

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE MOULOUD MAMMERE DE TIZI
OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET
DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE

De fin d'études

En vue d'obtention du diplôme de
MASTER en Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie des populations et des organismes

Thème

Détection et caractérisation des arbovirus à partir des tiques
de la région de Tizi-Ouzou (Mekla et Bouzeguene).

Travail réalisé par : **SIGUERDJIDJENE Sarah**
SERIDJ Taous

Soutenu le : 12/ 09/ 2024

Devant le jury compose de :

Président: Mme TALEB karima MCA

Examinatrice : Mme DJIOUA ouiza MAA

Co-promoteur : Mme BRAHMI karima

Promoteur : Mr BENALLAL Kamal eddine

Remerciements

À notre DIEU tout puissant de nous avoir donné le courage, la force, la volonté et surtout la patience pour réaliser ce modeste mémoire.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre promoteur, Mr BENALLAL Kamel, pour son soutien inestimable tout au long de la réalisation de ce mémoire. Vos conseils et votre soutien ont été essentiels pour mener à bien ce projet.

Nous remercions notre co-promotrice, Mme BRAHMI Karima de nous avoir accompagnés tout au long de notre travail.

Nous souhaitons également adresser nos remerciements à Mme TALEB karima MCA pour avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Nous remercions Mme DJIOUA ouiza MAA d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous tenons à remercier également les éleveurs de Bouzeguène et de Mekla qui ont bien voulu nous accueillir et nous permettre d'effectuer notre échantillonnage.

Enfin, nous exprimons notre gratitude à toutes les personnes qui nous ont apporté leur soutien et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicaces

Ce projet de fin d'études est dédié :

À mes parents, votre amour inconditionnel et vos sacrifices ont été les fondations de mon parcours. Merci pour votre soutien constant, vos encouragements et votre foi en moi. Ce travail est le reflet de tout ce que vous m'avez transmis.

À mes chères sœurs et frères qui m'ont toujours soutenu et encouragé.

À tous mes amis et camarades de sport, en particulier à mon coach S. DJEDDI, je tiens à vous exprimer ma gratitude pour votre soutien constant, vos encouragements et les moments de bonheur que nous avons partagés tout au long de ce parcours. Votre amitié a été une véritable source de motivation et de réconfort dans les instants difficiles.

À mon binôme Sarah, une personne chère à mon cœur, qui a été à mes côtés tout au long de cette année, partageant avec moi de nombreux moments et défis.

Tous



Dédicaces

Je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers.

À mes chers parents

Je tiens à honorer tout ce que vous avez fait pour moi, même si aucune dédicace ne peut vraiment exprimer la gratitude, l'affection et le respect que je ressens pour vos sacrifices. Je vous suis profondément reconnaissante pour le soutien et l'amour que vous m'avez offerts. J'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours. Que ce travail, bien que modeste, reflète vos espérances et le fruit de vos efforts. Que Dieu, le Tout-Puissant, vous accorde santé, bonheur et une longue vie.

À mes frères et ma sœur

À ceux qui ont partagé avec moi les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail, votre présence a été précieuse et réconfortante, ensemble nous sommes plus forts.

À mes camarades

À tous mes amis avec qui j'ai partagé une partie de mon parcours et avec qui j'ai vécu des moments inoubliables de joie et de folie au cours de ces années universitaires. Votre complicité et votre bienveillance ont été inestimables.

À mon binôme Taous

À toi, chère amie et collaboratrice, tu as été une source d'inspiration et de motivation tout au long de ce parcours. Merci pour notre collaboration fructueuse et notre amitié.

À toutes les personnes précieuses

Qui ont joué un rôle significatif dans mon parcours, je vous exprime ma profonde gratitude pour votre présence et votre soutien, qui ont marqué ma vie de manière positive.

Sarah

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1- Classification des espèces de tique | 06 |
| Figure 2- Morphologie général d'une tique Ixodidae | 07 |
| Figure 3- Anatomie externe générale des tiques dures | 07 |
| Figure 4- Anatomie interne des <i>Ixodes</i> | 09 |
| Figure 5- Principaux effets de la salive de tique sur la pharmacologie et l'immunité de l'hôte vertébré | 10 |
| Figure 6- Cycle de reproduction des tiques dures | 11 |
| Figure 7 - Les différents types de cycle des <i>Ixodidae</i> | 12 |
| Figure 8- Organisation génomique du virus TBE | 15 |
| Figure 9- Cycle de circulation du CCHF virus | 17 |
| Figure 10- Représentation schématique d'une particule virale d'un orthonairovirus et de son génome | 18 |
| Figure 11- Carte géographique des sites de collecte des tiques | 2à |
| Figure 12- Tique fixée sur l'oreille d'un mouton; B : Tique fixée sur la mamelle d'une vache (B..... | 21 |
| Figure 13- A: Méthode du drapeau ; B: Tique sur le drapeau..... | 21 |
| Figure14- laboratoire des arbovirus et des virus émergents, l'Institut Pasteur d'Algérie, annexe Sidi-Fredj | 22 |
| Figure 15- Schéma des étapes suivies dans la BSL3 | 24 |
| Figure 16- Un schéma des étapes suivies dans la BSL2..... | 25 |
| Figure 17- Automate "Smart Cycler" piloté par un ordinateur | 26 |
| Figure 18- un schéma des étapes de Mix | 26 |
| Figure 19 – un schéma des étapes de la migration sur le gel d'agarose | 30 |
| Figure 20– Principe du séquençage de l'ADN à l'aide d'électrophorèse capillaire en gel..... | 31 |
| Figure 21- Représentation graphique des résultats de la récolte des tiques | 36 |
| Figure 22- Densité des tiques par stades..... | 37 |
| Figure 23- Graphe représentant des résultats de L'eGFP | 40 |
| Figure 24- Graphe représentant un résultat négatif de TBE..... | 42 |
| Figure 25- Graphe représentant un résultat négatif de CCHF | 45 |
| Figure 26- Résultats de l'identification moléculaire des échantillons sur gel d'agarose..... | 46 |
| Figure 27- Exemple de résultats obtenus après une lecture par le logiciel "BioEdit | 46 |
| Figure 28- Arbre phylogénétique des tiques | 49 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1- Principales maladies associées aux tiques | 13 |
| Tableau 2- Calculs des volumes du mélange de Mix qRT-PCR (CCHF) | 27 |
| Tableau 3- Calculs des volumes du mélange de Mix qRT-PCR (TBE) | 27 |
| Tableau4- Calculs des volumes du mélange de Mix Qrt-PCR (eGFP)..... | 27 |
| Tableau 5- Programme thermocycleur de RT-PCR | 28 |
| Tableau 6- Calculs des volumes du mélange de Mix mtADN | 29 |
| Tableau 7- Programme thermocycleur de PCR mtADN | 29 |
| Tableau 8- Composition du mélange pour le Mix Amorce LCO | 32 |
| Tableau 9- Composition du mélange pour le Mix Amorce LCO | 32 |
| Tableau10- Profil thermique pour la réaction de RT-PCR | 32 |
| Tableau 11– Résultats de la récolte | 35 |
| Tableau 12- Densité des tiques par mois et par stades | 36 |
| Tableau 13- résultats de la RT PCR pour eGFP | 38 |
| Tableau 14- Résultats de la RT PCR pour TBE | 40 |
| Tableau 15- Résultats de la RT PCR pour CCHF..... | 43 |
| Tableau 16- Liste des échantillons utilisés pour l'identification moléculaire..... | 45 |
| Tableau 17- Résultats de l'identification moléculaire sur BLAST..... | 47 |

Liste des abréviations

TBE Encéphalite à tique

TBEV Encéphalites virales à tique

CCHF Fièvre hémorragique de Crimée-Congo

CCHFV Virus de la fièvre hémorragique du Crimée-Congo

COI Gène cytochrome C oxidase I

PCR Polymerase Chain Reaction

RT-PCR Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

RT Rétrotranscription

ADN Acide Desoxy Ribonucléique

ARN Acide RiboNucléique

ADNc ADN complémentaire

BSL2 / P2 Laboratoire de niveau de sécurité biologique 2

BSL3 / P3 Laboratoire de niveau de sécurité biologique 3

SVF Sérum de veau fœtal

RAV1 Tampon RIPA avec ajout de Vanadate 1

RAW RIPA avec inhibiteurs anti-protéase et anti-phosphatase

RAV3 RIPA avec inhibiteurs anti-protéase et anti-phosphatase 3

eGFP Protéine fluorescente verte améliorée

Tampon TBE Tris-Borate-EDTA

H₂O Eau

A Adénine

T Thymine

C Cytosine

G Guanine

dNTP désoxynucléotides triphosphates

ddNTP dideoxynucléotides triphosphates

HCO

LCO

NJ Arbre neighbor joining

% pourcentage.

T° Température.

°C Degré Celsius.

µl Microlitre.

Km kilomètre.

Km2 kilomètre carré

Mm millimètre.

m mètre

UV Ultra Violet

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Liste des abréviations | |
| INTRODUCTION | 01 |
| Chapitre I : Synthèse Bibliographique | |
| I.1.Généralité sur les tiques | 04 |
| I.1.1. Systématique..... | 04 |
| I.1.2. Morphologie générales des tiques | 05 |
| I.1.2.1.Morphologies externe des <i>Ixodidae</i> | 06 |
| I.1.2.1.1. Le tégument | 07 |
| I.1.2.1.2. Le capitulum | 07 |
| I.1.2.1.3. L'idiosome | 07 |
| I.1.2.1.4. Les organes sensoriels | 08 |
| I.1.2.2. Morphologies interne | 08 |
| I.1.2.2.1. Les glandes salivaires | 09 |
| I.1.2.2.2. rôle de la salive..... | 09 |
| I.1.3. Cycle de développement des tiques | 10 |
| I.1.3.1. Type de cycle..... | 10 |
| I.2. Importances médicale et vétérinaire des tiques | 11 |
| I.2.1. Le rôle vecteur | 11 |
| I.2.1.1. Modes d'infestation des tiques..... | 11 |
| I.3. les principales pathologies transmises par les tiques | 12 |
| I.3.1. Les arbovirus | 13 |
| I.3.1.1. La maladie de l'encéphalite à tiques (TBEV) | 13 |
| I.3.1.1.1. Caractéristiques et structure | 14 |
| I.3.1.1.2. Manifestation clinique TBE | 14 |
| I.3.1.2. La maladie de fièvre hémorragique de Crimée-Congo | 15 |
| I.3.1.2.1. caractéristique et structure | 16 |
| I.3.1.2.2. Manifestation clinique | 17 |

