

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE DE SAAD DAHLAB BLIDA 01



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologie et Agroécologie

**Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Master2**

**Option : Biotechnologie microbienne**

**Thème**

---

***La séroprévalence des phlébovirus  
dans la région Est d'Alger***

---

Présenté par : Melle. CHEBAB Hadia et Melle. MECHOUCHE Ayaterrahmane

**Devant le jury composé de :**

Mme. Toua D	MAA	USDB1	Présidente
Mme. Yala	Docteur	USDB1	Examinatrice
Mme. Bouredjoul N	MCR	IPA	Promotrice
Mme. Benoussaid N	MCB	USDB1	Co-promotrice

Date de soutenance : 13/07/2022

**Année universitaire : 2021/2022**

## Remerciements

*En préambule à ce mémoire, nous remercions ALLAH qui nous a aidé et donné la patience et le courage durant cette longue année d'étude.*

*Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères à notre promotrice **Dr. Nesrine BOUREDJOUL** Pour sa disponibilité tout en long de la réalisation de ce Mémoire. Ainsi pour son inspiration, aide et son suivi.*

*Nous tenons également à adresser nos remerciements à **Mme. Benoussaid** pour le soutien qu'elle nous a apporté afin de mener à bien notre travail.*

*Nos remerciements s'adressent également aux membres du jury **Mme. Ammad & Mme. Toua**, qui ont accepté d'examiner ce travail.*

*Nos remerciements vont par ailleurs à **Dr. HACHID.A** le responsable de laboratoire pour nous avoir accueillis dans son "Laboratoire des Arbovirus et des Virus émergents" à l'Institut Pasteur de Sidi Fredj. Ainsi que toutes les personnes de ce Service, spécialement **Mme. TEMANI.M, Mr. KHARDINE. F, Mr. AMIRAT**, qui nous ont conseillés et qui ont été présents tout au long de notre stage.*

*À tous nos enseignants durant les années des études, spécialement **Pr. KRIMI.Z** et **Pr.BENCHABANE.M***

*Nos remerciements s'étendent également aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce Mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.*

## *Dédicaces*

*C'est avec profonde gratitude et sincères mots, je dédie ce travail :*

*À ma famille, elle qui ma doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui, particulièrement à mes chers parents, qui ont sacrifié leur vie pour ma réussite et m'ont éclairé le chemin par leurs conseils judicieux. À ma sœur et mes frères pour leurs encouragements*

*A ma chère grand-mère, mes tantes, mes oncles, mes cousins et à Toute ma famille. Que dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur*

*À mon binôme pour son entente et sa sympathie*

*Enfin, j'voudrais exprimer ma reconnaissance envers mes amis et collègues qui m'ont apporté leur soutien moral et inconditionnel tout au long de ma démarche.*

*Ayaterrahmane*

*J'è dédie ce travail :*

*À la mémoire de mon oncle Mustapha*

*Le plus brave des hommes, décédé trop tôt, que dieu l'accueille dans son éternel paradis*

*À ma très chère famille, qui n'ont jamais cessé de croire en moi et de m'encourager tout au long de mes études, et leur soutien moral. J'è vous dédie ce travail en signe de ma sincère gratitude et de mon respect indéfectible en ce jour spécial.*

*Hadia*

## Résumé

Les phlébovirus sont des virus transmis par les phlébotomes qui se répandent dans le monde entier, provoquant soit une maladie fébrile légère appelée "fièvre phlébotomine", soit une maladie neuroinvasive plus grave.

Pour étudier la circulation des virus du groupe de la fièvre du phlébotome dans la région Est d'Alger, plus précisément la Daira Rouïba et ses communes voisines (Ain Taya, Boudouaou) une étude de séroprévalence a été menée dans la population de cette région. Au total, 155 échantillons de sérum de patients asymptomatiques qui se sont présentés au niveau de l'hôpital de Rouïba ont été testés pour la recherche d'anticorps IgG contre les virus de la fièvre du phlébotome. Une technique ELISA maison indirecte a été utilisée pour déterminer les sérums positifs. Ceux-ci ont ensuite été testés par une technique d'immunofluorescence indirecte à partir d'un kit commercial pour déterminer le sérotype.

10,96% de 155 sérums étaient positifs pour les IgG anti-phlébovirus, après confirmation par IFI, une prévalence effective du TOSV de 7,09% et SFNV 1,29% ont été obtenus, indiquant que la zone de recherche est considérée comme une zone d'endémicité moyenne pour ces virus.

Après avoir effectué une analyse statistique à l'aide du logiciel SPSS pour le calcul et la comparaison des différentes séroprévalences obtenues en fonction des différents facteurs de risque étudiés. Comme résultats obtenus, aucune différence statistique significative n'a pu être observée chez les différents citoyens des deux sexes avec des âges différents, le type de résidence, ainsi que leurs professions qu'il s'agisse d'une activité en extérieur ou en intérieur.

Mots clés : phlébovirus ; circulation ; IFI ; sérologie ; ELISA ; virus Toscana

## **Abstract**

Phleboviruses are phlebotomine-transmitted viruses that spread worldwide, causing either a mild febrile disease called "phlebotomine fever" or a more serious neuroinvasive disease.

To study the circulation of the phlebotomine fever group of viruses in the eastern region of Algiers, more precisely the Daïra Rouïba and its neighboring communes (Ain Taya, Boudouaou) a seroprevalence study was conducted in the population of this region. A total of 155 serum samples of asymptomatic patients who presented to the hospital of Rouïba were tested for IgG antibodies against sandfly fever viruses. An indirect in-house ELISA technique was used to determine the positive sera. These were then tested by an indirect immunofluorescence technique from a commercial kit to determine the serotype.

10.96% of 155 sera were positive for anti-phlebovirus IgG, after confirmation by IFI, an effective prevalence of TOSV of 7.09% and SFNV 1.29% were obtained, indicating that the research area is considered to be a medium endemicity area for these viruses.

After performing a statistical analysis using SPSS software for the calculation and comparison of the different seroprevalences obtained according to the different risk factors studied. As results obtained, no significant statistical difference could be observed in the different citizens of both sexes with different ages, type of residence, as well as their occupations whether it was an outdoor or indoor activity.

**Keywords:** phlebovirus; circulation; IFI; serology; ELISA; Toscana virus

## الملخص

الفيروسات الوريديّة هي فيروسات تنتقل عن طريق الفصد وتنتشر في جميع أنحاء العالم ، وتسبب إما مرض حمى خفيف "حمى الفاصدة" أو مرض عصبي أكثر خطورة يسمى

لدراسة انتشار مجموعة فيروسات حمى الفالوتومين في المنطقة الشرقية من الجزائر العاصمة ، وبالتحديد الضيرة الروبية والكوميونات المجاورة لها (عين طاية ، بودواو) أجريت دراسة الانتشار المصلي في سكان هذه المنطقة. تم اختبار إجمالي 155 عينة مصل من المرضى الذين لم تظهر عليهم أعراض والذين قدموا إلى مستشفى الروبية بحثاً عن الأجسام المضادة غير المباشرة في المنزل لتحديد الأمصال الإيجابية. ثم تم التآلق المناعي غير ضد فيروسات حمى الرمل. تم استخدام تقنية المباشرة من مجموعة تجارية لتحديد النمط المصلي

تم الحصول على انتشار فعال لـ IFI بعد تأكيد من IgG، من 155 سيرا كانت إيجابية لمضادات الفيروس الفيروسي %10.96. مما يشير إلى أن مجال البحث يعتبر منطقة متوسطة التوطن لهذه الفيروسات، %1.29 SFNV بنسبة %7.09 و TOSV لحساب ومقارنة التباينات المصلية المختلفة التي تم الحصول عليها وفقاً SPSS بعد إجراء تحليل إحصائي باستخدام برنامج لعوامل الخطر المختلفة المدروسة. كما تم الحصول على النتائج لم يلاحظ وجود فروق ذات دلالة إحصائية في مختلف المواطنين من كلا الجنسين باختلاف الأعمار ونوع الإقامة وكذلك المهنة سواء كانت نشاطاً خارجياً أو داخلياً

الكلمات المفتاحية: الفيروس الوريدي. تداول؛ الأمصال. إيزا. فيروس توسكانا

## Tables des matières :

Résumé .....	iv
Abstract.....	v
المخلص .....	vi
Tables des matières : .....	vii
Liste des figures: .....	viii
Liste des tableaux:.....	x
Liste des abréviations .....	x
Introduction.....	1
<b>Chapitre I_Synthèse bibliographique .....</b>	<b>3</b>
I.1. Les phlébovirus .....	4
I.1.1 Historique .....	4
I.1.2 Découverte des phlébovirus transmis par les phlébotomes .....	5
I.1.3 Taxonomie .....	6
I.1.4 Structure et génome : .....	7
I.1.4.1 Réplication.....	8
I.1.4.2 Réassortiment viral.....	9
I.1.4.3 Lignage .....	9
I.1.5 Caractères physico-chimiques des phlébovirus : .....	11
I.2 Les vecteurs : les phlébotomes : .....	11
I.2.1 Morphologie : .....	12
I.2.2 Développement et cycle de vie.....	13
I.2.3 Préférence d'habitat .....	14
I.2.4 Comportement alimentaire des phlébovirus adultes .....	14

I.3	Epidémiologie du virus.....	15
I.3.1	Épidémiologie et transmission des agents pathogènes :.....	16
I.3.2	Distribution géographique de la fièvre des phlébotomes :.....	16
I.3.3	Entretien et transmission :.....	17
I.3.4	Distribution géographique des phlébovirus transmis par les phlébotomes : .....	18
I.3.5	Effets des changements globaux sur les agents pathogènes transmis par les phlébotomes .....	22
I.4	Interaction entre le virus et l'hôte .....	22
I.4.1	Pouvoir pathogène et hormonogène .....	22
I.4.2	Cellules dendritiques comme portail d'accès pour les phlébovirus .....	23
I.4.3	Effets de la réplication virale sur les cellules hôtes .....	23
I.5	Manifestations cliniques .....	24
I.6	Méthodes de détection des phlébovirus et de leurs infections .....	25
I.6.1	<b>Diagnostic direct</b> .....	<b>25</b>
I.6.2	<b>Diagnostic indirect</b> .....	<b>25</b>
I.7	Traitement .....	26
I.8	Prévention .....	27
	<b>Chapitre II : Matériels et méthodes .....</b>	<b>30</b>
II.1	Présentation de la zone d'étude.....	31
II.2	Description de la population d'étude.....	31
II.3	Matériel .....	31
II.3.1	Matériel biologique.....	31
II.3.2	Matériel non-biologique.....	32
II.4	Méthode d'étude .....	32
II.4.1	Phase pré-analytique.....	32
II.4.2	Phase analytique .....	33
II.4.3	Test immunofluorescence indirecte pour la détection des anticorps anti-Sandfly Fever Virus Mosaic 1 type IgG (Euroimmun®) .....	37
II.5	Analyse statistique .....	40
	<b>Chapitre III : résultatset discussion .....</b>	<b>41</b>

III.1	Résultats.....	42
III.1.1	Test ELISA maison indirecte.....	42
III.1.2	Test immunofluorescence indirecte.....	42
III.1.3	Séroprévalence globale des Ac anti-phlébovirus.....	42
III.1.4	Répartition de la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus a Rouïba et ses communes.....	43
III.1.5	Répartition de la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus selon le sexe .....	44
III.1.6	Répartition de la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus selon le type de résidence .....	44
III.1.7	Répartition de la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus selon l'âge .....	45
III.2	Discussion.....	47
	Conclusion .....	50
	Annexe A .....	61
	Annexe B .....	64

## Liste des Figures :

<b>Figure 1:</b> schéma représentatif de particule phlébovirale .....	7
<b>Figure 2:</b> Un schéma qui représente la composition des différents segments du génome des phlébovirus .....	8
<b>Figure 3:</b> Cycle de réplication des phlébovirus .....	9
<b>Figure 4:</b> Analyse phylogénétique du virus Toscana (TOSV) basée sur le gène de la protéine de la nucléocapside. L'analyse du maximum de vraisemblance au niveau des nucléotides a été réalisée à l'aide du logiciel MEGA 6.06.....	10
<b>Figure 5:</b> Mouche de sable, <i>Phlebotomus papatasi</i> , femelle se nourrissant d'un être humain.....	12
<b>Figure 6:</b> Morphologie d'un phlébotome adulte vue au microscope optique G 100 .....	13
<b>Figure 7:</b> Cycle de vie d'un phlébotome (Elevage de <i>P. duboscqi</i> ).....	14
<b>Figure 8:</b> Mouches des sables femelles <i>Phlebotomus papatasi</i> prenant un repas de sang sur la queue d'une souris.....	15
<b>Figure 9:</b> Cycle de transmission des phlébovirus transmis par les phlébotomes.....	18
<b>Figure 10:</b> carte géographique représente les pays où des données sont disponibles pour la séroprévalence, la détection par PCR et l'isolement des virus appartenant à l'espèce Sandfly fever Naples.....	19
<b>Figure 11:</b> Carte géographique représente les pays où des données sont disponibles sur la séroprévalence, la détection par PCR et l'isolement du virus pour les virus appartenant au sérocomplexe sicilien de la fièvre des phlébotomes.....	19
<b>Figure 12:</b> Carte géographique représente les pays où des données sont disponibles sur la séroprévalence, la détection par PCR et l'isolement du virus pour les virus Toscana de la fièvre des phlébotomes.....	20
<b>Figure 13:</b> Étapes bioclimatiques de la région du Maghreb .....	20
<b>Figure 14:</b> Mesures de prévention du contrôle des arboviroses .....	29
<b>Figure 15:</b> Schéma représentatif des différentes étapes dans la partie expérimentale. ....	32
<b>Figure 16 :</b> Principe du test ELISA indirecte.....	33
<b>Figure 17 :</b> vue au microscope à fluorescence d'un sérum positif IgG anti-phlébovirus (sérotypage TOSV) Gx40 .....	42
<b>Figure 18:</b> histogramme représentatif de la distribution de la séroprévalence totale des IgG anti- Phlébovirus dans la région Est d'Alger. ....	43
<b>Figure 19:</b> Distribution de la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus à Rouïba et ses communes.....	43
<b>Figure 20:</b> Distribution de la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus selon le sexe.....	44
<b>Figure 21:</b> Distribution de la séroprévalence des IgG anti- phlébovirus selon le type de résidence. ....	44
<b>Figure 22:</b> Distribution de la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus selon l'âge. ....	45
<b>Figure 23:</b> Distribution de la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus selon le type de profession. ....	46

## Liste des tableaux :

**Tableau 1:** exemple de la demi-plaque ELISA de notre expérimentation.....37

## Liste des figures

## Liste des abréviations

**Ag :** Antigène

**ARN :** Acide ribonucléique

**ARNm :** Acide ribonucléique messenger

**ARNc :** Acide ribonucléique complémentaire

**CD :** cellule dendritique

**DO :** Densité Optique

**DC-SIGN:** dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin

**ELISA:** Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

**EP :** endosome précoce ;

**EPH:** Etablissement Public Hospitaliers

**ET :** endosome tardif ;

**MP :** membrane plasmique

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> :** Acide sulfurique

**H<sub>2</sub>O :** monoxyde de dihydrogène

**IgG :** Immunoglobuline de type G

**IgM :** Immunoglobuline de type M

**IFI :** Immunofluorescence Indirecte

**NaOH :** Hydroxyde de sodium

**PBS:** Phosphate Buffered Saline

**PRNT:** Plaque reduction neutralization test

**SFCV** : Sandfly Fever Cyprus Virus

**SFNV** : Sandfly Fever Naples Virus

**SFSV** : **Sandfly Fever Sicilian Virus**

**TOSV** : Toscana virus

## Introduction

Les infections à transmission vectorielle représentent plus d'un quart de l'ensemble des maladies infectieuses humaines. Ces maladies, qui sont causées par des agents pathogènes tels que les virus, sont devenues une préoccupation croissante pour la santé mondiale (Viglietta et *al.*, 2021).

Les agents pathogènes humains du groupe sandfly fever (cause de maladie fébrile "fièvre du phlébotome", maladies neuro-invasives) sont classés comme appartenant à l'un des deux complexes sérologiques : la fièvre du phlébotome sicilien, la fièvre du phlébotome de Naples. Les données issues des études de séroprévalence sur les humains ont révélé que ces virus sont assez actifs en circulation, en particulier le virus Toscana, montrant ainsi que les phlébovirus sont répandus dans une vaste zone géographique (Ayhan et *al.*, 2018).

Dans l'Ancien Monde, ils sont véhiculés par les mouches phlébotomes, largement répandues dans le bassin méditerranéen, l'Afrique du Nord, le sous-continent indien, le Moyen-Orient et l'Asie centrale. Des taux de séroprévalence élevés ont été enregistrés chez les humains et les animaux domestiques dans les zones où les phlébotomes sont présents (Alkan et *al.*, 2013).

Les études sur la diversité génétique de la circulation des virus transmis par les arthropodes peuvent fournir des signes d'alerte précoce cruciaux de nouveaux virus émergents, ce qui est essentiel pour la préparation aux épidémies mondiales (Viglietta et *al.*, 2021).

