a montré aussi que les protéines de glandes salivaires de moustiques sont capables d'induire une réponse anticorps chez les patients malades et les personnes saines. Ceci a déjà été démontré par une étude faite sur des animaux domestiques au Sénégal qui avait montré la présence d'immunoglobulines de type G (IgG) dirigés contre les protéines de glandes salivaires d'*Anopheles gambiae* dans leurs sérums (Boulangier et al., 2011). Une autre étude a aussi montré la présence d'IgM et IgG contre les protéines de glandes salivaires d'*Anopheles* dans les sérums de patients atteints de paludisme en Thaïlande (Waitayakul, 2006). Ces anticorps constituent ainsi des marqueurs d'exposition des populations aux piqûres de moustiques (Ali et al., 2012). Cette réponse anticorps pourrait être utilisée pour distinguer une exposition aux *Anopheles sp* de celle aux *Aedes sp* ou autre genre de moustique (Orlandi-Pradines et al., 2007).

La réponse anticorps dans notre étude a varié selon l'année d'étude (profils différents entre 2010 et 2012). Cela peut être dû au fait que les moustiques qui ont circulé durant ces épidémies étaient différents. Des différences selon les zones touchées en Mauritanie sont également possibles. En effet, en 2010 l'épidémie a eu lieu entre octobre et décembre au nord de la Mauritanie et les moustiques qui ont circulé étaient majoritairement des *Culex antennatus* dont certains ont été trouvés positifs au VFVR, *Anopheles gambiae* et *Anopheles rufipes* (Faye et al., 2014). Par contre en 2012,

l'épidémie a eu lieu entre septembre et novembre au sud de la Mauritanie et aucun moustique positif au VFVR n'a été trouvé (Sow *et al.*, 2014). Toutefois, *Aedes vexans*, *Culex poicilipes*, *Culex antennatus* et *Mansonia uniformis*, qui sont des vecteurs connus du VFVR, ont constitué plus de 50% des moustiques collectés durant l'épidémie. Globalement, les deux populations du nord et du sud ont donc été exposées à des piqûres provenant de moustiques différents et ceci pourrait expliquer les différences observées.

La réponse anticorps observée dans notre étude a également varié selon que la personne soit saine ou malade. En effet, les personnes saines ont eu plus d'anticorps reconnaissant les protéines de glandes salivaires que les malades. Cela renforce ainsi l'idée que les malades reçoivent moins de protéines de glandes salivaires et font ainsi moins d'anticorps. Dans notre étude, les personnes saines présentent une réponse anticorps forte entre 160 et 260 kDa, dirigée contre des protéines présentes uniquement dans les glandes salivaires saines. Les protéines de glandes salivaires de moustique qui ont induit ces anticorps chez l'Homme pourraient correspondre en partie, aux protéines circulant dans les sérums, détectées uniquement chez les personnes saines dans la première approche de notre étude. Chez les malades, ces protéines entre 160 et 260 kDa n'ont pas été détectées dans la première approche de l'étude, toutefois, une réponse anticorps correspondante plus ou moins faible a été observée. Cela suggère que ces protéines ont déjà circulé chez nos personnes malades dans le passé ou pendant les périodes précédant ces épidémies et que cette réponse anticorps détectée entre 160 et 260 kDa pourrait correspondre à des expositions plus ou moins anciennes aux piqûres de moustiques non infectés. Nous avons remarqué globalement que les profils de cette réponse anticorps ne sont pas exactement les mêmes entre deux personnes malades ou entre deux personnes saines au cours de la même épidémie. Cela montre que cette réponse anticorps est très complexe et dépend de plusieurs facteurs dont le nombre de piqûres de moustiques non infectés reçus, l'espèce de moustique et du statut immunologique de l'hôte.

Les résultats de la spectrométrie de masse ont montré que ces protéines comprises entre 160 et 260 kDa sont composées essentiellement de transporteurs, de protéines membranaires, de facteurs d'élongation et de protéines ribosomales. Ces protéines, détectées uniquement chez les moustiques non infectés, seraient donc sous-exprimées dans les glandes salivaires en présence du VFVR. De ce fait, elles ne joueraient donc pas un rôle de facilitation de l'infection de la FVR chez l'Homme. Cependant, les

anticorps produits chez l'Homme contre ces protéines, pourraient être considérés comme des marqueurs d'exposition aux piqûres de moustiques non infectés. L'identification de ces protéines chez plusieurs espèces de moustiques suivie d'une production de protéines recombinantes et la mise en place de tests d'ELISA pourrait permettre d'évaluer le niveau d'exposition des personnes aux piqûres de moustiques non infectés et d'identifier les espèces de moustiques qui ont circulé. Cela pourrait aider dans l'évaluation du risque de transmission des arbovirus en cas d'émergence dans une zone donnée et d'orienter ainsi les stratégies de lutte anti-vectorielle.

L'étude a montré également une réponse anticorps commune entre malades et personnes saines dirigée aussi bien contre les protéines de glandes salivaires infectées que non infectées et chez les deux espèces de moustiques testées.

Chez *Aedes vexans* et *Culex poicilipes*, les protéines D7 et l'Apyrase ont été identifiées par spectrométrie de masse. Ces protéines secretées dans la salive ont déjà été identifiées chez d'autres espèces de moustiques. L'Apyrase serait impliquée dans la prise du repas de sang d'un moustique infecté comme non infecté (Sun *et al.*, 2006). En effet, elle a une activité hydrolytique et pourrait aider dans la prévention de l'aggrégation de plaquettes en émettant de l'ADP (Adénosine Diphosphate) à partir de cellules lésées durant la phase de « sondage » du repas de sang. Toutefois, le rôle de l'Apyrase dans la transmission du pathogène et la facilitation de l'infection reste à élucider.

Les protéines de la famille des D7 quant à elles, sont décrites comme étant impliquées dans la prise du repas de sang (Malafronte Rosely dos Santos *et al.*, 2003) et la modulation du système immunitaire de l'hôte (Calvo *et al.*, 2006a). Les D7 ont été décrites pour la première fois chez *Aedes aegypti* (James *et al.*, 1991 ; Almeras *et al.*, 2010) et ont été retrouvées aussi chez *Culex quinquefasciatus* (Malafronte Rosely dos Santos *et al.*, 2003). Ces protéines apparaissent sous deux formes appelées : longue et courte (Valenzuela *et al.*, 2002). Chez *An. stephensi* la protéine D7 a été décrite comme étant un anticoagulant (Isawa *et al.*, 2002). Cela suggère que les protéines D7 peuvent avoir plusieurs fonctions. En effet, des études récentes ont montré que la vaccination de la souris avec une protéine recombinante D7 augmente la mortalité après infection par piqûre de moustique infecté par le virus *West Nile* (Reagan *et al.*, 2012). Une autre étude sur la Dengue, a montré que la protéine recombinante D7 inhibe la réplication du virus *in vivo* et *in vitro* (Conway *et al.*, 2016). Ces études

suggèrent que les D7 inhiberaient plutôt l'infection virale chez l'hôte vertébré et ne serait donc pas un bon candidat vaccin « altruiste ».

De plus, chez *Culex poicilipes* d'autres protéines déjà décrites comme, la Vitellogenine, l'antigène salivaire à 30 kDa et les SGS1 (protéines de surface des glandes salivaires 1) ont été identifiées dans ces bandes communes. Il a été montré que l'antigène à 30 kDa serait impliqué dans la modulation de la réponse immune (Ribiero *et al.*, 2007) et que les SGS1 sont impliquées dans la prise du repas de sang et ont été décrites comme étant très immunogènes (Jonas *et al.*, 2011). Cependant leur rôle dans l'infection virale reste à élucider.

La spectrométrie de masse a détecté aussi dans les bandes communes, des protéines de glandes salivaires de moustique secrétées dans la salive, jamais décrites et dont la fonction est à déterminer. Ceci a été le cas chez *Culex quinquefasciatus* ou une nouvelle famille de protéines contenant 12 membres dont la fonction est inconnue a été découverte (Ribiero *et al.*, 2004). Ces protéines secrétées non caractérisées pourraient jouer aussi un rôle important dans la facilitation de l'infection.

Ces bandes communes composées par les D7, l'Apyrase, la protéine à 30kDa, etc... semblent globalement être moins intenses en présence du VFVR. Les travaux de Chisenhall et collaborateurs avaient également montré une sous expression dans les glandes salivaires d'*Aedes aegypti* des protéines D7 et de celle à 30 kDa en présence du virus de la Dengue-2 (Chisenhall *et al.*, 2014). Ceci pourrait ainsi être corrélé avec la réponse anticorps plus faible observée chez les malades. La protéine D7 étant décrite comme ayant une activité anti-virale, sa réduction dans les glandes salivaires des moustiques infectés pourrait conduire à une augmentation des titres viraux dans la salive expectorée (Chisenhall *et al.*, 2014). Cette sous-expression de D7 en amont de la transmission du virus par le moustique pourrait ainsi favoriser l'infection chez l'Homme. Ces différentes observations sur D7 renforcent l'idée que cette protéine ne pourrait pas être utilisée comme cible vaccinale. Toutefois, Il serait intéressant de mieux investiguer sa sous-expression chez le moustique infecté par le VFVR en utilisant l'électrophorèse bi-dimensionnelle, puis d'évaluer son activité anti-virale chez l'hôte vertébré et son éventuelle utilisation dans le cadre d'un traitement spécifique.