Chapitre II : MATERIEL ET METHODE

| | |
|--|----|
| II.1. Choix des stations d'études | 19 |
| II.1.2. zones de récolte | 19 |
| II.2. Méthode d'échantillonnage des tiques..... | 20 |
| II.2.1. Collecte des tiques sur les animaux | 20 |
| II.2.2. Collecte des tiques Sur la végétation | 20 |
| II.3. Lieux du stage | 21 |
| II.4. Méthode d'identifications des tiques | 21 |
| II.5. extraction de l'ARN viral..... | 21 |
| II.5.1. Broyage et neutralisation des virus | 21 |
| II.5.1.1. - Etapes BSL 3 | 21 |
| II.5.1.2. - Etapes BSL 2 | 23 |
| II.6. Identification par RT-PCR..... | 25 |
| II.6.1. Principe de RT-PCR | 25 |
| II.6.2. Préparation du Mix | 25 |
| II.6.2.1. Mix qRT PCR du virus de la fièvre hémorragique du Crimée-Congo (CCHF)..... | 26 |
| II.6.2.2. Mix qRT PCR du virus de l'encéphalite à tique (TBE)..... | 26 |
| II.6.2.3. Mix Real time RT-PCR eGFP | 26 |
| II.6.3. Profile thermique de RT-PCR..... | 27 |
| II.7. Identification moléculaire des tiques | 27 |
| II.7.1. Réaction en chaine de polymérisation (PCR) | 27 |
| II.7.2. Préparation du Mix PCR mtADN | 27 |
| II.7.3. Profil thermique | 28 |
| II.8. Electrophorèse sur gel d'agarose à 2% | 28 |
| II.8.1. Préparation du gel d'agarose..... | 28 |
| II.9. Séquençage | 29 |
| II.9.1. Méthode de Sanger | 29 |
| II.9.2. Purification post-amplification..... | 30 |
| II.9.3. Echantillons PCR mitochondrie HCO/LCO..... | 31 |
| II.9.3.1. Mix Amorce HCO | 31 |
| II.9.3.2. Mix Amorce LCO | 31 |
| II.9.4. Profil thermique | 31 |
| II.10. Analyse des produits de séquençage..... | 32 |
| II.11. Construction de l'arbre phylogénétique..... | 32 |

Chapitre III : Résultats

| | |
|--|----|
| III.1. Résultats de l'effectif des tiques dans la région de Tizi-Ouzou | 36 |
| III.1.1. - Résultats globale de la récolte des tiques | 36 |
| III.1.2. Résultats de la récolte des tiques en fonction des stades de développements | 36 |
| III.2. Analyse des tiques | 37 |
| III.3. Identification des tiques..... | 37 |
| III.4. Résultats de la RT-PCR..... | 38 |
| III.4.1. Résultats de la RT-PCR Egfp | 38 |
| III.4.2. Résultats de la RT-PCR TBE | 40 |
| III.4.3. Résultats de la RT-PCR CCHF..... | 43 |
| III.5. L'identification moléculaire..... | 45 |
| III.6. Résultats du séquençage | 46 |
| III.7. Résultats d'identification moléculaire et l'arbre phylogénétique | 47 |

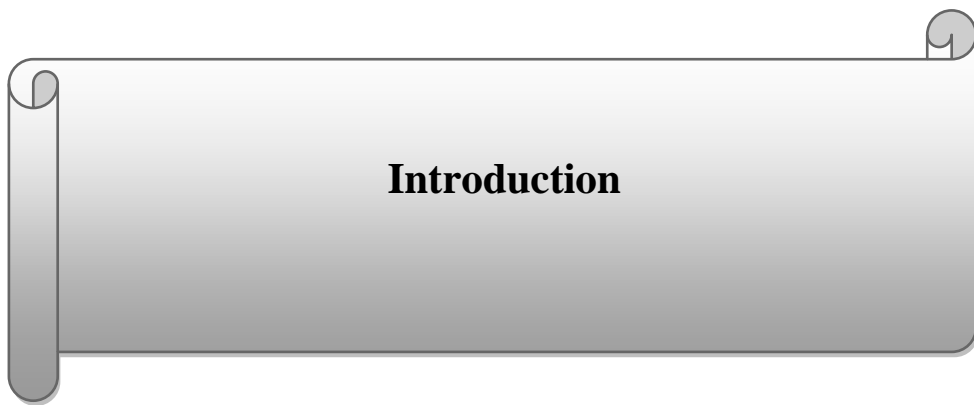
Chapitre IV : Discussion

| | |
|---|----|
| IV.1. Discussion des résultats de l'effectif des tiques dans la région de Tizi-Ouzou..... | 51 |
| IV.2. Discussion résultats globale de la récolte des tiques | 52 |
| IV.3. Discussion des résultats de l'identification | 52 |
| IV.4. Discussion des résultats de l'identification moléculaire | 53 |
| IV.5. Discussion des résultats de RT-PCR..... | 53 |
| IV.5.1. Discussion des résultats de RT-PCR TBE..... | 54 |
| IV.5.2. Discussion des résultats de RT-PCR CCHF..... | 54 |
| V. Conclusion..... | 56 |

VI. Références

VII. Résumé

VIII. Annexes



Introduction

Les tiques occupent la deuxième place dans la transmission des maladies infectieuses pour l'homme (Parola and Raoult, 2001), elles se situent immédiatement après les moustiques en tant que vecteurs d'arbovirus, elles sont résistantes aux conditions hostiles et douées d'une bonne longévité. Les tiques restent infectées tout au long de leur vie, ce qui signifie que l'infection peut se transmettre à travers les divers stades de leur cycle de vie. De plus, la transmission transovarienne des arbovirus est relativement courante chez les tiques, ce qui permet à ces agents pathogènes de se maintenir efficacement dans les populations de tiques. En outre, les tiques infectées peuvent être transportées à distance par leurs hôtes, ce qui facilite la diffusion des virus. Lorsque des oiseaux migrateurs sont impliqués, la transmission intracontinentale et intercontinentale des virus est assurée, ce qui permet une diffusion plus large de ces agents pathogènes (Deubel, 2002).

Les arboviroses impliquent généralement un ou plusieurs hôtes vertébrés amplificateurs, le plus souvent des mammifères ou des oiseaux. L'Homme, peut parfois jouer un rôle dans la transmission, notamment lors de zoonoses. Les interactions complexes entre virus, vecteurs et hôtes sont cruciales pour comprendre la dynamique des maladies infectieuses et élaborer des stratégies de contrôle efficaces. Elles offrent également des perspectives sur l'évolution des pathogènes et leur adaptation, tout en constituant une base pour des études virologiques fondamentales (Chippaux, 2003).

Les arboviroses, constituent un groupe hétérogène d'infections virales transmises à l'Homme et aux animaux par des arthropodes hématophages, principalement les moustiques, les phlébotomes et les tiques. Bien que plus de 500 arbovirus et virus zoonotiques aient été identifiés à ce jour, répartis dans sept familles virales majeures dont les Flaviviridae et les Bunyaviridae, seule une fraction d'entre eux est réellement pathogène pour l'Homme et capable de causer des épidémies potentiellement mortelles (Deubel & Georges-Courbot, 2002).

Autrefois cantonnées à certaines régions tropicales et subtropicales du globe, de nombreuses arboviroses connaissent aujourd'hui une expansion géographique inquiétante, favorisée par des facteurs multiples : évolution des virus et des vecteurs, changements climatiques, intensification des échanges commerciaux et des voyages internationaux, modifications des écosystèmes et des comportements humains (Yuill, 2023). Cette émergence et résurgence des arboviroses représentent un défi majeur pour la santé publique mondiale.

En raison de l'absence des recherches sur les arbovirus en Algérie et des signalements récents d'encéphalites dans les hôpitaux, notamment dans la wilaya de Tizi-Ouzou, il est pertinent d'explorer la possibilité que ces encéphalites soient causées par des tiques. Cette investigation est d'autant plus justifiée par la détection du virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHF) chez des tiques dans le sud du pays. L'objectif de notre étude est d'évaluer la circulation des virus transmis par les tiques dans cette région.

Le travail est organisé en quatre chapitres dont la chronologie est comme suit :

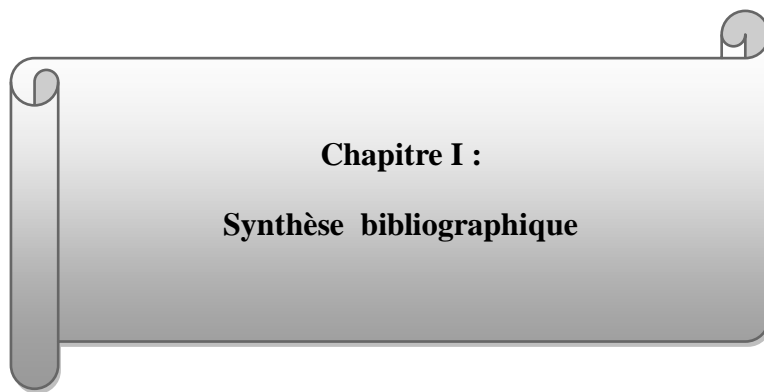
-Le premier chapitre comprend un rappel bibliographique sur les tiques en tant que parasites et en tant que vecteurs et sur les maladies transmises.

-Le deuxième chapitre II décrit dans un premier temps les stations d'étude retenues, puis expose les différentes techniques employées sur le terrain et au laboratoire pour mener à bien cette recherche.

-Le troisième chapitre restitue en détail les résultats obtenus au cours de notre étude.

-Le quatrième chapitre propose une analyse approfondie et critique des résultats. Ceux-ci sont discutés à la lumière des connaissances actuelles sur le sujet, pour en tirer une conclusion.

Enfin, la conclusion générale du mémoire fait la synthèse des principaux idées acquises de cette recherche et ouvre sur de nouvelles perspectives d'étude.



Chapitre I :
Synthèse bibliographique

Dans cette partie, nous aborderons divers aspects théoriques liés à notre thématique. Ce chapitre se concentre sur les généralités concernant les tiques, leur systématique, leur morphologie, leur cycle de vie, ainsi que les principales maladies qu'elles transmettent. Nous fournirons également des informations générales sur deux virus spécifiques : l'encéphalite à tiques (TBE) et la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHF).

I.1. - Généralité sur les tiques

I.1.1. - Systématique

Les arthropodes, constituant un groupe majeur d'invertébrés représentant près de 80 % des espèces animales connues, voient seulement quelques-unes d'entre elles ont développé la capacité de vivre exclusivement aux dépens d'autres animaux (Wall et Shearer, 2001).