En dehors des quelques études séro-épidémiologiques menées dans le nord de l'Algérie, qui ont mis en évidence des anticorps contre les virus de Sicile et de Naples, il existe très peu de données sur la distribution des phlébovirus à travers le pays. Les informations génétiques et sérologiques issues des recherches précédentes, lorsqu'elles sont combinées, apportent la preuve de l'existence des phlébovirus en Algérie (Izri et *al.*, 2008 ; Moureau et *al.*, 2010).

L'objectif de notre travail est de déterminer le taux de prévalence des anticorps anti- phlébovirus dans la région Est d'Alger en réalisant une enquête sérologique dans la population en suivant deux étapes :

- ⇒ Détermination de la prévalence des anticorps IgG anti-phlébovirus dans des échantillons de sérum humain par la technique ELISA indirecte.
- ⇒ Confirmation des résultats positifs par la technique d'immunofluorescence indirecte.

Ce manuscrit est structuré en 3 chapitres : le premier chapitre comprend des informations générales sur les phlébovirus les plus importants sur le plan médical dans l'Ancien Monde dont le virus de la fièvre du phlébotome de Toscane, de Naples, de Sicile, et de Chypre. Tandis que le second chapitre est consacré au matériel et aux méthodes d'étude. Il décrit la région étudiée, le matériel et les différentes méthodes utilisées au cours de notre enquête. Le troisième chapitre résume les résultats obtenus et leur discussion.

# **Chapitre I :**

# **Synthèse bibliographique**

## I.1. Les phlébovirus

### I.1.1 Historique

Les maladies infectieuses humaines ont été liées aux infections à phlébovirus à la fois de manière contemporaine et historique depuis l'ère napoléonienne (Hertig et *al.*, 1964). Les phlébovirus ont été responsables d'une morbidité importante chez les soldats tout au long de la Seconde Guerre mondiale, plus particulièrement sur la zone méditerranéenne (Hertig et *al.*, 1964). Dans la zone limitée du front méditerranéen pendant la Première Guerre mondiale, les phlébovirus étaient probablement à l'origine de certains cas de "fièvre des tranchées", qui est plus souvent liée à une maladie rickettsienne propagée par les poux (Lambert et *al.*, 2021).

C'est Alois Pick qui a décrit cliniquement la fièvre du phlébotome pour la première fois en 1886 dans la région des Balkans (Ayhan et *al.*, 2018), où la maladie était répandue sous une forme endémique parmi la population locale et présentait un risque élevé pour les visiteurs. Les infections phlébovirales transmises par les phlébotomes étaient une cause majeure de maladie fébrile parmi les forces militaires pendant les guerres napoléoniennes, la Commission autrichienne dans les Balkans et la colonisation britannique en Inde et au Pakistan (Tesh et *al.*, 1988).

Des phlébotomes ont été découverts dans des baraquements militaires en Herzégovine. Il a été révélé par la suite que l'agent causant la fièvre du phlébotome était un agent filtrable transmis par des phlébotomes infectés (Doerr et *al.*, 1909), de sorte que la maladie a été nommée "pappataci", qui se traduit approximativement de l'italien par "manger en silence", la fièvre faisant référence aux habitudes alimentaires cryptiques des mouches phlébotomes, ou "fièvre des trois jours", qui décrit la maladie fébrile autolimitée causée par la plupart des phlébovirus pathogènes (Lambert et *al.*, 2021).

Après la découverte et la description de la maladie, des épidémies ont été identifiées chez des soldats qui venaient d'arriver dans des zones endémiques, et la majorité de la littérature sur la fièvre du phlébotome a été publiée dans des revues ou des rapports militaires (Anderson et *al.*, 1941; Sabin, 1951 ; Tesh et Papaevangelou, 1977 ; Eitrem et *al.*, 1985 ; Oldfield et *al.*, 1991).

## I.1.2 Découverte des phlébovirus transmis par les phlébotomes

### A. Découverte du virus sicilien

Albert Sabin a isolé le SFSV à partir de sérums de soldats malades en Égypte pendant la Seconde Guerre mondiale en 1943. Plus tard, lors d'une épidémie de maladie fébrile parmi les troupes de l'armée américaine en Sicile, il l'isola à nouveau et des tests d'immunité croisée chez des volontaires révélèrent que les deux agents étiologiques étaient identiques (Sabin, 1951). Le vecteur a été identifié comme étant *Phlebotomus papatasi* (Alkan et al., 2013).

### B. Découverte du virus de Naples

Le virus de Naples a été repéré à une première occasion dans le sérum d'un soldat malade en Italie pendant la Seconde Guerre mondiale, où les études d'immunité croisée chez l'homme ont été les premières à montrer l'absence de relations immunologiques entre les virus Sicilien et Naples, et les tests de neutralisation et de fixation du complément ont été les seuls à le confirmer (Sabin, 1951). Les patients pourraient contracter les deux virus consécutivement, car aucune protection croisée n'a été démontrée (Sabin, 1951).

En plus de *P. papatasi*, le virus a été isolé chez *P. perniciosus* en Italie (Verani et al., 1980) et *Phlebotomus perfiliewi* en Serbie (Gligić et al., 1982).

### C. Découverte du virus Toscana

En 1971, le virus Toscana, un proche parent du virus Naples, a été isolé pour la première fois de *P. perniciosus* en région de Toscane en Italie centrale (Verani et al., 1980). Après la démonstration de son implication dans l'infection du SNC (système nerveux central) chez des citoyens suédois et américains rentrant chez eux après avoir visité le Portugal et l'Italie, respectivement, les premières preuves de pathogénicité humaine sont apparues (Calisher et al., 1987 ; Ehrnst et al., 1985). D'autres souches du Toscana virus ont été isolées de *P. perfiliewi* en Italie (Verani et al., 1988). Par la suite, chez une femme atteinte de méningite aseptique, confirmant son rôle de cause majeure d'infections du SNC en Italie centrale (Nicoletti et al., 1991).

À ce jour, le virus Toscana est le seul phlébovirus transmis par les phlébotomes qui a été définitivement lié à des manifestations du système nerveux central (Ayhan et al., 2020).

## D. Découverte du virus de Chypre

La fièvre Sandfly a été identifiée pour la première fois à Chypre en 1984, après une épidémie de maladie fébrile chez des soldats suédois servant dans les forces des Nations Unies (Eitrem et *al.*, 1985). Les tests de neutralisation ont confirmé que les virus de Naples, de Toscane et de Sicile circulaient ensemble, comme en témoignait la séroconversion, et provoquaient des infections aiguës. (Eitrem et *al.*, 1990).

Une épidémie de fièvre du phlébotome a frappé les soldats grecs stationnés dans la capitale Nicosie en 2002. La RT-PCR s'est avérée positive dans quinze échantillons de sang. Les échantillons de sang ont été utilisés pour isoler le virus, et la recherche génétique a révélé qu'il était apparenté mais distinct du virus sicilien. Le Sandfly fever Cyprus virus est le nom donné à ce virus (Konstantinou et *al.*, 2007 ; Papa et *al.*, 2006).

### I.1.3 Taxonomie

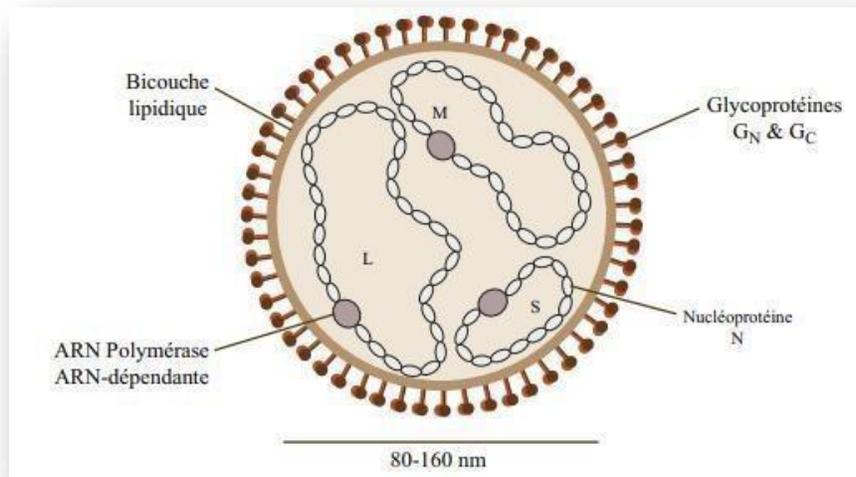
Les phlébovirus sont des arbovirus, acronyme dérivé d'Arthropod-borne virus ou virus transmis par les arthropodes, appartenant à l'ordre des *Bunyavirales*, famille des *Phenuiviridae*. Ce sont un groupe de virus à ARN qui se développent dans les arthropodes, principalement des moustiques hématophages et des tiques (Socha et *al.*, 2022).

Auparavant, la réactivité sérologique croisée était utilisée pour classer les espèces du genre. La découverte de nouveaux phlébovirus, qui sont rarement disponibles pour les tests sérologiques, a entraîné un changement des règles de classification. Dans les séquences d'acides aminés de leur RdRp, les espèces virales sont désormais définies par une identité de 95 % ou plus [TaxoProp 2019.026M.A.v1.Pheniviridae 4gen79sp]. Dans la dernière version de 2021 de « International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV » (Master Species List 2021.v1, MSL #37 du 24.03.2022), il y'a 67 espèces dans le genre *Phlebovirus* (Calisher et *al.*, 2021).

### I.1.4 Structure et génome

Les phlébovirus possèdent un virion sphérique enveloppé d'environ 100 nm de diamètre, ainsi qu'un génome ARN simple brin tri-segmenté de polarité négative avec une stratégie de codage négatif et ambisens (Calisher et *al.*, 2021). Les glycoprotéines de surface (G<sub>N</sub> et G<sub>C</sub>) codées par le segment génomique M (moyen), la protéine de nucléocapside codée par le segment S (petit) et l'ARN polymérase ARN-dépendante virale codée par le segment génomique L (grand) constituent les protéines structurales des phlébovirus, ainsi que deux protéines non structurales (NSs, NSm) (Calisher et *al.*, 2021) (**Fig.1**).

Le cytoplasme de la cellule infectée sert de site de réplication, tandis que la maturation des virions a lieu dans le complexe de Golgi (Ergunay et *al.*, 2014).



**Figure 1:** schéma représentatif de particule phlébovirale. Les trois segments génomiques viraux sont dénommés en fonction de leur taille : S (petit), M (moyen) et L (grand)

Les phlébovirus possèdent trois segments distincts (**Fig.2**) (Calisher et *al.*, 2021) :

- un grand segment (L) (6,4 kb) qui code pour l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp)
- un segment moyen (M) (3,2 kb), qui code pour plusieurs polyprotéines, obtenues par balayage de fuite et clivées en plusieurs protéines (NSm-G<sub>N</sub>, NSm, NSm', G<sub>N</sub> et G<sub>C</sub>)
- un petit segment (S) (1,7 kb) qui code pour deux protéines (N et NSs).

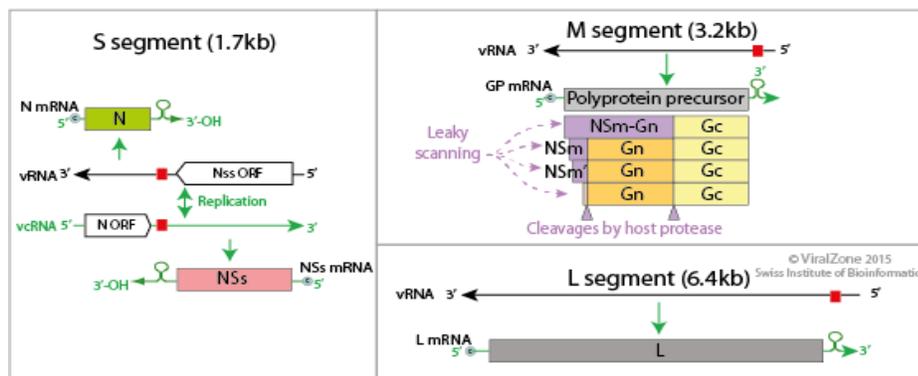


Figure 2: Un schéma qui représente la composition différents segments du génome des phlébovirus Philippe Le Mercier, P. (2022). Phlébovirus ~ ViralZone. Consulté le 8 mai 2022, à l'adresse <https://viralzone.expasy.org/252>.

### I.1.4.1 Réplication

Les étapes du cycle de réplication sont les suivantes (Knipe, D et Howley, P, 2013) (**Fig.3**) :

- Fixation, médiée par une interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe virales et les récepteurs de l'hôte ;
- Endocytose médiée par les récepteurs ;
- Décollement, par acidification des vésicules endocytiques, et fusion des membranes virales avec les membranes endosomales avec libération des complexes ribonucléoprotéiques viraux dans le cytoplasme ;
- Transcription primaire de la protéine complémentaire du virus. Transcription primaire d'espèces d'ARN messagers (ARNm) complémentaires du virus à partir de matrices génomiques à l'aide d'amorces issues de la cellule hôte et de la polymérase associée au virion ;
- Traduction des ARNm L, M et S, clivage co-translationnel de la polyprotéine du segment M, dimérisation de Gn et Gc dans le réticulum endoplasmique (RE) ;
- Réplication de l'ARN associé à la membrane, synthèse et encapsidation de l'ARNc pour servir de matrice à l'ARNv ou, pour les gènes ambisens, de matrice à l'ARNm subgénomique, réplication du génome ;
- Morphogénèse, y compris le transport des protéines structurales vers le Golgi, la glycosylation de Gn et Gc, le bourgeonnement dans les citernes de Golgi ;
- Migration des vésicules de Golgi contenant les virus vers la surface cellulaire, fusion des membranes vésiculaires avec la membrane plasmique et libération des virions infectieux par exocytose.

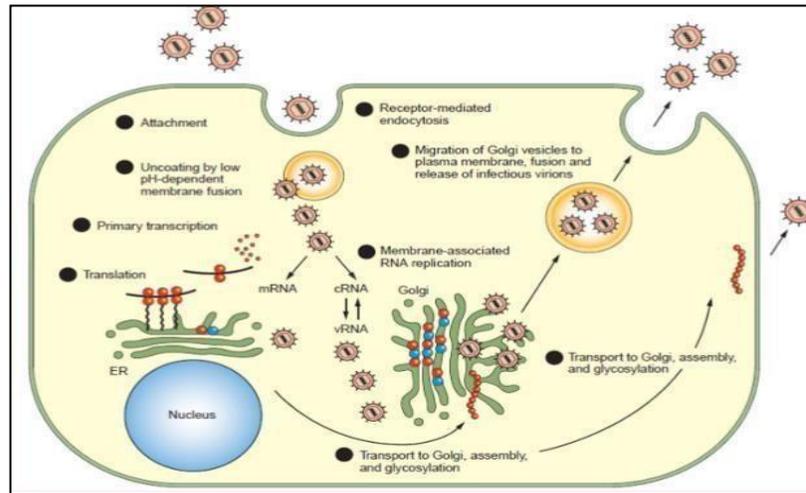


Figure 3: Cycle de réplication des phlébovirus (Knipe, D et Howley, P, 2013).

#### I.1.4.2 Réassortiment viral

Le réassortiment des segments d'ARN des phlébovirus est courant, comme c'est le cas pour d'autres virus à ARN segmenté. Au cours de la réplication, les segments d'ARN de différentes souches virales se mélangent, et les virus de la descendance contiennent des segments génomiques provenant des virus parentaux. Les phlébovirus réassortis sont donc la conséquence d'un échange génétique entre des souches parentales de phlébovirus apparentées (Alkan *et al.*, 2013).

La forme segmentée du génome tripartite du phlébovirus facilite ce processus, qui pourrait conduire à l'émergence de nouvelles maladies si l'échange de segments confère un avantage en termes de fitness ou modifie la pathogénicité chez l'hôte humain (Calzolari *et al.*, 2018). Par conséquent, la capacité à détecter et à identifier les virus réassortis revêt une importance particulière sur le plan clinique, épidémiologique et de la santé publique (Lambert *et al.*, 2021).