Les bandes spécifiques à *Culex poicilipes* de 18 et 25 kDa ont montré des protéines de salive, des protéines secrétées non caractérisées et la Ferritine. La Ferritine étant

décrite comme un anti-oxidant et est utilisé pour le stockage du fer (Dunkov *et al.*, 2002).

De façon globale, et afin de répondre à notre objectif initial, il serait intéressant d'étudier le rôle des autres protéines identifiées par la spectrométrie de masse à savoir, l'Apyrase, SGS1, l'antigène à 30 kDa, la vitéllogénine, et les protéines salivaires nouvellement identifiées et non caractérisées, dans la facilitation de l'infection au VFVR en utilisant des protéines recombinantes correspondantes dans des études *in vivo*.

Globalement pour les bandes communes (même masse moléculaire) détectées entre les deux espèces de moustiques, les protéines identifiées sont différentes à l'exception des D7 et l'Apyrase. Ceci pourrait s'expliquer d'abord par la différence de genres des moustiques testés, mais aussi par la non spécificité des bases de données utilisées pour l'identification des protéines en spectrométrie de masse (base d'*Ae. aegypti* a été utilisée pour *Ae. vexans* et celle de *Cx. quinquefasciatus* pour *Cx. poicilipes*).

Dans notre étude, nous avons remarqué une protéine à 29 kDa présente dans plusieurs bandes de tailles différentes chez *Culex poicilipes*. Des phénomènes de maturation ou de modifications post translationnelles de cette protéine pourrait expliquer cette présence multiple même si des contaminations de bandes analysées ne sont pas à exclure. Un résultat similaire a déjà été rapporté dans l'étude d'Almeras et collaborateurs sur la protéomique d'*Aedes aegypti* (Almeras *et al.*, 2010) où la protéine malate déhydrogénase était détectée dans les bandes de 20, 21 et 22 kDa. Cette protéine à 29 kDa identifiée dans notre étude, appartient à la famille des antigènes 5 trouvée dans le venin des vespides (King & Spangfort, 2000) et dans les glandes salivaires de beaucoup d'insectes hématophages (Francischetti *et al.*, 2002b ; Li *et al.*, 2001 ; Valenzuela *et al.*, 2002b). Cependant leur rôle reste inconnu.

La forte présence de lysosymes a été remarquée dans notre étude. L'activité des lysozymes a déjà été décrite dans les glandes salivaires de moustique mâle comme femelle, où elle pourrait jouer un rôle dans la prévention de la multiplication de bactéries dans le repas sucré emmagasiné dans l'abdomen du moustique. Les protéines comme les maltases et amylases impliquées dans la digestion du repas sucré ont été identifiées également.

Etant donné que les génomes d'*Ae. vexans* et de *Cx. poicilipes* ne sont pas encore disponible, les résultats de la spectrométrie de masse peuvent être sous estimés car l'analyse a été faite avec les bases de données d'*Aedes aegypti* et de *Culex*

*quinquefasciatus*. Ceci expliquerait le fait que l'on n'ait pas identifié de protéines pour les bandes comprises entre 50 et 60 kDa visibles chez *Culex poicilipes* infecté et suggère la spécificité de ces protéines à l'espèce. Nous sommes probablement passés à côté de plusieurs autres protéines surtout celles qui ne sont pas communes entre membres du même genre de moustiques pour les mêmes raisons. Une autre limitation de notre étude est le fait que plusieurs protéines soient détectées pour une bande de gel donnée. Cela ne permet pas de dire laquelle de ces protéines secrétées est à l'origine de la réponse anticorps observée.

Les protéines de glandes salivaires de moustique ont été répertoriées chez différents moustiques comme *Ae. albopictus* (Arca *et al.*, 2007), *An.gambiae* (Kalume *et al.*, 2005, Choumet *et al.*, 2007), *An. stephensi* (Valenzuela *et al.*, 2003) et *Culex pipiens quinquefasciatus* (Ribiero *et al.*, 2004). Cependant dans la littérature, quelque soit la méthode employée (Edman dégradation ou MS), le nombre de protéines secrétées identifiées dans les glandes salivaires n'a pas excédé 20 alors que plus de 40 protéines ont été identifiées par MS dans la salive d'*Aedes aegypti* (Almeras *et al.*, 2008). Ceci suggère que l'identification de protéines de glandes salivaires secrétées doit être faite préférentiellement avec la salive au lieu des glandes salivaires. Il serait donc intéressant de faire la protéomique de la salive des moustiques en question pour valider les protéines secrétées que nous avons identifiées dans les glandes salivaires mais aussi d'identifier d'autres protéines de salive qui seraient susceptibles de jouer un rôle dans la transmission et la pathogenèse virale.

## **V. Conclusion**

La salive de moustique contient des protéines qui participent dans la prise du repas de sang en interférant avec le système immunitaire de l'hôte. Ces protéines de salive de moustique induisent également une réponse anticorps chez l'hôte vertébré et favorise l'infection à arbovirus (Schneider & Higgs, 2008 ; Titus *et al.*, 2006). En effet, plusieurs études ont montré que les arbovirus transmis par piqûre de moustique ou inoculés artificiellement avec la salive de moustique produisent une augmentation de l'infection chez l'hôte vertébré comparé à une infection par seringue du même virus (Edwards *et al.*, 1998, Limesand *et al.*, 2000). Pour toutes ces raisons, la salive est considérée comme un marqueur d'exposition aux piqûres de moustiques ou un moyen de développement de vaccins de blocage de la transmission ou de nouvelles

molécules thérapeutiques. Ces perspectives mettent ainsi en évidence l'importance de la compréhension du « sialome » des vecteurs de maladies à arbovirus.

Notre étude a porté sur l'exploration du rôle de la salive de moustique dans la pathogenèse du VFVR chez l'Homme. L'étude des protéines de glandes salivaires d'*Ae. vexans* et de *Cx. poicilipes* n'a jamais été faite auparavant et cette étude pilote nous a permis d'avoir une idée du « sialome » de ces deux moustiques et de montrer aussi que les moustiques de genres différents ont des protéines communes et des protéines spécifiques.

Cette étude nous a montré que les protéines de glandes salivaires de moustique peuvent être détectées dans les sérums humains et de confirmer également que ces protéines sont immunogènes avec une réponse variable selon l'épidémie et selon que le moustique soit infecté ou non. Les protéines d'intérêt ont été identifiées par spectrométrie de masse et les résultats montrent plusieurs protéines déjà décrites comme étant impliquées dans la prise du repas de sang ou la modulation de la réponse immune de l'hôte mais également des protéines secrétées non encore caractérisées, ainsi qu'un précurseur d'actine.

La caractérisation de ces protéines pourrait permettre de démontrer l'existence de ce phénomène de facilitation de l'infection par le VFVR, ainsi que l'identification des protéines jouant ce rôle. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour pouvoir déterminer les protéines spécifiques qui ont réagi avec les sérums de patients infectés par le VFVR, étant donné que nous avons trouvé plusieurs protéines dans chaque bande de gel donnée.

A terme, cela donnerait une avancée majeure dans la compréhension des bases de la pathogénicité du VFVR et pourrait permettre la mise en place de vaccins permettant de limiter l'infection chez l'Homme.

Enfin, le séquençage du génome des vecteurs anthropophiles comme *Aedes vexans* et *Culex poicilipes* serait d'une grande utilité car permettrait une meilleure identification des protéines salivaires de ces espèces.

## **VI. Perspectives générales**

Cette étude a porté dans un premier temps sur l'impact de la diversité génétique du VFVR et de la pluviométrie dans l'épidémiologie en Afrique de l'Ouest et dans un deuxième temps sur l'exploration du rôle de la salive de moustique dans la transmission

Concernant l'étude sur la diversité génétique, la vérification des recombinaisons que nous avons trouvées au niveau des segments M et L par le séquençage à haut débit (NGS) serait d'une grande importance car permettrait de confirmer l'existence de ce phénomène qui est rare chez les virus à ARN négatif. L'étude de la phylogéographie et la phylodynamique de tous les échantillons en utilisant les 3 segments va être faite ainsi que la présence éventuelle de réassortants. Il serait aussi intéressant de séquencer les souches de VFVR de l'épidémie du Niger de 2016 et de les intégrer dans les différentes analyses phylogénétiques. Ceci va permettre une analyse plus complète et plus récente sur la diversité génétique du VFVR en Afrique de l'Ouest. L'analyse des génomes complets, avec les 3 segments, permettra de voir enfin l'existence de variants génétiques particuliers pouvant expliquer la différence de profils épidémiologiques observés entre les différents pays d'Afrique de l'Ouest.

De façon globale, pour mieux comprendre l'épidémiologie du VFVR, il serait important d'établir une surveillance intégrée (Homme, animaux et environnement) en collaboration avec les météorologues pour qu'une alerte de FVR soit faite à chaque fois qu'une période de forte pluviométrie est précédée d'une période sèche à la fin de la saison des pluies.

Dans la 2<sup>ème</sup> partie de l'étude, les résultats obtenus ont permis l'identification de plusieurs protéines de glandes salivaires déjà identifiées comme étant impliquées dans la prise du repas de sang ou dans la modulation du système immunitaire de l'hôte mais aussi des protéines sécrétées non encore caractérisées.

L'analyse de la salive de moustique d'*Ae. vexans* et de *Cx. Poicilipes* est en cours et ceci devrait permettre la comparaison entre les protéines identifiées par spectrométrie de masse dans les glandes salivaires de moustiques et celles retrouvées dans la salive de moustique. Cette comparaison va permettre la validation des protéines de glandes salivaires détectées par spectrométrie de masse mais aussi d'identifier des protéines strictes de salive.