Les tiques, appartiennent à la classe des Arachnides, elles constituent un groupe distinct d'acariens de par leur grande taille. Elles sont caractérisées par leur trait d'histoire de vie comme parasites hématophages obligatoires et temporaires. Elles vivent au dépend de la quasi-totalité des vertébrés terrestres du monde, surtout des mammifères et des oiseaux mais également des reptiles et des amphibiens (Goodman et al., 2017).

Leur taille varie généralement de 5 à 12 mm lorsqu'elles sont à jeun, mais peut atteindre 25 à 35 mm une fois qu'elles sont pleinement gorgées de sang (Moulinier, 2003; Perez-Eid, 2007).

Elles sont responsables de pertes économiques directes par leur action hématophage et les lésions cutanées, et indirectes de par la grande variété d'agents pathogènes qu'elle transmettent (Ait-Hamou et al., 2012). Les tiques sont classées dans trois familles : les *Argasidae*, les *Ixodidae* et *Nutalliellidae* (**Figure 1**) (Estrada-Peña et al., 2004).

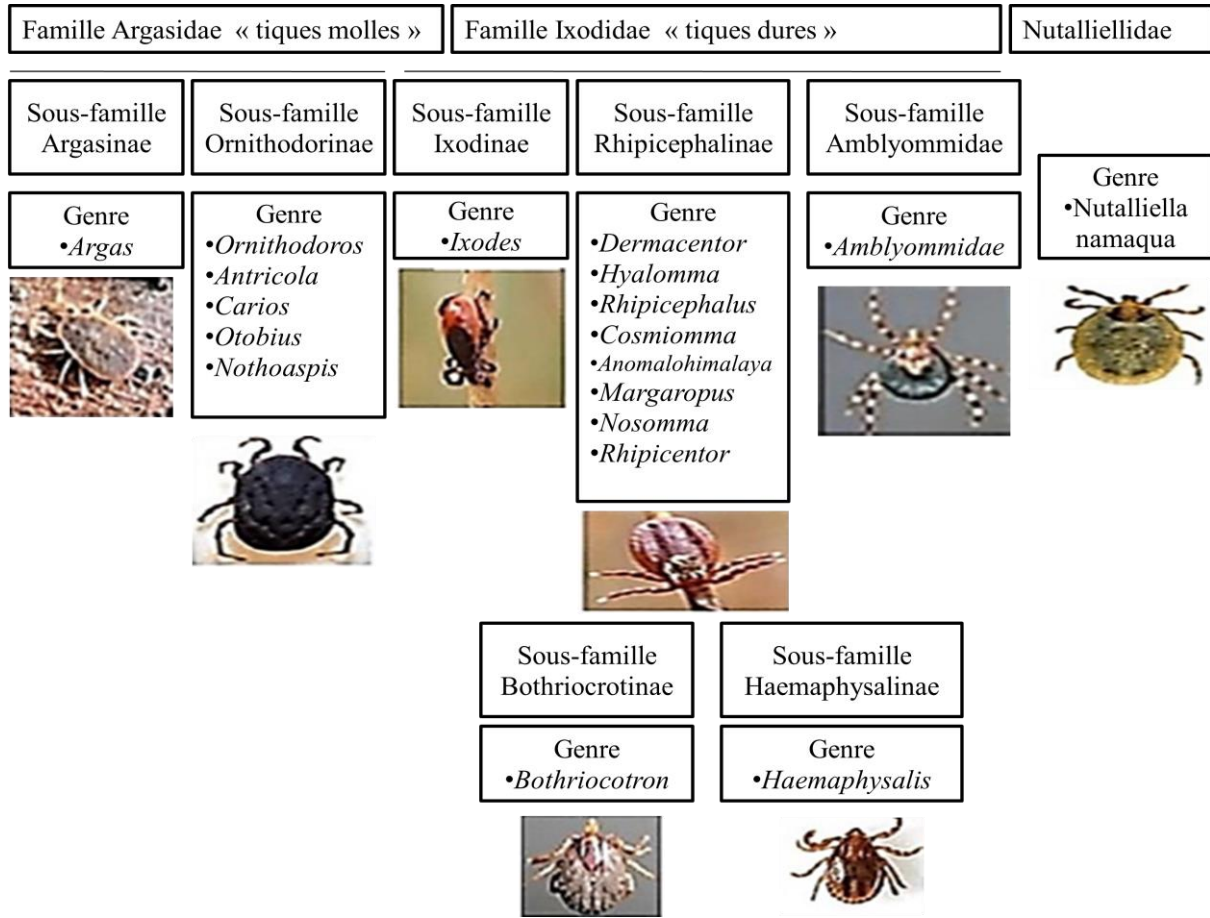


Figure 1 - Classification des espèces de tiques (McCoy et Boulanger, 2015)

I.1.2. - Morphologie générale des tiques

Les tiques sont des acariens, se distinguent par leur morphologie différente des autres arthropodes. Leur corps se divise en deux parties principales : le capitulum (portant les pièces buccales) et l'idiosome (où les pattes sont attachées). Contrairement aux insectes adultes qui ont trois paires de pattes, les tiques en stade larvaire possèdent trois paires de pattes mais les nymphes et les adultes possèdent quatre paires de pattes, caractéristique commune à tous les arachnides (Figure 2) (Sonenshine et Roe., 2014).

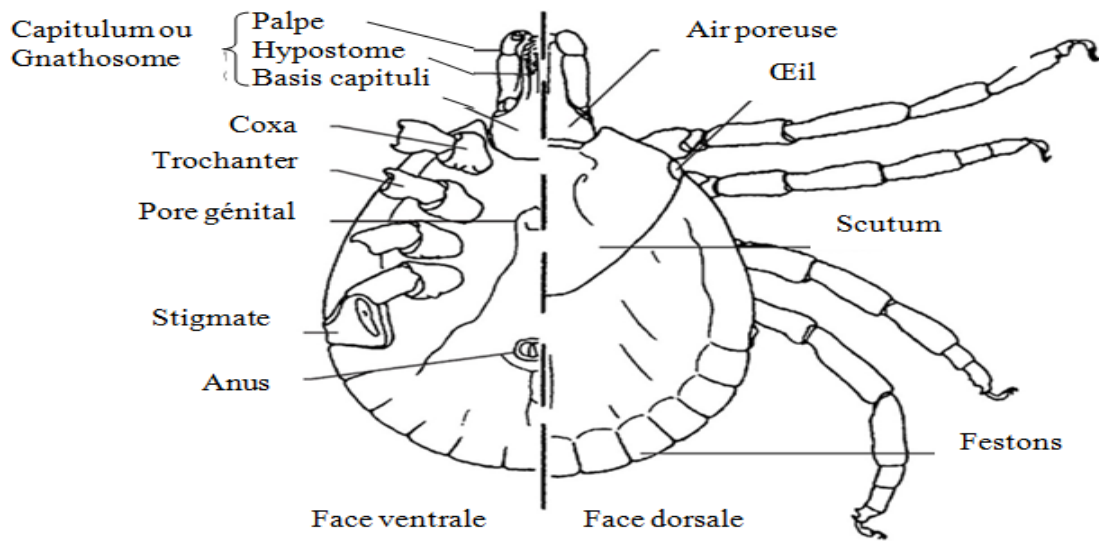


Figure 2 - Morphologie général d'une tique Ixodidae (Rodhain et Perez., 1985).

I.1.2.1. - Morphologies externes Ixodidae

Les tiques Ixodidae sont relativement grandes, mesurant entre 2 et 20 mm de longueur. Le corps de la tique à jeune est aplati dorsoventralement, étant divisé en seulement deux sections, le gnathosome (ou capitule) et l'idiosome postérieur, qui porte les pattes. Les pièces buccales des tiques sont structurellement similaires à celles des acariens (Figure 3) (Wall et al., 2001).

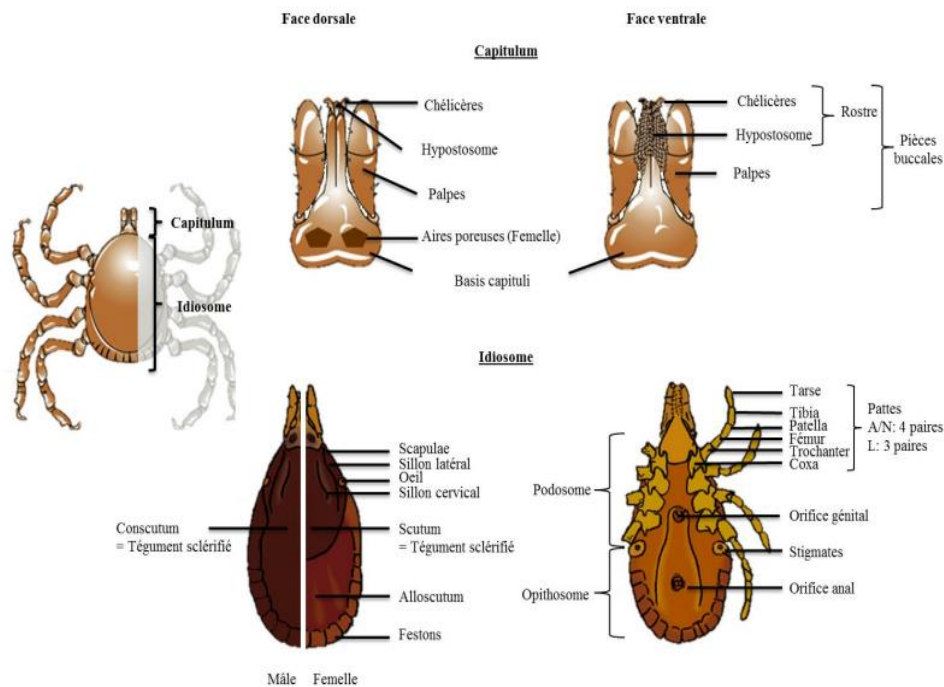


Figure 3 - Anatomie externe générale des tiques dures (McCoy et Boulanger, 2015, Sonenshine et Roe, 2014, Pérez-Eid, 2007, Boulanger et McCoy, 2017).

I.1.2.1.1. - Le tégument

Le tégument représente le squelette externe, il est formé d'une cuticule et d'un épiderme. La cuticule se compose de deux parties principales : l'épicuticule fine et complexe chimiquement, et la procuticule plus épaisse et subdivisée en trois couches ayant des compositions chimiques et des niveaux de sclérisation différents. La dominance de l'une de ces couches procuticulaires détermine la structure du tégument : une dominance de l'exocuticule conduit à des zones sclérisées et dures, tandis qu'une dominance de la mésocuticule rend le tégument élastique. Les larves présentent une cuticule réduite à l'épicuticule, ce qui les rend plus au moins transparentes et sensibles à la déshydratation, mais leur permet également de respirer directement à travers la cuticule (Pérez-Eid., 2007).

