

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES  
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES  
DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE FOR RESEARCH AND  
TRAINING IN GRADUATE STUDIES IN  
LIFE, HEALTH AND ENVIRONMENTAL  
SCIENCES

RESEARCH AND DOCTORATE  
TRAINING UNIT IN LIFE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE ET DE TOXICOLOGIE  
*LABORATORY OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY*

# Etude des virus de la dengue et du chikungunya : aspects épidémiologiques et pharmacologiques

THESE

Présentée en vue de l'obtention du **Diplôme de Doctorat/Ph.D** en Biochimie  
Spécialité : Biotechnologie et Développement

Par

**SIMO NEMG Frédy Brice**

Matricule : 08R0832  
Master en Biochimie



**Président :** MBACHAM FON Wilfred,  
Professeur

**Rapporteurs :** MOUNDIPA FEWOU Paul,  
Professeur

DEMANOU Maurice,  
Docteur/Ph.D

**Membres :** PENLAP NINTCHOM  
Véronique épouse BENG,  
Professeur

KORO KORO Francioli,  
Maître de Conférence

NJOUOM Richard,  
Directeur de Recherche

Université de Yaoundé 1 ;

Université de Yaoundé 1 ;

Centre Pasteur du Cameroun ;

Université de Yaoundé 1 ;

Université de Douala ;

Centre Pasteur du Cameroun.

Année académique : 2020/2021

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCE DE  
LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION  
DOCTORALE EN SCIENCE DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING  
IN GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH  
AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

RESEARCH DOCTORATE TRAINING UNIT  
IN LIFE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

## ATTESTATION DE CORRECTION

Nous soussignés, **Pr. NJOUOM Richard** et **Pr. MBACHAM FON Wilfred** respectivement Examineur et Président du jury de Thèse de Doctorat/PhD en Biochimie, spécialité Virologie moléculaire, soutenue par **M. SIMO NEMG Frédy Brice** (matricule: **08R0832**) le 24 Novembre 2021 à 14h dans la salle S01/02 Extension de la Faculté de Sciences de l'Université de Yaoundé I sur le thème intitulée «**Etude des virus de la dengue et du chikungunya : Aspects épidémiologiques et pharmacologiques**» attestons que la candidate a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

En foi de quoi la présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé, le **23 DEC 2021**.....

Examineur

*Njouom R. J.*  
**Dr. Richard Njouom**  
Chef Service de Virologie  
Centre Pasteur du Cameroun

Président du Jury

*L. Mbacham*  
**Prof Mbacham**

Le Chef de Département

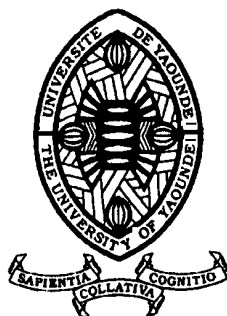
*Moundjha Fovou Paul*  
**Moundjha Fovou Paul DSc.D. Etat**  
Professor  
Immunology-Toxicology

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES DE  
LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION  
DOCTORALE EN SCIENCES DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING  
IN GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH  
AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

RESEARCH AND DOCTORATE TRAINING  
UNIT IN LIFE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE ET DE TOXICOLOGIE  
*LABORATORY OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY*

# **Etude des virus de la dengue et du chikungunya : aspects épidémiologiques et pharmacologiques**

THESE

Présentée en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat/Ph.D en Biochimie  
Spécialité : Biotechnologie et Développement

Par

**SIMO NEMG Frédy Brice**

**Matricule : 08R0832**

*Master en Biochimie*

**Président :** MBACHAM FON Wilfried,  
Professeur

**Rapporteurs :** MOUNDIPA FEWOU Paul,  
Professeur  
DEMANOU Maurice,  
Docteur/Ph.D

**Membres :** PENLAP NINTCHOM  
Véronique épouse BENG,  
Professeur  
KORO KORO Francioli,  
Maître de Conférence  
NJOUOM Richard,  
Directeur de Recherche

Université de Yaoundé 1 ;

Université de Yaoundé 1 ;

Centre Pasteur du Cameroun ;


Université de Yaoundé 1 ;

Université de Douala ;

Centre Pasteur du Cameroun.

Année académique : 2020/2021

## Liste protocolaire

<b>UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I</b> <b>Faculté des Sciences</b> Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		<b>THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I</b> <b>Faculty of Science</b> Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
<b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</b>		<b>LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF</b>

### ANNÉE ACADEMIQUE 2021/2022

(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION 22 septembre 2021**

#### ADMINISTRATION

**DOYEN** : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

**VICE-DOYEN / DPSAA** : ATCHADE Alex de Théodore, *Maître de Conférences*

**VICE-DOYEN / DSSE** : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DRC** : ABOSSOLO Monique, *Maître de Conférences*

**Chef Division Administrative et Financière** : NDOYE FOE Marie C. F., *Maître de Conférences*

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR** :  
 AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

#### **1- Département de Biochimie (BC) (38)**

N°	Noms et Prénoms	Grade	Observations
1	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOCHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	EWANE Cécile Anne	Maître de	En poste

		Conférences	
17	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
18	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
19	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
20	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
21	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
22	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

23	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
24	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
25	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
25	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
26	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
27	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
30	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
31	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
32	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
33	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGO Sylvain	Chargé de Cours	En poste

35	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
36	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
37	WILFRIED ANGIE Abia	Assistant	En poste

## 2- DÉpartement de BioLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (46)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	DAARS/FS
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	Vice Doyen/FMSB/UIYI
7	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
9	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste

10	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
11	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
12	NOLA Moïse	Professeur	En poste
13	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
14	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
15	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	<i>En poste</i>

16	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
19	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
20	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
21	MONY Ruth épse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
22	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
23	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

24	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
25	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
26	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
27	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
28	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
29	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
30	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
31	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
32	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
33	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
34	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
35	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
36	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
37	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
38	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
39	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
40	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
41	YEDE	Chargé de Cours	En poste

42	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
43	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
44	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
45	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
46	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

**3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)**

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MBOLO Marie	Professeur	En poste
5	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
6	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
7	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

8	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
9	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
10	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
11	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
12	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
16	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
17	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste

18	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
19	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23	NGOOU Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
24	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
25	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
26	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste

27	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
28	KABELONG BANAHO Louis-Paul- Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
30	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
31	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
32	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste

33	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste
----	---------------------	-----------	----------

**4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (33)**

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>
10	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>

11	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
12	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
13	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
14	KAMGANG YOUNBI Georges	Maître de Conférences	En poste
15	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
16	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
17	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
18	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
19	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
20	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste

21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
24	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
25	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
26	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
27	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
28	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste



31	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
32	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
33	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

<b>5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (34)</b>			
1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen/FSE/UYI
2	GHOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
5	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP/</i> Chef de Département
6	WANDJI Jean	Professeur	En poste

7	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	Vice-Doyen / DPSAA
8	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	C.E/ MINESUP
20	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	C.S/ MINESUP
21	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste

22	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
23	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
24	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
25	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
26	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
27	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

28	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
29	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
30	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
31	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
32	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste

33	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
34	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

#### 6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (25)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div.MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA.MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	-----------------------	----------

4	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
5	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
6	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
7	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
8	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
10	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
11	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
12	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	Directeur adjoint Enset. Ebolowa
14	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
15	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
16	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
17	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

18	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
----	------------------------	-----------	----------

19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

### 7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)

1	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	Chef de Département
2	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur MINESUP</i>

3	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
4	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
7	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
8	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef service des programmes &amp; Diplômes/FS/UYI</i>
9	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
10	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

11	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
12	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
16	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
17	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
18	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
19	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
20	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
21	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
22	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
23	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste

26	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
27	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
28	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

#### 8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
3	NWAGA Dieudonné M.	Professeur	En poste

4	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste

13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

#### 9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. UN</i>
4	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
6	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
7	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste

8	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
9	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
10	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
11	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
12	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen FS Univ/Bda
13	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste

16	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
17	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
19	EYEBE FOUA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
20	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
22	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
23	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
24	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
25	SAIDOU	Maître de Conférences	MINRESI
26	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
29	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UYYI</i>

30	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
32	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
33	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
34	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
35	MEL'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
36	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
37	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
38	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

39	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

**10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)**

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NGOS III Simon	Professeur	En poste
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
9	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
10	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
11	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
12	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
13	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
14	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
15	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
16	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
17	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance &amp; du Matériel/UYII</i>
18	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste

26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	Sec. D'Etat/MINMIDT
29	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	CD/Uma
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
39	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
40	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste

41	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
42	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

**Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I**

**NOMBRE D'ENSEIGNANTS**

DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	8 (01)	14 (10)	13 (05)	3 (02)	<b>38 (18)</b>
BPA	15 (01)	8 (06)	18 (05)	05 (02)	<b>46 (14)</b>
BPV	07 (01)	10 (01)	9 (06)	07 (01)	<b>33 (9)</b>
CI	10 (01)	10 (02)	10 (02)	03 (0)	<b>33 (5)</b>
CO	6 (0)	21 (05)	05 (02)	02 (0)	<b>34(7)</b>
IN	2 (0)	1 (0)	14 (01)	08 (01)	<b>25 (2)</b>
MAT	2 (0)	8 (0)	15 (01)	05 (02)	<b>30 (3)</b>
MIB	3 (0)	4 (02)	05 (01)	06 (02)	<b>18 (5)</b>
PHY	15 (0)	14 (02)	09 (03)	02 (0)	<b>40 (5)</b>
ST	7 (1)	15 (01)	18 (05)	02 (0)	<b>42(7)</b>
<b>Total</b>	<b>75 (5)</b>	<b>105 (29)</b>	<b>116 (31)</b>	<b>43 (10)</b>	<b>339 (75)</b>

Soit un total de **339 (75)** dont :

- Professeurs **75 (5)**
- Maîtres de Conférences **105 (29)**
- Chargés de Cours **116 (31)**
- Assistants **43 (10)**

( ) = Nombre de Femmes **75**

## **Dédicaces**

*Ce travail est dédié*

☞ *A DIEU le Père Tout Puissant.*

☞ *Aux âmes de mes défunts parents*

☞ *A toute ma famille.*



## **Remerciements**

J'exprime ma profonde reconnaissance :

☞ A monsieur le **Professeur MOUNDIPA FEWOU Paul**, Chef du Département de Biochimie et Chef de Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de l'Université de Yaoundé I, qui a bien voulu superviser ce travail et a mis à ma disposition son énergie, sa rigueur, ses connaissances et son expérience. Professeur je vous remercie pour vos critiques et votre savoir-faire qui ont été incontournables dans le déroulement et la finalisation de ce travail.

☞ A monsieur le **Docteur DEMANOU Maurice**, Directeur de cette thèse, qui m'a donné l'opportunité de réaliser ce travail. Merci de m'avoir accueilli dans votre service et au sein de votre équipe dans un sujet de travail si différent. Je vous remercie encore de l'intérêt que vous avez porté à mes travaux, pour tous les encouragements que vous m'avez donnés tout au long de son évolution et surtout votre suivi avec rigueur scientifique. Malgré vos nombreuses occupations, vous avez su me consacrer votre temps pour l'aboutissement de ce travail.

☞ A toute l'équipe de « *l'Institute of Life Science, Bhubaneswar* » de m'avoir accueilli pour la réalisation de la partie Pharmacologique de ce travail. Merci particulièrement à Madame le **Docteur SOMA Chattopadyay** et son équipe qui m'ont accordé leur suivi avec grande attention et n'ont jamais hésité à me rendre tout service à eux demandé. Malgré la longue distance, vous avez toujours été la solution à toutes mes diverses préoccupations.

☞ Au **Centre Pasteur du Cameroun**, et spécialement au **Dr Njouom Richard, Chef de service de virologie** pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser mes travaux dans un Laboratoire de Référence hautement sophistiqué.

☞ A l'ensemble des **cadres scientifiques** du Service de Virologie, à tous **les étudiants** du Service de Virologie, du Laboratoire de Paludisme et tous les Techniciens de Laboratoire du Centre Pasteur du Cameroun pour vos remarques, suggestions, expertises et multiples encouragements lors de la réalisation de ce travail.

☞ A **tous les enseignants du Département de Biochimie** pour la formation académique reçue.

☞ A toute **l'équipe du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie** de l'Université de Yaoundé I pour les conseils et remarques qu'ils m'ont prodigués lors des différentes présentations en séminaires.

☞ A la **Research Training Fellowship for Developing Country Scientist (RTF-DCS)** pour la bourse d'étude de 6 mois (S/CMR 15-06) qui nous a permis d'effectuer la partie pharmacologique

☞ Le **Laboratoire de recherche sur le Chikungunya de l'Institut de Sciences de la vie** qui a bien voulu supporter les coûts liés aux manipulations lors de mon séjour en Inde.

☞ Le **projet interne Arbovirus** financé par la Direction scientifique du CPC qui bien voulu supporter les coûts des manipulations dans cette institution.

☞ A **mes camarades de promotion** pour toutes les remarques et tous les échanges que nous avons eus tout au long de notre formation académique.

☞ A **TCHAPGANG Audrey**, qui m'a toujours conseillé et m'a toujours soutenue pendant la réalisation de ce travail.

☞ A mes amis **Maguy, Guy Roussel, Cédric, Gwladys, Arnaud, Edwige, Viviane, Corinne, Borro, Nina, Abdou, Elodie, Sebastien, Serges** et **Marie** qui m'ont remonté le moral à tout moment ;

☞ A **mes cadets de laboratoire** pour leur assistance et leur disponibilité.

☞ A **tous ceux** qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et dont je n'ai pas pu citer les noms, qu'ils soient rassurés de ma profonde gratitude.

## **Table des matières**

Liste protocolaire.....	i
Dédicaces .....	xiii
Remerciements .....	xiv
Table des matières .....	xvi
Liste des abréviations, acronymes et sigles.....	xxiii
Liste des tableaux .....	xxv
Liste des figures .....	xxvi
Résumé .....	xxviii
Abstract .....	xxix
Introduction .....	1
Questions de recherche.....	3
Hypothèses de recherche .....	3
Objectif général .....	4
Objectifs spécifiques .....	4
Chapitre I. Revue de la littérature .....	5
I.1. Historique de la découverte des Arbovirus : Cas des virus Dengue et Chikungunya.....	5
I.1.1. Définitions et Généralités sur les arbovirus.....	5
I.1.2. Histoire de la découverte du virus de la Dengue .....	5
I.1.3. Histoire de la découverte du virus Chikungunya.....	7
I.2. Description des virus de la dengue et du chikungunya .....	8
I.2.1. Le virus de la dengue (DENV) .....	8
I.2.1.1. Taxonomie .....	8
I.2.1.2. Organisation génomique .....	8

I.2.1.3. Protéines virales et leurs fonctions ( Yu <i>et al.</i> , 2008; Mukhopadhyay <i>et al.</i> , 2005). .....	10
I.2.1.4. Variabilité génétique.....	11
I.2.2. Cas du virus Chikungunya.....	13
I.2.2.1. Taxonomie .....	13
I.2.2.2. Organisation génomique.....	14
I.2.2.3. Protéines virales et leurs fonctions .....	14
I.2.2.4. Variabilité génétique.....	16
I.3. Description du cycle infectieux des virus Dengue et Chikungunya.....	17
1.3.1. Cycle infectieux du virus de la dengue .....	17
1.3.1.1. Processus d'entrée du virus dans la cellule hôte.....	17
1.3.1.2. Transcription, traduction et réplication de l'ARN génomique .....	19
1.3.1.3. Assemblage et sécrétion des particules virales.....	19
1.3.2. Cycle infectieux du virus du Chikungunya.....	20
1.3.2.1. Processus d'entrée du virus dans la cellule hôte .....	20
1.3.2.2. Transcription, traduction et réplication de l'ARN génomique .....	21
1.3.2.3. Assemblage et sécrétion des particules virales.....	21
I.4. Epidémiologie, transmission et manifestations cliniques de la dengue et du chikungunya.....	22
I.4.1. Répartition géographique .....	22
I.4.1.1. Répartition géographique du virus de la dengue .....	22
I.4.1.2. Répartition géographique du virus Chikungunya.....	24
I.4.2. Cycle de transmission des virus dengue et chikungunya .....	26
I.4.2.1. Cycle de transmission du virus du Chikungunya .....	26
I.4.2.2. Cycles de transmission de la Dengue .....	27

I.4.2.3. Cycle de vie des moustiques du genre <i>Aedes</i> spp.....	28
I.4.2.3.1. Oeuf .....	29
I.4.2.3.2. Larves .....	30
I.4.2.3.3. Chrysalides .....	30
I.4.3. Manifestations cliniques des virus dengue et chikungunya.....	30
I.4.3.1. Caractéristiques cliniques du virus Chikungunya .....	30
I.4.3.2. Caractéristiques cliniques du virus Dengue.....	31
I.4.4. Diagnostic des arbovirus .....	33
I.4.4.1. Diagnostic de l'infection par le virus de la Dengue .....	33
I.4.4.2. Diagnostic de l'infection par le virus Chikungunya.....	36
I.4.5. Traitement et prévention des infections.....	36
I.4.5.1. Prise en charge et prévention de l'infection par le virus Chikungunya.....	36
I.4.5.2. Traitement et prévention de l'infection par le DENV .....	37
I.5. Méthodes d'étude des propriétés anti-arbovirales.....	38
I.5.1. Approche <i>in vitro</i> .....	38
I.5.1.1. Réduction du nombre des plages de lyse.....	38
I.5.1.2. Technique d'absorption de colorant (MTT) .....	39
I.5.1.3. Technique de détection d'immunofluorescence .....	39
I.5.2. Criblage à haut débit.....	39
I.5.2.1. Technique phénotypique.....	40
I.5.2.2. Criblage à haut débit utilisant la resazurine.....	40
I.5.2.3. Utilisation des mini-génomomes .....	40
I.5.3. Approche <i>in silico</i> .....	40
I.6. Plantes médicinales et fièvre à virus Chikungunya .....	41

I.6.1. Activités anti-CHIKV des extraits de plantes.....	41
I.6.2. Activités anti-VHC de quelques composés extrait de plantes.....	41
I.7. Généralités sur les plantes étudiées.....	43
I.7.1. <i>Entada africana</i> ( <i>E. africana</i> ) Gill et Perr .....	43
I.7.2. <i>Khaya grandifoliola</i> C.D.C .....	44
I.7.3. <i>Senna alata</i> ( <i>S. alata</i> ).....	45
I.7.4. <i>Enantia chlorantha</i> ( <i>E. chlorantha</i> ).....	46
I.7.5. <i>Phragmanthera capitata</i> (Sprengel) Balle ( <i>Loranthaceae</i> ) .....	47
I.7.6. <i>Detarium microcarpum</i> .....	47
I.7.7. <i>Annona senegalensis</i> ( <i>A. senegalensis</i> ).....	48
I.7.8. <i>Macaranga hurifolia</i> ( <i>M. hurifolia</i> ) .....	49
I.7.9. <i>Entandrophragma cylindricum</i> ( <i>E. cylindricum</i> ).....	50
I.7.10. <i>Poga oleosa</i> ( <i>P. oleosa</i> ) .....	51
Chapitre II : Méthodologie.....	53
II.1. Etat de lieux sur la circulation des virus Dengue et Chikungunya au Cameroun.....	53
II.1.1. Cadre de l'étude .....	53
II.1.2. Type d'étude.....	54
II.1.3. Période d'étude.....	54
II.1.4. Type d'échantillonnage .....	54
II.1.5. Critères de sélection .....	55
II.1.6. Collecte des échantillons .....	55
II.1.7. Recherche du <i>Plasmodium</i> .....	55
II.1.8. Détection des virus Dengue, et Chikungunya par RT-PCR temps réel .....	56
II.1.9. Détermination de la validité du test.....	58

II.1.10. Sérotypage des cas positifs en RT-qPCR des acides nucléiques de la dengue ....	59
II.1.11. Génotypage des cas positifs de virus de la dengue .....	60
II.1.12. Analyse phylogénétique .....	61
II.1.13. Analyse des données .....	62
II.2. Etude des propriétés anti-Chikungunya de quelques extraits de plantes de la pharmacopée camerounaise.....	63
II.2.1. Préparation des extraits bruts et fraction de plantes.....	63
II.2.1.1. Préparation des extraits bruts de plante.....	63
II.2.1.2. Fractionnement d'extrait brut de <i>Poga oleosa</i> .....	64
II.2.2. Préparation des solutions d'extrait à utiliser .....	64
II.2.3. Cultures des cellules Vero.....	64
II.2.4. Comptage des cellules vivantes.....	65
II.2.5. Test d'inhibition du virus du Chikungunya.....	66
II.2.6. Détermination de l'effet des extraits et des fractions de plantes sur la viabilité des cellules VERO et la multiplication du virus Chikungunya.....	66
II.2.7. Effet des plantes et fraction actives sur les étapes clés du cycle infectieux du virus Chikungunya .....	70
II.2.7.1. Analyse de l'effet des plantes et fractions active sur l'expression des protéines virales nsP2 et E1 impliquées dans les interactions cellule hôte-virus au cours du cycle infectieux du virus Chikungunya .....	73
II.2.7.1.1. Analyse quantitative de l'expression des genes par RT-qPCR .....	73
II.2.7.1.2. Analyse de l'expression des protéines par Western blot.....	75
II.2.7.1.3. Analyse de l'expression de la protéine virale E1, par cytométrie en flux.....	79
II.2.7.1.4. Quantification de l'infection par immunofluorescence indirecte .....	80
II.4. Analyses statistiques .....	82
Chapitre III : Résultats et discussion.....	87

III.1. Résultats.....	87
III.1.1. Prévalence et caractéristiques des virus Dengue et Chikungunya dans cinq hôpitaux de districts du Centre .....	87
III.1.1.1. Données démographiques des participants .....	87
III.1.1.2. Niveau de connaissances des arbovirus par les participants.....	87
III.1.1.3. Fréquences de détection du <i>Plasmodium</i> et des arbovirus.....	89
III.1.1.4. Coinfections entre le plasmodium et les arbovirus détectés .....	89
III.1.1.5. Facteurs associés à l'infection par le virus Dengue .....	90
III.1.1.6. Sérotypes et génotypes des cas virus provenant de Dengue .....	91
III.1.2. Propriétés anti-Chikungunya virus de quelques plantes de la pharmacopée Camerounaise.....	94
III.1.2.1. Plantes utilisées et rendements d'extraction .....	94
III.1.2.2. Cytotoxicité des extraits bruts et fractions de plantes sur les cellules VERO ...	94
III.1.2.3. Effet des extraits bruts et fractions sur la multiplication du virus Chikungunya	96
III.1.2.4. Effet des extraits bruts et fractions actives sur les étapes clé du cycle de réplication du virus Chikungunya .....	97
III.1.2.4.1. Effet sur l'entrée du virus sur l'infection de la cellule VERO.....	97
III.1.2.4.2. Effet sur la réplication du virus dans la cellule VERO .....	98
III.1.2.4.3. Effet sur l'assemblage et libération des particules virales dans les cellules VERO.....	100
III.1.2.5. Activité dose réponse des extraits actifs sur le cycle de réplication du virus Chikungunya .....	102
III.1.2.6. Effet des extraits et fractions de plantes actives sur l'expression des gènes et protéines nsP2 et E2.....	104
III.1.2.6.1. Inhibition de l'entrée par les extraits E1, E2 et E4 par diminution de l'expression de gènes codants pour les protéine virale nsP2 et E2.....	105



III.1.2.6.2. Inhibition de la réplication par les extraits et fractions de plantes actives par diminution de l'expression des gènes codants pour les protéines virales nsP2 et E1 .....	108
III.1. Discussion .....	113
Conclusion.....	122
Perspectives.....	123
Bibliographie.....	124
Annexes.....	a
Annexe 1. Notice d'information.....	a
Annexe 2. Fiche de consentement éclairé .....	c
Annexe 3. Formulaire d'assentiment des parents.....	d
Annexe 4. Questionnaire .....	e
Annexe 5. Autorisation administrative.....	h
Annexe 6. Préparation des tampons et réactifs.....	n
Annexe 7 : Agence de financement.....	r
Annexe 8 : Listes des publications.....	s

## **Liste des abréviations, acronymes et sigles**

<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>APAP</b>	<i>Acetaminophen</i>
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>ARNt</b>	ARN de transfert
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovin Serum Albumin</i>
<b>CDC</b>	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentration Efficace 50
<b>CHIKV</b>	Virus du chikungunya
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentration Inhibitrice 50
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de Carbone
<b>CPC</b>	Centre Pasteur du Cameroun
<b>Ct</b>	Cycle seuil
<b>dNTP</b>	désoxyribo nucleoside Triphosphate
<b>ddNTP</b>	didéoxyribo Nucléoside Triphosphate
<b>DENV</b>	Virus de la dengue
<b>DHF</b>	<i>Dengue Hemoragic Fever</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dubelco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Diméthyl Sulfo Oxyde
<b>DSS</b>	<i>Dengue Shock Syndrome</i>
<b>EDTA</b>	Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>GAPDH</b>	Glyceraldéhyde 3 Phosphate Dehydrogénase
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MOI</b>	<i>Multiplicity Of Infection</i>
<b>MTT</b>	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé

<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>P-JNK</b>	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
<b>RT-qPCR</b>	<i>Real Time Reverse Transcriptase PCR</i>
<b>PRNT</b>	<i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>
<b>SDS</b>	Sodium Duodecyl Sulfate
<b>TDR</b>	Test de Diagnostic Rapide
<b>VHC</b>	Virus de l'Hépatite C
<b>YFV</b>	Virus de la Fièvre Jaune
<b>ZIKV</b>	Virus du Zika

## **Liste des tableaux**

Tableau I : Principaux arbovirus tropicaux selon la région géographique (Rodhain, 1983) .....	6
Tableau II : Quelques plantes médicinales ayant des propriétés anti-chikungunga .....	41
Tableau III : Quelques composés ayant des propriétés anti-chikungunga .....	42
Tableau IV : Liste des amorces et sondes pour la détection des virus Dengue, Zika et Chikungunya .	58
Tableau V : Séquences des amorces utilisées lors de la RT-qPCR .....	75
Tableau VI : Composition des gels pour SDS-PAGE .....	77
Tableau VII : Caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude .....	88
Tableau VIII : Niveau de connaissances des arbovirus par les participants .....	88
Tableau IX : Fréquences de distribution des différents pathogènes .....	89
Tableau X : Coinfections entre plasmodium et arbovirus .....	89
Tableau XI : Corrélations entre positivité à la dengue et habitudes de la population .....	90
Tableau XII: <b>Correlations entre positivité à la dengue et signes cliniques de la dengue</b> .....	91
Tableau XIII : Plantes et rendement d'extractions .....	91
Tableau XIV : Indice de sélectivité des extraits brut et fractions actives.....	104

## Liste des figures

Figure 1: Phylogénie des séquences d'acides aminés conservées (NS5 ou NS5B) des membres de la famille des <i>Flaviviridae</i> (Shi <i>et al.</i> , 2015).....	9
Figure 2 : Structure du virus de la dengue (A) et du genome viral (B) (Wilder-Smith <i>et al.</i> , 2019).....	11
Figure 3: Représentation phylogénétique de quelques virus de la famille des <i>Togaviridae</i> (Petersen & Powers, 2016).....	13
Figure 4 : Représentation schématique du virus Chikungunya (Schwartz & Albert, 2010) .....	14
Figure 5 : Génome du virus Chikungunya (Subudhi <i>et al.</i> , 2018).....	16
Figure 6 : phylogénie du virus du chikungunya basé sur l'analyse du génome entier (Hall, 2007).....	17
Figure 7 : Cycle de réplication du virus de la dengue en absence des anticorps (Flipse <i>et al.</i> , 2013)...	18
Figure 8 : Cycle de réplication des Flavivirus (Hasan <i>et al.</i> , 2018) .....	20
Figure 9 : Cycle de réplication du virus chikungunya (Thiboutot <i>et al.</i> , 2010) .....	22
Figure 10 : Répartition globale du risque d'infection par le virus de la Dengue (Malaysian, 2016).....	23
Figure 11 : Principaux lieux de transmission du virus Chikungunya (Arya & Agarwal, 2011) .....	25
Figure 12 : Cycles de transmission du virus du chikungunya (Horwood & Buchy, 2015).....	26
Figure 13 : Cycles de transmission du virus de la dengue (DENV) (Chen & Vasilakis, 2011).....	28
Figure 14: Cycle de développement des moustiques du genre <i>Aedes</i> (Jayawardene <i>et al.</i> , 2011).....	29
Figure 15 : Chronologie de l'apparition de biomarqueurs de la dengue chez les patients présentant une infection primaire et secondaire (Muller <i>et al.</i> , 2017).....	32
Figure 16 : <i>Entada africana</i> (Yusuf & Abdullahi, 2019).....	43
Figure 17 : <i>Khaya grandifoliola</i> (Dipelet <i>et al.</i> , 2019).....	45
Figure 18 : <i>Senna alata</i> (Adedayo <i>et al.</i> , 2001) .....	46
Figure 19: <i>Enantia chlorantha</i> (Mahé, 2020).....	46
Figure 20 : <i>Phragmentera capitata</i> (Guyot & Ntawanga, 1998) .....	47
Figure 21 : <i>Detarium microcarpum</i> (Kouyaté & Damme, 2002).....	48
Figure 22 : Fruit d' <i>Annona senegalensis</i> (Okhale <i>et al.</i> , 2016).....	49
Figure 23 : Feuilles de <i>Macaranga hurifolia</i> (Joseph, 2014).....	50
Figure 24 : <i>Entandrophragma cylindricum</i> (Alain, 2017) .....	51
Figure 25 : <i>Poga oleosa</i> (Udoh & Udoh, 2020) .....	52
Figure 26 : Représentation des sites de collecte des échantillons .....	54
Figure 27 : Cellule de Neubauer.....	65
Figure 28 Test de neutralisation sur plaque.....	70

Figure 29 : Gel de PCR sérotypage obtenu après électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% .....	91
Figure 30 : Produit de PCR génotypage obtenu après migration sur le gel d'agarose 1,5%.....	92
Figure 31: Arbre phylogénétique des cas de dengue sérotype 1 isolés au Cameroun.....	93
Figure 32 : Viabilité cellulaire dans le milieu d'incubation des VERO (A) en présence des différents extraits de plantes et (B) de l'extrait brut de <i>Poga oleosa</i> ainsi que ces 3 fractions.....	96
Figure 33: Titre viral des incubations des cellules Vero 90 min en présence du virus CHIK-S27 et des extraits de plante.....	97
Figure 34: Titre viral des incubations de cellules Vero 90 min en présence du virus CHIK-S27 et des fractions de <i>Poga oleosa</i> .....	98
Figure 35 A: Titre viral de l'incubation des cellules Vero avec le CHIKV-S27 90min puis 16h après ajout des extraits de plantes.....	99
Figure 36: Titre viral obtenus après incubation des cellules Vero 90 en présence du CHIKV-S27 et 16h en présence des fractions de <i>Poga oleosa</i> .....	100
Figure 37 : Titre viral des incubations des cellules Vero en présence des surnageants de culture des cellules Vero infectées 16h en présence des plantes .....	101
Figure 38 : Pourcentage de multiplication des virus sur l'entrée en présence de différentes doses d'extrait et fraction de plante.....	102
Figure 39 : Pourcentage de multiplication des virus sur l'entrée et la réplication en présence de différentes doses d'extrait et fraction de plante.....	103
Figure 40 : Effet des extraits bruts de plante pendant la phase d'entrée sur l'expression des gènes codants pour la protéine nsP2 par visualisation par les colorants en cytométrie de flux. ....	105
Figure 41 : Analyse de l'effet des extraits bruts sur la phase d'entrée virale sur les protéines E1 et nsP2 par microscopie à fluorescence .....	106
Figure 42 : Inhibition de l'expression des gènes codants pour la protéine E1 par les extraits de <i>Khaya grandifoliola</i> et d' <i>Entada africana</i> administrés sur la phase d'entrée. ....	107
Figure 43 : Analyse de la capacité d' <i>Entandrophragma cylindricum</i> à inhiber l'expression des gènes codants pour la protéine virale nsP2 dans la cellule par cytométrie en flux.....	108
Figure 44: Inhibition concentration dépendante de la traduction des protéines nsP2 et de E1 durant la phase de réplication virale par l'extrait de EI et E6 A, B : qRT-PCR; C: Western blot. ....	109
Figure 45: Inhibition concentration dépendante de l'expression des gènes codant pour les protéines nsP2 et de E1 durant la réplication virale par EIII et Eea de A, B : RT-qPCR ; C : Western blot. ....	109
Figure 46 : Mécanisme antiviral de l'extrait brut et la fraction acétate d'éthyle sur l'étape de réplication du Virus Chikungunya .....	111

## **Résumé**

L'infection par les arbovirus représente une menace constante pour la santé en Afrique et au Cameroun en particulier. L'objectif de ce travail était d'étudier quelques aspects épidémiologique et pharmacologique des virus de la dengue et du chikungunya.

Pour atteindre cet objectif, nous avons mené une étude descriptive pendant une la période allant de Mars 2017 à Juin 2018 au cours de laquelle nous avons inclus tout patient consentant ayant une fièvre dans les formations sanitaires de 5 régions du Cameroun notamment les hôpitaux de district de Limbé (Sud-Ouest), de New-Bell (Littoral), de Londji (Sud), de Bafoussam (Ouest), de Mfou (Centre). Les échantillons de sang ont été collectés et utilisés pour la recherche des virus Dengue et Chikungunya par RT-PCR en temps réel. Les cas positifs de Dengue ont été sérotypés et génotypés par RT-PCR semi-nichée. Enfin, Le screening des propriétés anti-virus Chikungunya a été effectué après culture du virus en présence d'extraits de plantes, par le test de neutralisation sur plaque et par RT-PCR temps réel. Les effets des extraits actifs sur les étapes clés du cycle de réplication virale (Entrée, réplication, et assemblage/Libération des particules virales) et sur les protéines virales (nsP2 et E2) ont été déterminés. Les analyses statistiques des données ont été faites à l'aide des logiciels R version 4, SPSS version 22.0 et Graph pad version 5.0 pour Windows.

Sur les 527 échantillons collectés, 40 étaient positifs à la RT-PCR en temps réel dont 37 (7%) cas positifs de dengue et 3 (0,6%) cas positifs de chikungunya. Les virus Dengue appartiennent au type 1, et au génotype V. Nos résultats ont montré qu'après 16 heures d'incubation les extraits et fractions de plantes testés sont relativement non toxiques à la concentration de 100 µg/mL. Sur les dix plantes testées, les extraits bruts de EI (*Entandrophragma cylindricum*) ; EIII (*Poga oleosa*) et E6 (*Macaranga hurifolia*) présentaient une inhibition >80% à la concentration de 25 µg/mL. La fraction à l'acétate d'éthyle d'EIII a présenté l'activité antivirale la plus élevée. Enfin, les résultats ont montré que les extraits bruts de EI et EIII ainsi que la fraction acétate d'éthyle de EIII inhibent à la fois l'entrée et la réplication virale avec des pourcentages d'inhibition >80 ; tandis que les extraits bruts de E2 (*Khaya grandifoliola*) et E4 (*Entanda africana*) inhibent préférentiellement l'étape d'entrée du virus. Enfin, les extraits bruts d'E6, E12 (*Phragmenthera capitata*) et E13 (*Detarium microcarpum*) agissent préférentiellement sur l'étape de réplication et de libération des particules virales. Les résultats montrent aussi que ces inhibitions se font de manière concentration-dépendante. Ainsi les extraits de EIII et la fraction acétate d'éthyle ont présenté les indices de sélectivité les plus élevés pour l'inhibition de la réplication (65,28 et >185) ; tandis que pour l'inhibition de l'étape d'entrée, l'extrait EI a présenté l'indice de sélectivité le plus élevé. Les résultats du Western Blot et de la RT-qPCR ont montré que l'action sur les étapes de réplication virale et d'entrée du virus s'effectuait par inhibition de l'expression des gènes viraux nsP2 et E.

Les résultats de cette étude montrent la nécessité de renforcer la surveillance des infections fébriles aiguës, et que les plantes de la pharmacopée Camerounaise sont des sources de composés actifs dans la thérapeutique des infections au Chikungunya.

**Mots clés :** Virus de la dengue et du chikungunya, extraits et fractions de plantes, Cameroun.

## **Abstract**

Arbovirus infection is a constant threat to health in Africa and in Cameroon in particular. The objective of this study was to study some epidemiological and pharmacological aspects of Dengue and Chikungunya viruses.

To achieve this objective, we conducted a descriptive study from March 2017 to June 2018 during which we included all consenting patients with fever in the health facilities of 5 regions of Cameroon including the district hospitals of Limbé (South-West), New-Bell (Littoral), Londji (South), Bafoussam (West), Mfou (Centre). Blood samples were collected and used for the detection of Dengue and Chikungunya viruses by RT-PCR in real time. Dengue positive cases were serotyped and genotyped by semi-nested RT-PCR. Finally, screening for Chikungunya anti-virus properties was performed after virus culture in the presence of plant extracts, by plate neutralization test and real-time RT-PCR. The effects of the active extracts on the key steps of the viral replication cycle (Entry, replication, and assembly/release of viral particles) and on viral proteins (nsP2 and E2) were determined. Statistical analyses of the data were performed using R version 4, SPSS version 22.0 and Graph pad version 5.0 for Windows.

Out of the 527 samples collected, 40 were positive in real-time RT-PCR, including 37 (7%) positive cases of dengue and 3 (0.6%) positive cases of Chikungunya. The positive Dengue viruses belonged to type 1, and genotype V. Our results showed that after 16 hours of incubation, the tested plant extracts and fractions are relatively non-toxic at the concentration of 100 µg/mL. Of the ten plants tested, the crude extracts of EI (*Entandrophragma cylindricum*); EIII (*Poga oleosa*) and E6 (*Macaranga hurifolia*) showed >80% inhibition at the concentration of 25 µg/mL. The ethyl acetate fraction of EIII showed the highest antiviral activity. Finally, the results showed that the crude extracts of EI and EIII as well as the ethyl acetate fraction of EIII inhibited both viral entry and replication with inhibition percentages >80 while the crude extracts of E2 (*Khaya grandifoliola*) and E4 (*Entanda africana*) acted preferentially on viral entry. Finally, the crude extracts of E6, E12 (*Phragmenthera capitata*) and E13 (*Detarium microcarpum*) act preferentially on the replication stage and the release of virus particles. The results also show that these inhibitions are concentration-dependent. Thus, the EIII extracts and the ethyl acetate fraction showed the highest selectivity indices for replication inhibition (65.28 and >185) while for entry inhibition, the EI extract showed the highest selectivity index. Western blot and RT-qPCR results showed that the action on viral replication as well as viral entry was carried out by inhibiting the expression of the viral genes nsP2 and E.

The results of this study show the necessity to reinforce the surveillance of acute febrile infections and that my plants of the Cameroonian pharmacopoeia are sources of active compounds in the therapy of Chikungunya infections.

**Key words:** Dengue, Chikungunya, Arbovirus, plant extracts and fractions, Cameroon.



# **Introduction et objectifs**

## **Introduction**

Les maladies à transmission vectorielle sont parmi les principales causes de mortalité et de morbidité dans le monde. C'est le cas des infections par les arbovirus qui sont des virus transmis par les piqûres d'arthropodes infectés (moustiques et tiques) (Chippaux, 2003). Selon le catalogue international des arbovirus, il existe environ 534 arbovirus parmi lesquels environ 134 appartenant à 4 grandes familles sont capables d'infecter l'Homme (Chippaux, 2003; Fontenille, 1989). Il s'agit de la famille des *Bunyaviridae* (virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo, Virus de la fièvre de la vallée de rift etc.), *Reoviridae* (Orbivirus), *Flaviviridae* (virus de la dengue (DENV), Zika (ZIKV), amaril etc.) et *Togaviridae* (virus Chikungunya (CHIKV), Encéphalite équine, etc.). Ce sont pour la plupart des virus à ARN simple brin de polarité positive (Cunha & Trinta, 2017; Vijayan & Sukumaran, 2016).

Le CHIKV est un virus à ARN enveloppé simple brin de polarité positive qui appartient au genre *Alphavirus* et à la famille des *Togaviridae* (Fros *et al.*, 2012). Il s'agit d'un virus sphérique de 70 nm de diamètre. Il est constitué d'une capsid protéique et d'une enveloppe lipoprotéique provenant de l'hôte (Giry *et al.*, 2017). Il possède un génome d'environ 12 kb qui code pour quatre protéines non structurales (nsP1-4), avec cinq protéines structurales (C, E3, E2, 6K et E1) exprimées à partir d'ARN sous-génomique synthétisé dans les cellules infectées (Hong *et al.*, 2006). Selon les études phylogénétiques, il existe trois génotypes du virus Chikungunya. Le groupe de génotypes Ouest-africain a été identifié à partir de patients nés en Afrique de l'Ouest. Le deuxième groupe est le génotype asiatique, qui regroupe à 60 % uniquement des isolats de virus provenant d'Asie et notamment de Malaisie et d'Inde. Un troisième groupe est constitué d'isolats provenant de diverses Régions de l'Est, du Centre et du Sud de l'Afrique, connu sous le nom de génotype ECSA. Ce dernier génotype est celui qui est responsable de la plupart des épidémies actuelles dans le monde (Weaver & Forrester, 2015).

Le virus de la Dengue possède un ARN simple brin de polarité positive. L'ARN viral est sphérique, enveloppé par une membrane, d'un diamètre de 65 à 70 nanomètres (Flamand & Desprès, 2002). Le génome viral est un ARN d'environ 11kb ne possédant qu'un seul clade de lecture ouvert (ORF) codant pour trois protéines structurales (C, prM/M, E) et sept protéines non structurales (NS1, NS2a/b, NS3, NS4a/b, NS5) (Amarasinghe, 2011). L'infection au virus de la dengue est dans la majorité des cas asymptomatique. Il existe quatre sérotypes génotypiquement différents mais qui sont très semblables. Le virus de la dengue peut causer des formes plus sévères de la maladie, la dengue hémorragique et le syndrome de

choc dengue (DHF/DSS), responsables d'un taux de mortalité élevé, en particulier chez les enfants. Une infection secondaire par un sérotype hétérologue a été établie comme le principal facteur de risque pour l'apparition du DHF/DSS (Goncalvez *et al.*, 2002).

A la suite de l'injection de salive lors de la piqûre d'un arthropode infecté, les arbovirus vont se répliquer à proximité du point d'inoculation, puis dans les ganglions lymphatiques correspondants (phase de virémie). La période d'incubation de l'infection due aux arbovirus varie entre 1 et 12 jours, avec une moyenne de 2 à 4 jours. Puis, les virus vont se disséminer dans l'organisme jusqu'aux différents organes. L'infection entraîne une réponse immunitaire à médiation humorale et cellulaire. Durant les épidémies récentes en Asie, en Amérique et en Afrique (Weaver & Forrester, 2015), de nombreuses complications telles que l'arthrite chronique, le syndrome hémorragique et l'encéphalite ont été décrites. Les autres symptômes cliniques peuvent inclure : éruption maculopapuleuse, arthrites/arthralgies, maux de tête et vomissements (Manore *et al.*, 2014). Cependant, la plupart de ces signes cliniques sont similaires à ceux causés par la maladie parasitaire la plus endémique transmise par les moustiques (le paludisme) (Hertz *et al.*, 2012).

Deux cycles de transmission distincts ont été décrits pour ces arbovirus. Le cycle sylatique a été documenté principalement en Afrique, entre les primates non humains et les espèces *Aedes* vivant dans les forêts (Jupp & McIntosh, 1990). Ces virus peuvent également être transmis aux humains, qui empiètent sur le cycle naturel, par des activités telles que la chasse et la cueillette ou la vie à proximité du milieu sylatique. Le cycle sylatique affecte principalement les populations rurales (Diallo *et al.*, 2008; Fontenille *et al.*, 1998). Le cycle urbain quant à lui caractérise les zones où vivent de nombreuses populations en milieux urbains et dans lesquels la circulation virale se fait selon un cycle humain-moustique-humain (Petersen & Powers, 2016).

Le diagnostic clinique des infections par le virus de la dengue et du chikungunya est difficile en raison de l'absence de symptômes spécifiques et de leur ressemblance avec d'autres maladies caractérisées par la présence de fièvre, comme le paludisme et la fièvre typhoïde. Le diagnostic biologique peut être établi aux premiers stades de la maladie par la recherche du virus ou des particules virales ; ou à un stade ultérieur (7 jours ou plus après l'apparition des signes cliniques) par la recherche des anticorps anti-arbovirus à l'aide de tests sérologiques (Silva & Dermody, 2017).

La médecine moderne ne propose aucun traitement efficace contre l'infection par les arbovirus, la prise en charge est donc symptomatique, basée sur l'utilisation des antidouleurs et des anti-inflammatoires. L'infection par les arbovirus est concentrée dans les zones intertropicales. L'Afrique reste un continent à haut risque de transmission surtout avec la présence du vecteur *Aedes aegypti* et de l'émergence d'un vecteur d'origine asiatique *Aedes albopictus*. (Kamgang *et al.*, 2017 ; Guzman *et al.*, 2010). En Asie des études pharmacologiques ont montré le potentiel que pourrait avoir certains extraits de plantes sur les arbovirus (Jain *et al.*, 2018; Ledoux *et al.*, 2018; Mohamat *et al.*, 2018).

Deux revues systématiques ont permis d'avoir une idée sur la circulation du virus de la dengue et du chikungunya en Afrique du nord et au Moyen-Orient par Humphred *et al.* (2016) avec des fréquences allant de 0 à 63%. Au Cameroun, la plupart des études faites sur les arbovirus cible la présence des anticorps dirigés contre ces virus. La présence des réactions croisées entre les virus de la même famille diminue la sensibilité de cette technique (Tchouandom *et al.*, 2018; Demanou *et al.*, 2014; Kuniholm *et al.*, 2006). Ainsi, aucune étude n'a permis de caractériser la présence de ces virus au Cameroun, ni de ressortir la prévalence moyenne des virus Dengue et Chikungunya en Afrique. Par ailleurs, il n'existe aucune étude montrant l'effet des extraits de plantes de la pharmacopée camerounaise sur les arbovirus. Au vue de ces observations, nous nous sommes posés les questions suivantes :

### **Questions de recherche**

- Quelle est la fréquence de détection des virus Dengue et Chikungunya au Cameroun ?
- Quelles sont les plantes médicinales potentiellement actifs contre le virus Chikungunya ?
- Quel est l'effet des extraits actifs sur le cycle de réplication virale ?

Afin de proposer des réponses à ces questions nous avons émis les hypothèses et les objectifs ci-dessous.

### **Hypothèses de recherche**

- La prévalence des infections à la dengue et au chikungunya est élevée au Cameroun.
- Les plantes de la pharmacopée camerounaise sont capables d'inhiber la multiplication du virus Chikungunya

- Les plantes médicinales inhibent la multiplication en agissant sur les étapes clés du cycle de réplication virale.

### **Objectif général**

Etudier quelques aspects épidémiologiques et pharmacologiques des virus Dengue et Chikungunya.

### **Objectifs spécifiques**

- Déterminer la prévalence de la dengue et du chikungunya dans quelques hôpitaux de district du Cameroun.
- Caractériser les cas positifs du virus de la dengue détectés
- Déterminer les propriétés antivirales de quelques extraits de plantes sur le virus Chikungunya.

# **Chapitre I : Revue de la littérature**

## **Chapitre I. Revue de la littérature**

### **I.1. Historique de la découverte des Arbovirus : Cas des virus Dengue et Chikungunya**

#### **I.1.1. Définitions et Généralités sur les arbovirus**

Provenant de l'expression anglaise « *Arthropod-borne virus* », les arbovirus sont des virus transmis par les piqûres d'arthropodes infectés (OMS, 1967).

Encore appelées anthroponoses car pouvant se retrouver chez l'Homme et chez les animaux, les arboviroses sont des maladies transmises par les arbovirus, la transmission pouvant se faire de façon biologique (entre hôtes vertébrés, par des arthropodes hématophages), trans-ovarienne et éventuellement vénérienne (chez les arthropodes) (Chippaux, 2003).

Selon le catalogue international des arbovirus, ces virus sont principalement rencontrés dans les zones intertropicales et sont regroupés en quatre grandes familles (*Togaviridae*, des *Flaviviridae*, des *Bunyaviridae* et des *Reoviridae*) qui ont été identifiées comme contenant des espèces pouvant entraîner des maladies humaines, animales ou zoonotiques. Au sein de ces différentes familles, plus de 534 arbovirus (134 étant responsables des maladies humaines et une quarantaine responsable des pathologies animales pouvant avoir des conséquences économiques importantes) ont été identifiés. Le tableau I indique quelques arbovirus ainsi que leur distribution géographique (Thi, 2015).

#### **I.1.2. Histoire de la découverte du virus de la Dengue**

La première description de la fièvre dengue se trouve dans une encyclopédie médicale chinoise datant de la dynastie Chine (265–420 après Jésus-Christ). Elle faisait référence à une maladie appelée « poison de l'eau » renvoyant aux insectes volants liés à l'eau et caractérisée par la présence de fièvre, des éruptions cutanées, des douleurs oculaires, des arthralgies et des myalgies, ainsi que par des saignements pharyngés, gingivaux, vaginaux ou intestinaux (Gubler, 2002).

**Tableau I** : Principaux arbovirus tropicaux selon la région géographique (Rodhain, 1983)

Familles	Genres	Principaux arbovirus retrouvés en Afrique	Principaux arbovirus retrouvés en Asie et Pacifique du Sud	Principaux arbovirus retrouvés en Amérique
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Chikungunya O’Nyong Nyong, Sindbis	Chikungunya, Sindbis Ross River, Barmah Forest	Mayaro, Una, Encéphalites équines Américaines
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Fièvre jaune, Dengue West-Nile Zika	Dengue, Encéphalite Japonaise, West-Nile, Murray Valley, Kunjin, Zika, Forêt de Kyasanur	Fièvre jaune, Dengue, West-Nile, Rocio, Ilheus, Encéphalite de Saint Louis, Zika
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Bunyavirus</i> <i>Phlébovirus</i> <i>Nairovirus</i>	Bunyamwera Ilesha Bwamba Tataguine Valée du Rift Crimée-Congo		Oropouche
<i>Reoviridae</i>	<i>Orbivirus</i>	Orungo		

Des allusions à des foyers d'une maladie similaire ont été faites aux XVIIe et XVIIIe siècles dans les Indes françaises (1635), Darien (1699), Batavia (1779), Le Caire, Alexandrie (1779), Philadelphie (1780), Cadix (1784 et 1788), Séville (1784 et 1785) et Philadelphie (1780). Au cours du 19ème siècle, des épidémies semblables à la dengue ont été signalées dans les régions tropicales et subtropicales du monde. En 1824, par exemple, une maladie similaire à la dengue frappa Calcutta, en Inde. Entre 1826-1827, une épidémie de « fièvre osseuse » a été signalée à Charleston (Caroline du Sud) et à Savannah (Géorgie), dans le Sud des États-Unis. Au cours des années 1870-1873, une autre épidémie toucha divers continents allant de Zanzibar (Juillet 1870), sur la Côte Est de l’Afrique, puis s’est étendue à la côte arabe et à Port-Saïd et d’autres continents. Enfin, les épidémies ont été déclarées aux îles Maurice et de la Réunion dans les années 1960 (Buchillet, 2012).

La dengue (DENV) est causée par un virus du genre *Flavivirus* (famille *Flaviviridae*) dont quatre sérotypes, phylogénétiquement distincts, ont été identifiés à ce jour : DENV-1,



DENV-2, DENV-3 et DENV-4 (Morra *et al.*, 2018). Les DENV-1 et -2 ont ensuite été isolés chez des soldats américains au cours de la seconde guerre mondiale, tandis que les DENV-3 et -4 ont été isolés en 1954 chez des patients lors d'une épidémie de dengue hémorragique à Manille, aux Philippines (Hammon *et al.*, 1960; Sabin & Schlesinger, 1945).

### **I.1.3. Histoire de la découverte du virus Chikungunya**

Le virus du Chikungunya (CHIKV), un *Alphavirus* de la famille des *Togaviridae*, est transmis par un moustique de genre *Aedes* (Wahid *et al.*, 2017).

En Afrique, après la découverte de son premier foyer en 1952 sur le plateau de Makonde (Tanzanie), il a été nommé d'après le mot makonde : « kungunyala », qui signifie : « ce qui se penche », en référence à la posture des patients souffrant de douleurs articulaires graves pendant l'infection à CHIKV depuis sa première incidence. Entre les années 1960 et 1990, des épidémies ont été enregistrées en République démocratique du Congo, en République Centrafricaine, au Malawi, en Ouganda, au Burundi, en Angola, en Guinée, en Afrique du Sud et au Nigéria. Près d'un demi-million de cas ont été signalés en Juin 2004 lors d'une éclosion à Atoll Lamu, au Kenya (Zeller *et al.*, 2013). Une épidémie de chikungunya a touché l'île de la Réunion entre le début de l'année 2005 et le milieu de l'année 2006, touchant près de 40 % de la population. Apparue en Juillet 2004 aux Comores, le chikungunya est une maladie virale transmise par les espèces de moustiques du genre *Aedes* (Vazeille *et al.*, 2010; Boutin, 2006).

En Asie, le virus CHIKV a été signalé pour la première fois à Bangkok, en Thaïlande, en 1958. Le virus s'est propagé dans les régions environnantes jusqu'en 1964, puis est réapparu en 1975 et 1976. Une vingtaine d'États indiens ont connu plusieurs épidémies désastreuses. En Inde, des épidémies majeures qui ont accentué les préoccupations relatives au CHIKV se sont produites en 2005, touchant 1,4 million de personnes. Plus d'un million d'infections à CHIKV ont été signalés dans différentes régions de l'Inde entre Janvier 2006 et Août 2007, la plupart des patients venant du Kerala et du Tamil Nadu. Une autre épidémie de moindre ampleur est survenue en Indonésie au cours de la même période, touchant environ 15 000 personnes (Sudeep & Parashar, 2008).

En Europe, le premier foyer autochtone de CHIKV a été signalé en 2007 en Émilie-Romagne, en Italie. Le vecteur du CHIKV, *Aedes albopictus*, est présent dans près de 20 pays européens. Le génotype ECSA était responsable de l'émergence du CHIKV en Europe. Malgré l'afflux massif de voyageurs revenant des Amériques où le génotype du CHIKV

asiatique a causé environ un million de cas, aucune transmission autochtone du CHIKV liée au génotype asiatique n'a été rapportée en Europe. En 2007, une épidémie de CHIKV en Italie a débuté avec un ressortissant indien qui a développé un syndrome fébrile deux jours après son arrivée en Italie (Petersen & Powers, 2016).

En Amérique, l'émergence du CHIKV s'est produite en Décembre 2013 à Saint-Martin et le virus s'est propagé dans 17 pays d'Amérique du Sud jusqu'en Décembre 2014. Depuis sa première apparition à Saint-Martin, la transmission autochtone du CHIKV a été identifiée dans 45 pays (Jain *et al.*, 2008).