Par la suite, il serait intéressant de synthétiser les peptides des différentes protéines de glandes salivaires sécrétées et identifiées dans notre étude, et d'effectuer des tests ELISA avec les sérums des patients. Cela permettrait de voir les protéines qui ont réellement induit les réponses anticorps observées et d'identifier celles qui sont les plus immunogènes. Parmi les protéines les plus immunogènes, quelques unes (4 ou 5) devraient être étudiées en produisant des protéines recombinantes.

Des tests d'infection de la souris avec le VFVR en présence ou absence de ces protéines recombinantes pourront être réalisés afin de voir l'effet dans l'infection virale et la pathogenèse chez l'hôte vertébré. En cas d'effet dans la facilitation de l'infection, des essais de vaccination des souris seront envisagés avec les protéines recombinantes, suivis d'infections avec le VFVR pour voir si cela pourrait empêcher l'infection. Ceci va permettre d'identifier de bons candidats vaccins « altruistes » qui pourraient lutter contre la FVR. Il serait intéressant également de voir si ce mécanisme de facilitation est de type pathogène ou vecteur-dépendant, en testant d'autres espèces de moustiques ainsi que d'autres arbovirus. Dans le cas où le mécanisme serait conservé entre les différents genres, espèces, et pathogènes, ces vaccins pourraient de façon intéressante être utilisés pour lutter contre de nombreuses maladies vectorielles.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. **Akakpo AJ, Saluzzo JF, Bada R, Bornarel P, Sarradin P (1991).** Epidemiology of Rift Valley fever in west Africa. Serological investigation of small ruminants in Niger. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1991;84(3):217-24
2. **Al-Afaleq, A., E. A. Elzein, S. Moussa, & a. A. Abbas (2003).** - Retrospective study of Rfit Valley Fever in Saudi Arabia. *Rev.Sci. Tech.Off. Int.Epiz.*,**22**, 867-871.
3. **Alexander RA (1951).** Rift Valley fever in the Union. *J. S. Afr. Vet. Med. Assoc* 789; 22 :105–9.
4. **Amino R, Thiberge S, Blazquez S, Baldacci P, Renaud O, Shorte S, Menard R (2007).** Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Na.t Protoc*; 2:1705–1712.
5. **Anderson GW Jr, Smith JF (1987).** Immunoelectron microscopy of Rift Valley fever viral morphogenesis in primary rat hepatocytes. *Virology*. Nov;161(1):91-100.
6. **Andersonn G.W. & Peters C.J. (1988).** Viral determinant of virulence for Rift Valley Fever in rats. *Microb. Pathog.*, **5**(4), 241-250.
7. **Andriamandimby, S.F., Randrianarivo-Solofoniaina, A.E., Jeanmaire, E.M., Ravololomanana, L., Razafimanantsoa, L.T., Rakotojoelinandrasana, T., Razainirina, J., Hoffmann, J., Ravalohery, J.P., Rafisandratantsoa, J.T.,**

- Rollin, P.E., Reynes, J.M (2010).** Rift Valley fever during rainy seasons, Madagascar, 2008 and 2009. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 963–970.
8. **Arca, B, Lombardo, F, Francischetti, IM, Pham, VM, et al (2007).** An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*; 37:107–127.
  9. **Archer et al (2013).** Epidemiologic investigations outbreaks of RVF in humans South Africa. Source: *Emerg. Infect. Dis.*, 19: 1918-1925.
  10. **Arishi HM, Aqeel AY, Al Hazmi MM (2006).** Vertical transmission of fatal Rift Valley fever in a newborn. *Ann. Trop. Paediatr.*, 26:251–3.
  11. **Arum SO, Weldon CW, Orindi B, Landmann T, Tchouassi DP, Affognon HD, et al (2015).** 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.
  12. **Baskerville, A., Hubbard K., & Stephenson J (1992).** Comparison of the pathogenicity for pregnant sheep of Rift valley fever virus and a live attenuated vaccine. *R. Vet. Sci.*, 52, 307-311.
  13. **Battles J.K. & Dalrymple J.M (1988).** Genetic variation among geographic isolates Rift Valley Fever virus. *Am.J. Trop. Med. Hyg.* 39(6), 617-631.
  14. **Billecocq, A., M. Spiegel, P. Vialat, A. Kohl, F. Weber, M. Bouloy, & Haller O (2004).** NSs protein of Rift Valley fever virus blocks interferon production by inhibiting host gene transcription. *J. Virol.*, 78, 9798-9806.
  15. **Bird B.H., Albarino CG, Hartemann AL, Ksiazek T.G. & Nicholl S.T (2008).** Rift valley fever virus lacking the NSs and NSm genes is highly attenuated, confers protective immunity from virulent virus challenge, and allows for differential identification of infected and vaccinated animals. *J. Virol.*, 82(6):2681-91.

16. **Bird BH, Githinji JWK, Macharia JM, Kasiiti JL, Muriithi RM, Gacheru SG, et al (2008).** Multiple virus lineages sharing recent common ancestry were associated with a large Rift Valley fever outbreak among livestock in Kenya during 2006–2007. *J. Virol*, 82:11152–66.
17. **Bird B.H., Khristova M.L., Rollin P.E., Ksiazek T.G. & Nichol S.T (2007).** Complete Genome Analysis of 33 Ecologically and Biologically Diverse Rift Valley Fever Virus Strains Reveals Widespread Virus Movement and Low Genetic Diversity due to Recent Common Ancestry. *J. Virol*, 81(6),2805–2816.
18. **Bird BH, Ksiazek TG (2009).** Rift Valley fever virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc*, 234:883–93
19. **Bob NS, Bâ H, Fall G, Ishagh E, Diallo MY, Sow A, Sembene PM, Faye O, El Kouri B, Sidi ML, Sall AA (2017).** Detection of the Northeastern African Rift Valley Fever Virus Lineage During the 2015 Outbreak in Mauritania. *Open Forum Infect Dis*. Jun 16 ;4(2).
20. **Boiro I, Konstaninov OK, Numerov AD (1987).** Isolation of Rift Valley fever virus from bats in the Republic of Guinea. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales*, 80(1):62-7.
21. **Bouloy M, Weber F (2010).** Molecular biology of rift valley Fever virus. *Open Virol J*, Apr 22;4:8-14.
22. **Bouloy, M., C. Janzen, P. Vialat, H. Khun, J. Pavlovic, M. Huerre, & Haller O (2001).** Genetic evidence for an interferon-antagonistic function of Rift Valley fever virus nonstructural protein NSs. *J. Virol*, 75,1371-1377.
23. **Bres, P (1981).** Prevention of the spread of RVFV from the African continent. *Contrib. epidemiol. biostat*, 3, 178-190.

24. **Calvo E, Mans BJ, Andersen JF, Ribeiro JM (2006a).** Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *J. Biol. Chem*, 281:1935–1942.
25. **Carvalho SE, Martin DP, Oliveira LM, Ribeiro BM, Nagata T (2010).** Comparative analysis of American Dengue virus type 1 full-genome sequences. *Virus Genes*. 40 :60–66.
26. **Carver T, Bleasby A (2003).** The design of Jemboss: a graphical user interface to EMBOSS. *Bioinformatics*. Sep 22;19(14):1837-43
27. **CDC. Rift Valley fever (1998).** East Africa, 1997–1998. *Morb. Mortal. Wkly Rep*, 43 :261-4
28. **Chambers PG, Swanepoel R (1980).** Rift valley fever in abattoir workers. *Cent Afr J Med*, Jun;26(6):122-6.
29. **Charlab, R., Valenzuela, J.G., Andersen, J., Ribeiro, J.M.C (2001).** The invertebrate growth factor/CECR1 subfamily of adenosine deaminase proteins. *Gene*, (267) 13–22.
30. **Choumet V, Carmi-Leroy A, Laurent C, Lenormand P, Rousselle JC, Namane A, Roth C, Brey PT (2007).** The salivary glands and saliva of *Anopheles gambiae* as an essential step in the Plasmodium life cycle: a global proteomic study. *Proteomics*, Sep;7(18):3384-94.
31. **Chinikar S, Bouzari S, Shokrgozar MA, Mostafavi E, Jalali T, Khakifirouz S, Nowotny N, Fooks AR, & Shah-Hosseini N.** Genetic Diversity of Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus Strains from Iran. *J. Arthropod Borne Dis*. 2016 Jan 5;10(2):127-40. eCollection 2016.
32. **Coetzer JA (1982).** The pathology of Rift Valley fever. II. Lesions occurring in field cases in adult cattle, calves and aborted fetuses. *Onderstepoort J. Vet. Res*, Mar; 49(1):11-7.