I.1.2.1.2. - Le capitulum

Comprend une paire de palpes sensoriels latéraux et un hypostome ventral avec des chélicères dorsales. Les palpes sont formés de quatre segments mobiles chez les Argasinae et moins mobiles chez les Ixodina, avec des différences de taille. Les chélicères sont équipés de doigts griffus pouvant être rétractés dans une gaine protectrice, permettant à la tique de percer la peau de l'hôte. L'hypostome, servant à l'ancrage de la tique dans la peau de l'hôte, possède des dents orientées vers l'arrière. Pendant que l'hypostome et les chélicères s'enfoncent dans la peau, les palpes restent en surface, tandis que la tique scelle sa fixation en injectant du ciment dans la plaie (Pérez-Eid., 2007).

I.1.2.1.3. L'idiosome

La partie supérieure de l'idiosome, appelée podosome, comprend les quatre paires de pattes et l'appareil génital. En revanche, la partie inférieure de l'idiosome, l'opisthosome, abrite les stigmates et l'anus, délimité par le sillon anal (Socolovschi et al., 2008 ; Duvallet et al., 2017).

À l'extrémité de l'idiosome, certaines espèces présentent chez les deux sexes une série régulière de renflements appelés « festons » qui peuvent être moins visibles chez les femelles gorgées. La présence, l'absence ou le nombre de ces festons peuvent être des caractéristiques utiles pour l'identification des espèces (Estrada Pena et al., 2004).

I.1.2.1.4. - Les organes sensoriels

Les tiques possèdent des organes sensoriels essentiels pour localiser leurs hôtes et partenaires, ainsi que pour évaluer les conditions environnementales. Outre les soies et parfois les yeux, elles possèdent l'organe de Haller, qui est sensible à l'humidité et aux phéromones, détecte le CO₂, la chaleur et les métabolites de l'hôte. Les pédipalpes, équipés de soies sensorielles, restent à la surface de la peau et ne pénètrent pas lors de l'alimentation (Bonnet et al., 2015)

I.1.2.2. - Morphologies interne

Les tiques sont des parasites hématothrophes, possèdent une musculature robuste avec des muscles dorso-ventraux médians qui leur assurent une fixation solide et une grande mobilité (Bourdeau, 1993). Leur système digestif est adapté à leur régime sanguin, comprend un pharynx, un œsophage et un intestin moyen où se déroule la digestion sans séparation entre les canaux de sang et de salive. Après s'être gorgées de sang, les femelles digèrent lentement leurs repas jusqu'à leur reproduction (Bonnet et al., 2015). Leur appareil génital féminin est complexe, avec un ovaire en forme de "fer à cheval", de longs oviductes et un vagin protractile, tandis que l'appareil mâle se limite à la production de spermatophores pour la fécondation (**Figure 4**) (Neveu-Lemaire, 1938; Bourdeau, 1993; Blary, 2004).

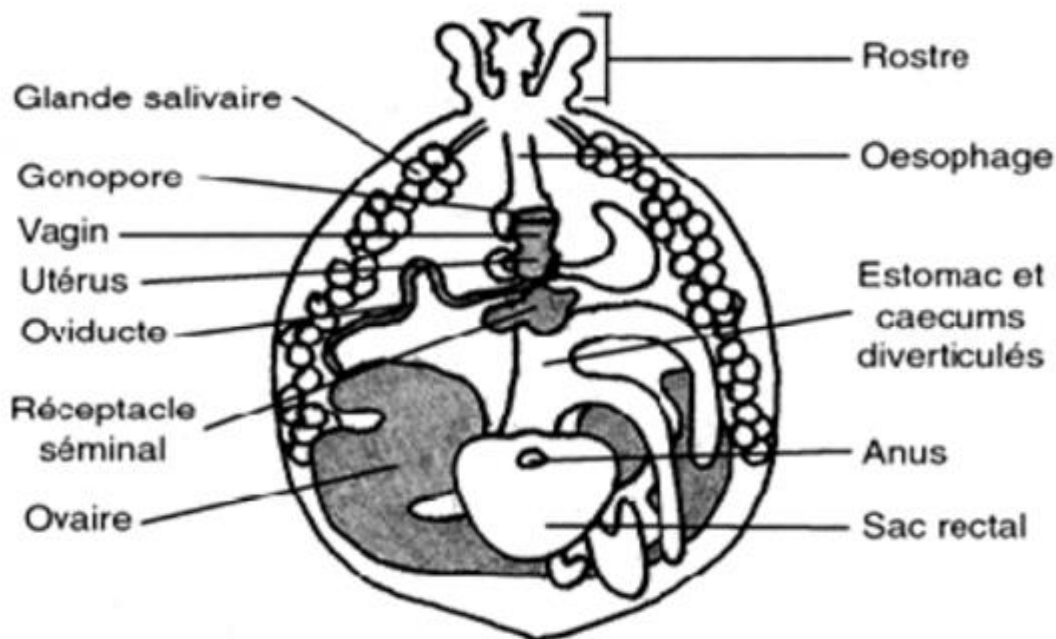


Figure 4 -Anatomie interne des *Ixodes* (Guetard, 2001).

I.1.2.2.1. - Les glandes salivaires

Les glandes salivaires des tiques sont essentielles pour leur alimentation sanguine prolongée. Elles produisent des substances qui facilitent l'alimentation en réduisant la réaction de l'hôte et permettent à la tique de survivre dans des environnements secs. De plus, ces glandes facilitent la fixation de la tique à l'hôte, tout en jouant un rôle crucial dans l'élimination de l'eau excédentaire absorbée pendant le repas sanguin. Elles sont aussi un site clé pour la transmission des agents infectieux. Après le repas, les glandes salivaires se dégradent (Bonnet et al., 2015).

I.1.2.2.2. - Rôle de la salive

La salive des tiques est essentielle pour faciliter la prise de sang et la transmission des agents infectieux. Elle contient des substances actives comme des anticoagulants, des anesthésiques, des antihistaminiques et des immunosuppressives qui aident à dilater les vaisseaux sanguins réprimé la réponse et à inhiber les défenses immunitaires de l'hôte et à prévenir la douleur (**Figure 5**) (Duvallet et al., 2017).

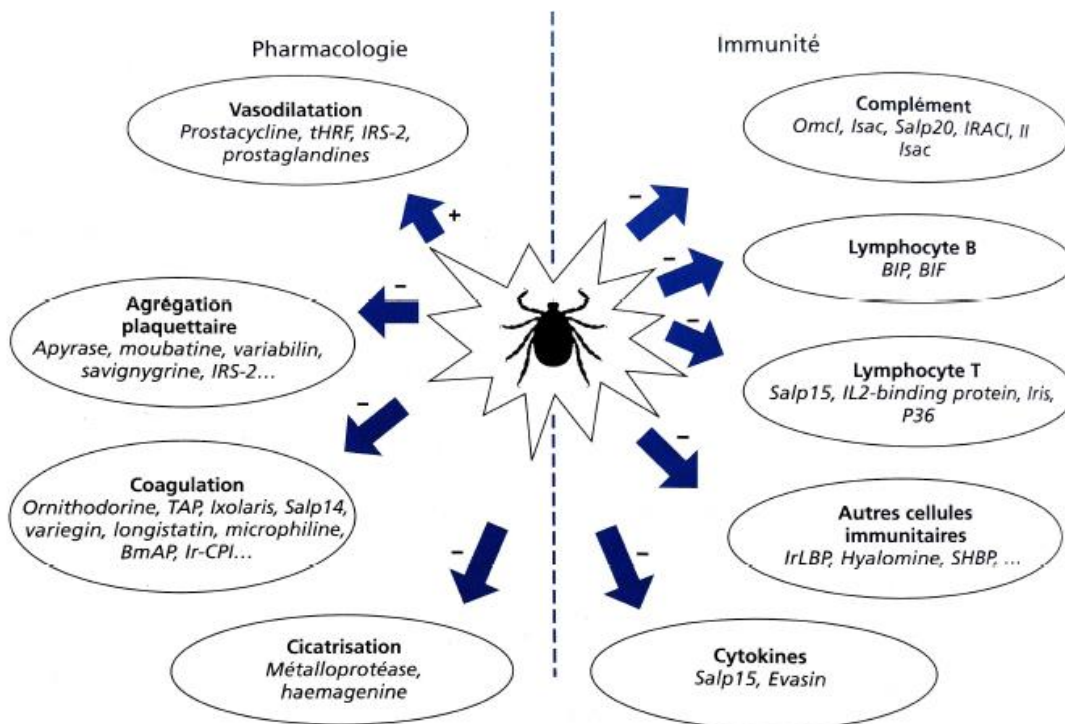


Figure 5 - Principaux effets de la salive de tique sur la pharmacologie et l'immunité de l'hôte vertébré (Duvallet et al., 2017).

I.1.3. - Cycle de développement des tiques

Les tiques passent par quatre stades de développement : œufs, larve, nymphe et adulte (mâle et femelle). Les tiques dures suivent trois types de cycles pour se nourrir. Après l'éclosion des œufs, les larves se nourrissent ou entrent en diapause. Après un repas sanguin prolongé, elles se métamorphosent en nymphes puis en adultes. La femelle adulte prend un repas sanguin prolongé pour assurer la ponte tandis que les mâles se nourrissent peu. Ce cycle peut prendre de quelques semaines à plusieurs années, influencées par des facteurs environnementaux et la disponibilité des hôtes (Socolovschi et al., 2008).

Les tiques dures se reproduisent généralement sur l'hôte, bien que dans certains cas, l'accouplement puisse se produire avant le repas, soit sur la végétation soit sur l'hôte lui-même. Après la fécondation, la femelle termine son repas sanguin, puis se détache pour digérer et pondre les œufs dans un environnement protégé avant qu'elle ne meurt. Le nombre d'œufs pondus dépend du volume de sang ingéré lors du repas (**Figure 6**) (Sonenshine D., 1991).

