

Estimation du risque d'introduction du virus de la fièvre de la vallée du Rift en Tunisie par le moustique *Culex pipiens*

Assessment of the risk of introduction to Tunisia of the Rift Valley fever virus by the mosquito *Culex pipiens*

G. Krida · L. Diancourt · A. Bouattour · A. Rhim · B. Chermiti · A.-B. Failloux

Reçu le 25 août 2010 ; accepté le 19 octobre 2010
© Société de pathologie exotique et Springer-Verlag France 2010

Résumé Le moustique *Culex pipiens* a été impliqué dans la transmission du virus West Nile en Tunisie. Les caractéristiques bioécologiques de l'espèce ainsi que certains facteurs environnementaux ont favorisé l'émergence de ce virus dans une région jusqu'alors indemne. Ce scénario fait craindre l'émergence d'autres arbovirus dont le virus de la fièvre de la vallée du Rift (FVR) qui affecte principalement les petits ruminants. La proximité de pays où circule le virus de la FVR avec lesquels la Tunisie entretient le commerce d'animaux n'est pas sans risque. Pour mesurer le risque potentiel d'introduction du virus de la FVR en Tunisie, différents aspects ont été étudiés : la compétence vectorielle des populations de *Cx. pipiens* et leur niveau de différenciation génétique. Nous avons mis en évidence une compétence vectorielle faible vis-à-vis du virus de la FVR et une différenciation forte entre populations témoignant d'une faible capacité de dispersion de l'espèce. Ainsi, nous concluons que même si le virus de la FVR était introduit, l'amplification virale dans

le vecteur *Cx. pipiens*, tout en étant possible, ne serait pas associée à une dissémination du virus par l'intermédiaire du moustique. Toutefois, le caractère émergent du virus de la FVR et la présence d'autres espèces potentiellement vectrices (e.g. *Ochlerotatus caspius*) doivent imposer le maintien et même le renforcement des surveillances zoosanitaire et entomologique afin de limiter le risque d'introduction et de circulation du virus de la FVR en Tunisie. **Pour citer cette revue : Bull. Soc. Pathol. Exot. 104 (2011).**

Mots clés Fièvre de la vallée du Rift · *Culex pipiens* · Surveillance entomologique · Contrôle vétérinaire du bétail · Arbovirus · Émergence · Différenciation génétique · Compétence vectorielle · Nord-est et centre-est de la Tunisie · Maghreb · Afrique du Nord

Abstract The mosquito *Culex pipiens* has been involved as vector of the West Nile virus in Tunisia. Its bio-ecological characteristics in combination with some environmental factors have favoured the emergence of this virus in a West-Nile free zone. This leads to question about the potential risk of introducing another arbovirus, the Rift Valley fever (RVF) virus, in Tunisia from neighbouring countries where RVF circulates. In this study, we have evaluated the vector competence of different populations of *Cx. pipiens* towards two strains of RVF virus, the virulent ZH548 and the avirulent Clone 13 by experimental infections and the genetic differentiation of these populations of *Cx. pipiens* using four microsatellite loci. We found disseminated infection rates ranging from 0% to 14.7% and a high genetic differentiation among populations without any geographical pattern (no isolation by distance). Thus, although *Cx. pipiens* is able to sustain an amplification of RVF virus, viral dissemination through mosquito dispersal would be unlikely. However, as RVF is an emerging disease transmitted by several other potential mosquito species (e.g. *Ochlerotatus caspius*), attention should be maintained to survey livestock and mosquitoes in Tunisia. **To cite this journal: Bull. Soc. Pathol. Exot. 104 (2011).**

G. Krida · A. Bouattour · A. Rhim
Institut Pasteur de Tunis, service d'entomologie médicale,
13, Place Pasteur, BP 74, 1002 Tunis Belvédère, Tunisie

G. Krida
Institut national agronomique de Tunisie,
43, avenue Charles-Nicollé, 1082 Tunis Mahrajène, Tunisie

L. Diancourt
Institut Pasteur, plateforme génotypage des pathogènes
et santé publique, 25–28, rue du Docteur-Roux,
F-75724 Paris cedex 15, France

B. Chermiti
Institut supérieur agronomique de Chott-Mariem,
BP 47, 4042 Chott Mériem, Sousse, Tunisie

A.-B. Failloux (✉)
Institut Pasteur, unité de génétique moléculaire des Bunyavirus,
25–28, rue du Docteur-Roux,
F-75724 Paris cedex 15, France
e-mail : anna-bella.failloux@pasteur.fr

Keywords Rift valley fever · Arbovirus · *Culex pipiens* · Entomologic surveillance · Veterinary control of cattle · Emergence · Genetic differentiation · Vector competence · North-east and centre-east Tunisia · Maghreb · Northern Africa

Introduction

Les moustiques du complexe *Culex pipiens* sont connus comme vecteurs d'agents pathogènes dont les principaux sont la filaire de Bancroft, *Wuchereria bancrofti* [14], le virus de l'encéphalite de Saint Louis [65], le virus de la fièvre du Nil occidental ou West Nile [66] et l'agent causal du paludisme aviaire [16]. La distinction morphologique de la plupart des espèces appartenant au complexe *Cx. pipiens* est difficile en l'absence de caractères taxonomiques discriminants [3]. Ces difficultés taxonomiques existent même pour des populations de la même espèce. En effet, l'espèce *Cx. pipiens* comprend deux formes distinctes, *pipiens* et *molestus*, qui sont morphologiquement identiques, mais écophysiologiquement différentes [22,62]. La forme *pipiens* est largement distribuée dans toutes les régions tempérées [6,41,59]. Elle se développe dans des gîtes épigés à ciel ouvert et entre en diapause en hiver. La forme *molestus*, quant à elle, a une répartition plus limitée : elle prolifère au nord de l'Europe, aux États-Unis, en Australie, au Japon et dans les îles voisines [69]. Elle affectionne les gîtes hypogés (abrités) naturels et artificiels comme les stations souterraines du métro [5]. Elle reste, par conséquent, en activité durant la période hivernale, bénéficiant des conditions de températures plus douces qui règnent en sous-sol [35,56]. Récemment, sa présence a été confirmée au sud de l'Europe, dans des gîtes à ciel ouvert [20]. La forme *molestus* se nourrit sur les mammifères [5] et la forme *pipiens* sur les oiseaux principalement [1]. Les deux formes sont génétiquement isolées au nord de l'Europe, alors qu'il existe des formes hybrides aux États-Unis, présentant des préférences trophiques mixtes pour les oiseaux et les mammifères [15,32]. Par ailleurs, la forme *molestus* est autogène (capable d'effectuer une première ponte sans avoir recours à un repas sanguin). À l'inverse, la forme *pipiens* est anautogène exigeant toujours un repas de sang pour réaliser une ponte. Les deux formes diffèrent également par leur mode d'accouplement. La forme *molestus* est sténogame et peut s'accoupler sur un support, dans des espaces confinés alors que la forme *pipiens* est eurygame, s'accouplant en vol dans des espaces à ciel ouvert [69].