## **I.2. Description des virus de la dengue et du chikungunya**

### **I.2.1. Le virus de la dengue (DENV)**

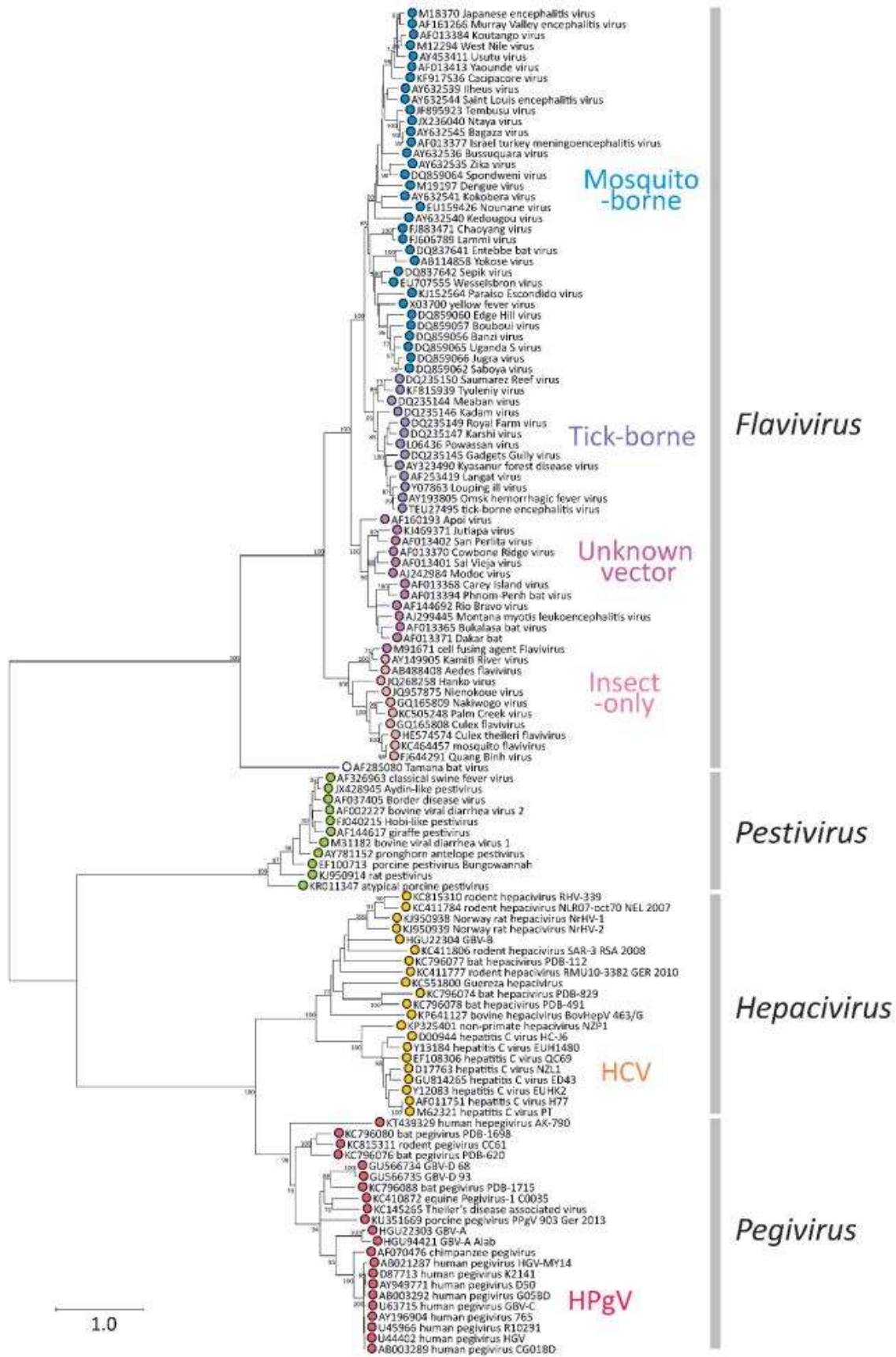
La dengue est une infection virale systémique, transmise entre humains par des piqûres de moustiques.

#### **I.2.1.1. Taxonomie**

La dengue est causée par l'un des quatre virus, de type 1 à 4 (également appelés sérotypes) appartenant à la famille des *Flaviviridae* et plus spécifiquement du genre *Flavivirus* (Li *et al.*, 2008). La famille des *Flaviviridae* est constituée de 4 genres à savoir les *Hepacivirus*, *Pegivirus*, *Pestivirus* et *Flavivirus* (**Figure 1**). Le genre *Flavivirus* comprend plus de 70 virus parmi lesquels le virus de la dengue, le virus de l'encéphalite japonaise, le virus de l'encéphalite de Saint-Louis et le virus de la fièvre jaune sont d'importants agents pathogènes humains (Simmonds *et al.*, 2017).

#### **I.2.1.2. Organisation génomique**

Le DENV est un virus à ARN enveloppé, simple brin, sens positif, d'environ 10-11 kb de longueur. Les virus de la dengue possèdent un diamètre d'environ 50 nm et ont une capside icosaédrique à symétrie cubique. L'enveloppe est constituée d'une bicouche lipidique qui dérive de la cellule-hôte et dans laquelle sont ancrées deux glycoprotéines structurales virales, la protéine d'enveloppe (E) et la protéine de membrane (M), et sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) (**Figure 2A**) (Kuhn *et al.*, 2002).



**Figure 1:** Phylogénie des séquences d'acides aminés conservées (NS5 ou NS5B) des membres de la famille des *Flaviviridae* (Shi *et al.*, 2015).

Les études des structures protéiques des gènes de la dengue a permis de déduire des incidences sur la fonction des protéines, telles que la dynamique de la forme des virions, la disponibilité du site de liaison, les rôles de réplication et de virulence, et la variation aux épitopes définis (Kuno *et al.*, 1998).

### **I.2.1.3. Protéines virales et leurs fonctions ( Yu *et al.*, 2008; Mukhopadhyay *et al.*, 2005).**

- La protéine E ou protéine de l'enveloppe, joue un rôle dans l'attachement viral à la cellule cible et favorise l'endocytose. Cette protéine est la cible privilégiée des anticorps. Elle est constituée d'un domaine central (domaine I), d'un domaine de dimérisation qui présente un peptide de fusion (domaine II) et d'un domaine de reconnaissance du récepteur au virus à la surface cellulaire (domaine III).

- La protéine M ou protéine de la membrane, synthétisée sous forme de précurseur appelé pré-membrane (PrM), permet de maintenir l'intégrité de la conformation de la protéine E pendant l'assemblage du virion. Le clivage de PrM en protéine M a lieu lors de l'exocytose des nouveaux virions vers l'extérieur de la cellule. De plus, il acquiert au même moment son enveloppe d'origine cellulaire (**Figure 2B**).

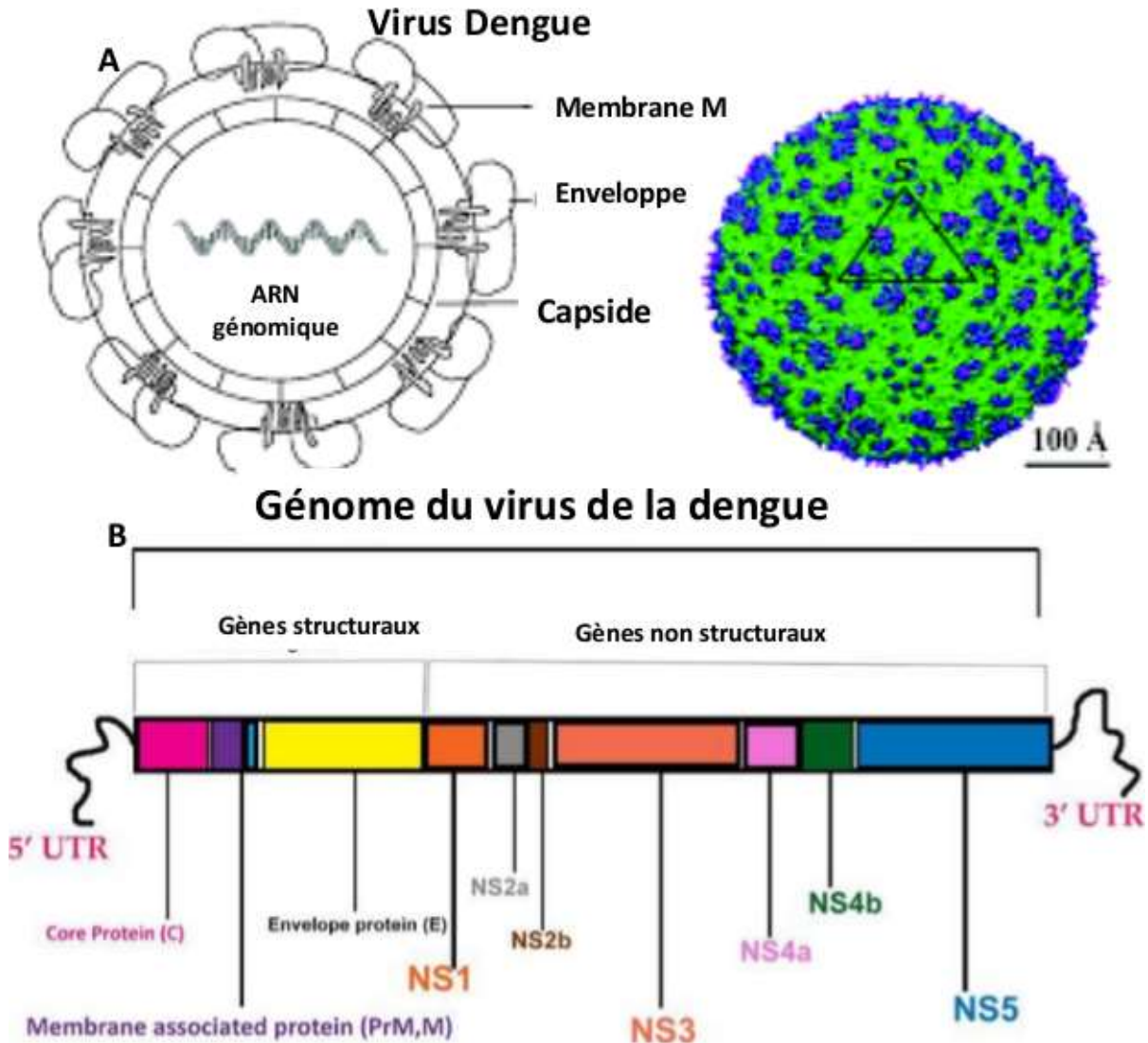
- La protéine de capsid (C), forme la nucléocapside.

- La protéine NS1 existe sous forme soluble ou sous une forme associée aux membranes cellulaires. Elle a la possibilité sous forme d'homodimère, de s'associer aux membranes des cellules infectées. Elle se dimérise pour pouvoir être exportée du réticulum endoplasmique (RE) vers la membrane plasmique. Elle est donc présente sur la surface cellulaire des cellules infectées, tandis que la partie libérée dans le milieu extracellulaire, sous forme soluble hexamérique peut être détectée dans le sérum de patients infectés (Yu *et al.*, 2008; Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

- NS2A, NS2B, NS4A et NS4B sont des protéines membranaires intégrales qui sont localisées sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE). NS4A, probablement de concert avec des facteurs viraux et hôtes, réduit les réarrangements de la membrane. Ceux-ci incluent des vésicules formées par invagination de la membrane du RE. Les vésicules servent de sites pour la réplication de l'ARN et sont reliés au cytosol via un pore servant probablement de site de sortie pour l'ARN viral. Cet ARN s'associe à la protéine de capsid, formant très probablement un complexe capsid-ARN peu structuré, et s'enfonce dans la lumière du RE en acquérant ainsi une membrane lipidique décorée d'hétérodimères de la protéines prM ( Guo *et al.*, 2017; Fischl & Bartenschlager, 2011).

- La protéine NS3 est probablement trifonctionnelle et possède des activités de protéase, d'hélicase et d'ARN triphosphatase ( Messina *et al.*, 2014; Blacksell *et al.*, 2006).

La protéine NS5 possède une activité ARN polymérase ARN-dépendante. C'est une protéine multifonctionnelle qui possède un domaine N-terminal qui joue le rôle de méthyltransférase suivi d'un domaine C-terminal ARN polymérase dépendant (Simmons *et al.*, 2012).



**Figure 2** : Structure du virus de la dengue (A) et du génome viral (B) (Wilder-Smith *et al.*, 2019)

**Légende** : 5'-3'UTR : 5'-3' Region transcrite non traduite ; C : Protéine Core ; E : Proteine de l'enveloppe ; NS : Protéine non structurale

#### I.2.1.4. Variabilité génétique

Le virus de la dengue comprend quatre sérotypes, à savoir DENV-1, DENV-2, DENV-3 et DENV-4. Les sérotypes du virus de la dengue ont une corrélation avec la sévérité de la maladie due à la réponse immunitaire de l'hôte. Les quatre virus de la dengue ont entre

eux une homologie protéique de 60 à 80 %, le sérotype étant déterminé par une glycoprotéine d'enveloppe (E1/2). Les études de séquençage du génome viral ont révélé par ailleurs une hétérogénéité à l'intérieur d'un même sérotype et une aptitude à la mutation, à la microévolution et à la divergence génétiques.

- Le virus de la dengue sérotype 1 (DENV-1) comprend 5 génotypes regroupés en génotype I à V. Le génotype I est représenté par deux des premiers isolats des années 1940, dont la souche prototype Hawaïi, et par des souches d'Asie du Sud-Est, de Chine et d'Afrique de l'Est; le génotype II est représenté par les souches isolées en Thaïlande dans les années 1950 et 1960; le génotype III, par une souche selvatique de Malaisie; le génotype IV, par des isolats des îles du Pacifique Occidental et d'Australie; le génotype V, regroupant toutes les souches isolées d'Amérique, trois souches d'Afrique occidentale et deux souches asiatiques. (Dorji *et al.*, 2009; Goncalvez *et al.*, 2002).

- Le virus de la dengue sérotype 2 (DENV-2) est subdivisé en six génotypes, dont cinq sont présents chez l'Homme avec des distributions géographiques différentes. Les génotypes, "Asian I" et "Asian II", sont actuellement limités à l'Asie du Sud-Est. Le génotype "American" ne circule que sur le continent américain et, avec une fréquence décroissante, le génotype "Asian/American" a ses origines dans l'Asie du Sud-Est, mais s'est étendu aux Amériques au fil des années, et enfin, le génotype « Cosmopolitan » est largement répandu dans le monde tropical et subtropical. De nombreuses preuves expérimentales montrent que les souches asiatiques de DENV-2, associées au syndrome de choc de la dengue et fièvre hémorragique de la dengue (DSS/DHF), sont capables de supplanter celles échantillonnées à partir du génotype américain ( Zhang *et al.*, 2005; Twiddy *et al.*, 2002; Leitmeyer *et al.*, 1999).

- Le virus de la dengue sérotype 3 (DENV3) est subdivisé en 5 génotypes nommés I, II, III, IV et V. Les génotypes I (GI) et II (GII) sont constitués de souches isolées de la région asiatique. Les souches de génotype III (GIII) présentent une large répartition géographique, notamment en Asie, dans les Caraïbes, dans les Amériques et en Europe. Le génotype III est subdivisé en trois sous-populations (GIII-a, GIII-b et GIII-c) et est donc hétérogène. Les sous-populations des génotypes I, II et GIII-a comprennent des souches asiatiques, tandis que GIII-c comprend des souches américaines. La sous-population GIII-b comprend principalement des souches américaines ainsi que quelques souches du Sri Lanka. Le génotype IV (GIV) comprend des souches plus anciennes isolées des Caraïbes telles que Tahiti (1965) et Porto Rico (1963/77). Le génotype V (GV) comprend principalement des souches asiatiques alors que quelques souches d'Amérique (Brésil et Colombie) ont également été rapportées dans des

études récentes (Waman *et al.*, 2017; Lobo *et al.*, 2016; Aquino *et al.*, 2009; Dorji *et al.*, 2009).

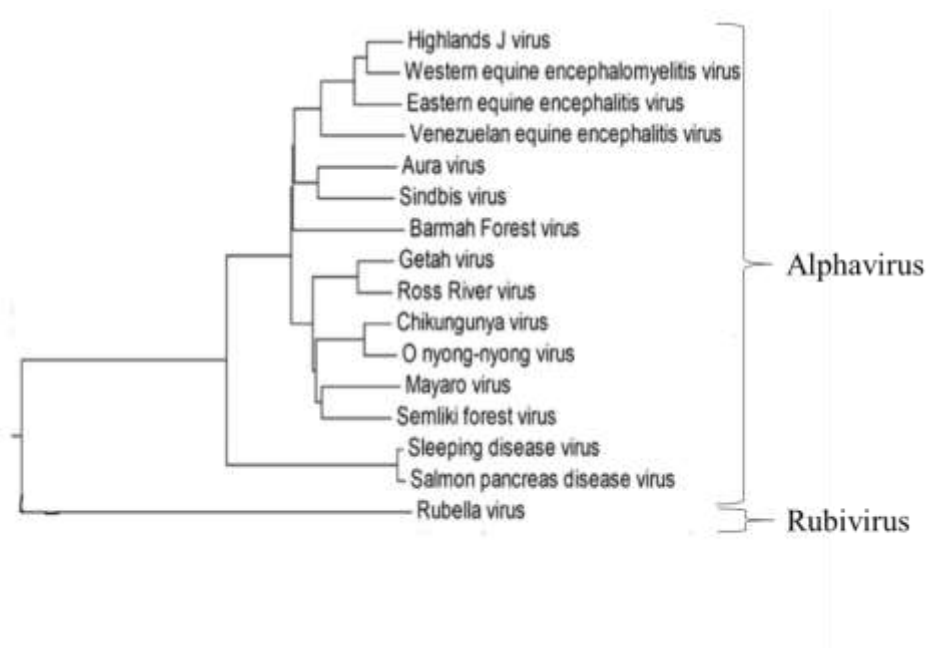
- Le virus de la dengue sérotype 4 (DENV4) est subdivisé en 5 génotypes nommés I, II, III, IV et V. Le génotype II étant subdivisé en IIa et IIb. Les génotypes I et II circulent actuellement dans les populations humaines du monde entier. Inversement, les infections de génotype III, IV et V sont relativement rares. Le génotype III a été détecté sporadiquement en Asie entre 1997 et 2015, et le génotype V principalement en Inde dans les années 1960, mais aussi récemment qu'en 2009. Le génotype IV est selvatique (Gallichotte *et al.*, 2018).

## I.2.2. Cas du virus Chikungunya

### I.2.2.1. Taxonomie

Le CHIKV est un membre de la famille *Togaviridae*, genre *Alphavirus*. Les *Togaviridae* regroupent les virus appartenant au groupe IV des virus à ARN. Ils sont subdivisés en deux genres qui sont :

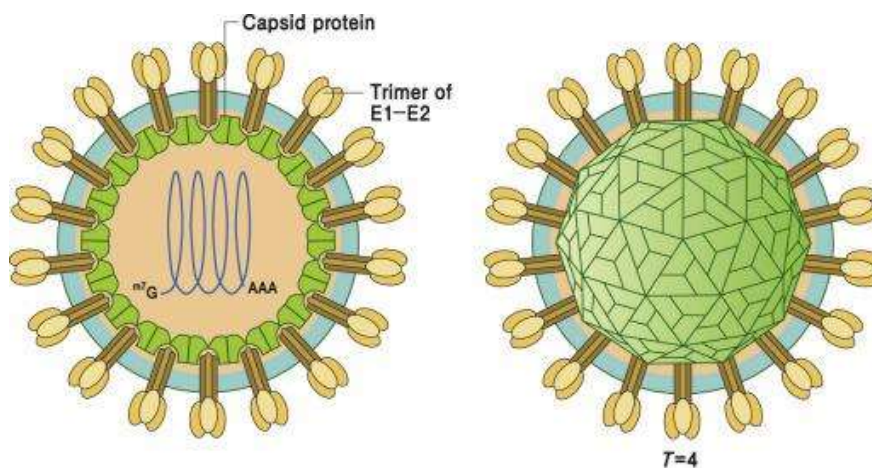
- Le genre *Alphavirus* possède une large gamme de virus parmi lesquels on peut citer les virus Sindbis, de l'encéphalite équine de l'Est, de l'encéphalite équine de l'Ouest, de Ross River, O'Nyong-nyong, Chikungunya etc.
- Le genre *Rubivirus* comprend un seul virus à savoir le virus de la rubéole (**Figure 3**) (Burt *et al.*, 2017; Schwartz & Albert, 2010).



**Figure 3:** Représentation phylogénétique de quelques virus de la famille des *Togaviridae* (Petersen & Powers, 2016)

### I.2.2.2. Organisation génomique

Le CHIKV possède un génome à ARN à sens positif simple brin. Le génome viral contient deux cadres de lecture ouverts codant l'un pour des protéines non structurales et l'autre pour des protéines structurales (**Figure 4**). En plus de l'ARN du génome, un ARN sous-génomique contenant les gènes de la protéine structurale et la région 3' non codante est synthétisé pendant la réplication. Les ARN génomiques et sous-génomiques ont tous deux une coiffe de 7mGpppA de type viral 0 à leur extrémité 5' et une queue poly-A à leur extrémité 3'. L'ARN, brin négatif, intermédiaire de la réplication ne possède pas de coiffe et ne contient qu'une queue poly-A. Les protéines structurales sont traduites à partir de l'ARNm sous-génomique (Schwartz & Albert, 2010).



**Figure 4** : Représentation schématique du virus Chikungunya (Schwartz & Albert, 2010)

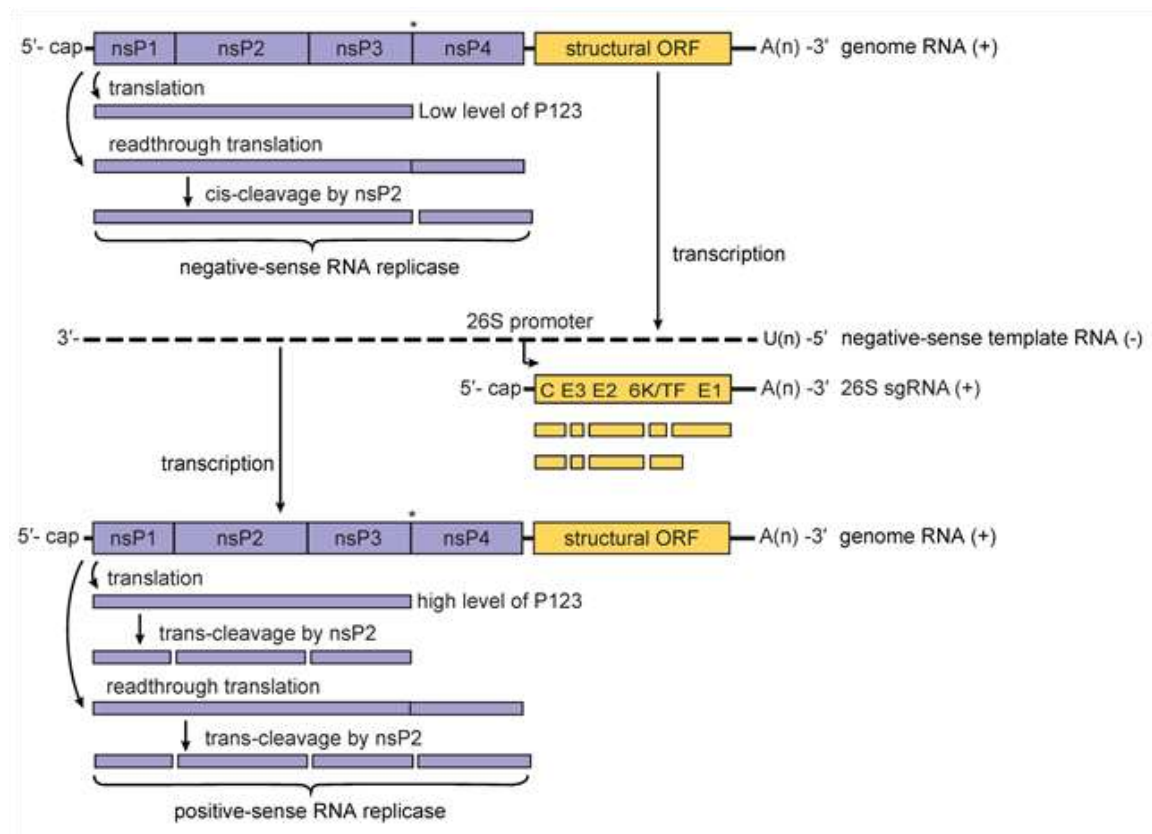
Le virus chikungunya est constitué d'une capsid enveloppée, sphérique, icosaédrique, de 65-70nm de diamètre, avec une symétrie icosaédrique T=4 composée de 240 monomères. L'enveloppe contient 80 pointes de trimères, chaque pointe = 3 x hétérodimères E1/E2.

### I.2.2.3. Protéines virales et leurs fonctions

Le virus Chikungunya est un virus sphérique de 70 nm de diamètre. Il est constitué d'une capsid protéique et d'une enveloppe lipoprotéique provenant de l'hôte. Le virus Chikungunya possède un génome d'ARN positif d'environ 12 kb qui code pour quatre protéines non structurales (nsP1-4), avec cinq protéines structurales (C, E3, E2, 6K et E1) exprimées à partir d'ARN subgénomique synthétisé dans des cellules infectées (**Figure 5**). Le génome comprend une région courte non traduite à l'extrémité 5' et une région non traduite à l'extrémité 3' plus longue, comprenant des structures en tige-boucle et des répétitions directes qui seraient associées à l'adaptation du virus aux moustiques (Burt *et al.*, 2017).



- Les glycoprotéines E1 et E2, constituent la coquille icosaédrique du CHIKV. E1 facilite la fusion membranaire, E2 facilite la liaison du CHIKV à la cellule hôte. Les motifs de liaison dans les deux domaines A et B de E2 facilitent l'interaction. La troisième protéine structurale, E3, protège contre la fusion prématurée de l'hétérodimère E2-E1 avec les membranes cellulaires (Perera *et al.*, 2017; van Duijl-Richter *et al.*, 2015; Hong *et al.*, 2006).
- La protéine C ou capsid est constituée de deux domaines : le domaine N-terminal de liaison à l'ARN et le domaine de protéase C-terminal. Alors que le domaine N-terminal est impliqué dans la liaison à l'ARN génomique, le domaine C-terminal est fortement impliqué dans la formation de la poly-protéine structurale et du cycle de vie viral. Son interaction moléculaire avec le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine E2 est connue pour faciliter le bourgeonnement des virions de la membrane plasmique de la cellule hôte infectée (Hong *et al.*, 2006).
- La protéine nsP1, une protéine palmitoylée avec 535 résidus d'acides aminés est impliquée dans les activités méthyltransférase et guanylyl-transférase, responsables du recouvrement et de la méthylation des ARN génomiques et subgénomiques viraux nouvellement formés (Blaising *et al.*, 2014).
- La protéine nsP2 est une protéine multifonctionnelle dotée d'un domaine protéolytique C-terminal (cystéine protéase). Cette cystéine protéase est composée de 324 résidus et la déprotonation du groupe thiol de la cystéine initie la catalyse dans le site actif en utilisant des acides aminés basiques tels que l'histidine (Grudkowska & Zagdańska, 2004; Strauss & Strauss, 1994).



**Figure 5 :** Génome du virus Chikungunya (Subudhi *et al.*, 2018)

**Légende :** nsP : Protéine non structurale, 5'CAP : coiffe 5' ; RNA : acide ribonucléique

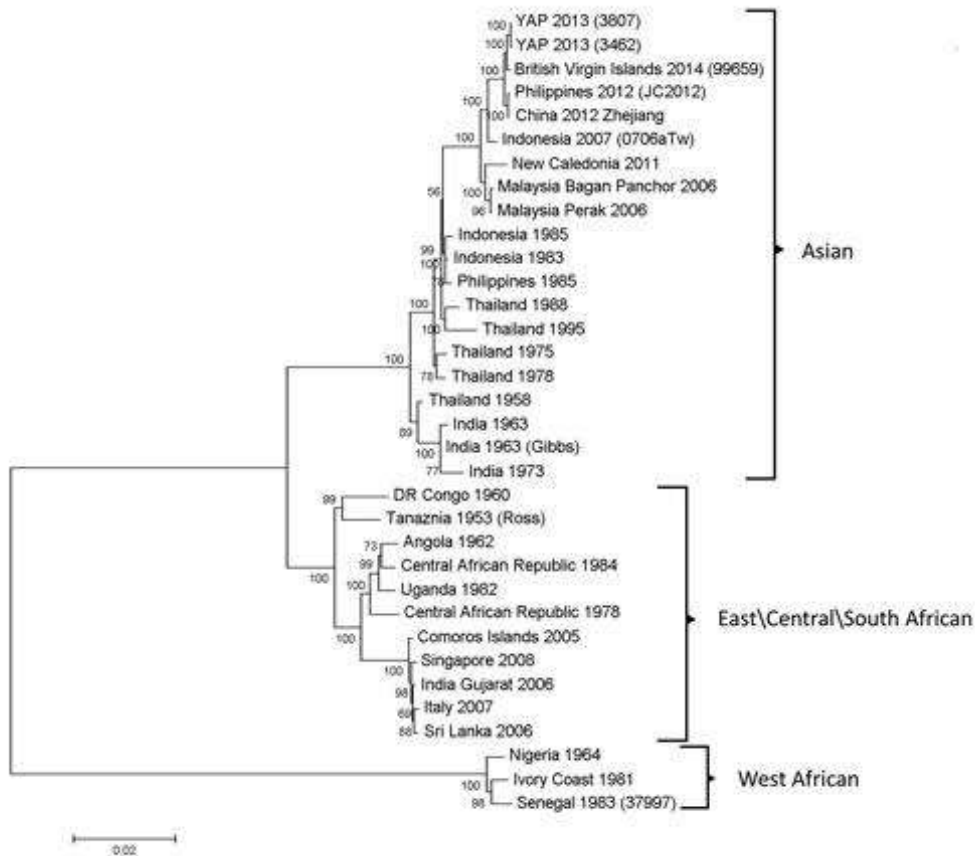
- Le rôle de la protéine nsP3 dans la réplication CHIKV n'est pas encore bien élucidé. Néanmoins, des rapports récents ont montré que nsP3 interagissait avec le HSP-90, chaperon du stress de l'hôte, qui favorise la réplication du CHIKV. Il a également été proposé que nsP3 bloque l'assemblage des granules sous contrainte en interagissant avec la protéine de liaison au domaine Ras-GAP SH3 (G3BP) afin de promouvoir la réplication de l'ARN du CHIKV. De plus, la phosphorylation de nsP3 est corrélée à la synthèse d'ARN par brin négatif (Rathore *et al.*, 2014; Fros *et al.*, 2012).

- La protéine nsP4 est une ARN polymérase dépendante de l'ARN. Les études récentes ont démontré qu'un dérivé du benzimidazole inhibait l'infection par CHIKV en ciblant nsP4. Il a été démontré que l'action était due à une interaction avec le résidu M2295 dans le nsP4, entraînant une inhibition de la fonction ARN-polymérase dépendante de l'ARN (Wada *et al.*, 2017; Hong *et al.*, 2006).

#### I.2.2.4. Variabilité génétique

Selon les études moléculaires, on distingue plusieurs génotypes du virus Chikungunya. Le génotype Ouest Africain regroupe les séquences des cas des patients natifs de l'Afrique de l'Ouest. Le second groupe est le génotype Asiatique, qui regroupe uniquement les isolats de

virus provenant de l'Asie et particulièrement de la Malaisie et de l'Inde à 60%. Un troisième groupe est constitué des isolats provenant de diverses régions de l'Afrique de l'Est, du Centre, et du Sud et de l'Afrique et nommé sous le nom de génotype Est/Centre/Sud-Africain (**Figure 6**). Ce dernier génotype est celui qui est responsable de la plupart des épidémies actuelles dans le monde ( Thi, 2015; Hall, 2007).



**Figure 6** : phylogénie du virus du chikungunya basé sur l'analyse du génome entier (Hall, 2007)

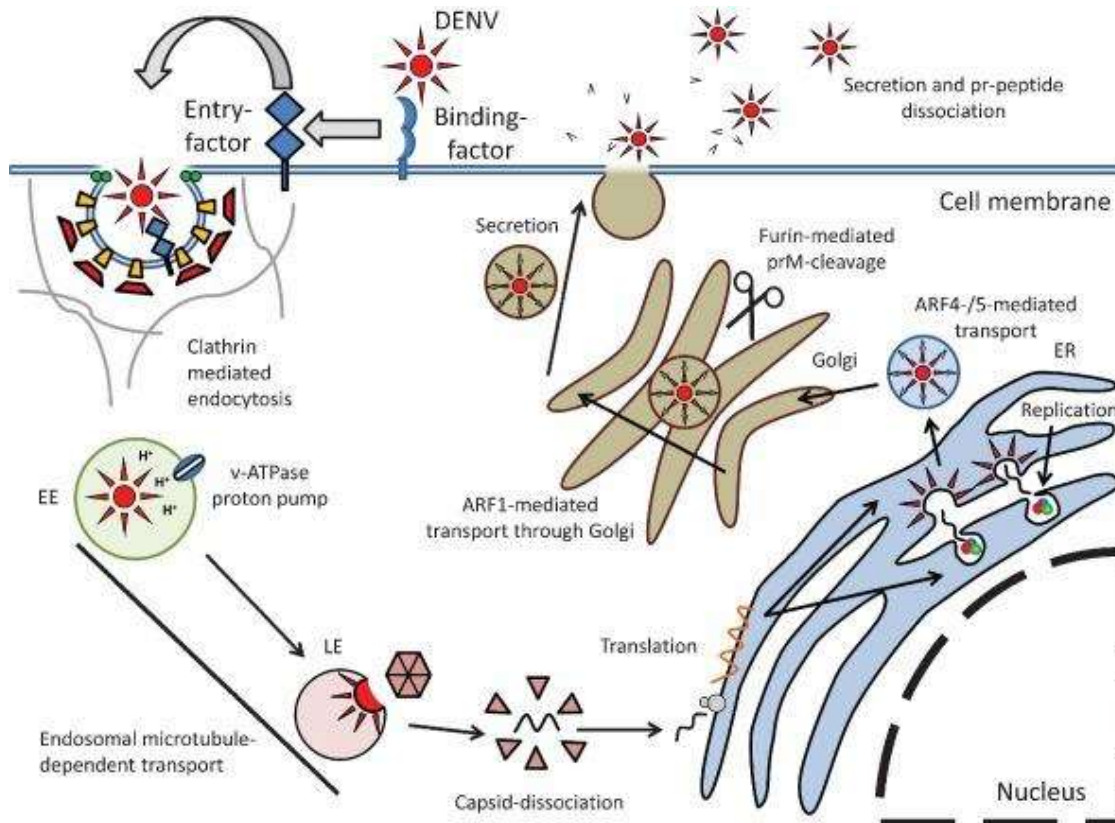
### **I.3. Description du cycle infectieux des virus Dengue et Chikungunya**

#### **1.3.1. Cycle infectieux du virus de la dengue**

##### **1.3.1.1. Processus d'entrée du virus dans la cellule hôte**

L'entrée du virus dans la cellule hôte se fait par endocytose médiée par un récepteur situé à la surface cellulaire donc la nature n'a pas encore bien été élucidée (**Figure 7**). Les récepteurs cellulaires nécessaires à l'entrée du virus sont diverses glycoprotéines (héparines sulfates) et une molécule d'adhérence intercellulaire spécifique des cellules dendritiques. Selon la souche virale, le sérotype et le type de cellule hôte, le DENV fusionne par

endocytose (pH ~ 6,0) ou à un stade ultérieur de la voie endocytique, après maturation de l'endosome tardif (pH 5,0 - 6,0). La maturation des endosomes est essentielle à la fusion et à l'exocytose du DENV, car l'appauvrissement en v-ATPase ou l'ajout de médicaments lysosomotropes, qui inhibent l'acidification des endosomes, altèrent l'infection par le DENV-2 (Flipse *et al.*, 2013).



**Figure 7 :** Cycle de réplication du virus de la dengue en absence des anticorps (Flipse *et al.*, 2013)

Outre l'acidification, les protéines de transport (kinésine et dynéine) sont des facteurs importants dans la maturation des endosomes. La perturbation des microtubules dans les cellules ECV306 ne semble pas inhiber l'infection, alors que dans les cellules BHK-21, il a été établi que DENV-2 était associé à la dynéine 38. La fusion membranaire est facilitée par la glycoprotéine E et déclenchée par un pH bas et un environnement lipidique des endosomes. Premièrement, les homodimères de la membrane virale se dissocient en monomères E. Les monomères E interagissent ensuite avec la membrane cible et cette interaction facilite la formation de trimères E. On pense que l'énergie libérée par ces changements de conformation dirige le processus de fusion (Gallichotte *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2008; Kuhn *et al.*, 2002).

### **I.3.1.2. Transcription, traduction et réplication de l'ARN génomique**

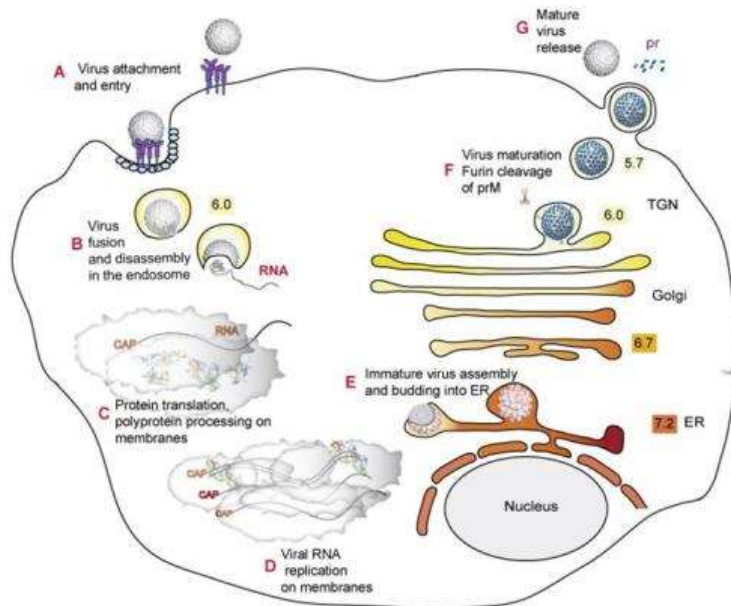
Une fois introduit dans le cytoplasme, l'ARN sens positif code pour une polyprotéine unique, qui est ensuite clivée par des auto-protéases et des protéases cellulaires pour produire sept protéines non structurales (NS1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B et 5), ainsi que trois protéines structurales : C (capside), prM (protéine membranaire précurseur) et E (Bollati *et al.*, 2010).

Pendant ce processus, les séquences de transfert de signal et d'arrêt de la polyprotéine facilitent sa translocation directe à travers la membrane du réticulum endoplasmique (RE) dans les deux sens. La protéine E est glycosylée au niveau des résidus d'acides aminés Asn67 et Asn153 pour assurer le repliement correct. Les autres potentiels sites de N-glycosylation sont situés dans les points 7, 31 et 52 de la prM et dans NS1 aux positions 130 et 207. Lors de la traduction et du repliement des protéines individuelles, les protéines NS initient la réplication du génome viral. L'ARN nouvellement synthétisé est ensuite conditionné par la protéine C pour former une nucléocapside. Les protéines prM et E forment des hétérodimères qui sont orientés dans la lumière du RE. Ensuite, les hétérodimères prM/E s'associent à des trimères et on pense que ces interactions oligomères induisent un réseau de surface incurvée qui guide le bourgeonnement du virion (Castro *et al.*, 2017; Diamond & Pierson, 2015; Seema & Jain, 2005).

### **I.3.1.3. Assemblage et sécrétion des particules virales**

Dans les surnageants de cellules infectées, le virus se présente sous forme de particule mature ou immature d'un diamètre d'environ 50 nm et 60 nm, respectivement. Les deux particules consistent en une enveloppe de glycoprotéine externe et une bicouche lipidique dérivée de l'hôte interne. Dans cette bicouche se trouve un noyau ARN-protéine constitué d'ARN génomique et de protéines de capsid (C). L'enveloppe de glycoprotéine est bien définie et consiste en 180 copies d'une enveloppe (E) et d'une protéine membranaire (prM / M). Ces deux protéines ont des conformations différentes dans les particules de DENV immatures et matures et confèrent donc des caractéristiques structurales uniques aux deux formes de particules. Dans le virion immature, la prM et E forment 90 hétérodimères qui s'étendent sous forme de 60 pointes trimériques à partir de la surface des particules. Dans le virion mature, la protéine E se présente sous la forme de 90 homodimères qui reposent à plat sur la surface virale, formant une enveloppe protéique « lisse ». Le peptide "pr" est clivé de prM pendant la maturation et M reste dans la particule mature en tant que protéine transmembranaire sous la coque de protéine E. Les transitions structurales entre la morphologie immature (« épineuse ») et mature (« homogène ») se produisent pendant le

transit par le réseau Trans-Golgien et sont principalement influencés par les changements de conformation de la protéine E. Ces modifications conformationnelles de E sont déclenchées par un pH bas (environ 5,8 à 6,0) et se produisent avant le clivage de la prM par une furine protéase codée par l'hôte. La prM, cependant, reste associée à la protéine E pendant l'exocytose pour empêcher la fusion prématurée du virion dans les compartiments acides du réseau de Golgi. Enfin, les particules de DENV sont sécrétées dans l'espace extracellulaire (Gallichotte *et al.*, 2018; Whitehead *et al.*, 2007).



**Figure 8 :** Cycle de réplication des Flavivirus (Hasan *et al.*, 2018)

### 1.3.2. Cycle infectieux du virus du Chikungunya

#### 1.3.2.1. Processus d'entrée du virus dans la cellule hôte

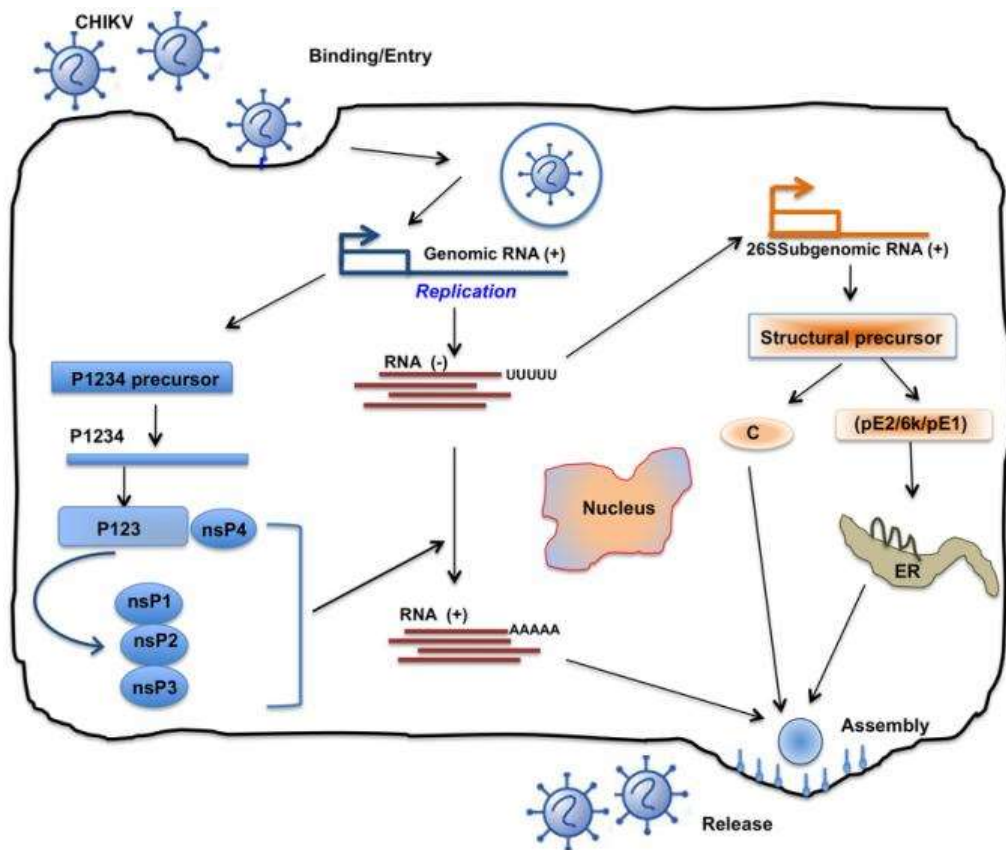
Semblable au cycle de réplication des autres virus du genre *Alphavirus*, l'entrée du CHIKV dans la cellule hôte est facilitée par l'interaction de la glycoprotéine d'enveloppe E2 avec des récepteurs à la surface des cellules cibles. Lors de la liaison au récepteur, le virus est rapidement internalisé par endocytose. Au sein de l'endosome, des changements conformationnels se produisent dans les glycoprotéines de l'enveloppe virale en raison de l'environnement à pH bas, permettant la fusion entre la glycoprotéine d'enveloppe E1 et la membrane endosomale. Le virus est absorbé et se lie à un endosome. L'endosome possède une pompe  $H^+$  dépendante de l'ATP qui pompe les protons dans l'endosome, ce qui diminue le pH et dégrade la couche externe, exposant ainsi le génome viral et le libérant dans le cytoplasme (Fros *et al.*, 2012).

### **I.3.2.2. Transcription, traduction et réplication de l'ARN génomique**

Le premier processus que fait le génome consiste à traduire les protéines non structurales. Cela est possible parce que le génome est déjà dans un ARN simple brin de sens positif. Le génome utilise donc les ribosomes et l'ARNt de l'hôte pour produire les protéines non structurales. La nucléocapside virale est libérée dans le cytoplasme, où elle est désassemblée pour libérer le génome de l'ARN viral. Par conséquent, le génome viral est traduit par la machinerie de la cellule hôte pour générer la poly-protéine non structurale. Cette dernière est par la suite clivée pour donner le précurseur des protéines nsP1,2,3 et la protéine nsP4 libre. Le précurseur de nsP1,2,3 interagit avec nsP4 et les protéines hôtes pour former un complexe de réplication initial (réplicase virale) qui synthétise l'ARN du brin négatif (Subudhi *et al.*, 2018; Solignat *et al.*, 2009). L'ARN à brin négatif est utilisé comme matrice pour synthétiser l'ARN génomique à brin positif et l'ARN sous-génomique (ARN 26S). L'ARN 26S sert d'ARNm pour la synthèse du polypeptide contenant les protéines virales structurales C-pE2-6K-E1. La protéine de capsid (C) est ensuite libérée de ce polypeptide par son activité auto-protéase, alors que le polypeptide pE2-6K-E1 restant est traité dans le réticulum endoplasmique (RE). Les glycoprotéines pE2 et E1 forment des complexes hétérodimères qui migrent vers la membrane cellulaire à travers le complexe de Golgi. Au cours de cette migration vers la surface cellulaire, pE2 est clivé par une furine cellulaire ou des protéinases analogues à la furine pour former des E2 et E3 matures (van Duijl-Richter *et al.*, 2015).

### **I.3.2.3. Assemblage et sécrétion des particules virales**

Enfin, les complexes de nucléocapside s'assemblent dans le cytoplasme et forment un bourgeon à travers la membrane cellulaire pour acquérir une enveloppe bicouche lipidique contenant la glycoprotéine E1-E2 codée par le virus (Solignat *et al.*, 2009).



**Figure 9** : Cycle de réplication du virus chikungunya (Thiboutot *et al.*, 2010)

**Légende** : CHIKV : Virus Chikungunya ; RNA : Acide ribonucléique ; P1234 : Proteines 1234 ; 26S : ARN subgénomique 26S ; nsP : Proteine non structurale ; c : Capside ; ER : Reticulum endoplasmique ; pE : Préenveloppe

## I.4. Epidémiologie, transmission et manifestations cliniques de la dengue et du chikungunya

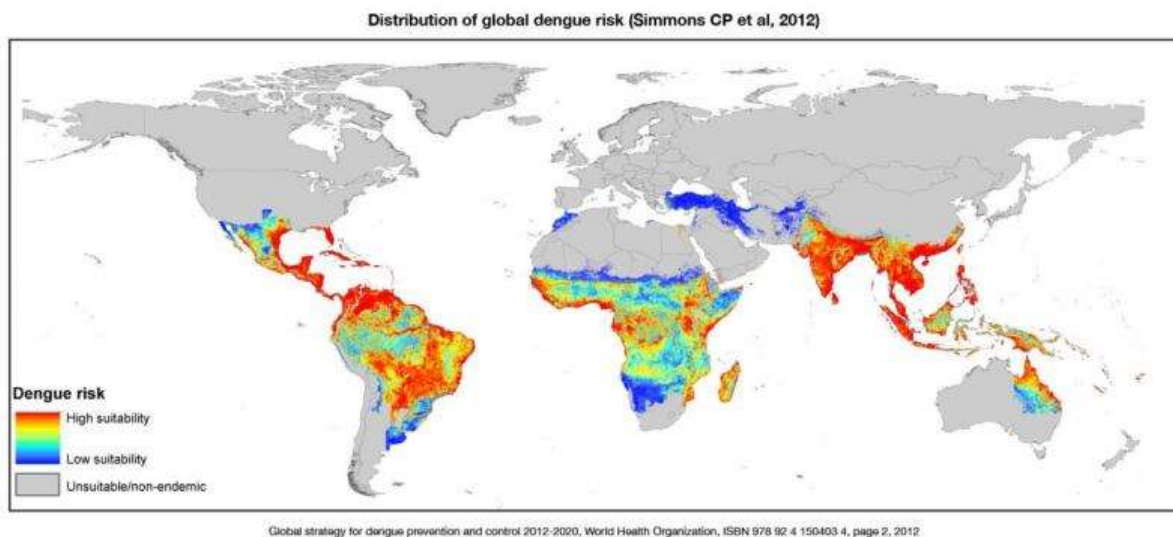
### I.4.1. Répartition géographique

#### I.4.1.1. Répartition géographique du virus de la dengue

Les quatre virus de la dengue sont originaires de singes et ont été transférés de manière indépendante à l'homme en Afrique ou en Asie du Sud-Est il y a entre 100 et 800 ans. La dengue est restée une maladie relativement mineure et géographiquement restreinte jusqu'au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle. Les perturbations de la seconde guerre mondiale en particulier le transport simultané de cargaisons de moustiques *Aedes* dans le monde entier auraient joué un rôle crucial dans la dissémination des virus. La Dengue Hémorragique (DH) n'a été documentée pour la première fois que dans les années 1950 lors des épidémies aux Philippines et en Thaïlande. Ce n'est qu'en 1981 que de nombreux cas de DH ont commencé à apparaître dans les Caraïbes et en Amérique latine, où des programmes de lutte contre *Aedes*



très efficaces étaient mis en place jusqu'au début des années 1970 (OMS, 2018). L'incidence de la dengue a considérablement augmenté dans le monde entier au cours des dernières décennies. La grande majorité des cas est asymptomatique. Par conséquent, le nombre réel de cas de dengue est sous-estimé et de nombreux cas sont mal classés. Une estimation indique 390 millions d'infections par dengue par an (intervalle de confiance de 95%, entre 284 et 528 millions), dont 96 millions (67-136 millions) se manifestent cliniquement (peu importe la gravité de la maladie). Une autre étude sur la prévalence de la dengue, estime que 3,9 milliards de personnes dans 128 pays courent un risque d'infection par le virus de la dengue. Dans les Amériques, en Asie du Sud-Est et dans le Pacifique Occidental, les cas de dengue ont dépassé 1,2 million en 2008 et plus de 3,34 millions en 2016 (**Figure 10**) (Guo *et al.*, 2017).



**Figure 10** : Répartition globale du risque d'infection par le virus de la Dengue (Malaysian, 2016)

Non seulement le nombre de cas augmente à mesure que la maladie se propage dans de nouvelles régions, mais des épidémies explosives se produisent. La menace d'une possible épidémie de dengue existe maintenant en Europe, une transmission locale ayant été signalée pour la première fois en France et en Croatie en 2010 et des cas importés ont été détectés dans 3 autres pays européens. En 2012, une épidémie de dengue sur les îles de Madère au Portugal a entraîné plus de 2 000 cas et des cas importés ont été détectés au Portugal et dans 10 autres pays d'Europe. Parmi les voyageurs revenant de pays à revenu faible ou intermédiaire, la dengue est la deuxième cause de fièvre la plus diagnostiquée après le paludisme. En 2015,

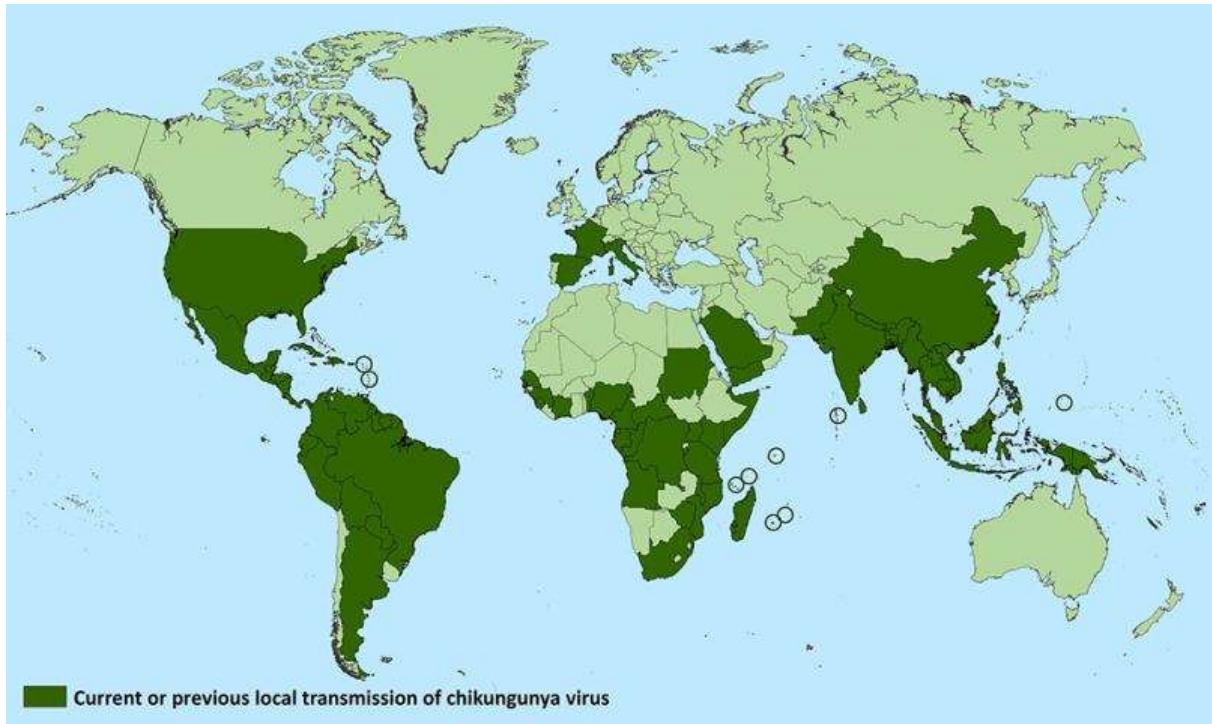
Delhi, en Inde, a enregistré sa pire épidémie depuis 2006, avec plus de 15 000 cas (Messina *et al.*, 2014).

Aux États-Unis d'Amérique, l'île d'Hawaï a été touchée par une épidémie avec 181 cas déclarés en 2015. Les îles du Pacifique, Fidji, Tonga et la Polynésie française, ont continué à enregistrer des cas. En 2016, la région des Amériques a signalé plus de 2,38 millions de cas, le Brésil seul, représentant un peu moins de 1,5 millions de cas, soit environ trois fois plus qu'en 2014. 1032 décès par dengue ont également été signalés dans la région. La Région du Pacifique Occidental a signalé plus de 375 000 cas présumés de dengue en 2016, dont 176.411 aux Philippines et 100.028 en Malaisie, ce qui représente une charge similaire à celle de l'année précédente pour les deux pays. Les Îles Salomon ont déclaré un foyer avec plus de 7.000 suspects. Le Panama, le Pérou et Aruba sont les seuls pays à avoir enregistré une augmentation du nombre de cas en 2017. De même, une réduction de 53% du nombre de cas de dengue sévère a également été enregistrée en 2017. En Afrique, le Burkina Faso a signalé une épidémie localisée de Dengue avec 1.061 cas probables. En 2017, le nombre de cas de dengue dans les Amériques a sensiblement diminué, passant de 2.177.171 cas en 2016 à 584.263 cas en 2017, ce qui représente une réduction de 73%. Une enquête a permis la détection d'IgG anti-Dengue chez des patients fébriles infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), dans un hôpital tertiaire d'Abuja, au Nigeria. Au cours de cette enquête, 44,4% étaient positifs pour les IgG anti-dengue et 44,2% étaient co-infectés par la dengue et le paludisme sur les 178 participants (Mustapha *et al.*, 2017). Les données disponibles au Cameroun sont limitées. Dans une étude menée par l'équipe de recherche du Centre Pasteur Cameroun (CPC) en 2006/2007 à Garoua, Yaoundé et Douala sur la détection d'Ig M et d'IgG anti-Dengue, a montré une prévalence de 61,4% d'IgG et de 0,3% d'IgM à Douala ; 24,2% d'IgG et 0,1% d'IgM à Garoua ; et 9,8% d'IgG sans IgM à Yaoundé (Demanou *et al.*, 2014).