#### I.1.4.3 Lignage

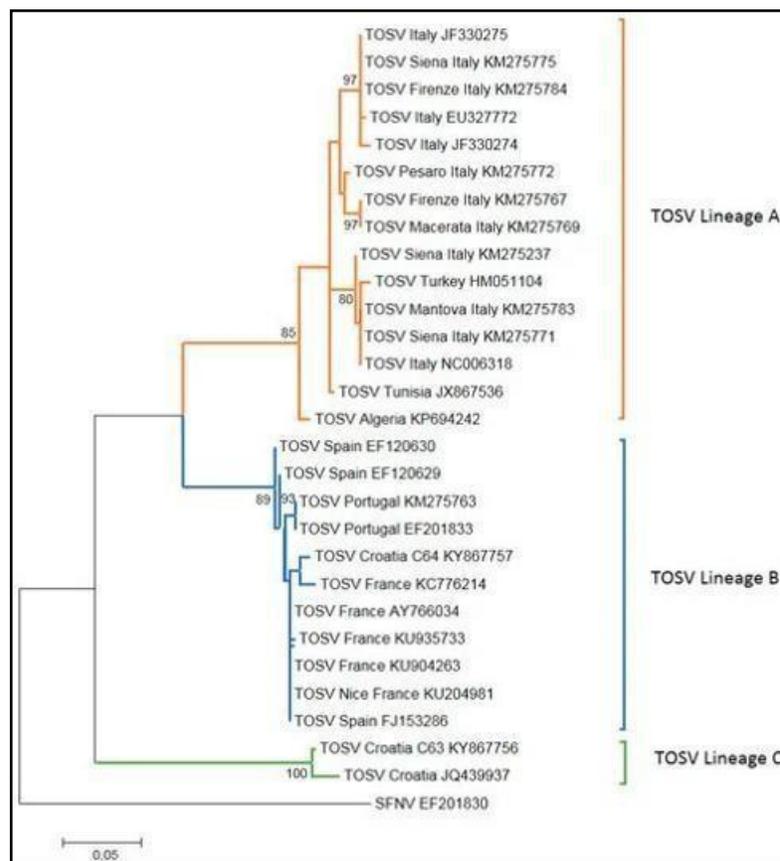
D'un point de vue médical, ces quatre sérotypes sont les plus importants, à savoir le virus "Sandfly Fever Sicilian" (SFSV ; sérotype sicilien), le virus "Sandfly Fever Cyprus" (SFCV ; sérotype chypriote), le virus "Sandfly Fever Naples" (SFNV ; sérotype napolitain) et le virus "Toscana" (TOSV ; sérotype toscan) (Marklewitz *et al.*, 2020). Il a été discuté que tous les virus de cette famille de virus sont les plus récents de longues lignées génétiques (Briese *et al.*, 2013).

Certains (ou tous) des virus énumérés sont sans aucun doute des phlébovirus réassortis, en particulier ceux détectés en Italie, probablement en raison de la co-circulation de plusieurs phlébovirus dans des arthropodes vecteurs se trouvant à proximité (Calzolari *et al.*, 2018).

Selon des recherches, de multiples phlébovirus transmis par les phlébotomes et pouvant appartenir à différents complexes génétiques co-circulent souvent dans un endroit particulier. Le virus Arbia et le TOSV, par exemple, ont été détectés en Italie (Verani *et al.*, 1988), le virus Saddaguia et le TOSV en Tunisie (Dachraoui *et al.*, 2016), les virus Massilia, Alcube, et Arrabida au Portugal (Amaro *et al.*, 2016), et les virus Adana, Zerdali, et Toros virus en Turquie (Alkan *et al.*, 2016).

Pendant la saison chaude dans les zones endémiques où des vecteurs compétents sont présents, le TOSV, connu pour être neurotrope, peut provoquer des maladies du SNC telles que la méningite aseptique aiguë, l'encéphalite et la méningo-encéphalite (Marklewitz *et al.*, 2020).

Les études génétiques du TOSV ont révélé l'existence de trois génotypes, appelés lignées A, B et C (**Fig. 4**) (Ayhan *et al.*, 2020) :



**Figure 4:** Analyse phylogénétique du virus Toscana (TOSV) basée sur le gène de la protéine de la nucléocapside. L'analyse du maximum de vraisemblance au niveau des nucléotides a été réalisée à l'aide du logiciel MEGA 6.06

La lignée A était constituée de souches virales identifiées initialement en Italie, tandis que la lignée B était constituée de souches virales isolées d'abord au Portugal, puis en Espagne. Il est rapidement apparu que la dispersion de la lignée génétique est influencée par la géographie plutôt que par les caractéristiques de l'hôte (humain, vertébré non humain, mouche des sables) (Verani et *al.*, 1988).

Il a également été démontré que deux lignées génétiques peuvent circuler ensemble : Les lignées A et B co-circulent à la fois en France (Baklouti et *al.*, 2016 ; Nougairede et *al.*, 2010) et en Turquie (Erdem et *al.*, 2014;Dincer et *al.*, 2016), quant à la Croatie, il a été noté une co-circulation des lignées B et C (Ayhan et *al.*, 2018). Il est important de souligner qu'il n'existe aucune preuve indiquant qu'une lignée est plus pathogénique chez l'homme qu'une autre. Cependant, à l'heure actuelle, les preuves d'un lien entre la lignée génétique du TOSV et les espèces de phlébotomes sont faibles (Calzolari et *al.*, 2018).

### **I.1.5 Caractères physico-chimiques des phlébovirus**

Les virions des phlébovirus sont fragiles et peuvent être inactivés par la chaleur, un pH acide, le formaldéhyde, les détergents et les désinfectants :

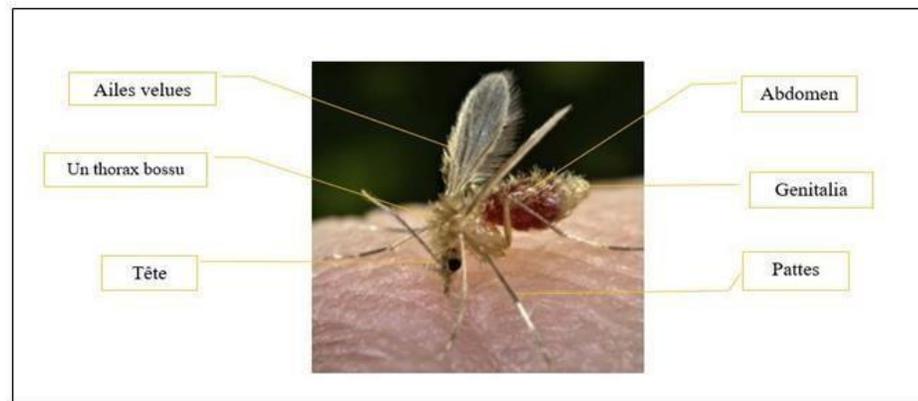
- Température : Le traitement thermique du sérum pendant 120 minutes à 56°C détruit le virus.
- pH : il résiste au pH basique mais est inactivé à pH moins à 6,8 par l'éther, par 0,1% de  $\beta$ - Propiolactone à pH=9, le désoxycholate.
- Agents chimiques : Inactivé par l'éther et le chloroforme
- Désinfectants : il est inactivé par les solutions fortes d'hypochlorite de sodium ou de calcium (le chlore résiduel doit dépasser 5000 ppm).

## **I.2 Les vecteurs : les phlébotomes**

*Phlebotominae*, le taxon des vecteurs des espèces membres de la fièvre du phlébotome des phlébovirus, est dérivé du grec phlebos, qui signifie "veine" (Calisher et *al.*, 2021).

Les phlébotomes ou "mouche des sables" sont de minuscules insectes hématophages (suceuses de sang) appartenant à l'ordre des diptères, à la famille des *Psychodidae* et à la sous-famille des *Phlebotominae* (Benallal et *al.*, 2022) (**Fig.5**).

Jusqu'à présent, plus de 950 espèces ont été classées en plusieurs genres, dont environ 100 espèces de l'Ancien et du Nouveau Monde impliquées dans le transfert de diverses infections, y compris celles qui infectent les humains (Munstermann et *al.*, 2019).



**Figure 5: Mouche de sable, *Phlebotomus papatasi*, femelle se nourrissant d'un être humain.**

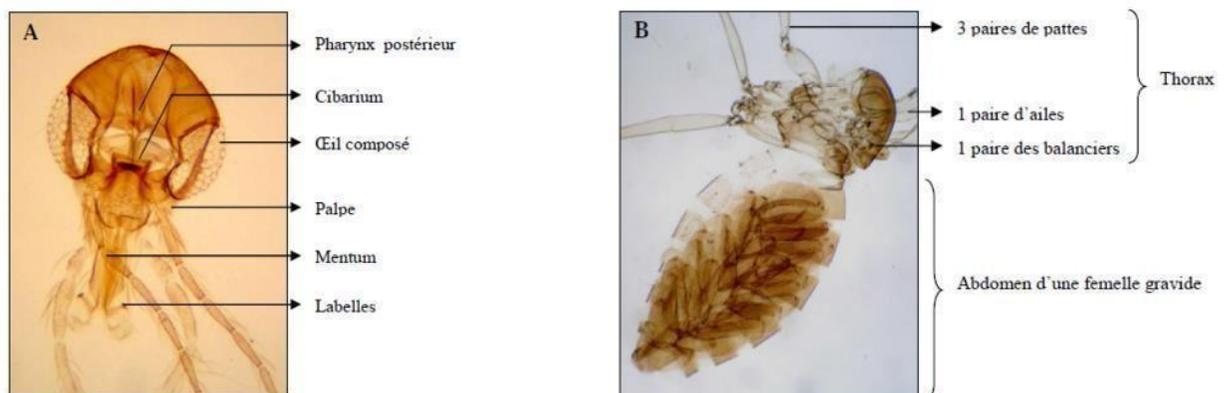
Bibliothèque d'images de santé publique (PHIL), 2022. Accéder le 28 Avril 2022

<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=10275>

*P. papatasi* a été la première espèce de phlébotomes découverte en Afrique du Nord, dans la région de Beni Ounif, à la frontière sud algéro-marocaine encore non contrôlée, en 1908, introduisant pour la première fois le pou en pathologie humaine (Dedet et *al.*, 1984).

### I.2.1 Morphologie

Les phlébotomes sont de petits insectes nocturnes (1,5-3 mm) (**Fig.6**), fragiles et capables de voler sur de courtes distances avec une activité crépusculaire et un comportement de repos diurne (Alkan et *al.*, 2013).



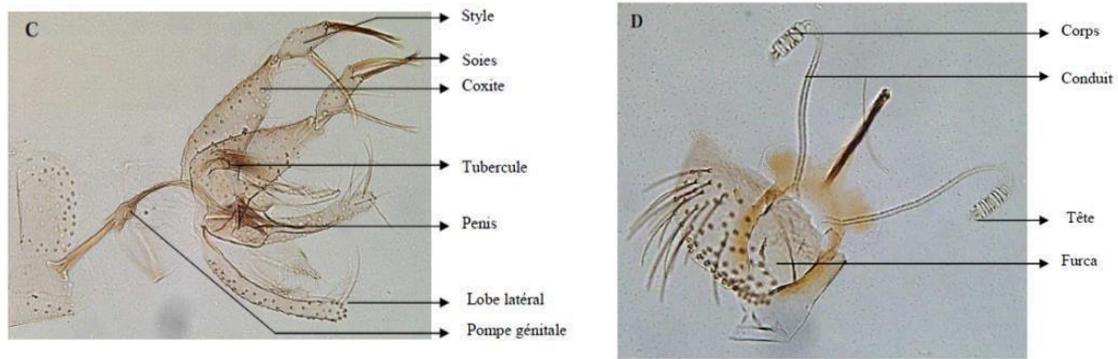


Figure 6: Morphologie d'un phlébotome adulte vue au microscope optique G 100 (Boussaa, 2008)

A. Tête (vue ventrale). B. Thorax et l'abdomen. C. Génitalia mâle. D. Spermathèques (*Ph.sergenti*)

## I.2.2 Développement et cycle de vie

Le cycle de vie du phlébotome dure de 5 à 10 semaines, et comprend quatre étapes : l'œuf, la larve, la nymphe et l'adulte (Tesh et *al.*, 1989) (**Fig.7**) :

- Les œufs éclosent au bout de 4 à 20 jours, mais cela peut être retardé par temps froid.
- La maturation des larves se déroule en quatre étapes et dure de 20 à 30 jours, selon l'espèce, la température et l'apport nutritionnel. Les températures extrêmes, le froid ou la sécheresse peuvent faire entrer les larves en diapause, ce qui prolonge la période de développement pendant des mois.
- Les larves sont principalement des charognards, se nourrissant de matières organiques (par exemple, champignons, feuilles en décomposition, excréments d'animaux et arthropodes en décomposition).
- Avant l'émergence des phlébotomes adultes, le stade nymphal dure de 6 à 13 jours.

En plus de la dormance et la diapause en tant qu'œufs et larves (Ready et *al.*, 2013), il existe également des preuves l'autogenèse (Lewis et *al.*, 1971).

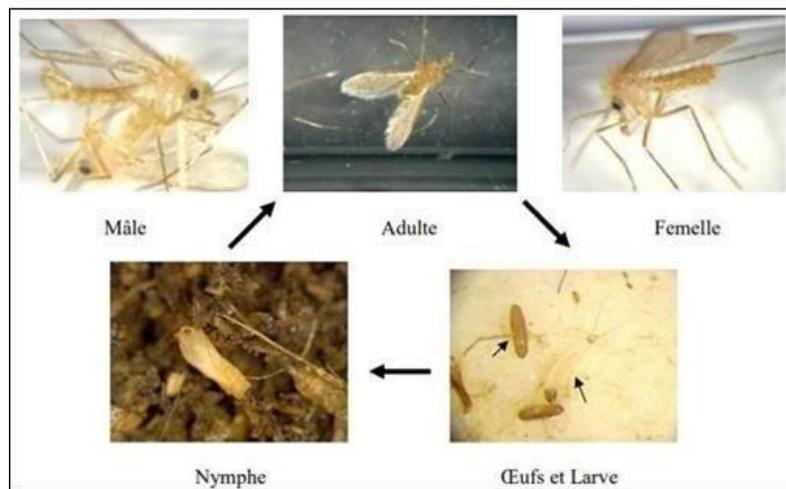


Figure 7: Cycle de vie d'un phlébotome (Elevage de *P. duboscqi*) (Boussaa, 2008)

### I.2.3 Préférence d'habitat

Les granges d'animaux, les maisons, les volières, les cavernes, les trous d'arbres, les terriers d'animaux, les crevasses entre les rochers et les trous de murs sont tous des lieux de repos courants pour les adultes (Alkan et *al.*, 2013). De fortes pluies pourraient inonder ces lieux de repos, réduisant ainsi le nombre d'endroits où les phlébotomes peuvent se reproduire (Alexander et *al.*, 2000).

Les espèces de phlébotomes ont des préférences différentes pour les lieux de repos. Par exemple, *Sergentomyia minuta* a tendance à se reposer entre de petits rochers, tandis que *Phlebotomus mascitii* a une préférence d'habitat spécifique qui concerne principalement les cavernes (Alkan et *al.*, 2013).

### I.2.4 Comportement alimentaire des phlébovirus adultes

Les phlébotomes se nourrissent de divers vertébrés, dont des animaux à sang froid, des mammifères et des oiseaux, selon l'espèce (Alkan et *al.*, 2013) avec une activité nocturne et crépusculaire (Alten et *al.*, 2016). Les deux sexes consomment du miellat, de la sève végétale et des sécrétions de pucerons comme sources de sucre pour se nourrir (Muller et *al.*, 2004).

Néanmoins, seules les femelles consomment du sang, qui est essentiel au développement des œufs, avant de les pondre dans des microhabitats terrestres riches en matière organique, comme le sol et les terriers d'animaux, qui servent de source de nutrition pour les larves (**Fig.8**) (Alexander et *al.*, 2000 ; Feliciangeli et *al.*, 2004).



Figure 8: Mouches des sables femelles *Phlebotomus papatasi* prenant un repas de sang sur la queue d'une souris

(Courtoisie de FilizGunay, Université Hacettepe).

### I.3 Epidémiologie du virus

Les phlébovirus transmis sont présents dans tout le bassin méditerranéen, en Afrique, sur le sous-continent indien, au Moyen-Orient et en Asie centrale (Alkan et *al.*, 2013).

À l'exception du virus Toscana, qui présente un tropisme marqué pour les systèmes neurologiques centraux et périphériques, les fièvres dues aux phlébotomes provoquent des maladies modérément graves et sont souvent peu prises en compte par les médecins. Les maladies virales transmises par les phlébotomes suscitent également beaucoup moins d'intérêt scientifique que les autres arbovirus (Alkan et *al.*, 2013).

L'épidémiologie de la fièvre du phlébotome est intimement liée au cycle de vie des vecteurs. La maladie peut devenir épidémique pendant la saison estivale en raison de la reproduction des phlébotomes.

Les zones de distribution des vecteurs possibles sont actuellement reconnues pour limiter la propagation de la fièvre du phlébotome. Étant donné que les vecteurs phlébotomes sont actifs, la maladie peut apparaître et/ou réapparaître dans n'importe quelle région géographique (Depaquit et *al.*, 2010).

La présence de vecteurs phlébotomes augmente les risques d'infection par les phlébovirus transmis par les phlébotomes dans de vastes régions de l'Ancien Monde (Maroli et *al.*, 2013). Plus il y a de phlébotomes, plus il y a de chances qu'un nouveau virus soit découvert.

Lorsque la fièvre de la mouche des sables frappe, la biologie du vecteur domine l'épidémiologie, comme en témoignent les observations suivantes :

- Les cas sont concentrés géographiquement près des habitats habituels du vecteur.
- L'été est la saison la plus courante pour l'infection dans les zones non-tropicales.
- S'il est observé par la surveillance, le taux d'attaque secondaire doit être considéré comme un bruit.
- La période d'incubation dure entre 4 et 8 jours (Brett-Major et Claborn, 2009).

### **I.3.1 Épidémiologie et transmission des agents pathogènes**

La sous-famille des *Phlebotominae* comprend les trois principaux genres *Lutzomyia* (Nouveau Monde), *Phlebotomus* et *Sergentomyia* (Ancien et Nouveau Monde) (Calisher et *al.*, 2021). Les deux premiers genres contiennent les espèces les plus importantes capables de transmettre des infections virales (Tesh et *al.*, 1988).