La reconnaissance de l'appartenance à l'une des deux formes est parfois délicate. En effet, Villani et al. (1986) [68] ainsi que Nudelman et al. (1988) [51] ont noté l'absence de formes distinctes de *pipiens* et de *molestus* en Israël et en Égypte. Toutes les populations de *Cx. pipiens* étudiées

étaient autogènes quelle que soit la nature de leurs gîtes (hypogés et épigés). De même, aucune corrélation n'a été observée entre la nature du gîte larvaire et les préférences trophiques des femelles qui se nourrissaient invariablement sur oiseaux et sur mammifères [74].

En Tunisie, l'espèce *Cx. pipiens* est autogène, sténogame, en milieux urbains dans des gîtes aussi bien hypogés qu'épigés. Elle manifeste une préférence trophique envers les mammifères, en particulier l'homme [7,55,56]. À l'inverse, dans les gîtes épigés présents en milieux ruraux, l'espèce est anautogène, sténogame, se nourrissant sur les mammifères (en particulier l'homme) et/ou les oiseaux [57,67]. Selon Spielman (2001) [60], les préférences trophiques peuvent influencer sur les capacités vectorielles. En effet, des populations ornithophiles pouvant piquer les mammifères, y compris l'homme, [23] seraient à l'origine des épidémies de la fièvre du Nil occidental qui ont eu lieu en Tunisie en 1997 [64] et en 2003 [17] et en Algérie en 1994 [36]. Les populations ornithophiles étaient impliquées dans les épidémies survenues en Europe [69] et aux États-Unis [24]. Elles font circuler le virus entre les oiseaux (hôtes amplificateurs) et l'homme (ou les équidés) pendant les périodes de pics de densités de moustiques [11,49].

Inféodé également à un large spectre d'hôtes mammifères incluant les animaux domestiques et l'homme, *Cx. pipiens* a été fortement impliqué dans la transmission du virus de la fièvre de la vallée du Rift (FVR) en Égypte, durant une épizootie qui a eu lieu pour la première fois en dehors de l'Afrique subsaharienne en 1977 [25,45]. Ce virus est à l'origine d'une zoonose qui provoque des avortements chez les petits ruminants et la mort des jeunes animaux. La FVR est une arbovirose émergente vis-à-vis de laquelle la Tunisie devrait se préparer. Les échanges transfrontaliers non contrôlés des petits ruminants avec l'Algérie et la Libye (pays ayant des frontières communes avec des pays endémiques : la Mauritanie, le Mali et le Soudan), le comportement anthropozophile des populations de *Cx. pipiens*, la durée d'incubation extrinsèque relativement courte (inférieure à la durée du cycle gonotrophique de *Cx. pipiens*) [13,37] ainsi que l'abondance de *Cx. pipiens*, particulièrement dans les zones urbaines [33], sont autant d'éléments qui justifient la crainte d'introduction et d'établissement du virus de la FVR en Tunisie.

Le virus de la FVR appartient à la famille des Bunyaviridae et au genre *Phlebovirus*. Son génome est composé de trois segments d'ARN simple brin de polarité négative : le segment L (long ou *large*), le segment M (moyen ou *medium*) et le segment S (petit ou *small*). Le segment L code pour une ARN polymérase ARN dépendante, le segment M pour le précurseur des glycoprotéines d'enveloppe G_N et G_C et d'une protéine non structurale NS_m qui est a priori non essentielle pour le déroulement du cycle viral [18] et le segment S pour une nucléoprotéine N ainsi

qu'une protéine non structurale NSs fortement impliquée dans la virulence [19].

Les hôtes vertébrés peuvent être des mammifères sauvages (rongeurs) ou domestiques à l'instar des ovins chez lesquels le virus est susceptible de provoquer l'avortement des brebis gestantes et la mort des jeunes agneaux. Plus occasionnellement, l'homme peut, à son tour, être contaminé par le virus de la FVR manifestant un syndrome pseudogrippal accompagné par des troubles oculaires et neurologiques ou parfois, une encéphalite et une fièvre hémorragique.

Le virus de la FVR circule sur le continent africain au sein d'un cycle selvatique dont l'homme était exclu. Les changements liés à la domestication et à l'élevage du bétail ont favorisé l'émergence du virus, la survenue d'épizooties plus fréquentes et l'apparition de foyers où ont été observés les premiers cas humains. Le virus de la FVR a été décrit dès 1913 lors d'épizooties ovines, mais n'a été caractérisé et identifié qu'en 1931 au nord du lac Naivasha, dans la partie kenyane de la vallée du Rift lors d'une enzootie qui tua 3 500 agneaux et 1 200 brebis [8]. Considérée comme un problème essentiellement vétérinaire limité à la partie orientale et australe de l'Afrique, la FVR est sortie de son berceau d'origine en provoquant en Égypte, en 1977, une épizootie accompagnée des premiers cas humains (200 000 cas, 600 morts [43]). Le virus réapparaît sporadiquement : en 1987 en Mauritanie [70] et au Sénégal [73], en 1991 à Madagascar [46], en 1993 en Égypte [2], en 1997–1998 au Kenya, en Tanzanie, en Somalie [71], et en 1998 en Mauritanie [50]. En 2000, la FVR est signalée pour la première fois hors d'Afrique en Arabie Saoudite et au Yémen [29]. En 2007, des épizooties ont été observées en Afrique de l'Est (Kenya, Tanzanie et Somalie), et une circulation virale est confirmée dans l'océan Indien, dans l'archipel des Comores et, plus particulièrement, à Mayotte qui dispose d'un système de surveillance sanitaire performant [52]. En 2008, le virus de la FVR a été identifié au Soudan [53].