#### **I.4.1.2. Répartition géographique du virus Chikungunya**

Depuis sa découverte, le virus Chikungunya a été identifié dans près de 40 pays dans le monde (**Figure 11**). En Asie, les infections par le virus du chikungunya ont été documentées au Cambodge, au Timor oriental, en Inde, en Indonésie, au Laos, en Malaisie, aux Maldives, au Myanmar, au Pakistan, aux Philippines, à la Réunion, aux Seychelles, à Singapour, à Taiwan, en Thaïlande et au Vietnam. En Afrique, le virus du chikungunya est présent au Bénin, au Burundi, au Gabon, au Cameroun, en République Centrafricaine, aux Comores, au Congo (RDC), en Guinée Equatoriale, en Guinée, au Kenya, à Madagascar, au

Malawi, à Maurice, à Mayotte, au Nigéria, au Sénégal, au Soudan, en Tanzanie, en Ouganda et au Zimbabwe. En Europe et aux Amériques, l'Italie est le seul pays européen à avoir eu un foyer épidémique, mis à part les taux d'incidence mineurs causés par des cas importés de voyageurs. L'Amérique n'a pas encore connu d'épidémie majeure (**Figure 11**) (Gaüzère, 2018).



**Figure 11** : Principaux lieux de transmission du virus Chikungunya (Arya & Agarwal, 2011)

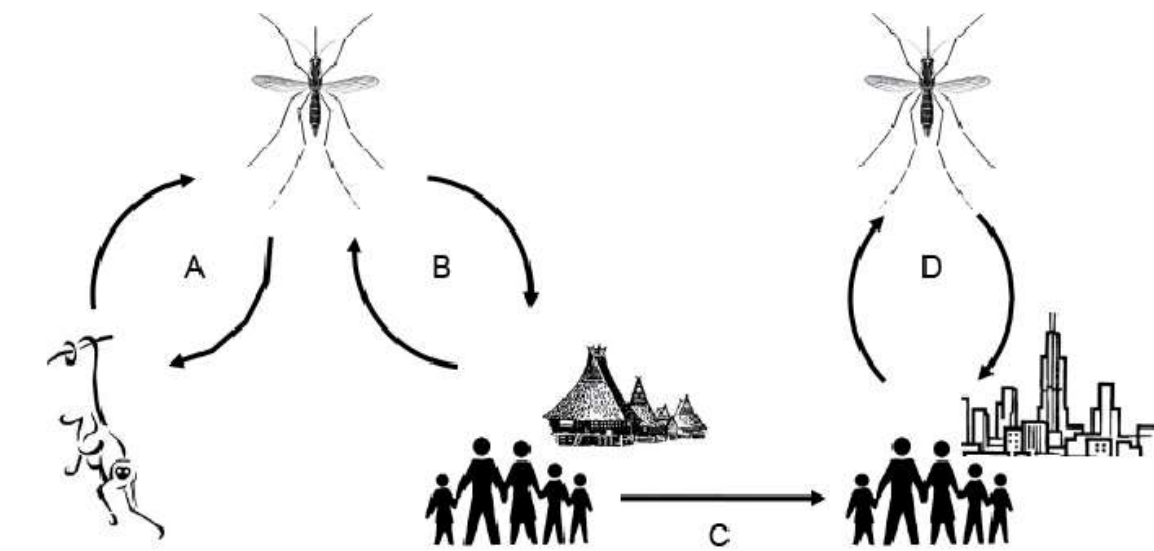
Le chikungunya a été identifié pour la première fois en Tanzanie au début de 1952 et a provoqué des épidémies sporadiques en Asie et en Afrique depuis les années 1960. Les épidémies sont souvent séparées par des périodes de plus de 10 ans. Entre 2001 et 2011, plusieurs pays ont signalé des flambées de chikungunya. Entre 2005-2006, plus de 272.000 personnes ont été infectées à partir d'un foyer de chikungunya dans les îles de la Réunion et de l'île Maurice, situées dans l'océan Indien, où *Aedes Albopictus* était le vecteur présumé. En 2006, une épidémie a été déclarée en Inde et plus de 1,5 millions de cas de chikungunya rapportés avec *Aedes Aegypti* impliqué comme vecteur. En 2007, la migration des personnes infectées a introduit l'infection dans un village côtier en Italie. En octobre 2013, le premier génotype du virus Chikungunya asiatique a été observé à Saint-Martin dans les Caraïbes. Plus tard, en Décembre 2013, il a été démontré que CHIKV était présent dans 17 autres pays originaires d'Amérique du Sud et des Caraïbes (Hall, 2007). À Porto Rico, le Centre pour le control et la prévention des maladies (CDC) a confirmé que 27.000 personnes étaient

infectées par le virus, dont 14 sont décédées (CDC, 2016). De plus, en 2015, plus d'un million d'infections ont été documentées en Asie, dont 71 sont décédées. En Afrique, une étude réalisée par Waggoner *et al.* (2017) a permis de détecter 8,8% de cas d'infection à CHIKV chez des enfants fébriles au Kenya. Peyrefitte *et al.*, ont isolé pour la première fois le CHIKV au Cameroun en 2006. Le virus a été identifié lors d'une épidémie de syndrome fébrile chez des soldats français à Douala et chez des patients d'un centre médical urbain de Yaoundé. La présence d'anticorps anti-CHIKV a été mise en évidence dans la région du Sud-Ouest par Fokam *et al.* (2010) et dans le Nord-Ouest Cameroun par Demanou *et al.* (2010) et Kuniholm *et al.* (2016). De plus, des études menées par Demanou *et al.* (2015) ont permis de caractériser, par RT-PCR, les différents génotypes présents au Cameroun (Demanou *et al.*, 2014; Demanou *et al.*, 2010; Fokam *et al.*, 2010; Kuniholm *et al.*, 2006).

#### I.4.2. Cycle de transmission des virus dengue et chikungunya

##### I.4.2.1. Cycle de transmission du virus du Chikungunya

Deux cycles de transmission distincts ont été décrits pour le CHIKV. Le cycle selvatique a été documenté principalement en Afrique, entre les primates non humains et les espèces d'*Aedes* vivant dans les forêts, telles que celles du groupe *Aedes furcifer/taylori* (Jupp & McIntosh, 1990). Parfois, le virus peut être transmis aux populations humaines, ce qui empiète sur le cycle naturel, par le biais d'activités comme la chasse et la cueillette pour les populations vivant à proximité du milieu selvatique (Diallo *et al.*, 2012) (**Figure 17**). Ainsi, le cycle selvatique affecte principalement les populations rurales.



**Figure 12** : Cycles de transmission du virus du chikungunya (Horwood & Buchy, 2015)

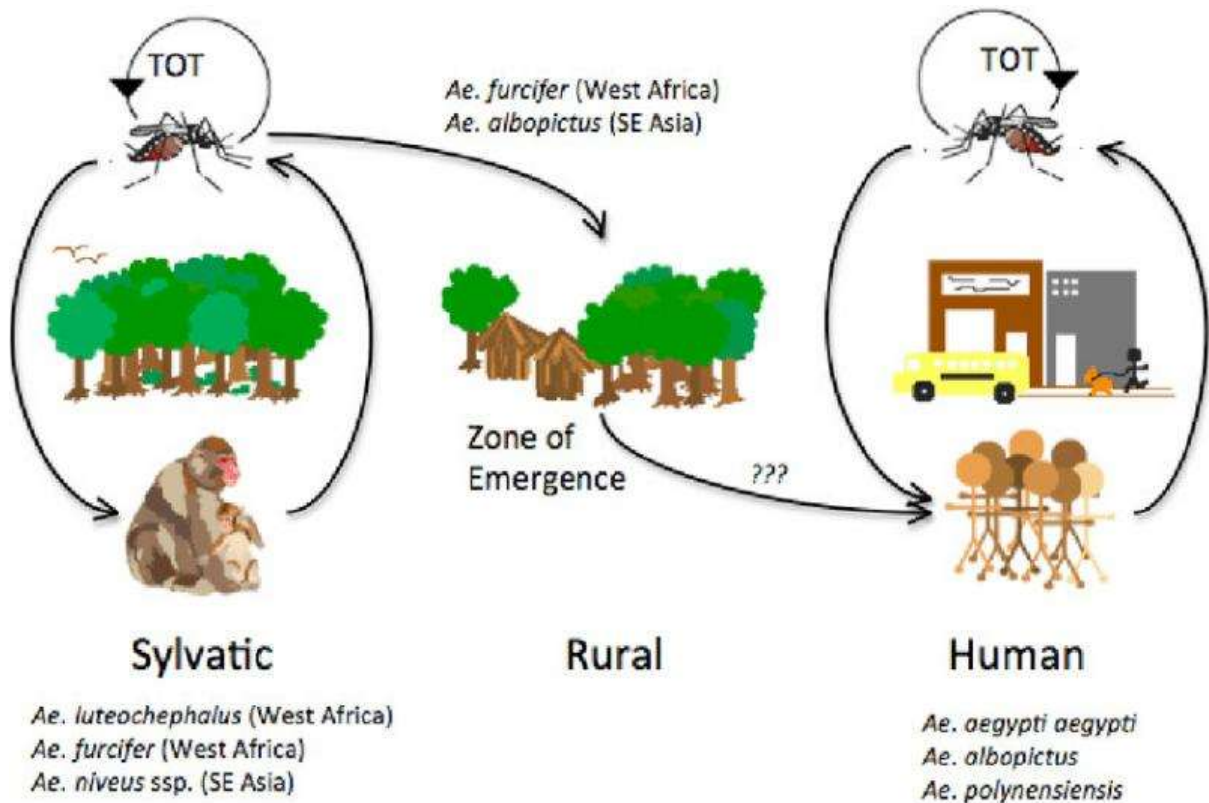
*A : le cycle selvatique existe principalement en Afrique, où le virus circule entre les primates non humains et les espèces de Aedes vivant dans les forêts. B : De petits foyers peuvent se produire au sein des populations rurales lorsque l'homme empiétant sur l'habitat naturel est piqué par des moustiques forestiers infectés. C : Le déplacement d'êtres humains infectés vers des agglomérations importantes peut aboutir à l'établissement d'un cycle urbain D : Dans un cycle urbain, le virus est maintenu entre les espèces urbaines d'Aedes (Ae. Aegypti et Ae. Albopictus) et les humains dans un cycle humain moustique-humain.*

Cependant, la récente expansion d'*Aedes Aegypti* et *Aedes albopictus* dans l'ensemble de l'Afrique, associée à une urbanisation accrue, ont entraîné de grandes épidémies au Kenya et dans des pays d'Afrique Centrale tels que le Cameroun, le Congo et le Gabon (Nkoghe *et al.*, 2012; Kelvin, 2011; Kariuki Njenga *et al.*, 2008). Ainsi, le cycle urbain a évolué dans les zones où vivent de nombreuses populations et des moustiques *Aedes* urbains afin de maintenir un cycle humain-moustique-humain. Le chikungunya en Asie a été historiquement associé à un cycle urbain entre l'homme et l'*Aedes aegypti*, et on pense que la persistance du virus CHIKV dans cette région est le résultat de l'introduction continue de CHIKV dans des populations immunologiquement naïves (Powers & Logue, 2007). *Aedes albopictus* a traditionnellement été considéré comme un vecteur d'importance secondaire, mais de récents foyers de chikungunya en Asie (et dans de nombreuses autres régions du monde) ont souligné leur importance en tant que vecteur primaire (Paupy *et al.*, 2012).

#### **I.4.2.2. Cycles de transmission de la Dengue**

Les quatre sérotypes DENV sont maintenus dans deux cycles de transmission distincts : selvatique et humain. Le cycle selvatique est écologiquement et évolutivement distinct du cycle de transmission humain. Il se déroule dans les environnements urbains de l'Asie du Sud-Est et de l'Afrique de l'Ouest, dans des foyers bien documentés de la Malaisie péninsulaire et du Sénégal oriental. Des analyses phylogénétiques récentes ont permis d'élargir la plage spatio-temporelle dans laquelle on sait que les DENV selvatiques circulent en Afrique de l'Ouest. Dans ce cycle, la transmission est assurée par *Aedes* spp. et les primates non humains semblent être les seuls hôtes amplificateurs et réservoirs. En Afrique, les principaux vecteurs incluent *Aedes (Stegomyia) lutécéphalus*, *Aedes (Diceromyia) furcifer* et *Aedes (Diceromyia) taylori* (**Figure 13**) (Diallo *et al.*, 2003). À l'heure actuelle, presque toutes les infections humaines sont dues à des souches de DENV qui circulent exclusivement dans les environnements domestiques et péri-domestiques sous les tropiques, où les humains constituent l'unique hôte d'amplification et de réservoir. Dans ce cycle humain, *Aedes aegypti* est le principal vecteur de transmission de la dengue tandis que les autres *Aedes* spp. (Par

exemple, *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis*) servent de vecteurs secondaires (Metselaar *et al.*, 1980; Gubler & Rosen, 1976).



**Figure 13 :** Cycles de transmission du virus de la dengue (DENV) (Chen & Vasilakis, 2011)

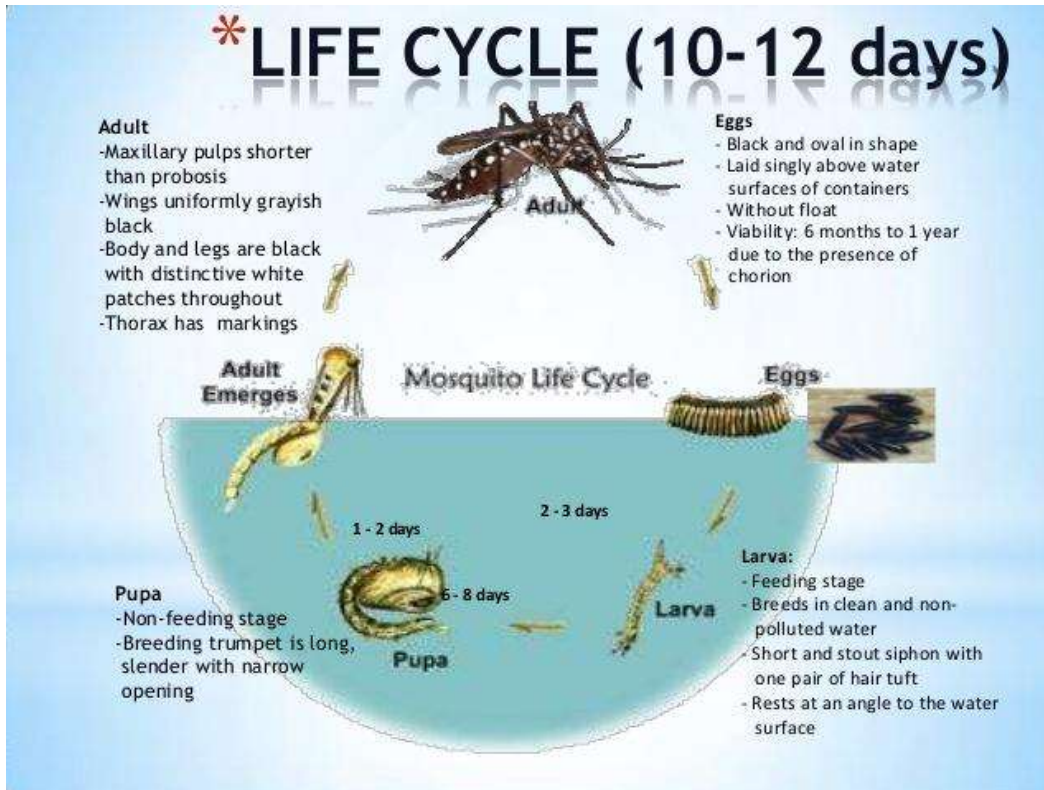
Les cycles de transmission du DENV, illustrant les origines selvatiques et la « zone d'émergence » où les cycles selvatiques entrent en contact avec les populations humaines dans les zones rurales d'Afrique de l'Ouest et du Sud-Est.

La transmission trans-ovarienne (TOT) a également été suggérée comme un mécanisme de maintien du DENV dans les deux cycles de transmission (**Figure 13**), en particulier pendant les saisons sèches prolongées ou les périodes inter-épidémiques. L'implication de TOT dans la maintenance du DENV a été démontrée dans la nature avec l'isolement du DENV-2 probablement selvatique d'un pool d'*Aedes taylori* en 1980 en Côte d'Ivoire, et un an plus tard au Sénégal à partir d'un pool de moustiques *Aedes furcifer* (Diallo *et al.*, 2008b; Mawlouth Diallo *et al.*, 2003).

#### I.4.2.3. Cycle de vie des moustiques du genre *Aedes* spp.

Les *Aedes* sont des insectes dits holométabole. Cela signifie qu'ils subissent une métamorphose complète au stade œuf, larve, pupa et adulte (**Figure 14**). La durée de vie d'un adulte peut aller de deux semaines à un mois en fonction des conditions environnementales.

Le cycle de vie de *Aedes aegypti* peut être complété en une semaine et demi à trois semaines (aedesbusterutemcom, 2016).



**Figure 14:** Cycle de développement des moustiques du genre *Aedes* (Jayawardene *et al.*, 2011)

#### I.4.2.3.1. Oeuf

Après avoir pris un repas de sang, les moustiques femelles *Aedes aegypti* produisent en moyenne 100 à 200 œufs par lot. Les femelles peuvent produire jusqu'à cinq lots d'œufs au cours de leur vie. Le nombre d'œufs dépend de la taille du repas de sang. Les œufs sont pondus sur des surfaces humides dans des zones susceptibles d'être inondées temporairement, telles que des trous d'arbres et des contenants artificiels tels que des tonneaux, des barils, des bœux, des pots, des seaux, des vases à fleurs, des soucoupes pour plantes, des réservoirs, des bouteilles et plus particulièrement les lieux d'accumulation d'eau de pluie. La femelle *Aedes aegypti* pond ses œufs séparément, contrairement à la plupart des espèces. Tous les œufs ne sont pas pondus en une fois, mais ils peuvent être étalés sur des heures ou des jours, en fonction de la disponibilité de substrats appropriés. Les œufs seront le plus souvent placés à différentes distances au-dessus de la ligne de flottaison. Les œufs d'*Aedes aegypti* sont lisses, longs, de forme ovoïde et mesurent environ un millimètre. Lors de la première ponte, les œufs paraissent blancs mais en quelques minutes, virent au noir brillant. Dans les climats chauds,

les œufs peuvent se développer en deux jours à peine, alors que dans les climats tempérés plus froids, leur développement peut prendre jusqu'à une semaine. Les œufs pondus peuvent survivre très longtemps à l'état sec, souvent pendant plus d'un an. Cependant, ils éclosent immédiatement une fois immergés dans l'eau. Cela rend le contrôle du moustique du virus de la dengue très difficile (Buster, 2016; Gubler & Rosen, 1976).

#### **I.4.2.3.2. Larves**

Après l'éclosion des œufs, les larves (**Figure 14**) se nourrissent de particules organiques présentes dans l'eau, telles que des algues et d'autres organismes microscopiques. La majeure partie du stade larvaire se passe à la surface de l'eau, bien qu'elle nage jusqu'au fond du récipient si elle est dérangée ou lorsqu'elle se nourrit. Les larves se trouvent souvent autour de la maison dans des flaques d'eau, des pneus ou dans tout objet contenant de l'eau. Le développement larvaire dépend de la température. Les larves passent par quatre stades, passant peu de temps dans les trois premiers jours et jusqu'à trois jours au quatrième stade. Les larves du quatrième stade ont une longueur approximative de huit millimètres. Les mâles se développant plus rapidement que les femelles. Si les températures sont fraîches, *Aedes aegypti* peut rester au stade larvaire pendant des mois aussi longtemps que l'approvisionnement en eau est suffisant (Ferreira-de-Lima & Lima-Camara, 2018; Turell, 1993).

#### **I.4.2.3.3. Chrysalides**

Après le quatrième stade larvaire, les larves entrent dans la phase nymphale. Les nymphes (chrysalides) sont mobiles et répondent aux stimuli. Les nymphes ne se nourrissent pas et mettent environ deux jours à se développer. Les adultes émergent en ingérant de l'air pour dilater l'abdomen, ouvrant ainsi le cas de la pupille et émergeant la tête la première (Buster, 2016).

### **I.4.3. Manifestations cliniques des virus dengue et chikungunya**

#### **I.4.3.1. Caractéristiques cliniques du virus Chikungunya**

La période d'incubation de l'infection à virus Chikungunya varie entre 1 et 12 jours, avec une moyenne de 2 à 4 jours. La phase aiguë de la maladie se caractérise par une fièvre et une arthralgie aiguë, accompagnées d'une éruption maculo-papulaire observée dans 40 à 50% des cas (Sissoko *et al.*, 2010). Bien que de nombreux cas signalent une guérison complète au bout de 1 à 2 semaines, une proportion élevée de patients présentent une arthrite persistante. Ces symptômes peuvent persister pendant des mois voire des années. Les douleurs



arthritiques causées par une infection à CHIKV sont les symptômes les plus caractéristiques de la maladie et sont généralement très douloureuses et potentiellement débilitantes. En fait, le nom « Chikungunya » signifie « ce qui se plie » dans la langue Makonde d'Afrique de l'Est et décrit les graves douleurs arthritiques de la maladie (Bett *et al.*, 2017). De nombreuses études rapportent une réduction significative de la qualité de vie liée à la santé des patients souffrant de symptômes chroniques après une infection à Chikungunya. Le mécanisme des symptômes arthritiques persistants à la suite d'une infection à CHIKV n'a pas été complètement élucidé. Les preuves provenant de patients et d'études sur des modèles animaux suggèrent qu'une arthralgie persistante pourrait être due à des mécanismes inflammatoires de l'hôte (Nakaya *et al.*, 2012). Une étude portant sur une cohorte de patients atteints de chikungunya en Inde, sans antécédents de troubles musculo-squelettiques, a montré que les patients présentaient des symptômes similaires à ceux de la polyarthrite rhumatoïde auto-immune, mais sans l'érosion habituelle du cartilage et des os ( Vijayan & Sukumaran, 2016; Horwood & Buchy, 2015).

#### **I.4.3.2. Caractéristiques cliniques du virus Dengue**

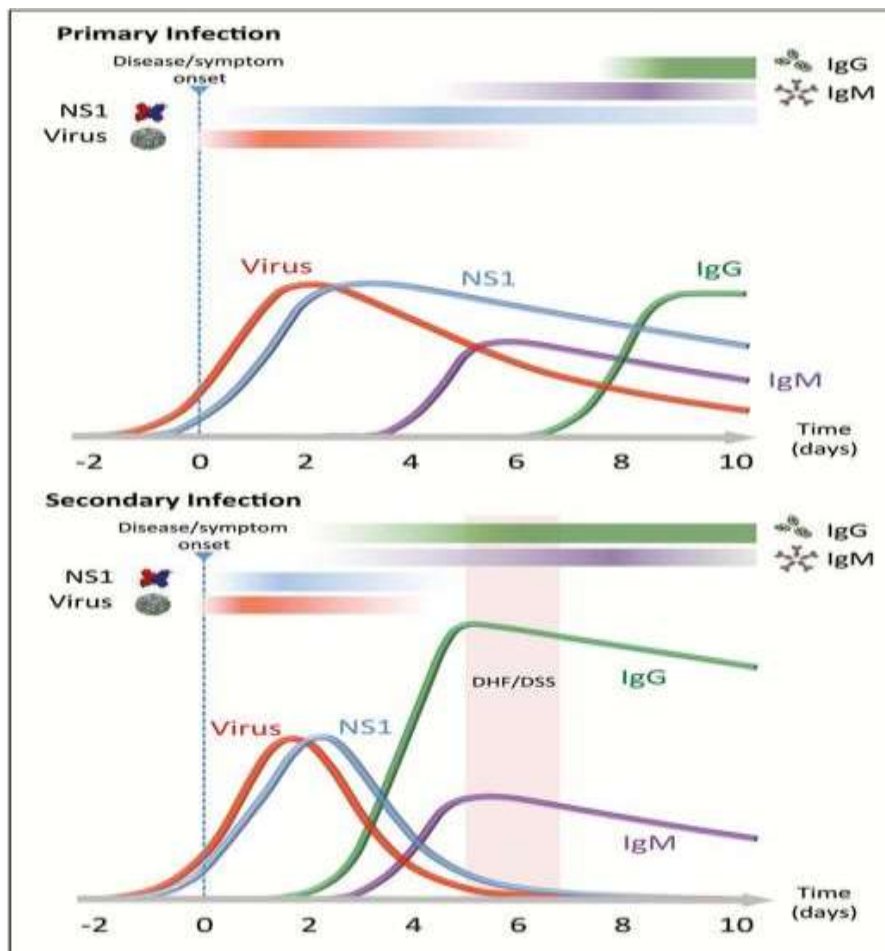
En 2009, un groupe de travail coordonné par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a défini une série de lignes directrices pour la gestion clinique de la dengue. Ce groupe a également modifié la classification existante de dengue, dengue hémorragique, et de la DSS en dengue (avec ou sans signes précurseurs) et en dengue sévère. Le but de ces directives était d'établir des critères cliniques uniformes et plus simples fournissant une approche globale normalisée de la classification des maladies (Muller *et al.*, 2017).

L'infection par le virus de la dengue peut entraîner une infection asymptomatique ou symptomatique. Environ 20% de toutes les infections sont symptomatiques, les individus présentant des symptômes de la maladie couvrant un large spectre de manifestations cliniques allant de non sévères à graves. La maladie causée par la dengue est une fièvre d'apparition soudaine avec trois phases clairement identifiables : fébrile, critique et récupération (Rosenberger *et al.*, 2016).

La phase fébrile initiale se caractérise par une apparition rapide, avec une fièvre soudaine et sévère. Cette phase dure entre 2 et 7 jours. Elle est caractérisée par un érythème cutané, des douleurs généralisées au corps, des myalgies, des arthralgies, des douleurs oculaires rétro-orbitales, une photophobie, un exanthème rubéiforme et des maux de tête. Les maux de gorge, l'anorexie, les nausées et les vomissements sont également fréquents. La phase fébrile

aiguë peut également être accompagnée de symptômes hémorragiques (Rigau-Pérez *et al.*, 1998).

La majorité des patients infectés par le DENV se rétablissent complètement après la période fébrile et n'entrent pas dans la phase critique de la maladie. Cependant, les patients qui entrent dans la phase critique peuvent développer des signes avant-coureurs indiquant une augmentation de la perméabilité capillaire menant à une fuite de plasma. La leucopénie suivie d'une chute rapide du nombre de plaquettes entraîne généralement une fuite plasmatique. Parallèlement à la diminution du nombre de plaquettes, on observe une augmentation correspondante du taux d'hématocrite. L'hypoperfusion qui survient lors d'un choc profond/prolongé entraîne une acidose métabolique pouvant entraîner une insuffisance progressive des organes et éventuellement une coagulation intravasculaire (Yacoub & Wills, 2015; Kalayanarooj *et al.*, 1997).



**Figure 15** : Chronologie de l'apparition de biomarqueurs de la dengue chez les patients présentant une infection primaire et secondaire (Muller *et al.*, 2017)

**Légende :** IgM/G : Immunoglobuline M/G ; NS : Protéine non structurale ; DHF : Dengue hémorragique ; DSS : Syndrome de choc de la dengue

Une fois que les patients ont traversé la période critique de 24 à 48 heures, le rétablissement du malade peut être remarquablement rapide. La réabsorption de liquides extravasculaires accompagne une amélioration du bien-être général du patient, un retour de l'appétit ainsi que la cessation des autres symptômes (Yacoub & Wills, 2015). Les patients peuvent développer ce que l'on a appelé une « éruption de récupération » avec des zones caractéristiques de peau normale assimilées à des « îles de blanc dans une mer de rouge » qui se développent sur le tronc, puis se propagent à la tête et aux extrémités. Les numérations sanguines des patients se stabilisent et reviennent à la normale pendant cette phase de récupération (Nimmannitya, 1987). Dans les formes graves de la maladie, les symptômes suivants sont généralement retrouvés : une fuite plasmatique sévère entraînant un choc et/ou une accumulation de liquide dans une détresse respiratoire ; saignements graves et insuffisance multi-viscérale grave (OMS, 2018). Les patients atteints de DSS souffrent initialement de fuites capillaires asymptomatiques évoluant progressivement vers un choc compensé suivi d'un choc hypotenseur, aboutissant finalement à un arrêt cardiaque. Les patients en état de choc dû à la dengue doivent faire l'objet d'une surveillance étroite, car le délai entre les signes avant-coureurs et l'apparition d'un choc compensé et d'un choc hypotensif peut ne prendre que quelques heures. Seules quelques minutes peuvent séparer choc hypotenseur, collapsus cardiorespiratoire et arrêt cardiaque. (Rigau-Pérez *et al.*, 1998).

#### **I.4.4. Diagnostic des arbovirus**

Les biomarqueurs ciblés pour le diagnostic comprennent le virus lui-même (isolement du virus en culture ou chez des moustiques ou la détection directe de l'ARN génomique viral), les particules virales ou la réponse immunitaire de l'hôte à une infection virale (en détectant l'immunoglobuline M [IgM] et l'immunoglobuline G [IgG] spécifiques du virus) (Blacksell *et al.*, 2006).

##### **I.4.4.1. Diagnostic de l'infection par le virus de la Dengue**

- **Isolement du virus**

L'isolement du virus est la méthode de diagnostic traditionnelle pour détecter l'infection par le DENV. Cependant, il a été progressivement remplacé par la RT-PCR et, plus récemment, par des tests ELISA ciblant la protéine virale NS1 pour un diagnostic plus rapide. Pour l'isolement du virus, les échantillons cliniques prélevés sur des patients sont cultivés

dans diverses lignées cellulaires de cellules de moustique ou des mammifères, ou chez des moustiques vivants (Muller *et al.*, 2017; Mishra *et al.*, 2011). Les échantillons de sang prélevés chez des patients infectés souffrant d'une maladie fébrile jusqu'à 5 jours après l'apparition de la maladie donnent les meilleurs résultats. Cependant, l'isolement viral chez les patients infectés de manière secondaire est rendu plus difficile par la production anamnastique rapide d'anticorps à réactivité croisée au début de la phase aiguë de la maladie qui forment des complexes immuns avec le virus en circulation. Bien que la détection du DENV par isolement du virus soit efficace, elle n'est pas difficile à mettre en œuvre, et de plus, elle peut durer plusieurs jours à plusieurs semaines (dos Santos *et al.*, 2008; Muller *et al.*, 2017).

- **Test de diagnostic moléculaire**

Des méthodes moléculaires telles que la RT-PCR et l'hybridation d'acides nucléiques ont été utilisées avec grand succès pour diagnostiquer l'infection par le DENV. Les méthodes basées sur la PCR permettent de diagnostiquer le DENV le jour même où le lendemain dans la phase aiguë de la maladie. Lanciotti *et al.* (1992) ont initialement désigné un test de RT-PCR semi-niché en deux étapes très sensibles. Cette méthode a ensuite été modifiée en un test RT-PCR en temps réel multiplex à une seule étape (Chien *et al.*, 2006). L'avantage majeur des techniques de PCR est que l'ARN viral peut être détecté dès l'apparition de la maladie et qu'elles sont sensibles, spécifiques, rapides, moins compliquées et moins coûteuses que les méthodes d'isolement du virus. Bien que les méthodes de PCR soient rapides et précises, elles nécessitent un laboratoire doté d'un équipement spécialisé et d'un personnel qualifié pour effectuer les analyses (Santiago *et al.*, 2018; Dos Santos *et al.*, 2008).

- **Capture d'antigène NS1**

La protéine virale NS1 est une cible de diagnostic idéale car elle est sécrétée par des cellules infectées. Elle est présente à des taux élevés circulant dans le sang des individus infectés et peut être détectée dès l'apparition des symptômes jusqu'à neuf jours ou plus après l'apparition de la maladie. La protéine NS1 peut être détectée en même temps que l'ARN viral et avant qu'une réponse anticorps ne soit déclencher durant les infections primaires. Elle peut être considérée comme un marqueur de substitution de la virémie, le niveau de NS1 étant corrélé au titre viral. Malgré la valeur prédictive suggérée de NS1 en tant que marqueur de la progression de la maladie, la quantification requise reste du ressort de la recherche, tous les tests commerciaux fournissant uniquement une lecture qualitative. Une limite de la détection de NS1 pour les patients présentant une infection secondaire est la hausse anamnastique

rapide des anticorps à réaction croisée de NS1 pendant la phase aiguë de la maladie (Oyero *et al.*, 2014; Dussart *et al.*, 2008).

- **Test Sérologique indirect**

Il existe de nombreuses méthodes de diagnostic sérologique disponibles, notamment les tests d'inhibition de l'hémagglutination (IH), les tests de fixation du complément, les tests de *dot blot*, le *Western blot*, les tests d'immunofluorescence indirecte et les tests de neutralisation par réduction de la plaque, ainsi que les tests ELISA (*Enzyme Linked Immunosorben Assay*) de capture des anticorps IgM et IgG. Les tests IH et les ELISA de capture des anticorps IgM et IgG se sont avérés être les méthodes de diagnostic sérologique les plus efficaces pour la détection de routine du DENV. Le test IH est appliqué au diagnostic de la dengue depuis de nombreuses années, la plupart des laboratoires développent des protocoles maison, bien que des kits commerciaux soient également disponibles. Comme pour tous les tests de détection d'anticorps, la période de maladie aiguë présente généralement une fenêtre de détection négative, compte tenu de la nécessité d'obtenir la réponse en anticorps pertinente. Néanmoins, les tests ELISA de capture d'anticorps IgM et IgG à haut débit sont devenus relativement courants, en particulier après leur automatisation. Les IgM peuvent apparaître dès les jours 3 à 5 lors de la primo-infection, avec un pic pouvant persister plusieurs semaines après la guérison et des niveaux détectables pendant plusieurs mois (Muller *et al.*, 2017; Faye *et al.*, 2014). Les IgG n'apparaissent généralement pas pendant la phase aiguë de la primo infection. Cependant, lors d'une infection secondaire, il existe une réponse anamnétique des IgG aux épitopes partagés de plusieurs protéines virales entre les sérotypes différents, les IgG apparaissant dès les 3 jours suivant l'apparition de la maladie. Par conséquent, lorsqu'elles sont effectuées en parallèle, la détection des IgM et des IgG peut fournir une indication diagnostique d'une infection primaire ou secondaire sur la base du rapport IgM/IgG au cours de la phase aiguë de la maladie. La détection sérologique de l'infection à DENV est compliquée dans les régions du monde où plusieurs *Flavivirus* circulent (fièvre jaune, Encéphalite japonaise, Zika), en raison de la possibilité de réactions croisées dues à la similitude des épitopes présentent sur la protéine E des *Flavivirus* (Amarasinghe, 2011).

#### **I.4.4.2. Diagnostic de l'infection par le virus Chikungunya**

Les méthodes moléculaires de diagnostic du CHIKV, telles que la RT-PCR, la RT-LAMP (*Loop mediated isothermal amplification*) et la qRT-PCR, ont acquis une importance croissante. Elles sont plus sensibles et plus rapides que l'isolement viral et permettent la détection de l'ARN de toutes les lignées de CHIKV avec une spécificité élevée. Habituellement, les échantillons de sérum prélevés jusqu'à sept jours après l'apparition des symptômes conviennent à la détection du CHIKV par des plateformes de diagnostic moléculaire (Giry *et al.*, 2017; Horwood & Buchy, 2015).

Dans les phases tardives de l'infection, la détection du CHIKV est généralement basée sur des méthodes sérologiques, telles que le test ELISA et le test de neutralisation par réduction des plages de lyse (PRNT). Les techniques ELISA sont utiles pour distinguer les infections aiguës ou de convalescence via la détection des anticorps IgM ou IgG anti-CHIKV. Les tests ELISA pour le diagnostic du CHIKV sont très spécifiques et ont une grande précision. Le PRNT, utilisé comme paramètre pour mesurer les anticorps neutralisants en circulation, est utile pour établir les niveaux d'immuno-protection sur la base de la détermination des titres d'anticorps sériques nécessaires pour neutraliser une quantité connue de particules virales infectieuses. Les techniques alternatives de détection des anticorps anti-CHIKV incluent l'immunofluorescence et l'inhibition de l'hémagglutination (Calvo *et al.*, 2016; Wasonga *et al.*, 2015; Jain *et al.*, 2008).

#### **I.4.5. Traitement et prévention des infections**

##### **I.4.5.1. Prise en charge et prévention de l'infection par le virus Chikungunya**

À ce jour, aucun traitement ou vaccin anti-CHIKV n'est disponible, et seuls les soins palliatifs utilisant des analgésiques, des antipyrétiques sont recommandés pour soulager les symptômes. Comme la lutte antivectorielle n'a donné que peu de succès en matière de contrôle du CHIKV, il existe un besoin important en médicament ou vaccins sûrs, efficaces pour combattre le CHIKV afin de limiter la propagation virale et limiter le fardeau de la maladie. À ce jour, la ribavirine qui est le seul médicament autorisé par la *Food and Drug Administration* (FDA) à être testé chez l'homme, a eu un résultat positif chez les patients infectés par le CHIKV (Vijayan & Sukumaran, 2016). Le criblage à haut débit de bibliothèques de chimie, ainsi que les médicaments de synthèse ont permis d'identifier des antiviraux candidats pour le CHIKV (Horwood & Buchy, 2015; Vijayan & Sukumaran, 2016; Jain *et al.*, 2008). Des potentiels médicaments anti-CHIKV ont également été découverts ou

développés et ciblent directement les étapes du cycle de réplication virale, plus précisément, les étapes d'entrée, la synthèse des protéines, la réplication du génome ou les fonctions enzymatiques. Bien que les recherches aient mis à jour un certain nombre d'antiviraux contre le CHIKV, des essais supplémentaires sur des modèles animaux et chez l'homme sont nécessaires pour la validation clinique de ces médicaments (Burt *et al.*, 2017).

Actuellement, la seule méthode approuvée pour la prévention de l'infection au CHIKV est la lutte contre les moustiques *Aedes* en milieu urbain. Cette méthode consiste à appliquer des méthodes de lutte antivectorielle telles que la pulvérisation d'insecticides et l'élimination des sites de reproduction. Ces efforts de contrôle ont largement échoué pour limiter l'expansion géographique d'*Aedes Aegypti* et *Aedes albopictus*, entraînant une augmentation de l'incidence mondiale du Chikungunya (Thiboutot *et al.*, 2010).

#### **I.4.5.2. Traitement et prévention de l'infection par le DENV**

La nécessité d'obtenir une protection immunitaire contre quatre virus différents est un défi de taille, car une immunité incomplète induite par un vaccin contre un sérotype unique pourrait théoriquement prédisposer un individu à une maladie grave lors d'une infection naturelle ultérieure par un autre sérotype. De nombreuses stratégies pour créer des vaccins DENV ont été explorées, allant de l'atténuation du DENV en passant par des passages successifs sur cultures cellulaires à ceux exploitant une compréhension de plus en plus sophistiquée de la biologie moléculaire et cellulaire des *Flavivirus*. Trois vaccins candidats DENV tétravalents vivants atténués sont en cours d'évaluation dans le cadre d'essais cliniques de grande envergure. La première étude de phase III achevée est le candidat Sanofi Pasteur CYD-TDV, qui contient quatre virus chimériques dans lesquels les gènes structurels du virus du vaccin contre la fièvre jaune (YFV 17D) ont été remplacés par ceux de chaque sérotype de DENV. Ce vaccin a montré une efficacité modérée sur le terrain, car ses effets protecteurs variaient considérablement entre les différents sérotypes de DENV (35% à 78%) (WHO, 2018; Yacoub & Wills, 2015). De manière inattendue, le vaccin n'a profité qu'à ceux qui avaient déjà été exposés au DENV, ce qui suggère que son utilité principale est de renforcer l'immunité protectrice croisée naturelle. De plus, le titre de neutralisation moyen des échantillons de sérum provenant de receveurs de vaccins ne correspondait pas à la protection dans les essais cliniques. Compte tenu de la complexité des résultats, les discussions sur les corrélats immunitaires appropriés de la protection DENV ont été renouvelées.

Au-delà du développement d'un vaccin, d'autres stratégies ont été poursuivies pour contrôler les infections au DENV. Un nouvel effort a été fait pour évaluer les inhibiteurs d'étapes spécifiques du cycle de vie du DENV. Des études ont permis la découverte de médicaments capables d'inhiber la protéine d'enveloppe virale (E), les protéines de protéase et d'hélicase (NS3), les protéines membranaires intégrales nécessaires à la réplication (NS2A et NS4B) et de l'ARN polymérase ARN-dépendant de et méthyltransférase (NS5) (Godói *et al.*, 2017; Amarasinghe, 2011).

Des progrès intéressants ont également été accomplis dans la réduction de la transmission du DENV en limitant l'infection chez le moustique vecteur. Par exemple, la surinfection de moustiques *Aedes aegypti* par l'infection endosymbiotique de la bactérie *Wolbachia* a entraîné une augmentation de populations de ces moustiques et une interférence avec la réplication du DENV dans ces moustiques (Moreira-Soto *et al.*, 2018; Sharp *et al.*, 1987).

## **I.5. Méthodes d'étude des propriétés anti-arbovirales**

Tout récemment, diverses méthodes ont été développées pour le screening des antiviraux, c'est le cas de la quantification directe de l'infectivité à l'aide de l'essai de dose infectieuse par culture de tissus (TCID<sub>50</sub>), de l'essai sur plaque et de l'essai par immunofluorescence focalisée. La recherche de médicament à potentiel antiviral s'est appuyée principalement sur la méthode *in vitro* de culture cellulaire pour l'authentification des propriétés antivirales des composés inhibiteurs, en ciblant les protéines impliquées dans la réplication virale (de Chasse *et al.*, 2014).

### **I.5.1. Approche *in vitro***

C'est une méthode qui permet d'évaluer individuellement les composés en fonction de leur propriété, soit pour protéger les cellules contre les effets pathologiques induits par le virus, soit pour guérir une cellule infectée.

#### **I.5.1.1. Réduction du nombre des plages de lyse**

C'est une méthode pratique pour la détermination de l'efficacité antivirale. Des régions clairement visibles appelées « plages de lyse » sont observées lorsque CHIKV infecte la cellule. Toute réduction du nombre de ces plages en présence d'un médicament en étude suggère son activité antivirale. La réduction des plages peut être quantifiée par coloration avec du cristal violet ou au rouge neutre (Chattopadhyay *et al.*, 2014).



### **I.5.1.2. Technique d'absorption de colorant (MTT)**

Parmi les cellules infectées par le virus, le nombre de cellules répondant à un composé antiviral peut être mesuré par une technique d'absorption de colorant. Les colorants sont absorbés par les cellules viables en épargnant les non viables, ce qui se reflète dans les densités optiques mesurées à l'aide de spectrophotomètres et comparés aux contrôles. Le Rouge neutre, Le MTT (3- (4,5-bromure de diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium), MTS (3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxyméthoxyphényl) -2- (4-sulfophényl) -2H-tétrazolium), la résazurine (7-Hydroxy-3H-phénoxazin-3-one 10-oxyde), sont les colorants les plus utilisés (Wada *et al.*, 2017).

### **I.5.1.3. Technique de détection d'immunofluorescence**

Un test d'immunofluorescence est généralement utilisé pour cribler de petites molécules inhibitrices de la réplication du CHIKV. Dans ce test, les cellules infectées par le CHIKV sont traitées avec différentes molécules candidates à des concentrations variables. En effet, après incubation en présence du médicament, les cellules sont fixées avec du méthanol puis traitées avec les anticorps primaires spécifiques aux protéines structurales et non structurales des deux virus. Les cellules sont ensuite lavées, puis incubées à nouveau avec des anticorps secondaires conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). La coloration des noyaux des cellules avec du DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) pendant 15 minutes à température ambiante, suivie d'une étape de lavage avec du tampon phosphate salin (PBS). En comptant les noyaux marqués au DAPI, on obtient le nombre total de cellules par puits, tandis que le nombre total de cellules infectées par le virus est déterminé en comptant les cytoplasmes marqués au FITC (Kumar *et al.*, 2015).

### **I.5.2. Criblage à haut débit**

Le criblage à haut débit consiste à faire réagir simultanément un grand nombre de molécules différentes avec un substrat donné, en vue d'identifier, en un minimum de temps, celles de ces molécules qui présentent un intérêt éventuel pour une application déterminée. Dans le criblage à haut débit, une particule virale ou un gène/protéine particulier de l'hôte est testé pour sa fonction biologique contre un ensemble de petites molécules. Ce système permet d'identifier rapidement les potentiels inhibiteurs potentiels des arbovirus en contournant les éventuels échecs lors de la mise au point d'un test robuste sur cellules et l'exigence de biosécurité plus élevée. L'utilisation de réplicons sup-génomiques ou de virus de substitution

a été une aide précieuse pour la découverte et la conception de médicaments (de Chassey *et al.*, 2014).

#### **I.5.2.1. Technique phénotypique**

Le test phénotypique basé sur CHIKV nsP2 a été utilisé comme nouvelle cible pour le screening de petites molécules inhibitrices. La capacité de la nsP2 à induire l'arrêt de la transcription pour permettre au virus de bloquer la réponse antivirale cellulaire est démontrée en utilisant divers essais de gènes reporteurs à base de luciférase, y compris un système trans-rapporteur, où le domaine de liaison à l'ADN Gal4 est fusionné au facteur de transcription (Fros *et al.*, 2012).

#### **I.5.2.2. Criblage à haut débit utilisant la resazurine**

Cet essai est basé sur la réduction métabolique de la résazurine, pour vérifier la viabilité cellulaire, en réponse à une infection par le CHIKV et a été utilisé pour identifier des inhibiteurs de la mort cellulaire associée au CHIKV (Subudhi *et al.*, 2018).

#### **I.5.2.3. Utilisation des mini-génomes**

Le modèle de mini-génome est un système, qui permet la réplication du CHIKV. Certaines des régions ORF du CHIKV sont supprimées et remplacées par des gènes rapporteurs tels que chloramphénicol acétyltransférase, protéine fluorescente verte ou luciférase, tandis que les régions non codantes sont conservées. Les régions non codantes servent de matrice pour la polymérase virale. Le mini-génome est ensuite inséré dans un vecteur d'expression. Avec l'expression des gènes viraux, l'activité du rapporteur est également générée, et la lecture de luminescence est prise. Les niveaux d'expression de l'ARN viral sont directement proportionnels à la charge virale (Subudhi *et al.*, 2018).

#### **I.5.3. Approche *in silico***

Récemment, l'approche *in silico* a été identifiée comme un outil potentiel dans le développement de médicaments contre les virus. *In silico* signifie « via une simulation sur ordinateur ». Elle peut être utilisée en prélude des expériences *in vitro*, pour présélectionner des molécules provenant des bases de données de chimiothèques. On pense que les méthodes de découverte de médicaments *in silico* accélèrent le processus de criblage des molécules candidates tout en réduisant le besoin de travaux de laboratoire coûteux et des essais cliniques. Les protéines non structurales et d'enveloppe du CHIKV sont considérées comme cibles idéales pour le criblage de médicaments *in silico* afin d'identifier les inhibiteurs potentiels de ces protéines (Kumar *et al.*, 2015).

## I.6. Plantes médicinales et fièvre à virus Chikungunya

Malgré les efforts déployés par les firmes pharmaceutiques pour mettre sur pied de nouveaux traitements contre la fièvre chikungunya, il n'existe toujours pas de médicaments efficaces contre cette pathologie. Ainsi, la recherche de nouvelles substances à partir des plantes médicinales est une piste prometteuse pouvant améliorer le paysage thérapeutique

### I.6.1. Activités anti-CHIKV des extraits de plantes

Très peu de travaux ont rapporté l'effet des extraits de plantes sur le CHIKV. Ces travaux ont permis l'identification d'extraits de plantes qui inhibent l'attachement viral, la réplication et les deux. *Ocimum tenuiflorum*, et *Terminalia chebula* ont montré leur capacité à inhiber le CHIKV dans le format d'essai de réduction de plaque, ce qui suggère leur capacité en tant qu'inhibiteurs d'attachement viral. Les extraits végétaux d'*Ocimum tenuiflorum*, et *Zingiber officinale* ont montré une inhibition de l'activité hélicase suggérant leur utilité potentielle comme inhibiteurs de réplication. Les extraits d'*Ocimum tenuiflorum* et de *Terminalia chebula* sont apparus comme des inhibiteurs de protéase. *Psidium guajava* et *Cedrus deodara* inhibe la multiplication du virus Chikungunya mais le mécanisme d'inhibition reste inconnu (tableau 2).

**Tableau II :** Quelques plantes médicinales ayant des propriétés anti-chikungunga

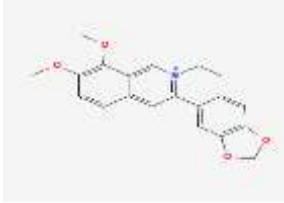
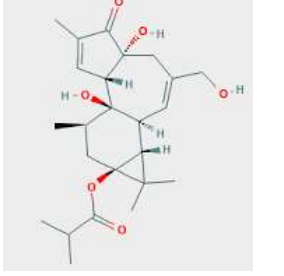
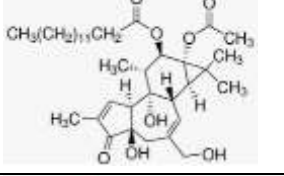
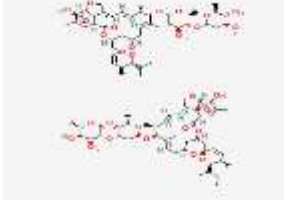
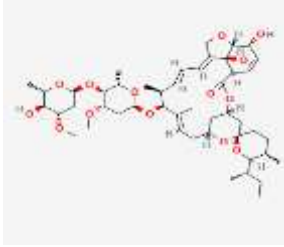

Espèces	Modes d'action	Paramètres modulés	Références
<i>Ocimum tenuiflorum</i>	inhibition de l'activité de hélicase, protéase, réduction de plaque	nsP2 protéase, inhibition de la réplication virale	Rhagavendar <i>et al.</i> , 2019
<i>Terminalia chebula</i>	inhibition de l'activité de hélicase, protéase, réduction de plaque	nsP2 protéase, anti-hélicase, inhibition de la réplication virale	Rhagavendar <i>et al.</i> , 2019
<i>Zingiber officinale</i>	Inhibition de la réplication virale	anti-Chikv, anti-hélicase Cellules Vero	Rhagavendar <i>et al.</i> , 2019
<i>Cedrus deodara</i>	Inhibition de la multiplication virale	anti-nsP2 hélicase	Rhagavendar <i>et al.</i> , 2019
<i>psidium guajava</i>	Inhibition de la multiplication virale	anti-Chikv, Cellules Vero	Yashika <i>et al.</i> , 2021

### I.6.2. Activités anti-VHC de quelques composés extrait de plantes

De nombreux composés sont actuellement à l'étude pour leur efficacité anti-CHIKV. Nous ne parlerons que des composés qui ont montré leur efficacité dans une variété de tests *in vitro*. Il faut noter que l'efficacité des composés peut varier considérablement, en fonction de

la lignée cellulaire, de la souche virale ou de la méthode de test utilisée. Le tableau 3 illustre quelques composés ayant présenté une activité contre le virus Chikungunya ainsi que leur cible. Il ressort de ce tableau que certains composés (Berberine) ont une action multiple sur le cycle de multiplication du CHIKV tandis que d'autre inhibent la multiplication en ciblant une protéine virale.

**Tableau III :** Quelques composés ayant des propriétés anti-chikungunga

Composés	Structures	activités	References
Berberine		Cible multiple	Friederike <i>et al.</i> , 2020
Protratin (12-deoxyphorbol 13-acétate)		Proteine kinase C	Friederike <i>et al.</i> , 2020
12-o-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate		Proteine kinase C	Friederike <i>et al.</i> , 2020
Abamectine		Cible multiple	Friederike <i>et al.</i> , 2020
Ivermectine		Cible multiple	Friederike <i>et al.</i> , 2020
Ribavirine		Inhibition de nsP4 et de la réplication de la viral	Friederike <i>et al.</i> , 2020

## I.7. Généralités sur les plantes étudiées

### I.7.1. *Entada africana* (*E. africana*) Gill et Perr

*E. africana* est un arbuste de 4 à 5 m de haut, mais pouvant atteindre environ 7m, appartenant à la famille des *Mimosaceae*. Cette plante est rencontrée dans plusieurs pays d'Afrique subsaharienne et au Cameroun. Appelé sama méré (Bambara), padapari (Peuhl), batala (Somraï), *E. africana* est chez les Niominka (Sénégal) un arbre sacré dont l'usage est réservé aux traitements prescrits par les grands marabouts (**Figure 16**). Il ne sert alors que de substratum aux prières et incantations. Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle comme antiseptique et cicatrisant des plaies et blessures (Radt, 1974).

Les décoctions des écorces de tronc, des racines et des rameaux sont utilisées comme contre-poison en raison de ses propriétés émétiques. Elle est utilisée pour traiter le diabète, l'hypertension, les infections de la peau, les troubles hépatiques et d'estomac (Kuete, 2014). Cet auteur a aussi démontré que cet extrait contenait un taux élevé de polyphénols. Certaines fractions ont présenté une forte activité immuno-modulatoire et anti-inflammatoire (Owona *et al.*, 2013). Les extraits aqueux des feuilles, d'écorces et de racines ont aussi montré une forte activité antiradicalaire (Tibiri *et al.*, 2010). *E. africana* possède également une activité antioxydante et des propriétés hépatoprotectrices (Njayou *et al.*, 2016). D'après la littérature, cette plante serait utilisée dans le traitement des affections hépatiques mais aussi des infections des voies respiratoires (Karou *et al.*, 2011). L'extrait brut d'écorce et la fraction chlorure de méthylène méthanol 10 % (EaF10) ont montré leur capacité à inhiber l'expression de l'ARN viral et de l'ARNm des gènes de la réponse antivirale à l'interféron notamment (hème oxygénase-1 (HO-1) et 2'-5' oligoadenylate synthetase-3 (OAS-3) dans les réplicons subgénomiques LucUbiNeo-ET (Galani *et al.*, 2014). Par ailleurs, une inhibition précoce du cycle infectieux a été rapportée en culture cellulaire sur des particules HCVcc et HCVpp avec la fraction EaF10 qui cible essentiellement l'entrée virale (Galani *et al.*, 2015).