33. **Colton L, Nasci RS (2006)**. Quantification of West Nile virus in the saliva of *Culex* species collaborateursected from the southern United States. *J. Am. Mosq Control. Assoc*, 22:57–63.
34. **Craig DE, Thomas WJ, DeSanctis AN (1967)**. Stability of Rift Valley fever virus at 4°C. *Appl. Microbiol*, Mars;15(2):446-7.
35. **Cross ML, Cupp EW, Enriquez FJ (1994)**. Differential modulation of murine cellular immune responses by salivary gland extract of *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 51:690–696.
36. **Cupp MS, Ribeiro JM, Champagne DE, Cupp EW (1998)**. Analyses of cDNA and recombinant protein for a potent vasoactive protein in saliva of a blood-feeding black fly, *Simulium vittatum*. *J. Exp. Biol*, 201 :1553–1561.
37. **Curasson G (1934)**. La fièvre de la vallée du Rift existe-t-elle au Soudan français ? *Bull. Soc. Path. Ex*, 27, 599-602.
38. **Daniel M. Chisenhall, Berlin L. Londono, Rebecca C. Christofferson, Michael K. McCracken, et Christopher N. Mores (2014)**. Effect of Dengue-2 Virus Infection on Protein Expression in the Salivary Glands of *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Am.j. Trop. Med. Hyg*, 90(3), pp. 431-437.
39. **Daubney, R., Hudson, J.R (1931)**. Enzootic hepatitis or Rift Valley fever: an undescribed virus disease of sheep cattle and man from east Africa. *J. Path. Bact*, 34, 545–579.
40. **Diallo S (2001)**. Epidémiologie-surveillance de la FVR au Mali (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.

41. **Digoutte JP, Peters CJ (1989)**. General aspects of the 1987 Rift Valley fever epidemic in Mauritania. *Res. Viro*, Jan-Feb ;140(1) :27-30.
42. **Digoutte JP, Chartier C, Martinez D, Bada R (1987)**. Focus of Rift Valley fever transmission in southern Mauritania. *Lancet*, 1 :504.
43. **Diop G., Thiongane Y., Thonnon J., Fontenille D., Diallo M., Sall A.A., Ruel T. D. & Gonzalez J.P. (2000)**. The potential role of rodents in the cycle of Rift Valley fever virus in the Senegal. *Microb. Infect*, 2(4), 343-346.
44. **Do Rosário MS, de Jesus PA, Vasilakis N, Farias DS, Novaes MA, Rodrigues SG, Martins LC, Vasconcelos PF, Ko AI, Alcântara LC, de Siqueira IC (2016)**. Guillain-Barré Syndrome After Zika Virus Infection in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 2016 Nov 2;95(5):1157-1160.
45. **Doucet J. et Cacilan P.** Moustiques forestiers de la République de Côte d'Ivoire : Observations sur les gîtes de ponte des moustiques du genre *Eretmapodites Theobald* dans la forêt du Banco (Abidjan). *Bull. Soc. Path. Exo.* Tome 54(6) :1253-1265.
46. **Dunkov, BC, Georgieva, T, Yoshiga, T, Hall, M, et al (2002)**. Aedes aegypti ferritin heavy chain homologue: feeding of iron or blood influences message levels, lengths and subunit abundance. *J. Insect Sci*, 2:7.
47. **Easterday BC (1965)**. Rift valley fever. *Adv. Vet. Sci*, 10:65-127.
48. **Edwards JF, Higgs S, Beaty BJ (1998)**. Mosquito feeding-induced enhancement of Cache Valley Virus (Bunyaviridae) infection in mice. *J. Med Entomol*, 35: 261–265.
49. **Edwards JF, Higgs S, Beaty BJ (1998)**. Mosquito feeding-induced enhancement of Cache Valley Virus (Bunyaviridae) infection in mice. *J. Med Entomol*, 35:261–265

50. **El-Akkad AM (1978)**. Rift Valley fever outbreak in Egypt. October--December 1977. *J. Egypt. Public. Health. Assoc*, 53(3-4):123-8.
51. **Elliott RM, Schmaljohn CS, Collaborateursett MS (1991)**. Bunyaviridae genome structure and gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, 169:91-141.
52. **Ellis DS, Shirodaria PV, Fleming E, Simpson DI (1988)**. Morphology and development of Rift Valley fever virus in Vero cell cultures. *J. Med. Virol*, 24(2):161-74.
53. **Eisa M, Obeid HMA, El Sawi ASA. Rift Valley fever in the Sudan (1977)**. Results on field investigations of the epizootic in Kosti District, 1973. *Bull. Anim. Health. Prod. Afr*, 25:343-7.
54. **Euler M, Wang Y, Nentwich O, Piepenburg O, Hufert FT, Weidmann M (2012)**. *Virus. Clin Virol*, Aug; 54(4) :308-12
55. **Fafetine J.M., Janusz E.T T. Paweska, Neves L.C.B.G., Hendriks J., Swanepoel R., Coetzer J.A.W., Egberink H.F., Rutten V.P.M.G (2007)**. Cloning and expression of Rift Valley fever virus nucleocapsid (N) protein and evaluation of a N-protein based indirect ELISA for the detection of specific IgG and IgM antibodies indomestic ruminants. *Vet. Microbiol*, 121 29-38.
56. **Fall G, Diallo M, Loucoubar C, Faye O, et al (2014)**. Vector competence of *Culex neavei* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) for lineages 1, 2, Koutango and a putative new lineage of West Nile Virus from Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg* ; 90 :747-754.
57. **Faye O, Ba H, Ba Y, Freire CC, Faye O, Ndiaye O, Elgady IO, Zanutto PM, Diallo M, Sall AA (2014)**. Reemergence of Rift Valley fever, Mauritania, 2010. *Emerg. Infec.t Dis*, 20 (2) : 300-3

58. **Faye O., Diallo M., Diop D., Bezeid O., Bâ H., Niang M., Dia I., Sidi Ahmed O.M., Ndiaye K., Diallo D., Ly P.O., Diallo B., Nabeth P., Simon F., Lô B. & Diop O.M (2007).** Outbreak of Rift Valley Fever in Mauritania, 2003: First emergence of the East-Central Africa virus lineage in West Africa. *Emerging Infectious Diseases*, **13** (7),1016-1023.
59. **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(1-2) :155-64.
60. **Findlay, G. M., Stefanopoulo G. J., & Callum F. O. M. (1936).** Présence d'anticorps contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift dans le sang des africains. *Bull. Soc. Path. Ex.* 29.
61. **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.
62. **Frese M., Kochs G., Feldmann H., Hertkorn C. & Haller O. (1996).** Inhibition of Bunyaviruses, Phleboviruses, and Hantaviruses by Human MxA Protein. *J. Virol*, **70**(2), 915–923.
63. **Gauliard N, Billecocq A, Flick R, Bouloy M (2006).** Rift Valley fever virus noncoding regions of L, M and S segments regulate RNA synthesis. *Virology*, Jul 20;351(1):170-9.
64. **Gear J.H.S. De Meillon B., Measarch V., Harwin R. & Davis D.H.S (1951).** Rift Virus Fever in South Africa. The occurrence of human case in the Orange Free State, The North-Western Cap province, the Western and the Southern Transversal B. Field and laboratory investigation. *S. Afr. Med. J.*, **25**,908-912.

65. **Gerrard SR, Nichol ST (2002).** Characterization of the Golgi retention motif of Rift Valley fever virus G(N) glycoprotein. *J. Virol*, 76(23):12200-10.
66. **Gettins, PG (2002).** Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev*, 102:4751–4804.
67. **Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG (2000).** The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol*, 22: 319–331.
68. **Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG (2000).** The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol*, 22:319–331.
69. **Gonzales, J.P, Camicas, L.L, Cornet, J.P. Faye O. Wilson M.L (1992).** Sexual and transovarian transmission of crimean Congo haemorrhagic fever virus in hyalomma truncatum ticks. *Res.virol*, 143 :23-28.
70. **Grobbelaar AA, Weyer J, Leman PA, Kemp A, Paweska JT, Swanepoel R (2011).** Molecular epidemiology of Rift Valley fever virus. *Emerg. Infect. Dis*, 17:2270–6.
71. **Gubler DJ, Rosen L. A (1976).** Simple technique for demonstrating transmission of dengue virus by mosquitoes without the use of vertebrate hosts. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 25:146–150.
72. **Hasko, G, Kuhel, DG, Salzman, AL, Szabo, C (2000).** ATP suppression of interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha release from macrophages. *Br. J. Pharmacol*, 129:909–914.
73. **Hassan O, Ahlm C, Sang R, Evander M (2011).** The 2007 Rift Valley fever outbreak in Sudan. *PLoS Negl. Trop. Dis*, 5 : e1229.
74. **Hewson Roger.** Lessons learnt from imported cases and onward transmission of Lassa fever in Europe support broader management of viral haemorrhagic fevers. *Euro Surveill*. 2017;22(39).