Le mode de transmission du virus de la FVR est complexe, faisant intervenir différentes espèces de moustiques vecteurs de bioécologie très contrastée. La circulation à bas bruit du virus semble être la règle comme l'atteste l'isolement répété du virus durant les périodes interépidémiques [44]. Les épizooties surviennent dès la mise en eau de certaines excavations naturelles dans les milieux selvatiques. Les moustiques (essentiellement de genre *Aedes* ou *Ochlerotatus*) ayant conservé le virus par transmission verticale [39,40] annoncent la circulation virale en contaminant les animaux sauvages. En se rapprochant de ces milieux naturels pour boire ou brouter, des animaux domestiques (bovins, buffles, ovins, caprins et camélidés) sont à leur tour contaminés à l'issue de piqûres d'*Aedes* infectés. Ils deviennent ainsi une source de contamination pour l'homme par contact direct, via l'émission d'aérosols lors de l'abattage des ani-

maux contaminés ou par piqûres de moustiques anthropozoophiles, du genre *Culex*, telles certaines populations de *Cx. pipiens* pouvant se nourrir conjointement sur les animaux d'élevage et sur l'homme.

Pour appréhender le rôle vectoriel du moustique le plus fréquent en Tunisie, *Cx. pipiens*, dans la transmission du virus de la FVR, deux aspects relatifs à la compétence vectorielle vis-à-vis de ce virus et à la différenciation génétique des populations ont été étudiés. Ces données seront d'une importance significative pour apprécier les risques épizootiques et/ou épidémiques en cas d'introduction du virus de la FVR en Tunisie.

Matériel et méthodes

Compétence vectorielle

Nous avons évalué la compétence vectorielle de différentes populations de *Cx. pipiens* de Tunisie, vis-à-vis du virus de la FVR, par infection artificielle en laboratoire [48]. Les femelles de moustiques sont issues des générations F0, F1 ou F2 de moustiques récoltés aux stades préimaginaux dans divers gîtes larvaires épigés (Tableau 1). Après 24 heures de jeûne, les femelles ont été infectées par repas artificiel contenant une des deux souches virales de FVR : ZH548 (souche virulente en raison d'une protéine NSs fonctionnelle à l'origine de la virulence) et Clone 13 (souche avirulente ayant subi une délétion à 70 % du gène exprimant la protéine NSs) (Tableau 2). Le repas est constitué de deux tiers d'érythrocytes de moutons, préalablement lavés au PBS (*phosphate buffered saline*) [47], mélangés à un tiers de suspension virale et à un phagostimulant, l'ATP à 5×10^{-3} M. Le titre viral dans le sang infecté est de $10^{8.5}$ UFP (unités formant plaque)/ml. Les femelles gorgées sont maintenues, pendant 14 jours, à 30 °C et à 80 % d'humidité relative. La détection du virus chez les femelles survivantes se fait par immunofluorescence indirecte sur squashes de tête.

Les tissus infectés apparaissent, sous microscope à épifluorescence, en vert fluorescent et les tissus non infectés en rouge grâce au bleu d'Evans [34]. Le nombre de femelles présentant une infection disséminée (avec le virus présent dans la tête témoignant d'une dissémination virale au-delà du tube digestif) rapporté au nombre total de femelles survivantes 14 jours après infection, correspond au taux d'infection disséminée qui est une mesure de la compétence vectorielle.

Structure génétique des populations

Les différentes populations d'une même espèce peuvent différer d'un point à l'autre de son aire de répartition. Cette variation géographique peut porter sur des caractères

Tableau 1 Échantillons de *Cx. pipiens* infectés expérimentalement par le virus de la fièvre de la vallée du Rift / *Samples of Cx. pipiens orally infected with Rift Valley fever virus*

Échantillon	Localité	Nature du gîte	Date	Génération testée
TAZE	Tazerka	Fossé de drainage aux eaux polluées	7/2006	F1
SKOR	Korba	Dépression se trouvant dans une sebka recevant en continu des eaux usées urbaines	7/2006	F1
OKOR	Korba	Oued passant par le centre de la ville et recevant des eaux usées urbaines	7/2005–2006	F1
KELB	Kelibia	Avaloir d'eau pluviale	7/2006	F0
KELL	Kelibia	Avaloir d'eau pluviale	7/2005–2006	F1
BOUA	Sidi Bouali	Oued recevant des eaux pluviales	7/2006	F2
CHOU	Choutrana (Ariana)	Fossé de drainage dans une station d'épuration des eaux usées	7/2005–2006	F1

Tableau 2 Taux d'infection disséminée de *Cx. pipiens* infectés expérimentalement avec deux souches virales de la fièvre de la vallée du Rift, ZH548 et Clone 13 / *Disseminated infection rates of Cx. pipiens orally infected with two strains of Rift Valley fever virus, ZH548 and Clone 13*

Échantillon	Localité	Taux d'infection disséminée en pourcentage (n)	
		ZH548	Clone 13
Cp13	Tazarka	2,8 (35)	0 (7)
Cp14	Korba	14,7(34)	14,7 (34)
Cp70	Korba	2,7 (110)	3,1 (130)
Cp71	Kelibia	0 (14)	0 (18)
Cp72	Kelibia	4,7 (85)	8,9 (79)
Cp80	Sidi Bouali	5,8 (52)	5,9 (68)
Cp81	Choutrana	2,4 (41)	2,1 (48)

n : nombre de moustiques.

morphologiques (coloration), physiologiques (viabilité et létalité), chromosomiques (inversions), écologiques [9,10,42] ou encore sur les fréquences de certains gènes neutres [27,38]. Pour estimer les flux des gènes au sein des populations de *Cx. pipiens*, on a eu recours aux microsatellites qui sont des marqueurs génétiques à évolution rapide.

Vingt-neuf échantillons de moustiques ont été prélevés entre mars 2005 et mai 2006, dans dix points de récolte, à ciel ouvert, répartis dans le Nord-Est (Manzel Jémil, Choutrana, Tazerka, Korba, Manzel Témime, Kélibia, Mansoura) et au Centre-Est (Sidi Bouali) de la Tunisie (Tableau 3). Les stades préimaginaux récoltés sont maintenus en insectarium dans des conditions contrôlées de température (22 à 27 °C), d'humidité (65 à 80 %) et de photopériode (12 h:12 h). Après leur émergence, les imagos sont identifiés grâce au logiciel d'identification des Culicidae de l'Afrique du Nord [4]. Les adultes de *Cx. pipiens* sont ainsi triés, puis

analysés au moyen de quatre microsattellites (GT4, GT9, GT46 et GT51) [30] dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau 4.