**Figure 16 :** *Entada africana* (Yusuf & Abdullahi, 2019)

### **I.7.2. *Khaya grandifoliola* C.D.C**

*K. grandifoliola* est un arbre de la famille des *Mileaceae*. Il est également appelé acajou d'Afrique, acajou du Bénin, acajou à grandes feuilles ou acajou du Sénégal. Dans le Nord-Cameroun, la plante est connue sous le nom de *Daléhi* en langue *fulfulde*. Dans l'Ouest-Cameroun, elle est connue sous le nom *de fa'tùtù* en langue Bamoun. Elle est largement répandue en Afrique de l'Ouest, de la côte guinéenne au Cameroun et s'étend à certains pays de l'Afrique de l'Est à travers le bassin du Congo, en Ouganda, au Nigéria, en Côte d'Ivoire, au Ghana, au Togo et au Soudan (Ojokuku *et al.*, 2010) (**Figure 17**). L'arbre a environ 40m de haut et une circonférence d'environ 5m. Les écorces de *K. grandifoliola* ont une couleur grise sombre, sont d'un goût amer et sont utilisées pour les maladies de la peau (Hostettmann & Marston, 2002). Des études antérieures sur cette plante ont rapporté des activités antipaludiques. Les études phytochimiques ont rapporté l'isolement et la caractérisation de 11 limonoïdes dont la grandifotane A, la méthylangolensate, la gedunine, la 7-deacetylkhivorine, la 1-deacetylkhivorine et la 6-acétylswietenolide présentaient des activités antiplasmodiales *in vitro* sur *Plasmodium falciparum* (Bickii *et al.*, 2000). Les décoctions d'écorce du tronc sont utilisées pour traiter les troubles hépatiques, gastriques, d'estomac et la toux. L'extrait aqueux de l'écorce a montré un effet favorable sur la réduction du taux de cholestérol et de glucose dans le sang chez le rat. L'extrait au mélange de chlorure de méthylène/méthanol (1:1 v/v) de l'écorce a présenté des fortes propriétés immunomodulatoires. L'activité antioxydante et les propriétés hépato-protectrices de cette plante ont également été démontrées (Njayou *et al.*, 2016). La fraction KgF25 de cette plante a montré un effet antiviral très élevé sur les réplicons LucUbiNeoET à des concentrations non toxiques (500µg/ml). Testé à 100 µg/mL, KgF25 a un effet inhibiteur élevé sur la réplication du VHC, comparable à celui du daclatasvir (0,01 µM) ou du Télaprévir (1 µM). Cette fraction a également inhibé l'infection à HCVcc en ciblant principalement l'étape d'entrée. Le KgF25 inhibe l'entrée du VHC d'une manière pan-génotypique en inactivant directement les particules virales libres. Ses effets antiviraux ont été médiés par la régulation positive transcriptionnelle du gène de l'hème oxygénase-1 et la réponse antivirale de l'interféron (Galani *et al.*, 2016).



**Figure 17 :** *Khaya grandifoliola* (Dipelet *et al.*, 2019)

### **I.7.3. *Senna alata* (*S. alata*)**

*S. alata*, est communément connue sous le nom de buisson de bougie, de plante rampante, d'acapulo, de buisson de teigne ou de plante de teigne. La plante est très répandue en Asie et en Afrique. *S. alata* est classé dans la famille des *Fabaceae*. Elle porte le nom de "buisson-bougie" en raison de la structure de ses inflorescences. C'est une herbe annuelle et parfois biannuelle, d'une hauteur moyenne de 1 à 4 m, qui pousse dans les zones ensoleillées et humides. Les feuilles sont oblongues, avec 5 à 14 folioles, des pétioles robustes (2 à 3 mm), des bractées de caducée (2 × 3 par 1 × 2 cm) et des fleurs denses (20 × 50 par 3 × 4 cm) (**Figure 18**). Elle possède un ensemble de composés chimiques bioactifs. Certains des composants chimiques signalés sont des composés phénoliques (rhéine, chrysaphanol, kaempférol, aloemodine et glycosides), des anthraquinones (alatinone et alatonal), des acides gras (acides oléique, palmitique et linoléique), des stéroïdes et des terpénoïdes (sitostérol, stigmastérol et campestérol). Ces métabolites secondaires présenteraient de nombreuses activités biologiques (Oladeji *et al.*, 2020; Adedayo *et al.*, 1999). La plante a été utilisée pour la gestion de plusieurs maladies en médecine traditionnelle telles que l'hépatite, la dermatite, la jaunisse, la gastro-entérite, l'eczéma, la constipation et la diarrhée (Adedayo *et al.*, 2001). Elle est reconnue pour ses activités antimicrobiennes, antifongiques, purgatives, anti-inflammatoires, analgésiques, antitumorales et hypoglycémiques (Moriyama *et al.*, 2003).



**Figure 18 :** *Senna alata* (Adedayo *et al.*, 2001)

#### **I.7.4. *Enantia chlorantha* (*E. chlorantha*)**

*E. chlorantha* est largement répandue le long des côtes de l'Afrique de l'Ouest et du Centre. Il est également très répandu dans les régions forestières du Nigeria. C'est un arbre ornemental qui peut atteindre 30m de haut, avec un feuillage dense et une couronne étalée (**Figure 19**). L'écorce extérieure, fine et brune foncée, est fissurée géométriquement, tandis que l'écorce intérieure est brune sur le dessus et crème pâle en dessous. La tige est cannelée et aromatique, tandis que les feuilles elliptiques mesurent environ 0,14-0,15 m de long et 0,05-0,14 m de large (Iwu, 1993). Des études ont fait état de l'utilisation possible de la plante dans la lutte contre les pathologies telles que la fièvre de rickettsie, la toux et les plaies, la fièvre typhoïde et l'hépatite infectieuse ou la jaunisse. Il a également été révélé que la plante possède des activités antipyrétiques ainsi qu'antimicrobiennes et antipaludiques. Au Cameroun, l'extrait d'écorce de tige d'*E. chlorantha* est utilisé pour traiter la jaunisse et les infections des voies urinaires (Olivier *et al.*, 2015). Des études récentes sur cette plante ont révélé des activités antivirales, anticancéreuses, antioxydantes et antimicrobiennes (Fasola *et al.*, 2011).



**Figure 19:** *Enantia chlorantha* (Mahé, 2020)



### **I.7.5. *Phragmanthera capitata* (Sprengel) Balle (*Loranthaceae*)**

*Phragmanthera capitata* (Sprengel) Balle, est une plante de la famille des *Loranthaceae*. C'est un arbuste ligneux parasite, aux branches pendantes d'environ 2 m de long, à corolle jaune à pointe rose-rouge et souvent associé aux nids des fourmis (Figure 20). Il pousse sur les arbres dans les jungles secondaires, les plantations et les zones de savane arbustive, de la Sierra Leone au Cameroun, et s'étendant à travers le bassin du Congo jusqu'au Zaïre, au Nigeria, au Gabon, en Côte d'Ivoire et en Angola. Il a été largement utilisé dans le folklore pour traiter un éventail de maux. Des études sur cette plante ont révélé des activités antipaludiques, antioxydantes et antimicrobiennes (Engone Obiang, 2006; Guyot & Ntawanga Omanda, 1998).



**Figure 20 :** *Phragmanthera capitata* (Guyot & Ntawanga, 1998)

### **I.7.6. *Detarium microcarpum***

*Detarium microcarpum* est un arbre africain appartenant à la famille des *Fabaceae*. *D. microcarpum* pousse dans les régions sèches d'Afrique Centrale et Occidentale, où il peut atteindre des hauteurs allant jusqu'à 15 m (**Figure 21**). Dans les zones à forte pluviométrie, il peut atteindre jusqu'à 25 m. *D. microcarpum* est souvent utilisé comme remède pour traiter les maladies telles que la diarrhée, de la méningite, de la tuberculose et des hémorroïdes, grâce à ses propriétés médicinales (Mariod *et al.*, 2019). Les fruits et les feuilles de cet arbre sont comestibles et ont été utilisés par les tribus africaines comme condiment et légume. Dans certains pays africains, la farine à base de graines est traditionnellement utilisée comme agent émulsifiant et épaississant du fait de sa forte teneur en glucides. Au Mali, les feuilles sont utilisées comme engrais et au Burkina Faso, elles sont parfois utilisées comme masques (Kouyaté & Damme, 2002).



**Figure 21 :** *Detarium microcarpum* (Kouyaté & Damme, 2002)

### **I.7.7. *Annona senegalensis* (*A. senegalensis*)**

*A. senegalensis* est une plante de la famille des *Annonaceae*. Communément appelée pomme de terre sauvage et sureau sauvage, c'est un arbuste ou un petit arbre de 2 à 6 m de haut, mais qui peut atteindre 11 m dans des conditions favorables (**Figure 22**). L'écorce est lisse à rugueuse, gris argenté ou gris-brun. Les feuilles sont alternes, simples, oblongues, ovales ou elliptiques, vert à vert bleuté, presque sans poils sur la surface supérieure mais souvent avec des poils brunâtres sur la surface inférieure. Les fleurs ont jusqu'à 3 cm de diamètre sur des tiges de 2 cm de long, en solitaire ou en groupe de 2 à 4, se situant au-dessus de l'aisselle des feuilles. Les fruits sont formés de nombreux carpelles soudés, charnus, grumeleux, en forme d'œuf, de 2,5 à 5 cm sur 2,5 à 4 cm, ovoïde ou globulaire; le fruit non mûr vert, devint jaune à orange (Okhale *et al.*, 2016). Toutes les parties de la plante ont été trouvées utiles pour des applications de médecine traditionnelle. Les feuilles ont été utilisées dans le traitement de la fièvre jaune, de la tuberculose et de la petite vérole (Mustapha *et al.*, 2013). L'écorce de la tige a été utilisée dans le traitement des morsures de serpent et des hernies. La racine est utilisée dans des conditions telles que la difficulté à avaler, la gastrite, les morsures de serpent, l'impuissance sexuelle masculine, les troubles de l'érection, la tuberculose, et comme antidote aux toxines nécrosantes. L'écorce de la racine est efficace dans les maladies infectieuses. En Guinée, *A. senegalensis* a été employé dans le traitement de la malaria. Au Swaziland, l'écorce est utilisée pour traiter les plaies ouvertes (Voeks & Rashford, 2012).



**Figure 22 :** Fruit d'*Annona senegalensis* (Okhale *et al.*, 2016)

### **I.7.8. *Macaranga hurifolia* (*M. hurifolia*)**

*Macaranga hurifolia* Beille est une plante de la famille des *Euphorbiaceae*. C'est un arbuste ou arbre grimpant jusqu'à 12 m de haut (**Figure 23**). On le retrouve en Sierra Leone et au Cameroun. L'aubier est blanc, le bois du cœur est citron clair, teinté de violet. Le bois est de texture moyenne et facile à travailler. Il est couramment utilisé pour le bois de chauffage et parfois pour les poteaux de hutte, bien qu'il ne soit probablement pas résistant aux insectes et à la pourriture (Cooper & Record, 1931), l'écorce étant parfois utilisée comme purgatif. Le macérat aqueux des rameaux feuillus, souvent avec *Baphia nitida* (Leguminosae : Papilionoideae), est utilisé par la tribu Guere de Côte d'Ivoire comme purgatif pour toutes les affections gastro-intestinales (Bouquet & Debray, 1974). Les Shiens au Burkina-Faso considèrent qu'il s'agit d'un bon médicament pour la toux, en particulier l'hémophyse tuberculeuse. Les décoctions de racine sont extrêmement diurétiques et utilisées pour soulager les œdèmes chez les femmes enceintes (van Welzen *et al.*, 2014). Les travaux récents ont montré le potentiel anti-inflammatoire et antidiabétique de *M. hurifolia* (Segun *et al.*, 2019; Joseph, 2014).



**Figure 23 :** Feuilles de *Macaranga hurifolia* (Joseph, 2014)

#### **I.7.9. *Entandrophragma cylindricum* (*E. cylindricum*)**

*E. cylindricum* aussi appelé Sapelli, Sapali ou Sapele, est une espèce d'arbre tropical appartenant à la famille des *Meliaceae*. C'est une espèce de transition entre la forêt sempervirente et la forêt semi-décidue, présente jusqu'en lisière de savane (**Figure 24**). Le Sapelli s'installe également dans les forêts secondaires et les jachères, et préfère les sols secs et bien drainés des versants ou des plateaux aux sols marécageux. C'est une espèce dominante de la canopée, à longue durée de vie, non pionnière, mais à tendance héliophile, hermaphrodite et entomophile, de demi-ombre dans son jeune âge et de pleine lumière ultérieurement (Alain, 2017). En Afrique Centrale, l'écorce est utilisée dans la médecine traditionnelle sous forme de décoctions ou macérations pour traiter les bronchites, les affections pulmonaires, le rhume, les oedèmes, tandis que la pulpe d'écorce est appliquée en externe sur les furoncles et les plaies. Les extraits d'écorce ont été utilisés comme protecteur du maïs stocké. L'arbre est planté comme arbre de bord de route et comme arbre d'ombre ornemental. Les chenilles du papillon *Imbrasia oyemensis* se trouvent couramment sur les feuilles ; elles sont comestibles et très recherchées en Afrique de l'Est pour la consommation par les populations (Happi *et al.*, 2018).



**Figure 24 :** *Entandrophragma cylindricum* (Alain, 2017)

#### **I.7.10. *Poga oleosa* (*P. oleosa*)**

*P. oleosa*, une plante appartenant à la famille des *Anisophyllaceae*, est largement répandue du Nigeria à la région du Congo dans la forêt équatoriale dense, souvent le long des rives des rivières et du littoral. Appelée aussi noix du Brésil africain, c'est un arbre de taille moyenne pouvant atteindre 30 m de long et 150 cm de diamètre dont les fruits sont des noix utilisées en cuisine comme condiment et huile (**Figure 25**). En médecine traditionnelle, l'huile de *P. oleosa* est utilisée comme laxatif. Le baume fait à partir de son écorce et de l'huile de palme est souvent utilisé pour traiter les inflammations de la peau. Le *Poga oleosa* est également utilisé comme plante médicinale dans le traitement de plusieurs maladies. L'enveloppe du fruit est utilisée après incinération contre les maux de dents (Ogbole *et al.*, 2008). Récemment, l'évaluation de l'activité antiplasmodiale de l'extrait hydroéthanolique d'écorce de *cette plante* contre la souche 3D7 de *Plasmodium falciparum* a montré une concentration efficace de 3,34 µg/ml contre 27,83 nM de chloroquine (Udoh & Udoh, 2020; Ogbole *et al.*, 2008).



**Figure 25 :** *Poga oleosa* (Udoh & Udoh, 2020)

# **Chapitre II :**

# **Méthodologie**

## **Chapitre II : Méthodologie**

### **II.1. Etat de lieux sur la circulation des virus Dengue et Chikungunya au Cameroun**

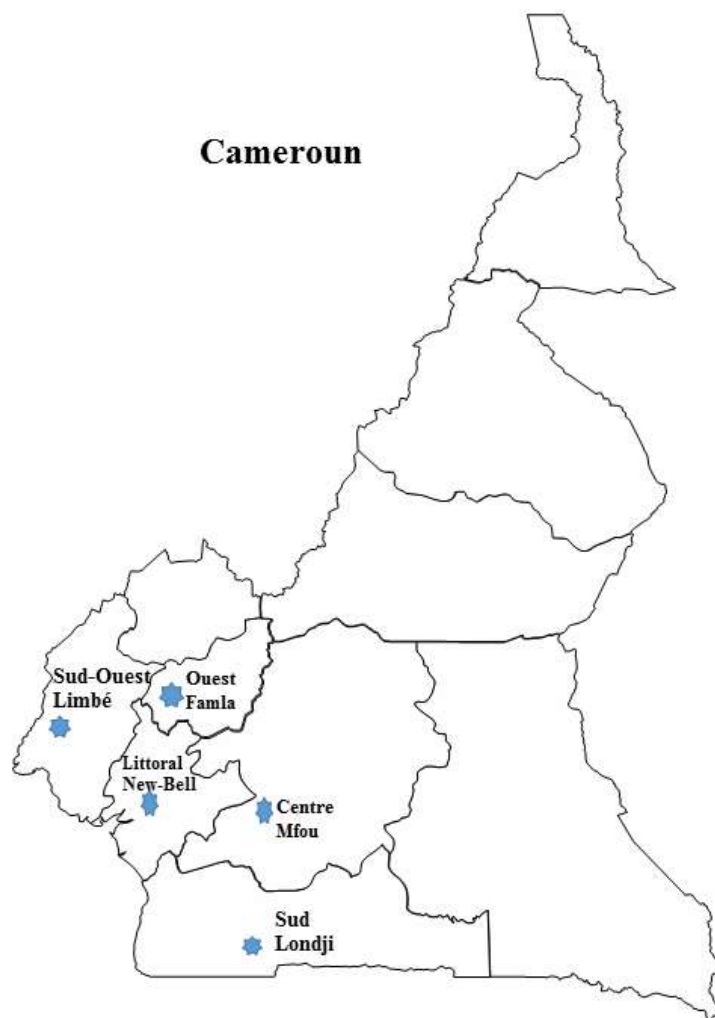
Les données issues de la revue systématique et méta-analyse ont permis d'établir l'état de lieux de la circulation active des virus Dengue et Chikungunya en Afrique et particulièrement au Cameroun. On note un manque de données sur la circulation active de ces deux virus dans les différentes régions du Cameroun ; les études menées à ce jour ne ciblent que les traces de la circulation de ces deux virus (IgG et IgM). Ces deux marqueurs sont non spécifiques car il existe des probabilités d'obtenir les réactions croisées entre les anticorps dirigés contre les virus de la même famille (notamment celle des Flavivirus « Virus Dengue, Nile occidental, Amaril etc. » et celle des Alphavirus « Chikungunya, O'Nyong Nyong, Sémliki etc. ») qui sont aussi endémique dans les régions d'étude. On note aussi une absence d'étude montrant les différentes sources de Dengue circulant au Cameroun. Pour pallier à ces manquements, nous avons envisagé dans cette partie du travail, de déterminer la fréquence de circulation de ces deux virus dans quelques régions du Cameroun.

#### **II.1.1. Cadre de l'étude**

Le Cameroun s'étend sur une superficie de 475.650 km<sup>2</sup>. C'est un pays de l'Afrique Centrale situé dans le Golfe de Guinée, entre les 2° et 13° degrés de latitude Nord et le 9° et 16° degrés de longitude Est. Il présente une forme triangulaire qui s'étire du Sud jusqu'au Lac Tchad sur près de 1200 km, tandis que la base s'étale de l'Ouest à l'Est sur 800 km. Il est organisé en 10 Régions et est limité à l'Ouest par le Nigéria, au Sud par le Congo, le Gabon et la Guinée Equatoriale, à l'Est par la République Centrafricaine, et au Nord-Est par le Tchad. Au sommet du triangle, au Nord, il est coiffé par le Lac Tchad.

L'étude a été menée dans cinq hôpitaux de districts du Cameroun. A savoir : New-Bell (Littoral), Mfou (Centre), Famla (Ouest), Limbé (Sud-Ouest) et Londji (Sud) (Figure 26).





**Figure 26 : Représentation des sites de collecte des échantillons**

### **II.1.2. Type d'étude**

Il s'agissait d'une étude descriptive, prospective et transversale.

### **II.1.3. Période d'étude**

La phase de collecte a été menée durant la période de 15 mois allant du mois de Mars 2017 à Juin 2018.

### **II.1.4. Type d'échantillonnage**

Nous avons utilisé la méthode d'échantillonnage par convenance dont la taille d'échantillon était déterminée à la fin de l'étude, ceci pour des raisons pratiques d'accessibilité et de coût.

### **II.1.5. Critères de sélection**

#### **➤ Critères d'inclusion**

Nous avons inclus dans cette étude toute personne présentant une fièvre datant de moins de 7 jours associée à deux des symptômes listés ci-après : courbatures, céphalées, myalgies, arthralgie, éruption cutanée.

#### **➤ Critère de non inclusion**

Toute personne refusant de participer à l'étude ou refusant de signer la fiche de consentement.

#### **➤ Critères d'exclusion**

Tout participant ayant un échantillon de sang insuffisant.

### **II.1.6. Collecte des échantillons**

Au cours des consultations, les patients fébriles respectant les critères d'inclusion ont été approchés. Après signature de la fiche de consentement éclairé par ces derniers, ils ont répondu aux différentes questions de la fiche d'enquête (cf. annexes 4).

Le prélèvement sanguin a été effectué en respectant les règles d'hygiène et de sécurité applicable au laboratoire. Il s'agissait de rassurer la patiente, de l'installer et de collecter au niveau du pli du coude, environ 5 mL de sang (à l'aide d'un tube vacutainer stérile ou d'une seringue) dans un tube EDTA.

Après le prélèvement, le sang a été immédiatement conservé dans un réfrigérateur (2° à 8°C) une partie a été utilisée pour la détection du plasmodium (pathogènes endémique au Cameroun et partageant certains signes cliniques avec la Dengue et le Chikungunya) à l'aide d'un test de détection rapide (TDR). En fin de journée, le plasma de chaque participant a été récupéré après centrifugation (3000 tours/minutes ; Centrifugeuse eppendorf<sup>TM</sup> 5702 R) pendant 20 minutes, et transféré dans des cryotubes à l'aide d'une micropipette de 1000 µL. Les plasmas collectés ont été transférés au CPC dans une glacière (+4°C) contenant des blocs de glace. Une fois au laboratoire, ils ont été conservés dans un congélateur, à -80°C jusqu'à utilisation pour la détection des différents arbovirus.

### **II.1.7. Recherche du *Plasmodium***

Immédiatement après le prélèvement, le kit de diagnostic rapide (TDR-Malaria) était utilisé pour la recherche du *Plasmodium*.

Pour le TDR du paludisme, une quantité de sang a été prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur présente dans le carton de TDR. La goutte de sang a été déposée sur la fenêtre "S" et 2 gouttes de diluant étaient placées sur la fenêtre indiquée et le tout incubé à température ambiante pendant 20 minutes. Pour la lecture, la présence d'un trait sur la fenêtre de lecture au niveau du contrôle (C), montre que le patient est négatif, tandis que la présence de deux bandes au niveau du C et pf (antigène du plasmodium) montre que le patient est positif.

### **II.1.8. Détection des virus Dengue, et Chikungunya par RT-PCR temps réel**

La technique utilisée au CPC pour l'analyse des échantillons est la RT-qPCR Trioplex permettant la détection simultanée de trois arbovirus (Chikungunya et Dengue de même que Zika). Avant la RT-qPCR, l'ARN de chaque échantillon a été extrait à l'aide du Kit Qiagen.

#### ➤ **Extraction de l'ARN viral**

- **Principe d'extraction des ARN par le kit « *QiaampViral RNA mini kit* »**

Le mini kit Qiagen facilite l'isolement de l'ARN viral à partir de fluides corporels sans cellules. Cette méthode repose sur la fixation spécifique de l'ARN par échange d'ions à travers une phase stationnaire solide constituée d'une membrane faite à base de la silice chargée positivement par centrifugation, les débris protéiques sont efficacement éliminés en utilisant les tampons de lavage différents. L'ARN de haute pureté est élué avec de l'eau dépourvue de RNase (Qiagen, 2020).

- **Mode opératoire**

L'ARN viral a été extrait à l'aide du kit commercial "*QIAamp VIRAL RNA MINI KIT*" de QIAGEN selon les recommandations du fabricant (Qiagen, Hilden, Allemagne). Ce kit contient le tampon de lyse AVL, les tampons de lavage (AW1 et AW2), le tampon d'éluion AVE et l'ARN porteur. Tout d'abord, les particules virales contenues dans 140 µL de plasma ou sérum ont été inactivées par ajout de 560 µL de tampon de lyse pendant 10 minutes à température ambiante. Ensuite, 560 µL d'éthanol absolu ont été ajoutés pour assurer la précipitation de l'ARN. Après que l'ARN ait été adsorbé sur une colonne de silice chargée positivement par centrifugation du mélange à 6000 g pendant une minute, la purification de l'ARN a été assurée par deux lavages successifs. Le premier a été effectué par l'ajout de 500 µL de tampon AW1 suivi d'une centrifugation à 6000 g pendant une minute et le second par 500 µL du tampon AW2, suivi d'une centrifugation à 20000 g pendant 3 minutes pour éliminer les protéines. Cette étape de purification a été suivie d'une centrifugation

supplémentaire à 20000 g pendant une minute pour éliminer toutes les traces de liquide. Enfin, les ARN fixés ont été élués par ajout de 60 µL d'eau dépourvue RNase/DNase. Les ARN obtenus ont été conservés à -80°C et utilisés pour rechercher la présence des virus Dengue et Chikungunya.

➤ **Détection des virus dengue et chikungunya par qRT-PCR**

• **Principe de la RT-PCR temps réel Trioplex**

La RT-PCR en temps réel Trioplex utilise des amorces et une sonde à double marquage (Taqman®) pour la détection qualitative *in vitro* de l'ARN des virus Dengue, Chikungunya et Zika, à partir du sérum, plasma, liquide céphalorachidien, de l'urine et du liquide amniotique. La réaction débute par une étape de transcription inverse qui produit l'ADNc à partir de l'ARN présent dans l'échantillon. Par la suite, la sonde Taqman se lie à l'ADN cible entre les couples d'amorces PCR non marquées. Pour la sonde spécifique au virus de la dengue, le signal du colorant fluorescent (FAM) à l'extrémité 5' est éteint par le BHQ-1 sur son extrémité 3'. Pour la sonde spécifique au virus du Chikungunya, le signal du reporter fluorescent (HEX) sur l'extrémité 5' est éteint par le BHQ-1 à son extrémité 3'. Pour la sonde spécifique au virus Zika, le signal du reporter fluorescent (CAL Fluor Red 610) à l'extrémité 5' est éteint par le BHQ-2 à son extrémité 3'. Pendant la PCR, la Taq polymérase étend les amorces non marquées en utilisant le brin d'ADNc comme guide, et lorsqu'il atteint la sonde, il la digère en séparant le reporter du quencher, ce qui la rend fluorescente. L'appareil de PCR en temps réel détecte cette fluorescence à partir du reporter non inhibé. À chaque cycle de PCR, un plus grand nombre de sondes sont clivées, ce qui entraîne une augmentation de la fluorescence qui est directement proportionnelle à la quantité d'acide nucléique cible présente.

• **Mode opératoire**

La RT-PCR en temps réel a été réalisée dans un thermo-cycler Applied Biosystems 7500 System en utilisant le kit superscript III RT/platinum Taq, ThermoFisher Scientific, USA en suivant les instructions du fabricant. Le volume réactionnel était constitué ainsi qu'il suit : 10 µL d'ARN ; 12,5 µL du mélange 2X ; 0,5 µL du mélange de chaque couple d'amorce (DENV, ZIKV, CHIKV sens 5'-3' et antisens 3'-5') ; 0,5 µL d'eau dépourvue de RNase et enfin 0,5 µL d'enzyme superscript III RT/platinum Taq Enzyme Mix. Le mélange réactionnel pour la RNaseP était constitué de 10 µL d'ARN ; 12,5 µL du mélange 2X ; 0,5 µL du mélange de chaque couple d'amorce (RP sens 5'-3' et antisens 3'-5') ; 0,5 µL d'eau

dépourvue de RNase et enfin 0,5 µL d'enzyme SuperScript™ III Reverse Transcriptase. La RT-PCR en temps réel a débuté par une transcription inverse à 50°C pendant 30 min, suivie d'une dénaturation de la Reverse transcriptase couplée à l'activation de l'enzyme Taq Polymérase à 95°C pendant 2 min. L'étape d'amplification de 45 cycles était constituée par une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes suivie d'une étape d'hybridation et d'élongation à 60°C pendant 1min (Santiago *et al.*, 2018). Les amorces de tous les gènes d'intérêt ont été fournies par les Centers for Disease Control and Prevention (CDC) des Etats Unies d'Amérique (Tableau IV). Les résultats obtenus pour chaque cible doivent être analysés séparément en effectuant un réglage manuel de la valeur seuil. Cette valeur a été ajustée de manière à croiser le début de la phase exponentielle des courbes de fluorescence et au-dessus du bruit de fond et les cycles seuils (Ct) de chaque échantillon ont été obtenus. Il est à noter que tous les échantillons ayant un Ct<39 étaient considérés comme positifs pour la cible choisie.

**Tableau IV :** Liste des amorces et sondes pour la détection des virus Dengue, Zika et Chikungunya

Nom de la séquence	N° de référence	Position du gene
DENV-S	SO3684	5'-UTR
DENV-AS1		
DENV-AS2		
DENV-sonde		
CHIKV-S	SO3685	nSP1
CHIKV-AS		
CHIKV-sonde		
ZIKV-S	SO3686	Gène de l'enveloppe
ZIKV-AS		
ZIKV-sonde		
RP-S	SO3687	Ribonucléase P
RP-AS		
RP-sonde		

### II.1.9. Détermination de la validité du test

La validité a été déterminée avant de procéder à l'analyse des résultats des échantillons cliniques et a été effectuée comme suit :

- Si les contrôles du positif (ARN des virus DENV, CHIKV et ZIKV) sont positifs avec des valeurs Ct dans la plage prévue tandis-que le contrôle négatif est négatif.

- Chaque échantillon doit être positif pour la cible RP tandis que le négatif pour le contrôle négatif n'amplifie pas pour cette cible.

Tous les cas positifs au virus de la Dengue ont été sérotypés par PCR semi-nichée selon la méthode décrite par Chien *et al.* (2006), et les échantillons positifs pour la cible DENV ont été génotypés suivant la méthode décrite par Goncalvez *et al.* (2003); les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel CLC et l'arbre phylogénétique a été construit à l'aide du logiciel MEGA 5.0 pour Windows.

#### **II.1.10. Sérotypage des cas positifs en RT-qPCR des acides nucléiques de la dengue**

Le sérotypage des cas positifs de dengue a été fait par PCR semi-nichée.

- **Principe de la PCR semi-nichée**

La technique de PCR nichée repose sur l'amplification spécifique d'une séquence nucléotidique à travers deux PCR successives suivant la méthode décrite par Chien *et al.* (2006). Elle consiste en la réalisation d'une première PCR puis d'une seconde PCR en utilisant les produits de la première PCR, ceci dans le but d'augmenter la spécificité et la sensibilité de l'amplification. Si au cours de la deuxième PCR l'amorce sens est conservée, la PCR sera qualifiée de sémi-nichée. Dans le cas où les deux amorces sont changées, la PCR est dite nichée.

- **Mode opératoire**

Il s'agit d'une succession de deux PCR dans lesquelles la première consiste en une rétro-transcription de l'ARN viral présent dans chaque échantillon en ADNc, suivie par l'amplification de la portion capsid pré-membrane (C-prM) en présence des amorces spécifiques mD1- 134-TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG DENV (Tout sérotype); D2- TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-616 ; rTS1- CCCGTAACACTTTGATCGCT-322 pour DENV1 ; mTS2CGCCACAAGGGCCATGAACAGTTT-232 pour DENV2; TS3- TAACATCATCATGAGACAGAGC-400 pour DENV3; et rTS4- TTCTCCCGTTCAGGATGTTC-374 pour DENV4.

La première amplification a été faite avec un *Master Mix* de 50 µL contenant 5µL d'ARN extrait et 1 µL de chacune des amorces mD1 et D2 ; 34,5 µL d'eau dépourvue de DNase/RNase ; 1 µL de dNTP ; 5 µL de tampon taq ; 1,5µL de Mg<sup>2+</sup>et 1µL de taq polymérase. La PCR sémi nichée a par la suite été réalisée avec 5 µL du produit de la première RT-PCR et en présence des amorces mD1 en combinaison avec rTSA, mTS2, TS3 et rTS4 spécifique à chaque sérotype du virus de la Dengue dans 4 tubes différents. Après

amplification, 5µL de chaque tube ont été mélangés avec le tampon de charge et déposés sur le gel d'agarose (1,5%).

La migration a été faite pendant une heure à une tension de 60 volts et le gel a été transféré dans un transilluminateur UV. L'identification des différents sérotypes a été faite sur la base des différents poids moléculaires des fragments amplifiés. Ainsi, la taille des fragments pour chaque sérotype étaient de 208 bp, 119 bp, 288 bp et 260 bp respectivement pour DENV-1, DENV-2, DENV-3 et DENV-4 figure 26. Les échantillons positifs au virus de la dengue sérotype 1 ont été sélectionnés et une portion du gène de l'enveloppe a été amplifiée par RT-PCR sémi-nichée suivant la procédure ci-dessous.

#### **II.1.11. Génotypage des cas positifs de virus de la dengue**

- **Amplification de l'ARN du virus de la dengue par RT-PCR**

Le génotypage des cas positifs de dengue Sérotype 1 a été effectué par amplification d'un fragment d'une portion partielle du gène de l'enveloppe E des échantillons positifs pour le virus de la dengue par RT-PCR suivant la procédure précédemment décrite par Goncalvez *et al.* (2002). Pour la première amplification, 10µL d'ARN ont été ajoutés à 40 µL de *Master mix* contenant un volume de 13,5 µL d'eau dépourvue de DNase et RNase, 25 µL de tampon 2X, 0,5 µL d'amorces à une concentration finale de 20 mM ciblant le gène de l'enveloppe sens (d1s22 : 5'-AGTTGTTAGTCTACGTGGAC-3') et anti sens (d1a17 : 5'-CCAATGGCYGCTGAYAGTCT-3') et enfin, 1µL de Superscript III reverse transcriptase avec Platinum Taq Hifi (Invitrogen-Thermo Scientific, USA). Par la suite, afin d'augmenter la sensibilité, 5 µL de produit de la première amplification ont été utilisés comme matrice pour la seconde amplification (PCR sémi-nichée) en présence d'un mix contenant 0,5µL de chacune des amorces d1a17 et d1s6 (5'-GGYTCTATAGGAGGRGTGTTTCAC-3'), 40µL d'eau dépourvue de DNase et RNase, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> à 50 mM, 1 µL de dNTPs à 10 mM, 5µL de tampon de PCR 10X ; et enfin 1µL de Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA). Les amplicons obtenus à la fin ont été visualisés après migration sur un gel d'agarose (1,5%).

- **Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5%**

Cinq microlitres de chaque amplicons ont été séparés sur un gel d'agarose (1,5 % ; P/V) en présence de 2 µL de *gel green* (molécule fluorescente qui s'intercale entre les brins d'ADN et permet la révélation). La migration lors de l'électrophorèse a été réalisée à 60 mV dans un tampon Tris borate EDTA (1X, pH 8,0). Le marqueur de poids moléculaire 100 bp (*Invitrogen, Thermofisher scientific, USA*) a été utilisé comme référence. Les gels ont été visualisés et photographiés via un transilluminateur UV.

- **Séquençage par la méthode Sanger**

**Principe**

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. La méthode de séquençage de Sanger repose sur l'allongement par l'ADN polymérase d'un brin à partir d'une amorce, en utilisant le brin d'ADN dont on veut déterminer la séquence comme matrice. Au cours de cet allongement les dNTP ou les ddNTP ont été incorporés. Lorsqu'un ddNTP est incorporé, la polymérisation s'arrête (car ces nucléotides sont dépourvus de 3'OH sur le ribose pour assurer la continuité de la polymérisation). Chaque ddNTP est lié à un fluorochrome différent permettant de l'identifier. La séparation des fragments de différentes tailles générées après polymérisation et le traitement du signal émis par le ddNTP en bout de chaîne permet de déterminer la séquence du brin. Les fragments amplifiés lors des PCR de génotypage Dengue 1 ont été séquencés de façon bidirectionnelle. Les amorces utilisées pour le séquençage étaient les mêmes que celles utilisées pour les PCR de génotypage.

**Mode opératoire**

- **Purification des produits d'amplification marqués et séquençage**

La purification a été réalisée avec la résine Séphadex® G50, qui permet de dessaler les produits d'amplification et d'éliminer les nucléotides non incorporés ainsi que les amorces en excès. La limite d'exclusion de la résine est d'environ 20 nucléotides. Dans une plaque de 96 puits MultiScreen HV® ont été distribués 250 µL de solution de Séphadex® G50 à 5% deux fois et centrifugés à 910 g pendant 5 minutes. Ce processus permet d'éliminer l'eau en excès et de compacter les colonnes du gel. Les produits d'amplification marqués ont été déposés au fond de ces mini colonnes et centrifugés 5 minutes à 910 g. Ces produits ont été récupérés dans une plaque et 10 µL de Formamide HDI® ont été additionnés pour la rupture des liaisons hydrogènes entre les acides nucléiques. La plaque contenant les produits marqués a été enfin insérée dans le séquenceur *Applied Biosystems 3500* pour le séquençage.

### **II.1.12. Analyse phylogénétique**

L'analyse phylogénétique des séquences obtenues a été réalisée sur une portion de la région E du génome du virus de la dengue. Les séquences obtenues ont été étudiées en terme d'homologie la plus proche à l'aide de l'outil de recherche BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) sur le site du NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Les séquences sens et antisens de nos souches ont été obtenues par élimination des pics de bases de faible qualité à la fin du chromatogramme et assemblées en un seul consensus. Les



discordances de paires de bases ont été corrigées. Les séquences nucléotidiques obtenues ont été traduites en séquences de protéine. Les séquences consensus de cette étude ainsi que les séquences de références d'autres études à travers le monde ont été alignées en utilisant l'algorithme CLUSTAL W. La comparaison des proportions de similarité a été effectuée entre nos isolats et les souches de références. Un arbre phylogénétique a été construit à l'aide d'un système de score de distance, l'algorithme du *neighbor-joining* et le modèle de substitution de Kimura à 2 paramètres a été utilisé. La robustesse de l'arbre a été évaluée avec 1000 ré-échantillonnages « *bootstrap* ». Les séquences ont été assemblées et éditées à l'aide du logiciel CLC version 5 pour Windows et les analyses phylogénétiques ont été exécutées à l'aide du logiciel MEGA version 6 (Tamura *et al.*, 2013; Ong *et al.*, 2008). Les séquences nucléotidiques de cette étude ont été soumises à *GenBank* et enregistrées avec les numéros d'accès allant de MH802053 à MH802057.

### **II.1.13. Analyse des données**

- Synthèse et analyse des données de méta-analyse

Les données ont été analysées à l'aide des packages « *meta* » du logiciel statistique R (version 3.5.1 pour Windows). La prévalence de l'infection à DENV a été calculée sur la base des numérateurs et des dénominateurs bruts fournis par les études individuelles. L'effet des études avec des prévalences extrêmement faibles ou extrêmement élevées sur la prévalence a été stabilisé et minimisé à l'aide du test de Freeman-Tukey avant de regrouper les données avec le modèle de méta-analyse à effets aléatoires (Barendregt *et al.*, 2013). L'hétérogénéité entre les données de prévalence a été évaluée par test du chi-carré sur la base des statistiques Q de Cochrane (Cochran, 1954), et quantifié par les valeurs  $I^2$ , en supposant que les valeurs des carrés de I de 25, 50 et 75% représentent respectivement une hétérogénéité faible, moyenne et élevée. La valeur  $p < 0,10$  a été considérée comme révélatrice d'un biais de publication statistiquement significatif pour les études de prévalence (Egger *et al.*, 1997).

- Synthèse et analyse des données épidémiologiques

Les données collectées ont été enregistrées dans une base Microsoft Excel 2016. L'analyse des données a été faite avec le logiciel SPSS version 22.0 pour Windows. Les variables catégorielles ont été exprimées en effectifs et proportions. L'analyse a évalué les facteurs (sexe, âge et sévérité) associés à l'infection au virus de la dengue en utilisant le test d'indépendance Khi-deux de Pearson. La valeur  $p < 0,05$  a été considérée comme statistiquement significative.

## **II.2. Etude des propriétés anti-Chikungunya de quelques extraits de plantes de la pharmacopée camerounaise**

Le virus Chikungunya a été précédemment caractérisé au Cameroun. Tout d'abord par Peyrefitte *et al.* (2007) qui ont rapporté l'isolement du virus du chikungunya chez un patient lors d'une épidémie d'un syndrome pseudo grippal au Cameroun en 2006. Le virus a été regroupé phylogénétiquement dans le groupe de la République démocratique du Congo, ce qui indique une circulation continue d'une population de virus Chikungunya génétiquement similaire pendant 6 ans en Afrique Centrale. Par la suite, une autre étude a rapporté la caractérisation du virus au cours d'une épidémie semblable à la première et a montré que le virus formait un cluster avec les souches circulant en Afrique Centrale (Maurice *et al.*, 2015). Selon les données de la littérature, ce virus peut causer des épidémies suivant un cycle de 10 ans (Silva *et al.*, 2018). Dans cette partie du travail, nous avons sélectionné quelques plantes de la pharmacopée utilisées pour le traitement de la fièvre. Les extraits de ces plantes ont été préparés et utilisés pour traiter les cellules Vero préalablement infectées par le virus Chikungunya souche S27. La plante présentant la meilleure activité a été dégrossie. L'activité antivirale des trois fractions issues de ces plantes a été testée sur différents stades du cycle de replication du virus et enfin, l'effet de ces extraits sur les protéines virales a été déterminé.

### **II.2.1. Préparation des extraits bruts et fraction de plantes**

Dix plantes médicinales ont été sélectionnées sur la base de leur utilisation par les populations pour le traitement des fièvres en générale. Ces plantes ont également fait l'objet d'une recherche webographique afin de confirmer leur utilisation pour le traitement des fièvres associées à la présence de douleurs articulaires sévères ou arthralgie qui est le signe caractéristique de l'infection par le virus chikungunya (Vijayan & Sukumaran, 2016).

#### **II.2.1.1. Préparation des extraits bruts de plante**

Les écorces et/ou tiges des 10 plantes ont été découpées, lavées, séchées à l'air libre et broyées à l'aide d'un moulin électrique. Pour chaque plante, 100 g de la poudre obtenue ont été extraits par macération dans 300 mL du système solvant Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) / Eau (H<sub>2</sub>O) (65 : 35 V/V) pendant 72 h. L'opération a été renouvelée ainsi plusieurs fois à température ambiante. Les macérâts ainsi collectés ont été mélangés et filtrés sur papier Whatman N°1 et le filtrat concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif (Buchi rotavapor R-200) à 65°C. L'extrait final a été séché à l'étuve (JuLabo WS100) à une température de 40°C. Chaque extrait obtenu a été pesé puis conservé à une température de 4°C pour les expérimentations ultérieures. Les

rendements d'extraction ont été calculés par rapport à la masse de poudre totale obtenue, suivant la formule ci-dessous :

$$\text{Rd}(\%) = \frac{\text{Masse de l'extrait (g)}}{\text{Masse de la poudre(g)}} \times 100$$

### **II.2.1.2. Fractionnement d'extrait brut de *Poga oleosa***

Vingt grammes (20 g) d'extrait brut de *Poga oleosa* précédemment préparés ont été soumis à un dégrossissement par partitionnement en utilisant une ampoule à décanter et trois solvants ayant un gradient de polarité croissant : Hexane, Acétate d'éthyle et méthanol. En effet, ces extraits ont été dissouts dans le méthanol puis partitionnés respectivement avec de l'hexane et de l'acétate d'éthyle. A l'issue de ce dégrossissement, 3 fractions ont été obtenues avec chaque solvant et nommées Fme (Fraction au méthanol), Fea (Fraction à l'acétate d'éthyle), et Fhex (Fraction hexanique).

### **II.2.2. Préparation des solutions d'extrait à utiliser**

Les solutions stocks des extraits et fractions de plantes ont été préparées dans le DMSO (Sigma Aldrich, GmbH, Steinheim, Allemagne) à la concentration de 10000 µg/mL. Elles ont ensuite été filtrées en utilisant des filtres à seringue (0,22 µM) dans les conditions stériles. Les filtrats obtenus ont été répartis en aliquotes et conservés à -20°C jusqu'au moment d'utilisation.

### **II.2.3. Cultures des cellules Vero**

Les cellules VERO ont étéensemencées à raison de  $1 \times 10^6$  cellules pour 10 mL de milieu DMEM (*Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Allemagne*) supplémenté avec 10% de SVF, 1% de pénicilline/streptomycine 500 µg/mL. Les cellules ont été incubées à 37°C sous atmosphère humide 5% CO<sub>2</sub>, dans des boîtes de cultures stériles munies de bouchons ventilés. Après 2 à 4 jours d'incubation, les boîtes présentaient une confluence qui variait de 80-100% et un surnageant de culture de couleur jaunâtre. Le surnageant a été jeté et les cellules ont été lavées 2 fois avec 10 mL de PBS. Après lavage, les cellules ont été détachées par incubation avec 1 mL d'une solution de trypsine EDTA (1X) pendant 5-10 min, puis en tapotant légèrement les boîtes sur les côtés. La collecte a ensuite été réalisée en ajoutant 4 mL de milieu de culture frais et l'ensemble a été mélangé plusieurs fois à l'aide d'une pipette. Une fois collectées, les cellules ont été centrifugées à 1000 tr/min, 22°C pendant 5 min. Le surnageant a été éliminé et le culot cellulaire re-suspendu dans 10 mL de milieu DMEM frais. Cent microlitres de cette suspension ont été prélevés pour le comptage des cellules vivantes

au Bleu Trypan. Un million de cellules vivantes ont été réensemencées dans de nouvelles boîtes de culture, et le reste a été utilisé directement pour les expériences.

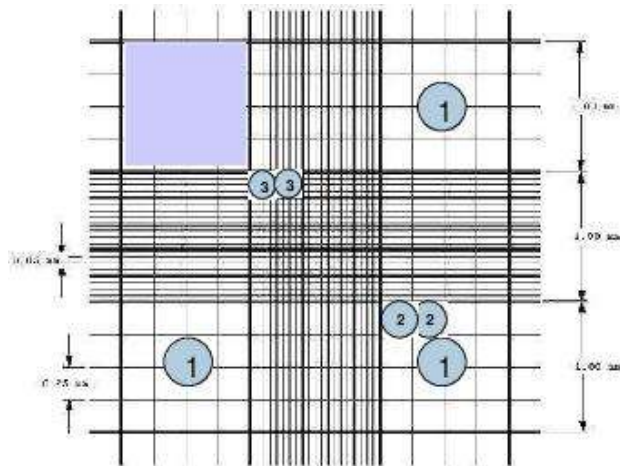
#### II.2.4. Comptage des cellules vivantes

- **Principe**

En présence du Bleu Trypan, les cellules vivantes excluent le colorant, ce qui empêche son internalisation. Elles apparaîtront ainsi claires ou brillantes au microscope optique contrairement aux cellules mortes, qui seront colorées en bleues (Strober, 2015).

- **Mode opératoire**

Pour réaliser ce test, une solution de Bleu Trypan à 0,4% préparée dans le PBS a été utilisée. Dans un tube eppendorf de 1,5 mL, 100 µl de la suspension cellulaire fraîchement préparée ont été introduits, puis 400 µl de la solution de Bleu Trypan. L'ensemble a été mélangé 3 à 4 fois à l'aide d'une micropipette, puis 10 µl de la suspension obtenue ont été prélevés et déposés dans la chambre de *Neubauer* (Figure 27). La préparation a ensuite été observée sous microscope optique et les cellules vivantes et mortes ont été comptées à l'aide d'un hémocytomètre.



**Figure 27 :** Cellule de Neubauer

Les cellules ont été comptées dans les quatre carrés qui ont chacun pour superficie  $S = 1\text{mm} \times 1\text{mm}$  soit  $1\text{mm}^2$  et pour volume :  $V = 1\text{mm}^2 * 0,1\text{mm} = 0,1\text{mm}^3 = 1 \times 10^{-4}\text{mL}$ .

Le calcul de la concentration de la suspension cellulaire de départ a été effectué en utilisant la formule suivante :

$$\left(\frac{\text{Cellules}}{\text{ml}}\right) = \frac{\text{Nombre total de cellules dans les 4 carrés} \times 100 \times fd \times 10000}{\text{Nombre de carrés comptés (4)}}$$

Avec : fd = facteur de dilution = 500/100 = 5

Le pourcentage de viabilité a été ensuite déterminé par la formule ci-dessous.

$$\% \text{ de viabilité cellulaire} = \frac{\text{Nombre de cellules brillantes} \times 100}{\text{Nombre total de cellules}}$$

### **II.2.5. Test d'inhibition du virus du Chikungunya**

La procédure générale d'évaluation des propriétés anti-Chikungunya des extraits bruts et fractions de plantes a consisté à ensemercer les cellules Vero à raison de  $1 \times 10^5$  cellules/mL/puit dans les plaques de 24 puits et incubées à 37°C, pendant 24h en atmosphère humide, 5% CO<sub>2</sub>. Ensuite, le milieu de culture était remplacé avec du milieu frais et les cellules incubées en absence (groupe témoin) ou en présence du virus Chikungunya souche S27 (groupe infecté ; isolé pendant la première épidémie de fièvre chikungunya en tanzanie et de génotype ECSA) pendant 90 min, le temps nécessaire pour que le virus soit adsorbé dans la cellule ; ou en présence du virus (pendant 90 min) et du composé de référence (Ribavirine), des extraits bruts et fractions pendant 16 h après traitement des cellules. Le virus a été utilisé à la MOI (*Multiplicity Of Infection*) de 0,2 préalablement déterminée. Avant l'évaluation des propriétés anti-Chikungunya, l'effet des extraits et fractions sur la viabilité des cellules VERO a été examinée.

### **II.2.6. Détermination de l'effet des extraits et des fractions de plantes sur la viabilité des cellules VERO et la multiplication du virus Chikungunya**

Pour étudier l'effet des extraits bruts et des fractions sur la viabilité cellulaire, les cellules VERO en culture ont été traitées avec le DMSO, les extraits bruts ou les fractions aux concentrations finales respectives 0,14% pour le DMSO ; 25 µg/mL à 1000 µg/mL pour les extraits et fractions. Après 16h d'incubation, la viabilité des cellules a été mesurée par le test de viabilité cellulaire au bromure de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT).

Pour la détermination de l'effet des extraits sur la multiplication du virus Chikungunya, les cellules VERO ont été ensemençées dans les plaques de 24 puits à raison de  $1 \times 10^5$  cellules/mL/puit dans le milieu DMEM complet. Après avoir été incubées à 37°C, pendant 24h en atmosphère humide, 5% CO<sub>2</sub>, les cellules ont été infectées avec le virus Chikungunya, prototype S27 à une MOI de 0,2 pendant 90 min. Après cette période d'infection, les cellules ont été lavées et incubées en présence de chaque extrait brut et

fraction de plantes aux concentrations finales de 25 et/100 µg/mL pendant 16h ou en présence de la Ribavirine (4,1 µM) pendant 16h. Au préalable, pour toutes les expériences, les contrôles ont été incubés à la même concentration de DMSO utilisée dans les groupes tests. L'absence d'effet du DMSO sur la viabilité cellulaire et la réplication du virus Chikungunya à la concentration de 0,14% a été vérifié. Après incubation, les surnageant ont été récupérés pour déterminer le titre viral par RT-PCR et par le test de neutralisation.

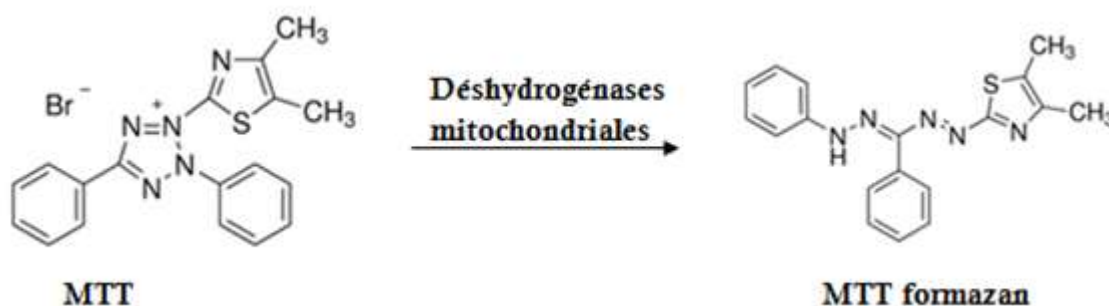
### **Test de viabilité cellulaire au MTT**

- **Principe**

Le MTT est un sel de tétrazolium de couleur jaune qui est utilisé pour mesurer la viabilité cellulaire, la prolifération cellulaire et les effets cytotoxiques des substances chimiques ou phytochimiques. Les cellules viables métabolisent ce substrat par leurs déshydrogénases mitochondriales en formazan, produit insoluble en milieu aqueux et coloré (bleu-violet). L'intensité de la couleur produite est lue à 540-570 nm et est directement proportionnelle à la concentration de cellules viables dans le milieu (Kasugai *et al.*, 1991).

- **Mode opératoire**

A la fin du traitement comme indiqué ci-dessus, le milieu de culture a été éliminé et les cellules ont été lavées avec 500 µL de PBS et incubées avec 200 µL de la solution de MTT dissous dans le PBS à la concentration de 0,5 mg/mL. Après 3h d'incubation à 37°C, la solution de MTT a été aspirée et les cristaux de formazan dans les cellules ont été dissouts avec 500 µL de la solution d'isopropanol acidifiée (3 :1 (V/V)). L'absorbance de la solution de couleur bleu-violette obtenue a été lue à 560 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (*Multiskan FC, Thermo Fischer Scientific*). L'absorbance des cellules du groupe témoin ont été considérées comme 100% viable. La viabilité cellulaire dans chaque groupe test a été exprimée en pourcentages du témoin et calculée comme suit :



$$\text{Viabilité (\%)} = (\text{Absorbance du groupe test} / \text{Absorbance du groupe témoin}) \times 100$$

## **Détermination de la charge virale par RT-PCR dans le surnageant**

- **Synthèse des ADNc par reverse transcription**

Les ADNc ont été synthétisés dans un thermo-cycler Eppendorf en utilisant le kit de synthèse de l'ADNc (Takara) et en respectant les instructions du fabricant. Dans un tube de micro-centrifugation, 1 µg d'ARN fraîchement extrait a été mélangé avec 0,5 µL d'amorce *Random primers*, 0,5 µL de dNTP (20µM), 2µL de tampon 5X, 0,5 µL d'enzyme transcriptase inverse, et 0,25 µL de *RNase inhibitor* (40U/µL) et enfin l'eau dépourvue de RNase/DNase a été ajoutée pour compléter le volume final à 10 µL. La synthèse de l'ADNc a été effectuée dans les conditions de réaction suivante : 5 min à 25 °C suivie de 60 min à 37 °C et enfin 5 min à 70 °C suivie d'une baisse de la température à 4°C pour un temps infini. Les ADNc obtenus ont été conservés à 4°C jusqu'à la quantification par RT-PCR.

- **RT-PCR pour la détermination de la portion E1 du virus Chikungunya**

L'ADNc a été utilisé pour le test PCR en temps réel avec des amorces PCR spécifiques au CHIKV (CL 011(F)-5' TGCCGTCACAGTTAAGGACG3' et CL012(R)-5' CCTCGCATGACATGTCCG3' (Mishra *et al.*, 2016) ciblant le gène de l'enveloppe E1 en utilisant le *master mix* plus constitué de 2,5 µL de tampon 10X, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (20µM), et dNTP (20µM), 1 µL de chacune des amorces sens et antisens (20 µM), 14,35 µL d'eau dépourvue de DNase/RNase et 0,65 µL de Taq polymérase. Le profil thermique de 95 °C pendant 5 min, puis la phase cyclique était effectuée à 95°C pendant 45s, 72 °C pendant 30 s, pour 35 cycles et enfin 72 °C pendant 10 min. Un contrôle positif et un négatif de la matrice ont également été inclus dans toutes les expériences.

## **Test de Neutralisation du virus**

- **Prélèvement d'échantillons pour le test de neutralisation**

Les surnageants de culture cellulaire peuvent être récoltés sur des plaques de culture et stockés dans des tubes à -80 °C si les tests de neutralisation doivent être effectués un jour différent.