75. **Holmes EC, Worobey M, Rambaut A (1999).** Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Mol. Biol. Evol.* 16 :405–409.
76. **Hoogstraal H. (1978).** Rift Valley Fever: An historical perspective. *Egypt. Pub. Health. Assoc*, **53**, 129-135.
77. **House J.A., Turell M.J. & Mebus CA. (1992).** Rift Valley Fever, Present status and risk to the western hemisphere. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, **16(653)**,233-242.
78. **Hubalek Z, Halouzka J. (1999).** West Nile fever a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis* 5 : 643– 650.
79. **Huggins JW (1989).** Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug. *Rev. Infect. Dis*, 11 Suppl 4: S750-61.
80. **Hunter P., Erasmus B.J & Voster J.H. (2002).** Teratogenicity of a mutagenized Rift Valley Fever Virus (MP12) in sheep. *J. Vet. Res*, **69**, 95–98.
81. **Hurlbut HS (1966).** Mosquito salivation and virus transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 15:989–993.
82. **Ikegami T., Won S., C. J. Peters,1,2 & M. Shinji (2005).** Rift Valley Fever Virus NSs mRNA Is Transcribed from an Incoming Anti-Viral-Sense S RNA Segment. *J. Virol*, **79(18)**, 12106–12111.
83. **Ikegami, T., Won, S., Peters, C.J., Makino, S (2007).** Characterization of Rift Valley fever virus transcriptional terminations. *J. Virol*, 81, 8421–8438.
84. **Imadeldin E. Aradaib, Bobbie R. Erickson, Rehab M. Elageb, Marina L. Khristova, Serena A. Carroll, Isam M. Elkhidir, Mubarak E. Karsany, Abdel Rahim E. Karrar, Mustafa I. Elbashir, and Stuart T.**

- Nichol (2013).** Rift Valley Fever, Sudan, 2007 and 2010. *Emerg. Infect. Dis.* Feb, 19(2): 246–253.
85. **Jeremy F. Fuchs, Huarong Li, Bradley S. Schneider, Charles E. Mcgee, Thomas A. Rocheleau, Hanan Helmy, Bruce M. Smithburn KC, Haddow AJ, Gillett JD (1948).** Rift Valley Fever: isolation of the virus from wild mosquitoes. *J. Exp. Pathol*, 29 :107–121
86. **Johnson K.M (1993).** Emerging viruses in context: an overview of viral hemorrhagic fevers. In «MORSE S. Emerging Viruses». *Oxford Univ. Press ed.*, New York, pp 46-47.
87. **Jonas G. King, Kenneth D. Vernick, and Julián F. Hillyer (2011).** Members of the Salivary Gland Surface Protein (SGS) Family. September 30, DOI 10.1074/jbc.M111.280552.
88. **Jouan A, Le Guenno B, Digoutte JP, Philippe B, Riou O. & Adam F. (1988).** An RVF epidemic in southern Mauritania. *Ann. Virol*, 139,307-8.
89. **Jupp PG, Kemp A, Grobbelaar A, Lema P, Burt FJ, Alahmed AM, Al Mujalli D, Al Khamees M & Swanepoel R. (2002).** The 2000 epidemic of Rift Valley fever in Saudi Arabia, mosquito vector studies. *Med. Vet. Entomol*, 16(3),245-52.
90. **Jupp PG, Grobbelaar AA, Leman PA, Kemp A, Dunton RF, Burkot TR, Ksiazek TG, Swanepoel R (2000).** Experimental detection of Rift Valley fever virus by reverse transcription-polymerase chain reaction assay in large samples of mosquitoes. *J. Med. Entomol*, 37(3):467-71.
91. **Kabete Veterinary Laboratories.** Diseases of sheep. Kenya Veterinary Department annual report—1910. *Kenya Department of Veterinary Services*, Nairobi, Kenya.

92. **Kalume, DE, Okulate, M, Zhong, J, Reddy, R, et al (2005).** A proteomic analysis of salivary glands of female *Anopheles gambiae* mosquito. *Proteomics*, 5:3765–3777.
93. **Karen L. Mansfield, Ashley C. Banyard, Lorraine McElhinney, Nicholas Johnson, Daniel L. Horton, Luis M. Hernández-Triana, Anthony R. Fooks (2015).** Rift Valley fever virus: A review of diagnosis and vaccination, and implications for emergence in Europe. *Vaccine*, (42):5520-31.
94. **Keegan K, Collaborateursett MS (1986).** Use of bacterial expression cloning to define the amino acid sequences of antigenic determinants on the G2 glycoprotein of Rift Valley fever virus. *J. Virol*, 58(2):263-70.
95. **Kenneth J. Linthicum, Seth C. Britch, et Assaf Anyamba (2016).** Rift Valley Fever: An Emerging Mosquito-Borne Disease. *Annu. Rev. Entomol*, 61:395–415.
96. **Kilpatrick AM, Randolph SE (2012).** Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *Lancet*, 380: 1946–55.
97. **Ksiazek T.G., Jouan A, Meegan JM, Le Guenno B, Wilson ML, Peters CJ, Digoutte JP, Guillaud M, Merzoug NO. & Touray EM. (1989).** Rift Valley fever among domestic animals in the recent West African outbreak. *Res. Virol*, 140,67-7.
98. **Ksiazek TG, Jouan A, Meegan JM, Le Guenno B, Wilson ML, Peters CJ, Digoutte P, Guillaud M, Ould Merzoug N, Touray EM (1989).** Rift Valley fever among domestic animals in the recent West African outbreak. *Res. Virol*, 140: 67-77.
99. **LaBeaud AD, Cross PC, Getz WM, Glinka A, King CH (2011).** Rift Valley fever virus infection in African buffalo (*Syncerus caffer*) herds in rural South Africa: evidence of inter-epidemic transmission. *The Am. J. Trop. Med. and Hyg*, 84: 641–646.

100. **Le Coupanec A, Babin D, Fiette L, Jouvion G, Ave P, et al. (2013)** Aedes Mosquito Saliva Modulates Rift Valley Fever Virus Pathogenicity. *PLoS. Negl Trop. Dis*, 7(6) : e2237.
101. **Le May N, Dubaele S, De Santis LP, Billecocq A, Bouloy M. & Egly JM. (2004)**. TFIIH transcription factor, a target for the Rift Valley haemorrhagic fever virus. *Cell*, 116(4), 541-50.
102. **Limesand KH, Higgs S, Pearson LD, Beaty BJ (2000)**. Potentiation of vesicular stomatitis New Jersey virus infection in mice by mosquito saliva. *Parasite Immunol*, 22:461–467.
103. **Linda M. Styer, Pei-Yin Lim, Karen L. Louie, Rebecca G. Albright, Laura D. Kramer, and Kristen A. Bernard (2011)**. Mosquito Saliva Causes Enhancement of West Nile Virus Infection in Mice. *Journal of virology*, Feb, p. 1517–1527
104. **Linthicum KJ, Bailey CL, Davies FG, Tucker CJ (1987)**. Detection of Rift Valley fever viral activity in Kenya by satellite remote sensing imagery. *Science*, 235:1656–9.
105. **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.
106. **Luplertlop N, Surasombatpattana P, Patramool S, Dumas E, Wasinpiyamongkol L, Saune L, Hamel R, Bernard E, Sereno D, Thomas F, Piquemal D, Yssel H, Briant L, Missé D (2011)**. Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following Infection with Dengue Virus. *PLoS Pathog*, Jan 13 ;7(1) : e1001252.

107. **Lutomiah J, Omondi D, Masiga D, Mutai C, Mireji PO, Ongus J, Linthicum KJ, Sang R (2014).** Blood meal analysis and virus detection in blood-fed mosquitoes during the 2006-2007 Rift Valley fever outbreak in Kenya. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 14(9) :656-64.
108. **Liu W, Sun F-J, Tong Y-G, Zhang S-Q, Cao W-C (2016).** Rift Valley fever virus imported into China from Angola. *Lancet Infect. Dis*, 16(11):1226.
109. **Mackenzie JS, Williams DT (2009).** The zoonotic flaviviruses of southern, south-eastern and eastern Asia, and Australasia: The potential for emergent viruses. *Zoonoses Public Health* ; 56 :338–356
110. **Mark O. Nanyingi, Peninah Munyua, Stephen G. Kiama, Gerald M. Muchemi, Samuel M. Thumbi, Austine O. Bitek, Bernard Bett, Reese M. Muriithi, and M. Kariuki Njenga (2015).** A systematic review of Rift Valley Fever epidemiology 1931–2014. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 5: 10.3402/iee.v5.28024.
111. **Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P. (2010).** RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics.* 2010 Oct 1 ;26(19) :2462-3
112. **McGavran M. & Easterday B.C. (1963).** Rift Valley fever virus hepatitis. *Am. J. Path*, 42, 587-607.
113. **Meegan J, Bailey CL (1988).** Arboviruses Epidemiology and Ecology. CRC Press IV: 51–71.
114. **Meegan JM, Watten RH, Laughlin LW (1981).** Clinical experience with Rift Valley fever in humans during the 1977 Egyptian epizootic. *Contrib. Epidemiol. Biostat*, 3: 114–123.

115. **Meegan JM, Digoutte JP, Peters CJ, Shope RE (1983).** Monoclonal antibodies to identify Zinga virus as Rift Valley Fever virus. *Lancet*, **1983** Mar 19;1(8325):641.
116. **Michael J. Conway, Berlin Londono-Renteria, Andrea Troupin, Alan M. Watson, William B. Klimstra, Erol Fikrig, Tonya M. Colpitts (2016).** *Aedes aegypti* D7 Saliva Protein Inhibits Dengue Virus Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, DOI : 10.1371/journal.pntd.0004941 September 15.
117. **Miller WS, Demchak P, Rosenberger CR, Dominik JW, Bradshaw JL. (1963)** Stability and infectivity of airborne Yellow Fever and Rift Valley Fever viruses. *Am. J.Trop.Med. Hyg*, 77: 114–121.
118. **Miller, B.R., Godsey, M.S., Crabtree, M.B., Savage, H.M., Al-Mazrao, Y., Al-Jeffri, M.H., Abdoon, A.M., Al-Seghayer, S.M., Al-Shahrani, A.M., Ksiazek, T.G (2002).** Isolation and genetic characterization of Rift Valley fever virus from *Aedes vexans arabiensis*, Kingdom of Saudi Arabia. *Emerg. Infect. Dis*, 8, 1492–1494.
119. **Miller, B.R., Godsey, M.S., Crabtree, M.B., Savage, H.M., Al-Mazrao, Y., Al-Jeffri, M.H., Abdoon, A.M., Al-Seghayer, S.M., Al-Shahrani, A.M., Ksiazek, T.G (2002).** Isolation and genetic characterization of Rift Valley fever virus from *Aedes vexans arabiensis*, Kingdom of Saudi Arabia. *Emerg. Infect. Dis*, 8, 1492–1494.
120. **Monaco et al (2013).** RVF in Namibia 2010. Source: *Emerg. Infect. Dis*, 19: 2025-2027.
121. **Montgomery, R. E., and R. J. Stordy.** Report of Veterinary Department for 1912-1913. *Annual Report of the Department of Agriculture, Kenya Colony*.
122. **Morill J.C, Carpenter L., Taylor D., Ransburg H.H., Quance J. & Peters C.J. (1991).** Further evaluation of a mutagen-attenuated RVF vaccine in sheep. *Vaccine*, **9**, 35 - 41.