Analyse des données

Les taux d'infection disséminée ont été comparés en utilisant le test exact de Fisher.

La différenciation génétique entre les échantillons et les groupes d'échantillons de *Cx. pipiens* a été analysée à l'aide du logiciel Genepop version 4.0. Pour caractériser la différenciation génétique des populations, Wright (1931) [72] a défini le paramètre F_{ST} qui exprime l'effet de la subdivision entre les sous-populations et la population, et la mesure de la réduction d'hétérozygotie dans les sous-populations, liée aux différences de fréquences alléliques. F_{ST} correspond à un index de déviation par rapport aux proportions de Hardy-Weinberg. Il varie de 0 (absence de différenciation) à 1 (différenciation maximale). L'isolement par la distance est estimé à l'aide des coefficients de corrélation calculés entre la distance génétique ($F_{ST}/1-F_{ST}$) et le logarithme de la distance géographique qui sépare les échantillons pris deux à deux [58].

Résultats

Compétence vectorielle

Les résultats montrent que sur les sept échantillons infectés expérimentalement, six ont pu développer une infection disséminée avec la souche virale ZH548 et cinq avec la souche Clone 13. Les taux d'infection disséminée varient entre 0 (KELB) et 14,7 % (SKOR) avec la souche virulente ZH548 et entre 0 (KELB, TAZE) et 14,7 % (SKOR) avec la souche avirulente Clone 13. Quand on considère l'ensemble des échantillons testés vis-à-vis d'une même souche virale, aucune différence significative n'est détectée

Tableau 3 Échantillons du moustique *Cx. pipiens* récoltés entre 2005 et 2006 pour l'analyse de la différenciation génétique / *Samples of Cx. pipiens collected in 2005–2006 to analyse the population genetic differentiation*

Étage bioclimatique	Échantillon	Récolte			Type de gîte larvaire	Milieu
		Localité	Date	Saison		
Subhumide, à hiver doux	JEMI1	Menzil Jemil	03/2005	P	Dépression naturelle sur le bord du lac d'Ickeul	Périurbain
Subhumide, à hiver chaud	KELL1	Kelibia	06/2005	E	Avaloir d'eau pluviale	Urbain
	KELL2		08/2005	A		
	KELL3		09/2005	A		
	KELL4		05/2006	P		
	KELB1	Kelibia	06/2005	E	Avaloir d'eau pluviale	Urbain
	KELB2		11/2005	A		
	KELB3		05/2006	P		
	MAN1	Mansoura	12/2005	H	Dépression naturelle au bord de la plage	Périurbain
Semi-aride supérieur, à hiver doux	CHOU1	Choutrana	08/2005	E	Station d'épuration d'eaux usées	Urbain
	CHOU2		10/2005	A		
Semi-aride supérieur, avec hiver chaud	OKOR1	Korba	06/2005	E	Oued recevant des eaux usées domestiques et industrielles	Urbain
	OKOR2		11/2005	A		
	OKOR3		12/2005	H		
	OKOR4		05/2006	P		
	SKOR1	Korba	04/2005	P	Sebkha recevant des eaux usées et domestiques	Urbain
	SKOR2		06/2005	E		
	SKOR3		07/2005	E		
	SKOR4		08/2005	E		
	SKOR5		11/2005	A		
	SKOR6		02/2006	H		
	TAZE1	Tazerka	06/2005	E	Fossé de drainage à eaux usées	Urbain
	TAZE2		11/2005	A		
	TEMI1	Menzel Temin	03/2005	P	Dépression naturelle	Rural
	TEMI2		06/2005	E		
TEMI3	01/2006		H			
Semi-aride inférieur, à hiver doux	BOUA1	Sidi Bouali	05/2005	P	Oued recevant des eaux pluviales	Rural
	BOUA2		11/2005	A		
	BOUA3		01/2006	H		

P : printemps, E : été, A : automne, H : hiver.

($p = 0,21$ pour ZH548 et $p = 0,13$ pour Clone 13). Quand on compare, pour un même échantillon, les taux d'infection disséminée déterminés pour les deux souches virales, aucune différence significative n'est observée ($p > 0,05$).

Que la souche soit virulente ou avirulente, le taux d'infection disséminée est invariable. De même, aucune différence de compétence vectorielle n'est observée pour une même souche virale quelle que soit la provenance géographique de la population de *Cx. pipiens*.

Structure génétique des populations

Les résultats montrent une différenciation génétique qui est hautement significative ($p < 10^{-4}$) entre tous les échan-

tillons. Quand on considère les échantillons récoltés dans une même localité pendant différentes saisons, une différenciation hautement significative est constatée ($p < 10^{-4}$). Une différenciation significative ($p < 0,05$) est également observée quand on considère tous les échantillons récoltés pendant une saison donnée (printemps, été, automne ou hiver) (Tableau 5). La pente de la droite de régression (Spearman *rank correlation*) entre la différenciation génétique [$F_{ST}/(1-F_{ST})$] et la distance géographique séparant deux échantillons est négative ($b = -0,0005$), mais non significative ($p = 0,53$) (Fig. 1). Ce résultat indique une absence d'isolement génétique en fonction de la distance géographique qui sépare les échantillons distants entre 100 m et 150 km.

Tableau 4 Caractéristiques des microsatellites de <i>Cx. pipiens</i> testés / Characteristics of microsatellites in <i>Cx. pipiens</i>				
Locus Ta (C)	Séquence des amorces (5'→3')	Motifs microsatellite	Taille du fragment	
CxpGT4	F : GTCGTCGCTAACCTTGTT R : CGCGATAGTCGGTAATCGT ^a	(GT) ₅ (GTTT) ₂ GC(GT) ₂ CT(GT) ₅	139–153	54
CxpGT9	F : AATCTCCCCGTATAATTGTG R : TATAAGACCAGTGAAGCCAG ^a	(GT) ₁₃	108–142	52
CxpGT46	F : CCGACACCGTGTTCAAAGAG ^a R : TGACGACGACGGTACAAGAG	(TG) ₁₅	260–286	52
CxpGT51	F : GAGTATCGCTCGTTGGAGATT R : ACCCTCTTTCTTTCTATGTCTGT ^a	(TG) ₄ CG(TG) ₁₅	108–174	54

^a L'amorce est marquée par un marqueur fluorescent pour le génotypage à l'aide du séquenceur ABI Prism (GT4R par Ned, GT9R et GT46F par Hex, GT51R par fam ; Applied Biosystems).
Ta : température optimale d'appariement ; F : amorce directe (*forward primer*) ; R : amorce « anti-sens » (*reverse primer*).