- **Ensemencement de cellules VERO sur des plaques de 24 puits**

Après avoir chauffé tous les milieux de culture cellulaire, le PBS et la trypsine-EDTA (1X) au bain-marie à 37 °C, les milieux de culture cellulaire ont été retirés d'une boîte de culture confluente de cellule VERO, puis ont été éliminés par aspiration et les cellules ont été lavées deux fois avec 5 ml de PBS 1X. Les cellules ont été traitées avec 2 ml de trypsine-EDTA 1X et incubées à température ambiante pendant 1-3 min. puis la boîte tapotée

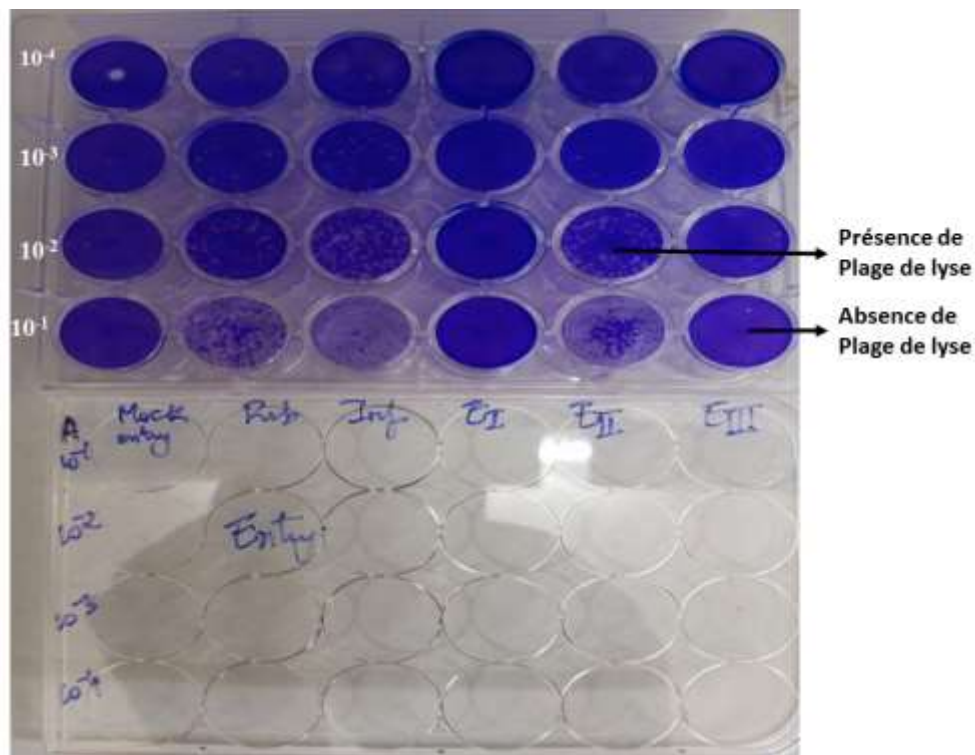
doucement sur le côté pour décoller les cellules. Par la suite, 8 ml de DMEM complet ont été ajoutés pour stopper l'action de la trypsine-EDTA. Et l'ensemble bien mélangé à la pipette une dispersion uniforme des cellules. 20 µl de suspension de cellules VERO viables ont été prélevées et comptées à l'aide la cellule de Neubauer à l'aide un hémocytomètre comme décrit précédemment. Les facteurs de dilution appropriés pour une densité d'ensemencement qui donnerait un confluence >80 % après une incubation de 24h, puis les cellules diluées dans le milieu DMEM complet en fonction du nombre de plaques à ensemercer. 1 ml de suspension cellulaire diluée dans chaque puits de 24 puits de la plaque ont été laissées sur la paillasse pendant au moins 15 minutes pour permettre aux cellules de se fixer au fond du puits. Les plaques ont été incubées pendant la nuit à 37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub>.

➤ **Test de neutralisation sur plaque**

Des dilutions en série et en double des échantillons provenant de chaque manipulation allant jusqu'à 10<sup>-4</sup> (Figure 28) ont été effectuées. Par la suite, le milieu de chaque plaque de 24 puits a été éliminé et 140 µl d'échantillon dilué ont été ajoutés dans chaque puits (duplicatas). Le control négatif était constitué du milieu de culture. Pour permettre l'adsorption des virus, les plaques ont été incubées pendant 90 min à 37 °C ,5 % de CO<sub>2</sub>. Après la période d'incubation, les plaques ont été lavées deux fois avec 1 ml de PBS par puits, puis 1 ml de milieu de recouvrement (DMEM + Carboxy Méthyl Cellulose (CMC) 1,5%) a été ajouté dans chaque puits et les plaques incubées pendant environ 5 jours à 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Les plaques ont été observées au microscope optique pour s'assurer qu'elles sont prêtes à être colorées. Après incubation, les supports de recouvrement ont été enlevés et les plaques fixées à l'aide du para formaldéhyde 1% pendant 6 h puis colorées avec une solution de cristal violet (500 µl/puits) pour visualiser et compter les plages de lyse formées. Les plaques ont été lavées et séchées dans un incubateur à sec ou sur la paillasse. Pour déterminer le titre du virus, les puits ont été comptés avec 10 à 100 plaques. Les titres de virus ont été exprimés en unité formatrice de plaque par millilitre (pfu/ml) après ajustement pour les facteurs de dilution. La formule suivant à été utilisée pour calculer le titre viral :

$$\text{pfu/mL} = \text{moyenne de plage formée} / (\text{Dilution} \times \text{Volume de l'inoculum})$$





**Figure 28 Test de neutralisation sur plaque**

**Légende :** Mock : témoin négatif non infecté ; Rib : groupe traité avec la ribavirine et infecté ; Inf : Groupe infecté non traité ; EI : extrait de *Entendrophragma cylindricum* ; EII extrait brut de *Annickia affinis* ; EIII : Extrait brut de *Poga oleosa*.

### II.2.7. Effet des plantes et fraction actives sur les étapes clés du cycle infectieux du virus Chikungunya

L'effet des extraits et fractions a été examiné sur les étapes clés du cycle infectieux du virus Chikungunya (l'entrée du virus dans la cellule hôte, la réplication virale et, l'assemblage/libération de nouveaux virions). Ainsi, Les cellules VERO ont étéensemencées dans les plaques de 24 puits dans le milieu DMEM complet à raison de  $1 \times 10^6$  cellules/puits le jour précédant la manipulation. Après ce temps d'incubation, le milieu de culture a été aspiré et les traitements effectués ainsi qu'il suit :

✓ Pour l'étape d'entrée, les cellules VERO ont été incubées pendant 90 min en présence de la suspension virale contenant du DMSO 0,2% (témoin) ou des extraits bruts ou fractions de plantes aux concentrations prédéterminées. Cette durée de l'étape d'inoculation correspond à l'entrée du virus. Après 90min d'incubation, le milieu de culture a été éliminé, la plaque a été lavée deux fois avec du PBS 1X et un nouveau milieu DMEM sans sérum fœtal de veau ne contenant ni les extraits de plantes ou les fractions, ni le virus Chikungunya S27 a été ajouté et l'ensemble a été incubé pendant 16 h supplémentaires (Galani *et al.*, 2015).

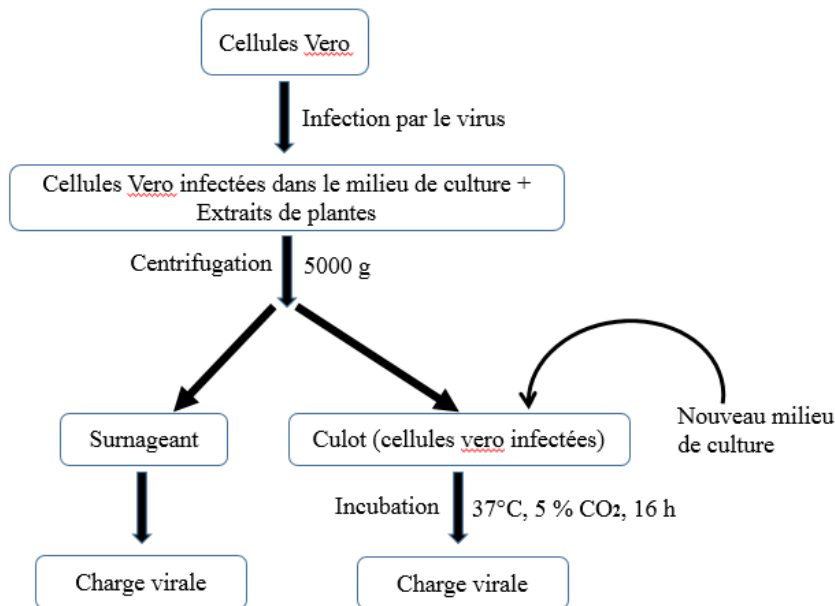


Diagramme 1. Effet des extraits sur l'étape d'entrée du virus Chikungunya

✓ Pour l'étape de répliation, les cellules VERO ont d'abord été infectées avec le virus Chikungunya S27 pendant 90 min et le milieu a été éliminé et la plaque a été lavée avec du PBS 2X. Puis, les cellules ont été incubées avec le milieu DMEM contenant du DMSO 0,14 % (témoin) ou les extraits et fractions de plantes aux concentrations prédéterminés pendant 16 h.

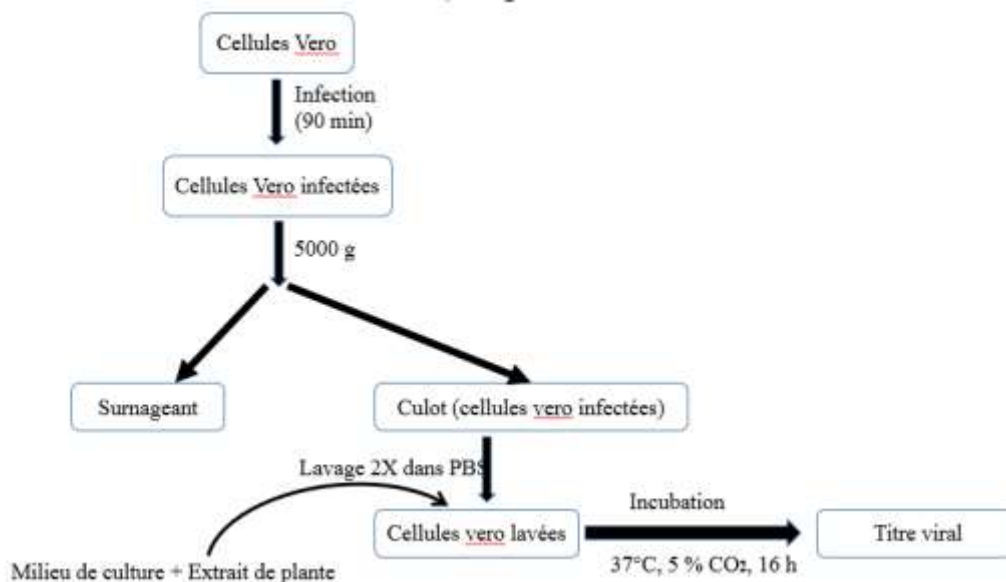
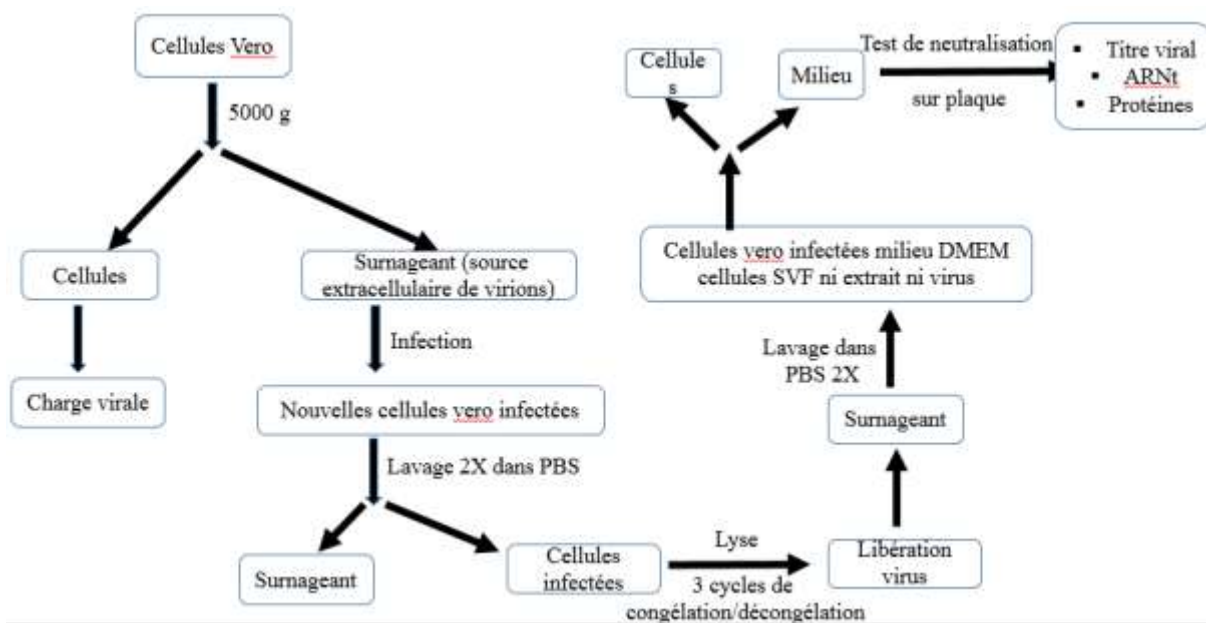


Diagramme 2 : Effet des extraits de plante sur l'étape de répliation du virus Chikungunya

✓ Pour l'étape de synthèse de virions, le milieu de culture collecté à l'issue des 16h d'incubation dans l'étape de répliation a été clarifié par centrifugation (5 000 g, 5 min,

25°C) et utilisé comme source extracellulaire de particules du virus Chikungunya pour infecter les cellules VERO, tandis que les cellules restantes ont été lavées deux fois avec le PBS, collectées séparément dans les tubes et soumises à trois cycles de congélation/décongélation pour lyser les cellules et libérer les virus formés et les surnageants obtenus après centrifugation ont été utilisés pour infecter les cellules VERO confluentes. Après 90 min d'incubation correspondant à la période d'adsorption du virus par la cellule, le milieu a été éliminé, les cellules lavées 2 fois au PBS et incubées avec le milieu DMEM sans sérum fœtal de veau ne contenant ni les extraits et ou fractionS, ni le virus Chikungunya S27 pendant 16h.



**Diagramme 3 : Effet des extraits de plante sur l'étape d'assemblage libération du virus Chikungunya**

Après ces 16h d'incubation dans chaque étape, les milieux de culture et les cellules ont été collectés séparément et clarifiés par centrifugation (5 000 g, 5 min, 25°C). Le titre viral a été déterminé dans le surnageant par le test de neutralisation sur plaque tel que décrit plus haut tandis que les ARN totaux et/ou les protéines ont été extraits afin d'analyser l'effet des extraits actifs sur l'expression de quelques protéines impliquées dans l'interaction hôte-virus au cours du cycle infectieux du virus Chikungunya.

### **II.2.7.1. Analyse de l'effet des plantes et fractions active sur l'expression des protéines virales nsP2 et E1 impliquées dans les interactions cellule hôte-virus au cours du cycle infectieux du virus Chikungunya**

Pour mieux comprendre le mécanisme par lequel les extraits de plantes inhibent le cycle infectieux du virus Chikungunya, leur effet sur l'expression des protéines nsP2 et E1 (impliquées dans les interactions cellule hôte-virus au cours des étapes clés du cycle infectieux du virus Chikungunya) a été évalué. Pour l'étape d'entrée, l'analyse s'est faite par Cytométrie en flux, analyse *Confocal*, RT-qPCR et *Western blot* et par le test de blocage et a porté sur l'expression des gènes codants pour les protéine nsP2 et E1, un récepteur d'entrée virale. Pour les étapes de réplication, l'analyse s'est faite par RT-qPCR, *Western Blot* et a porté sur l'expression des protéines nsP2 et E1 (étape de réplication) ( Mishra *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2015).

#### **II.2.7.1.1. Analyse quantitative de l'expression des genes par RT-qPCR**

##### **✓ Extraction des ARN totaux**

Dans chaque culot cellulaire collecté, 500 µL du réactif de TRIzol (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Allemagne) ont été ajoutés et les cellules homogénéisées en pipetant 10 à 15 fois. L'échantillon a été laissé pendant 5 min à 15-30°C, puis la suspension transférée dans un tube eppendorf de 1,5 mL. Cent microlitres de chloroforme ont été ajoutés dans les tubes et ceux-ci ont été agités vigoureusement à la main pendant environ 15 secondes. Les tubes ont été centrifugés à 12000 g pendant 15 min à 4°C. Trois phases ont été observées : une phase aqueuse claire et surnageant qui contient les ARN ; une interphase qui contient l'ADN et une phase organique en dessous qui contient les protéines. La phase aqueuse a été prélevée (soit environ 300 µL) et transférée dans un tube eppendorf RNase-free. Puis on y a ajouté 250 µl d'isopropanol, puis l'échantillon a été laissé au repos pendant 20-30 min. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 12 000g pendant 10 min à 4°C pour précipiter les ARN. Le surnageant a été alors délicatement éliminé. Cinq cent microlitres d'éthanol absolu ont été ajoutés à chaque culot d'ARN, puis l'ensemble a été mélangé et centrifugé à 7500 g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant a été décanté, puis le culot lavé à nouveau avec l'éthanol absolu et centrifugé à 7500 g pendant 1 min à 4°C. L'éthanol a ensuite été éliminé délicatement et l'ARN séché pendant 10 min. Les ARN ont été re-solubilisés dans 30 µL d'eau dépourvue de Rnase en aspirant la solution plusieurs fois à l'aide d'une micropipette, et en mélangeant à l'aide d'un Vortex. La concentration des ARN et leur qualité ont été évaluées par

spectrophotométrie (Nanodrop ND2000). Les échantillons d'ARN avec un ratio  $A_{260}/A_{230} > 1,7$  et  $A_{260}/A_{280}$  nm entre 1,7-2,0 ont été utilisés pour la synthèse des ADNc selon la procédure décrite précédemment.

#### ✓ **PCR quantitative en temps réel ou RT-qPCR**

L'expression des gènes nsP2 et E1 a été antérieurement décrite comme référence pour la détermination des effets antiviraux en culture cellulaire (Mishra *et al.*, 2016). La qRT-PCR est une technique d'analyse quantitative de l'expression des gènes basée sur une PCR classique qui permet l'amplification d'un ADNc à l'aide d'amorces spécifiques. Les fragments d'ADNc néoformés ou amplicons sont ensuite détectés et quantifiés à mesure qu'ils se forment dans le milieu grâce à un reporter fluorescent issu de la technologie *SYBR green*. Dans cette technologie, les ADNc sont amplifiés dans le milieu en présence d'un fluorochrome à base de cyanine (le vert de SYBR ou *SYBR green*) qui a la capacité de se lier à une molécule d'ADN double brin. Lorsque ce colorant se fixe à la double hélice d'ADN, il se forme un complexe qui absorbe la lumière bleue ( $\lambda_{\max} = 497$  nm) et émet une fluorescence verte ( $\lambda_{\max} = 520$  nm). Plus la quantité de produits de PCR augmente dans le milieu, plus ce fluorochrome va se fixer et plus l'intensité de la fluorescence va augmenter à 520 nm. La séquence des différentes amorces utilisées est présentée dans le tableau V.

La RT-qPCR a été réalisée dans un thermocycler BioRad CFX96 (*Biorad Laboratories GmbH*) en utilisant un kit *Master Mix SyBR Green* (*Thermo Fisher, Swerte, Allemagne*) suivant les instructions du fabricant. Pour confirmer la spécificité de l'amplification, les produits de la PCR ont été soumis à une analyse des courbes de fusion. La courbe de quantification des amplicons en fonction des cycles PCR donne l'allure d'une courbe sigmoïde.

Le programme de PCR a consisté en 3 étapes : Une dénaturation (95°C), une étape d'hybridation avec des oligonucléotides spécifiques, et une étape d'élongation à 72°C dont la durée dépend de la taille de l'ADNc à amplifier. Les étapes ont été répétées pendant 35 cycles. Avant le début du premier cycle, les tubes ont été préchauffés à 95°C pendant 15 minutes pour activer la Taq polymérase et séparer les brins de la double hélice d'ADN.

**Tableau V:** Séquences des amorces utilisées lors de la RT-qPCR

Gènes	Séquences
NsP-2	[F-CGAGGATCCAGTATGGAAGACACTCTCC]
	[R-CGACTCGAGTTAACATCCTGCTCGGGTGG]
E1	[F-ACGCAGTTGAGCGAAGCAC]
	[R-CTGAAGACATTGGCCCCAC]
GAPDH	[F-CGACCACTTTGTCAAGCTCA]
	[R-AGGGGTCTACATGGCAACTG]

Pour mesurer l'expression relative d'un gène d'intérêt, une valeur Ct (*Cycle threshold*) du gène a été calculée pendant la phase d'augmentation exponentielle de la fluorescence.

Le Ct correspond en fait au nombre de cycles de PCR qu'il faut à un échantillon d'ADNc (X) amplifié pour qu'il atteigne la même intensité de fluorescence que dans les autres échantillons d'ADNc pendant la phase exponentielle d'amplification. Le Ct est au-dessus du bruit de fond de l'appareil. Une valeur  $\Delta Ct$  a été ensuite déterminée en normalisant la valeur Ct du gène cible par rapport à la valeur Ct d'un gène standard utilisé comme contrôle interne ( $\Delta Ct = Ct(\text{Gène d'intérêt}) - Ct(\text{Gène contrôle})$ ). Cette normalisation permet d'exclure les différences possibles dans le rapport ADNc/ARN ou dans la qualité des échantillons expérimentaux. Le gène de Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogénase (GAPDH) a été utilisé ici comme contrôle interne.

Pour deux échantillons A et B dans lesquels on mesure l'expression du gène de la nsP2, plus le  $\Delta Ct$  (A) est supérieur au  $\Delta Ct$  (B), plus le gène nsP2 est élevé dans A que dans B. L'expression relative du gène d'intérêt a été déterminée par la formule :  $2^{\Delta Ct}$ . La spécificité des produits de la PCR a été contrôlée en analysant les courbes de fusion et la valeur de la température de fusion pour chacun de ces produits. Pour s'assurer que l'amplification d'un gène d'intérêt s'est bien déroulée, il fallait que tous les produits PCR décrivent une même courbe de fusion et présentent une même valeur de  $T_m$ .

#### II.2.7.1.2. Analyse de l'expression des protéines par Western blot

##### ✓ Extraction des protéines totales

Après traitement des cellules, les protéines totales ont été extraites à l'aide du kit d'extraction *M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent* (Thermo Fisher Scientific, USA) contenant 0,2% du cocktail d'inhibiteur de protéases *Halt protease inhibitor cocktail EDTA-*

*free 100X* (Thermo Fischer Scientific, USA) en suivant les instructions du fabricant. Une fois les cellules lavées avec du PBS, 400 µL de tampon de lyse ont été ajoutés dans chaque puits et les plaques de culture mises sous faible agitation à température ambiante pendant 5 min. Les lysats ont ensuite été transférés dans les tubes Eppendorf et centrifugés (12.000 g, 15 min, 4°C). Les surnageants obtenus constituant ainsi les protéines totales ont été transférés dans de nouveaux tubes et conservés à -80°C jusqu'à analyse par *Western blot*.

La concentration en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford dans le but de normaliser les concentrations en protéines de tous les échantillons à une seule concentration avant l'analyse par *Western Blot*.

#### ✓ **Dosage des protéines**

Le dosage des protéines a été effectué par la méthode utilisant la méthode de Bradford (1976).

#### ✓ **Principe**

C'est une méthode de mesure de concentration protéique basée sur la réaction colorimétrique entre les protéines et un colorant : le bleu de Coomassie G250. Ce réactif se fixe sur les groupements NH<sub>2</sub>-libre des protéines, produisant ainsi un complexe bleu qui absorbe avec un maximum d'intensité à 595nm. L'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la quantité de protéines dans le milieu.

#### ✓ **Procédure**

Le kit de dosage *Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA) a été utilisé en respectant les instructions du fabricant. La concentration en protéine a été calculée en utilisant la courbe d'étalonnage réalisée à partir d'une solution standard de BSA (*bovine serum albumin*) à 2 mg/mL.

#### ✓ **Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE)**

##### • **Principe et description de la technique**

L'électrophorèse est une technique de séparation fondée sur le déplacement à travers un support (matrice de polymère ou gel de polyacrylamide ou d'agarose) des molécules

chargées positivement ou négativement sous l'effet d'un champ électrique (Brunelle & Green, 2014).

En biochimie ou en biologie moléculaire, l'électrophorèse sur gel est utilisée pour la séparation des protéines ou des acides nucléiques en fonction de leur taille et de leur charge électrique. Le gel est constitué d'une matrice de polymère baignant dans un tampon conducteur. Deux principaux polymères sont utilisés : l'agarose et le polyacrylamide dont on peut faire varier la concentration.

### ❖ SDS-PAGE

La technique du gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (*Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis* ou SDS-PAGE) consiste à dénaturer à chaud un mélange de protéines en présence d'un agent réducteur : le  $\beta$ -mercapto-éthanol ou le dithiothréitol (DTT) qui réduit les ponts disulfures et d'un détergent anionique fort : le SDS, qui confère à toutes les protéines du mélange une charge négative. Les protéines de l'échantillon sont ensuite séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS.

#### ✓ Procédure

La première étape consiste à couler le gel de séparation et le gel de concentration entre deux plaques de verre. Le dispositif nécessaire pour la préparation du gel est présenté sur la figure 25 ci-après tandis que la composition des différents gels est présentée dans le Tableau VI ci-dessous.

Le gel de séparation (12% acrylamide) a été coulé en premier en introduisant environ 6 mL de cette solution entre les plaques de verre. Le gel a ensuite été recouvert avec de l'isopropanol pour permettre une solidification homogène à température ambiante pendant 20 min. Après solidification du gel de séparation, l'isopropanol a été éliminé et remplacé avec 2 mL de la solution du gel de concentration et les peignes de 1 mm d'épaisseur ont été introduits afin de former les puits servant pour le dépôt des échantillons.

**Tableau VI :** Composition des gels pour SDS-PAGE

Réactifs (en mL)	Gel de séparation (12% Acrylamide) Vf = 50 mL	Gel de concentration (5% Acrylamide) Vf = 10 mL
------------------	---	---



<b>Eau distillée</b>	16,5	6,8
<b>Acrylamide 30%</b>	20	1,7
<b>Tampon Tris-HCl 1,5M pH 8,8</b>	12,5	/
<b>Tampon Tris-HCl 1M pH 6,8</b>	/	1,25
<b>SDS 10%</b>	0,5	0,1
<b>Persulfate d'ammonium 10%</b>	0,5	0,1
<b>TEMED</b>	0,02	0,01

TEMED : N, N, N', N'-tétraméthyl-1,2-diamino-méthane ; Vf : volume final.

Après la préparation du gel, les protéines ont été diluées dans le tampon de *Laemmli* 5 fois concentré (tampon Tris-HCl 1 M, pH 6,8 contenant 100 mM DTT, 12% SDS, 4% bleu de bromophénol) et chauffées à 100°C pendant 10 min dans un block chauffant. Dix microlitres du mélange obtenu contenant 40 µg de protéines (pour tous les échantillons à analyser) ont été introduits dans les puits. Un puits séparé contenant le marqueur de poids moléculaire *pre-stained marker* (Thermo Fisher Scientific, USA) a été introduit. L'électrophorèse s'est déroulée en utilisant le générateur *Biorad Powerpac Universal System* pour générer le courant électrique. Dans le gel de concentration, la migration s'est effectuée sous un courant de tension 80 V pendant 30 min, suivie d'un courant de tension 100 V pendant 60 min pour la migration dans le gel de séparation à l'aide du tampon d'électrophorèse conducteur : Tris 50 mM – Glycine 0,2 M – SDS 0,1% - pH 8,5.

✓ **Transfert et détection des protéines sur membrane de nitrocellulose à l'aide d'anticorps**

Après migration, le gel est démoulé et les protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose (Nitrocellulose Blotting Membrane, GE Healthcare, Life Science, Germany) afin de rendre les protéines accessibles à la détection par anticorps.

Le principe du transfert est similaire à celui de la migration dans le SDS-PAGE, à savoir que les protéines chargées négativement migrent vers l'anode sous l'effet du champ électrique. La membrane étant incorporée entre le gel et l'anode, les protéines adhèrent à la membrane selon leur même disposition sur le gel. Le transfert s'est effectué sous un courant d'intensité 200 mA généré par le générateur *Biorad Powerpac Universal System* pendant 90 min en présence de la glace. Le tampon de transfert est constitué de 25 mM Tris, 190 mM Glycine et 20% Méthanol.

Une fois les protéines transférées, la membrane a été bloquée avec 5% (p/v) de lait sans matières grasses dilué dans le tampon Tris-Salin-Tween 20 (TBST : Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween20 0,05% ; pH 7,6) pendant 1h à température ambiante afin de limiter les interactions non-spécifiques entre la membrane et les anticorps. Après le blocage, la membrane a été incubée toute une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire dilué dans le tampon TBST contenant 1,5% de lait sans matières grasses.

Les anticorps primaires pour les protéines d'intérêt étaient : [*Rabbit polyclonal anti-nsP2 antibody (dilution 1:1000); Mouse monoclonal anti-E2 antibody (dilution 1:2000); Mouse monoclonal anti-GAPDH, (dilution 1:3000)*].

La membrane a été lavée 3 fois avec le tampon TBST et incubée pendant 2h à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire dilué dans le tampon TBST contenant 1,5% de lait sans matières grasses. Les anticorps secondaires utilisés étaient : *Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit et anti-mouse IgG AP-linked secondary antibodies (dilution 1 : 2000, Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA)*.

Après 3 lavages avec le tampon TBST, la membrane a été imbibée avec le réactif *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA)* et la détection des bandes de protéines a été réalisée par la méthode dite *Enhanced Chemiluminescent Method* qui combine les logiciels *MicroChemi Unit* et *GelCapture*. L'analyse densitométrique des bandes de protéines obtenues a été faite à l'aide du logiciel *Image J Software*.

### **II.2.7.1.3. Analyse de l'expression de la protéine virale E1, par cytométrie en flux**

#### **✓ Définition et principe de la technique**

La cytométrie en flux est définie comme l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une

particule ou une cellule coupant le faisceau lumineux d'un laser. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs aux paramètres morphologiques (taille et granularité) et aux paramètres de fluorescence (liés à l'utilisation de marqueurs fluorescents). Cette technique de caractérisation individuelle (cellule par cellule), quantitative et qualitative peut être couplée à l'immuno-détection qui consiste à détecter une protéine grâce à un anticorps primaire spécifique d'une protéine d'intérêt, puis à révéler cette reconnaissance par une antiglobuline (anticorps secondaire) marquée qui se fixe à l'anticorps primaire. Cette antiglobuline peut être marquée par un fluorochrome comme la fluorescéine isothiocyanate (FITC). Une analyse en cytométrie de flux ou FACS (*fluorescence-assisted cell sorting*) permet de détecter et quantifier les cellules fluorescentes qui expriment la protéine d'intérêt. La technique utilisée ici nous permet d'analyser par fluorescence, le pourcentage de cellules ayant exprimé le récepteur virale E1 (Kumar *et al.*, 2018).

#### ✓ **Procédure**

Les cellules VERO ont étéensemencées à raison de  $1 \times 10^6$  cellules/puits dans les disques de 100 mm. Le jour suivant, le milieu a été changé et les cellules ont été traitées avec le DMSO (0,2%) ou les extraits de plantes à différentes concentrations pendant 48 h. Les cellules ont ensuite été lavées avec le PBS et détachées avec 100  $\mu$ L de Trypsine-EDTA (GIBCO, *Life Technologies*) et transférées dans un tube Eppendorf. Après lavage par centrifugation (300 g, 5 min, 4°C) avec 1 mL de PBS, le surnageant a été éliminé et les tubes ont été incubées dans la glace pendant 30 min avec 100  $\mu$ L d'anticorps monoclonal *rabbit anti-E1 antibody* (*Beijing Biosynthesis Biotechnology, Beijing, China*) dilué au 1/50<sup>ème</sup> dans le PBS. Ensuite, les cellules ont été lavées 3 fois avec 1 ml de PBS par centrifugation (300 g, 5 min, 4°C), puis les tubes ont été incubés dans la glace et à l'obscurité pendant 30 min avec 100  $\mu$ L d'anticorps *FITC-goat anti-rabbit secondary antibody* (*Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA*) dilué au 1/200<sup>ème</sup> dans le PBS. Après 3 lavages avec le PBS, les cellules ont été suspendues dans 200  $\mu$ L de PBS et analysées avec l'appareil BD FACS *Calibur Flow Cytometer* couplé au logiciel *FlowJo Software*.

#### **II.2.7.1.4. Quantification de l'infection par immunofluorescence indirecte**

##### ✓ **Principe**

L'immunofluorescence indirecte est une technique d'immuno-marquage qui consiste à détecter un gène viral grâce à un anticorps monoclonal spécifique de cet antigène, puis à

révéler cette reconnaissance par une antiglobuline (anticorps secondaire) marquée qui se fixe à l'anticorps monoclonal. Cette antiglobuline peut être marquée par un fluorophore comme la 594 Alexa floor (E1) ou le fluorochrome 488 Alexa floor (nsP2). Une lecture en microscopie à fluorescence permet de visualiser les cellules fluorescentes et à préciser la localisation subcellulaire de l'antigène viral.

La technique utilisée ici nous permet de visualiser par fluorescence les cellules infectées par le virus Chikungunya souche S27 et de quantifier le taux d'infection. Elle repose sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal de souris qui reconnaît spécifiquement la glycoprotéine E1 et le gène nsP2 du virus Chikungunya dans les cellules infectées : c'est l'anticorps primaire. Cet anticorps est lui-même reconnu par un anticorps polyclonal de chèvre anti-souris, couplé au fluorochrome *Alexa floor*. Ainsi, les cellules infectées vont émettre une fluorescence verte (nsP2) et rouge (E1) lorsqu'elles sont observées sous lumière UV. Parallèlement à ce marquage, les cellules sont également marquées au diamidino-2-phenylindole (DAPI) qui se fixe aux noyaux et leur attribuent une fluorescence bleue. Ce marquage au DAPI permet de quantifier le nombre total de cellules présentes dans les puits. Par ailleurs, il nous donne une indication sur la toxicité des composés. Si on observe une baisse du nombre de cellules infectées et aucune baisse du nombre total de cellules dans les tubes traités, on conclura à un effet inhibiteur de la substance testée sur le virus Chikungunya (Mishra *et al.*, 2016).

#### ✓ **Mode opératoire**

Les cellules VERO obtenus de l'effet des plantes sur la replication ont été préalablement fixées à -20°C dans du méthanol. Ces cellules ont été décongelées pendant quelques minutes à température ambiante puis le méthanol a été évacué. Cinquante microlitres de sérum de mouton (1%) ont ensuite été ajoutés afin de saturer chaque puits de la plaque et éviter les fixations non spécifiques, et les cellules ont été incubées pendant 10 min à température ambiante. Après ce temps d'incubation, 50µl d'anticorps monoclonal (anti-E1 et anti-nsP2) (Chattopadhyay *et al.*, 2014) dilué au 1/500 dans du sérum de chèvre (1%) ont été ajoutés et les cellules incubées à nouveau à température ambiante pendant 30 min. Après ce temps d'incubation, les cellules ont été lavées 3 fois par ajout de 100 µl de PBS pendant 5 min. Puis 50 µl du mélange (25µl de DAPI (1µg/mL) de *Molecular Probes (Life Technologies)* et 25 µl d'anticorps secondaire de chèvre anti-souris marqué au *Alexa floor* de *Jackson ImmunoResearch (West grove, PA, USA)* dilué au 1/500ième dans du sérum de chèvre 1%) ont été ajoutés. Les cellules ont été incubées à l'obscurité pendant 25 à 30 min,

puis lavées 3 fois au PBS. Les cellules au troisième lavage ont été laissées dans le tampon PBS et acheminées à la plateforme d'imagerie de l'institut des sciences de la vie, où la fluorescence a été quantifiée. Les images ont été prises dans chaque puits à l'aide d'un microscope à fluorescence automatisé *IN Cell Analyser 6000 (GE Healthcare Life Sciences)*, à l'objectif X 20 avec des paramètres d'exposition 405/450 nm et 561/610 nm. Six images ont été enregistrées par puits. Chaque image a été ensuite traitée à l'aide du logiciel d'analyse d'image *Columbus (Perkin Elmer)*.

#### **II.4. Analyses statistiques**

Les expériences ont été réalisées en double et les données exprimées sous forme de moyennes  $\pm$  écarts-types (ET). L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel *GraphPad prism 5.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA)*. Les comparaisons des moyennes ont été effectuées entre les groupes traités et les groupes non traités. Les différences entre les moyennes ont été comparées par l'analyse des variances à un facteur (ANOVA). Pour les groupes ayant présenté une différence significative entre les variances, les moyennes ont été comparées par le post-hoc test de Bonferroni. Le seuil de probabilité  $p < 0,05$  a été considéré comme statistiquement différent.

# **Chapitre III : Résultats et discussion**

## **Chapitre III : Résultats et discussion**

### **III.1. Résultats**

#### **III.1.1. Prévalence et caractéristiques des virus Dengue et Chikungunya dans cinq hôpitaux de districts du Centre**

La revue systématique menée en Afrique a montré que très peu d'études avaient été engagées afin de déterminer la prévalence réelle des virus Dengue et Chikungunya. Au Cameroun en particulier, les données y sont parcelaires et basées sur l'identification des anticorps IgG et IgM. Afin de combler ce gap et de déterminer la prévalence réelle de ces virus au Cameroun, nous avons investigué parmi les patients fébriles la fréquence de circulation des virus Dengue et Chikungunya dans cinq districts de santé en ciblant la présence du matériel génétique de ces virus par biologie moléculaire.

##### **III.1.1.1. Données démographiques des participants**

L'enquête effectuée dans les 5 hôpitaux a permis de recruter et d'inclure 527 participants parmi lesquels 56,7% étaient des femmes. L'âge médian des participants a été de 25 ans avec un intervalle interquartile de [7-42]. L'âge des participants a varié de 3 mois à 81 ans. La tranche d'âge la plus représentée était celle de moins de 20 ans (46,3%) tandis que, la moins représentée était celle de plus de 60 ans (7,2%). La population d'étude était en majorité sans emploi (63,4%), tandis que les fonctionnaires étaient les moins représentés (10,2%). La plupart des participants était des élèves (69,7%) et était majoritairement des élèves du secondaire (39,9%). Les participants étaient équitablement repartis entre les 5 hôpitaux de district, bien qu'avec une fréquence légèrement supérieure à Bafoussam (23%) et légèrement inférieure à Londji (16,9%) (Tableau IX).

##### **III.1.1.2. Niveau de connaissances des arbovirus par les participants**

Seulement 3% des personnes interrogées avaient déjà entendu parler des arbovirus. De même, de très faibles proportions des participants avaient des connaissances sur la dengue et le chikungunya, 1,1% et 0,9% respectivement comme le montre les résultats présentés dans le tableau X ci-dessous.

Tableau VII : Caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude

	<b>Paramètres</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
Sexe	Féminin	299/527	56,7
	Masculin	228/527	43,3
Age	<20	244/527	46,3
	[20-39[	177/527	33,6
	[40-59[	68/527	12,9
	>60	38/527	7,2
Profession	Sans emplois	334/527	63,4
	Informel	139/527	26,4
	Fonctionnaire	54/527	10,2
Niveau d'étude	Non scolarisé	111/527	21,1
	Primaire	160/527	30,4
	Secondaire	207/527	39,3
	Supérieur	49/527	9,2
Lieu de collecte	Bafoussam	121	23,0
	Douala	116	22,0
	Limbé	93	17,6
	Londji	89	16,9
	Mfou	108	20,5
	<b>Total</b>	<b>527</b>	<b>100,0</b>

Tableau VIII : Niveau de connaissances des arbovirus par les participants

	<b>Connaissance</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentages (%)</b>
Arbovirus	Non	511/527	97
	Oui	16/527	3
Chikungunya	Non	522/527	99,1
	Oui	5/527	0,9
Dengue	Non	521/527	98,9
	Oui	6/527	1,1
	<b>Total</b>	<b>527</b>	<b>100</b>



### III.1.1.3. Fréquences de détection du *Plasmodium* et des arbovirus

Les résultats de l'enquête montrent que le paludisme était la pathologie la plus fréquente avec 41,9% des participants qui présentaient un résultat positif au test de détection du *Plasmodium*, il est à noter qu'aucun cas n'a été détecté à Londji. Les infections aux virus du chikungunya et de la dengue étaient peu fréquentes dans la population d'étude, 0,6% (3/527) et 7% (37/527) respectivement (Tableau XI). Le virus de la dengue a été détecté à Mfou (14,8%), Limbé (13,5%) et Douala (9%) ; tandis que le virus Chikungunya a été détecté uniquement dans la ville de Mfou (2,8%).

**Tableau IX** : Fréquences de distribution des différents pathogènes

Hopitaux de district	Plasmodium	CHIKV	DENV
Bafoussam	<b>85/121 (70,2)</b>	0/121 (0)	0/121 (0)
Douala	23/116 (19,8)	0/116 (0)	9/116 (7)
Limbé	47/93 (50,5)	0/93 (0)	0/93 (0)
Londji	0/89 (0,0)	0/89 (0)	12/89 (13,5)
Mfou	66/108 (61,1)	<b>3/108 (2,8)</b>	<b>16/108 (14,8)</b>
Total	221/527 (41,9)	3/527 (0,6)	37/527 (7,0)

### III.1.1.4. Coinfections entre le plasmodium et les arbovirus détectés

Le tableau XII ci-dessous présente les données de coinfections entre le plasmodium et les arbovirus. Il ressort de ce tableau que parmi les personnes positives au virus de la Dengue, 34,4% étaient positifs au *Plasmodium*. Parmi les positifs au virus Chikungunya, 33,3% présentaient un test positif au *Plasmodium*.

**Tableau X** : Coinfections entre plasmodium et arbovirus

	Sérologie	DENV +	CHIKV+
<b>Plasmodium</b>	Négatif	25/37 (67,6%)	2/3 (66,7%)
	Positif	<b>12/37 (34,4%)</b>	<b>1/3 (33,3%)</b>
	Total	37/37 (100%)	3/37 (100%)

### III.1.1.5. Facteurs associés à l'infection par le virus Dengue

Le tableau XIII ci-dessous présente la relation entre les habitudes de la population et la séropositivité au virus de la Dengue. Il montre que l'utilisation de la moustiquaire, d'insecticides par les participants, ainsi que la présence de pneus et de pots de fleur autour de la maison des participants et les voyages n'étaient pas corrélés à la séropositivité au virus de la dengue. Par ailleurs, on a noté une corrélation entre la présence d'eau stagnante autour de la maison des participants et la séropositivité au virus de la dengue.

**Tableau XI :** Corrélations entre positivité à la dengue et habitudes de la population

	Paramètres	Négatif	Positif	p-value
Fréquences relatives				
Moustiquaire	Non	195/527	19/527	0,168
	Oui	295/527	18/527	
Insecticide	Non	341/527	27/527	0,666
	Oui	149/527	10/527	
Eau stagnante	Non	233/527	11/527	0,036*
	Oui	257/527	26/527	
Pneu	Non	389/527	28/527	0,592
	Oui	101/527	9/527	
Pot de fleurs	Non	336/527	21/527	0,138
	Oui	154/527	16/527	
Voyage	Non	329/527	26/527	0,693
	Oui	161/527	11/527	

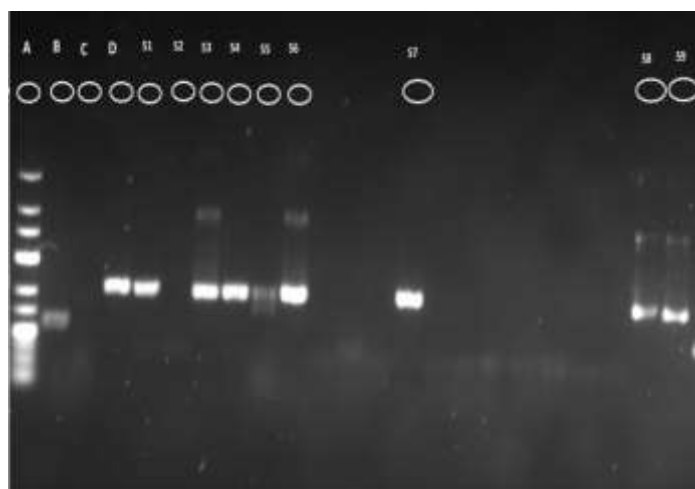
Pour ce qui est de la relation entre la séropositivité et les caractéristiques cliniques des participants, nos résultats montrent que seule la présence de la fièvre était corrélée à la présence du virus. Les autres signes cliniques présents chez les participants (douleur articulaires, douleurs musculaires, céphalées, vomissement et la présence d'éruptions cutanées) n'étaient pas associés à la séropositivité (Tableau XIV).

Tableau XII: Correlations entre positivité à la dengue et signes cliniques de la dengue

		Négatif	Positif	p-value
Fièvre	Non	117/527	17/527	<b>0,03</b>
	Oui	373/527	20/527	
Douleurs articulaires	Non	302/527	23/527	0,949
	Oui	188/527	14/527	
Douleurs musculaires	Non	403/527	28/527	0,318
	Oui	87/527	9/527	
Vomissements	Non	343/527	28/527	0,466
	Oui	147/527	9/527	
Céphalées	Non	289/527	25/527	0,305
	Oui	201/527	12/527	
Eruptions cutanées	Non	405/527	31/527	0,861
	Oui	85/527	6/527	

### III.1.1.6. Sérotypes et génotypes des cas virus provenant de Dengue

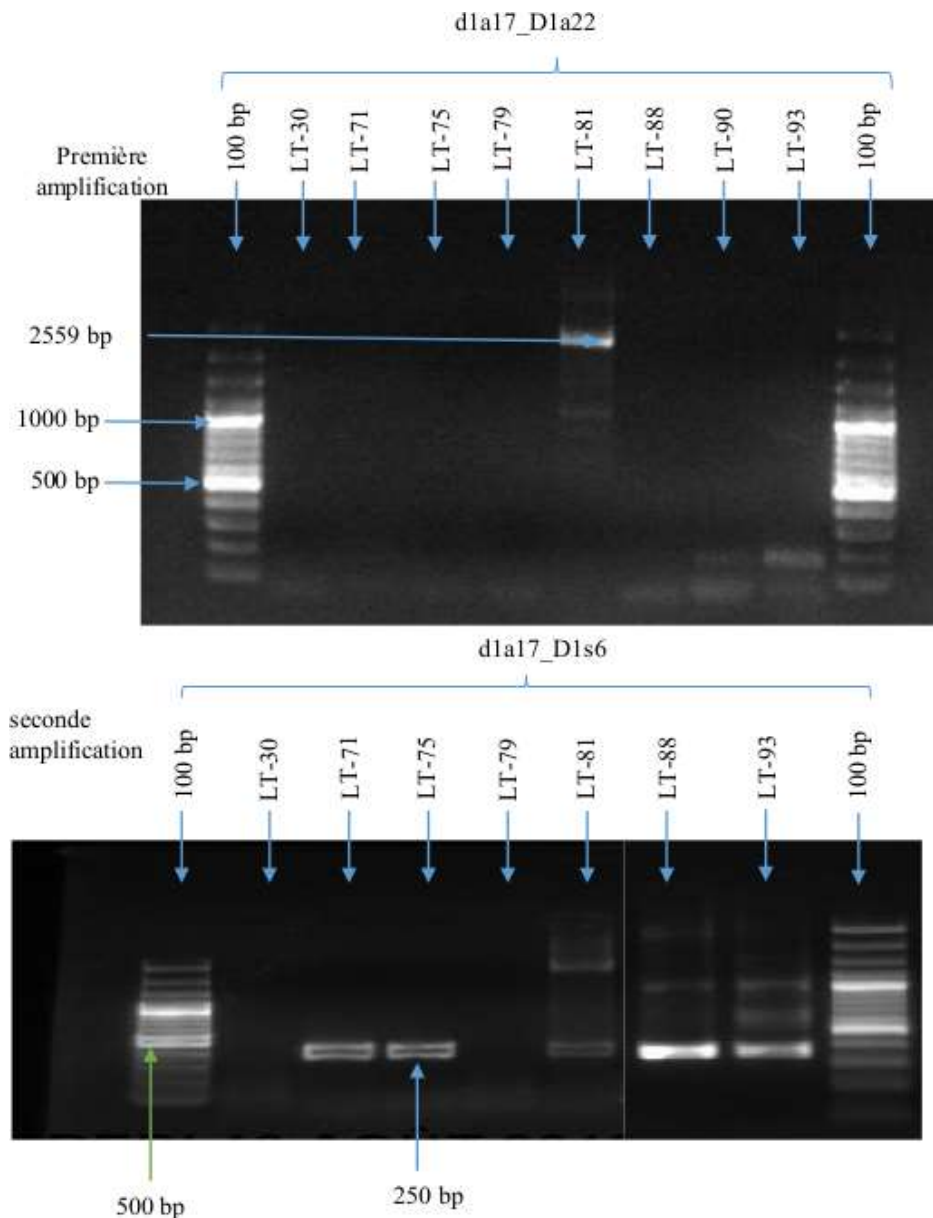
Les sérums des 37 cas positifs de virus provenant de dengue obtenus ont été sérotypés par amplification par PCR semi-nichée. Parmi ces échantillons, seuls 11/37 (29,72%) cas ont pu être sérotypés et les résultats montrent que ces cas de dengue appartiennent tous au sérotype 1 (**Figure 30**).



**Figure 29** : Gel de PCR sérotypage obtenu après électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%

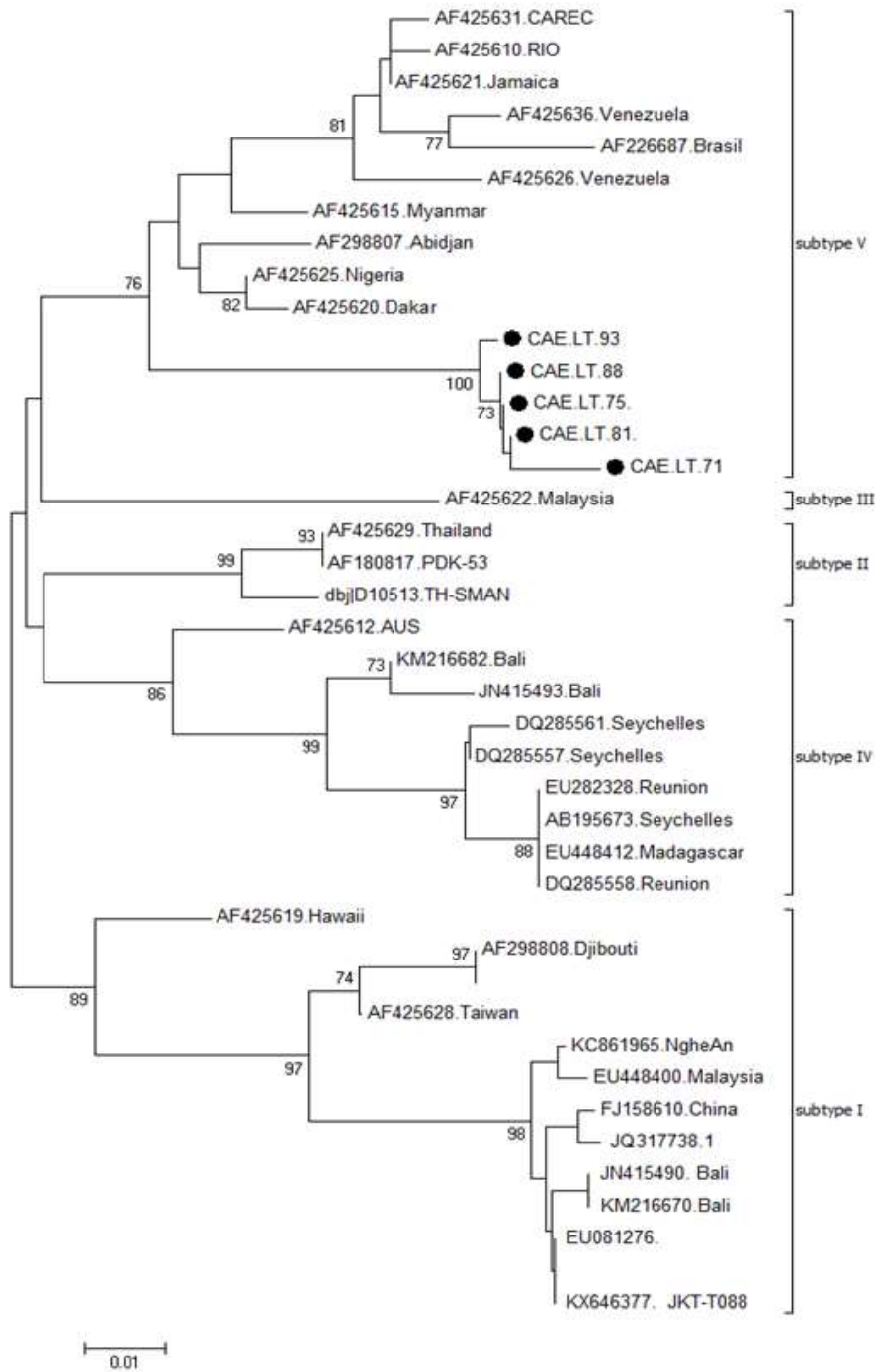
**Légende :** A = marqueur de poids moléculaire (100 pb) ; B = témoin positif Dengue 2 (119 pb) ; C = témoin négatif ; D = contrôle positif Dengue D 1 (208 pb) ; S1; S2; S3; S4; S5; S6; S7; S8; S9 = échantillons

Le génotypage a été effectué par amplification d'une portion du gène de l'enveloppe de ces cas positifs (Figure 31). Parmi ces échantillons, seuls 5/11 (45,45%) échantillons ont pu être génotypés et les résultats obtenus après construction de l'arbre phylogénétique montrent que tous ces cas positifs appartiennent au sous type V, qui forme un cluster avec les cas de dengue détectés pendant les épidémies liées à ce virus au Nigéria (**Figure 32**).



**Figure 30 :** Produit de PCR génotypage obtenu après migration sur le gel d'agarose 1,5%

**Légende :** LT : échantillons



**Figure 31:** Arbre phylogénétique des cas de dengue sérotype 1 isolés au Cameroun

**Légende :** CAE.LT : Cameroun Littoral

### **III.1.2. Propriétés anti-Chikungunya virus de quelques plantes de la pharmacopée Camerounaise**

#### **III.1.2.1. Plantes utilisées et rendements d'extraction**

A l'issue de l'enquête ethnobotanique menée auprès des tradi-praticiens, 42 plantes ont été identifiées (Cf annexe 1) parmi lesquelles 10 plantes communément utilisées par ces tradi-praticiens ont été sélectionnées pour la détermination des propriétés anti Chikungunya (Tableau XV). Les noms communs et systématiques de ces plantes et fractions ainsi que les rendements d'extraction sont recensés dans le tableau ci-dessous.