123. **Morill J.C., Mebus C.A. & Peters C.J. (1997) a.** Safety of mutagen-attenuated Rift Valley Fever Virus vaccine in a fetal and neonatal bovids. *Am. J. Vet. Res*, **58** (10), 1110-1114.
124. **Morill J.C., Mebus C.A. & Peters C.J. (1997) b.** Safety and efficacy of mutagen-attenuated Rift Valley Fever Virus vaccine in cattle. *Am. J. Vet. Res*, **58** (10), 1104-1109.
125. **Morrill JC, Jennings GB, Cosgriff TM, Gibbs PH, Peters CJ (1989).** Prevention of Rift Valley fever in rhesus monkeys with interferon-alpha. *Rev. Infect. Dis*, Suppl 4: S815-25.
126. **Morvan J., Rollin P. E., Laventure S., Rakotoarivony I. & Roux J. (1992).** RVF epizootic in the central highlands of Madagascar. *Res. Virol*, **143**, 407-415.
127. **Muller R., Saluzzo J., 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. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, **53**, 405-411.
128. **Murithi RM, Munyua P, Ithondeka PM, Macharia JM, Hightower A, Luman ET, Breiman RF, Njenga MK. Rift Valley fever in Kenya (2011):** history of epizootics and identification of vulnerable districts. *Epidemiol. Infect*, Mar;139(3):372-80.
129. **Murphy, F. A., Harrison, A. K. & Whitfield, S. G. (1973).** Bunyaviridae: morphologic and morphogenetic similarities of Bunyamwera serologic supergroup viruses and several other arthropod-borne viruses. *Intervirology*, **1**, 297-316.
130. **Mwaengo D, Lorenzo G, Iglesias J, Warigia M, Sang R, Bishop RP, Brun A (2012).** Detection and identification of Rift Valley fever virus in mosquito vectors by quantitative real-time PCR. *Virus. Res*, **169**(1):137-43.

131. **Nderitu L, Lee JS, Omolo J, Omulo S, O'Guinn ML, Hightower A, et al (2011).** Sequential Rift Valley fever outbreaks in eastern Africa caused by multiple lineages of the virus. *J. Infect. Dis*, 203:655–65.
132. **Ndiaye el H, Fall G, Gaye A, Bob NS, Talla C, Diagne CT, Diallo D, B A Y, Dia I, Kohl A, Sall AA, Diallo M (2016).** 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. *Parasit. Vectors*, Feb 20; 9:94.
133. **Ndione, J.A.; Besancenot, J.P.; Lacaux, J.P.; Sabatier, P.** Environment and epidemiology of Rift Valley fever in the lower basin of the Senegal river. *Environnement, Risques & Santé* **2003**, 2, 176–182.
134. **Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, Xi Z, Megy K, Grabherr M, Ren Q et al (2007).** Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*, Jun 22;316(5832):1718-23.
135. **Nguku PM, Sharif SK, Mutonga D, Amwayi S, Omolo J, Mohammed O, et al (2010).** An investigation of a major outbreak of Rift Valley fever in Kenya: 2006–2007. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 83(2 Suppl):5–13.
136. **Niklasson B, Peters CJ, Bengtsson E, Norrby E (1985).** Rift Valley fever virus vaccine trial: study of neutralizing antibody response in humans. *Vaccine*, Jun;3(2):123-7.
137. **Nuttall PA, Labuda M (2004).** Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*, (129 Suppl): S177–S189.
138. **Odendaal L, Fosgate GT, Romito M, Coetzer JA, Clift SJ (2014).** Sensitivity and specificity of real-time reverse transcription polymerase chain reaction, histopathology, and immunohistochemical labeling for the detection of

Rift Valley fever virus in naturally infected cattle and sheep. *J. Vet Diagn. Invest*, Jan ;26(1) :49-60.

139. **Orlandi-Pradines, E., Almeras, L., Denis de Senneville, L., Barbe, S., Remoué, F., Villard, C., Cornelie, S., Penhoat, K., Pascual, A., Bourgouin, C., Fontenille, D., Bonnet, J., Corre-Catelin, N., Reiter, P., Pagés, F., Laffite, D., Boulanger, D., Simondon, F., Pradines, B., Fusai, T., and Rogier, C (2007).** Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa. (2007) *Microbes Infect*, **9**, 1454 –1462.
140. **Osorio JE, Godsey MS, Defoliart GR, Yuill TM (1996).** La Crosse viremia in white-tailed deer and chipmunks exposed by injection or mosquito bite. *Am. J Trop. Med. Hyg*, 54:338–342.
141. **Owhashi M, Harada M, Suguri S, Ohmae H, Ishii A (2001).** The role of saliva of *Anopheles stephensi* in inflammatory response: identification of a high molecular weight neutrophil chemotactic factor. *Parasitol. Res*, 87: 376–382.
142. **Pepin M, Bouloy M, Bird BH, Kemp A, Paweska J (2010).** Rift Valley fever virus (Bunyaviridae: Phlebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet. Res*, Nov-Dec;41(6):61.
143. **Pepin, M., Bouloy, M., Bird, B.H., Kemp, A., Paweska, J (2010).** Rift Valley fever virus (Bunyaviridae: Phlebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet. Res*, 41, 61.
144. **Perez-Ramirez G, Diaz-Badillo A, Camacho-Nuez M, Cisneros A, Munoz Mde L (2009).** Multiple recombinants in two dengue virus, serotype-2 isolates from patients from Oaxaca, Mexico. *BMC Microbiol*.9 :260.
145. **Peters C.J, Jones D., Trotter R., Donaldson J., Wite J., Stephen E. & Slone T.W (1988).** Experimental Rift valley fever in rhesus macaques. *Arch. Virol*, **99**, 31-44.

146. **Peters C.J. & Anderson G.W (1981).** Pathogenesis of Rift valley fever. *In Contrib. Epid. Biosat*, **3**, 21-41.
147. **Peters CJ, Jahrling PB, Liu CT, Kenyon RH, McKee KT Jr, Barrera Oro JG (1987).** Experimental studies of arenaviral hemorrhagic fevers. *Curr. Trop Microbiol. Immunol*: 134:5-68.
148. **Peters CJ, Jones D, Trotter R, Donaldson J, White J, Stephen E, Slone TW., Jr (1988).** Experimental rift valley fever in rhesus macaques. *Arch. Virol*, 99:31–44.
149. **Peters CJ, Reynolds JA, Slone TW, Jones DE, Stephen EL (1986).** Prophylaxis of Rift Valley fever with antiviral drugs, immune serum, an interferon inducer, and a macrophage activator. *Antiviral. Res*, Aug;6(5):285-97.
150. **Peters, C. J. & K. J. Linthicum (1994).** Rift Valley fever. *In* B. G. W. & J. H. Steele (ed.), *Handbook of zoonoses*, section B. Viral, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Fla., p. 125-138.
151. **Pittman, P.R., Liu C.T., Cannon T.L., Makuch R.S., Mangiafico J.A., Gibbs P.H., & Peters C.J. (1999).** Immunogenicity of an inactivated Rift Valley fever vaccine in humans: a 12-year experience. *Vaccine*, **18**, 181-189.
152. **Pretorius A., J. O. Smith, & Ryst E. V. D. (1997).** Rift Valley Fever virus: A seroepidemiologic study of small terrestrial vertebrates in South Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, **57**, 693-698.
153. **R Core Team (2013).** **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL [http:// www. R-project.org/](http://www.R-project.org/)

154. **Rambaut, Lam, de Carvalho & Pybus (2016)**. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst. *Virus Evolution* 2: vew007
155. **Randall, R.; Gibbs, C.J., Jr.; Aulisio, C.G.; Binn, L.N.; Harrison, V.R (1962)**. The development of a formalin-killed rift valley fever virus vaccine for use in man. *J. Immunol*, 89, 660–671.
156. **Reisen WK, Fang Y, Martinez VM (2005)**. Avian host and mosquito (Diptera: Culicidae) vector competence determine the efficiency of West Nile and St. Louis encephalitis virus transmission. *J. Med. Entomol*, 42:367–375.
157. **Remoue F, Alix E, Cornélie S, Sokhna C, Cissé B, Doucoure S, Mouchet F, Boulanger D, Simondon F (2007)**. IgE and IgG4 antibody responses to *Aedes* saliva in African children. *Acta. Trop*, Nov-Dec ;104(2-3) :108-15.
158. **Remoue, F., B. Cissé, F. Ba, C. Sokhna, J. P. Herve, D. Boulanger, and F. Simondon. (2006)**. Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*, 100: 363–370.
159. **Ribeiro JM, Rossignol PA, Spielman A (1984)**. Role of mosquito saliva in blood vessel location. *J. Exp. Biol*, 1984; 108:1–7.
160. **Ribeiro, J.M.C (1995)**. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect. Agents Dis*, 4, 143–152.
161. **Ribeiro, J.M.C (2000)**. Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). *Med. Vet. Entomol*, 14, 142– 148.