Tableau 5 Différenciation génétique de <i>Cx. pipiens</i> récoltés en Tunisie en fonction de la saison et la localisation géographique / Genetic differentiation of <i>Cx. pipiens</i> collected in Tunisia according to season and geographic localisation of samples											
Échantillon	n	GT4		GT9		GT46		GT51		Tous les loci	
		F _{ST}	P	F _{ST}	P	F _{ST}	P	F _{ST}	P	F _{ST}	P
Tous les échantillons	29	0,088	< 10 ⁻⁴	0,167	< 10 ⁻⁴	0,249	< 10 ⁻⁴	0,066	< 10 ⁻⁴	0,130	< 10 ⁻⁴
Ville ou localité											
Kelibia	7	0,024	< 10 ⁻⁴	0,024	< 10 ⁻³	-0,022	0,700	0,097	< 10 ⁻⁴	0,036	< 10 ⁻⁴
KELL	4	0,024	< 10 ⁻⁴	0,024	< 10 ⁻³	-0,022	0,700	0,097	< 10 ⁻⁴	0,036	< 10 ⁻⁴
KELB	3	-0,002	0,618	0,195	< 10 ⁻⁴	0,442	< 10 ⁻⁴	0,093	< 10 ⁻⁴	0,230	< 10 ⁻⁴
Choutrana	2	0,019	0,098	0,006	0,089	0,645	< 10 ⁻⁴	0,015	0,162	0,121	< 10 ⁻⁴
Korba	10	0,097	< 10 ⁻⁴	0,174	< 10 ⁻⁴	0,159	< 10 ⁻⁴	0,069	< 10 ⁻⁴	0,117	< 10 ⁻⁴
OKOR	4	0,098	< 10 ⁻⁴	0,160	< 10 ⁻⁴	0,154	0,007	0,037	< 10 ⁻⁴	0,105	< 10 ⁻⁴
SKOR	6	0,093	< 10 ⁻⁴	0,220	< 10 ⁻⁴	0,142	0,145	0,105	< 10 ⁻⁴	0,135	< 10 ⁻⁴
Tazerka	2	0,043	< 10 ⁻⁴	0,059	< 10 ⁻⁴	0,241	0,001	0,063	0,004	0,067	< 10 ⁻⁴
Menzel Temin	3	0,078	< 10 ⁻⁴	0,243	< 10 ⁻⁴	0,271	< 10 ⁻⁴	0,095	< 10 ⁻⁴	0,178	< 10 ⁻⁴
Sidi Bouali	3	0,086	< 10 ⁻⁴	0,072	< 10 ⁻⁴	0,322	< 10 ⁻⁴	0,019	< 10 ⁻⁴	0,074	< 10 ⁻⁴
Saison											
Printemps	7	0,095	< 10 ⁻⁴	0,167	< 10 ⁻⁴	0,108	< 10 ⁻⁴	0,073	< 10 ⁻⁴	0,108	< 10 ⁻⁴
Été	9	0,109	< 10 ⁻⁴	0,221	< 10 ⁻⁴	0,326	< 10 ⁻⁴	0,063	< 10 ⁻⁴	0,165	< 10 ⁻⁴
Automne	8	0,016	0,003	0,037	< 10 ⁻⁴	0,418	< 10 ⁻⁴	0,064	< 10 ⁻⁴	0,063	< 10 ⁻⁴
Hiver	5	0,031	< 10 ⁻⁴	0,058	< 10 ⁻⁴	0,045	0,042	0,032	< 10 ⁻⁴	0,041	< 10 ⁻⁴

n : nombre de moustiques ; F_{ST} : indice de différenciation génétique ; P : probabilité : les valeurs significatives de P (< 0,05) sont en gras.

Discussion

Le moustique *Cx. pipiens* est l'espèce de moustiques la plus fréquente en Tunisie. En plus d'être responsable de nuisances, il est capable de transmettre divers agents pathogènes. Les deux épidémies de West Nile, survenues en Tunisie en 1997 et en 2003 en sont témoins [17,64]. En outre, l'abondance de *Cx. pipiens* et sa tendance à se nourrir, indistinctement, sur l'hôte le plus disponible, oiseaux ou mammifères y

compris l'homme [26,31,74], sont autant d'arguments en faveur d'un rôle potentiel de *Cx. pipiens* dans la transmission d'un autre arbovirus, le virus de la FVR.

La compétence vectorielle correspond à la capacité d'une espèce d'arthropodes à s'infecter artificiellement, c'est-à-dire à ingérer, répliquer et transmettre le virus en laboratoire. C'est un caractère sous contrôle génétique qui varie au sein d'une même espèce en fonction de l'origine géographique des populations du vecteur [21,63]. Cette variabilité

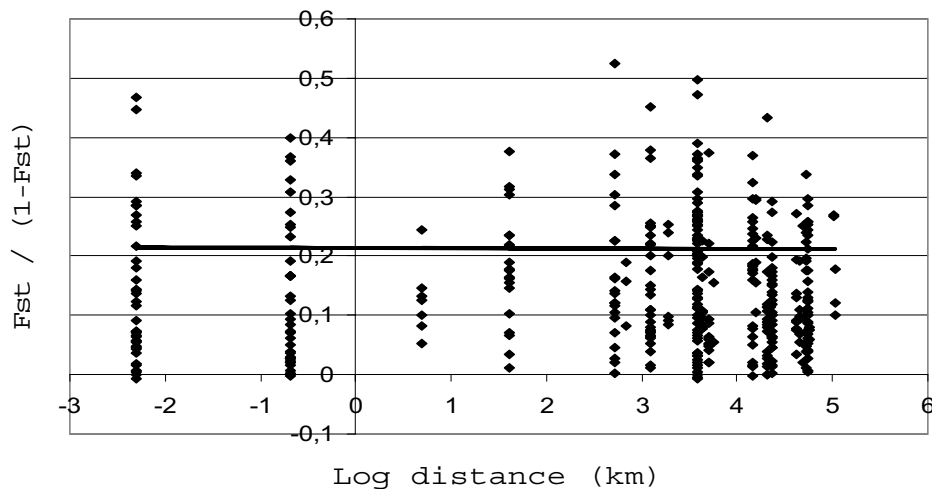


Fig. 1 Variations de différenciation $F_{ST}/(1-F_{ST})$ en fonction de la distance géographique séparant les échantillons de *Cx. pipiens* de Tunisie pris deux à deux / Relation between pairwise $F_{ST}/(1-F_{ST})$ values and the geographic distance for samples of *Cx. pipiens* collected in Tunisia