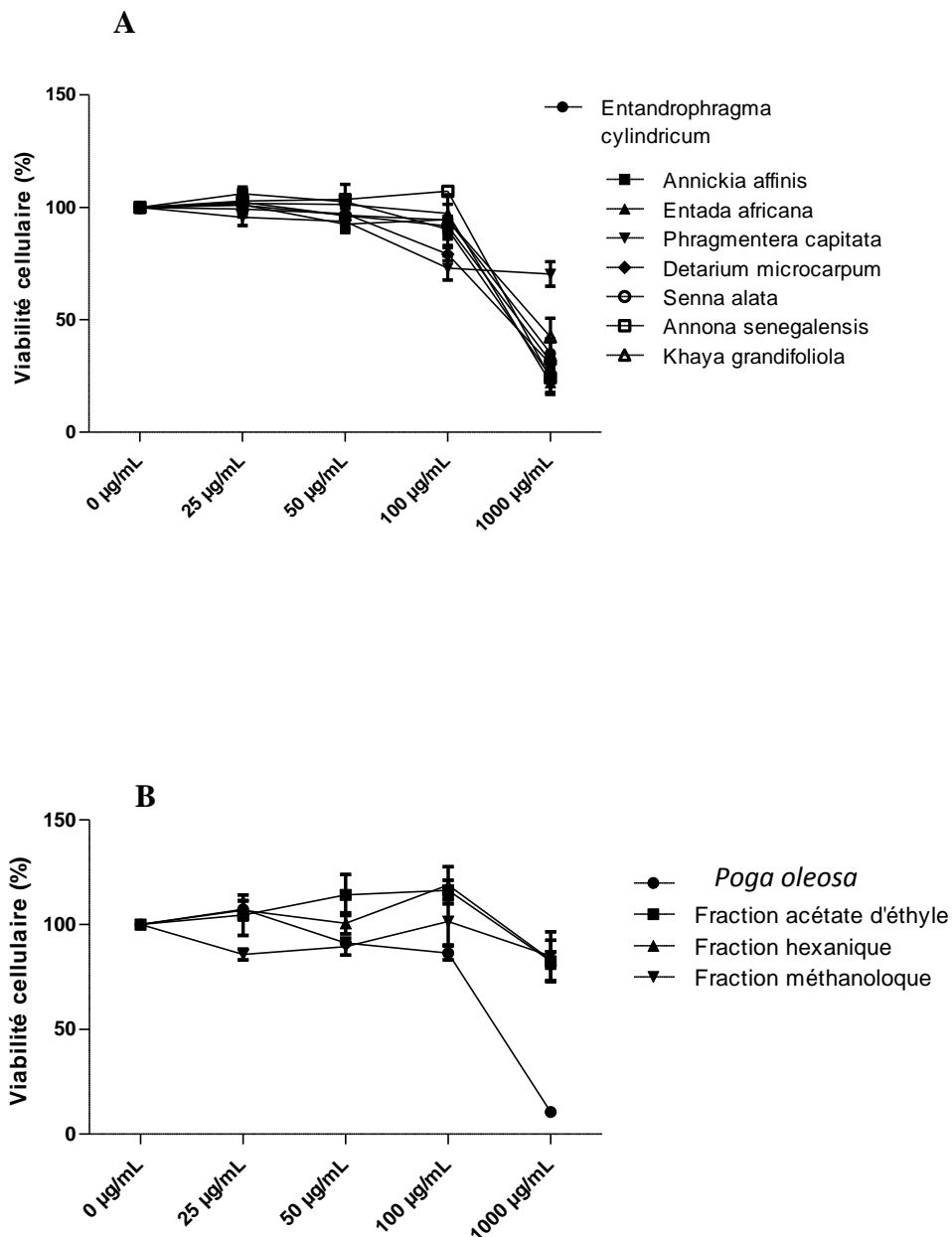
De ce tableau, il ressort que l'extrait brut d'*Entandrophragma cylindricum* présente le plus grand rendement d'extraction tandis que l'extrait brut de *Detarium microcarpum* présente le plus faible rendement d'extraction. Le fractionnement de l'extrait brut de *Poga oleosa* montre que les trois fractions obtenues ont des rendements d'extraction de 2,77% (hexanique) ; 0,32% (acétate d'éthyle) et 3,57% (méthanolique).

#### **III.1.2.2. Cytotoxicité des extraits bruts et fractions de plantes sur les cellules VERO**

Avant d'effectuer le criblage des propriétés anti-Chikungunya des extraits bruts et fractions de plantes, les effets cytotoxiques de ces derniers ont été déterminés en incubant les cellules VERO pendant 16h en présence des extraits bruts et fractions à différentes concentrations. L'observation des résultats du test de viabilité au MTT (**Figure 33**) montre que pour les extraits bruts, il n'y'a pas de différence significative sur la viabilité cellulaire jusqu'à la concentration de 200 µg/mL par ailleurs, on note une baisse de la viabilité cellulaire de plus de 50% au-delà de cette concentration.

**Tableau XIII :** Plantes et rendement d'extractions

<b>Noms scientifiques</b>	<b>Familles</b>	<b>Numéros d'identification</b>	<b>Rendements (%)</b>	<b>Codes</b>
<i>Entandrophragma cylindricum</i> (Sprague)	Meliaceae	29030/SRF/CAM	4,29	EI
<i>Detarium microcarpum</i>	Caesalpinaceae	498334/SFR/CAM	0,61	E13
<i>Poga oléosa</i>	Anillophyllaceae	6182/SRF/CAM	1,02	EIII
<i>Annickia affinis</i> (Exell) Versteegh and Sosef	Annonaceae	25236/SRF/CAM	3,27	EII
<i>Khaya grandifoliola</i> C.D.C.	Meliaceae	52661/HNC	1,84	E2
<i>Phragmentera capitata</i> (Spreng) Balle	Loranthaceae	24667/HNC	2,45	E12
<i>Entada africana</i> Guill et Pers.	Mimosaceae	2334/HNC	1,22	E4
<i>Macaranga hurifolia</i> Beille	Euphorbiaceae			E6
<i>Senna alata</i> (Lin.) link.	Cesalpilaceae	11002/HNC	1,22	S23
<i>Annona muricata</i> L.	Annonaceae	32879/HNC	1,84	E29



**Figure 32 :** Viabilité cellulaire dans le milieu d'incubation des VERO (A) en présence des différents extraits de plantes et (B) de l'extrait brut de *Poga oleosa* ainsi que ces 3 fractions.

**Légende :** Les cellules ont été incubées en présence des extraits de plante pendant 16h. Ensuite, la viabilité cellulaire a été déterminée par le test de MTT.

### III.1.2.3. Effet des extraits bruts et fractions sur la multiplication du virus Chikungunya

L'incubation des cellules VERO en présence du virus Chikungunya prototype S27, MOI 0,2 pendant 90 min puis avec le milieu de culture sans extraits de plantes entraîne une



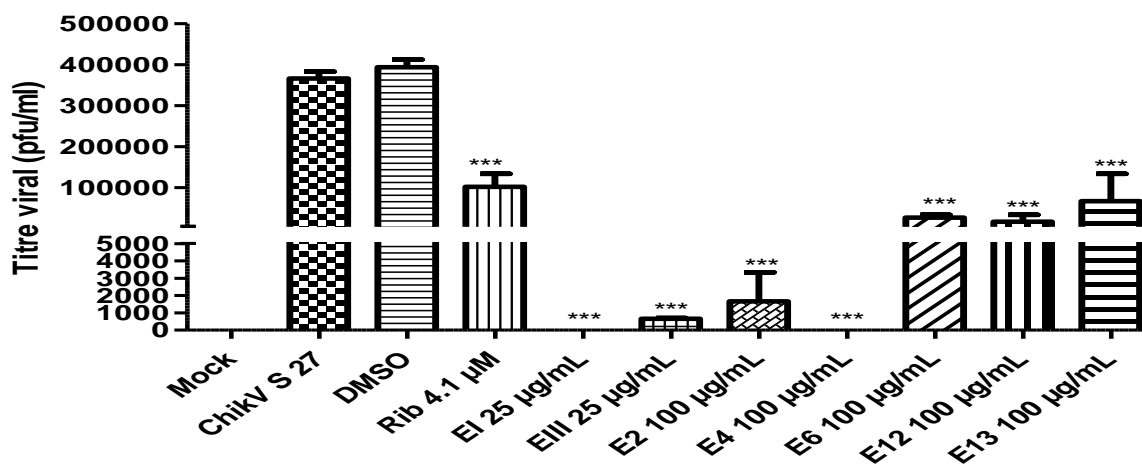
augmentation significative ( $p < 0,05$ ) du titre viral dans le surnageant cellulaire (figure 34) dans le milieu d'incubation. L'ajout des différents extraits bruts et fractions (Figure 35) de plantes entraîne une baisse significative de la multiplication virale.

Il ressort de ces figures que la plupart des extraits bruts de plantes ont inhibé la multiplication virale. Ainsi, les extraits bruts d'*Entandrophragma cylindricum*, *Poga oleosa* et *Macaranga hurifolia* ont inhibé significativement la multiplication virale avec des pourcentages d'inhibition supérieurs à 80% aux concentrations finales de 25  $\mu\text{g/mL}$ . Les autres extraits de plantes ont présenté une activité inhibitrice à la concentration finale de 100  $\mu\text{g/mL}$ . La fraction à l'acétate d'éthyle de *Poga oleosa* a inhibé significativement la multiplication du virus avec un pourcentage d'inhibition de 100% à 25 $\mu\text{g/mL}$ .

#### III.1.2.4. Effet des extraits bruts et fractions actives sur les étapes clé du cycle de réplication du virus Chikungunya

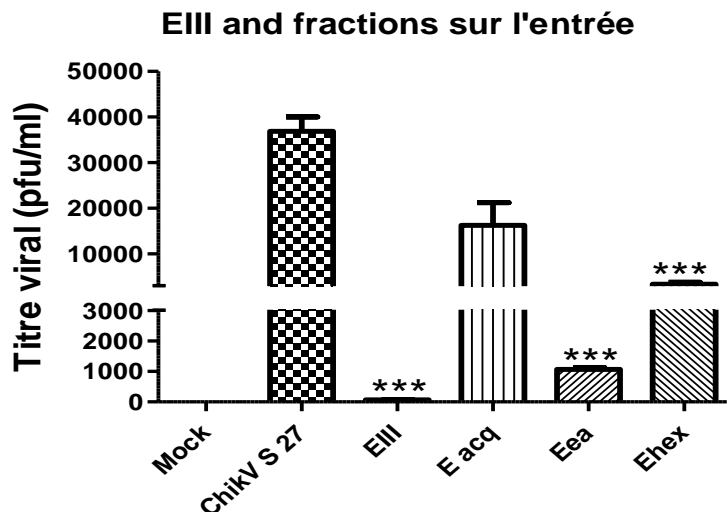
##### III.1.2.4.1. Effet sur l'entrée du virus sur l'infection de la cellule VERO

L'effet des extraits bruts et fractions de plantes sur l'entrée du virus Chikungunya a été déterminé sur un système de cultures cellulaires couplé à une détermination du titre viral par le test de neutralisation sur plaque. En effet le virus Chikungunya prototype S27 a été utilisé pour infecter les cellules VERO et en présence des différents extraits. Après 90 min, les cellules ont été lavées et incubées pendant une période de 16h post infection sans virus ni extrait de plante. Le titre viral a été évalué dans le milieu de culture issu de la culture. Les figures 36 et 37 ci-dessous présentent les différents résultats de l'effet des extraits de plantes et fractions sur l'entrée du virus Chikungunya.



**Figure 33:** Titre viral des incubations des cellules Vero 90 min en présence du virus CHIK-S27 et des extraits de plante.

**Légende :** E1, *Entandrophragma cylindricum* ; EII, *Annickia affinis* ; EIII, *Poga oleosa* ; E2, *Khaya grandifoliola*, E4, *Entada africana* ; E6, *Macaranga hurifolia* ; E12, *Phragmenthera capitata* ; E13, *Detarium microcarpum*. Rib, Ribavirine + infection ; Chik V, Chikungunya Virus ; Mock, DMSO sans infection ; \*: valeur significativement différente du témoin positif (CHIK+DMSO) \*\*\* $p < 0,001$ .



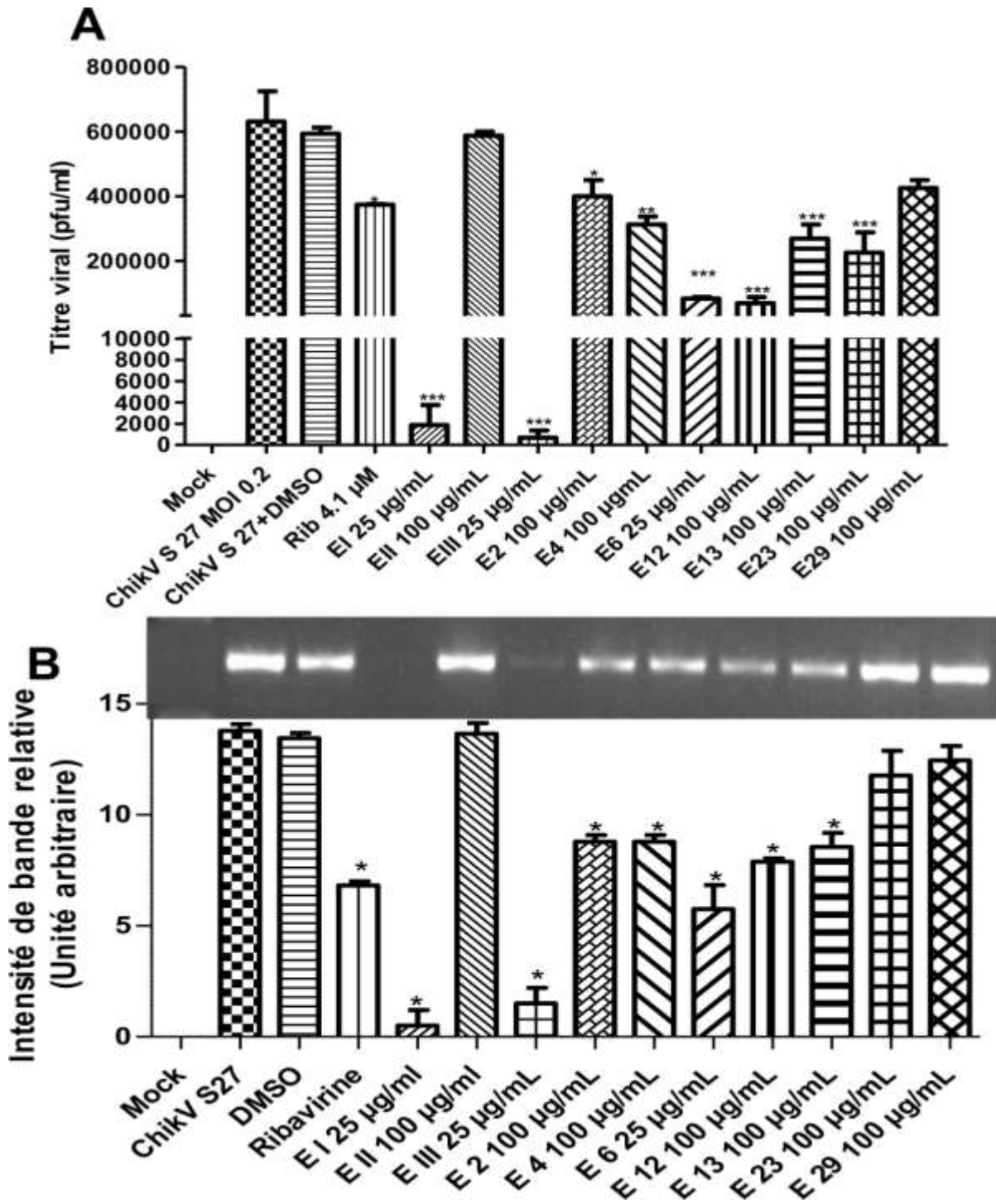
**Figure 34:** Titre viral des incubations de cellules Vero 90 min en présence du virus CHIK-S27 et des fractions de *Poga oleosa*.

**Légende :** \*\*\*: valeur significativement différente du témoin positif (CHIK+DMSO) \*\*\* $p < 0,001$ .  
Légende : EIII : *Poga oleosa* ; Eac: fraction méthanolique ; Eea fraction acétate d'éthyle; Ehex: fraction hexanique ; Eacq : Fraction à l'acétate d'éthyle de *Poga oléosa*.

L'analyse de ces figures montre que les bruts de *Entandrophragma cylindricum*, *Poga oleosa* (à 25 $\mu$ g/mL), *Khaya grandifoliola*, et *Entanda africana* (100  $\mu$ g/mL) inhibent significativement l'entrée du virus Chikungunya avec des pourcentages d'inhibition supérieurs à 80% autant que la Ribavirine (4,1  $\mu$ M) utilisé comme contrôle positif. Deux des trois fractions de l'extrait brut de *Poga oleosa* ont aussi inhibé de manière significative l'entrée ( $p < 0,001$ ) (figure 37): la fraction à l'acétate d'éthyle (ayant le plus grand pourcentage d'inhibition) et la fraction hexanique.

#### III.1.2.4.2. Effet sur la réplication du virus dans la cellule VERO

Pour déterminer l'effet des extraits bruts et fractions sur la réplication virale, les cellules ont été infectées avec le virus Chikungunya S27 pendant 90 min puis traitées avec les différents extraits et fractions de plantes pendant 16h supplémentaires. Par la suite le titre viral a été déterminé par le test de neutralisation. Les résultats de ces analyses sont rapportés dans les figures 38 et 39 ci-dessous.

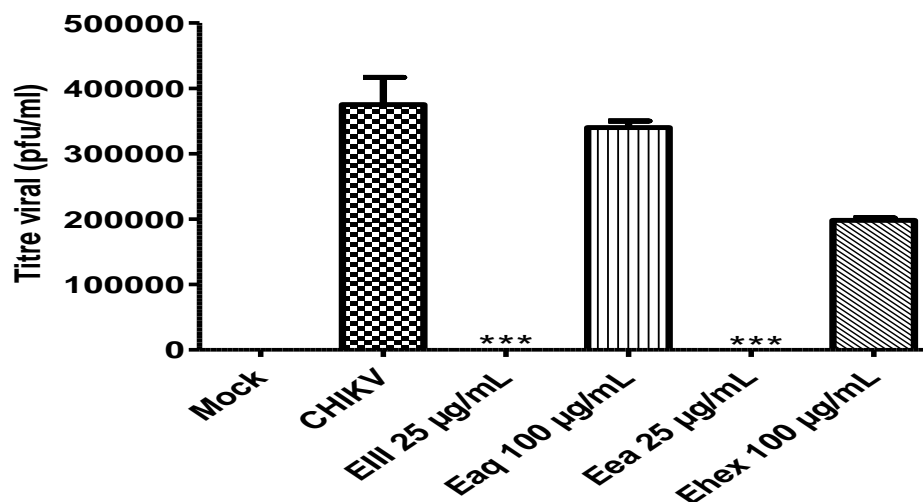


**Figure 35 A:** Titre viral de l'incubation des cellules Vero avec le CHIKV-S27 90min puis 16h après ajout des extraits de plantes.

**Figure 38 B:** Intensité de bandes obtenues après l'incubation des cellules Vero avec le CHIKV-S27 90min puis 16h après ajout des extraits de plantes

**Légende :** EI : *Entandrophragma cylindricum* ; EII : *Annickia affinis* ; EIII : *Poga oleosa* ; E2 : *Khaya grandifoliola*, E4 : *Entada africana*; E6 : *Macaranga hurifolia*; E12 : *Phragmenthera capitata*;

E13 : *Detarium microcarpum*. \*: valeur significativement différente du témoin positif (CHIK+DMSO)  
\* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$



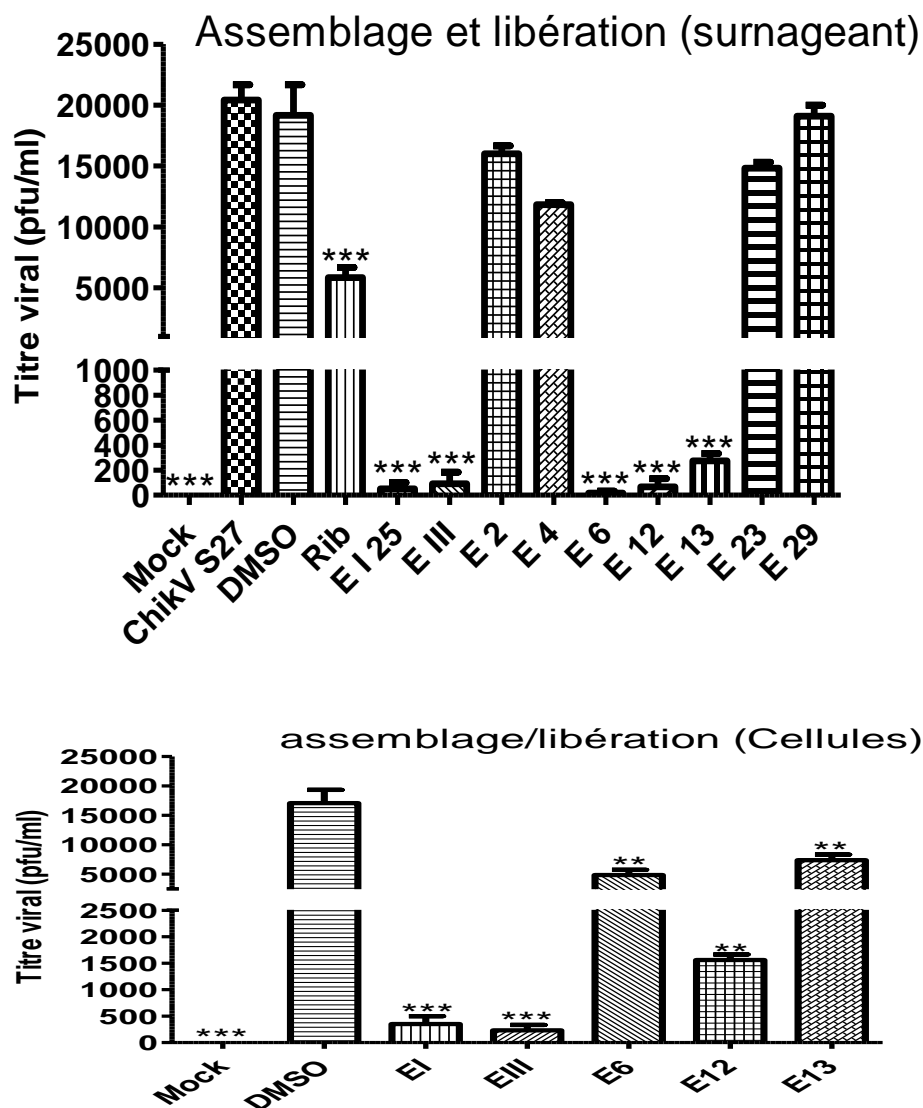
**Figure 36:** Titre viral obtenus après incubation des cellules Vero 90 en présence du CHIKV-S27 et 16h en présence des fractions de *Poga oleosa*

Légende : \*: valeur significativement différente du témoin positif (CHIK+DMSO) \*\*\* $p < 0,001$ .  
Légende : EIII : *Poga oleosa* ; Eaq : fraction méthanolique ; Eea : fraction acétate d'éthyle ; Ehex : fraction hexanique.

Les résultats obtenus sur ces figures démontrent que les extraits bruts de *Entandrophragma cylindricum*, *Poga oleosa* et *Macaranga hurifolia* inhibent significativement ( $p < 0,05$ ) la réplication virale à une concentration finale de 25µg/mL et que les pourcentages d'inhibition sont supérieurs à celui du composé de référence qui est la Ribavirine (4,1 µM). Par ailleurs, seule la fraction à l'acétate d'éthyle de *Poga oleosa* a montré une inhibition significative ( $p < 0,05$ ) de la réplication virale.

#### III.1.2.4.3. Effet sur l'assemblage et libération des particules virales dans les cellules VERO

Afin d'étudier l'effet des extraits et fractions actives sur l'étape d'assemblage/libération des particules virales, les surnageants et cellules Vero issus de l'effet sur la réplication virale ont été collectés et utilisés pour infecter à nouveau les cellules. Puis après 90 min d'incubation, les cellules Vero infectées ont été lavées et un nouveau milieu dépourvu de virus et d'extraits de plantes a été introduit. Les résultats sont rapportés dans la figure 40 ci-dessous.



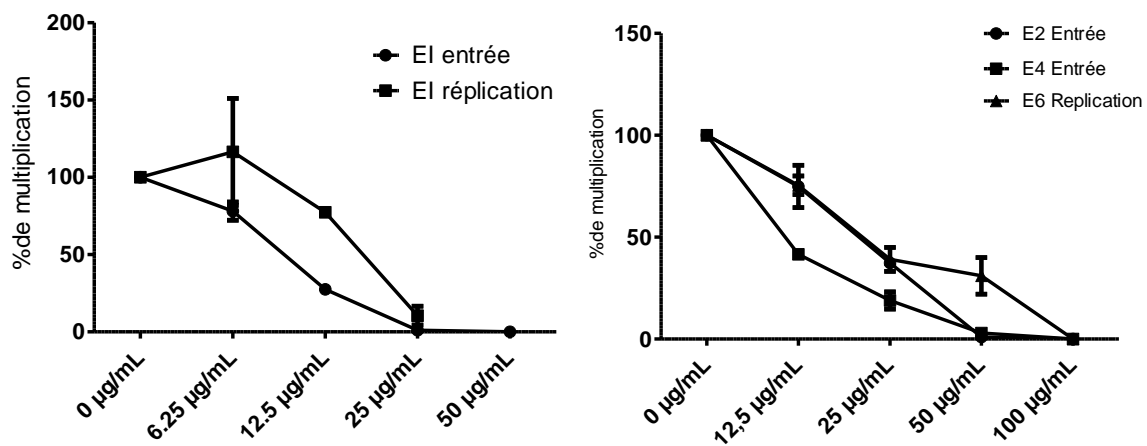
**Figure 37 :** Titre viral des incubations des cellules Vero en présence des surnageants de culture des cellules Vero infectées 16h en présence des plantes

**Légende :** E1 : *Entandrophragma cylindricum* ; E11 : *Annickia affinis* ; E111 : *Poga oleosa* ; E2 : *Khaya grandifoliola* ; E4 : *Entanda africana* ; E6 : *Macaranga hurifolia* ; E12 : *Phragmenthera capitata* ; E13 : *Detarium microcarpum*. \* : valeur significativement différente du témoin positif (CHIK+DMSO). \*\* $p < 0,1$  ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Il ressort de ces figures que les extraits bruts de *Entandrophragma cylindricum*, *Poga oleosa*, *Macaranga hurifolia*, *Phragmenthera capitata*, et *Detarium microcarpum* inhibent significativement ( $p < 0,05$ ) l'assemblage et libération des particules virales dans le milieu extra cellulaire, tandis que dans le milieu intracellulaire, seuls les groupes traités avec les extraits *Entandrophragma cylindricum* et *Poga oleosa* ont noté une baisse significative du titre viral intracellulaire.

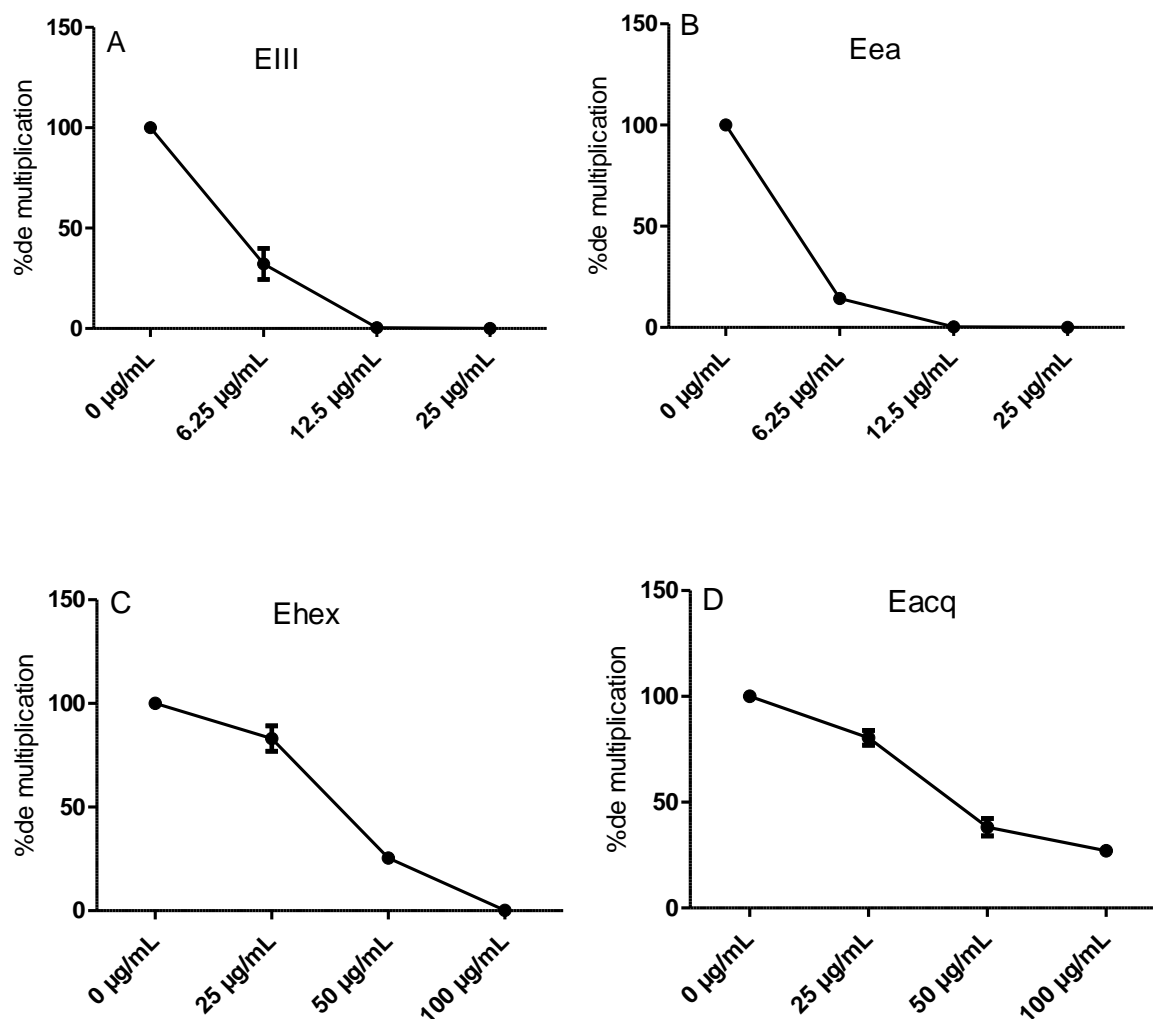
### III.1.2.5. Activité dose réponse des extraits actifs sur le cycle de réplication du virus Chikungunya

L'activité dose/réponse des extraits et fractions de plantes a été déterminée en traitant les cellules VERO infectées avec différentes concentrations d'extraits et fractions de plantes, suivi d'une incubation de 16h au-delà de laquelle le titre viral a été déterminé par le test de neutralisation. Les figures 41 et 42 présentent les résultats de l'activité dose/réponse des différents extraits et fractions respectivement durant les étapes d'inhibition de l'entrée et de la réplication.



**Figure 38 :** Pourcentage de multiplication des virus sur l'entrée en présence de différentes doses d'extrait et fraction de plante.

**Légende :** EI : *Entandrophragma cylindricum* ; E2 : *Khaya grandifoliola*, E4 : *Entanda africana* ; E6 : *Macaranga hurifolia*



**Figure 39 :** Pourcentage de multiplication des virus sur l'entrée et la réplication en présence de différentes doses d'extrait et fraction de plante.

**Légende :** **A :** extrait brut de *Poga oleosa* ; **B :** fraction acétate d'éthyle ; **C :** fraction hexanique ; **D :** Fraction methanolique.

Il ressort de l'analyse de cette figure que les extraits bruts de *Macaranga hurifolia*, *Khaya grandifoliola*, *Entanda africana* et *Entandrophragma cylindricum* inhibent significativement ( $p < 0,05$ ) et de manière dose-dépendante l'entrée et ou la réplication du virus comparativement au groupe non traité (0 µg/mL). De plus, à ces concentrations, les extraits bruts n'ont démontré aucune altération de la viabilité cellulaire. Ces données nous ont permis d'obtenir les concentrations inhibitrices 50 (CI<sub>50</sub>) de 26,99 µg/mL, 12,81 µg/mL, 8,14 µg/mL, 8,29 µg/mL, 18,37 µg/mL respectivement pour *Macaranga hurifolia* (réplication), *Khaya grandifoliola* (entrée), *Entanda africana* (entrée) et *Entandrophragma cylindricum* (entrée et réplication) respectivement. L'activité dose-réponse des fractions de *Poga oleosa* montre une inhibition significative et dose dépendante pour chacune des trois fractions avec

des  $CI_{50}$  de 3,98  $\mu\text{g/mL}$ , 20,99  $\mu\text{g/mL}$ , 0,54  $\mu\text{g/mL}$ , et 40,05  $\mu\text{g/mL}$  respectivement pour l'extrait brut de *Poga oleosa*, la fraction hexanique, à l'acétate d'éthyle et au méthanol de cette même plante. Les indices de sélectivité des extraits bruts et fractions actives sont regroupés dans le tableau XVI ci-dessous.

**Tableau XIV** : Indice de sélectivité des extraits brut et fractions actives

	<b>CE<sub>50</sub> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>CI<sub>50</sub> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>IS (CE<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>)</b>
EI entrée	563,82	8,29	30,69
EI réplication		18,37	68,01
E2 entrée	586,33	12,81	45,77
E4 entrée	395,81	8,14	48,62
E6 réplication	1000	26,99	37,05
EIII réplication	259,84	3,98	65,28
Eea réplication	>1000	0,54	>1851,85
Ehex réplication	>1000	20,99	47,64
Eacq réplication	>1000	40,05	24,96

**Légende** : EI : *Entandrophragma cylindricum* ; E2 : *Khaya grandifoliola*, E4 : *Entanda africana* ; E6 : *Macaranga hurifolia* ; EIII : *Poga oleosa*, Eea : fraction acétate d'éthyle ; Ehex : fraction hexanique ; Eacq : Fraction méthanolique. CE<sub>50</sub> : Concentration Efficace 50 ; CI<sub>50</sub> : Concentration Inhibitrice 50 ; IS : Indice de Sélectivité.

Il ressort de l'analyse de ce tableau que les indices de sélectivité variaient entre 30 et >1800 et que la fraction à l'acétate d'éthyle de *Poga oleosa* présente le meilleur indice de sélectivité ainsi que la plus forte CE<sub>50</sub>.

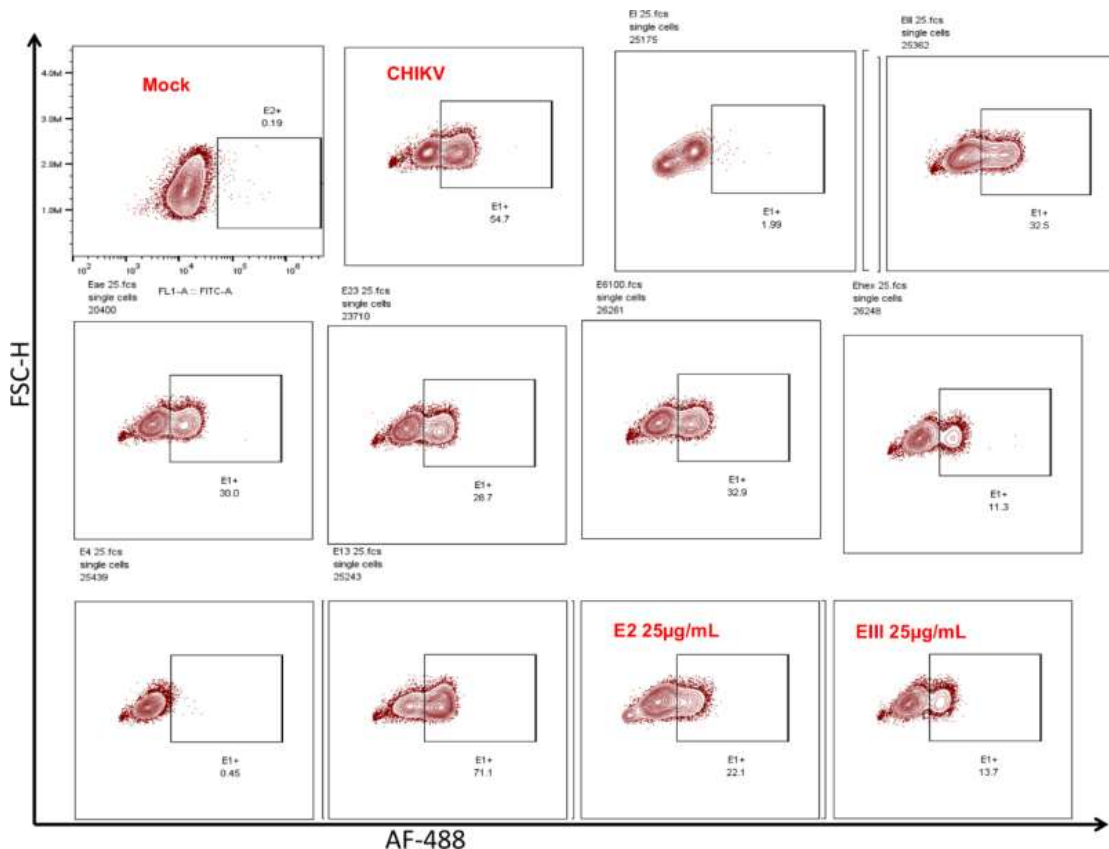
### **III.1.2.6. Effet des extraits et fractions de plantes actives sur l'expression des gènes et protéines nsP2 et E2**

Les molécules antivirales qui agissent sur l'étape de réplication du virus Chikungunya notamment en inhibant la synthèse de ces protéines structurales et ou non structurale reste les meilleures pour combattre cette pathologie.



### III.1.2.6.1. Inhibition de l'entrée par les extraits EI, E2 et E4 par diminution de l'expression de gènes codants pour les protéine virale nsP2 et E2

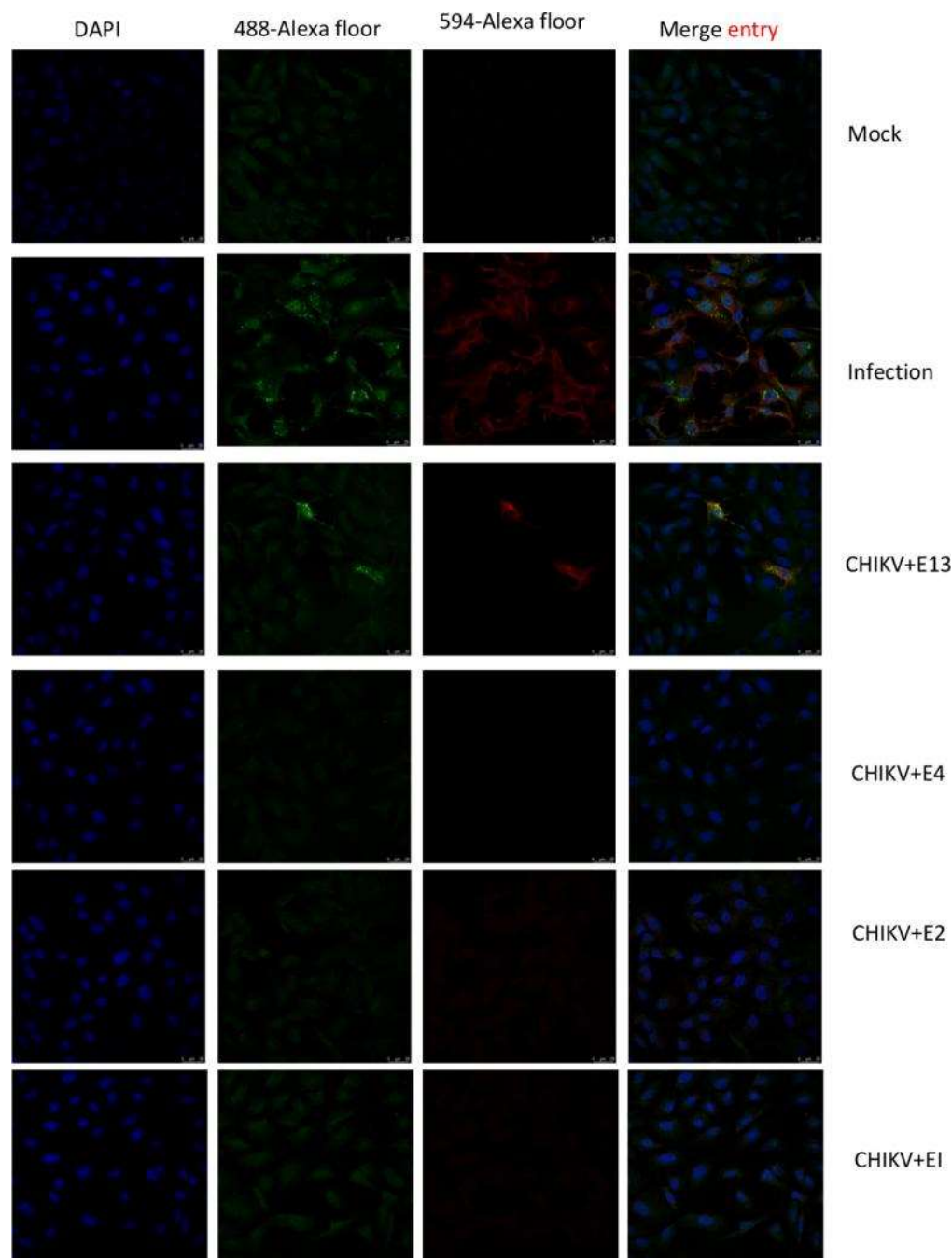
L'entrée du virus Chikungunya dans la cellule hôte se fait par liaison des protéines E2, qui donne un hétérodimère avec la protéine E1 (E1/E2) du virus sur le récepteur spécifique situé à la surface de la cellule hôte. Pour déterminer l'effet inhibiteur des extraits bruts de plante sur l'entrée virale, l'expression des protéines E2 et nsP2 a été évalué par microscopie, cytométrie en flux, western blot et RT-qPCR 16h post infection et traitement des cellules avec ces extraits de plantes. Les résultats de la cytométrie en flux montrent que 16h après incubation, seuls les extraits bruts de *Entandrophragma cylindricum* et *Entanda africana* présentent les meilleures propriétés inhibitrices de la traduction des protéines virales E1 et nsP2 (**Figure 43**). Les autres extraits de plantes ont présenté des activités faibles ou modérées à la concentration testée.



**Figure 40** : Effet des extraits bruts de plante pendant la phase d'entrée sur l'expression des gènes codants pour la protéine nsP2 par visualisation par les colorants en cytométrie de flux.

**Légende** : EI, *Entandrophragma cylindricum* ; EII : *Annickia affinis* ; EIII : *Poga oleosa* ; E2 : *Khaya grandifoliola*, E4 : *Entanda africana* ; E6 : *Macaranga hurifolia* ; E12 : *Phragmenthera capitata* ; E13 : *Detarium microcarpum* ; E23 : *Senna alata* ; E25 : *Annona senegalsis*.

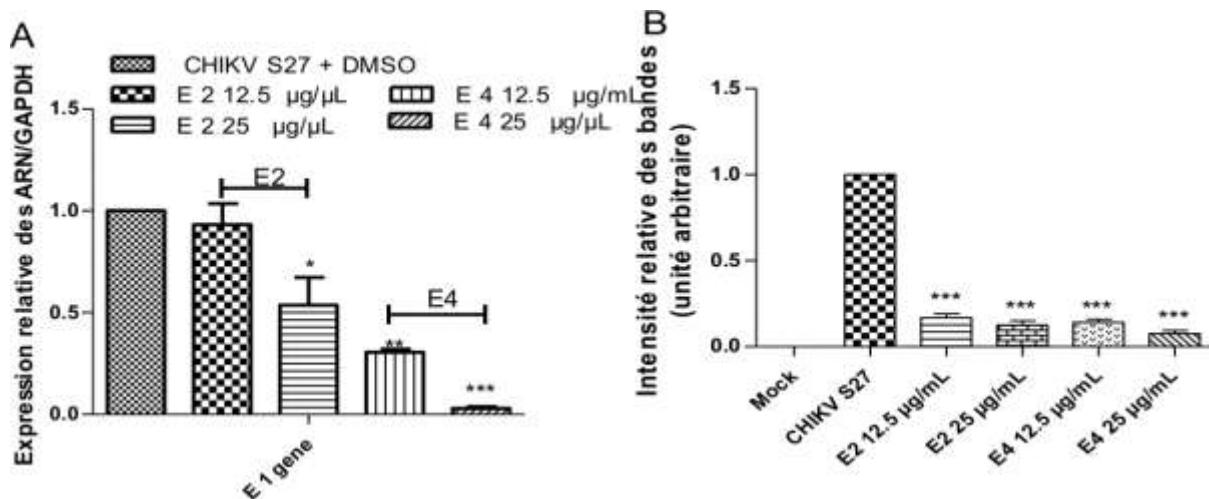
Ainsi à partir de la figure ci-dessus les extraits bruts ayant inhibé l'entrée du virus dans la cellule ont été sélectionnés et leur effet a été confirmé par coloration DAPI. La figure 44 ci-dessous présente les résultats de la coloration DAPI. Les résultats de la microscopie montrent que 16h post infection, le pourcentage de cellules exprimant les gènes viraux nsp2 et E2 à diminué de plus de 80% comparativement au groupe non traité.



**Figure 41** : Analyse de l'effet des extraits bruts sur la phase d'entrée virale sur les protéines E1 et nsp2 par microscopie à fluorescence

**Légende :** E1 : *Entandrophragma cylindricum* ; E2 : *Khaya grandifoliola* ; E4 : *Entanda africana* ; E13 : *Detarium microcarpum*. Les images confocales fluorescentes ont été prises à raison de 4 par traitement. Ici nous n'avons présenté qu'une par échantillon. Les noyaux marqués au DAPI indiquent le nombre total de cellules viables dans le champ et la fluorescence verte indique la présence de E1, et la fluorescence rouge indique la présence du gène viral nsP2 dans les cellules infectées.

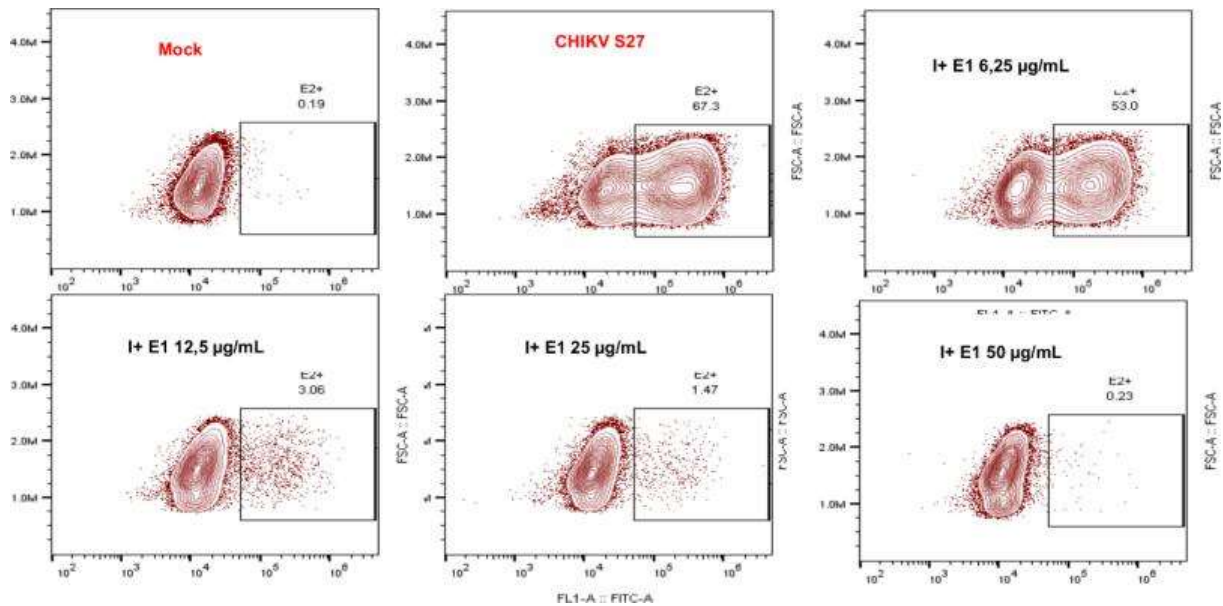
Il ressort de cette figure que les extraits bruts d'*Entandrophragma cylindricum*, *Khaya grandifoliola*, *Entanda africana* et *Detarium microcarpum* inhibent la phase d'entrée du virus comparativement au groupe témoin positif dans lequel la présence du virus est visible. Ainsi donc pour vérifier cette inhibition, l'analyse de l'expression du gène E1 à l'intérieur des cellules VERO a été effectué par Western blot et RT-qPCR (figure 45).



**Figure 42 :** Inhibition de l'expression des gènes codants pour la protéine E1 par les extraits de *Khaya grandifoliola* et d'*Entanda africana* administrés sur la phase d'entrée.

**Légende :** E2 : *Khaya grandifoliola*, E4 : *Entanda Africana* \*P<0,5 ; \*\*, P<0,01 et \*\*\*, P<0,001 : Extrait et Contrôle vs CHIKV infection.

A partir de la figure ci-dessous nous pouvons noter une diminution significative ( $p<0,05$ ) de l'expression relative du gène E1 suggérant que les extraits bruts de *Khaya grandifoliola* et *Entanda africana* inhibent la multiplication virale en inhibant la synthèse des protéines virales. Par ailleurs l'effet dose réponse d'*Entandrophragma cylindricum* a été déterminé par cytométrie en flux (Figure 46). Il ressort de cette figure que l'incubation du virus Chikungunya avec les cellules sans extraits bruts conduit à une hyper-expression du gène viral nsP2 dans la cellule Vero. Puis l'ajout de l'extrait brut d'*Entandrophragma cylindricum* à des concentrations croissantes entraînent une diminution de l'expression intracellulaire de la protéine virale nsP2 qui tend à s'annuler à la concentration de 50 µg/mL.

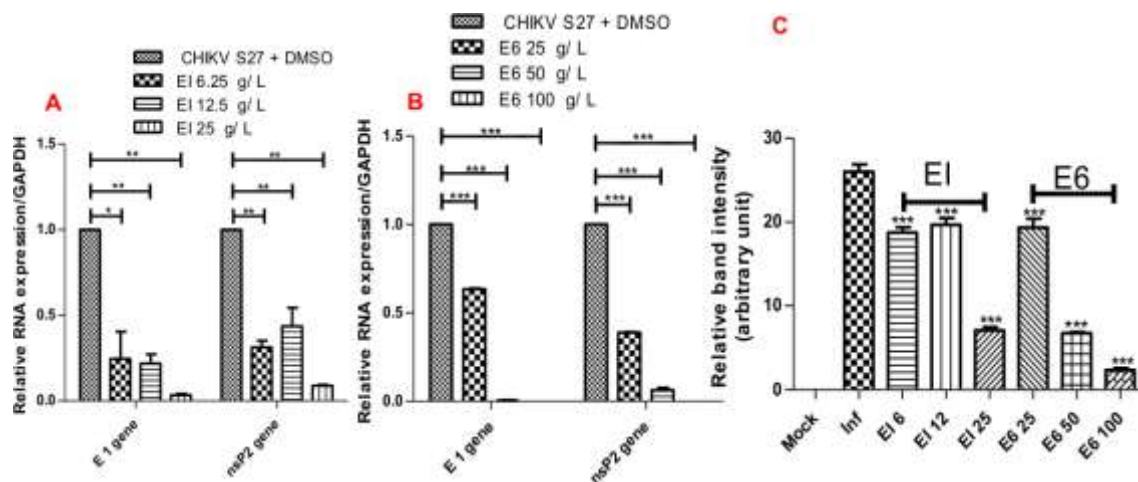


**Figure 43 :** Analyse de la capacité d'*Entandrophragma cylindricum* à inhiber l'expression des gènes codants pour la protéine virale nsP2 dans la cellule par cytométrie en flux

### III.1.2.6.2. Inhibition de la réplication par les extraits et fractions de plantes actives par diminution de l'expression des gènes codants pour les protéines virales nsP2 et E1

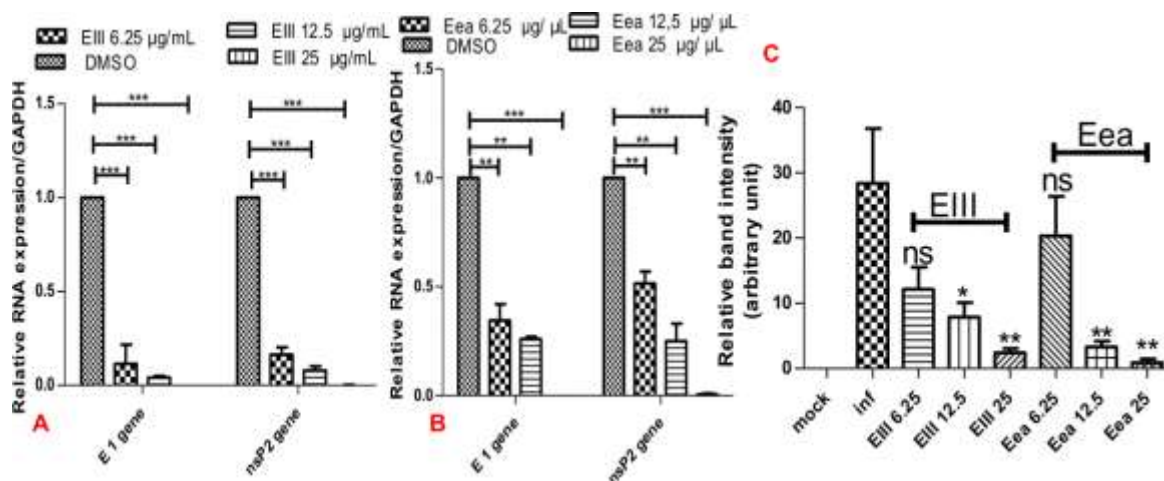
Il a été démontré que l'inhibition de ces deux protéines est directement proportionnelle au taux de réplication virale. Pour avoir une idée du mécanisme par lequel les extraits bruts de plantes et surtout la fraction à l'acétate d'éthyle de *Poga oleosa* inhibent la réplication virale, nous avons étudié leur effet sur l'expression de ces deux protéines.

La protéine nsP2 joue plusieurs rôles dans le cycle de multiplication du virus Chikungunya. Elle a une activité méthyltransférase, guanylyltransférase coiffe l'ARN viral, elle joue aussi le rôle de protéase C-terminal responsable de la coupure des protéines non structurales. Elle aide à la synthèse de l'ARN brin négatif dans la transcription permet la synthèse des protéines structurales. Tandis que la protéine structurale E1 joue un rôle important dans la fixation du virus au récepteur cellulaire et l'attachement à la cellule hôte (Silva & Dermody, 2017). Les résultats de la RT-qPCR et du *Western blot* (Figure 47 et 48) présentent l'effet de ces extraits bruts et fractions de plantes actives sur l'expression de ces deux protéines.



**Figure 44:** Inhibition concentration dépendante de la traduction des protéines nsP2 et de E1 durant la phase de répllication virale par l'extrait de EI et E6 **A, B :** qRT-PCR; **C:** Western blot.

**Légende :** \*: valeur significativement différente du témoin positif (CHIKV+DMSO)  $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ ;  $***p<0,001$ . EI : *Entandrophragma cylindricum* ; E6 : *Macaranga hurifolia*.