Malgré la capacité limitée des phlébotomes à se disperser, les récents changements climatiques ont entraîné l'expansion des zones géographiques où les phlébotomes circulent (Fischer et *al.*, 2011).

Le virus est transmis au phlébotome (de mai à octobre) par la piqûre d'une personne infectée entre 48 heures et 24 heures avant l'apparition de la fièvre (Ergunay et *al.*, 2014), nécessitant une période d'incubation de 7-10 jours après la transmission, après quoi le phlébotome est définitivement infecté (Depaquit et *al.*, 2010).

### **I.3.2 Distribution géographique de la fièvre des phlébotomes**

Les phlébotomes sont distribués dans un large éventail de régions, y compris les zones tempérées, les déserts et les régions semi-arides. On peut même les trouver dans des endroits tropicaux et subtropicaux (Alkan et *al.*, 2013).

La Méditerranée, l'Afrique du Nord et l'Asie occidentale et centrale sont les principales régions où les phlébotomes de l'Ancien Monde ont été découverts (Ayhan et *al.*, 2017).

Dans les pays méditerranéens, l'activité des phlébotomes est saisonnière. En raison des températures froides de l'hiver, ils sont présents de mai à octobre. Les périodes d'émergence et la dynamique saisonnière de ces insectes (avec un pic en juillet et août) sont influencées par les températures moyennes annuelles et la latitude, les facteurs environnementaux et climatiques, et peuvent différer selon l'espèce et la zone de capture (Alten et *al.*, 2016).

La prévalence des anticorps humains et animaux contre les phlébovirus transmis par ces vecteurs dans les régions susmentionnées souligne l'importance de ces maladies pour la santé publique (Alkan et *al.*, 2013).

### **I.3.3 Entretien et transmission**

Les virus de la fièvre du phlébotome ont été isolés à la fois chez l'homme et chez les phlébotomes. À l'heure actuelle, il existe peu de preuves pour étayer le concept selon lequel les humains ou les grands animaux sont des réservoirs de virus, il est largement admis qu'ils sont des hôtes sans avenir qui ne jouent aucun rôle dans le cycle de vie naturel du virus. Ainsi, les vertébrés augmenteraient les chances de survie et de dissémination du virus (García San Miguel et *al.* 2021).

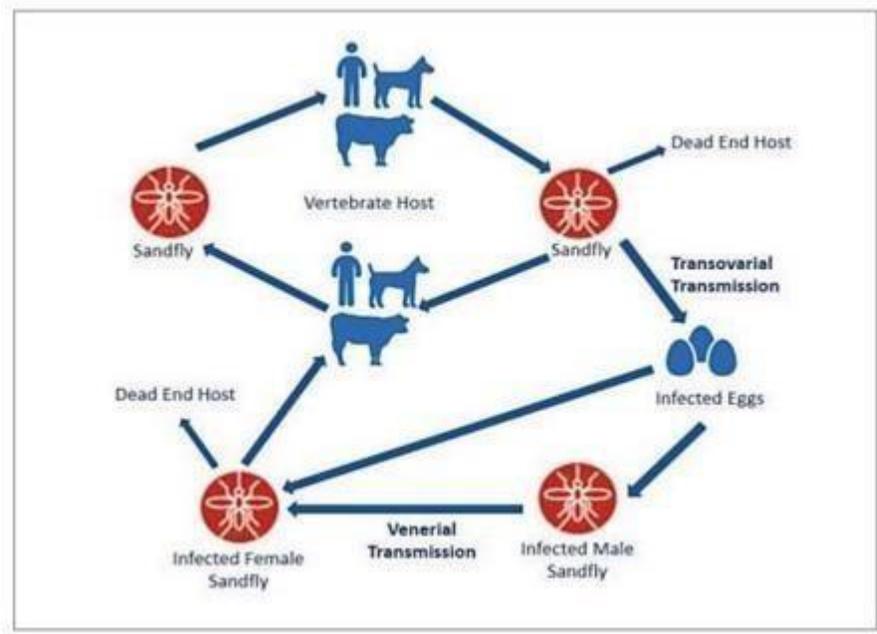
Selon les dernières études, de nombreux phlébovirus sont maintenus dans leurs arthropodes vecteurs par transmission veineuse (transovarienne) qui est essentielle à leur survie dans la nature, cela permet aux phlébovirus de survivre en l'absence de vecteurs adultes ou en l'absence d'hôtes vertébrés vulnérables (Bergren et *al.*, 2018).

D'autre part, il a été démontré que l'accouplement entraîne une transmission vénérienne (horizontale) des mâles malades aux femelles non infectées (Tesh et *al.*, 1992). En outre, dans des expériences que le virus Toscana se maintient verticalement pendant 15 générations de cellules de phlébotomes sans diminution significative du taux d'infection (Bergren et *al.*, 2018).

Plusieurs espèces de vertébrés ont été suggérées comme réservoirs possibles pour ces virus, mais aucune prédiction n'a été faite en raison de la brève durée de la virémie et de l'absence d'infection persistante (Ayhan et *al.*, 2020).

Étant donné l'inactivité des espèces vectrices pendant les saisons d'automne et d'hiver, le mécanisme sous-jacent du maintien à long terme du virus reste inconnu. En ce sens, il semble plausible de conclure que le principal hôte réservoir est le phlébotome, dans lequel les virus se reproduisent et sont transmis à des hôtes vertébrés qui, dans la plupart des cas, ne présentent aucun signe clinique d'infection (Ergunay et *al.*, 2014).

Trois éléments sont nécessaires à la transmission des arbovirus qui se produit dans certaines conditions environnementales qui impliquent des cycles écologiquement distincts : l'hôte vertébré, l'arthropode vecteur et le virus (**Fig. 9**) (Weaver et *al.*, 2021).



**Figure 9:** Cycle de transmission des phlébovirus transmis par les phlébotomes

### I.3.4 Distribution géographique des phlébovirus transmis par les phlébotomes

Les phlébovirus transmis par les phlébotomes de l'Ancien Monde ont été signalés principalement dans la région méditerranéenne, en Afrique du Nord et en Asie occidentale et centrale (Ayhan et *al.*, 2017). Le virus de la fièvre du phlébotome de Naples et le virus de la fièvre du phlébotome de Sicilien sont tous deux présents dans la région méditerranéenne ainsi qu'en Asie occidentale et centrale (Tesh et *al.*, 1976) (**Fig.10**).

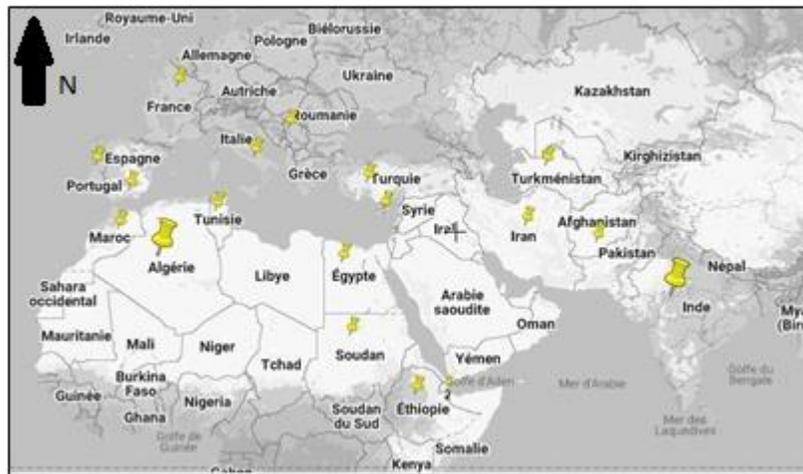


Figure 10: carte géographique représente les pays où des données sont disponibles pour la séroprévalence, la détection par PCR et l'isolement des virus appartenant à l'espèce Sandfly fever Naples.

Le virus de la fièvre du phlébotome sicilien est endémique dans les mêmes pays africains que le virus de la fièvre du phlébotome de Naples, à l'exception de Djibouti, et a été trouvé en Ouganda et en Somalie (Tesh et *al.*, 1976 ; Rodhain et *al.*, 1989). Enfin, le virus sicilien de la fièvre du phlébotome a été identifié en Éthiopie comme la cause d'une épidémie de maladie fébrile (Woyessa et *al.*, 2011) (Fig.11).



Figure 11: Carte géographique représente les pays où des données sont disponibles sur la séroprévalence, la détection par PCR et l'isolement du virus pour les virus appartenant au sérocomplexe sicilien de la fièvre des phlébotomes.

Après sa découverte en Italie centrale, le virus Toscana a été découvert qu'il était endémique dans un certain nombre d'autres régions italiennes, où il provoque des infections neuro-invasives pendant l'été (Calamusa et *al.*, 2012; Ayhan et *al.*, 2020) (Fig.12).



Les pays du Maghreb ont signalé plusieurs arbovirus de l'ordre des *Bunyavirales*, dont le célèbre TOSV, qui présente un intérêt particulier, le virus de Naples et le virus sicilien.

Les taux élevés d'anticorps neutralisant le TOSV rapportés dans des études humaines en Algérie (Moureau et *al.*, 2010 ; Izri et *al.*, 2008 ; Tahir et *al.*, 2016) et en Tunisie (Fezaa et *al.*, 2013 ; Sakhriaet *al.*, 2013) suggèrent que le virus circule fréquemment dans la région. En fait, certaines études de séroprévalence humaine ont révélé que le pourcentage de la population ayant des anticorps neutralisants du TOSV est 2 à 3 fois plus élevé que dans le sud de l'Europe (Ayhan et *al.*, 2020).

Les trois phlébovirus mentionnés ci-dessus ont été détectés chez des espèces de phlébotomes de plusieurs sous-genres dans la région du Maghreb : TOSV en *Ph. papatasi*, *Ph. sergenti*, *Ph. perniciosus* et *Ph. longicuspis*, les virus de Naples dans *Ph. perniciosus* et *Ph. longicuspis*, et le virus sicilien chez *Ph. ariasi* (Benallal et *al.*, 2022).

Dans la région du Maghreb, la diversification des phlébovirus est encore peu claire. Un des objectifs des études futures sera de déterminer le rôle des différentes espèces de phlébotomes dans leur transmission.

#### **I.3.4.2 En Algérie**

Les anticorps neutralisants contre les virus de Sicile et de Naples n'ont pas été trouvés dans le sud-est de l'Algérie en 1976 (Tesh et *al.*, 1976), dans leur étude la plus complète, n'ont signalé aucun anticorps neutralisant réagissant au SFSV dans le sérum humain des populations algériennes de Tamanrasset et Djanet.

En 2006, un phlébotome sur 460 (principalement *P. perniciosus*) était porteur d'un ARN viral de type sicilien : il s'agissait d'un *P. ariasi*, ce qui était surprenant (Izri et *al.*, 2008). Une collecte de phlébotomes organisée en Kabylie et à Alger en 2007 a donné deux résultats positifs, l'un pour l'ARN viral de type Naples (*P. longicuspis*) et l'autre pour l'ARN viral de type Sicilien (*P. papatasi*). En utilisant des tests IFI et ELISA, des études de séroprévalence dans le nord de l'Algérie ont révélé des anticorps contre les virus Sicilien et Naples à des taux de 5 % et 10,6-21,6 %, respectivement (Moureau et *al.*, 2010). Les preuves sérologiques indiquent que le SFSV est présent en Algérie.

Les souches algériennes, italienne et chypriote du SFSV sont toutes étroitement liées, selon l'analyse génétique d'une petite section du gène de la polymérase (segment du génome L) (Izri et *al.*, 2008).

### **I.3.5 Effets des changements globaux sur les agents pathogènes transmis par les phlébotomes**

Le changement climatique peut affecter les lieux à risque et les populations humaines puisque la distribution géographique de ces agents est régie par la distribution de leurs vecteurs (Benallal et *al.*, 2022).

L'altération de l'épidémiologie des infections à transmission vectorielle est causée par des facteurs externes tels que le changement climatique, l'urbanisation croissante, la croissance économique et les mouvements de population pour des raisons économiques, sociales ou politiques, qui entraînent des changements dans la gamme des vecteurs, des réservoirs et des agents pathogènes (Viglietta et *al.*, 2021).

Les changements écologiques provoqués par l'homme, tels que l'urbanisation, l'expansion de l'agriculture dans les zones semi-arides et la mise en place de systèmes d'irrigation artificielle, peuvent tous avoir un impact sur la prévalence des phlébotomes (Viglietta et *al.*, 2021). D'autres activités anthropiques, comme le tourisme et les pèlerinages en provenance ou à destination de lieux endémiques, peuvent contribuer à la propagation d'infections exotiques dans des zones où d'autres agents pathogènes transmis par les phlébotomes sont déjà endémiques (Ayhan et *al.*, 2017).

## **I.4 Interaction entre le virus et l'hôte**

### **I.4.1 Pouvoir pathogène et hormonogène**

Au cours des dernières décennies, plusieurs virus transmis par les phlébotomes, récemment découverts et responsables d'un large éventail de maladies humaines, ont été attribués au genre *Phlebovirus* (Viglietta et *al.*, 2021). La protéine non structurale (NSs) des bunyavirus est le principal facteur de virulence et un antagoniste de l'interféron (IFN)

(Rezelj et *al.*, 2017). L'immunité innée, qui est médiée par la voie de l'interféron (IFN) de type I, constitue une première ligne de protection contre les virus (Lee et *al.*, 2018).

Selon les dernières recherches, la capacité d'un NSs spécifique à interférer à la fois avec l'induction et la signalisation de l'IFN est nécessaire pour une virulence élevée (Wuerth et *al.*, 2021).

Au niveau de la transcription cellulaire, les phlébovirus semblent être antagonistes de l'IFN de l'hôte. Les protéines NSs du SFSV réduisent, mais n'éliminent pas complètement, l'induction de l'IFN de type I et de type III. Les NS du SFSV n'ont également eu aucun effet sur la signalisation de l'IFN, ce qui a entraîné des niveaux élevés d'expression de l'ISG (Gène stimulés par l'IFN) dans les cellules infectées, alors que les NSs du TOSV ne bloquent l'induction que lorsqu'ils sont produits dans un environnement hétérologue (Wuerth et *al.*, 2021).

#### **I.4.2 Cellules dendritiques comme portail d'accès pour les phlébovirus**

Les phlébovirus se transmettent à l'homme à travers son derme lorsqu'un arthropode infecté ingère du sang. Pour initier l'infection, les virus doivent d'abord s'attacher à leurs cellules cibles et, ensuite, accéder à l'espace intracellulaire pour se répliquer (Meier et *al.*, 2012). Les phlébovirus utilisent leurs protéines d'enveloppe, Gn et Gc protéines de fusion membranaire virale de classe II pour pénétrer dans les cellules cibles et assembler les particules de la progéniture dans les cellules infectées (Spiegel et *al.*, 2016).

Les cellules dendritiques, qui expriment à leur surface la lectine de type C (calcium-dépendante) DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) et qui sont l'une des premières cellules de l'hôte humain à entrer en contact avec les particules virales puisqu'elles sont situées sur le site anatomique de la première infection, sont l'une des premières cellules à entrer en contact avec les particules virales (Švajger et *al.*, 2010).

#### **I.4.3 Effets de la réplication virale sur les cellules hôtes**

Les effets cytopathiques observés dans les cellules en culture infectées par les phlébovirus varient considérablement, selon le virus et le type de cellule hôte examiné (Knipe, D et Howley, P, 2013).

Les virus sont souvent ciblés sur un certain organe ou type de cellule dans les infections spontanées des mammifères (Newton SE., 1981) :

- Dans les cellules de vertébrés, il a été découvert que plusieurs phlébovirus provoquaient une diminution de la synthèse des protéines de la cellule hôte, qui devenait plus perceptible à mesure que l'infection progressait.
- Dans les cultures cellulaires de moustiques, les membres de la famille transmis par les arthropodes, comme la plupart des autres arbovirus, ne provoquent aucune cytopathologie observable et la persistance virale est facilement maintenue.

## I.5 Manifestations cliniques

La fièvre du phlébotome est une maladie infectieuse virale aiguë, bénigne, autolimitée qui se caractérise par une virémie de courte durée, ainsi que la formation d'une papule à l'endroit de la piqûre du phlébotome. Elle provoque une variété de symptômes tels que : une fièvre (38,8-40,3°C), perte d'appétit, douleurs musculaires et articulaires, maux de tête, douleurs derrière le globe oculaire, diarrhée, nausées, vomissements et douleurs abdominales sont les symptômes d'accompagnement les plus courants (Ergunay, 2014).

Dans de rares cas, une hépatomégalie, une splénomégalie peuvent apparaître, ainsi qu'une hyperémie conjonctivale et une photosensibilité. Les résultats de laboratoire de la fièvre du phlébotome comprennent : lymphopénie, monocytose, thrombocytopenie, augmentation des enzymes hépatiques ainsi que de la créatinine kinase (CK) (Özkale et *al.*, 2016).

La fièvre du phlébotome doit être suspectée chez les individus qui arrivent avec une " fièvre de trois jours " caractéristique dans des endroits où les phlébotomes sont abondants. De même, l'infection par le TOSV doit être suspectée chez les patients atteints d'une maladie aiguë du SNC dans des endroits ruraux ou semi-ruraux où les phlébotomes sont présents pendant les mois d'été (Ayhan et *al.*, 2021).