serait liée en partie à la densité de récepteurs présents dans l'épithélium intestinal de l'insecte et/ou à la capacité de réplication du virus chez l'hôte invertébré. Certaines populations de *Cx. pipiens* de Tunisie sont réceptives, en laboratoire, aux deux souches du virus de la FVR (ZH548 et Clone 13) avec des taux d'infection disséminée pouvant atteindre 14,7 %. *Cx. pipiens* est susceptible d'être impliqué dans une transmission de la FVR si le virus était introduit en Tunisie. La circulation transfrontalière peu contrôlée des petits ruminants entre la Mauritanie (où le virus est épisodiquement amplifié lors des épizooties) [50], le Mali (où le virus continue à circuler à bas bruit depuis la dernière épizootie en 2000), l'Algérie, la Libye et le Soudan (698 cas dont 222 mortels entre 2007 et 2008) [53] peut faire craindre une entrée d'animaux virémiques en Tunisie. Ces animaux peuvent être à l'origine d'une contamination de *Cx. pipiens* qui est très abondant dans les agglomérations [33].

Dans la nature, la possibilité de transmission d'un agent pathogène ne dépend pas uniquement de la compétence vectorielle, mais aussi de l'intensité des interactions entre le vecteur, le virus et l'hôte vertébré, conditionnée par divers facteurs tels que les densités du vecteur, sa distribution géographique, sa dispersion, sa longévité, la durée de son cycle gonotrophique et ses préférences trophiques. Il semble que tous ces facteurs étaient favorables pour permettre les épidémies de West Nile qui ont eu lieu en Afrique du Nord entre 1994 et 2003. En effet, des cas humains de West Nile ont été rapportés en Tunisie, en 1997, associés à une vingtaine de décès [64]. Une nouvelle épidémie moins sévère est apparue à nouveau en 2003 [17]. En Algérie, le même virus a été à l'origine du décès de huit enfants en 1994 [36]. Au Maroc, un cas d'encéphalite humaine a été confirmé en 1996 [12]. Le virus West Nile a probablement été introduit,

dans les pays du Maghreb, par des oiseaux migrateurs infectés pendant leur voyage transméditerranéen vers l'Afrique, en automne où des pluies très abondantes ont favorisé la pullulation de *Cx. pipiens* [11,49]. De plus, *Cx. pipiens* était impliqué dans la transmission de la FVR en Égypte en 1977, en infectant un large spectre d'hôtes mammifères incluant les animaux domestiques et l'homme [25,45]. *Cx. pipiens* est une espèce anthropozoophile, ubiquiste et abondante dans les milieux anthropisés en Tunisie [74]. Son potentiel de prolifération est élevé dans les eaux chargées en matières organiques, à l'abri de la prédation et de la concurrence interspécifique [33]. Par ailleurs, la durée d'incubation extrinsèque du virus de la FVR est inférieure à celle du cycle gonotrophique de *Cx. pipiens*, rendant possible la transmission virale après le premier repas sanguin [13,37]. Néanmoins, l'analyse de la différenciation génétique des populations et des flux de gènes indique que l'espèce se disperse peu. La disponibilité d'hôtes pour réaliser les repas sanguins et la présence de nombreux gîtes pour les pontes [61] pourraient expliquer le profil de différenciation observé. *Cx. pipiens* a une tendance marquée à pondre dans l'environnement immédiat de ses hôtes, après avoir digéré son repas sanguin, sans avoir besoin de s'éloigner de son site de reproduction [15,54,60,74]. La différenciation génétique, hautement significative, observée entre populations, a des implications épidémiologiques très importantes sur la transmission des agents pathogènes dont *Cx. pipiens* est vecteur. Elle témoigne d'un faible flux de gènes entre populations et suggère, par conséquent, des mouvements de populations très limités. Ainsi, les animaux qui arriveraient en Tunisie durant leur phase de virémie pourraient être à l'origine d'une transmission locale du virus de la FVR au vu des densités de populations de *Cx. pipiens* et des niveaux de

compétence vectorielle mesurée en laboratoire. Cependant, la dispersion des moustiques porteurs de virus serait restreinte compte tenu des échanges génétiques limités mis en évidence. Ainsi, la surveillance de la circulation du virus de la FVR passe obligatoirement par le contrôle de l'état sanitaire du bétail.

Conclusion

La forte différenciation génétique entre les populations de *Cx. pipiens* analysées par des approches de génétique de populations montre que ce Culicidae n'est pas capable de disséminer le virus de la FVR à partir de son point d'entrée, malgré la réceptivité de certaines d'entre elles à l'infection orale par cet agent pathogène en laboratoire. Par conséquent, la dissémination du virus à partir d'un éventuel foyer contaminé ne pourrait se faire qu'à la faveur des déplacements de petits ruminants et des dromadaires infectés ou par la dispersion d'autres espèces de moustiques telles que *Ochlerotatus caspius* et *O. detritus* qui sont réceptives à l'infection par le virus de la FVR [48] et capables de se disperser sur des longues distances, au-delà de 20 km [28]. Par conséquent, une surveillance entomologique et un contrôle du bétail devraient être maintenus pour prévenir tout risque d'introduction du virus de la FVR en Tunisie.

Remerciements Nous souhaitons remercier Sylvain Brisse, responsable de la plateforme « génotypage des pathogènes et santé publique » à l'institut Pasteur pour nous avoir permis de bénéficier des infrastructures de génotypage, Michèle Bouloy, chef de l'unité de génétique moléculaire des Bunyavirus pour avoir encouragé cette étude et aux directeurs de l'institut Pasteur de Tunis, M. Abdeladhim Abdeladhim et M. Hechmi Louzir, pour leur soutien constant à l'entomologie médicale. Ce projet a été financé par la direction des affaires internationales de l'institut Pasteur (AC-2004 and A-25-2006). GK a bénéficié d'une bourse de la Fondation jeunesse internationale.