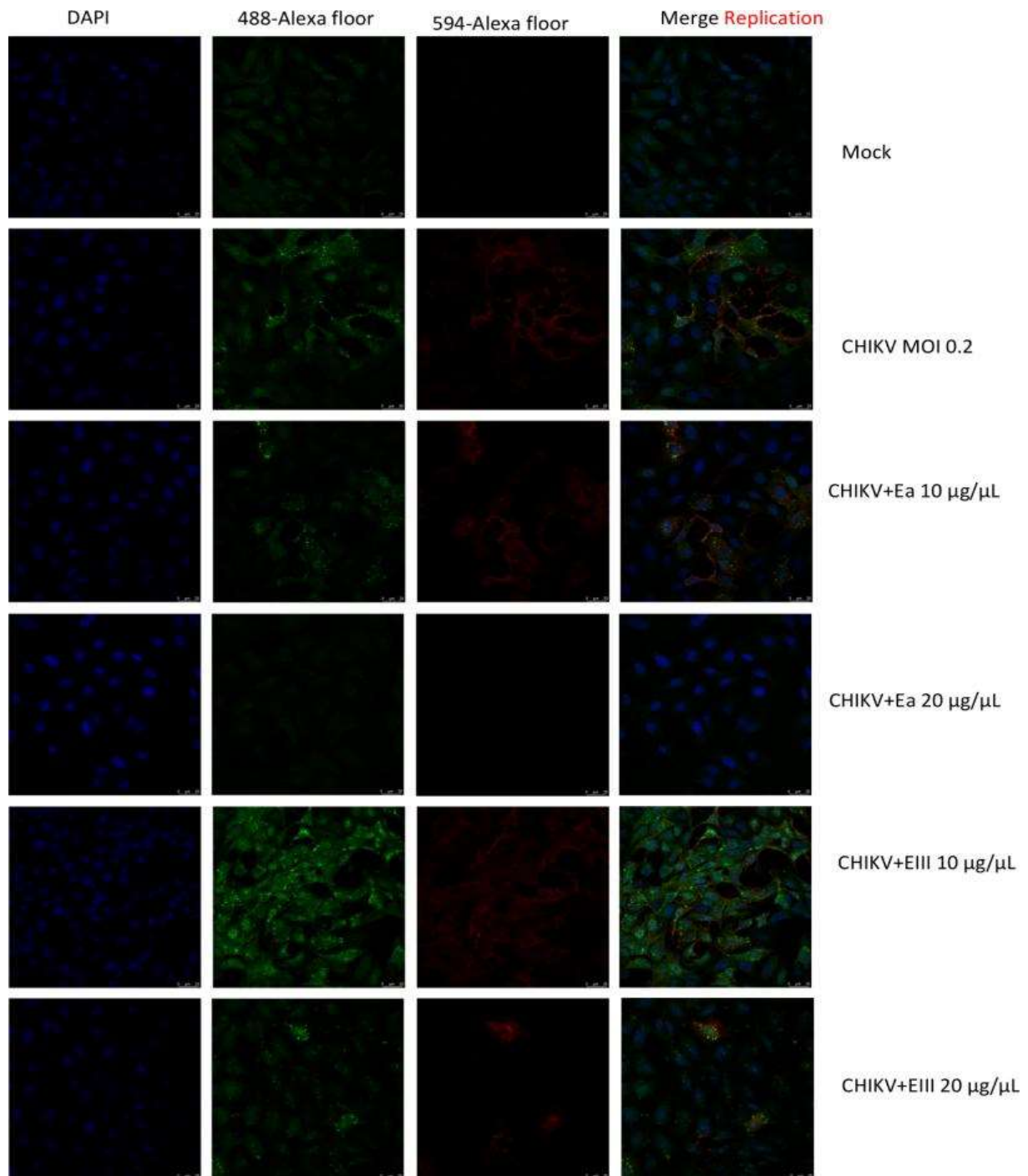


**Figure 45:** Inhibition concentration dépendante de l'expression des gènes codant pour les protéines nsP2 et de E1 durant la répllication virale par EIII et Eea de **A, B :** RT-qPCR ; **C :** Western blot.

**Légende :** \*: valeur significativement différente du témoin positif (CHIKV+DMSO)  $*p<0,05$  ;  $**p<0,01$ ; par le test de Dunnet. EIII : *Poga oleosa* ; Eea : Fraction à l'acétate d'éthyle de *Poga oleosa*.

Il ressort de ces figures que l'expression des gènes et protéines nsP2 et E1 est significativement inhibée en présence des différents extraits et fractions de plantes et que cette inhibition est plus accentuée dans le groupe traité avec la fraction à l'acétate d'éthyle

comparativement aux groupes traités par les extraits bruts. On observe aussi que l'inhibition se fait de manière dose dépendante dans tous les groupes sauf celui traité avec l'extrait brut d'*Entandrophragma cylindricum*. Afin de confirmer l'effet inhibiteur de EI (*Entandrophragma cylindricum*) et de la fraction Eea (Fraction à l'acétate d'éthyle de *Poga oleosa*) sur les protéines virales E1 et nsP2, l'étude par immunofluorescence a été réalisé et les résultats matérialisés dans la figure 49 ci-dessous.



**Figure 46 :** Mécanisme antiviral de l'extrait brut et la fraction acétate d'éthyle sur l'étape de réplication du Virus Chikungunya

Les cellules ont été infectées avec la préparation virale de MOI : 0,2 pendant 1h30, puis lavées et incubées avec le milieu frais contenant le DMSO (0,14%), EIII et Eea aux concentrations finales de 10 et 20 µg/mL. Après 16 h, les cellules ont été soumises à l'immunofluorescence pour la détection de la protéine nsP2 et E1 (A). Les images enregistrées avec le microscope à fluorescence présentent la superposition de la protéine E1 (en vert), nsP2 en rouge et du noyau (en bleu). EIII : Poga oleosa; Eea : Fraction à l'acétate d'éthyle de EIII.

Il ressort de cette figure que l'extrait brut et la fraction m inhibent significativement la réplication virale et cette inhibition se fait de manière concentration dépendante. Ces résultats confirment que la fraction à l'acétate d'éthyle de *Poga oleosa* possède la plus grande activité inhibitrice.



### **III.1. Discussion**

Depuis le début du 21<sup>ème</sup> siècle, l'émergence de deux arbovirus (Chikungunya et Dengue) transmis par les moustiques, a eu lieu à l'échelle mondiale. Des millions d'infections ont non seulement modifié l'épidémiologie des virus jusqu'alors obscure, mais ont également mis à l'épreuve les capacités de la santé publique mondiale (Huang *et al.*, 2019). La recrudescence des moustiques vecteurs de ces arboviroses est attribuée en partie à l'augmentation des échanges internationaux et du tourisme, mais surtout au changement climatique. D'après certaines études réalisées à l'échelle globale, celui-ci aurait pour effet d'accroître les zones où le climat est propice à la multiplication de ces insectes (Fall, 2018). Malgré les progrès scientifiques significatifs réalisés ces dernières années dans le domaine des arbovirus, il n'existe pas encore de médicaments spécifiques contre l'infection par ces deux virus (AlShebly *et al.*, 2017). L'objectif principal de ce travail a été d'étudier quelques aspects épidémiologiques et pharmacologiques des virus Dengue et Chikungunya.

Des données précises sur la prévalence de l'infection aux virus Chikungunya et Dengue en Afrique sont nécessaires pour formuler des politiques efficaces de contrôle des pathologies causées par ces derniers. Cette revue systématique avec méta-analyse de la prévalence de l'infection par les virus de la dengue et du chikungunya chez les personnes résidant en Afrique a mis en évidence une prévalence relativement élevée avec une grande hétérogénéité en fonction de la présentation clinique, et les marqueurs viraux considérés. L'analyse de 39 études portant sur 37 881 personnes ont abouti à une prévalence combinée de l'infection au virus Chikungunya de 9,7 %, 16,4 % et 2,8 % pour les marqueurs IgM, les IgG et l'ARN du CHIKV respectivement. Tandis que l'analyse de 77 études incluses portant sur 80977 participants ont abouti à une prevalence de l'infection par le virus de la dengue de 24,8%, 10,8% et 8,4% pour IgG, IgM, et RNA respectivement. Les séroprévalences obtenues dans ces études étaient proches de celles trouvées dans deux études systématiques réalisées pour les zones urbaines du Moyen-Orient et de l'Afrique du Nord (0-43%) avec une médiane de 1% dans les études de 1970 à 2015 (Humphrey *et al.*, 2016, 2017). Cependant, cette revue précédente ne différenciait pas le type de séroprévalences entre les IgG et les IgM. En outre, l'ARN des virus Chikungunya et Dengue n'a pas été pris en compte.

Dans certains pays africains, des stratégies de lutte contre les vecteurs ont été mises en œuvre jusqu'à présent (Guo *et al.*, 2017; Pialoux *et al.*, 2007). En plus de la séroprévalence, notre étude a rapporté et différencié la prévalence en se basant sur une méthode plus sensible

et plus spécifique, la détection de l'ARN viral. La prévalence de l'ARN viral était nettement inférieure à la séroprévalence. Les anticorps IgM et IgG sont très sensibles, mais la spécificité peut être faible en raison de la réactivité croisée avec d'autres arbovirus appartenant à la même famille (Scoglio *et al.*, 2016; Sánchez-San *et al.*, 2013). La prévalence élevée des IgG peut également s'expliquer par le fait que cette classe d'anticorps apparaît dans les sérums environ 15 jours après l'infection et reste présente pendant de nombreuses années, voire des décennies, par rapport à la présence de l'ARN de ces deux virus qui représente la phase de virémie pendant la phase aiguë qui ne dure que sept jours après l'infection (Giry *et al.*, 2017).

La fièvre due aux arbovirus apparaît généralement entre 4 et 7 jours après l'infection et dure moins d'une semaine. Les IgG apparaissent environ 15 jours après l'infection et persistent généralement pendant des années. Les IgM apparaissent généralement environ 5 jours après l'infection et persistent jusqu'à plusieurs mois. Logiquement, cela démontre qu'il peut y avoir une longue période pendant laquelle on peut avoir des anticorps détectables après l'arrêt des signes et symptômes cliniques, y compris la fièvre. Par conséquent, si une surveillance active visant à détecter les cas d'infection par le CHIKV est basée sur des signes et symptômes cliniques, y compris une maladie fébrile, certains cas d'infection sub-clinique peuvent passer inaperçus. Cette étude a mis en évidence une forte prévalence de l'infection par les virus Dengue et Chikungunya en Afrique, en particulier pendant les périodes d'épidémie. De plus, l'analyse est également limitée par la rareté des données sur le continent, ce qui souligne la nécessité de mener des investigations sur le terrain afin de décrire d'avantage la prévalence ainsi que les facteurs de risque liés à la circulation de ces pathogènes.

L'un des vecteurs du virus Chikungunya et Dengue, *Aedes albopictus*, est originaire de la région tropicale et subtropicale de l'Asie du Sud-Est. La présence de ce vecteur en Afrique a été facilitée par le développement du transport international. Par exemple, le commerce des pneus entre l'Asie, l'Europe et l'Afrique a été le facteur le plus favorable au transfert des œufs de moustiques d'Asie ou d'Europe vers l'Afrique (John *et al.*, 2016; Hanley *et al.*, 2015; Krueger & Hagen, 2007).

L'hétérogénéité de la prévalence de l'infection par les virus de la dengue et chikungunya en Afrique peut être due à la différence d'immunité des humains sur le continent et à l'hétérogénéité de la distribution des vecteurs (Hanley *et al.*, 2015; Manore *et al.*, 2014; Gould *et al.*, 2008). En outre, dans certains pays africains, on trouve les deux vecteurs

épidémiques *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* et seulement *Aedes aegypti* dans d'autres pays. Les données issues de ces études ont montré que les informations sur la prévalence réelle des virus Dengue et Chikungunya sont parcellaires voire inexistantes dans la plupart des pays de l'Afrique subsaharienne. Par ailleurs, ces études montrent aussi une absence de données sur les différents génotypes du virus Dengue au Cameroun.

Après avoir décrit la prévalence moyenne des virus Dengue et Chikungunya en Afrique, nous avons évalué la circulation active de ces virus au Cameroun. A cet effet les données de la littérature ont fait l'état de la présence des anticorps spécifiques à ces deux virus dans quelques Régions du Cameroun (Demanou *et al.*, 2014; Fokam *et al.*, 2010). Afin de confirmer la circulation active des virus Chikungunya et Dengue chez les patients fébriles dans quelques hôpitaux de district du Cameroun, nous avons mené une enquête transversale dans ces hôpitaux où nous avons analysé les cas suspects de dengue et/ou de chikungunya par RT-PCR temps réel. Cette étude est l'une des premières à décrire la présence des génomes des virus Dengue, et Chikungunya et non des anticorps dirigés contre ces virus, avec la détection du sérotype 1 du virus de la dengue (par RT-PCR en temps réel Trioplex) au Cameroun. Les études précédentes sur une durée de deux ans (2012/2013) menées au Cameroun par Demanou et ses collaborateurs n'ont pas réussi à détecter les cas positifs d'infection au virus Dengue et/ou Chikungunya aiguë, la principale limite de cette étude étant l'exclusion des cas de paludisme positif (Demanou *et al.*, 2014). Il convient de noter que plusieurs autres études ont été réalisées sur les arbovirus au Cameroun au cours des deux dernières décennies. La première s'est concentrée sur l'identification des vecteurs potentiels de ces virus (Fontenille & Toto, 2001), et les autres études basées sur la recherche des anticorps IgG et IgM (Demanou *et al.*, 2010; Kuniholm *et al.*, 2006). Le seul cas de détection de virus de la dengue par RT-PCR (du Cameroun) a été trouvé chez des voyageurs rentrant dans leur pays après des vacances au Cameroun.

Un total de 37 cas (7 %) de Dengue ont été détectés par des méthodes moléculaires, avec 11 cas qui ont pu être sérotypés appartenant tous au sérotype 1. Seulement trois cas (0,6%) d'infections par le virus Chikungunya ont été détectés. Ces résultats permettent ainsi de confirmer la circulation silencieuse du virus DENV-1 au Cameroun, telle que décrite par Fokam *et al.* (2010) qui ont obtenu 2,50% d'anti corps anti-DENV-1 et 36,5% d'anticorps anti-Chikungunya chez des patients fébriles par inhibition de l'hémagglutination et la fixation du complément. Une autre étude menée par Demanou *et al.* (2014) a rapporté une prévalence d'IgM anti-DENV de 0,3 % en 2006 à Douala lors d'une enquête impliquant plus de 700

participants. De plus, la grande proportion de résultats négatifs pourrait être attribuée à la circulation de nombreuses autres maladies endémiques au Cameroun ayant des symptômes similaires, notamment le paludisme (41,9 % dans notre étude), la leptospirose, la rickettsiose et d'autres non testés. Malgré cette incidence apparemment faible de l'infection par les virus de la dengue et du chikungunya, les résultats de cette étude montrent l'importance de la mise en place effective d'un programme soutenu de surveillance des arbovirus dans toutes les régions du Cameroun. Les signes cliniques présentés par la plupart des participants étaient des signes communs à celle d'autres infections endémiques semblables à celle des pathogènes recherchés, et donc seule la fièvre était associée à la présence du virus de la dengue. Aucun cas de dengue hémorragique de la fièvre (DHF) n'a été détecté pendant la durée de notre étude. Cette observation corrobore celle de Demanou *et al.* (2014) qui ont démontré que malgré la circulation endémique des sérotypes 1 et 2 du DENV 2 (7 à 11 % de la population camerounaise), il n'existait pas d'évidences de complications de la maladie car aucun cas de DHF n'avait été rapporté dans le pays.

La fréquence de détection du plasmodium était de 19,8% à Douala, 50,5% à Limbé et 61,1% à Mfou pour une fréquence moyenne de 41,9%. Cette fréquence est relativement faible comparée à celle décrite par Achonduh *et al.* (2016) détectée à Yaoundé de Février à Avril 2014 qui était de 56,8% (179/315). Cette faible incidence pourrait s'expliquer par les efforts de lutte soutenus tels que l'utilisation de moustiquaires imprégnées aux insecticides et/ou par le fait que le paludisme est plus fréquent chez les enfants de moins de cinq ans, alors que dans notre étude, toutes les tranches d'âge étaient représentées. La fréquence de coinfection entre arbovirus et paludisme dans notre étude était de 34,4% et 33,3% respectivement pour la dengue et le chikungunya. Ces résultats sont inférieurs aux fréquences de 67,6% (3/24) observées en 2012/2013 chez les patients fébriles dans deux hôpitaux de la capitale ville de Yaoundé, Cameroun (Monamele & Demanou, 2018). Par ailleurs, Ayorinde *et al.* (2016), travaillant sur la coinfection entre le plasmodium et certains arbovirus chez les patients fébriles venus en consultation à Simawa, au Nigeria, ont obtenu une fréquence de coinfection dengue-paludisme de 3% (1/60) et chikungunya-paludisme de 24% (9/60). Cette différence pourrait s'expliquer par la différence entre les caractéristiques sociodémographiques de la population. En effet la ville de Simawa est une communauté rurale alors que Douala et Yaoundé sont des zones urbaines à forte densité de population, et donc les conditions sont favorables au développement des vecteurs responsables de la transmission de ces arbovirus.

Seule la présence d'eau stagnante autour des habitations des participants était associée ( $p > 0,05$ ) à l'infection par le DENV.

Cette étude fournit les premières informations sur la caractérisation du génome de la Dengue au Cameroun. Les cas positifs obtenus sont tous du Sérotype 1 et l'analyse phylogénétique a montré que les souches de cette étude sont regroupées avec le sous-type (ou génotype) V. Ces souches appartiennent au même clade que les souches isolées pendant les épidémies récentes en Afrique de l'Ouest. On a constaté que le sous-type V du DENV-1 circule bien en Asie et Amérique (Ong *et al.*, 2008; Goncalvez *et al.*, 2002). La distance génétique entre les souches camerounaises et les autres souches africaines du sous-type V était inférieure ( $92,8 \pm 95,0\%$ ) par rapport aux souches d'Asie et d'Amérique du même sous-type ( $90,7 \pm 91,8\%$ ). La circulation du virus Dengue serotype 1 est courante en Afrique Centrale, bien que cette étude soit la première décrivant la caractérisation moléculaire des souches camerounaises. En effet, lors de l'épidémie de dengue en Angola en 2013, ce sérotype était soupçonné d'être la cause exclusive des cas de dengue classiques et non compliqués (Parreira *et al.*, 2014). Par ailleurs, d'autres sérotypes du DENV ont été détectés de manière rétrospective par Abreu *et al.* (2016).

La recherche des virus Dengue et Chikungunya n'est pas incluse dans le diagnostic de routine des patients fébriles dans la plupart des pays en Afrique tropicale. Étant donné que ces deux arbovirus et le paludisme ont certaines manifestations cliniques communes, notamment la présence de fièvre, ces résultats démontrent la nécessité d'un diagnostic approprié des patients fébriles pour limiter la transmission des arbovirus. Cette enquête fournit des données sur la circulation de la dengue et souligne la nécessité d'un système de surveillance soutenue de ces arbovirus dans la Région du Sud-Cameroun pour détecter les cas et prévenir d'éventuelles épidémies. Étant donné que la vaccination générale de la population contre ces arbovirus n'est pas encore d'actualité à cause de l'absence de vaccin spécifique, des mesures préventives devraient être encouragées (Muller *et al.*, 2017).

La nouvelle vision de l'industrie pharmaceutique consiste à utiliser les plantes médicinales pour la gestion des infections virales dans le but d'identifier les composés actifs (Ganjhu *et al.*, 2015). Il était question dans la seconde partie de notre travail de déterminer les effets des extraits de plante de la pharmacopée camerounaise dans la prise en charge de l'infection *in vitro* par le virus du Chikungunya en utilisant un système de cultures cellulaires. Dix extraits de plantes médicinales utilisés par les populations pour le traitement de maladies

liées à la fièvre ou à l'arthralgie ont été testés sur l'infection par le virus du chikungunya *in vitro*. Les résultats de cette étude ont montré que les extraits hydro-éthanoliques d'*Entandrophragma cylindricum*, *Poga oleosa*, *Khaya grandifoliola*, *Entanda africana* et *Macaranga hurifolia* ainsi que la fraction à l'acétate d'éthyle de *Poga oleosa* se sont révélés être les plantes les plus actives contre l'infection par le virus du chikungunya.

Les extraits bruts de *Khaya grandifoliola* et d'*Entanda africana* ont été actifs uniquement sur l'étape d'entrée du virus, tandis que *Macaranga hurifolia* a ciblé uniquement l'étape de réplication virale. Les extraits bruts d'*Entandrophragma cylindricum* et de *Poga oleosa* et la fraction à l'acétate d'éthyle de *Poga oleosa* ont inhibé à la fois l'entrée et la réplication du virus Chikungunya. Nos résultats ont également montré que les extraits bruts d'*Annickia affinis*, de *Senna alata* et d'*Annona senegalensis* se sont avérés être les moins actifs contre la multiplication du virus Chikungunya à la concentration testée.

L'effet anti-virus du Chikungunya des plantes médicinales a été rapporté par différentes études. L'étude de Nothias-Scaglia *et al.* (2015) a examiné l'effet de 45 extraits éthanoliques de 11 Euphorbes méditerranéennes en utilisant le système de cultures cellulaires sur le virus du chikungunya. Ils ont constaté que tous les extraits présentaient de faibles activités anti-chikungunya. Dans une étude plus récente de Raghavendhar *et al.* (2019), il a été constaté qu'après infection des cellules Vero par la souche S27 du virus Chikungunya, le traitement à l'aide d'un extrait végétal entraînait une réduction de 50 à 95 % du titre viral. Ils ont également constaté que les extraits aqueux de cinq plantes inhibaient l'attachement viral, que quatre plantes inhibaient la réplication virale et que deux plantes inhibaient à la fois l'attachement et la réplication, et enfin que cette inhibition se faisait de manière concentration dépendante. Les résultats obtenus dans notre étude sont proches de ces résultats, mais nous avons utilisé différentes espèces de plantes.

En effet, *Khaya grandifoliola* et *Entandrophragma cylindricum* sont de la famille des *Meliaceae*. Selon la littérature, les plantes de cette famille sont très riches en limonoïdes. Les méliacines et la proméliacine ont été décrites comme étant les métabolites secondaires les plus représentatifs de cette famille. *Entandrophragma cylindricum* contient spécialement du sesquiterpène, du squalène et du triterpène, dont l'activité a été citée dans le traitement de la malaria, des rhumatismes, des douleurs articulaires ou des blessures (Galani *et al.*, 2016; Happi *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2002; Bickii *et al.*, 2000; Massiot *et al.*, 1995). Galani *et al.* (2016) ont démontré l'effet inhibiteur de l'extrait brut et une fraction de *Khaya grandifoliola*

dans l'infection par le virus de l'hépatite C en utilisant les modèles répliquons et infectieux HCVcc et les résultats ont montré qu'à la concentration testée de 100µg/mL, la fraction inhibait la multiplication du VHC en ciblant l'étape d'entrée (Galani *et al.*, 2016). Ensuite Kouam *et al.* (2017) ont isolé 3 limonoïdes de *Khaya grandifoliola* (17-epi-méthyl-6-hydroxylangolensate, 7-deacétoxy-7-oxogedunin et deacétoxy-7R-hydroxygedunin,) qui inhibent les signaux cellulaires, notamment la kinase C-Jun-N-terminale induite par le paracétamol, P-JNK et Bcl2. L'étude de Mediesse *et al.* (2018) a montré que l'extrait brut de *Khaya grandifoliola* a régulé la surproduction de ROS induites par le LPS à 12,5 µg/mL. Des études sur les extraits de plante ont montré que qu'*Entada africana* contient des triterpènes, des flavonoïdes et des saponines comme principaux composés ayant démontré des activités antioxydantes, et antivirales (Yusuf & Abdullahi, 2019). La racine est utilisée en décoction comme agent stimulant, alors que décoction d'écorce de tige est utilisée pour traiter différentes maladies liées à la fièvre, l'herpès et le virus de l'hépatite (Mbatchou *et al.*, 2011). L'étude de Galani *et al.* (2014) a montré que la fraction Ea10 d'*Entanda Africana* inhibe la réplication du génotype 1b du VHC en bloquant l'hème oxygénase et la 2'-5'-oligo adénylate synthase 3.

*Macaranga hurifolia* est utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement des maladies liées à la fièvre, notamment le paludisme et la typhoïde (Segun *et al.*, 2019). Les analyses phytochimiques ont permis d'identifier 34 composés à partir de ses feuilles et 12 dans l'écorce de la tige. Cette plante est riche en dérivés de l'acide gallique ou flavonoïdes comme métabolites secondaires. L'effet anti-entérovirus et anti-échovirus du stilbénolide isolé de *Macaranga sp.* a été décrit par Segun *et al.* (2019).

L'entrée du CHIKV dans la cellule débute par la fixation de la protéine E2 à la surface cellulaire par l'intermédiaire d'un récepteur inconnu et peut-être de glycosaminoglycanes comme facteurs d'attachement. Le CHIKV pénètre dans la cellule par endocytose médiée par la clathrine. L'acidification des endosomes entraîne l'insertion du peptide de fusion de E1 dans la membrane endosomale. La fusion de l'enveloppe virale et de la membrane endosomale libère la nucléocapside dans le cytosol. Par la suite, le désassemblage de la nucléocapside libère l'ARN génomique positif et la traduction de la protéine non structurale (nsP) se produit. Quatre nsP, ainsi que l'ARN génomique et probablement des protéines de l'hôte, s'assemblent au niveau de la membrane plasmique (PM) et la modifie pour former des complexes de réplication virale (sphérules) contenant le dsRNA viral. Les nsP1-4 fonctionnent comme une réplicase et se localisent au niveau du col de la sphérule pour générer des vRNA génomiques,

antigénomiques et sous-génomiques (Deeba *et al.*, 2015). L'internalisation des sphérules permet la formation de grandes vacuoles cytopathiques (CPV-1) qui abritent de multiples sphérules. La traduction de l'ARN subgénomique produit la polyprotéine structurale, et l'autoprotéolyse de la capsid libère la capsid dans le cytoplasme et la translocation des polyprotéines E3-E2-6K-E1/E2-E2-TK dans le RE. Les protéines E2/E1 sont modifiées post-traductionnellement, transitent par le système sécrétoire, et sont déposées au niveau de la PM. L'interaction entre la capsid et l'ARN génomique conduit à la formation de nucléocapsides icosaédriques. Les nucléocapsides s'assemblent avec E2/E1 au niveau de la PM, ce qui entraîne le bourgeonnement des virions matures de la progéniture. Plus tard dans l'infection, les CPV-II se forment, contenant des treillis hexagonaux de E2/E1 et sont constellés de nucléocapsides. Les CPV-II servent probablement de véhicules de transport et de sites d'assemblage pour les protéines structurales, permettant la formation de virions matures et la sortie (Sylva & Dermordy, 2017).

Nos résultats ont également révélé que les extraits bruts actifs ainsi que la fraction active inhibaient la multiplication du virus Chikungunya en bloquant l'expression des protéines nsP2 et E1 de manière concentration-dépendante. Ces résultats sont proches de ceux de Mishra *et al.* (2016) qui ont établi que le 1-[(2-méthylbenzimidazol-1-yl) Methyl]-2-Oxo-Indolin-3-ylidène]Amino] Thiourée (MBZM-N-IBT) inhibait significativement la souche S27 du virus Chikungunya en culture Vero en inhibant la synthèse de nsP2 de manière dose-dépendante (Mishra *et al.*, 2016). Ces deux protéines jouent un rôle clé dans le cycle de vie du virus Chikungunya. En effet, la glycoprotéine E1 de l'enveloppe du virus Chikungunya se combine à E2 pour former un hétérodimère capable de fixer une nouvelle molécule E1 pour former un trimère, qui facilite la fusion membranaire avec la cellule fixée et favorise la libération de la nucléocapside virale dans le cytoplasme. La protéine nsP2 a un rôle multifonctionnel et multienzymatique. Son domaine N-terminal a une activité hélicase qui fonctionne comme ARN triphosphatase et ses domaines C-terminaux a une activité papain comme cystéine protéase qui est importante pour le traitement de la polyprotéine non structurale du virus (Abu Bakar & Ng, 2018; Bhakat & Soliman, 2015). Les études ont montré que ces deux protéines sont des cibles thérapeutiques privilégiées pour le développement des médicaments contre le virus Chikungunya (Subudhi *et al.*, 2018).

Cette étude est la première qui a étudié l'activité anti-Chikungunya des extraits de plante du Cameroun. Nos données démontrent que la fraction active de *Poga oleosa* pourrait contenir des composés capables d'inhiber la réplication du virus Chikungunya. Cette plante



peut être considérée comme bon candidat pour des études précliniques. De notre étude pharmacologique, une plante se démarque par son activité sur l'étape de fixation et de réplication du virus Chikungunya. Il s'agit de *Poga oleosa* et sa fraction à l'acétate d'éthyle. Cette plante appartient à la famille des *Anisophylleaceae*. L'étude de Fungo *et al.*, (2019) a montré que la pulpe de fruit est riche en flavonoides, polyphénols, proanthocyanines, vitamine C. Dans cette même étude, les auteurs ont montré que cette plante est riche en zinc, fer et sélénium (Fungo *et al.*, 2019). Cette plante produit des fruits comestibles qui sont utilisés par les populations du Sud Caemroun et du Gabon comme condiments. L'huile extraite des graines de fruits de cette plante est appréciée pour ces propriétés culinaires. En médecine traditionnelle, cette huile est utilisée comme laxatif dans le traitement de la gonorrhée, et comme huile de massage ; elle est aussi utilisée pour le traitement certaines infections cutanées ainsi que de l'inflammation (Ogole *et al.*, 2007). Les travaux de Ogbole *et al.*, (2013) ont montré que l'extrait *Poga oleosa* ne présentait pas de toxicité sur les cellules rhabdomyosarcome mais présentait une très faible activité anti-poliovirus à la concentration de 10 µg/mL (Ogbole *et al.*, 2013). Dans cette étude, nous avons décrit pour la première fois les propriétés anti-CHIKV des extraits hydroéthanoliques et de la fraction acétate d'éthyle d'écorce de *Poga oleosa*.

# **Conclusion et perspectives**

## **Conclusion**

Au terme de ce travail dont l'objectif était de déterminer la prévalence des virus Dengue et Chikungunya en Afrique et au Cameroun, et ensuite de déterminer les effets antichikungunya de quelques extraits de plantes de la pharmacopée traditionnelle, nous pouvons conclure que :

✓ En ce qui concernait l'aspect épidémiologique, la prévalence de ces deux virus chez les patients fébriles venus en consultation dans les hôpitaux des cinq districts de santé du Cameroun était de 7 % (37 cas) pour le virus Dengue ; 0,6 % (3 cas) pour le virus Chikungunya. Les cas de Dengue détectés appartiennent au sérotype 1 et au sous type V qui forme un cluster avec les souches circulant au Nigéria.

✓ En ce qui concernait l'aspect pharmacologique, nous pouvons conclure que les extraits de plantes utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement des pathologies associées à la fièvre présentent des activités anti-CHIKV.

✓ Les extraits bruts d'*Entandrophragma cylindricum*, *Poga oleosa*, et la fraction à l'acétate d'éthyle de *Poga oleosa* inhibent la multiplication virale en interférant les étapes d'entrée, de la réplication et de la libération des particules virales. L'activité inhibitrice se déroule de façon dose dépendante et les extraits et fraction active agissent sur les gènes viraux nsP2 et E1.

## **Perspectives**

Dans un futur proche, nous nous proposons de :

- ✓ Déterminer la prévalence du virus DEN et CHIK dans les autres régions du Cameroun,
- ✓ Rechercher la présence d'autres arbovirus dans les échantillons négatifs,
- ✓ Isoler les composés actifs de Eea, EI et E6 et déterminer leur propriétés anti-CHIKV et anti DENV,
- ✓ Evaluer l'activité anti-CHIKV, anti-DENV sur les souches isolées au Cameroun.

# **Bibliographie**

## **Bibliographie**

- Abreu, C., Silva-Pinto, A., Lazzara, D., Sobrinho-Simoes, J., Guimaraes, J. T., Sarmento, A., Abreu, C., Silva-Pinto, A., Lazzara, D., Sobrinho-Simoes, J., Guimaraes, J. T., & Sarmento, A. (2016). Imported dengue from 2013 Angola outbreak: Not just serotype 1 was detected. *Journal of clinical virology*, 79, 77-79.
- Abu Bakar, F., & Ng, L. F. P. (2018). Nonstructural Proteins of Alphavirus—Potential Targets for Drug Development. *Viruses*, 10(2).
- Achonduh, -Atijegbe, Ko, M., Ah, M., Jp, C., Dw, T., Vr, N., Wf, M., & R, L. (2016). Prevalence of malaria, typhoid, toxoplasmosis and rubella among febrile children in Cameroon. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 658-658.
- Adedayo, O., Anderson, W. A., Moo-Young, M., & Kolawole, D. O. (1999). Antifungal Properties of Some Components of Senna Alata Flower. *Pharmaceutical Biology*, 37(5), 369-374.
- Adedayo, O., Anderson, W. A., Moo-Young, M., Snieckus, V., Patil, P. A., & Kolawole, D. O. (2001). Phytochemistry and Antibacterial Activity of Senna alata Flower. *Pharmaceutical Biology*, 39(6), 408-412.
- aedesbusterutemcom. (2016, mars 23). Life Cycle of Aedes mosquitos. *AedesBusterUTeM*. <https://aedesbusterutemcom.wordpress.com/2016/03/23/life-cycle-of-aedes-mosquitos/>
- alain. (2017, mars 16). Entandrophragma cylindricum (Sprague) Sprague (Meliaceae), une espèce ligneuse concurrentielle en Afrique centrale (synthèse bibliographique). *Gestion des Ressources forestières*. <https://www.gembloux.ulg.ac.be/gestion-des-ressources-forestieres/2017/03/16/entandrophragma-cylindricum-sprague-sprague-meliaceae-espece-ligneuse-concurrentielle-afrique-centrale-synthese-bibliographique/>
- AlShebly, M. M., AlQahtani, F. S., Govindarajan, M., Gopinath, K., Vijayan, P., & Benelli, G. (2017). Toxicity of ar-curcumene and epi- $\beta$ -bisabolol from *Hedychium larsenii* (Zingiberaceae) essential oil on malaria, chikungunya and St. Louis encephalitis mosquito vectors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137, 149-157.
- Amarasinghe, A. (2011a). Dengue Virus Infection in Africa. *Emerging Infectious Diseases*.
- Aquino, V. H., Amarilla, A. A., Alfonso, H. L., Batista, W. C., & Figueiredo, L. T. M. (2009). New Genotype of Dengue Type 3 Virus Circulating in Brazil and Colombia Showed a Close Relationship to Old Asian Viruses. *PLOS ONE*, 4(10), e7299.
- Arya, S. C., & Agarwal, N. (2011). A propos « Outbreak of Chikungunya in the Republic of Congo and the global picture ». *Journal of Infection in Developing Countries*, 5(8), 609-610.
- Ayissi Owona, B., Njayou, N. F., Laufer, S., Moundipa, P. F., & Schluesener, H. J. (2013). A fraction of stem bark extract of *Entada africana* suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(1), 162-168.
- Ayorinde, A. F., Oyeyiga, A. M., Nosegbe, N. O., Folarin, O. A., Ayorinde, A. F., Oyeyiga, A. M., Nosegbe, N. O., & Folarin, O. A. (2016). A survey of malaria and some arboviral infections among suspected febrile patients visiting a health centre in Simawa, Ogun State, Nigeria. *Journal of infection and public health*, 9, 52-59.
- Barendregt, J. J., Doi, S. A., Lee, Y. Y., Norman, R. E., & Vos, T. (2013). Meta-analysis of prevalence of dengue and chikungunya. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 67(11), 974-978.
- Bett, B., Kiunga, P., Gachohi, J., Sindato, C., Mbotha, D., Robinson, T., Lindahl, J., & Grace, D. (2017). Effects of climate change on the occurrence and distribution of livestock diseases. *Preventive Veterinary Medicine*, 137(Pt B), 119-129.

- Bhakat, S., & Soliman, M. E. S. (2015). Chikungunya virus (CHIKV) inhibitors from natural sources: A medicinal chemistry perspective. *Journal of Natural Medicines*, 69(4), 451-462.
- Bickii, J., Njifutie, N., Foyere, J. A., Basco, L. K., & Ringwald, P. (2000). In vitro antimalarial activity of limonoids from *Khaya grandifoliola* C.D.C. (Meliaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 69(1), 27-33.
- Blacksell, S. D., Doust, J. A., Newton, P. N., Peacock, S. J., Day, N. P. J., & Dondorp, A. M. (2006). A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of rapid immunochromatographic assays for the detection of dengue virus IgM antibodies during acute infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(8), 775-784.
- Blaising, J., Polyak, S. J., & Pécheur, E.-I. (2014). Arbidol as a broad-spectrum antiviral : An update. *Antiviral Research*, 107, 84-94.
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Coutard, B., Decroly, E., de Lamballerie, X., Gould, E. A., Grard, G., Grimes, J. M., Hilgenfeld, R., Jansson, A. M., Malet, H., Mancini, E. J., Mastrangelo, E., Mattevi, A., Milani, M., Bolognesi, M. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins : Perspectives for drug design. *Antiviral Research*, 87(2), 125-148.
- Bouquet, A., & Debray, M. (1974). *Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire*. ORSTOM.
- Boutin, J. P. (2006). *Le chikungunya à la réunion en 2006*. 5.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods in Enzymology*, 541, 151-159.
- Buchillet, D. (2012). Dengue and dengue-like outbreaks in the past : The case of the Macau epidemic fever of 1874. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(5), 905-912.
- Burt, F. J., Chen, W., Miner, J. J., Lenschow, D. J., Merits, A., Schnettler, E., Kohl, A., Rudd, P. A., Taylor, A., Herrero, L. J., Zaid, A., Ng, L. F. P., & Mahalingam, S. (2017). Chikungunya virus: An update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(4), e107-e117.
- buster. (2016, mars 23). Life Cycle of Aedes mosquitos. *AedesBusterUTeM*. <https://aedesbusterutemcom.wordpress.com/2016/03/23/life-cycle-of-aedes-mosquitos/>
- Calvo, E. P., Coronel-Ruiz, C., Velazco, S., Velandia-Romero, M., Castellanos, J. E., Patricia Calvo, E., Coronel-Ruiz, C., Velazco, S., Velandia-Romero, M., & Castellanos, J. E. (2016). Dengue and Chikungunya differential diagnosis in pediatric patients. *BIOMEDICA*, 36, 35-43.
- Castro, M. C., Wilson, M. E., & Bloom, D. E. (2017). Disease and economic burdens of dengue. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(3), e70-e78.
- Chattopadhyay, S., Kumar, A., Mamidi, P., Nayak, T. K., Das, I., Chhatai, J., Basantray, I., Bramha, U., Maiti, P. K., Singh, S., Suryawanshi, A. R., & Chattopadhyay, S. (2014). Development and characterization of monoclonal antibody against non-structural protein-2 of Chikungunya virus and its application. *Journal of Virological Methods*, 199, 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.01.008>
- Chen, R., & Vasilakis, N. (2011). Dengue—Quo tu et quo vadis? *Viruses*, 3(9), 1562-1608.

- Chien, L.-J., Liao, T.-L., Shu, P.-Y., Huang, J.-H., Gubler, D. J., & Chang, G.-J. J. (2006). Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(4), 1295-1304.
- Chippaux, A. (2003). Généralités sur arbovirus et arboviroses. *Médecine et Maladies Infectieuses*, *33*(8), 377-384.
- Cochran, W. G. (1954). The combination of estimates from different experiments. *Biometrics*, *10*, 101-129.
- Cooper, G., & Record, S. (1931). The Evergreen Forests of Liberia: A Report on Investigations made in the West African Republic of Liberia by the Yale University School of Forestry in Cooperation with the Firestone Plantations Company. *Yale School of Forestry & Environmental Studies Bulletin Series*, *31*. [https://elischolar.library.yale.edu/yale\\_fes\\_bulletin/29](https://elischolar.library.yale.edu/yale_fes_bulletin/29)
- Cunha, R. V. da, & Trinta, K. S. (2017). Chikungunya virus: Clinical aspects and treatment - A Review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *112*(8), 523.
- de Chasse, B., Meyniel-Schicklin, L., Vonderscher, J., André, P., & Lotteau, V. (2014). Virus-host interactomics: New insights and opportunities for antiviral drug discovery. *Genome Medicine*, *6*(11), 115.
- Demanou, M., Pouillot, R., Grandadam, M., Boisier, P., Kamgang, B., Herve, J. P., Rogier, C., Rousset, D., Paupy, C., Pouillot, R., Grandadam, M., Boisier, P., Kamgang, B., Herve, J. P., Rogier, C., Rousset, D., & Paupy, C. (2014a). Evidence of Dengue Virus Transmission and Factors Associated with the Presence of Anti-Dengue Virus Antibodies in Humans in Three Major Towns in Cameroon. *PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES*, *8*.
- Demadou, Maurice, Antonio-Nkondjio, C., Ngapana, E., Rousset, D., Paupy, C., Manuguerra, J.-C., & Zeller, H. (2010). Chikungunya outbreak in a rural area of Western Cameroon in 2006: A retrospective serological and entomological survey. *BMC Research Notes*, *3*, 128.
- Diallo, D., Sall, A. A., Buenemann, M., Chen, R., Faye, O., Diagne, C. T., Faye, O., Ba, Y., Dia, I., Watts, D., Weaver, S. C., Hanley, K. A., & Diallo, M. (2012). Landscape ecology of sylvatic chikungunya virus and mosquito vectors in southeastern Senegal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *6*(6), e1649.
- Diallo, M., Ba, Y., Faye, O., Soumare, M. L., Dia, I., Sall, A. A., Diallo, M., Ba, Y., Faye, O., Soumare, M. L., Dia, I., & Sall, A. A. (2008a). Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Senegal for sylvatic and epidemic dengue 2 virus isolated in West Africa. *TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE*, *102*, 493-498.
- Diallo, M., Ba, Y., Sall, A. A., Diop, O. M., Ndione, J. A., Mondo, M., Girault, L., & Mathiot, C. (2003). Amplification of the sylvatic cycle of dengue virus type 2, Senegal, 1999–2000 : Entomologic findings and epidemiologic considerations. *Emerging infectious diseases*, *9*(3), 362.
- Diamond, M. S., & Pierson, T. C. (2015). Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell*, *162*(3), 488-492.
- Dipelet, U., Doumenge, C., Loumeto, J. joel, Jacques, F., Gonmadje, C., & Doyle, M. (2019). *Des confusions entre espèces préjudiciables à la gestion durable des essences forestières : L'exemple des acajous d'Afrique (Khaya, Meliaceae) | BOIS & FORETS DES TROPIQUES*. 339. <https://revues.cirad.fr/index.php/BFT/article/view/31714>
- Dorji, T., Yoon, I.-K., Holmes, E. C., Wangchuk, S., Tobgay, T., Nisalak, A., Chinnawirotpisan, P., Sangkachantaron, K., Gibbons, R. V., & Jarman, R. G.



- (2009). Diversity and Origin of Dengue Virus Serotypes 1, 2, and 3, Bhutan. *Emerging Infectious Diseases*, 15(10), 1630-1632.
- dos Santos, H. W. G., Poloni, T. R. R. S., Souza, K. P., Muller, V. D. M., Tremeschin, F., Nali, L. C., Fantinatti, L. R., Amarilla, A. A., Castro, H. L. A., Nunes, M. R., Casseb, S. M., Vasconcelos, P. F., Badra, S. J., Figueiredo, L. T. M., & Aquino, V. H. (2008). A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection. *Journal of Medical Virology*, 80(8), 1426-1433.
- Dussart, P., Petit, L., Labeau, B., Bremand, L., Leduc, A., Moua, D., Matheus, S., & Baril, L. (2008). Evaluation of Two New Commercial Tests for the Diagnosis of Acute Dengue Virus Infection Using NS1 Antigen Detection in Human Serum. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(8), e280.
- Egger, M., Davey Smith, G., Schneider, M., & Minder, C. (1997). Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 315(7109), 629-634.
- Engone O, N. L. (2006). *Biologie et écologie des Loranthaceæ parasites au Gabon : Impact de Phragmanthera capitata sur la productivité des hévéas* [These de doctorat, Paris 6]. <http://www.theses.fr/2006PA066258>
- Fall, I. (2018). « En Afrique, le changement climatique entraîne une multiplication des épidémies ». *Le Monde.fr*. [https://www.lemonde.fr/afrique/article/2018/12/04/en-afrique-le-changement-climatique-entraîne-une-multiplication-des-epidemies\\_5392613\\_3212.html](https://www.lemonde.fr/afrique/article/2018/12/04/en-afrique-le-changement-climatique-entraîne-une-multiplication-des-epidemies_5392613_3212.html)
- Fasola, T. R., Adeyemo, F. A., Adeniji, J. A., & Okonko, I. (2011). *Antiviral Potentials of Enantia chlorantha Extracts on Yellow Fever Virus*. /paper/Antiviral-Potentials-of-Enantia-chlorantha-Extracts-Fasola Adeyemo/7766363b86d3b3b7dce99bd0ef935e2920bce911
- Faye, O., Ba, Y., Faye, O., Talla, C., Diallo, D., Chen, R. B., Mondo, M., Ba, R., Macondo, E., Siby, T., Weaver, S. C., Diallo, M., Sall, A. A., Faye, O., Ba, Y., Faye, O., Talla, C., Diallo, D., Chen, R., Sall, A. A. (2014). Urban Epidemic of Dengue Virus Serotype 3 Infection, Senegal, 2009. *Emerging infectious diseases*, 20, 456-459.
- Ferreira-de-Lima, V. H., & Lima-Camara, T. N. (2018). Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* : A systematic review. *Parasites & Vectors*, 11(1).
- Fischl, W., & Bartenschlager, R. (2011). Exploitation of cellular pathways by Dengue virus. *Current Opinion in Microbiology*, 14(4), 470-475.
- Flamand, M., & Desprès, P. (2002). La dengue. *médecine/sciences*, 18(8-9), 816-818.
- Flipse, J., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2013). Molecular mechanisms involved in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in humans. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 14(1), 25-35.
- Fokam, E. B., Levai, L. D., Guzman, H., Amelia, P. A., Titanji, V. P. K., Tesh, R. B., & Weaver, S. C. (2010a). Silent circulation of arboviruses in Cameroon. *East African Medical Journal*, 87(6), 262-268.
- Fontenille, D. (1989). [Arbovirus transmission cycles in Madagascar]. *Archives De l'Institut Pasteur De Madagascar*, 55(1), 1-317.
- Fontenille, D., & Toto, J. C. (2001). *Aedes* (Stegomyia) albopictus (Skuse), a potential new Dengue vector in southern Cameroon. *Emerging Infectious Diseases*, 7(6), 1066-1067.
- Fontenille, D., Traore-Lamizana, M., Diallo, M., Thonnon, J., Digoutte, J. P., & Zeller, H. G. (1998). New vectors of Rift Valley fever in West Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 4(2), 289-293.

- Fros, J. J., Domeradzka, N. E., Baggen, J., Geertsema, C., Flipse, J., Vlak, J. M., & Pijlman, G. P. (2012a). Chikungunya Virus nsP3 Blocks Stress Granule Assembly by Recruitment of G3BP into Cytoplasmic Foci. *Journal of Virology*, 86(19), 10873-10879.
- Fungo, R., Muyonga, J.H., Ngondi, J.L., Mikolo-Yobo, C., Iponga, D.M., Ngoye, A., Nchuaji Tang, E., Chupezi Tieguhong, J., (2019). Nutrient and Bioactive Composition of Five Gabonese Forest Fruits and Their Potential Contribution to Dietary Reference Intakes of Children Aged 1–3 Years and Women Aged 19–60 Years. *Forests* 10, 86.
- Galani, R. T., Sahuc, M.-E., Njayou, F. N., Deloison, G., Mkounga, P., Feudjou, W. F., Brodin, P., Rouillé, Y., Nkengfack, A. E., Moundipa, P. F., & Séron, K. (2015). Plant extracts from Cameroonian medicinal plants strongly inhibit hepatitis C virus infection in vitro. *Frontiers in Microbiology*, 6, 488.
- Galani, B. R. T, Sahuc, M.-E., Sass, G., Njayou, F. N., Loscher, C., Mkounga, P., Deloison, G., Brodin, P., Rouillé, Y., Tiegs, G., Séron, K., & Moundipa, P. F. (2016). *Khaya grandifoliola* C.DC: A potential source of active ingredients against hepatitis C virus in vitro. *Archives of Virology*, 161(5), 1169-1181.
- Galani, B. R., Sass, G., Njayou, N. F., Mkounga, P., Tiegs, G., & Moundipa, P. F. (2014). Anti-Hepatitis C Virus Activity of Crude Extract and Fractions of *Entada africana* in Genotype 1b Replicon Systems. *The American Journal of Chinese Medicine*, 42(04), 853-868.
- Gallichotte, E. N., Baric, T. J., Nivarthi, U., Delacruz, M. J., Graham, R., Widman, D. G., Yount, B. L., Durbin, A. P., Whitehead, S. S., de Silva, A. M., & Baric, R. S. (2018). Genetic Variation between Dengue Virus Type 4 Strains Impacts Human Antibody Binding and Neutralization. *Cell Reports*, 25(5), 1214-1224.
- Ganjhu, R. K., Mudgal, P. P., Maity, H., Dowarha, D., Devadiga, S., Nag, S., & Arunkumar, G. (2015). Herbal plants and plant preparations as remedial approach for viral diseases. *Virus Disease*, 26(4), 225-236.
- Gaüzère, D. B.-A. (2018). *Infection à virus Chikungunya Actualités 2018*. 7.
- Giry, C., Roquebert, B., Li-Pat-Yuen, G., Gasque, P., Jaffar-Bandjee, M. C., Giry, C., Roquebert, B., Li-Pat-Yuen, G., Gasque, P., & Jaffar-Bandjee, M.-C. (2017a). Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic *Leptospira* genomes using a multiplex TaqMan ((R)) assay. *BMC MICROBIOLOGY*, 17.
- Godói, I. P., Lemos, L. L. P., de Araújo, V. E., Bonoto, B. C., Godman, B., & Guerra Júnior, A. A. (2017). CYD-TDV dengue vaccine: Systematic review and meta-analysis of efficacy, immunogenicity and safety. *Journal of Comparative Effectiveness Research*, 6(2), 165-180.
- Goncalvez, A. P., Escalante, A. A., Pujol, F. H., Ludert, J. E., Tovar, D., Salas, R. A., & Liprandi, F. (2002b). Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology*, 303(1), 110-119.
- Gould, L. H., Osman, M. S., Farnon, E. C., Griffith, K. S., Godsey, M. S., Karch, S., Mulenda, B., El Kholy, A., Grandesso, F., de Radiguès, X., Brair, M.-E., Briand, S., El Tayeb, E. S. M., Hayes, E. B., Zeller, H., & Perea, W. (2008). An outbreak of yellow fever with concurrent chikungunya virus transmission in South Kordofan, Sudan, 2005. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(12), 1247-1254.

- Grudkowska, M., & Zagdańska, B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, 51(3), 609-624.
- Gubler, D. J., & Rosen, L. (1976). Variation among geographic strains of *Aedes albopictus* in susceptibility to infection with dengue viruses. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 25(2), 318-325.
- Gubler, D. J. (2002). The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of Medical Research*, 33(4), 330-342.
- Guo, C., Zhou, Z., Wen, Z., Liu, Y., Zeng, C., Xiao, D., Ou, M., Han, Y., Huang, S., Liu, D., Ye, X., Zou, X., Wu, J., Wang, H., Zeng, E. Y., Jing, C., & Yang, G. (2017b). Global Epidemiology of Dengue Outbreaks in 1990–2015 : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7.
- Guyot, J., & Ntawanga Omanda, E. (1998). Note sur la sensibilité de six clones d'hévéa à *Phragmenthera capitata*. *Plantations, Recherche, Développement*. <http://agritrop.cirad.fr/390329/>
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H. S., Martínez, E., Nathan, M. B., Pelegrino, J. L., Simmons, C., Yoksan, S., & Peeling, R. W. (2010). Dengue : A continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12supp), S7-S16.
- Hall, J. (2007). Chikungunya Outbreaks. *The New England Journal of Medicine*, 3.
- Hammon, W. M., Rundnick, A., & Sather, G. E. (1960). Viruses Associated with Epidemic Hemorrhagic Fevers of the Philippines and Thailand. *Science*, 131(3407), 1102-1103.
- Hanley, K. A., Sall, A. A., Cummings, D. A. T., Diallo, D., Ba, Y., Watts, D. M., Faye, O., Weaver, S. C., Althouse, B. M., & Diallo, M. (2015). Impact of Climate and Mosquito Vector Abundance on Sylvatic Arbovirus Circulation Dynamics in Senegal. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(1), 88-97.
- Happi, G. M., Ngadjui, B. T., Green, I. R., & Kouam, S. F. (2018). Phytochemistry and pharmacology of the genus *Entandrophragma* over the 50 years from 1967 to 2018 : A 'golden' overview. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(11), 1431-1460.
- Hasan, S. S., Sevvana, M., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2018). Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(1), 13.
- Hertz, J. T., Munishi, O. M., Ooi, E. E., Howe, S., Lim, W. Y., Chow, A., Morrissey, A. B., Bartlett, J. A., Onyango, J. J., Maro, V. P., Kinabo, G. D., Saganda, W., Gubler, D. J., Crump, J. A., Hertz, J. T., Munishi, O. M., Ooi, E. E., Howe, S., Lim, W. Y., Crump, J. A. (2012). Chikungunya and Dengue Fever among Hospitalized Febrile Patients in Northern Tanzania. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 86, 171-177.
- Hong, E. M., Perera, R., & Kuhn, R. J. (2006a). Alphavirus capsid protein helix I controls a checkpoint in nucleocapsid core assembly. *Journal of Virology*, 80(18), 8848-8855.
- Horwood, P. F., & Buchy, P. (2015). Chikungunya : -EN- -FR- Le chikungunya -ES- El chikungunya. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 34(2), 479-489.
- Hostettmann, K., & Marston, A. (2002). Twenty years of research into medicinal plants : Results and perspectives. *Phytochemistry Reviews*, 1(3), 275-285.
- Huang, Y.-J. S., Higgs, S., & Vanlandingham, D. L. (2019). Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. *Current Opinion in Virology*, 34, 104-109.
- Hucke, F.I.L., Bugert, J.J., 2020. Current and Promising Antivirals Against Chikungunya Virus. *Frontiers in Public Health*. 8, 916.
- Humphrey, J. M., Cleton, N. B., Reusken, C. B. E. M., Glesby, M. J., Koopmans, M. P. G., & Abu-Raddad, L. J. (2016). Dengue in the Middle East and North Africa : A Systematic Review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(12), e0005194.

- Humphrey, J. M., Cleton, N. B., Reusken, C. B. E. M., Glesby, M. J., Koopmans, M. P. G., & Abu-Raddad, L. J. (2017). Urban Chikungunya in the Middle East and North Africa : A systematic review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *11*(6), e0005707.
- Iwu, M. M. (1993). *Handbook of African Medicinal Plants*. <https://doi.org/10.5860/choice.31-5446>
- Jain, J., Narayanan, V., Chaturvedi, S., Pai, S., & Sunil, S. (2018). In Vivo Evaluation of *Withania somnifera*-Based Indian Traditional Formulation (Amukkara Choornam), Against Chikungunya Virus-Induced Morbidity and Arthralgia. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, *23*.
- Jain, M., Rai, S., & Chakravarti, A. (2008). Chikungunya : A review. *Tropical Doctor*, *38*(2), 70-72.
- Jayawardene, W., Lohrmann, D., Youssefagha, A., & Nilwala, D. (2011). Prevention of Dengue Fever : An Exploratory School-Community Intervention Involving Students Empowered as Change Agents\*. *The Journal of school health*, *81*, 566-573.
- John, M. J. M., Cleton, N., Reusken, C., Marshall, J. M. J., Koopmans, M., & Abu-Raddad, L. J. (2016). Dengue in the Middle East and North Africa : A Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(12), Article 12.
- Joseph, J. M. (2014). Phytochemistry and pharmacology of the genus *Macaranga* : A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, *8*(12), 489-503.
- Jupp, P. G., & McIntosh, B. M. (1990a). *Aedes furcifer* and other mosquitoes as vectors of chikungunya virus at Mica, northeastern Transvaal, South Africa. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *6*(3), 415-420.
- Kalayanarooj, S., Vaughn, D. W., Nimmannitya, S., Green, S., Suntayakorn, S., Kunentrasai, N., Viramitrachai, W., Ratanachu-ek, S., Kiatpolpoj, S., Innis, B. L., Rothman, A. L., Nisalak, A., & Ennis, F. A. (1997). Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *The Journal of Infectious Diseases*, *176*(2), 313-321.
- Kamgang, B., Yougang, A. P., Tchoupo, M., Riveron, J. M., & Wondji, C. (2017). Temporal distribution and insecticide resistance profile of two major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Yaoundé, the capital city of Cameroon. *Parasites & Vectors*, *10*(1), Article 1.
- Kariuki N, M., Nderitu, L., Ledermann, J. P., Ndirangu, A., Logue, C. H., Kelly, C. H. L., Sang, R., Serگون, K., Breiman, R., & Powers, A. M. (2008). Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. *The Journal of General Virology*, *89*(Pt 11), 2754-2760.
- Karou, S. D., Tchacondo, T., Ouattara, L., Anani, K., Savadogo, A., Agbonon, A., Attaia, M. B., de Souza, C., Sakly, M., & Simpore, J. (2011). Antimicrobial, antiplasmodial, haemolytic and antioxidant activities of crude extracts from three selected Togolese medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *4*(10), 808-813.
- Kasugai, S., Hasegawa, N., & Ogura, H. (1991). Application of the MTT colorimetric assay to measure cytotoxic effects of phenolic compounds on established rat dental pulp cells. *Journal of Dental Research*, *70*(2), 127-130.
- Kelvin, A. A. (2011). Outbreak of Chikungunya in the Republic of Congo and the global picture. *Journal of Infection in Developing Countries*, *5*(6), 441-444.
- Kouam, A. F., Yuan, F., Njayou, F. N., He, H., Tsayem, R. F., Oladejo, B. O., Song, F., Moundipa, P. F., & Gao, G. F. (2017). Induction of Mkp-1 and Nuclear Translocation of Nrf2 by Limonoids from *Khaya grandifoliola* C.DC Protect L-02 Hepatocytes against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. *Frontiers in Pharmacology*, *8*.
- Kouyaté, A. M., & Damme, P. V. (2002). Caractères morphologiques de *Detarium microcarpum* Guill. Et Perr. Au sud du Mali. *Fruits*, *57*(4), 231-238.