162. **Ribeiro, JM, Arca, B, Lombardo, F, Calvo, E, et al (2007).** An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics*, 8:209.
163. **Ribeiro, JM, Charlab, R, Pham, VM, Garfield, M, et al (2004).** An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect. Biochem. Mol. Biol*, 2004; 34:543–563.
164. **Romoser WS, Faran ME, Bailey CL, Lerdthusnee K (1992).** An immunocytochemical study of the distribution of Rift Valley fever virus in the mosquito *Culex pipiens*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, Apr;46(4):489-501.
165. **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 and associated pathology: possible implications for endemic maintenance. *Dove Journal Press* 121-127.
166. **Rossi SL, Ross TM, Evans JD.(2010).** West Nile virus. *Clin. Lab Med* 30: 47–65.
167. **Sall A.A., Macondo E.A., Sène O.K., Diagne M. Sylla R., Mondo M., Giraut L., Marrama L., Spiegel A., Diallo M., Bouloy M. & Mathiot. (2002).** Use of Reverse Transcriptase PCR in early diagnosis of Rift Valley fever. *Clin.Diag. Lab. Imm*, 9(3), 713-715.
168. **Sall A.A., Zanotto P. M. A., Zeller H.G., Digoutte J.P., Thiongane Y. & Bouloy M. (1997).** Variability of The NSs Protein Among Rift Valley Fever Virus Isolates. *J. Gen. Virol*,78,2853-2858.
169. **Sall A.A., Zanotto P.M.A., Sène O.K., Zeller H.G., Digoutte J.P., Thiongane Y. & Bouloy M. (1999).** Genetic reassortment of Rift Valley Fever in Nature. *J. Gen. Virol*, 73(10),8196-8200.

170. **Sall AA, Zanotto PM, Vialat P, Sène OK, Bouloy M (1998).** Molecular epidemiology and emergence of Rift Valley fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93:609–14
171. **Sall AA, Thonnon J, Sene OK, Fall A, Ndiaye M, Baudez B, Mathiot C, Bouloy M (2001).** Single-tube and nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of Rift Valley fever virus in human and animal sera. *J. Virol Methods*, Jan; 91(1):85-92.
172. **Saluzzo J. F, Andersonn G.W. Jr., Smith J.F., Fontenille D. & Coulanges P (1989)** Biological relationship between Rift Valley fever virus strains isolated in Egypt and Madagascar. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1989** Sep-Oct;83(5):701
173. **Saluzzo J. F., & Dupuy A (1986).** Rapport sur le fonctionnement technique, pp. 62-72. Institut Pasteur, Dakar.
174. **Saluzzo JE Digoutte JP, Chartier C, Martinez D, Bada R (1987).** Focus of Rift Valley fever transmission in southern Mauritania. *Lancet*: 504.
175. **Schmaljohn C. S (1996).** Bunyaviridae: the viruses and their replication. In Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M. and al. Eds. *Fields Virology*, 3rd edn, Raven press, New York, pp. 1447-1471.
176. **Schneider BS, Higgs S (2008).** The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*, 102: 400–408.
177. **Schneider BS, Soong L, Coffey LL, Stevenson HL, McGee CE, et al. (2010).** *Aedes aegypti* saliva alters leukocyte recruitment and cytokine signaling by antigen-presenting cells during West Nile virus infection. *PLoS One*, 5: e11704.

178. **Schneider BS, Soong L, Girard YA, Campbell G, Mason P, Higgs S (2006).** Potentiation of West Nile encephalitis by mosquito feeding. *Viral Immunol*, 19:74–82.
179. **Schneider, B. S., and S. Higgs (2008).** The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*, 102: 400D408.
180. **Sellers R.F., Pedgley D.E., Tucker M.R. (1982).** Rift Valley fever, Egypt 1977: disease spread by windborne insect vectors? *Vet. Rec*, **110**, 73–77.
181. **Shimshony A. & Barzilai R. (1983).** Rift Valley fever. *Adv. vet. sci. comp. med*, **27**,347-425
182. **Shoemaker T, Boulianne C, Vincent MJ, Pezzanite L, Al-Qahtani MM, Al-Mazrou Y, Khan AS, Rollin PE, Swanepoel R, Ksiazek TG, Nichol ST (2002).** Genetic analysis of viruses associated with emergence of Rift Valley fever in Saudi Arabia and Yemen, 2000-01. *Emerg. Infect. Dis*, **8**(12):1415-20.
183. **Shoemaker T, Boulianne C, Vincent MJ, Pezzanite L, Al-Qahtani MM, Al-Mazrou Y, Khan AS, Rollin PE, Swanepoel R, Ksiazek TG, Nichol ST (2002).** Genetic analysis of viruses associated with emergence of Rift Valley fever in Saudi Arabia and Yemen, 2000-01. *Emerg. Infect. Dis*, **8**(12):1415-20.
184. **Shope RE, Peters CJ, Walker JS (1980).** Serological relation between Rift Valley fever virus and viruses of phlebotomus fever serogroup. *Lancet*, (8173):886-7.
185. **Shrestha B, Ng T, Chu HJ, Noll M, Diamond MS (2008).** The relative contribution of antibody and CD8+ T cells to vaccine immunity against West Nile encephalitis virus. *Vaccine*, 26: 2020–2033.

186. **Sidwell RW, Huffman JH, Barnett BB, Pifat DY (1988).** In vitro and in vivo Phlebovirus inhibition by ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother*, Mar; 32(3):331-6.
187. **Sissoko D, Giry C, Gabrie P, Tarantola A, Pettinelli F, Collaborateurset L, D'Ortenzio E, Renault P, Pierre V (2009).** Rift Valley fever, Mayotte, 2007-2008. *Emerg. Infect. Dis*, Apr;15(4):568-70. doi: 10.3201/eid1504.081045.
188. **Smith DR, Carrara AS, Aguilar PV, Weaver SC (2005).** Evaluation of methods to assess transmission potential of Venezuelan equine encephalitis virus by mosquitoes and estimation of mosquito saliva titers. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 73:33–39.
189. **Smithburn KC, Hughs TP, Burke AW, Paul JH(1940).** A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am. J. Trop. Med*; 20:471–492.
190. **Smithburn R (1949).** Rift valley fever: A neurotropic adaptation of the virus and the experimental use of this modified virus as a vaccine. *Br. J. Exp. Path*, 30, 1-16.
191. **Smolinski MS, Hamburg MA, Lederberg J (2003).** Committee on emerging microbial threats to health in the 21st Century. Microbial threats to health: emergence, detection, and response. Washington, DC : The National Academies Press, 2003.
192. **Soi RK, Rurangirwa FR, McGuire TC, Rwambo PM, DeMartini JC, Crawford TB (2010).** Protection of sheep against Rift Valley fever virus and sheep poxvirus with a recombinant capripoxvirus vaccine. *Clin. Vaccine. Immunol*, Dec ;17(12): 1842-9.
193. **Soumaré P, Freire C, Faye O, Diallo M, de Oliveira V, Zannotto P, Amadou alpha Sall (2012).** Phylogeography of Rift Valley fever virus in Africa reveals multiple introductions in Senegal and Mauritania. *PLoS One*, 7:23–6.

194. **Sow A, Faye O, Ba Y, Ba H, Diallo D, Faye O, et al (2014).** Rift Valley fever outbreak, Southern Mauritania, 2012. *Emerg Infect Dis*, 20 :2012–15.
195. **Stefanopoulo G (1933).** Sur le "Dioundé", à propos d'une enquête épidémiologique sur la fièvre jaune dans les pays de Ségou et de Macina (Soudan français). *Bull. Soc. Path. Ex*, 560-562.
196. **Stephane Tchankouo-Nguetcheu, Edouard Bourguet, Pascal Lenormand, Jean-Claude Rousselle, Abdelkader Namane et Valerie Choumet (2012).** Infection by chikungunya virus modulates the expression of several proteins in *Aedes aegypti* salivary glands. *Par & Vec*, 5 :264
197. **Stordy, R. J (1913).** Mortality among lambs. Annual Report Department of Agriculture, British East Africa, 1912-1913.
198. **Struthers J.K., & Swanepoel R. (1982).** Identification of a major non-structural protein in the nuclei of Rift Valley fever virus-infected cells. *J. Gen. Virol*, **60**,381-384.
199. **Styer LM, Kent KA, Albright RG, Bennett CJ, Kramer LD, Bernard KA.** Mosquitoes inoculate high doses of West Nile virus as they probe and feed on live hosts. *PLoS Pathog*, 3:1262–1270.
200. **Sun, D, McNicol, A, James, AA, Peng, Z (2006).** Expression of functional recombinant mosquito salivary apyrase: a potential therapeutic platelet aggregation inhibitor. *Platelets*, 17:178–184.
201. **Surasombatpattana P, Patramool S, Luplertlop N, Yssel H, Misse D (2012).** *Aedes aegypti* Saliva Enhances Dengue Virus Infection of Human Keratinocytes by Suppressing Innate Immune Responses. *J. Invest. Dermatol*, 132: 2103–2105.