Conflit d'intérêt : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

- Apperson CS, Harrison BA, Unnasch TR, et al (2002) Host-feeding habits of *Culex* and other mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the borough of Queens in New York City, with characters and techniques for identification of *Culex* mosquitoes. *J Med Entomol* 39(5):777–85
- Arthur RR, El Sharkawy MS, Cope SE, et al (1993) Recurrence of Rift Valley Fever in Egypt. *Lancet* 342(8880):1149–50
- Brownie J, Shawcross S, Theaker J, et al (1997) The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res* 25(16):3235–41
- Brunhes J, Rhaïem A, Geoffroy B, Hervy JP (2000) Les moustiques de l'Afrique méditerranéenne. Logiciel d'identification et d'enseignement. IRD et IPT, CD-ROM Collection didactique IRD Éditions, Montpellier, France
- Byrne K, Nichols R (1999) *Culex pipiens* in London underground tunnels: differentiation between surface and subterranean populations. *Heredity* 82(Pt1):7–15
- Dahl C (1988) Taxonomic studies on *Culex pipiens* and *Cx. torrentium*. *Biosystematics of Haematophagous insects*. Oxford Systematics Association, Oxford, pp 149–75
- Dancesco P, Chadli A, Kchouk M, Horac M (1975) À propos d'un biotope saisonnier hivernal *autogenicus*. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 68(5):503–8
- Daubney R, Hudson JR, Garnham PC (1931) Enzootic hepatitis or Rift Valley Fever: an undescribed virus disease of sheep, cattle and man from East Africa. *J Pathol Bacteriol* 34:545–9
- Dobzhansky T (1937) *Genetics and the Origin of Species*. In: *The Columbia classics in evolutionary series*. Columbia Univ. Press, New York, 364 p
- Dobzhansky T, Pavan C (1943) Studies on Brazilian species of *Drosophila*. *Bolm Fac Filos Cienc S Paulo* 36: 7–72
- Durand JP, Simon F, Tolou H (2004) Virus West Nile : à nouveau en France chez l'homme et les chevaux. *Rev Prat* 54(7):703–10
- El Harrak M, Le Guenno B, Gounon P (1997) Isolement du virus West Nile au Maroc. *Virologie* 1:248–9
- Faraj C, Elkohli M, Lyagoubi M (2006) Cycle gonotrophique de *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae), vecteur potentiel du virus West Nile, au Maroc : estimation de la durée en laboratoire. *Bull Soc Pathol Exot* 99(2):119–21 [http://www.pathexo.fr/documents/articles-bull/T99-2-2846-3p.pdf]
- Farid HA, Hammad RE, Hassan MM, et al (2001) Detection of *Wuchereria bancrofti* in mosquitoes by the polymerase chain reaction: a potentially useful tool for large-scale control programmes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95(1):29–32
- Fonseca DM, Keyghobadi N, Malcolm CA, et al (2004) Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science* 303(5663):1535–8
- Fonseca DM, LaPointe DA, Fleischer RC (2000) Bottlenecks and multiple introductions: population genetics of the vector of avian malaria in Hawaii. *Mol Ecol* 9(11):1803–14
- Garbouj M, Bejaoui M, Aloui H, Ben Ghorbal M (2003) La maladie du Nil occidental. *Bull Epidemiol* 3:4–6
- Gerrard SR, Bird BH, Albariño CG, Nichol ST (2007) The NSm proteins of Rift Valley fever virus are dispensable for maturation, replication and infection. *Virology* 359(2):459–65. (Epub 2006 Oct 30)
- Giorgi C, Accardi L, Nicoletti L, et al (1991) Sequences and coding strategies of the S RNAs of Toscana and Rift Valley fever viruses compared to those of Punta Toro, Sicilian Sandfly fever, and Uukuniemi viruses. *Virology* 180(2):738–53
- Gomes B, Sousa CA, Novo MT, et al (2009) Asymmetric introgression between sympatric *molestus* and *pipiens* forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in the Comporta region, Portugal. *BMC Evol Biol* 9:262
- Gubler DJ, Nalim S, Tan R, et al (1979) Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 28(6):1045–52
- Harbach RE, Harrison BA, Gad AM (1984) *Culex molestus* Forskål (Diptera: Culicidae): neotype designation, description, variation and taxonomic status. *Proc Entomol Soc Wash* 86:521–42
- Hamer GL, Walker ED, Brawn JD, et al (2008) Rapid amplification of West Nile virus: the role of hatch-year birds. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8(1):57–67