Dans les zones endémiques, la fièvre du phlébotome est fréquemment diagnostiquée sur la base des symptômes cliniques, une confirmation en laboratoire étant recherchée dans le cas d'occurrences spécifiques, de maladies liées à des voyages/importées ou d'épidémies. Le diagnostic est établi par la clinique, les résultats des tests sanguins, des informations épidémiologiques et des tests virologiques et/ou sérologiques (Calisher et *al.*, 2021).

## I.6 Méthodes de détection des phlébovirus et de leurs infections

### I.6.1 Diagnostic direct

Isolement des virus : Les types de prélèvements les plus couramment soumis à des tests sont le sérum humain et le liquide cébrospinal (LCS) ; toutefois, les tissus post- mortem, le sang total et l'urine ou de surnageant d'homogénats obtenus à partir de tissus d'individus ou d'arthropodes infectés, entre autres, peuvent également convenir aux méthodes de détection directe (Ergunay et *al.*, 2011 ; Lambert et *al.*, 2016 ; Li M et *al.*, 2019).

Ces dernières années, plutôt que de recourir à la sérologie, les isolats ont été de plus en plus caractérisés par des approches basées sur les acides nucléiques (Hughes et *al.*, 2020 ; Wang et *al.*, 2020), y compris le séquençage du génome entier. Ce changement a facilité l'identification plus rapide des virus réassortis (Calzolari et *al.*, 2018 ; Baker et *al.*, 2021) et permet une classification taxonomique fondée sur des critères de démarcation basés sur les acides nucléiques (Calisher et *al.*, 2021).

RT-PCR : Les tests RT-PCR consensuels qui identifient le petit segment (Lambert et *al.*, 2009) ou utilisent une méthode pour détecter à la fois les petits et les gros segments (Weidmann et *al.*, 2008) se sont avérés particulièrement utiles pour détecter un large éventail d'espèces dans les enquêtes cliniques et épidémiologiques, les découvertes virales et la recherche sur la surveillance (Kay et *al.*, 2009 ; Woyessa et *al.*, 2014 ; Remoli et *al.*, 2016).

Après l'isolement, des tests de diagnostic indirect sont utilisées pour l'identification et caractérisation : des techniques basées sur les anticorps, comme la fixation du complément (FC), l'inhibition de l'hémagglutination (HI), les tests d'immunofluorescence (IFI) et les tests de neutralisation par réduction de plaque (PRNT) (Nicoletti et *al.*, 2014).

### I.6.2 Diagnostic indirect

La détection d'anticorps : Historiquement, l'inférence sérologique des infections à phlébovirus était principalement fournie par l'identification des anticorps dans les échantillons de sérum via les analyses HI et PRNT (Nicoletti et *al.*, 2014 ; Tesh RB et *al.*, 1976).

La sérologie pour toutes les infections virales est devenue plus largement employée pour le diagnostic aigu de première ligne en raison de la découverte des anticorps monoclonaux (MAbs), du test immuno-enzymatique (ELISA), et des antigènes recombinants (Percivalle et *al.*, 2021).

Les tests ELISA et IFA pour la détection des IgM et des IgG en kit et en format interne sont fréquemment utilisés lors des enquêtes sérologiques sur les phlébovirus (Billioud et *al.*, 2019).

La spécificité est accrue lorsque le dépistage de première ligne des IgM et IgG est complété par des analyses de confirmation PRNT, indiquant une séropositivité des infections de la fièvre Sandfly pouvant atteindre 42 % dans une étude, ce qui souligne la possible sous-estimation des phlébovirus dans la situation clinique (Percivalle et *al.*, 2021).

Sans aucun doute, disposer d'une gamme complète de méthodes de détection directe et d'approches basées sur les anticorps est la meilleure stratégie pour augmenter la probabilité d'identifier une infection à phlébovirus chez l'hôte humain (Percivalle et *al.*, 2021).

## I.7 Traitement

Il n'existe pas de vaccin pour la prévention de la fièvre du phlébotome. Par conséquent, la maladie doit être incluse dans le diagnostic différentiel chez les patients qui présentent certains ou tous les symptômes précédemment mentionnés pendant les mois d'été, lorsque les moustiques sont abondants (Calisher et *al.*, 2021).

Un vaccin créé pour l'un de ces virus a peu de chances d'être efficace contre un autre sérotype en raison de la grande diversité génétique et antigénique signalée entre les sérocomplexes de phlébovirus. Par conséquent, le concept d'un vaccin à large spectre doit sans doute passer par la mise au point d'un vaccin à trois virus au moins (Alkan et *al.*, 2013).

Le traitement de la fièvre du phlébotome en ces temps actuels est donc symptomatique et la maladie se résout de manière spontanée. Une hydratation, un repos au lit et des analgésiques doivent être administrés aux patients hospitalisés (Özkale et *al.*, 2016). Ces dernières années, des solutions alternatives ont été proposées, basées sur l'utilisation de vaccins ciblant non pas un pathogène particulier mais des protéines salivaires d'arthropodes. Cibler la salive du vecteur ce qui pourrait empêcher la création du microenvironnement nécessaire à la transmission du pathogène (Manning et *al.* 2018).

Cependant, des recherches supplémentaires sur le terrain sont nécessaires pour déterminer si ce type de vaccination peut conférer une protection substantielle et à long terme contre les maladies à transmission vectorielle (Manning et *al.*, 2020).

## I.8 Prévention

Les pratiques actuelles de prévention et de contrôle de la propagation des maladies arbovirales peuvent être classées en deux catégories : celles qui se concentrent sur les arthropodes vecteurs et celles qui ciblent les virus eux-mêmes par le biais de vaccins ou de thérapies (Socha et *al.*, 2022).

Bien que ces dernières soient l'une des stratégies les plus efficaces pour prévenir les maladies infectieuses, les vaccins contre seulement quelques-uns des principaux arbovirus sont actuellement disponibles dans le commerce (Silva et *al.*, 2018) et uniquement dans le domaine vétérinaire (Socha et *al.*, 2022).

Ces dernières années, des solutions alternatives ont été proposées, basées sur l'utilisation de vaccins ciblant non pas un pathogène particulier mais des protéines salivaires d'arthropodes. Cibler la salive du vecteur ce qui pourrait empêcher la création du microenvironnement nécessaire à la transmission du pathogène (Manning et *al.*, 2018).

Cependant, des recherches supplémentaires sur le terrain sont nécessaires pour déterminer si ce type de vaccination peut conférer une protection substantielle et à long terme contre les maladies à transmission vectorielle (Manning et *al.*, 2020).

De nombreuses stratégies de prévention donc ont été développées, en commençant par les vecteurs, en raison de leur propagation géographique rapide, de la pertinence des virus qu'ils transportent, et donc du risque considérable pour la vie humaine (Socha et *al.*, 2022).

La première stratégie vise à réduire la population locale d'arthropodes vecteurs en limitant leur interaction avec des hôtes potentiels ou en supprimant leur capacité à propager les virus. Ceci peut être réalisé en combinant des types de mécanismes de contrôle établis (environnementaux, mécaniques, biologiques et chimiques) avec des approches génétiques récemment développées (Socha et *al.*, 2022).

Les méthodes environnementales sont utilisées pour modifier les écosystèmes locaux afin qu'ils soient moins propices à la reproduction ou à la survie d'un certain vecteur. La diminution à la source de la population de phlébotomes est un défi car, pour la plupart des espèces connues, il existe relativement peu d'informations sur les habitats et les sites de reproduction de leurs stades immatures (Warburg et *al.*, 2011 ; Feliciangel, 2004).

Certaines expériences pour limiter la population adulte de l'un des phlébotomes, *Phlebotomus argentipes*, ont été obtenues grâce à des mesures simples telles que le plâtrage

des trous dans les maisons et les étables où des sites de reproduction ont été identifiés (Kumar et al., 1999).

Les méthodes mécaniques de lutte contre les vecteurs reposent sur l'utilisation de divers pièges conçus pour attirer et tuer les vecteurs, ou sur l'utilisation de filets imprégnés d'insecticides pour réduire les possibilités de se nourrir et de transmettre l'infection (Boussaa, 2008).

Actuellement, deux grandes catégories d'insecticides chimiques sont utilisées dans la lutte contre les vecteurs : les larvicides (ciblant les stades immatures), y compris les régulateurs de croissance des insectes (par exemple, le pyriproxifène) et les adulticides. Cependant, comme les phlébotomes se reproduisent à l'état terrestre et que leurs larves sont difficiles à localiser, les mesures de lutte se limitent généralement à celles qui ciblent les individus adultes (Alexander & Maroli, 2003).

Bien que les méthodes de lutte chimique se soient avérées efficaces pour contrôler les maladies à transmission vectorielle, leur utilisation continue suscite de plus en plus d'inquiétudes en raison de leur effet négatif potentiel sur la santé humaine et de l'émergence de résistances dans les populations de vecteurs ciblées (Hemingway, J., & Ranson, H, 2000).

Les techniques de lutte biologique, qui utilisent des champignons entomopathogènes (par exemple *Beauveria bassiana*), des toxines bactériennes ou de larvicides naturels (par exemple, les produits de *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* (Bti) ) ou un produit de fermentation de *Saccharopolyspora spinosa* (Spinosan), sont considérées comme un substitut viable aux pesticides car elles sont moins coûteuses, plus sûres pour l'environnement et moins susceptibles de développer une résistance dans la population de vecteurs visée (Huang et al., 2017).

En plus, les prédateurs naturels des espèces vectrices sont utilisés comme biocontrôle alternatif s'ils ne sont spécifiques que de quelques espèces, à condition qu'ils soient spécialisés dans certains vecteurs, qu'ils n'entrent pas en compétition avec les espèces locales, qu'ils soient faciles à cultiver dans des conditions artificielles et qu'ils soient introduits dans l'écosystème en quantité suffisante (Ostfeld et al., 2006).

Les approches de contrôle génétique, quant à elles, reposent sur l'introduction d'insectes génétiquement modifiés en grand nombre dans l'environnement. La suppression des populations peut être obtenue en introduisant des mâles stériles (la technique dite de l'insecte stérile - SIT) entraînant un déclin de la population locale suivi d'une faible reproduction (Wang et al.,

2021), ou des porteurs de mutations létales visant à produire une descendance caractérisée par une forte mortalité, comme le développement de femelles dépourvues de la capacité de voler (Navarro-Payá et *al.*, 2020).

Ces tactiques ne s'excluent pas mutuellement et peuvent être utilisées conjointement dans le cadre de la gestion intégrée des vecteurs, qui se définit comme un processus décisionnel logique visant à optimiser l'utilisation des ressources de lutte antivectorielle (**Fig.14**) (Socha et *al.*, 2022).

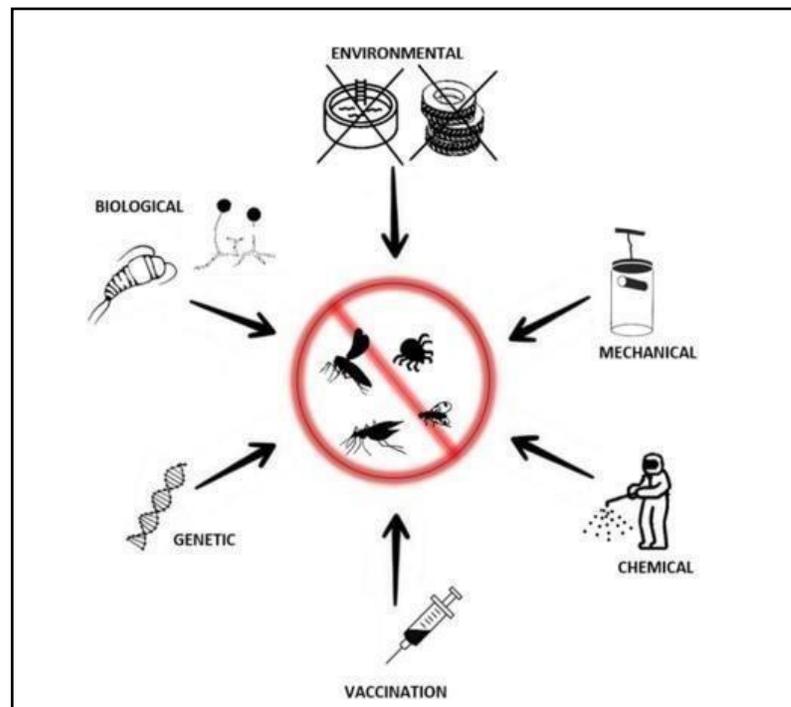


Figure 14: Mesures de prévention du contrôle des arboviroses (Socha et *al.*, 2022).

# **Chapitre II :**

## **Matériels et méthodes**

## II.1 Présentation de la zone d'étude

Rouïba est une daïra située à 21 km de la périphérie Est de la wilaya d'Alger en Algérie. Ville a vocation agricole, elle devient une ville industrielle après la seconde guerre mondiale avec la plus grande zone industrielle du pays. Le climat dans Rouïba ainsi que ces communes est méditerranéen, avec des hivers doux et pluvieux et des étés chauds et ensoleillés, ce qui permet la transmission accidentelle de ce virus vers la population de cette région.

## II.2 Description de la population d'étude

Ce sont des patients asymptomatiques qui se sont présentés au mois de Février 2020 au niveau de hôpital de Rouïba (wilaya d'Alger) et chez lesquels il a été prélevé un échantillon de sang dans le cadre d'un bilan d'orientation, préopératoire, de suivi de maladie chronique,...etc. Les patients sont tous des habitants de la daïra de Rouïba et ses environs depuis plus d'un an.

## II.3 Matériel

### II.3.1 Matériel biologique

#### A. Prélèvements sanguins

A partir des prélèvements sanguins après centrifugation, les sérums ou les plasmas ont été récupérés, et conservés à -20°C jusqu'à l'analyse sérologique.

#### B. Antigène

L'antigène utilisé a été produit à partir de la souche du TOSV inoculée sur culture cellulaire Vero (lignée cellulaire épithéliale de rein de singe) pour amplification. Après lyse cellulaire, le surnageant contenant les particules virales, inactivées par  $\beta$ - Propiolactone.

#### C. Surnageant

C'est le contrôle négatif cellulaire (culture cellulaire Vero non infectée par le virus), qui a subi le même procédé que pour la production de l'antigène.

#### D. Témoins positif et négatif

Sérums humains préalablement testés et confirmés sérologiquement, choisis comme contrôles positifs ou négatifs pour les IgG anti-phlébovirus pour la validation de la technique.

### II.3.2 Matériel non-biologique

L'ensemble complet de l'équipement conventionnel, y compris les dispositifs, les matériaux réactifs, les produits chimiques et la verrerie, qui a été utilisé dans cette étude est décrit dans l'annexe (A). Les solutions et environnements préparés sont décrits en détail dans l'annexe (B).

### II.4 Méthode d'étude

Les différentes méthodes utilisées dans cette étude ainsi que les étapes suivies dans la partie expérimentale sont représentées dans le diagramme ci-dessous (**Fig.15**) :

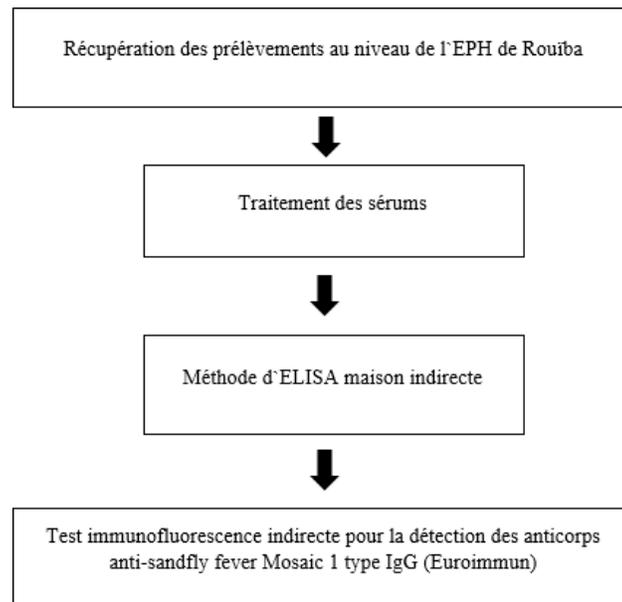


Figure 15: Schéma représentatif des différentes étapes dans la partie expérimentale.

#### II.4.1 Phase pré-analytique

##### A. Collecte des sérums

La collecte des sérums a été faite aléatoirement au niveau de l'hôpital de ROUIBA. Des sérums de patients asymptomatiques, pour des analyses de routine, ont été récupérés. Au total, 155 sérums ont été collectés et conservés jusqu'au jour de l'analyse.