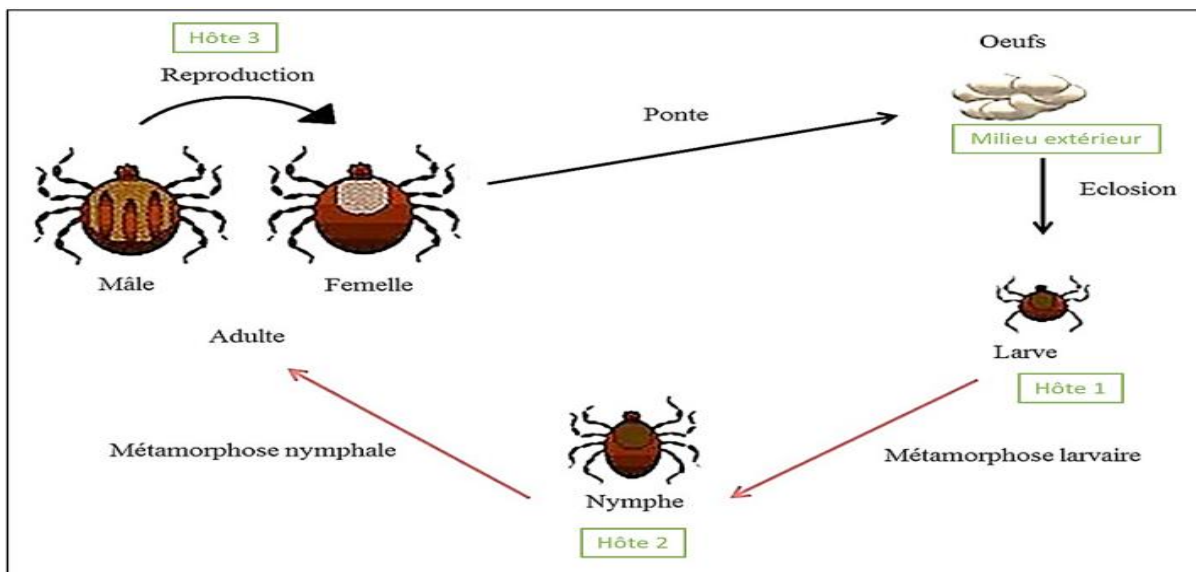


Figure 6 - Cycle de reproduction des tiques dures (Florence, 2015).

I.1.3.1. - Type de cycle

Les tiques se distinguent par trois types de cycles de vie : monphasique, utilisant un seul hôte pour tous leurs repas (ex. *Rhipicephalus*), diphasique, se nourrissant sur deux hôtes différents (ex. *Hyalomma*), et triphasique, impliquant trois hôtes pour leurs repas, représentant 90% des tiques dures (ex. *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Haemaphysalis*, *Ixodes*) (**Figure 7**) (Duvallat et al., 2017).

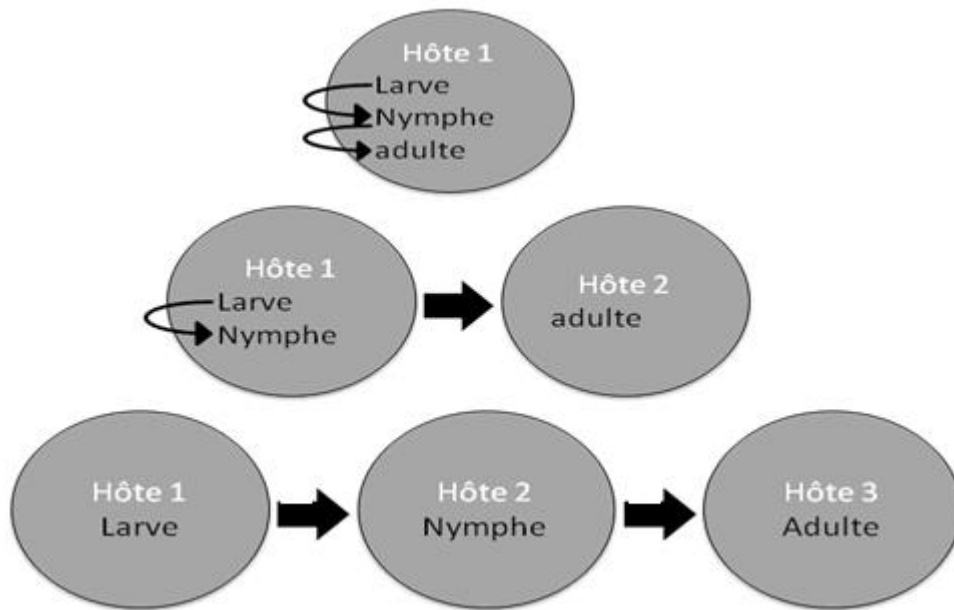


Figure 7 - Les différents types de cycle des Ixodidae (Duvallet et al., 2017).

I.2. - Importances médicale et vétérinaire des tiques

I.2.1. - Le rôle vecteur

Les tiques agissent comme vecteurs dans la transmission des agents pathogènes, en transférant des germes infectieux d'un hôte à un autre. Ce rôle vecteur peut être primaire, lorsque la tique est capable seule de maintenir la circulation des germes, ou secondaire, lorsque son efficacité est insuffisante pour le faire seule. La transmission des germes peut se produire entre les tiques et les vertébrés ou entre les tiques elles-mêmes (Pérez-Eid, 2007).

I.2.1.1. - Modes d'infestation des tiques

L'infestation peut se faire de différentes façons :

- Sur l'hôte réservoir** (rongeur, oiseau) : la tique s'infeste en se gorgeant de sang si l'hôte contient agents pathogènes (Parola and Raoult, 2001).
- Transmission trans-stadiale** : les nymphes et larves s'infestent lors d'un repas sanguin sur un petit hôte et conservent le germe lors de leur mue (Mievis and Bigaignon, 1998).
- Transmission trans-ovarienne (rare)** : une femelle infestée peut transmettre les agents pathogènes à ses œufs via son sang (Parola and Delaunay, 2000).
- Co-feeding** : est un phénomène où une tique non infectée peut s'infester en se nourrissant à proximité d'une tique déjà infectée sur le même hôte (Parola and Raoult, 2001; Giammanco and al., 2003).

I.3. - Les principaux pathogènes transmis par les tiques

Les tiques transmettent une multitude de pathogènes (bactéries, virus et parasites) tant qu'aux animaux qu'à l'homme. L'intérêt pour ces pathogènes a connu une recrudescence au cours des dernières décennies (**Tableau 1**) (Estrada-Pena, 2015).

Tableau 1 - Principales maladies associées aux tiques (Mccoy & Boulanger, 2016)

| Maladies | Pathogènes | Tiques vectrices | Hôtes-réservoirs | Répartition géographique |
|--|---|--|--|---|
| Virus (arbovirus) | | | | |
| Méningoencéphalite à tique | <i>Flavivirus</i> | <i>Ixodes ricinus</i> <i>I. persulcatus</i> | Mammifères | Asie, Europe |
| Fièvre hémorragique Crimée-Congo | <i>Nairovirus</i> | <i>Hyalomma</i> spp. | Mammifères | Europe, Asie, Afrique |
| Fièvre porcine africaine | <i>Iridovirus</i> | <i>Ornithodoros</i> | Cochons, phacochères | Afrique, Europe |
| Bactéries | | | | |
| Fièvre Q** | <i>Coxiella burnetii</i> | <i>Rhipicephalus</i> spp. <i>Dermacentor</i> spp. et autres tiques | Mammifères | Cosmopolite |
| Borréliose de Lyme | <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato | <i>Ixodes</i> sp. | Mammifères, oiseaux, lézards | Hémisphère Nord |
| Fièvres récurrentes à tique | <i>Borrelia</i> sp. | <i>Ornithodoros</i> spp. <i>Ixodes</i> sp. | Rongeurs | Principalement en zones tropicales et subtropicales |
| Fièvre boutonneuse méditerranéenne | <i>Rickettsia conorii</i> | <i>Rhipicephalus sanguineus</i> | Chiens, rongeurs | Afrique, Asie, Europe |
| Fièvre africaine à tique | <i>Rickettsia africae</i> | <i>Amblyomma</i> sp. | Mammifères | Afrique subsaharienne |
| Tibola (<i>Tick-borne lymphadenopathy</i>) | <i>Rickettsia slovaca</i> | <i>Dermacentor</i> sp. | Moutons, cerfs | Europe |
| Tularémie** | <i>Francisella tularensis</i> | Plusieurs genres | Lièvres, lapins, rongeurs | Cosmopolite |
| Anaplasmoses | <i>Anaplasma phagocytophilum</i> <i>A. marginale</i> | <i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. scapularis</i> <i>Dermacentor</i> sp. | Nombreux mammifères, cervidés Bovins, moutons, autres ruminants | Europe, Amérique du Nord, Russie |
| Ehrlichioses | <i>Ehrlichia chafeensis</i> <i>E. ruminantium</i> | <i>Amblyomma Americanum</i> <i>A. hebraeum</i> | Hommes, cervidés Bovins et | Amérique du Nord Afrique |

| | | | | |
|------------------|---|--|----------------------------|---|
| | | <i>A. variegatum</i> | autres ruminants | |
| Parasites | | | | |
| Babésioses | <i>Babesia divergens</i> <i>B. microti</i> <i>B. venatorium</i> | <i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. scapularis</i> | Mammifères Rongeurs | Europe Amérique du Nord |
| Théilerioses | <i>Theileria annulata</i> <i>T. parva</i> | <i>Hyalomma</i> sp. <i>Rhipicephalus appendiculatus</i> | Bovins et autres ruminants | Méditerranée, Moyen-Orient, Inde, Chine, Afrique |

** Pas uniquement transmis par les tiques

I.3.1. - Les arbovirus

Les arbovirus sont des virus transmis par des arthropodes hématophages. Les virus se multiplient dans les arthropodes puis sont transmis aux vertébrés lors des repas de sang. Chaque arbovirus est associé à un type spécifique d'arthropode vecteur et peut se propager dans de nouvelles zones (Chippaux, 2003).

I.3.1.1. - La maladie de l'encéphalite à tiques

Les encéphalites virales à tique (TBEV) sont transmises par les tiques comprennent des sous-types comme l'encéphalite de la taïga, d'Europe centrale, et orientale (prévalent au Japon). Le virus est principalement transmis par les tiques *Ixodes persulcatus* en Russie et en Asie, et par *Ixodes ricinus* en Europe. Les micromammifères servent de réservoirs pour ces virus (Ripert, 2007).

La transmission à l'hôte peut se produire lors d'un repas sanguin d'une tique infectée par la consommation de produits laitiers non pasteurisés ou le contact avec des animaux infectés. Une transmission interhumaine a été observée via l'allaitement, la transfusion sanguine, et la transplantation d'organes (Sudhindra, 2018).