24. Hayes CG (2001) West Nile virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999. *Ann N Y Acad Sci* 951:25–37
25. Hoogstraal H, Meegan JM, Khalil GM, Adham FK (1979) The Rift Valley fever epizootic in Egypt 1977–1978. 2. Ecological and entomological studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73 (6):624–9
26. Huang S, Hamer GL, Molaei G, et al (2009) Genetic variation associated with mammalian feeding in *Culex pipiens* from a West Nile virus epidemic region in Chicago, Illinois. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9(6):637–42
27. Hubby JL, Lewontin RC (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54(2):577–94
28. Juminer B, Kchouk M, Rioux JA, Ben Osman F (1964) À propos des culicidés vulnérants de la banlieue littorale de Tunis. *Arch Inst Pasteur Tunis* 41(2):23–32
29. Jup PG, Kemp A, Grobelaar A, et al (2002) The 2000 epidemic of Rift Valley fever in Saudi Arabia: mosquito vector studies. *Med Vet Entomol* 16(3):245–52
30. Keyghobadi N, Matrone M, Ebel GD, et al (2004) Microsatellite loci from the northern house mosquito (*Culex pipiens*), a principal vector of West Nile virus in North America. *Mol Ecol Notes* 4:20–22
31. Kilpatrick AM, Daszak P, Jones MJ, et al (2006) Host heterogeneity dominates West Nile virus transmission. *Proc Biol Sci* 273 (1599):2327–33
32. Kilpatrick AM, Kramer LD, Jones MJ, et al (2007) Genetic influences on mosquito feeding behavior and the emergence of zoonotic pathogens. *Am J Trop Med Hyg* 77(4):667–71
33. Krida G, Rhaïem A, Bouattour A (1997) Effet de la qualité des eaux sur l'expression du potentiel biotique du moustique *Culex pipiens* L. dans la région de Ben Arous (sud de Tunis). *Bull Soc Entomol France* 102(2):143–50
34. Kuberski TT, Rosen L (1977) A simple technique for the detection of dengue antigen in mosquitoes by immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* 26(3):533–7
35. Laven H (1951) Crossing experiments with *Culex* strains. *Evolution* 5:310–75
36. Le Guenno B, Bougermouh A, Azzam T, Bouakaz R (1996) West Nile: a deadly virus? *Lancet* 348(9037):1315
37. Lee DS, Yoon HK, Kim HS, Lee KW (1970) Studies on the life cycle of *Culex pipiens pallens* in Korea. *Kisaengchunghak Chaphchi* 8(1):36–8
38. Lewontin RC, Hubby JL (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54(2):595–609
39. 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(4796):1656–9
40. Linthicum KJ, Davies FG, Kairo A, Bailey CL (1985) Rift Valley fever virus (family Bunyaviridae, genus *Phlebovirus*). Isolations from Diptera collected during an inter-epizootic period in Kenya. *J Hyg (Lond)* 95(1):197–209
41. Mattingly PF, Rozeboom LE, Knight KL, et al (1951) The *Culex pipiens* complex. *Trans Roy Ent Soc London* 102:331–82
42. Mayr E (1942) *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York
43. Meegan JM (1979) The Rift Valley fever epizootic in Egypt 1977–1978. 1. Description of the epizootic and virological studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73(6):618–23
44. Meegan JM, Bailey CL (1988) Rift Valley fever. In: Monath TP (ed) *The arboviruses: epidemiology and ecology*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 61–76
45. Meegan JM, Khalil GM, Hoogstraal H, Adham FK (1980) Experimental transmission and field isolation studies implicating *Culex pipiens* as a vector of Rift Valley fever virus in Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 29(6):1405–10
46. Morvan J, Rollin PE, Laventure S, et al (1992) Rift Valley fever epizootic in the central highlands of Madagascar. *Res Virol* 143 (6):407–15
47. Moutailler S, Bouloy M, Failloux AB (2007) Short report: efficient oral infection of *Culex pipiens quinquefasciatus* by Rift Valley fever virus using a cotton stick support. *Am J Trop Med Hyg* 76(5):827–9
48. Moutailler S, Krida G, Schaffner F, et al (2008) Potential vectors of Rift Valley Fever virus in the Mediterranean Region. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8(6):749–53
49. Murgue B, Murri S, Zientara S, et al (2001) West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis* 7(4):692–6
50. Nabeth P, Kane Y, Abdalahi MO, et al (2001) Rift Valley fever outbreak, Mauritania, 1998: seroepidemiologic, virologic, entomologic, and zoologic investigations. *Emerg Infect Dis* 7 (6):1052–4
51. Nudelman S, Galun R, Kitron U, Spielman A (1988) Physiological characteristics of *Culex pipiens* populations in the middle East. *Med Vet Entomol* 2(2):161–9
52. OMS (2007) Fièvre de la vallée du Rift dans l'Union des Comores. *Bull Hebdo Int n°1036*
53. OMS (2008) Fièvre de la Vallée du Rift au Soudan. *Bull Epidemiol Hebdo n°5*
54. Richards AG (1941) Differentiation between toxic and suffocating effects of petroleum oils on larvae of the house mosquito (*Culex pipiens* L.) [Diptera]. *Trans Am Entomol Soc* 67:161–96
55. Rioux JA, Juminer B, Kchouk M, Crosset H (1965) Présence du caractère autogène chez *Culex pipiens pipiens* L. dans un biotope épigé de l'Île de Djerba. *Arch Inst Pasteur Tunis* 42:1–8
56. Roubaud E (1933) Essai synthétique sur la vie du moustique commun *Culex pipiens* (L.). *Ann Sc Nat Bot Zool* 16: 165–168
57. Roubaud E (1939) Le pouvoir autogène chez le biotype nord-africain du moustique commun *Culex pipiens* (L.). *Bull Soc Pathol Exot* 32:172–5
58. Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145 (4):1219–28
59. Smith JL, Fonseca DM (2004) Rapid assays for identification of members of the *Culex* (*Culex*) *pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg* 70(4):339–45
60. Spielman A (2001) Structure and seasonality of Nearctic *Culex pipiens* populations. *Ann NY Acad Sci* 951:220–34
61. Subra R (1982) The distribution and frequency of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say 1823 (Diptera, Culicidae) breeding places on the Kenya Coast in relation to human sociological factors. *J Trop Med Hyg* 85(2):57–61
62. Tempelis CH (1975) Host-feeding patterns of mosquitoes, with a review of advances in analysis of blood meals by serology. *J Med Entomol* 11(6):635–53
63. Tesh RB, Gubler DJ, Rosen L (1976) Variation among geographic strains of *Aedes albopictus* in susceptibility to infection with chikungunya virus. *Am J Trop Med Hyg* 25(2):326–35
64. Triki H, Murri S, Le Guenno B, et al (2001) Méningoencéphalite à arbovirus West Nile en Tunisie. *Med Trop* 61(6):487–90
65. Tsai TF, Mitchell CJ (1989) St Louis encephalitis. In: Monath TP (ed) *The arboviruses: epidemiology and ecology*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 113–43
66. Turell MJ, O'Guinn ML, Dohm DJ, Jones JW (2001) Vector competence of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. *J Med Entomol* 38(2):130–4

67. Vermeil C (1954) Nouvelle contribution à l'étude du complexe *Culex pipiens* en Tunisie. Bull Soc Pathol Exot 47:841-3
68. Villani F, Urbanelli S, Gad A, et al (1986) Electrophoretic research on populations of Egyptian and Israeli *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae). Ann Ist Super Sanita 22(1):373-5
69. Vinogradova EB (2000) Mosquitoes *Culex pipiens pipiens*: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control. Pensoft Publishers, Sofia, 280 p
70. Walsh J (1988) Rift Valley fever rears its head. Science 240 (4858):1397-9
71. Woods CW, Karpati AM, Grein T, et al (2002) An outbreak of Rift Valley Fever in Northeastern Kenya, 1997-1998. Emerg Infect Dis 8(2):138-44
72. Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. Genetics 16(2):97-159
73. Zeller HG, Fontenille D, Traore-Lamizana M (1997) Enzootic activity of Rift Valley fever virus in Senegal. Am J Trop Med Hyg 56(3):265-72
74. Zimmerman JH, Hanafi HA, Abbassy MM (1985) Host-feeding patterns of *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) on farms in Gharbiya Governorate, Egypt. J Med Entomol 22(1):82-7