## B. Traitement des sérums

Les prélèvements sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  et transportés dans une glacière vers le laboratoire pour analyse, accompagnés des fiches de renseignements qui recueille des informations sur les patients, telles que l'âge, le sexe, le type de résidence, le type de profession, afin d'étudier les facteurs de risque. Des codes internes ont été attribués aux prélèvements, après avoir vérifié leur correspondance avec les fiches remises (nom & prénom, âge, sexe, profession, commune/ lieu de résidence), et la saisie des données des patients sur le logiciel SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

### II.4.2 Phase analytique

#### A. Test ELISA maison indirecte

L'ELISA dont le nom correspond à un acronyme anglais : « Enzyme- Linked Immuno Sorbent Assay » qui signifie « test d'immuno-absorption enzymatique », est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

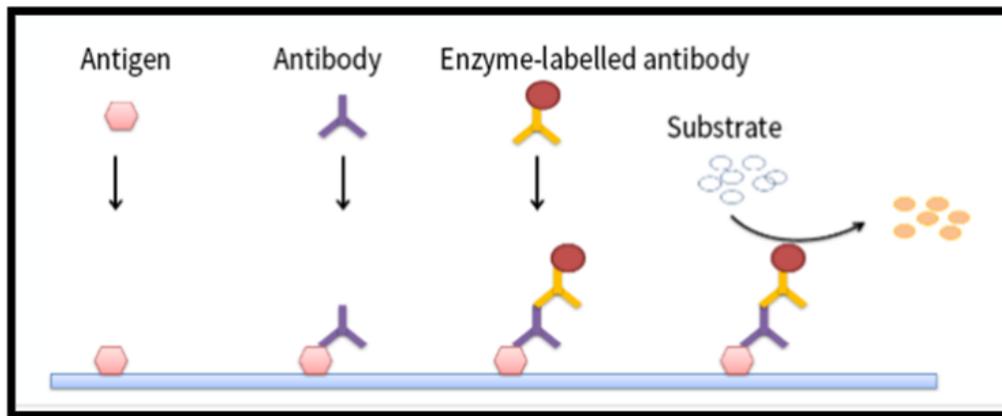


Figure 16: Principe du test ELISA indirecte, accéder le 31 Mai 2022

<https://www.sinobiological.com/category/indirect-elisa>

- Protocole :

Principe : Technique immuno-enzymatique indirecte semi-quantitative à la recherche des immunoglobulines type IgG anti-virus Toscana dans le sérum ou le plasma (**Fig. 16**).

- Mode opératoire:

1er jour:

1. Coating de la plaque :

Diluer l'antigène TOSV et le surnageant cellulaire à 1/300ème dans du PBS, distribuer 100 micros litres par puits de ces dilutions dans les cupules correspondantes puis couvrir la plaque d'un film adhésif et incubé pendant une nuit à une température comprise entre +2°C et +8°C.

2eme jour :

2. Lavage de la plaque :

Retirer le film adhésif et effectuer une aspiration du contenu de la plaque à l'aide d'un laveur automatique (laveur de microplaques PW40 de Bio-Rad) et sécher la plaque en la tapotant sur du papier absorbant.

3. Saturation de la plaque :

Préparer la solution de saturation à 5% de lait dans du PBS et distribuer 250 microlitres par puits de la solution de saturation dans toutes les cupules, puis couvrir la plaque et incubé 60 min à température ambiante (18°C à 25 °C).

4. Lavage de la plaque :

À l'aide d'un laveur automatique, effectuer 4 cycles de lavage par la solution de PBST à 0,05% en laissant un temps de trempage de 1 min avant chaque cycle. Après le dernier lavage, retournez la plaque et tapoter-la sur du papier absorbant pour bien la sécher.

5. Dépôt des échantillons/contrôles :

Préparer le tampon de dilution à 3% de lait dans du PBST à 0,05% et ajuster le pH 7,2 +/- 0,1 pour la dilution des contrôles (négatif, positif) et les échantillons de sérums ou de plasma au 1/100ème dans le tampon de dilution, puis déposer 100 micros litres par puits de chaque dilution dans les cupules correspondantes. En fin, Couvrir la plaque et incubé 60 min à 37 °C +/- 1 °C.

6. Lavage de la plaque :

À l'aide d'un laveur automatique, effectuer 4 cycles de lavage par la solution de PBST à 0,05% en laissant un temps de trempage de 1 min avant chaque cycle. Après le dernier lavage, retourner la plaque et tapoter-la sur du papier absorbant pour bien la sécher.

7. Ajout du conjugué :

Diluer le conjugué (anti-corps anti-IgG humaine couplé à une peroxydase) au 1/15000<sup>ème</sup> dans le tampon de dilution et distribuer 100 micros litres par puits de cette dilution dans toutes les cupules puis couvrir la plaque et incuber 60 min à 37 °C +/- 1 °C.

8. Lavage de la plaque :

À l'aide d'un laveur automatique, effectuer 4 cycles de lavage par la solution de PBST est à 0,05% en laissant un temps de trempage de 1 min avant chaque cycle. Après le dernier lavage, retourner la plaque et tapoter-la sur du papier absorbant pour bien la sécher.

9. Ajout du substrat :

À l'abri de la lumière, mettre 80 micros litres de substrat chromogène (TMB) dans chaque puits de la plaque. Puis Incuber la plaque à l'obscurité et à température ambiante (18 °C à 25 °C) pendant 5min.

10. Ajout de la solution d'arrêt :

Ajouter 80 microlitres de la solution d'arrêt (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N) dans chaque puits de la plaque, dans le même ordre et avec la même vitesse pour que le substrat.

11. Lecture :

Agiter légèrement la plaque pour assurer une distribution homogène de la solution et mesurer les densités optiques (DO) à deux longueurs d'onde (450nm et 620/650nm) dans les 30 min suivant l'ajout de la solution d'arrêt.

- Validation de la technique :

Vérifier que la DO de surnageant de chaque contrôle est inférieure à 0,1 et calculer les différences de DO des contrôles (négatif, positif) comme suit :

$$\text{Différence de DO} = \text{DO antigènes contrôle} - \text{DO surnageant contrôle}$$

Vérifier que :

- la valeur de la différence de DO du contrôle positif et supérieur à 0,2.
- la valeur de la différence de DO du contrôle négatif et inférieure à 0,1.

- Calcul in interprétation des résultats :

Vérifier que la DO du surnageant de chaque échantillon est inférieur à 0,1 puis calculer les différences de DO des échantillons comme suit :

$$\text{Différence de DO} = \text{DO antigènes échantillon} - \text{DO surnageant échantillon}$$

- Faire l'interprétation des résultats de chaque échantillon comme suit :

**Différence de DO  $\leq$  0,1 = Résultat négatif**

**Différence de DO  $\geq$  0,2 = Résultat positif**

**0.1 < Différence de DO < 0,2 = Résultat douteux (indeterminé)**

**Tableau 1 : exemple de la demi-plaque ELISA de notre expérimentation (manipulation du 03-04/04/2022).**

Ag : Antigène ; Sur : Surnageant ; CN : Contrôle négatif ; CP : Contrôle positif ; R : Rouïba.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CN	CN	R67/20	R67/20	R75/20	R75/20						
B	CP	CP	R68/20	R68/20	R76/20	R76/20						
C	R61/20	R61/20	R69/20	R69/20	R77/20	R77/20						
D	R62/20	R62/20	R70/20	R70/20	R78/20	R78/20						
E	R63/20	R63/20	R71/20	R71/20	R79/20	R79/20						
F	R64/20	R64/20	R72/20	R72/20	R81/20	R81/20						
G	R65/20	R65/20	R73/20	R73/20	R82/20	R82/20						
H	R66/20	R66/20	R74/20	R74/20	R83/20	R83/20						
	Sur	Ag	Sur	Ag	Sur	Ag						

#### II.4.3 Test immunofluorescence indirecte pour la détection des anticorps anti-Sandfly Fever Virus Mosaic 1 type IgG (Euroimmun®)

○ Principe :

Technique d'immunofluorescence indirecte a la recherché des immunoglobulines type IgG anti-Sandfly Fever virus (types Sicilien, Naples, Toscana et Cyprus virus) dans le sérum ou le plasma. Le test est qualitatif mais peut être semi-quantitatif.

o Mode opératoire :

1. Dilution des échantillons :

Diluer les échantillons au 1/100eme dans le tampon de dilution

## 2. Répartition des échantillons sur la plaque :

A l'aide d'une pipette, déposer 30 microlitres du contrôle positif, du contrôle négatif et des dilutions des sérums sur chaque champ de réaction correspondant de la plaque, tout en évitant les bulles d'air. Ajuster les diapositives de biopuces sur les champs correspondants de la plaque, en assurant que chaque échantillon est en contact avec sa biopuce et que les échantillons ne viennent pas en contact les uns avec les autres et incuber à température ambiante (18°C à 25°C) pendant 30 min.

## 3. Lavage :

A l'aide d'une pissette, verser abondamment la solution de lavage sur les diapositives de biopuces, puis plonger-les immédiatement après dans un bac contenant la solution de lavage pendant au moins 5 min, sous agitation. Faire sortir les diapositives de biopuces du bac et essuyer leur dos et leurs bords avec un papier absorbant, sans toucher les zones entre les champs de réaction.

## 4. Ajout du conjugué :

A l'abri de la lumière, déposer 25 microlitres du conjugué (anticorps anti-IgG humaine marqué à la fluorescence) sur chaque champ de réaction d'une plaque propre et ajuster immédiatement les diapositives de biopuces sur les champs correspondants de la plaque, en vérifiant que les biopuces sont bien en contact avec le conjugué puis incuber à température ambiante (18°C à 25°C) pendant 30 min, à l'abri de la lumière.

## 5. Lavage :

A l'aide d'une pissette, verser abondamment la solution de lavage sur les diapositives de biopuces, puis prolonger-les immédiatement dans un bac contenant la solution de lavage pendant 5 min, sous agitation. Faire sortir les diapositives de biopuces du bac et essuyer leur dos et leurs bords avec un papier absorbant, sans toucher les zones entre les champs de réaction.

## 6. Montage :

Sur la lamelle, déposer une gouttelette de milieu de scellage (max 10 microlitres) dans chaque champ de réactions puis mettre la diapositive de biopuces sur la lamelle préparée en vérifiant quelle est bien ajustée et que les gouttelettes de milieu de scellage sont bien en contact avec les biopuces.

## 7. Lecture :

La lecture se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence, avec un objectif 10x et 40x sur les quatre champs de la biopuce.

<b>SFSV</b>	<b>CYPV</b>
<b>SFNV</b>	<b>TOSV</b>

Les anticorps anti-Sandfly Fever virus donnent une fluorescence verte des cellules infectées, essentiellement cytoplasmique. Les cellules non infectées ne montrent aucune fluorescence.

Validation de la technique :

⇒ Le contrôle positif doit montrer une fluorescence verte, essentiellement cytoplasmique, des cellules infectées et une absence de la fluorescence dans les cellules non infectées.

⇒ Le contrôle négatif ne doit pas montrer de fluorescence.

o Interprétation des résultats :

L'interprétation des résultats des échantillons doit se faire suivant le tableau :

<b>réaction IgG</b>	<b>Résultat</b>
Absence de réaction a 1/100	Négatif : absence d'anticorps type ou IgG anti-virus Sandfly Fever
Réaction positive a 1/100	Positif : présence d'anticorps type ou IgG anti-virus Sandfly Fever

io

## **II.5. Analyse statistique**

Nous avons effectué une comparaison de pourcentages avec le test de Student et khi2, en utilisant le logiciel SPSS (version 23). Ces tests permettent de calculer la valeur exacte de p et de comparer les différentes séroprévalences obtenues. Une différence est dite significative si la valeur de p est inférieure à 0,05.

# **Chapitre III :**

## **Résultats et discussion**

## III.1 Résultats

### III.1.1 Test ELISA maison indirecte

Les résultats du test ELISA ont montré que 17 des 155 patients ont été testés positifs pour les IgG anti-phlébovirus.

### III.1.2 Test immunofluorescence indirecte

Parmi les 17 sérums positifs testés par IFI, 11 ont été déterminés comme étant du sérotype TOSV, avec seulement deux appartenant au sérotype SFNV. Les trois échantillons restants, positifs au test ELISA mais négatifs au test IFI, peuvent suggérer la présence d'autres phlébovirus en circulation (autres que les quatre sérotypes testés).

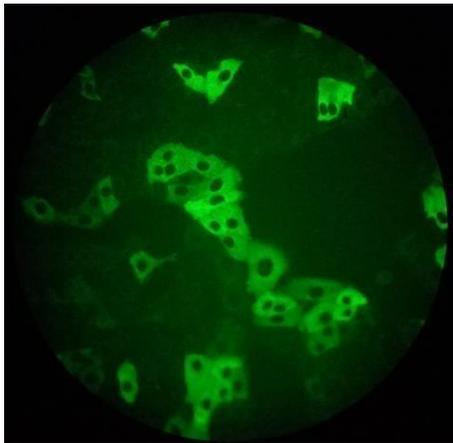


Figure 17: vue au microscope à fluorescence d'un sérum positif IgG anti-phlébovirus (sérotype TOSV) Gx40

### III.1.3 Séroprévalence globale des Ac anti-phlébovirus

L'étude de la prévalence des phlébovirus dans les sérums étudiés a révélé que sur la totalité des 155 sujets étudiés, 17 sont avérés positifs pour les IgG anti-phlébovirus, ce qui correspond à une séroprévalence globale dans notre échantillon d'environ 10,96% (**Fig.18**).

La séroprévalence globale est passée de 10,96% avec le test ELISA à 8,38% après le test d'immunofluorescence indirecte qui ne recherche que quatre sérotypes.

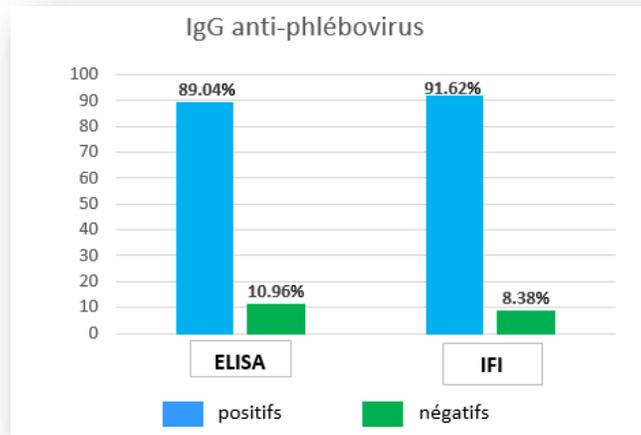


Figure 18: histogramme représentatif de la distribution de la séroprévalence totale des IgG anti- Phlébovirus dans la région Est d'Alger.

### III.1.4 Répartition de la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus a Rouïba et ses communes

Après application du test statistique, la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus a révélé l'absence de différence significative entre les communes de la région Est d'Alger ( $P=0,24 > 0,05$ ). En effet nos données indiquent une prévalence de 13,4% dans la commune de Rouïba et 4,9% dans les autres communes (Fig.19).

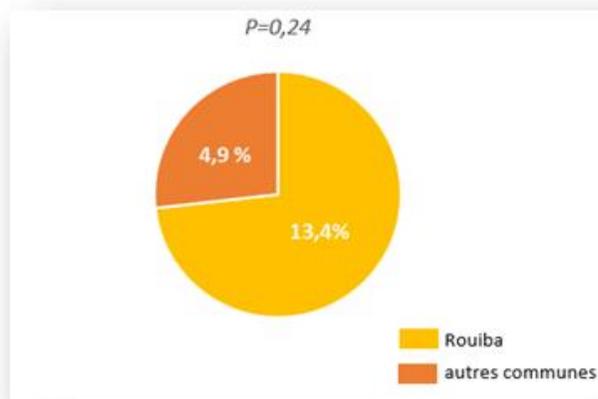


Figure 19: Distribution de la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus a Rouïba et ses communes

### III.1.5 Répartition de la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus selon le sexe

Les résultats obtenus indiquent que sur les 100 sujets de sexe masculin testés, 11 sont positifs en IgG anti-phlébovirus, ce qui correspond à une séroprévalence de 11%. Cette séroprévalence ne présente pas une différence significative par rapport à celle retrouvée chez les sujets de sexe féminin (10,9%) ( $P=0,986>0,05$ ) pour un risque d'erreur de 5% (**Fig.20**).

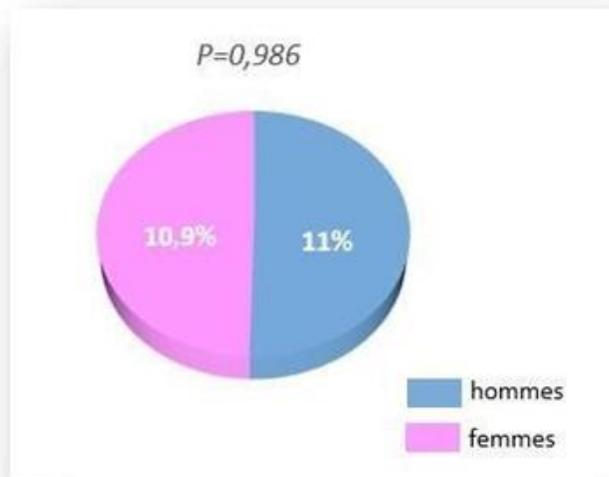


Figure 20 : Distribution de la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus selon le sexe.

### III.1.6 Répartition de la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus selon le type de résidence

Les résultats obtenus ont montré l'absence de différence significative de la séroprévalence en IgG anti-phlébovirus chez les sujets qui habitent dans les zones rurales avec ceux qui habitent dans les zones urbaines ( $P=0,36>0,05$ ) (**Fig.21**).