I.3.1.1.1. - Caractéristiques et structure

Le virus de l'encéphalite à tique (TBEV) est un virus de 50 nm de diamètre, composé d'une nucléocapside entourée par une enveloppe lipidique contenant les glycoprotéines E et M son génome à ARN simple brin de 11 kilobases est encapsulé dans une capsidie protéique formée par la protéine C (Gritsun et Gould, 2008). L'organisation génomique comprend un cadre de lecture unique encadré par deux régions non codantes, la

partie codante comprend une polyprotéine clivée en trois protéines structurales (C, M, E) et sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) par des protéases. La protéine E est essentielle pour l'entrée du virus dans les cellules cibles qui constitue une cible immunitaire majeure. Les protéines E se regroupent en dimères sur les virions matures. La protéine M agit comme chaperonne pour la protéine E. Les protéines non structurales telles que NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 ont diverses activités enzymatiques. Par exemple, NS1 est immunogène et considérée comme un antigène soluble. NS2A et NS2B participent à la formation du complexe protéase, NS3 est multifonctionnelle avec des activités protéase, hélicase et NATPase, tandis que NS4A, NS4B et NS5 forment le complexe polymérase ARN-dépendante (**Figure 8**) (Velay et al., 2019).

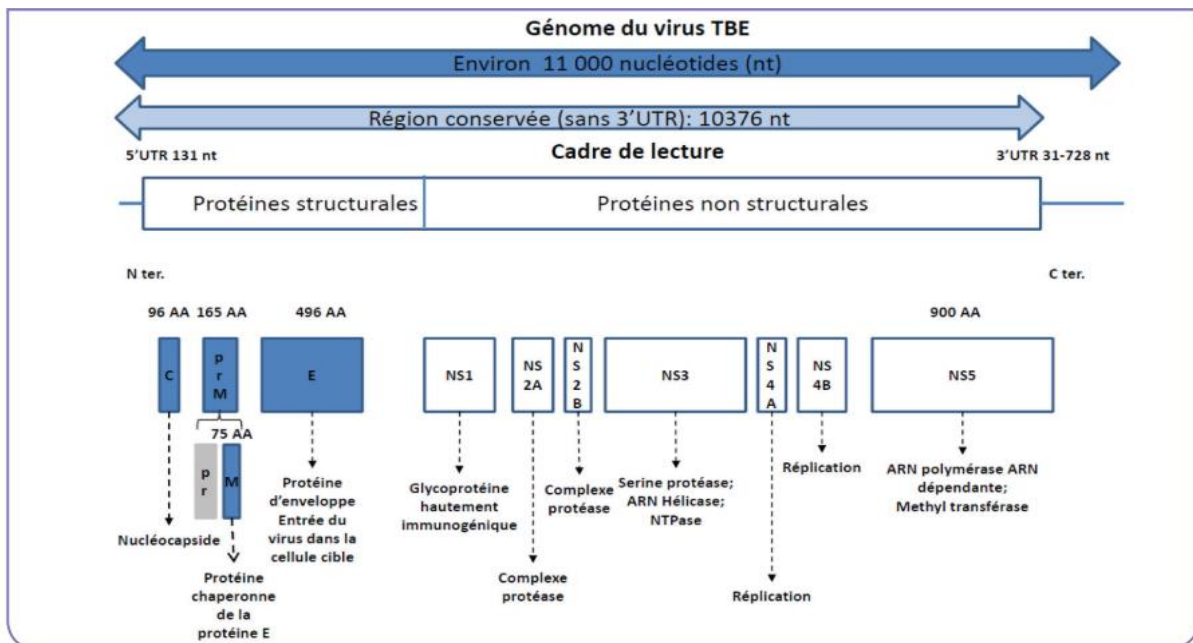


Figure 8 - Organisation génomique du virus TBE (Velay et al., 2019).

I.3.1.1.2. - Manifestation clinique TBE

L'encéphalite à tique (TBE) varie selon les sous-types de virus. Le sous-type européen présente un cours biphasique classique, le sous-type asiatique est monophasique, tandis que le sous-type sibérien peut entraîner des formes chroniques.

La période d'incubation de la TBE post-infection varie de 2 à 28 jours, cette infection est catégorisée avec une première phase virémique, qui peut progresser vers une seconde phase (neurologique). Pendant la première phase, Le virus se propage de manière systémique produisant de la fièvre et d'autres symptômes tels que les maux de tête, la fatigue, des myalgies, une anorexie, des nausées et/ou des vomissements. Chez certains patients, il n'y a

pas d'invasion virale du système nerveux central (SNC) et la maladie se termine après la première phase (maladie monophasique). Chez d'autres, le virus pénètre dans le SNC, et une seconde phase de la maladie débute avec des signes et symptômes neurologiques qui se développent (TBE biphasique).

Chez certains patients atteints de TBE, le virus peut persister activement dans le SNC pendant une période prolongée et le processus infectieux continue sans relâche. Dans ce cas, le virus devient une maladie chronique (progressive). Dans la première phase, le virus peut être détecté dans des échantillons de sang par RT-PCR, tandis que les patients en phase neurologique sont diagnostiqués sérologiquement (Velay et al., 2019).

I.3.1.2. - La maladie de fièvre hémorragique de Crimée-Congo

La fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHF), causée par le *Nairovirus*, est une maladie zoonotique grave qui peut provoquer des épidémies et présente un taux de mortalité pouvant atteindre 40 %. Le virus est transmis lors d'un repas de sang, contact avec les fluides corporels ou les tissus d'animaux infectés, et rarement entre humains. La CCHF est présente sur les trois continents l'Asie, l'Europe et Afrique dans plus de 50 pays (Yilmaz et al., 2023). Le virus est principalement transmis par les tiques du genre *Hyalomma* qui servent de vecteurs et de réservoirs en même temps. En plus, le virus peut être transmis de manière transovarienne et transstadiale (Carrera-Faja et al., 2023).

Elle provoque une maladie grave chez les humains entraînant des symptômes tels que la fièvre, maux de tête, douleurs musculaires, vomissements et saignements, tandis que les animaux infectés peuvent rester asymptomatiques (**Figure 9**) (Sankhe et al., 2023).

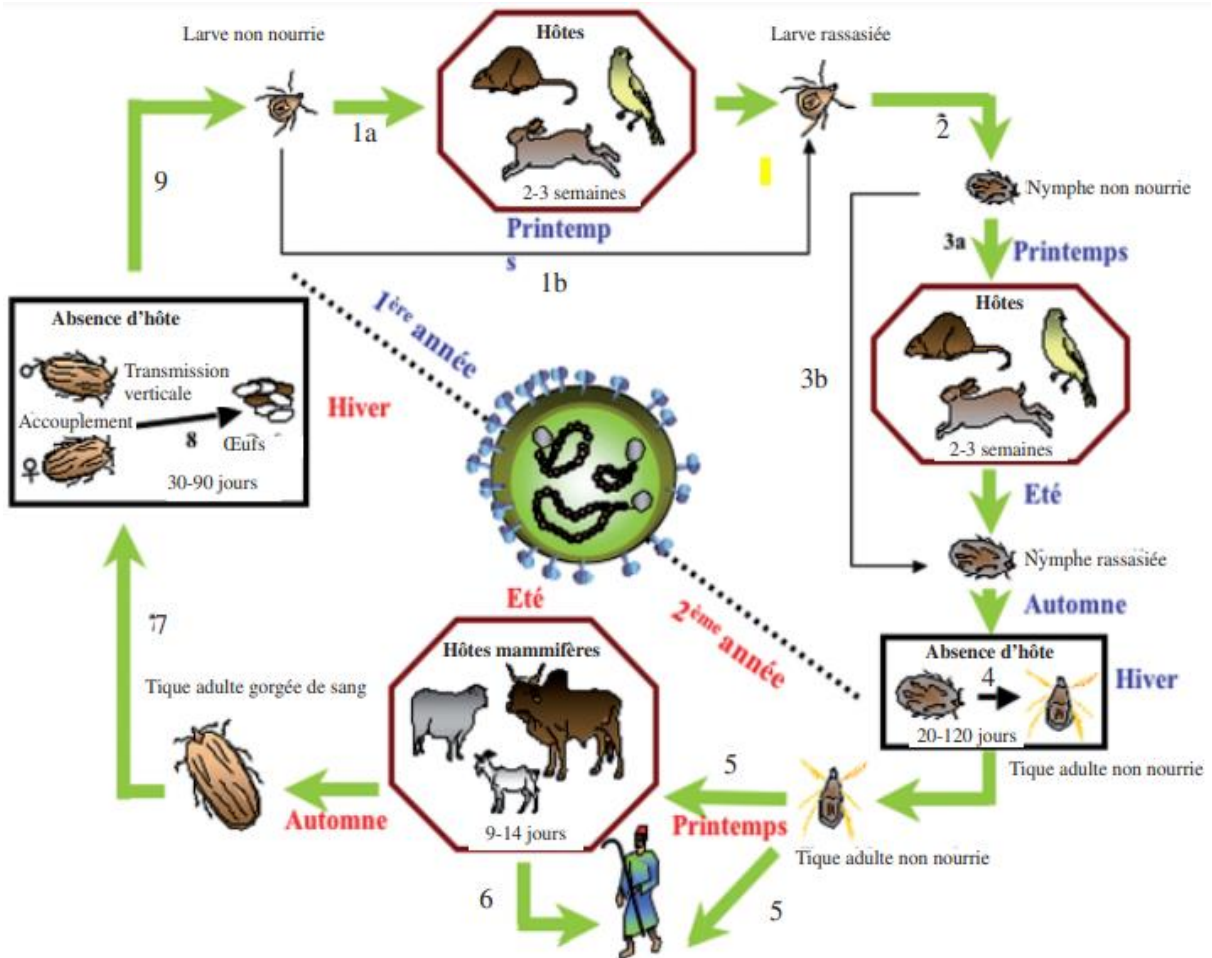


Figure 9 - Cycle de circulation du CCHF virus (Flusin et al., 2010).

I.3.1.2.1. - Caractéristique et structure

Le virus de la fièvre hémorragique du Crimée-Congo (CCHFV) appartient à la famille des *Bunyaviridae* et au genre *Nairovirus*. Il est sphérique d'un diamètre d'environ 80 à 100 nm, enveloppé dans une couche lipidique de 5 à 7 nm d'épaisseur et des pointes de glycoprotéines de 8 à 10 nm de long. Le CCHFV est un virus enveloppé portant un génome à ARN de sens négatif composé de trois segments. Ces segments comprennent le segment S (1,7 kb) code les protéines de la nucléocapside, le segment M (5,3 kb) code pour les glycoprotéines Gn et Gc, et le segment L (12,1 kb) qui code pour la polymérase virale. Le CCHFV présente une variabilité génétique importante, principalement basée sur le segment S, les virus sont divisées en 7 lignées héréditaires dont deux sont retrouvés en Asie, deux en Europe et trois en Afrique (Figure 10) (Bendary et al., 2022).