- Krueger, A., & Hagen, R. M. (2007). Short communication : First record of *Aedes albopictus* in Gabon, Central Africa: First record of *Ae. albopictus* in Gabon. *Tropical Medicine & International Health*, 12(9), 1105-1107.
- Kuete, V. (2014). *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*. Elsevier.
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S., & Strauss, J. H. (2002a). Structure of Dengue Virus. *Cell*, 108(5), 717-725.
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S., & Strauss, J. H. (2002b). Structure of Dengue Virus : Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. *Cell*, 108(5), 717-725.
- Kumar, S., Kumar, A., Mamidi, P., Tiwari, A., Kumar, S., Mayavannan, A., Mudulli, S., Singh, A. K., Subudhi, B. B., & Chattopadhyay, S. (2018). Chikungunya virus nsP1 interacts directly with nsP2 and modulates its ATPase activity. *Scientific Reports*, 8(1), 1-14.
- Kumar, S., Mamidi, P., Kumar, A., Basantray, I., Bramha, U., Dixit, A., Maiti, P. K., Singh, S., Suryawanshi, A. R., Chattopadhyay, S., & Chattopadhyay, S. (2015). Development of novel antibodies against non-structural proteins nsP1, nsP3 and nsP4 of chikungunya virus : Potential use in basic research. *Archives of Virology*, 160(11), 2749-2761.
- Kuniholm, M. H., Wolfe, N. D., Huang, C. Y. H., Mpoudi-Ngole, E., Tamoufe, U., Burke, D. S., Gubler, D. J., Kuniholm, M. H., Wolfe, N. D., Huang, C. Y. H., Mpoudi-Ngole, E., Tamoufe, U., Burke, D. S., & Gubler, D. J. (2006a). Seroprevalence and distribution of Flaviviridae, Togaviridae, and Bunyaviridae arboviral infections in rural Cameroonian adults. *American journal of tropical medicine and hygiene*, 74, 1078-1083.
- Kuno, G., Chang, G.-J. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N., & Cropp, C. B. (1998). Phylogeny of the Genus Flavivirus. *Journal of Virology*, 72(1), 73-83.
- Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J., & Vorndam, A. V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(3), 545-551.
- Ledoux, A., Cao, M., Jansen, O., Mamede, L., Campos, P.-E., Payet, B., Clerc, P., Grondin, I., Girard-Valenciennes, E., Hermann, T., Litaudon, M., Vanderheydt, C., Delang, L., Neyts, J., Leyssen, P., Frédérick, M., & Smadja, J. (2018). Antiplasmodial, anti-chikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(5), 622-628.
- Leitmeyer, K. C., Vaughn, D. W., Watts, D. M., Salas, R., Villalobos, I., de Chacon, Ramos, C., & Rico-Hesse, R. (1999). Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. *Journal of Virology*, 73(6), 4738-4747.
- Li, L., Lok, S.-M., Yu, I.-M., Zhang, Y., Kuhn, R. J., Chen, J., & Rossmann, M. G. (2008). The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex : Structure and Maturation. *Science*, 319(5871), 1830-1834.
- Lobo, J. M. D., Mores, C. N., Bausch, D. G., Christofferson, R. C., Lobo, J. M. de A., Mores, C. N., Bausch, D. G., & Christofferson, R. C. (2016). Short Report : Serological Evidence of Under-Reported Dengue Circulation in Sierra Leone. *Plos neglected tropical diseases*, 10.
- Luo, X.-D., Wu, S.-H., Wu, D.-G., Ma, Y.-B., & Qi, S.-H. (2002). Three new apo-tirucallols with six-membered hemiacetal from Meliaceae. *Tetrahedron*, 58(33), 6691-6695.

- Mahé, C. (2020). *Enantia chlorantha* / *La sorcière et le médecin*. La sorcière et le médecin. <https://la-sorciere-et-le-medecin.com/tag/enantia-chlorantha/>
- Malaysian, S. (2016, juin 6). The dengue vaccine dilemma : Route to prevention – are we there yet? *Scientific Malaysian Magazine*. <http://magazine.scientificmalaysian.com/issue-12-2016/dengue-vaccine-dilemma-route-prevention-yet/>
- Manore, C. A., Hickmann, K. S., Xu, S., Wearing, H. J., & Hyman, J. M. (2014). Comparing dengue and chikungunya emergence and endemic transmission in *A. aegypti* and *A. albopictus*. *Journal of Theoretical Biology*, 356, 174-191.
- Mariod, A. A., Tahir, H. E., & Komla, M. G. (2019). *Detarium microcarpum* : Chemical Composition, Bioactivities and Uses. In A. A. Mariod (Éd.), *Wild Fruits : Composition, Nutritional Value and Products* (p. 207-217). Springer International Publishing.
- Massiot, G., Bliard, C. C., Tsamo, E., & Ngnokam, D. (1995). Sapelenin D, a New Acyclic Triterpenoid from the Stem Bark of *Entandrophragma cylindricum*. *Natural Product Letters*, 5(4), 289-293.
- Maurice, D., Alain, S.-M. S., Christophe, V., Rene, N., Irene, K. T., Marthe, I. N., & Richard, N. (2015). Molecular characterization of chikungunya virus from three regions of Cameroon. *Virologica Sinica*, 30(6), 470-473.
- Mbatchou, V. C., Ayebila, A. J., & Apea, O. B. (2011). *Antibacterial activity of phytochemicals from Acacia nilotica, Entada africana and Mimosa pigra L. on Salmonella typhi*.
- Mediesse, F. K., Boudjeko, T., Hasitha, A., Gangadhar, M., Mbacham, W. F., & Yogeewari, P. (2018). Inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammatory response by polysaccharide fractions of *Khaya grandifoliola* (C.D.C.) stem bark, *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr and *Cymbopogon citratus* Stapf leaves in raw 264.7 macrophages and U87 glioblastoma cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 86.
- Messina, J. P., Brady, O. J., Scott, T. W., Zou, C., Pigott, D. M., Duda, K. A., Bhatt, S., Katzelnick, L., Howes, R. E., Battle, K. E., Simmons, C. P., & Hay, S. I. (2014). Global spread of dengue virus types : Mapping the 70 year history. *Trends in Microbiology*, 22(3), 138-146.
- Metselaar, D., Grainger, C. R., Oei, K. G., Reynolds, D. G., Pudney, M., Leake, C. J., Tukei, P. M., D'Offay, R. M., & Simpson, D. I. (1980). An outbreak of type 2 dengue fever in the Seychelles, probably transmitted by *Aedes albopictus* (Skuse). *Bulletin of the World Health Organization*, 58(6), 937-943.
- Mishra, B., Sharma, M., Pujhari, S. K., Ratho, R. K., Gopal, D., Kumar, C., Sarangi, G., Chayani, N., Varma, S. C., Mishra, B., Sharma, M., Pujhari, S. K., Ratho, R. K., Gopal, D. V. R. S., Kumar, C. V. M. N., Sarangi, G., Chayani, N., & Varma, S. C. (2011). Utility of multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction for diagnosis and serotypic characterization of dengue and chikungunya viruses in clinical samples. *DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE*, 71, 118-125.
- Mishra, P., Kumar, A., Mamidi, P., Kumar, S., Basantray, I., Saswat, T., Das, I., Nayak, T. K., Chattopadhyay, S., Subudhi, B. B., & Chattopadhyay, S. (2016). Inhibition of Chikungunya Virus Replication by 1-[(2-Methylbenzimidazol-1-yl) Methyl]-2-Oxo-Indolin-3-ylidene] Amino] Thiourea (MBZM-N-IBT). *Scientific Reports*, 6.

- Mohamat, S. A., Shueb, R. H., & Mat, N. F. C. (2018). Anti-viral Activities of Oroxylum indicum Extracts on Chikungunya Virus Infection. *Indian Journal of Microbiology*, 58(1), 68.
- Monamele, G. C., & Demanou, M. (2018). First documented evidence of dengue and malaria co-infection in children attending two health centers in Yaoundé, Cameroon. *Pan African Medical Journal*, 29. <http://panafrican-med-journal.com/content/PamjArticles.php?Src=Art&Vol=29-227>
- Moreira-Soto, A., Torres, M. C., Lima de Mendonça, M. C., Mares-Guia, M. A., dos Santos Rodrigues, C. D., Fabri, A. A., dos Santos, C. C., Machado Araújo, E. S., Fischer, C., Ribeiro Nogueira, R. M., Drosten, C., Sequeira, P. C., Drexler, J. F., & Bispo de Filippis, A. M. (2018). Evidence for multiple sylvatic transmission cycles during the 2016–2017 yellow fever virus outbreak, Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(9), 1019.e1-1019.e4.
- Moriyama, H., Iizuka, T., Nagai, M., Miyataka, H., & Satoh, T. (2003). Antiinflammatory activity of heat-treated Cassia alata leaf extract and its flavonoid glycoside. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 123(7), 607-611.
- Morra, M. E., Altibi, A. M. A., Iqtadar, S., Minh, L. H. N., Elawady, S. S., Hallab, A., Elshafay, A., Omer, O. A., Iraqi, A., Adhikari, P., Labib, J. H., Elhusseiny, K. M., Elgebaly, A., Yacoub, S., Huong, L. T. M., Hirayama, K., & Huy, N. T. (2018). Definitions for warning signs and signs of severe dengue according to the WHO 2009 classification : Systematic review of literature. *Reviews in Medical Virology*, 28(4), e1979.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 13-22.
- Muller, D. A., Depelsenaire, A. C. I., & Young, P. R. (2017a). Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(suppl\_2), S89-S95.
- Mustapha\*, A. A., Owuna, G., & Uthman, I.-H. I. (2013). Plant Remedies Practiced by Keffi People in the Management of Dermatitis. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 1(5), 112-118.
- Mustapha, J., Emeribe, A. U., & Nasir, I. A. (2017). Survey of malaria and anti-dengue virus IgG among febrile HIV-infected patients attending a tertiary hospital in Abuja, Nigeria. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care*, Volume 9, 145-151.
- Nakaya, H. I., Gardner, J., Poo, Y.-S., Major, L., Pulendran, B., & Suhrbier, A. (2012). Gene profiling of Chikungunya virus arthritis in a mouse model reveals significant overlap with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 64(11), 3553-3563.
- Nimmannitya, S. (1987). Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 18(3), 392-397.
- Njayou, F. N., Kouam, A. F., Simo, B. F. N., Tchana, A. N., & Moundipa, P. F. (2016). Active chemical fractions of stem bark extract of Khaya grandifoliola C.DC and Entada africana Guill. Et Perr. Synergistically protect primary rat hepatocytes against paracetamol-induced damage. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16.
- Nkoghe, D., Kassa, R. F., Caron, M., Grard, G., Mombo, I., Bikie, B., Paupy, C., Becquart, P., Bisvigou, U., Leroy, E. M., Nkoghe, D., Kassa, R. F., Caron, M., Grard, G., Mombo, I., Bikie, B., Paupy, C., Becquart, P., Bisvigou, U., & Leroy, E. M. (2012). Clinical Forms of Chikungunya in Gabon, 2010. *Plos neglected tropical diseases*, 6.
- Nothias-Scaglia, L.-F., Dumontet, V., Neyts, J., Roussi, F., Costa, J., Leyssen, P., Litaudon, M., & Paolini, J. (2015). LC-MS2-Based dereplication of Euphorbia extracts with anti-Chikungunya virus activity. *Fitoterapia*, 105, 202-209.

- Ogbole, O., Ekor, M., Oluremi, B., Ajaiyeoba, E., Gbolade, A., Ayoola, M., & Adeyemi, A. (2008). Anti-Inflammatory And Antimicrobial Activities Of *Hippocratea indica* Root Bark And *Poga oleosa* Fruits. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 4(3), 372. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v4i3.31232>
- Ojokuku, S. A., Okunowo, W. O., & Apena, A. (2010). Evaluation of the chemical composition of *Khaya grandifoliola* and *Ficus capensis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(12), 1126-1129.
- Okhale, S. E., Akpan, E., Fatokun, O. T., Esievo, K. B., & Kunle, O. F. (2016). *Annona senegalensis* Persoon (Annonaceae): A review of its ethnomedicinal uses, biological activities and phytocompounds. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(2), 211-219.
- Ogbole, O.O., Ekor, M.N., Oluremi, B.B., Ajaiyeoba, E.O., Gbolade, A.A., Ayoola, M.A., Adeyemi, A.A., (2007). Anti-Inflammatory and Antimicrobial Activities of *Hippocratea Indica* Root Bark and *Poga Oleosa* Fruits. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine* 4, 372–376.
- Oladeji, O. S., Adelowo, F. E., Oluyori, A. P., & Bankole, D. T. (2020). Ethnobotanical Description and Biological Activities of *Senna alata*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2020.
- Olivier, D. K., Van Vuuren, S. F., & Moteetee, A. N. (2015). *Annickia affinis* and *A. chlorantha* (Enantia chlorantha) – A review of two closely related medicinal plants from tropical Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 176, 438-462.
- Omonike, O., Adekunle, J., Edith, O., Festus, D., (2013). Anti-poliovirus activity of medicinal plants selected from the Nigerian ethno-medicine. *African Journal of Biotechnology*.12(24) 6, 3878-3883
- Ong, S. H., Yip, J. T., Chen, Y. L., Liu, W., Harun, S., Lystiyaningsih, E., Heriyanto, B., Beckett, C. G., Mitchell, W. P., Hibberd, M. L., Suwandono, A., Vasudevan, S. G., & Schreiber, M. J. (2008). Periodic re-emergence of endemic strains with strong epidemic potential-a proposed explanation for the 2004 Indonesian dengue epidemic. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 8(2), 191-204.
- Owona, B. A., Njayou, N. F., Laufer, S. A., Schluesener, H. J., & Moundipa, P. F. (2013). Entada africana fraction CH2Cl2/MEOH 5% inhibits inducible nitric oxide synthase and pro-inflammatory cytokines gene expression induced by lipopolysaccharide in microglia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 254.
- Oyero, O. G., Ayukekbong, J. A., Oyero, O. G., & Ayukekbong, J. A. (2014). High dengue NS1 antigenemia in febrile patients in Ibadan, Nigeria. *VIRUS RESEARCH*, 191, 59-61.
- Parreira, R., Centeno-Lima, S., Lopes, A., Portugal-Calisto, D., Constantino, A., Nina, J., Parreira, R., Centeno-Lima, S., Lopes, A., Portugal-Calisto, D., Constantino, A., & Nina, J. (2014). Dengue virus serotype 4 and chikungunya virus coinfection in a traveller returning from Luanda, Angola, January 2014. *EUROSURVEILLANCE*, 19, 7-10.
- Paupy, C., Kassa Kassa, F., Caron, M., Nkoghé, D., & Leroy, E. M. (2012). A chikungunya outbreak associated with the vector *Aedes albopictus* in remote villages of Gabon. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 12(2), 167-169.
- Perera, N., Miller, J. L., & Zitzmann, N. (2017). The role of the unfolded protein response in dengue virus pathogenesis. *Cellular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/cmi.12734>
- Petersen, L. R., & Powers, A. M. (2016a). Chikungunya : Epidemiology. *F1000Research*, 5.



- Peyrefitte, C. N., Rousset, D., Pastorino, B. A. M., Pouillot, R., Bessaud, M., Tock, F., Mansaray, H., Merle, O. L., Pascual, A. M., Paupy, C., Vessiere, A., Imbert, P., Tchendjou, P., Durand, J.-P., Tolou, H. J., & Grandadam, M. (2007). Chikungunya Virus, Cameroon, 2006. *Emerging Infectious Diseases*, 13(5), 768-771.
- Pialoux, G., Gaüzère, B.-A., Jauréguiberry, S., & Strobel, M. (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *The Lancet. Infectious Diseases*, 7(5), 319-327.
- Powers, A. M., & Logue, C. H. (2007). Changing patterns of chikungunya virus: Re-emergence of a zoonotic arbovirus. *The Journal of General Virology*, 88(Pt 9), 2363-2377.
- Qiagen. (2020). *QIAamp Viral RNA Mini Kit—QIAGEN Online Shop*. <https://www.qiagen.com/kr/products/diagnostics-and-clinical-research/sample-processing/qiaamp-viral-rna-mini-kit/?clear=true#orderinginformation>
- Radt, C. (1974). Kerharo J. & Adam J. G. —La Pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 21(1), 76-77.
- Raghavendhar, S., Tripathi, P. K., Ray, P., & Patel, A. K. (2019). Evaluation of medicinal herbs for Anti-CHIKV activity. *Virology*, 533, 45-49.
- Rathore, A. P. S., Haystead, T., Das, P. K., Merits, A., Ng, M.-L., & Vasudevan, S. G. (2014). Chikungunya virus nsP3 & nsP4 interacts with HSP-90 to promote virus replication: HSP-90 inhibitors reduce CHIKV infection and inflammation in vivo. *Antiviral Research*, 103, 7-16.
- Rigau-Pérez, J. G., Clark, G. G., Gubler, D. J., Reiter, P., Sanders, E. J., & Vorndam, A. V. (1998). Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet (London, England)*, 352(9132), 971-977.
- Rodhain, F. (1983). Le diagnostic biologique des arboviroses: Reflexions et commentaires du biologiste. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 13(4), 212-221.
- Rosenberger, K. D., Lum, L., Alexander, N., Junghanss, T., Wills, B., Jaenisch, T., & DENCO Clinical Study Group. (2016). Vascular leakage in dengue—Clinical spectrum and influence of parenteral fluid therapy. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH*, 21(3), 445-453.
- Sabin, A. B., & Schlesinger, R. W. (1945). Production of Immunity to Dengue with Virus Modified by Propagation in Mice. *Science*, 101(2634), 640-642.
- Sánchez-San Martín, C., Nanda, S., Zheng, Y., Fields, W., & Kielian, M. (2013). Cross-inhibition of chikungunya virus fusion and infection by alphavirus E1 domain III proteins. *Journal of Virology*, 87(13), 7680-7687.
- Santiago, G. A., Vázquez, J., Courtney, S., Matías, K. Y., Andersen, L. E., Colón, C., Butler, A. E., Roulo, R., Bowzard, J., Villanueva, J. M., & Muñoz-Jordan, J. L. (2018). Performance of the Triplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. *Nature Communications*, 9(1), 1391.
- Schwartz, O., & Albert, M. L. (2010). Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), 491. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2368>
- Scoglio, C. M., Bosca, C., Riad, M. H., Sahneh, F. D., Britch, S. C., Cohnstaedt, L. W., & Linthicum, K. J. (2016). Biologically Informed Individual-Based Network Model for Rift Valley Fever in the US and Evaluation of Mitigation Strategies. *PloS One*, 11(9), e0162759.
- Seema, & Jain, S. K. (2005). Molecular mechanism of pathogenesis of dengue virus: Entry and fusion with target cell. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 20(2), 92-103.

- Segun, P. A., Ogbole, O. O., Akinleye, T. E., Faleye, T. O. C., & Adeniji, A. J. (2019). In vitro anti-enteroviral activity of stilbenoids isolated from the leaves of *Macaranga barteri*. *Natural Product Research*, 1-5.
- Sharma, Y., Kawatra, A., Sharma, V., Dhull, D., Kaushik, Sulochana, Yadav, J.P., Kaushik, Samander, 2021. In-vitro and in-silico evaluation of the anti-chikungunya potential of Psidium guajava leaf extract and their synthesized silver nanoparticles. *Virus Disease*. 32, 260-265.
- Sharp, B. L., Appleton, C. C., Thompson, D. L., & Meenehan, G. (1987). Anthropophilic mosquitoes at Richards Bay, Natal, and arbovirus antibodies in human residents. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(2), 197-201.
- Shi, M., Lin, X.-D., Vasilakis, N., Tian, J.-H., Li, C.-X., Chen, L.-J., Eastwood, G., Diao, X.-N., Chen, M.-H., Chen, X., Qin, X.-C., Widen, S. G., Wood, T. G., Tesh, R. B., Xu, J., Holmes, E. C., & Zhang, Y.-Z. (2015). Divergent Viruses Discovered in Arthropods and Vertebrates Revise the Evolutionary History of the Flaviviridae and Related Viruses. *Journal of Virology*, 90(2), 659-669.
- Silva, J. V. J., Ludwig-Begall, L. F., Oliveira-Filho, E. F. de, Oliveira, R. A. S., Durães-Carvalho, R., Lopes, T. R. R., Silva, D. E. A., & Gil, L. H. V. G. (2018). A scoping review of Chikungunya virus infection : Epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. *Acta Tropica*, 188, 213-224.
- Silva, L. A., & Dermody, T. S. (2017). Chikungunya virus : Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *Journal of Clinical Investigation*, 127(3), 737-749.
- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D. B., & Stapleton, J. T. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile : Flaviviridae. *The Journal of General Virology*, 98(1), 2-3.
- Simmons, C. P., Farrar, J. J., van Vinh Chau, N., & Wills, B. (2012, avril 11). *Dengue* [Review-article]. [Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMra1110265](http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMra1110265).
- Sissoko, D., Ezzedine, K., Giry, C., Moendandze, A., Lernout, T., D'Ortenzio, E., Pettinelli, F., Malvy, D., Sissoko, D., Ezzedine, K., Giry, C., Moendandze, A., Lernout, T., D'Ortenzio, E., Pettinelli, F., & Malvy, D. (2010). Seroepidemiology of Dengue Virus in Mayotte, Indian Ocean, 2006. *PLOS ONE*, 5.
- Solignat, M., Gay, B., Higgs, S., Briant, L., & Devaux, C. (2009). Replication cycle of chikungunya : A re-emerging arbovirus. *Virology*, 393(2), 183-197.
- Strauss, J. H., & Strauss, E. G. (1994). The alphaviruses : Gene expression, replication, and evolution. *Microbiological Reviews*, 58(3), 491-562.
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, 111(1), A3.B.1-A3.B.3.
- Subudhi, B., Chattopadhyay, S., Mishra, P., & Kumar, A. (2018a). Current Strategies for Inhibition of Chikungunya Infection. *Viruses*, 10(5), 235.
- Sudeep, A. B., & Parashar, D. (2008). Chikungunya : An overview. *Journal of Biosciences*, 33(4), 443-449.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Tchuandom, S. B., Tchouangueu, T. F., Antonio-Nkondjio, C., Lissom, A., Ngono Djang, J. O., Atabonkeng, E. P., Kechia, A., Nchinda, G., & Kuate, J.-R. (2018). Seroprevalence of dengue virus among children presenting with febrile illness in some public health facilities in Cameroon. *Pan African Medical Journal*, 31.

- Thi, K. L. P. (2015). *Epidemiology and dynamic of dengue and chikungunya in several provinces in Vietnam* [Phdthesis, Université Montpellier]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01763165/document>
- Thiboutot, M. M., Kannan, S., Kawalekar, O. U., Shedlock, D. J., Khan, A. S., Sarangan, G., Srikanth, P., Weiner, D. B., & Muthumani, K. (2010). Chikungunya : A Potentially Emerging Epidemic? *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 4(4), e623.
- Thomas, S. J., Nisalak, A., Anderson, K. B., Libraty, D. H., Kalayanarooj, S., Vaughn, D. W., Putnak, R., Gibbons, R. V., Jarman, R., & Endy, T. P. (2009). Dengue Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) in Primary and Secondary Dengue Virus Infections : How Alterations in Assay Conditions Impact Performance. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 81(5), 825-833.
- Tibiri, A., W. Sawadog, R., & Ouedraogo, N. (2010). Evaluation of Antioxidant Activity, Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Entada africana* Guill. Et Perr. (Mimosaceae) Organ Extracts. *Research Journal of Medical Sciences*, 4(2), 81-87.
- Turell, M. J. (1993). Effect of environmental temperature on the vector competence of *Aedes taeniorhynchus* for Rift Valley fever and Venezuelan equine encephalitis viruses. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(6), 672-676.
- Twiddy, S. S., Farrar, J. J., Vinh Chau, N., Wills, B., Gould, E. A., Gritsun, T., Lloyd, G., & Holmes, E. C. (2002). Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology*, 298(1), 63-72.
- Udoh, U., & Udoh, U. (2020). *Germination and early seedling growth rate of poga oleosa*. [https://www.academia.edu/12940382/Germination\\_and\\_early\\_seedling\\_growth\\_rate\\_of\\_poga\\_oleosa](https://www.academia.edu/12940382/Germination_and_early_seedling_growth_rate_of_poga_oleosa)
- Van Duijl-Richter, M. K. S., Hoornweg, T. E., Rodenhuis-Zybert, I. A., & Smit, J. M. (2015). Early Events in Chikungunya Virus Infection-From Virus Cell Binding to Membrane Fusion. *Viruses*, 7(7), 3647-3674.
- van Welzen, P. C., Strijk, J. S., van Konijnenburg-van Cittert, J. H. A., Nucete, M., & Merckx, V. S. F. T. (2014). Dated Phylogenies of the Sister Genera *Macaranga* and *Mallotus* (Euphorbiaceae) : Congruence in Historical Biogeographic Patterns? *PLoS ONE*, 9(1).
- Vazeille, M., Mousson, L., Martin, E., & Failloux, A.-B. (2010). Orally Co-Infected *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean, Can Deliver Both Dengue and Chikungunya Infectious Viral Particles in Their Saliva. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(6), e706.
- Vijayan, V., & Sukumaran, S. (2016a). Chikungunya Virus Disease : An Emerging Challenge for the Rheumatologist. *Journal of Clinical Rheumatology: Practical Reports on Rheumatic & Musculoskeletal Diseases*, 22(4), 203-211.
- Voeks, R., & Rashford, J. (2012). *African Ethnobotany in the Americas*. Springer Science & Business Media.
- Wada, Y., Orba, Y., Sasaki, M., Kobayashi, S., Carr, M. J., Nobori, H., Sato, A., Hall, W. W., & Sawa, H. (2017). Discovery of a novel antiviral agent targeting the nonstructural protein 4 (nsP4) of chikungunya virus. *Virology*, 505, 102-112.
- Wahid, B., Ali, A., Rafique, S., & Idrees, M. (2017). Global expansion of chikungunya virus : Mapping the 64-year history. *International Journal of Infectious Diseases*, 58, 69-76.
- Waman, V. P., Kale, M. M., & Kulkarni-Kale, U. (2017). Genetic diversity and evolution of dengue virus serotype 3 : A comparative genomics study. *Infection, Genetics and Evolution*, 49, 234-240.
- Wasonga, C., Inoue, S., Kimotho, J., Morita, K., Ongus, J., Sang, R., Musila, L., Wasonga, C., Inoue, S., Kimotho, J., Morita, K., Ongus, J., Sang, R., & Musila, L. (2015).

- Development and Evaluation of an in-House IgM-Capture ELISA for the Detection of Chikungunya and Its Application to a Dengue Outbreak Situation in Kenya in 2013. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 68, 410-414.
- Weaver, S. C., & Forrester, N. L. (2015). Chikungunya : Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Research*, 120, 32-39.
- Whitehead, S. S., Blaney, J. E., Durbin, A. P., & Murphy, B. R. (2007). Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews Microbiology*, 5(7), 518-528.
- WHO. (1967). *Arboviruses and human disease : Report of a WHO scientific group [meeting held in Geneva from 26 September to 1 October 1966]*. Geneva : World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/40664>
- WHO. (2018). *Dengue*. WHO | Regional Office for Africa. <https://www.afro.who.int/health-topics/dengue>
- Wilder-Smith, A., Ooi, E.-E., Horstick, O., & Wills, B. (2019). Dengue. *The Lancet*, 393(10169), 350-363. (18)32560-1
- Yacoub, S., & Wills, B. (2015). Dengue : An update for clinicians working in non-endemic areas. *Clinical Medicine (London, England)*, 15(1), 82-85.
- Yu, I.-M., Zhang, W., Holdaway, H. A., Li, L., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G., & Chen, J. (2008). Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. *Science*, 319(5871), 1834-1837.
- Yusuf, A. J., & Abdullahi, M. I. (2019). The phytochemical and pharmacological actions of *Entada africana* Guill. & Perr. *Heliyon*, 5(9), e02332.
- Zeller, H., Marrama, L., Sudre, B., Van Bortel, W., & Wans-Petit, E. (2013). Mosquito-borne disease surveillance by the European Centre for Disease Prevention and Control. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(8), 693-698.
- Zhang, C., Mammen, M. P., Chinnawirotpisan, P., Klungthong, C., Rodpradit, P., Monkongdee, P., Nimmannitya, S., Kalayanarooj, S., & Holmes, E. C. (2005). Clade Replacements in Dengue Virus Serotypes 1 and 3 Are Associated with Changing Serotype Prevalence. *Journal of Virology*, 79(24), 15123-15130.

# **Annexes**

## **Annexes**

### **Annexe 1. Notice d'information**

**TITRE DE L'ETUDE :** Détection Clinique et Moléculaire des infections liées aux virus du Chikungunya, de la Dengue and et du Zika dans quelques régions du Cameroun.

**RESPONSABLE :**

SIMO NEMG Frédy Brice

**INTRODUCTION :**

Nous vous invitons à participer à une étude portant sur les ‘‘ **Détection Clinique et Moléculaire des infections liées aux virus du Chikungunya, de la Dengue and et du Zika dans quelques régions du Cameroun**’’ au cours de laquelle un questionnaire vous sera administré.

Cependant, avant d'accepter de participer à cette étude, veuillez prendre le temps de lire, de comprendre et de considérer attentivement les renseignements qui suivent.

Ce formulaire d'information et de consentement vous explique le but de ce projet de recherche, les procédures, les avantages, les risques et les inconvénients, de même que les personnes avec qui communiquer au besoin.

**NATURE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE :**

Cette étude essentiellement transversale et a pour objectif de déterminer la prévalence des virus : de la Dengue, Chikungunya, et du zika dans la région du centre du Cameroun. Pour ce faire, nous avons besoin de collecter des informations en ce qui concerne vos antécédents médicaux et votre état actuel.

**DEROULEMENT DE L'ETUDE :**

Si vous acceptez de participer à cette étude, nous vous demanderons des informations à propos de vos données sociodémographiques, votre carrière et vos antécédents médicaux. Ceci prendra environ 10 minutes pour vous poser des questions. Vous pourrez sauter n'importe quelle question que vous ne souhaitez pas répondre. Vous pourrez aussi arrêter de répondre aux questions à n'importe quel moment.

**RISQUES POTENTIELS :**

Il n'y a aucun risque connu lié à la participation à cette étude, sauf qu'il pourrait être stressant de répondre à nos questions pour environ 20 minutes.

**AVANTAGES POSSIBLES :**

L'un des avantages liés à votre participation à cette étude est de connaître s'il existe les virus suscités en circulation dans la région du centre et comment les éviter ou traiter.

**CLAUSE DE RESPONSABILITE :**

En acceptant de participer à cette étude, vous ne renoncez à aucun de vos droits ni ne libérez les enquêteurs, le commanditaire ou les institutions impliquées de leurs obligations légales et professionnelles.

**INDEMNITE COMPENSATOIRE :**

Aucune compensation financière ou de toute nature n'est prévue en contre partie pour votre participation à l'étude.

**CONFIDENTIALITE, CONSERVATION ET UTILISATION DES RESULTATS :**

Nous vous assurons que nous respecterons la confidentialité dans les limites permises par la loi. Pour cette raison, il est crucial que les informations que vous allez nous communiquer soient des plus correctes et véridiques que possibles. En outre, les fiches d'enquête seront anonymes et les données recueillies seront traitées et conservées dans une base de données dont seuls l'investigateur principal et le data manager auront accès. S'il y a des publications dans des journaux scientifiques votre nom ne sera en aucun cas mentionné.

**PERSONNES A CONTACTER :**

Si vous avez une question par rapport à cette étude, ou si vous subissez un préjudice lié à cette étude, vous pourrez contacter l'investigateur principal de cette étude, **SIMO NEMG Frédy Brice**, téléphone : 699179605

## **Annexe 2. Fiche de consentement éclairé**

### **A compléter par les participants**

Je soussigné, Mme/Mr./Mlle.....  
(Noms et prénoms)

Avoir été invité à participer au travail de recherche intitulé : "Etude des arbovirus : cas particuliers des virus Dengue, Chikungunya et Zika chez les patients fébriles " dont l'investigateur principal s'appelle SIMO NEMG Frédy Brice. Tel: 00237699179605 E-mail : [nemgsi@yahoo.fr](mailto:nemgsi@yahoo.fr)

- J'ai bien compris la notice d'information qui m'a été remise concernant cette étude
- Ou bien on m'a lu et expliqué la notice d'information relative à cette étude
- J'ai bien compris le but et les objectifs de cette étude
- J'ai reçu toutes les réponses aux questions que j'ai posées
- Les risques et bénéfices m'ont été présentés et expliqués
- J'ai bien compris que je suis libre d'accepter ou de refuser d'y participer

Mon consentement ne décharge pas les investigateurs de la recherche de leurs responsabilités, je conserve tous mes droits garantis par la loi

J'accepte librement de participer à cette étude dans les conditions précisées dans la notice d'information, c'est-à-dire :

- De répondre aux questions d'enquête
- De communiquer les informations médicales
- De donner 5ml de mon sang
- Etc.

Je donne mon accord pour que le reste des échantillons prélevés pour cette étude soient utilisés dans les études ultérieures.

Fait à.....le \_\_ / \_\_ / \_\_

Investigatrice principale (noms)  
.....

participant ou son représentant légal (noms et adresse)  
.....



### **Annexe 3. Formulaire d'assentiment des parents.**

#### **A compléter par les parents ou tuteurs des enfants mineurs**

Je soussigné, Mme/Mr./Mlle.....  
(Noms et prénoms) parents ou tuteurs du  
nommé(e).....(Noms et prénoms)

Ayant été invité(e) à participer au travail de recherche intitulé : " Etude des arbovirus : cas particuliers des virus Dengue, Chikungunya et Zika chez les patients fébriles " dont l'investigateur principal s'appelle SIMO NEMG Frédy Brice. Tel: 00237699179605 E-mail : [nemgsi@yahoo.fr](mailto:nemgsi@yahoo.fr)

- J'ai bien compris la notice d'information qui m'a été remise concernant cette étude
- Ou bien on m'a lu et expliqué la notice d'information relative à cette étude
- J'ai bien compris le but et les objectifs de cette étude
- J'ai reçu toutes les réponses aux questions que j'ai posées
- Les risques et bénéfices m'ont été présentés et expliqués
- J'ai bien compris que je suis libre d'accepter ou de refuser que mon enfant y participe

Mon assentiment ne décharge pas les investigateurs de la recherche de leurs responsabilités, je conserve tous les droits garantis par la loi que j'ai sur mon enfant

J'accepte librement que mon enfant participe à cette étude dans les conditions précisées dans la notice d'information, c'est-à-dire :

- De répondre aux questions d'enquête
- De communiquer les informations médicales
- D'accepter que 5ml de son sang soit prélevé
- Etc.

Je donne mon accord pour que le reste des échantillons prélevés pour cette étude soient utilisés dans les études ultérieures.

Fait à.....le \_\_ / \_\_ / \_\_

Investigatrice principale (noms)

Parents ou tuteurs (noms et adresse)

.....

.....

## **Annexe 4. Questionnaire**

### **QUESTIONNAIRE**

#### **Structure sanitaire :**

#### **I. Identification du participant**

Code questionnaire N° \_\_\_\_\_

1-Niveau scolaire : Non scolarisé  Primaire  Secondaire  Universitaire

2-Sexe : féminin  masculin

3-Quelle est votre tranche d'âge (ans) : 0 à 10  11 à 21  22 à 32  33 à 43

44 à 54  55 à 65  65 et plus

3--Situation matrimoniale : fiancé(e)  marié(e)  divorcé(e)  Célibataire   
Veuf (ve)

4-Profession : Commerçant(e)  fonctionnaires  Particuliers  | autres

#### **II. Aspect environnemental et connaissance du sujet**

6-Avez-vous déjà entendu parler de ces arbovirus : Dengue  Chikungunya  Zika

7-Dormez-vous sur une moustiquaire imprégnée ? Oui  non

8-Utilisez-vous des insecticides ? Oui  non

9-Autour de votre maison y'a-t-il : des réservoirs d'eau stagnante

Pneus abandonnés  des soucoupes de fleur

10-Après chaque pluie, videz –vous les réservoirs d'eau qui peuvent se trouver autour de

votre maison Oui  non

11-Quel est votre tenue vestimentaire habituelle : Exposée  recouvrant tout le corps

Autres \_\_\_\_\_

12-Avez-vous voyagé ces deux dernières semaines oui  non

Si oui précisé \_\_\_\_\_

### **III. symptômes majeurs**

13-Température : \_\_\_\_\_

14-Depuis combien de temps avez-vous la fièvre : 1 à 5 jours  \_\_\_\_\_

6 à 15 jours  15 jours et plus

15-Avez-vous des : douleurs articulaires  vomissements

Douleurs musculaires  Céphalées

16-Avez-vous des éruptions cutanées ? Oui  non

### **IV. Fiche réservée au laboratoire**

Date de collecte de l'échantillon : \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_heure

: Code : \_\_\_\_\_

#### **Identification des virus et résultats GE/TDR**

17- RNA du virus Dengue : présent  absent

*Etude des virus Dengue et Chikungunya : Aspects épidémiologique et pharmacologique.*

Si présent quel(s) sérotype(s) 1  2  3  4

18- RNA du virus Zika : présent  absent

19-Chikungunya présent  absent

20-Résultats GE/TDR : positif  négatif

**Annexe 5. Autorisation administrative**

**COMITE NATIONAL D'ETHIQUE DE LA RECHERCHE POUR LA  
SANTÉ HUMAINE**

Arrêté N° 0977/A/MINSANTE/SESP/SG/DROS/ du 18 avril 2012 portant création, organisation et fonctionnement des comités d'éthique de la recherche pour la santé humaine au sein des structures relevant du Ministère en charge de la santé publique

N° 2017/03/881/L/CNERSH/SP Yaoundé, le 17 mars 2017

[Cnethique\\_minsante@yahoo.fr](mailto:Cnethique_minsante@yahoo.fr)

**LETTRE D'INFORMATION**

Le Comité National d'Éthique de la Recherche pour la Santé Humaine (CNERSH), en sa session extraordinaire du 17 mars 2017, a examiné le projet de recherche intitulé: «Etude des arbovirus: cas particuliers des virus Dengue, Chikungunya et Zika chez les patients fébriles reçus en consultation à l'hôpital de district de New-Bell» soumis par Madame SADO YOUSSEU Francine Berlangé, Investigateur Principal, étudiante à la Faculté des Sciences, Université de Dschang.


Le Comité a formulé les observations et suggestions suivantes :

- A la virgule près, c'est le même protocole de recherche que celui de l'étudiant MATUNDU Emmanuel NDAM et de l'étudiante MBOCHÉ NGUIFFO Lydie Gaëlle, tous étant encadré par le Docteur DEMANOU Maurice
- Est-ce que c'est le projet du professeur?
- L'étudiant doit apprendre à écrire un protocole de recherche
- Les 03 étudiants sont convoqués à la prochaine réunion d'évaluation des protocoles de recherche

Le Comité a émis un avis favorable sous réserve de l'intégration des suggestions faites par les membres du comité avant la délivrance de la clairance éthique.

Ampliations

- MINSANTE



Président  
Suzare KAPTUE

PAIX – TRAVAIL – PATRIE  
MINISTÈRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE  
SECRETARIAT GÉNÉRAL  
DIRECTION DE LA LUTTE CONTRE LA MALADIE  
LES ÉPIDÉMIES ET LES PANDEMIES

N° 131-1a /L/MINSANTE/SG/DLMEP/SDLEP/CSLEP/CBI.

Peace – Work – Fatherland  
MINISTRY OF PUBLIC HEALTH  
SECRETARIAT GENERAL  
DEPARTMENT OF DISEASE, EPIDEMICS  
AND PANDEMICS CONTROL

Yaoundé le, 20 JUIN 2017.

LE MINISTRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE  
A  
MONSIEUR LE DIRECTEUR GÉNÉRAL  
DU CPC

**Objet:** Investigation des cas suspects de  
Dengue dans le DS Kribi, Région du  
Sud

**Monsieur le Directeur Général,**

Suite à la confirmation de cas de Dengue dans le District de Santé d'Efoulan et qui ont séjourné à Kribi pendant leur période d'incubation, une mission d'investigation approfondie a été planifiée pour la période du 18 au 23 juin 2017 dans le District de Santé de Kribi.

Aussi, vous saurai-je gré des dispositions diligentes qu'il vous plaira de prendre afin d'assurer la participation à la dite mission de votre collaborateur **Dr DEMANOU Maurice**.

Veuillez agréer **Monsieur le Directeur Général**, l'assurance de ma considération distinguée./-

La prise en charge de cette activité sera assurée par le CAFETP.

**Ampliations :**

- CAB/MINSANTE/SESP
- SG MINSANTE
- CPC Yaoundé
- DLMEP
- Concernés
- Archives /Chronos



**André MAMA FOUA**

**COMITE NATIONAL D'ETHIQUE DE LA RECHERCHE POUR LA  
SANTÉ HUMAINE**

Arrêté N° 0977/A/MINSANTE/SESP/SG/DROS/ du 18 avril 2012 portant création, organisation et fonctionnement des comités d'éthique de la recherche pour la santé humaine au sein des structures relevant du Ministère en charge de la santé publique

N° 2017/03/384/L/CNERSH/SP

Yaoundé, le 17 mars 2017

Cnethique\_minsante@yahoo.fr

**LETTRE D'INFORMATION**

Le Comité National d'Éthique de la Recherche pour la Santé Humaine (CNERSH), en sa session extraordinaire du 17 mars 2017, a examiné le projet de recherche intitulé: «**Étude des arbovirus: cas particuliers des virus Dengue, Chikungunya et Zika chez les patients reçus en consultation à l'hôpital de district de Famla à Bafoussam**» soumis par Madame **MBOCHE NGUIFFO Lydie Gaëlle**, Investigateur Principal, étudiante à la Faculté des Sciences, Université de Dschang.

Le Comité a formulé les observations et suggestions suivantes :

- C'est le même protocole de recherche que celui de l'étudiant **MATUNDU Emmanuel NDAM** et de l'étudiante **SADO YOUSSEU Francine Berlangue** tous étant encadré par le **Docteur DEMANOU Maurice**
- Est-ce que c'est le projet du professeur?
- L'étudiant doit apprendre à écrire un protocole de recherche
- Les 03 étudiants sont convoqués à la prochaine réunion d'évaluation des protocoles de recherche

Le Comité a émis un **avis favorable** sous réserve de l'intégration des suggestions faites par les membres du comité avant la délivrance de la clairance éthique.

Ampliations

- MINSANTE



président

**Pr. Bazare KAPTUE**

MBOGHE NGUIFFO Lydie Gaëlle  
S/C Chef de Département des Sciences Biomédicale/FS/UD,  
BP : 67 Dschang.  
Tel : +237 698371067, Email : mboqhe.gaelle@univob.fr

mercredi, 22 Février 2017

A

Monsieur le Chef de District de Santé

**Objet :** Demande d'autorisation

Monsieur :

Je viens auprès de votre haute personnalité solliciter une autorisation de recherche.

En effet, je suis étudiante en Master professionnel II option "Biologie Clinique" à l'université de Dschang, et je souhaite mener une étude sur le thème « ETUDE DES ARBOVIRUS : CAS PARTICULIERS DES VIRUS DENGUE ZIKA ET CHIKUNGUNYA CHEZ LES PATIENTS FEBRILES RECUS EN CONSULTATION A L'HOPITAL DE DISTRICT DE FAMLA A BAFOUSSAM. » en vue de la préparation de mon mémoire de fin de cycle.

En espérant une suite favorable à cette demande, veuillez agréer Monsieur, l'expression de mon profond respect.

Pièces jointes :

Autorisation du délégué régional

Accord d'accès  
à l'Hôpital

MBOGHE NGUIFFO Lydie Gaëlle





Dschang, le 22 Décembre 2016

SADO YOUSSEU Francine Berlang  
Etudiante en master 2 option  
Biologie clinique  
Tel : 678527373  
E.mail : francine.sado@yahoo.fr

A  
Monsieur le Directeur de  
l'Hôpital de District de New-bell

**Objet** : demande d'autorisation de recherche

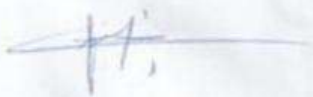
J'ai l'honneur de venir auprès de votre haute personnalité solliciter une autorisation de recherche dans votre structure.

En effet je suis étudiante en deuxième année de master en Science Biomédicale option Biologie Clinique à l'université de Dschang et je solliciterais faire une recherche de trois mois dans votre structure qui débutera en Mars et s'achèvera en Juin 2017. Ma recherche porte sur l'étude de la circulation de trois arbovirus à savoir les virus Dengue, Zika et Chikungunya.

Dans l'attente d'une suite favorable, veuillez agréer Monsieur le Directeur l'expression de mon profond respect.

SADO YOUSSEU Francine B.


Monsieur le Directeur




OK pour la recherche au Labo pour accuser



Dr. H. H. H. H.  
Médecin, ONMC 5179  
Tel. 699 88 35 83

 **REPUBLIQUE DU CAMEROUN**  
Paix - Travail - Patrie  
**UNIVERSITE DE DOUALA**

**REPUBLIC OF CAMEROON**  
Peace - Work - Fatherland  
**UNIVERSITY OF DOUALA**



**INSTITUTIONAL ETHICS COMMITTEE FOR RESEARCH ON HUMAN HEALTH**

N° 1447 IEC-UD/ 06/2018/T

Douala, the 07<sup>th</sup> of June 2018

**ETHICAL CLEARANCE**

The Institutional Ethics Committee for Research on Human Health of the University of Douala (IEC-UDo) for the 07<sup>th</sup> of June 2018 evaluation session, has examined the research project entitled « **Clinical and molecular detection of chikungunya, dengue and zika virus infections in Mefou, Center Region Cameroon** » submitted by **AKOUE NGAPE Rodrigue** for a Thesis at the Higher Institute of Medical Technology of Yaounde.

The present research project has a clear scientific interest and presents no risk for its participants. The objectives and methodology of this research project are clearly described. The principle of data confidentiality is respected. The required expertise for the supervision of the research is present.


From the above mentioned observations, the IEC-UDo approves this version of the project for a period of one year.

However, **AKOUE NGAPE Rodrigue** is responsible of the scrupulous respect of the methodology and ethical consideration, and should not amend it without approval of the IEC-UDo. Researchers are expected to collaborate with the IEC-UDo for a follow-up of the ethical aspects of the approved project. A copy of the final report of this research project should be submitted to IEC-UD for archival purposes.

The present ethical clearance is delivered to serve the purpose for which it is presented. It can be cancelled in case of non-respect of the above recommendations.

Copy

- MINPH

 The PRESIDENT  
*[Signature]*  
Leopold Gustave LEHMAN

NB : Only one copy of an ethical clearance is delivered.

N° 0977/Minsante/SESP/SG/DROS of April 16, 2012  
Campus de Logbessou, 3è étage du bloc pédagogique de la FMSP.  
Tél. : (237) 680.35.98.35 / 695.39.35.50 / B.P. : 2701 Douala - Cameroun / e-mail : ceil@univ-douala.cm

## **Annexe 6. Préparation des tampons et réactifs**

### **Tampon AW1 (98ml)**

- 130ml d'éthanol absolu qsp 228ml

### **Tampon AW2 (66ml)**

- 160ml d'éthanol absolu qsp 226ml

**NB:** -Les tampons AW1 et AW2 reconstitués sont stables un an en flacon fermé à température ambiante.

Inscrire la date du jour de la reconstitution, les initiaux de nom de l'opérateur et cocher « ethanol added ».

### **Carrier RNA (310µg lyophilisé)**

- 310µL d'eau distillée DNase/RNase qsp 1µg/µl.
- Dissoudre complètement et conserver à -20°C après utilisation. Le carrier ne doit pas être décongelé plus de 3 fois.

### **Tampon de lyse (tampon AVL + ARN carrier)**

- S'assurer de l'absence de précipité dans le tampon AVL et si nécessaire incuber le tampon à +80°C jusqu'à dissolution complète du précipité.
- Ajouter 1ml de tampon AVL dans le tube d'ARN carrier, laisser à température ambiante pendant 1min pour solubiliser.
- Vortexer ensuite centrifugé à 6000g pendant 30sec.
- Suspendre le mélange dans le reste de solution tampon AVL.
- Inscrire sur la boîte la date de reconstitution.

### **Préparation des amorces et des sondes**

- Avant leur reconstitution, conserver les kits à une température comprise entre 2° et 8°C à l'obscurité
- Précautions : ces réactifs doivent être manipulés dans une zone propre et conservés à des températures appropriées à l'obscurité. Les cycles de gel-dégel doivent être évités. Maintenir au froid les composantes dégelées.
- Reconstituer avec soins les réactifs lyophilisés dans 250µl de tampon Tris 10mM (pH 7.4 à 8.2), ou dans 250µl d'eau de qualité PCR (exempt de nucléase). Laisser la reconstitution procéder pendant 15min à la température ambiante à l'obscurité.
- Mélanger au vortex chaque tube pour obtenir une solution uniforme, puis préparer 5 aliquotes de 50µl du mélange d'amorces/sondes dans des tubes pré-étiquetés.
- Conserver les aliquotes d'amorces/sondes reconstitués à une température <-20°C. Ne pas conserver dans des congélateurs sans givre.

- Les aliquotes d'amorces/sondes reconstitués peuvent être conservées jusqu'à 24 mois.
- Pendant une période d'utilisation fréquente, les aliquotes de sondes/amorces dégelées peuvent être conservées à l'obscurité jusqu'à 4 mois à température comprise entre 2° et 8°C

Ne pas recongeler les aliquotes reconstitués.

Mix pour RT-PCR en temps réel

Mélange réactionnel		
	Echantillons	RNase P
ARN (µL)	10	10
Mélange 2X (µL)	12,5	12,5
Mélange de chaque couple d'amorce (DEN V, ZIK V, CHIK V sens 5'-3' et antisens 3'-5') (20 mM)	0,5	/
Mélange de chaque couple d'amorce (RP sens 5'-3' et antisens 3'-5') (20 mM)	/	0,5
Eau dépourvue de RNase (µL)	0,5	0,5
Enzyme superscript III TR/platinum Taq Enzyme Mix (µL)	0,5	/
superscript™ III Reverse Transcriptase (µL)	/	0,5
Transcription inverse : 50° C, 30 min		
Dénaturation de reverse transcriptase et activation de la Taq Polymérase : 95° C, 2 min		
Amplification (45 cycles): dénaturation à 95° C, 15 s + hybridation et élongation, 60° C, 1 min		

Mix pour RT-PCR de sérotypage dengue

Mélange réactionnel	
Réactifs	Volumes (µL)
ARN extrait	5
Amorce mD1 (20 mM)	1
Amorce D2 (20 mM)	1
Eau dépourvue de DNase/RNase	34,5
dNTP (10 mM)	1
Tampon Taq 10X	5
Mg <sup>2+</sup> (50 mM)	1,5
Taq Polymérase 1X	1

Mélange réactionnel	
Réactifs	Volumes (µL)
Amplicon	5
Amorce mD1 en combinaison avec rTSA/ mTS2/TS3 /rTS4 (20 mM)	1
Eau dépourvue de DNase et RNase	34,5
dNTP (10 mM)	1
Tampon Taq 10X	5
Mg <sup>2+</sup> (50 mM)	1,5
Taq Polymérase 1X	1

Mix pour PCR de genotypage dengue

Mélange réactionnel	
Réactifs	Volumes (µL)
ARN	10
Eau dépourvue de RNase et DNase	13,5
Tampon 2X	25
Amorce d1s22 et d1a17 (20 mM)	0,5
Superscript III reverse transcriptase	1

Mélange réactionnel	
Réactifs	Volumes (µL)
Amplicon	5
Eau dépourvue de RNase et DNase	40
Amorce d1a17 et d1s6 (20 mM)	0,5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5
dNTP (10 mM)	1
Tampon de PCR 10 X	5
Taq DNA Polymerase 1X	1

## Annexe 7 : Agence de financement

Je remercie :



→ La *Research Training Fellowship for Developing Country Scientist (RTF-DCS)*, pour la bourse d'étude de 6 mois (N° S/CMR 15-06) qu'elle m'a octroyée.



→ Le *Laboratoire de recherche sur le Chikungunya de l'Institut de Sciences de la vie* qui a bien voulu supporter les coûts liés aux manipulations lors de mon séjour en Inde.



→ Le *Projet interne Arbovirus financé par la Direction scientifique du CPC* qui a bien voulu supporter les coûts des manipulations dans cette institution.

## **Annexe 8 : Listes des publications**

- **Nemg Simo, F.B.**, Sado Yousseu, F.B., Evouna Mbarga, A., Bigna, J.J., Melong, A., Ntoudé, A., Kamgang, B., Bouyne, R., Moundipa Fewou, P., Demanou, M., 2018. Investigation of an Outbreak of Dengue Virus Serotype 1 in a Rural Area of Kribi, South Cameroon: A Cross-Sectional Study. *Intervirology* 61, 265–271. <https://doi.org/10.1159/000499465>
- **Simo, F.B.N.**, Bigna, J.J., Kenmoe, S., Ndangang, M.S., Temfack, E., Moundipa, P.F., Demanou, M., 2019. Dengue virus infection in people residing in Africa: a systematic review and meta-analysis of prevalence studies. *Sci. Rep.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50135-x>
- **Simo, F.B.N.**, Bigna, J.J., Well, E.A., Kenmoe, S., Sado, F.B.Y., Weaver, S.C., Moundipa, P.F., Demanou, M., 2018. Chikungunya virus infection prevalence in Africa: a contemporaneous systematic review and meta-analysis. *Public Health* 166, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2018.09.027>
- Yousseu, F.B.S., **Nemg, F.B.S.**, Ngouanet, S.A., Mekanda, F.M.O., Demanou, M., 2018. Detection and serotyping of dengue viruses in febrile patients consulting at the New-Bell District Hospital in Douala, Cameroon. *PLOS ONE* 13, e0204143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204143>