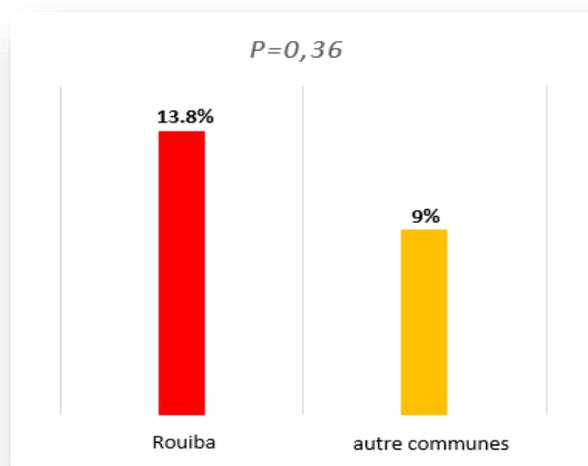


Figure 21: Distribution de la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus selon le type de résidence.

### III.1.7 Répartition de la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus selon l'âge

Nous avons étudié la répartition des sujets positifs en IgG anti-phlébovirus selon deux tranches d'âge. Pour la première tranche (inférieur ou égal à 15 ans), la séroprévalence était de 2,9% et pour la deuxième tranche (supérieur à 15 ans), elle était de 13,3% (**Fig.22**). L'analyse ne montre pas de différence significative ( $P=0,12>0,05$ ).

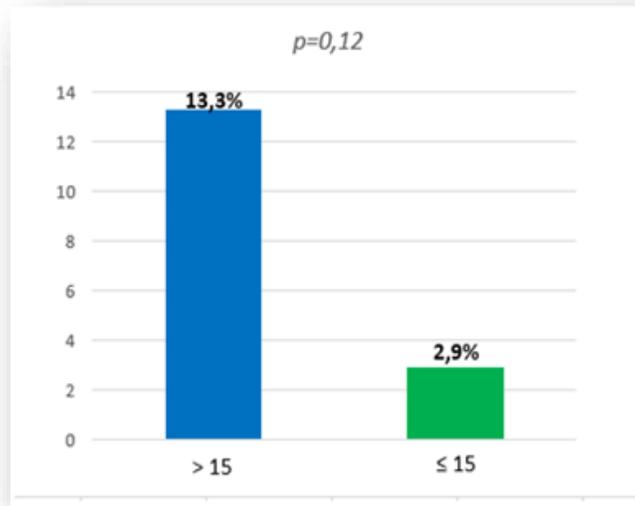
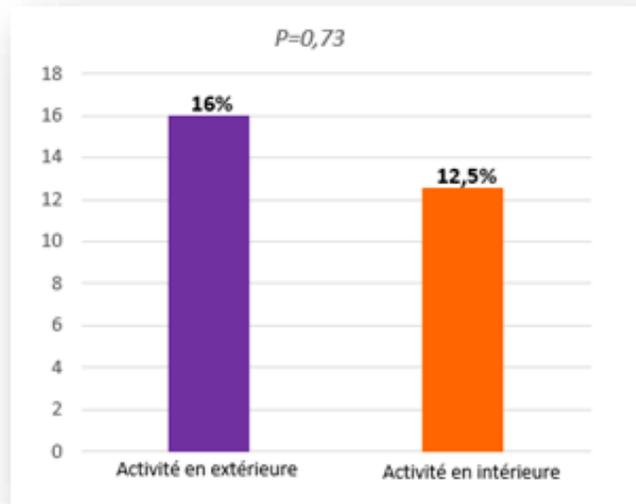


Figure 22: Distribution de la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus selon l'âge.

### III.1.8 Répartition de la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus selon le type de profession

Les résultats de séroprévalence des IgG anti-phlébovirus obtenus montrent l'absence de différence statistiquement significative chez les sujets qui ont une activité professionnelle à l'extérieur (16%) par rapport à ceux qui ont une activité professionnelle à l'intérieur (12,5%) ( $P=0,73>0,05$ ) (**Fig.23**).



**Figure 23:** Distribution de la séroprévalence des IgG anti-phlébovirus selon le type de profession.

## III.2 Discussion

Mis à part quelques enquêtes rapportant l'activité des phlébovirus dans le nord de l'Algérie, qui ont révélé des anticorps contre les virus de Sicile et de Naples, il existe très peu de données sur la distribution des phlébovirus à travers le pays. Nos résultats apportent des données supplémentaires sur la circulation de ces pathogènes dans le nord de l'Algérie, plus particulièrement la population de la région Est d'Alger.

Notre travail avait pour objectif d'évaluer l'étendue de la circulation des phlébovirus dans la région Est d'Alger, considérée comme une zone à risque pour ces derniers.

Nos données montrent que les virus "Sandfly Fever Naples" (SFNV ; sérotype napolitain) et le virus "Toscana" (TOSV ; sérotype toscan) circulent dans cette zone. En effet, 17 échantillons de sérums et de plasma (soit 10,96% de la population totale de l'étude) se sont avérés avoir des anticorps anti-phlébovirus.

Nos résultats sont similaires à ceux retrouvés dans la région, ou des études de séroprévalence menées dans les régions de Kabylie et d'Alger, ont rapporté des anticorps contre les virus de type sicilien et napolitain à des taux respectifs de 21,6 % et de 10,6 % en utilisant les tests IFI et ELISA (Izri et *al.*, 2008 ; Moureau et *al.*, 2010), ce qui témoigne d'une circulation endémique de ces virus dans cette partie du pays.

On constate par comparaison aux données de circulation du TOSV et SFNV des enquêtes de séroprévalence sur des sérums provenant de populations vivant dans les mêmes régions ont révélé que la région d'Est d'Alger est une zone à moyenne endémicité avec une séroprévalence constante entre les études menées en 2008-2010 et notre présent travail (Izri et *al.*, 2008 ; Moureau et *al.*, 2010).

Nos résultats sont en accord avec de nombreux arguments qui plaident en faveur d'une circulation active des virus dans cette région : Tout d'abord, l'abondance des vecteurs, les phlébovirus qui sont largement répandus dans la zone entourée d'habitations et de zones urbaines avec une grande variété de végétation présentant un environnement propice à la reproduction des phlébotomes.

En outre, le climat méditerranéen dans cette région, avec des hivers doux et pluvieux et des étés chauds et ensoleillés est favorable à la propagation des phlébotomes et à l'augmentation de leur capacité vectorielle et leur présence en grande abondance.

Par ailleurs, la comparaison des niveaux de prévalence entre les communes étudiées n'a pas révélé une différence statistiquement significative ( $P=0,24>0,05$ ), bien que la proportion des anticorps anti-phlébovirus dans la commune de Rouïba soit pratiquement le double par rapport aux autres communes. L'effectif faible des échantillons de ces dernières pourrait expliquer que le test statistique n'a pas été concluant.

Notre enquête n'a pas permis de révéler une différence statistiquement significative entre les personnes de sexe masculin et de sexe féminin ( $p=0,986>0,05$ ). En effet cette séroprévalence est de 10,9% chez les femmes et de 11 % chez les hommes. Ces résultats sont en conformité avec une étude de séroprévalence menée en Grèce. Dans l'ensemble, des anticorps IgG contre le TOSV ont été détectés chez 46/219 (21%) individus. Il n'y avait pas de différence significative associée à la séropositivité entre les hommes et les femmes (Anagnostou et *al.*, 2013).

En outre, notre enquête n'a également pas permis de mettre en évidence une différence statistiquement significative entre les personnes résidant dans une zone rurale et celles résidant dans une zone urbaine ( $P=0,36>0,05$ ). En effet cette séroprévalence est de 13,8% pour les zones rurales et de 9% pour les zones urbaines. Ces résultats sont en désaccord avec une étude de séroprévalence du TOSV réalisée par Calamusa et *al.* (2012) où une différence significative a été constatée entre les habitants des zones rurales et ceux des zones urbaines.

La topographie de la région de notre étude marquée par une forte végétation et la forte pollution des zones urbaines qui sont directement liée aux foyers des phlébotomes et aussi à la présence des égouts et des jardins dans les zones urbaines rendent les deux zones (rurale et urbaine) semblables écologiquement avec un risque d'infection similaire dans la région d'étude.

De même, le lien entre le risque d'infection par le TOSV et SFNV et l'âge n'a pas pu être établi dans notre étude ( $P=0,12>0,05$ ), bien que de nombreuses études ont rapporté un risque d'infection plus élevé chez les sujets adultes par rapport aux enfants (Sghaier et *al.*, 2012 ; Maia et *al.*, 2021). L'effectif faible des échantillons chez les sujets de moins de 15 ans pourrait expliquer l'absence d'une différence significative. Un travail complémentaire est donc nécessaire avec un plus grand échantillonnage pour augmenter la sensibilité du test statistique.

La comparaison des résultats de séroprévalence du TOSV et SFNV selon le type d'activité professionnelle (intérieure, extérieure) n'a pas révélé de différence significative ( $p = 0.73 > 0,05$ ).

En fin, notre travail a permis de montrer que parmi les 17 sérums positifs testés en IFI, plus que la moitié (11/17) se sont avérés être du sérotype TOSV et 2 seulement sont du sérotype SFNV. Les 3 autres sérums positifs en ELISA mais négatifs en IFI peuvent témoigner de la circulation d'autres phlébovirus (autres que les quatre sérotypes du test).

## Conclusion

Les résultats de recherche de la circulation du TOSV et le SFNV en Algérie ont permis de confirmer leur circulation dans la région du Nord avec des taux de prévalence chez les personnes résidant dans les différentes localités prospectées.

Dans notre étude, la circulation du TOSV et le SFNV dans la région Est d'Alger a bien été établie. En effet, nos données indiquent la circulation des deux sérotypes ou autres virus apparentés dans cette région avec un taux de prévalence de 10,96%. La confirmation par la technique d'IFI a montré une prévalence effective du TOSV de 7,09% et SFNV 1,93%, ceci permet de considérer la région Est d'Alger comme une région de moyenne endémicité pour le TOSV.

Afin de mieux comprendre la dynamique de circulation du TOSV dans cette région, il est nécessaire de compléter ce travail par des études entomologiques sur les vecteurs et les hôtes réservoirs possibles pour une meilleure caractérisation des souches virales en circulation. Compte tenu de la circulation endémique du TOSV dans cette région, il est nécessaire de rechercher systématiquement ce virus devant tout cas d'infections neuro-méningées d'étiologie supposée virale, particulièrement durant la saison estivo-automnale, aussi chez l'homme que l'animal. On suggère aussi de faire des enquêtes séro-épidémiologiques à large spectre en recrutant un nombre important d'échantillons pour déceler les différents facteurs de risque d'infection pour ce virus dans cette région. Le faible échantillonnage de notre étude n'a pas permis de révéler les facteurs de risque pour cibler la recherche du virus.

## Références bibliographiques :

### A

Alexander B. Sampling methods for phlebotomine sand flies. *Med Vet Entomol* 2000; 14:109–122

Alkan, C., Bichaud, L., de Lamballerie, X., Alten, B., Gould, E., & Charrel, R. (2013). Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: Epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral Research*, 100(1), 54-74. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.07.005

Alten, B.; Maia, C.; Afonso, O.; Campino, L.; Jiménez, M.; González, E.; Molina, R.; Bañuls, A.L.; Prudhomme, J.; Vergnes, B.; et al. Seasonal dynamics of phlebotomine sand fly species proven vectors of Mediterranean leishmaniasis caused by *Leishmaniainfantum* 2016,. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004458.

Alten B, Ozbel Y, Ergunay K, Kasap OE, et al. Sampling strategies for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Europe. *Bull Entomol Res* 2015; 105:664–768.

Anagnostou, V., & Papa, A. (2013). Seroprevalence of Toscana virus among residents of Aegean Sea islands, Greece. *Travel Medicine And Infectious Disease*, 11(2), 98-102. doi: 10.1016/j.tmaid.2012.11.006

Anderson, W. (1941). Clinical Observations on Sandfly Fever in the Peshawar District. *BMJ Military Health*, 77(5), 225-239. Retrieved from <https://militaryhealth.bmj.com/content/77/5/225>

Ayhan N, Baklouti A, Prudhomme J, Walder G, Amaro F, Alten B, Moutailler S, Ergunay K, Charrel RN, Huemer H. 2017. Practical guidelines for studies on sandfly-borne phleboviruses: part I: important points to consider ante field work. *Vector Borne Zoonotic Dis* 17:73– 80. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1957>.

Ayhan, N., & Charrel, R. (2020). An update on Toscana virus distribution, genetics, medical and diagnostic aspects. *Clinical Microbiology And Infection*, 26(8), 1017-1023. doi: 10.1016/j.cmi.2019.12.015

Ayhan, N., Charrel, R. (2018). Emergent Sand Fly–Borne Phleboviruses in the Balkan Region. *Emerging Infectious Diseases*, 24(12), 2324-2330. doi: 10.3201/eid2412.171626

## B

Baker M., Hughes H., Naqvi S., Yates K., Velez J., McGuirk S., Schroder B., Lambert A., Kosoy O., Pue H., et al. Reassortant Cache Valley Virus associated with acute febrile, nonneurologic illness, Missouri. *Clin. Infect. Dis.* 2021 doi: 10.1093/cid/ciab175.

Benallal, K., Gani, R., Harrat, Z., Volf, P., & Dvorak, V. (2022). Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Maghreb region: A systematic review of distribution, morphology, and role in the transmission of the pathogens. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 16(1), e0009952. doi: 10.1371/journal.pntd.0009952

Bergren, N., & Kading, R. (2018). The Ecological Significance and Implications of Transovarial Transmission among the Vector-Borne Bunyaviruses: A Review. *Insects*, 9(4), 173. doi: 10.3390/insects9040173

Billioud G., Tryfonos C., Richter J. The prevalence of antibodies against Sandfly Fever Viruses and West Nile Virus in Cyprus. *J. Arthropod. Borne Dis.* 2019;13:116–125. doi: 10.18502/jad.v13i1.938.

Boussaa S. (2008) - epidemiologie des leishmanios dans dal region de Marrakech, Maroc : effet de l'urbanisation sur la repartition spatio-temporelle des phlebotomes et caracterisation moleculaire de leurs populations. these de doctorat, Univ. Louis Pasteur Starsbourg 1, 181p

Brett-Major, D., & Claborn, D. (2009). Sand Fly Fever: What Have We Learned in One Hundred Years?. *Military Medicine*, 174(4), 426-431. doi: 10.7205/milmed-d-01-7508.

## C

Calamusa, G., Valenti, R., Vitale, F., Mammina, C., Romano, N., & Goedert, J. et al. (2012). Seroprevalence of and risk factors for Toscana and Sicilian virus infection in a sample population of Sicily (Italy). *Journal Of Infection*, 64(2), 212-217. doi: 10.1016/j.jinf.2011.11.012

Calisher, C., & Calzolari, M. (2021). Taxonomy of Phleboviruses, Emphasizing Those That Are Sandfly-Borne. *Viruses*, 13(5), 918. doi: 10.3390/v13050918

Calisher, C., Weinberg, A., Muth, D., &Lazuick, J. (1987). TOSCANA VIRUS INFECTION IN UNITED STATES CITIZEN RETURNING FROM ITALY. *The Lancet*, 329(8525), 165-166. doi: 10.1016/s0140-6736(87)92005-8

Calzolari, M., Chiapponi, C., Bellini, R., Bonilauri, P., Lelli, D., & Moreno, A. et al. (2018). Isolation of three novel reassortantphleboviruses, Ponticelli I, II, III, and of Toscana virus from field-collected sand flies in Italy. *Parasites & Vectors*, 11(1). doi: 10.1186/s13071- 018-2668-0

Charrel RN, Gallian P, Navarro-Marí JM, Nicoletti L, Papa A, Sánchez-Seco MP, et al. Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1657.

Charrel, R.N.;Izri, A.; Temmam, S.; de Lamballerie, X.; Parola, P. Toscana virus RNA in *Sergentomyia minuta* files. *Emerg. Infect. Dis.* 2006, 12, 1299–1300.

## D

Dedet J.P., Addadi K., Belazzoug S., Dib D. (collab.), Knidler B. (collab.), Touami M. (collab.). (1984). Les phlébotomes (Diptera, Psychodidae) d'Algérie. *Cahiers ORSTOM.Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, 22 (2), p. 99-127. ISSN 0029-7224. <https://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:28367>

Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, et al. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro Surveill* 2010;11(15):19507

Dionisio, D., Esperti, F., Vivarelli, A., &Valassina, M. (2003). Epidemiological, clinical and laboratory aspects of sandfly fever. *Current Opinion In Infectious Diseases*, 16(5), 383-388. doi: 10.1097/00001432-200310000-00003

Andayi F, Charrel RN, Kieffer A, Richet H, Pastorino B, Leparc-Goffart I, Ahmed AA, Carrat F, Flahault A, de Lamballerie X. 2014. A sero-epidemiological study of arboviral fevers in Djibouti, Horn of Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e3299. doi: 10.1371/journal.pntd.0003299.