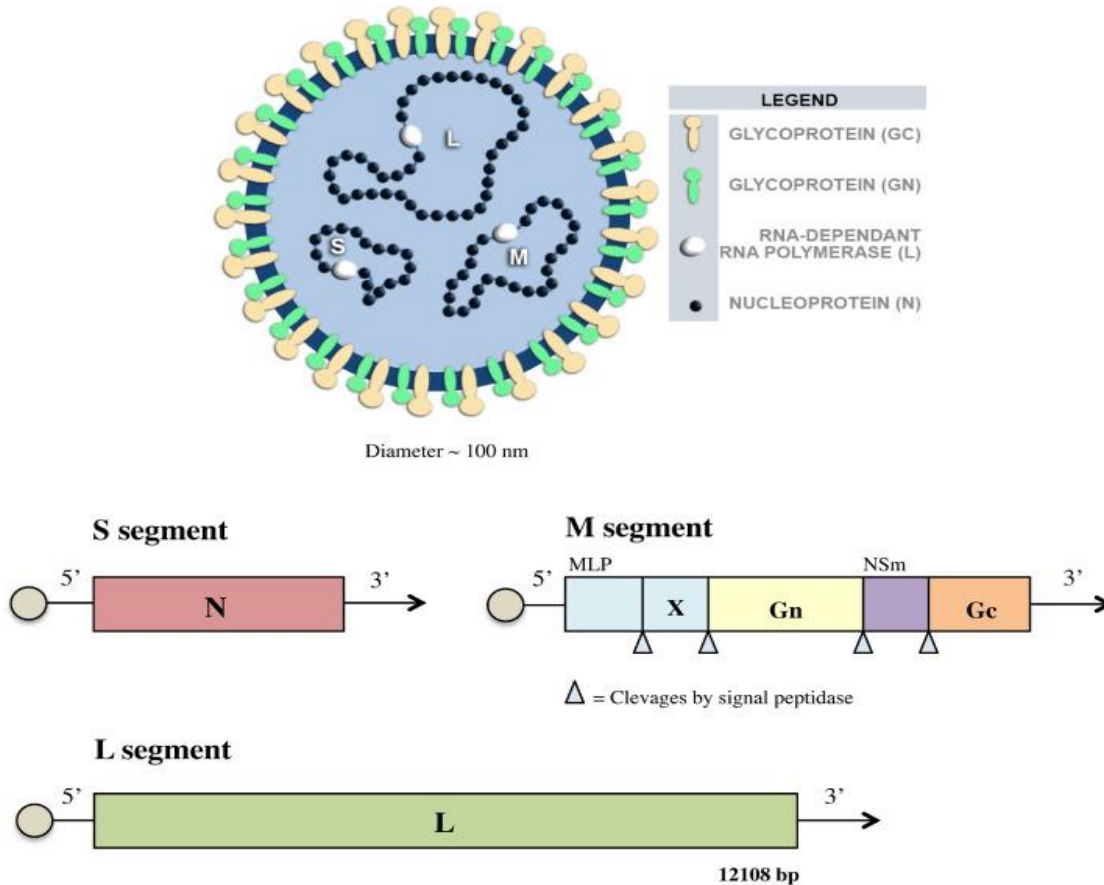


Figure 10 - Représentation schématique d'une particule virale d'un orthonairovirus et de son génome (Serretiello et al., 2020).

I.3.1.2.2. - Manifestation clinique

Le virus CCHFV, généralement asymptomatique chez les animaux, peut causer des infections graves chez l'homme. La maladie se manifeste en quatre phases présentant des symptômes distincts et une durée variable: incubation, pré-hémorragique, hémorragique et convalescence. La période d'incubation dépend du mode de transmission, elle peut durer de quelques jours à plus de deux semaines. La phase pré-hémorragique se manifeste par de la fièvre, des vertiges et des douleurs. La phase hémorragique survient quelques jours après elle se caractérise par des saignements internes et externes avec des complications potentiellement mortelles comme des hémorragies cérébrales. Les hémorragies résultent de l'infection des cellules endothéliales et des réponses inflammatoires de l'organisme. Le taux de mortalité varie de 5 à 40 % et les infections nosocomiales ont des issues souvent plus graves. La convalescence débute après environ deux semaines mais elle est longue (Reynard et al., 2021).



Chapitre II

Matériels et méthodes

Dans ce chapitre nous allons aborder la description et le choix des régions d'étude ainsi que le travail effectué sur le terrain et les différentes manipulations effectuées au laboratoire.

II.1. - Choix des stations d'études

Les stations d'études ont été choisies en fonction de leur accessibilité et de la disponibilité d'animaux domestiques pour le prélèvement d'échantillons de tiques. Les élevages comprenant des chats, des bovins et des ovins, et ont été sélectionnés de manière aléatoire.

II.1.2. - Zones de récolte

Notre étude a été réalisée dans deux régions Mekla et Bouzeguène situées dans la wilaya de Tizi-Ouzou (**Figure 11**) entre le mois de février et mai 2024.

-Bouzeguène : Ait-Salah est un village kabyle, de la commune de Bouzeguene, wilaya de Tizi-Ouzou (Algérie). Il est situé au pied de l'Akfadou, au Nord-Est de la wilaya de Tizi-Ouzou, à quelques 70 km environs du chef-lieu de la wilaya. Ait-Salah est limitrophe des villages Houra à l'Est, Ahrik au Sud, Ait-Ferrache à l'Ouest et des grandes montagnes de l'Akfadou au Nord (Situation Géographique du Village Ait-Salah, s. d.-b).

-Mekla : est située à environ 22Km à l'est de la wilaya Tizi-Ouzou, Elle est délimitée par freha et azazga avec une altitude environ 250 m au-dessus du niveau de la mer (Longitude Latitude In Mekla, Tizi Ouzou, Algeria GPS Coordinates, s. d.).

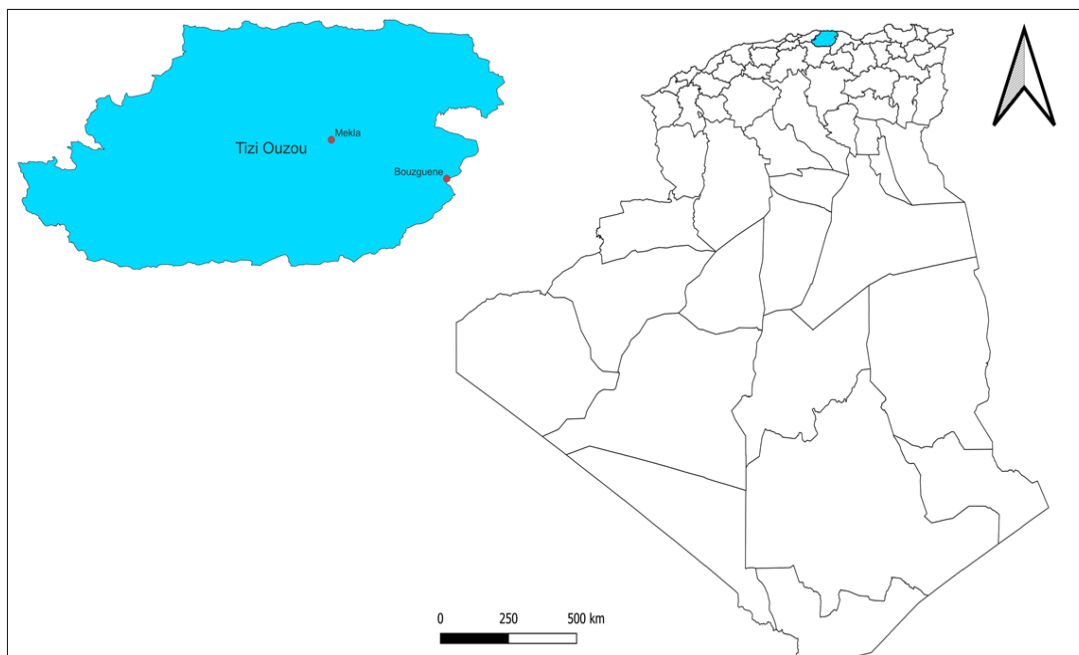


Figure 11 - Carte géographique des sites de collecte des tiques (Original, 2024).

II.2. - Méthode d'échantillonnage des tiques

II.2.1. - Collecte des tiques sur les animaux

La collecte des tiques a été réalisée à l'aide d'une pince fine. Les tiques sont retrouvées dans les parties sensibles des vaches et moutons (la région anal, les oreilles, les mamelles,...). Cette méthode permet de collecter des tiques en phase parasitaire (**Figure 12**).

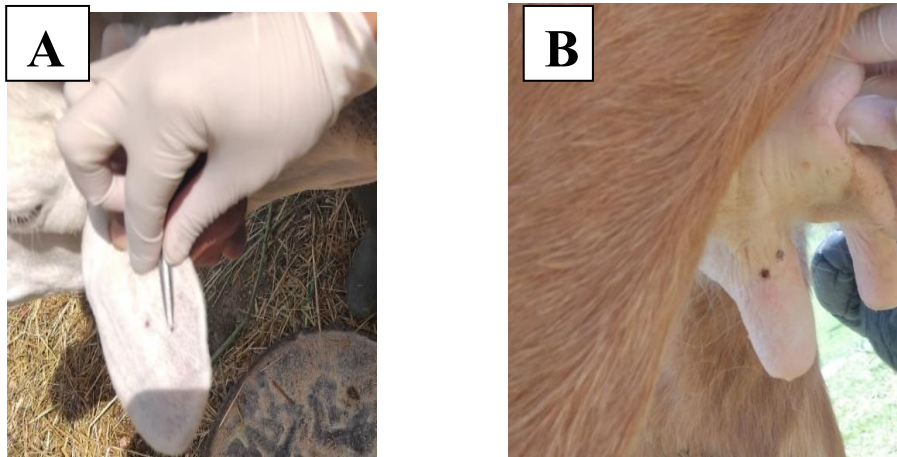


Figure 12 – **A** : Tique fixée sur l'oreille d'un mouton; **B** : Tique fixée sur la mamelle d'une vache (B) (Original, 2024).

II.2.2. - Collecte des tiques Sur la végétation

La collecte a été faite par la technique du drapeau qui consiste à faire passer un drapeau blanc mesurant 1 m² sur la végétation (herbe, mousse, plantes basses, feuilles mortes...) dans des endroits ombragés et humides. Cette méthode permet de collecter des tiques en phase libre (Vassallo et al., 2002) (**Figure 13**).