202. **Swanepoel, R., Coetzer, J.A.W (2004)**. Rift Valley fever. In: Coetzer, J.A.W., Thompson, G.R., Tustin, R.D. (Eds.), *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*, second ed. *Oxford University Press*, Cape Town, South Africa, pp. 1037–1070.
203. **Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A, and Kumar S (2013)** **MEGA6**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evolution*:30 2725-2729.
204. **Tavare, S (1986)**. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lect. Math. Life. Sci*, **17**, (1986).
205. **Tchankouo-Nguetcheu S, Bourguet E, Lenormand P, Rousselle JC, Namane A, Choumet V (2012)**. Infection by chikungunya virus modulates the expression of several proteins in *Aedes aegypti* salivary glands. *Par. Vec*, Nov 15 ; 5:264.
206. **Tetsuro Ikegami (2012)**. Molecular biology and genetic diversity of Rift Valley fever virus. *Antiviral Research*, 95 293–310.
207. **Theodos CM, Titus RG (1993)**. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. *Parasite Immunol*, 15:481–487.
208. **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>
209. **Titus RG, Bishop JV, Mejia JS (2006)**. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol*, 28: 131–141.

210. **Titus RG, Ribeiro JM (1988).** Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*, 239:1306–1308.
211. **Tolou HJ, Couissinier-Paris P, Durand JP, Mercier V, de Pina JJ, et al (2001).** Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genome sequences. *J. Gen. Virol.* 82 :1283–1290.
212. **Turell M. J., Presley S.M., Gad A.M., Cope S.E., Dohm D.J., Morrill J.C. & Arthur R.R (1996).** Vector competence of Egyptian mosquitoes for Rift Valley fever virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, **54**(2), 136-9.
213. **Turell M. J & Perkins P. V (1990).** Transmission of Rift Valley Fever Virus by the Sand fly, *Phlebotomus dubosci* (Diptera, Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg*, **42**, 185-188.
214. **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. *Am J. of Trop. Med. Hyg*, 43, 677\_680
215. **Turell M. J, Spielman A (1992).** Nonvascular delivery of Rift Valley fever virus by infected mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 47:190–194.
216. **Turell M. J, Tammariello RF, Spielman A (1995).** Nonvascular delivery of St. Louis encephalitis and Venezuelan equine encephalitis viruses by infected mosquitoes (Diptera: Culicidae) feeding on a vertebrate host. *J. Med. Entomol*, 32:563–568.
217. **Valenzuela, JG, Pham, VM, Garfield, MK, Francischetti, IM, et al (2002).** Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol*, 32:1101–1122.
218. **Vanlandingham DL, Schneider BS, Klingler K, Fair J, Beasley D, Huang J, Hamilton P, Higgs S (2004).** Real- time reverse transcriptase-polymerase

chain reaction quantification of West Nile virus transmitted by *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 71:120–123.

219. **Venter M, Zaayman D, van Niekerk S, Stivaktas V, Goolab S, Weyer J, Paweska JT, Swanepoel R.J (2014).** Macroarray assay for differential diagnosis of meningoencephalitis in southern Africa. *Clin Virol*, May;60(1):50-6.
220. **Vialat P., Billecocq A., Kohl A.& Bouloy M. (2000).** The S Segment of Rift Valley Fevr *Phlebovirus (Bunyaviridea)* Carries Determinant for Attenuation and Virulence in Mice. *J. Virol*, 74(4),1538-1543.
221. **Viroj Wiwanitkit (2016).** Emerging Rift Valley Fever in China: What should be known? *As. Pac. J. Trop. Biom*, 2016; 6(9): 727-729.
222. **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.
223. **Wertheim, J.O., Kosakovsky Pond, S.L (2011).** Purifying selection can obscure the ancient age of viral lineages. *Mol. Biol. Evol*, 28, 3355–3365
224. **WHO (1983).** The use of veterinary vaccines for prevention and control of Rift Valley fever: memorandum from a WHO/FAO meeting. *Bull. World. health Organ* 1983; 61: 261-8.
225. **WHO report 1998.** Life in the 21st century: A vision for all.
226. **WHO (2007).** Global alert and response. Rift Valley fever in Sudan, update November 7. 2007 [[Http:// www.who.int/csr/don/2007\\_11\\_05/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2007_11_05/en/index.html)]
227. **WHO (2007).** Outbreaks of Rift Valley fever in Kenya, Somalia and United Republic of Tanzania, December 2006–April 2007. *Weekly Epidemiol Rec*, 82 :169–78.

228. **WHO (2015a).** <http://www.who.int/csr/don/21-december-2015-zika-cape-verde/fr>
229. **WHO (2015b).** <http://www.who.int/csr/don/14-september-2015-chikungunya/en>
230. **WHO (2016).** Disease Outbreak News, 29 September 2016. Rift Valley Fever in Niger and unpublished WHO Situation Reports.
231. **WHO (2016a).** <http://www.afro.who.int/en/ethiopia/pressmaterials/item/6744-ethiopia-steps-up-actions-for-dengueprevention-and-control.html>(accessed on 7/1/2016)
232. **WHO (2016b).** <http://www.who.int/csr/don/18-november-2016-dengue-burkina-faso/fr>
233. **WHO (2016c).** <http://apps.who.int/ebola/ebola-situation-reports>
234. **WHO (2017).** <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs207/en>
235. **William B Karesh, Andy Dobson, James O Lloyd-Smith, Juan Lubroth, Matthew A Dixon, Malcolm Bennett, Stephen Aldrich, Todd Harrington, Pierre Formenty, Elizabeth H Loh, Catherine C Machalaba, Mathew Jason Thomas, David L Heymann (2012).** Ecology of zoonoses : natural and unnatural histories. *Lancet*, 380 : 1936–45
236. **Wikel, S.K., Rachamandra, R.N., Bergman, D.K (1996).** Arthropod modulation of host immune responses. In: Wikel, S.K. (Ed.), *The Immunology of Host–Ectoparasitic Arthropod Relationships. CAB International, Wallingford*, pp. 107–130.
237. **William B Karesh, Andy Dobson, James O Lloyd-Smith, Juan Lubroth, Matthew A Dixon, Malcolm Bennett, Stephen Aldrich, Todd Harrington,**

- Pierre Formenty, Elizabeth H Loh, Catherine C Machalaba, Mathew Jason Thomas, David L Heyman (2012).** Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *Lancet*, Vol 380 December 1.
238. **Wilson M.L, Chapman L.E., Hall D.B., Dykstra E.A., Ba K., Zeller H.G., Traoré-Lamizana M., Hervy J.P., Linthicum K.J. & Peters CJ. (1994) b.** Rift valley fever in rural northern Senegal: human risk factors and potential vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **50**, 663-675.
239. **Won S, Ikegami T, Peters CJ, Makino S (2007).** NSm protein of Rift Valley fever virus suppresses virus-induced apoptosis. *J. Virol*, Dec;81(24):13335-45.
240. **Woods C.W., Karpati A.M., Grein T., McCarthy N., Gaturuku P., Muchiri E., Dunster L., Henderson A., Khan A .S., Swanepoel R., Bonmarin I., Martin L., Mann P., Smoak B.L., Ryan M., Ksiazek T.G., Arthur R.R., Ndikuyeze A., Naphtali N.A., Peters C.J. (2002).** An outbreak of Rift Valley fever in Northeastern Kenya, 1997-98. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**(2), 138-144.
241. **Worobey M, Rambaut A, Holmes EC (1999).** Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96** :7352–7357.
242. **Yadani F-Z., & Bouloy M. (2000).** La protéine NSs du virus de la fièvre de la vallée du Rift forme un filament nucléaire. *Virologie*, **4** (1),64-5.
243. **Yadani F-Z., Kohl A., Préhaud C., Billecocq A., & Bouloy M. (1999).** The Carboxy-Terminal Acidic Domain of Rift Valley Fever Virus NSs Protein Is Essential for the Formation of filamentous Structures but Not for the Nuclear Localization of the Protein. *J. Virol*, **73**(6), 5018 – 5025.
244. **Yamar BA, Diallo D, Kebe CMF, 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). *J. Med. Entomol* 42: 739–750.
245. **Yang J-S, Kim JJ, Hwang D, Choo AY, Dang K, et al. (2001).** Induction of Potent Th1-Type Immune Responses from a Novel DNA Vaccine for West Nile Virus New York Isolate (WNV-NY1999). *J. Infect. Dis*, 184: 809–816.
246. **Yang YL, Reis LF, Pavlovic J, Aguzzi A, Schäfer R, Kumar A, Williams BR, Aguet M, Weissmann C (1995).** Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *EMBO J*. Dec 15;14(24):6095-106.
247. **Yedloutschnig RJ, Dardiri AH, Mebus CA, Walker JS (1981).** Abortion in vaccinated sheep and cattle after challenge with Rift Valley fever virus. *Vet. Rec.* Oct 24;109(17):383-4.
248. **Yvette A. Girard, George F. Mayhew Christensen, Stephen Higgs, et Lyric C. Bartholomay (2010).** Transcriptome Changes in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Salivary Glands During West Nile Virus Infection. *J. Med. Entomol*, 47(3) : 421D435
249. **Zakia M I Ali, Mahfoud Bakli, Albin Fontaine, Nawal Bakkali, Vinh Vu Hai, Stephane Audebert, Yvan Boublik, Frederic Pagès, Franck Remoué, Christophe Rogier, Christophe Fraiser, et Lionel Almeras (2012).** Assessment of *Anopheles* salivary antigens as individual exposure biomarkers to species-specific malaria vector bites. *Malar J*. 11: 439.
250. **Zeidner NS, Higgs S, Happ CM, Beaty BJ, Miller BR (1999).** Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice. *Parasite Immunol*, 21 : 35–44.

251. **Zeller, H. (1993).** Rapport sur le fonctionnement technique de l'Institut Pasteur de Dakar. Pp 181-183, Dakar.