## E

Eitrem, R., Vene, S., & Niklasson, B. (1990). Incidence of Sand Fly Fever Among Swedish United Nations Soldiers on Cyprus During 1985. *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 43(2), 207-211. doi: 10.4269/ajtmh.1990.43.207

Ergunay K., Aydogan S., IlhamiOzcebe O., Cilek E.E., Hacıoglu S., Karakaya J.A., Ozkul A., Us D. Toscana virus (TOSV) exposure is confirmed in blood donors from Central, North and South/Southeast Anatolia, Turkey. *Zoonoses Public Health*. 2011;59:148–154. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01436.x.

Ergunay, K. (2014). Phlebotomus Fever—Sandfly Fever. *Emerging Infectious Diseases*, 149-162. doi: 10.1016/b978-0-12-416975-3.00011-x

Ehrnst, A., Peters, C., Niklasson, B., Svedmyr, A., & Holmgren, B. (1985). NEUROVIRULENT TOSCANA VIRUS (A SANDFLY FEVER VIRUS) IN SWEDISHMAN AFTER VISIT TO PORTUGAL. *The Lancet*, 325(8439), 1212-1213. doi: 10.1016/s0140-6736(85)92886-7

## **F**

Fares W, Charrel RN, Dachraoui K, Bichaud L, et al. Infection of sand flies collected from different bio-geographical areas of Tunisia with phleboviruses. *Acta Trop* 2015; 141:1–6.

Failloux, A., Bouattour, A., Faraj, C., Gunay, F., Haddad, N., &Harrat, Z. et al. (2017). Surveillance of Arthropod-Borne Viruses and Their Vectors in the Mediterranean and Black Sea Regions Within the MediLabSecure Network. *Current Tropical Medicine Reports*, 4(1), 27-39. doi: 10.1007/s40475-017-0101-y

Feliciangeli MD. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* 2004; 18:71–80.

Fezaa, O., Bahri, O., AlayaBouafif, N., Triki, H., &Bouattour, A. (2013). Seroprevalence of Toscana virus infection in Tunisia. *International Journal Of Infectious Diseases*, 17(12), e1172-e1175. doi: 10.1016/j.ijid.2013.08.008

Fischer, D., Moeller, P., Thomas, S., Naucke, T., &Beierkuhnlein, C. (2011). Combining Climatic Projections and Dispersal Ability: A Method for Estimating the Responses of Sandfly Vector Species to Climate Change. *PlosNeglected Tropical Diseases*, 5(11), e1407. doi: 10.1371/journal.pntd.0001407

## **G**

García San Miguel, L., Sierra, M., Vazquez, A., Fernandez-Martínez, B., Molina, R., & Sanchez-Seco, M. et al. (2021). Phlebovirus-associated diseases transmitted by phlebotominae

in Spain: Are we at risk?. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica* (English Ed.), 39(7), 345-351. doi: 10.1016/j.eimce.2021.05.001

Grimm F, Gessler M, Jenni L. Aspects of sandfly biology in southern Switzerland. *Med Vet Entomol* 1993; 7:170–176.

## H

Hertig M., Sabin A. Sandfly fever (Papatasi, Phlebotomus, three-day fever) In: Coates J., Hoff E., Hoff P., editors. *Preventative Medicine in World War II*. Office of the Surgeon General; Washington, DC, USA: 1964. pp. 109–174.

Hughes H.R., Russell B.J., Lambert A.J. Genetic characterization of Frijoles and Chilibre Species Complex Viruses (Genus Phlebovirus; Family Phenuiviridae) and three unclassified new world phleboviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2020;102:359–365. doi: 10.4269/ajtmh.19-0717.

## I

Izri A, Temmam S, Moureau GG, Hamrioui B, De Lamballerie X, Charrel RN. Sandfly Fever Sicilian virus. *Algeria Emerg Infect Dis.* 2008; 14 (5):795–7. <https://doi.org/10.3201/eid1405.071487>

## K

Kalveram, B., & Ikegami, T. (2013). Toscana Virus NSs Protein Promotes Degradation of Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase. *Journal Of Virology*, 87(7), 3710-3718. doi: 10.1128/jvi.02506-12

Kay M.K., Gibney K.B., Riedo F.X., Kosoy O.L., Lanciotti R.S., Lambert A.J. Toscana virus infection in American traveler returning from Sicily, 2009. *Emerg. Infect. Dis.* 2010;16:1498–1500. doi: 10.3201/eid1609.100505.

Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics In Dermatology*, 17(3), 279-289. doi: 10.1016/s0738-081x(99)00046-2

Knipe, D. and Howley, P., 2013. *Fields virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, pp.1253-1254.

Konstantinou, G., Papa, A., & Antoniadis, A. (2007). Sandfly-fever outbreak in Cyprus: Are Phleboviruses still a health problem?. *Travel Medicine And Infectious Disease*, 5(4), 239-242. doi: 10.1016/j.tmaid.2007.02.002

## L

Lambert, A.J., & Hughes, H. (2021). Clinically Important Phleboviruses and Their Detection in Human Samples. *Viruses*, 13(8), 1500. doi: 10.3390/v13081500

Lambert A.J., Lanciotti R.S. Consensus amplification and novel multiplex sequencing method for S segment species identification of 47 viruses of the Orthobunyavirus, Phlebovirus, and Nairovirus genera of the family bunyaviridae. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47:2398–2404. doi: 10.1128/JCM.00182-09

Lambert A.J., Lanciotti R.S. In: *Laboratory Diagnosis of Arboviruses from: Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control*. Nikos V., Duane J.G., editors. Caister Academic Press; Norfolk, UK: 2016. pp. 271–280.

Lewis, D.J., 1971 phlebotomidsanflies. *Bull world Health organ* 44, 535-551

Li M., Wang B., Li L., Wong G., Liu Y., Ma J., Li J., Lu H., Liang M., Li A., et al. Rift Valley Fever Virus and Yellow Fever Virus in urine: A potential source of infection. *Viol. Sin.* 2019;34:342–345. doi: 10.1007/s12250-019-00096-2.

## M

Maia, C., Ayhan, N., Cristóvão, J., Pereira, A., & Charrel, R. (2021). Human seroprevalence of Toscana virus and Sicilian phlebovirus in the southwest of Portugal. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 41(1), 137-141. doi: 10.1007/s10096-021-04332-0

Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. *Med VetEntomol*2013;27:12347.

Meier, R., Helenius, A., & Lozach, P. (2012). DC-SIGN, un récepteur des phlébovirus. *Médecine/Sciences*, 28(1), 16-18. doi: 10.1051/medsci/2012281005

Muller, G.; Schlein, Y. Nectar and honeydew feeding of *Phlebotomus papatasi* in a focus of *Leishmania major* in NeotHakikar oasis. *J. Vector Ecol.* 2004, 29, 154–158.

Moureau G, Bichaud L, Salez N, Ninove L, Hamrioui B, Belazzoug S, et al. Molecular and Serological Evidence for the Presence of Novel Phleboviruses in Sandflies from Northern Algeria. *Open Virol J* 2010 Nov 5; 4(2):15–21. <https://doi.org/10.2174/1874357901004020015>

## N

Newton, S., Short, N., & Dalgarno, L. (1981). Bunyamwera Virus Replication in Cultured *Aedes albopictus* (Mosquito) Cells: Establishment of a Persistent Viral Infection. *Journal Of Virology*, 38(3), 1015-1024. doi: 10.1128/jvi.38.3.1015-1024.1981

Nicoletti, L., Renzi, A., Caciolli, S., Bartolozzi, D., Balducci, M., & Traini, E. et al. (1991). Central Nervous System Involvement during Infection by Phlebovirus Toscana of Residents in Natural Foci in Central Italy (1977–1988). *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 45(4), 429-434. doi: 10.4269/ajtmh.1991.45.429

Nicoletti L. Rift Valley Fever and Other Phleboviruses (Bunyaviridae), December 2014 DOI:10.1016/B978-0-12-801238-3.02660-X In book: Reference Module in Biomedical Sciences

## O

Oldfield, E., Wallace, M., Hyams, K., Yousif, A., Lewis, D., & Bourgeois, A. (1991). Endemic Infectious Diseases of the Middle East. *Clinical Infectious Diseases*, 13(Supplement\_3), S199-S217. doi: 10.1093/clind/13.supplement\_3.s199

## P

Palacios G., Tesh R., Travassos da Rosa A., Savji N., Sze W., Jain K., Serge R., Guzman H., Guevara C., Nunes M.R., et al. Characterization of the Candiru antigenic complex (Bunyaviridae: Phlebovirus), a highly diverse and reassorting group of viruses affecting humans in tropical America. *J. Virol.* 2011;85:3811–3820. doi: 10.1128/JVI.02275-10.

Papa A, Kesidou Ch, Kontana A, Arapidou Z, Petropoulou D. Phlebovirus infection in Greece: a case report. *Hippokratia*. 2015 Apr-Jun;19(2):189-91. PMID: 27418773; PMCID: PMC4938115.

Papa A, Konstantinou G, Pavlidou V, Antoniadis A. Sandfly fever virus outbreak in Cyprus. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:192–4.

Percivalle E., Cassaniti I., Calzolari M., Lelli D., Baldanti F. Thirteen years of Phleboviruses circulation in Lombardy, a Northern Italy region. *Viruses*. 2021;13:209. doi: 10.3390/v13020209.

## R

Ready, P. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annu. Rev. Entomol.* 2013, 58, 227–250.

Remoli M.E., Jiménez M., Fortuna C., Benedetti E., Marchi A., Genovese D., Gramiccia M., Molina R., Ciufolini M. Phleboviruses detection in *Phlebotomus perniciosus* from a human leishmaniasis focus in South-West Madrid region, Spain. *Parasites Vectors*. 2016;9:205. doi: 10.1186/s13071-016-1488-3

Rezelj, V., Li, P., Chaudhary, V., Elliott, R., Jin, D., & Brennan, B. (2017). Differential Antagonism of Human Innate Immune Responses by Tick-Borne *Phlebovirus* Nonstructural Proteins. *Msphere*, 2(3). doi: 10.1128/msphere.00234-17

Rodhain, F., Gonzalez, J., Mercier, E., Helynck, B., Larouze, B., & Hannoun, C. (1989). Arbovirus infections and viral haemorrhagic fevers in Uganda: a serological survey in Karamoja district, 1984. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene*, 83(6), 851-854. doi: 10.1016/0035-9203(89)90352-0

## S

Sabin, A. (1951). Experimental studies on phlebotomus (pappataci, sandfly) fever during world war II. *Archi. Die Gesamte Virusforschung*, 4(4), 367-410. doi:10.1007/bf01241161

Sakhria, S., Bichaud, L., Mensi, M., Salez, N., Dachraoui, K., & Thirion, L. et al. (2013). Co-Circulation of Toscana Virus and Punique Virus in Northern Tunisia: A Microneutralisation-Based Seroprevalence Study. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 7(9), e2429. doi: 10.1371/journal.pntd.0002429

Socha, W., Kwasnik, M., Larska, M., Rola, J., & Rozek, W. (2022). Vector-Borne Viral Diseases as a Current Threat for Human and Animal Health—One Health Perspective. *Journal Of Clinical Medicine*, 11(11), 3026. doi: 10.3390/jcm11113026

## T

Tahir D, Alwassouf S, Loudahi A, Davoust B, Charrel RN. Seroprevalence of Toscana virus in dogs from Kabylia (Algeria). *ClinMicrobiol Infect.* 2016;22(3):e16–7. doi: 10.1016/j.cmi.2015.10.029

Tesh RB, Lubroth J, Guzman H. Simulation of arbovirus overwintering: Survival of Toscana virus (Bunyaviridae: Phlebovirus) in its natural sand fly vector *Phlebotomus perniciosus*. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47:574–581.

Tesh, R., & Papaevangelou, G. (1977). Effect of Insecticide Spraying for Malaria Control on the Incidence of Sandfly Fever in Athens, Greece. *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 26(1), 163-166. doi: 10.4269/ajtmh.1977.26.163

Tesh R.B., Peters C.J., Meegan J.M. Studies on the antigenic relationship among phleboviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1982;31:149–155. doi: 10.4269/ajtmh.1982.31.149.

Tesh RB : *Phlebotomus Fevers: the Arboviruses* . In: *Epidemiology and Ecology*. Edited by Monath TP. Boca Raton, FL, CRC Press, 1989 ; pp 15 – 28 .

Tesh RB, Saidi S, Gajdamovic SJ, Rodhain F, Vesenjask-Hirjan J. 1976. Serological studies on the epidemiology of sandfly fever in the Old World. *Bull World Health Organ* 54:663– 674.

Tesh RB. The genus *Phlebovirus* and its vectors. *AnnuRevEntomol*1988; 33:169–181.

## V

Verani, P.; Ciufolini, M.G.; Caciolli, S.; Renzi, A.; Nicoletti, L.; Sabatinelli, G.; Bartolozzi, D.; Volpi, G.; Amaducci, L.; Coluzzi, M.; et al. Ecology of viruses isolated from sand flies in Italy and characterized of a new *Phlebovirus* (Arabia virus). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988, 38,433–439.

Verani, P.; Lopes, M.; Nicoletti, L.; Balducci, M. Studies on *Phlebotomus*-transmitted viruses in Italy. I. Isolation and characterization of a sandfly fever Naples-like virus. *Arboviruses Mediterr. Ctries. Stuttg. Gustav Fischer Verl.* 1980, Suppl. 9, 195–201.

Viglietta, M., Bellone, R., Blisnick, A. A., & Failloux, A. B. (2021). Vector Specificity of Arbovirus Transmission. *Frontiers in microbiology*, 12, 773211. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.773211>

## W

Wang J., Fu S., Xu Z., Cheng J., Shi M., Fan N., Song J., Tian X., Cheng J., Ni S., et al. Emerging sand fly-borne phlebovirus in China. *Emerg. Infect. Dis.* 2020;26:2435–2438. doi: 10.3201/eid2610.191374.

Weidmann, M., Sanchez-Seco, M., Sall, A., Ly, P., Thiongane, Y., & Lô, M. et al. (2008). Rapid detection of important human pathogenic Phleboviruses. *Journal Of Clinical Virology*, 41(2), 138-142. doi: 10.1016/j.jcv.2007.10.001

Woyessa A., Omballa V., Wang D., Lambert A., Waiboci L., Ayele W., Ahmed A., Abera N., Cao S., Ochieng M., et al. An outbreak of acute febrile illness caused by Sandfly Fever Sicilian Virus in the Afar region of Ethiopia, 2011. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014;91:1250– 1253. doi: 10.4269/ajtmh.14-0299.

Wuerth, J., & Weber, F. (2021). NSs of the mildly virulent sandfly fever Sicilian virus is unable to inhibit interferon signaling and upregulation of interferon-stimulated genes. *Journal Of General Virology*, 102(11). doi: 10.1099/jgv.0.001676

## Z

Zhioua E, Moureau G, Chelbi I, Ninove L, et al. Punique virus, a novel phlebovirus, related to sandfly fever Naples virus, isolated from sandflies collected in Tunisia. *J Gen Virol* 2010; 91:1275–1283.

Zina M. Uckeley, Jana Koch, Nicole D. Tischler, Psylvia Léger, Pierre-Yves Lozach. Entrée cellulaire des phlébovirus chez l'hôte mammifère. *Virologie.* 2019;23(3):176-187. doi:10.1684/vir.2019.0780

## Annexe A : Matériel, appareillage, réactifs utilisés

### 1. Réactifs

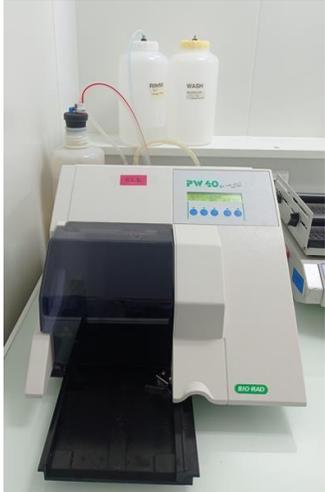
			
NaOH 1N	Tween 20	Pastilles PBS (pH 7, 4)	Solution stop H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1N
			
Substrat chromogène TMB	Lait écrémé	Eau distillée	Conjugué enzymatique (anti-IgG humaine)

## 2. Consommables

		
<p>Microplaques ELISA à fond plat de 96 puits (Nunc MaxiSorp)</p>	<p>Embouts de 10, 200-300 et 1000 <math>\mu</math>L</p>	<p>Tubes secs de 5 mL</p>

## 3. Instruments et appareils

		
<p>-Micropipettes à embouts interchangeables de 2, 10, 100 et 1000 <math>\mu</math>L -Pipette à 8 canaux de 200-300 <math>\mu</math>L</p>	<p>Balance</p>	<p>Incubateur de plaques ELISA (IPS, BIORAD®)</p>

		
<p>Laveur de plaques ELISA (PW40, BIORAD®)</p>	<p>Lecteur des plaques ELISA (PR4100, BIORAD®)</p>	<p>vortex</p>

## **Annexe B : Composition des milieux et solutions utilisés**

### **Solution de saturation**

- 1g de lait écrémé « Régilait® »
- 20 ml PBS

### **Solution de lavage**

- 1L H<sub>2</sub>O ultra pure fraîche
- pastille PBS
- 500 µl Tween 20

### **Le diluant**

- 0,75 g de lait écrémé - 25 ml PBST20
- 37,5 µl NaOH 1N