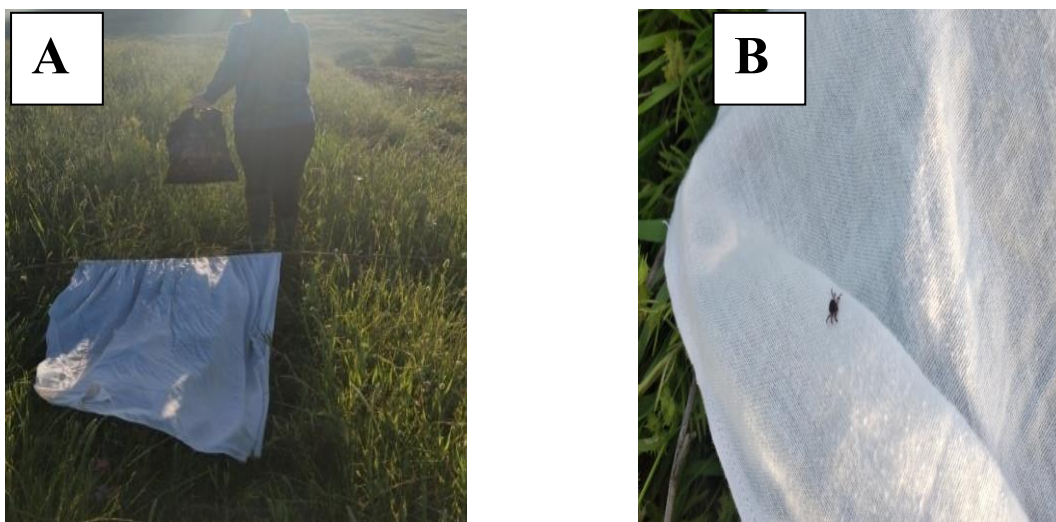


Figure 13 - **A**: Méthode du drapeau ; **B**: Tique sur le drapeau (Original, MEKLA, 2024).

II.3. - Lieux du stage

Ce travail a été réalisé au laboratoire des arbovirus et des virus émergents de l'Institut Pasteur d'Algérie, annexe Sidi-Fredj (**Figure 14**), qui comprend des laboratoires de niveau de sécurité biologique 2 (BSL2) et de niveau de sécurité biologique 3 (BSL3).



Figure 14 - Laboratoire des arbovirus et des virus émergents, l'Institut Pasteur d'Algérie, annexe Sidi-Fredj (Originale, 2024)

II.4. - Méthode d'identifications des tiques

L'identification morphologique des tiques collectées a été effectuée au niveau du genre suivant les clés dichotomiques (Bouattour, 2002) à l'aide d'une loupe binoculaire qui nous a permis de les séparer en pools (≤ 13). Une identification moléculaire aussi des tiques a été réalisée pour la détermination d'espèces de tiques en utilisant le gène cytochrome C oxidase I (COI) de la mitochondrie (Folmer et al., 1994).

II.5. - Extraction de l'ARN viral

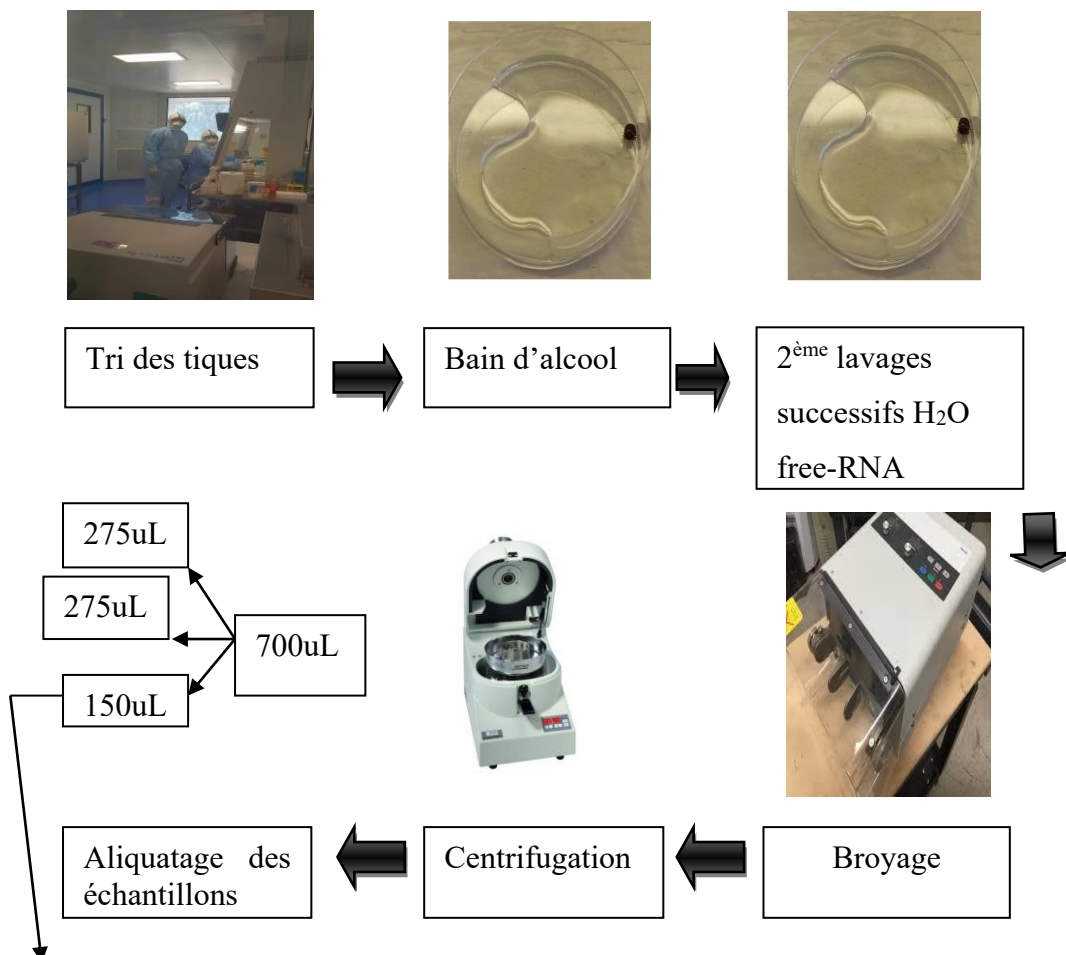
L'extraction des ARN se fait dans deux laboratoires de sécurité différente laboratoire niveau de sécurité biologique 3 (P3 ou BSL 3) pour le broyage et neutralisation des virus et laboratoire niveau de sécurité biologique 2 (P2 ou BSL 2) pour le reste des étapes d'extraction.

II.5.1. Broyage et neutralisation des virus

II.5.1.1. - Etapes BSL 3

Cette étape est réalisée dans un laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 (BSL3) sous une hotte à flux laminaire (PSM) en utilisant des poches de glace pour assurer la conservation des virus.

- Les tiques sont placées dans une boîte de Pétri, incubée dans 2 ml d'éthanol à 70, pendant 10 minutes, puis l'éthanol est retiré à l'aide d'une pipette. Deux lavages successifs avec H₂O free-RNA sont réalisés chacun 10 minutes pour enlever les traces de l'alcool.
- Les tiques sont ensuite transférées individuellement ou en pools (jusqu'à 13 tiques) dans des Eppendorf de 1,5 ml contenant 700 µl de milieu L-15 + 10% SVF et 2 billes métalliques à l'aide des pincettes. Les Eppendorf sont placés dans le broyeur avec une vitesse d'oscillation de 30 hertz pendant 5 minutes.
- Les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes à 16,000g à 8°C.
- Les 700 µl du surnageant sont réparties dans trois tubes Eppendorf
 Tube 1 : 150 µl sont utilisés pour l'extraction (ARN / ADN)
 Tube 2 : 275 µl conservés à -80°C (pour l'isolement du virus).
 Tube 3 : 275 µl conservés à -80°C (réserve).
- Le culot restant est aussi conservé à -80°C.
- 150 µL d'échantillon sont ajoutés à 600 µL de tampon de lyse RAV1 contenant de l'ARN porteur, 20 µL de solution de protéinase K et 5 µL de l'eGFP control interne de l'extraction, puis incubés 5 minutes à 70°C. Les tubes sont centrifugés brièvement environ 1s à 2,000 x g pour retirer les gouttes du couvercle (**Figure 15**).



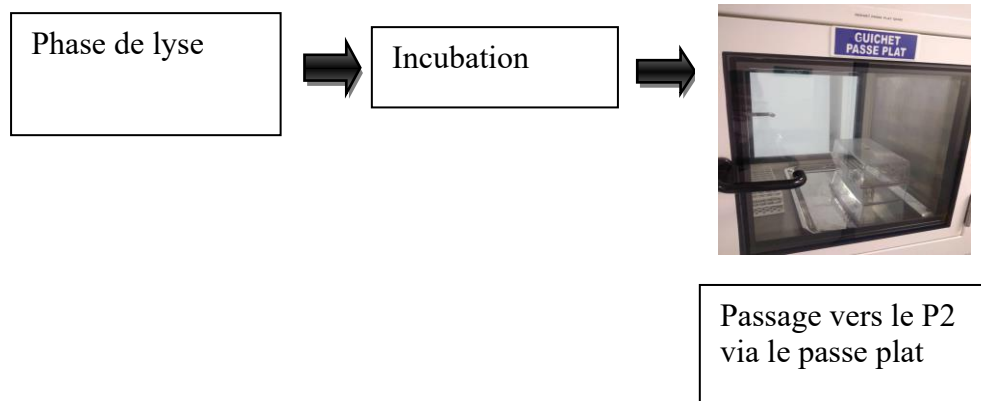


Figure 15 - Schéma des étapes suivies dans la BSL3.

II.5.1.2. - Etapes BSL 2

-600 μL d'éthanol (96-100%) sont ajoutés au lysat et mélangés pendant 10-15 secondes.

Le lysat est ensuite transféré par fractions de 700 μL sur une colonne "virus NucleoSpin® Dx" et centrifugé 1 minute à 8 000 g.

-La colonne est placée dans un nouveau tube et le collecteur est jeté. Cette étape est répétée avec le lysat restant.

-500 μL de tampon de lavage RAW sont ajoutés à la colonne, suivis d'une centrifugation d'une minute à 8 000 g. La colonne est à nouveau transférée dans un nouveau tube. Deux lavages successifs avec 600 μL puis 200 μL de tampon de lavage RAW3 sont effectués, avec des centrifugations d'une minute à 8 000 g puis 3 minutes à 11,000g pour sécher les colonnes et enlever toutes traces d'éthanol.

- 50 μL d'eau RNA-free préchauffée à 70°C sont ajoutés à la colonne qui est préalablement placée dans un tube Eppendorf stérile. La colonne est incubée 1 à 2 minutes avant une dernière centrifugation d'une minute à 11,000 g pour récupérer l'extrait d'acides nucléiques purifiés (Figure 16).

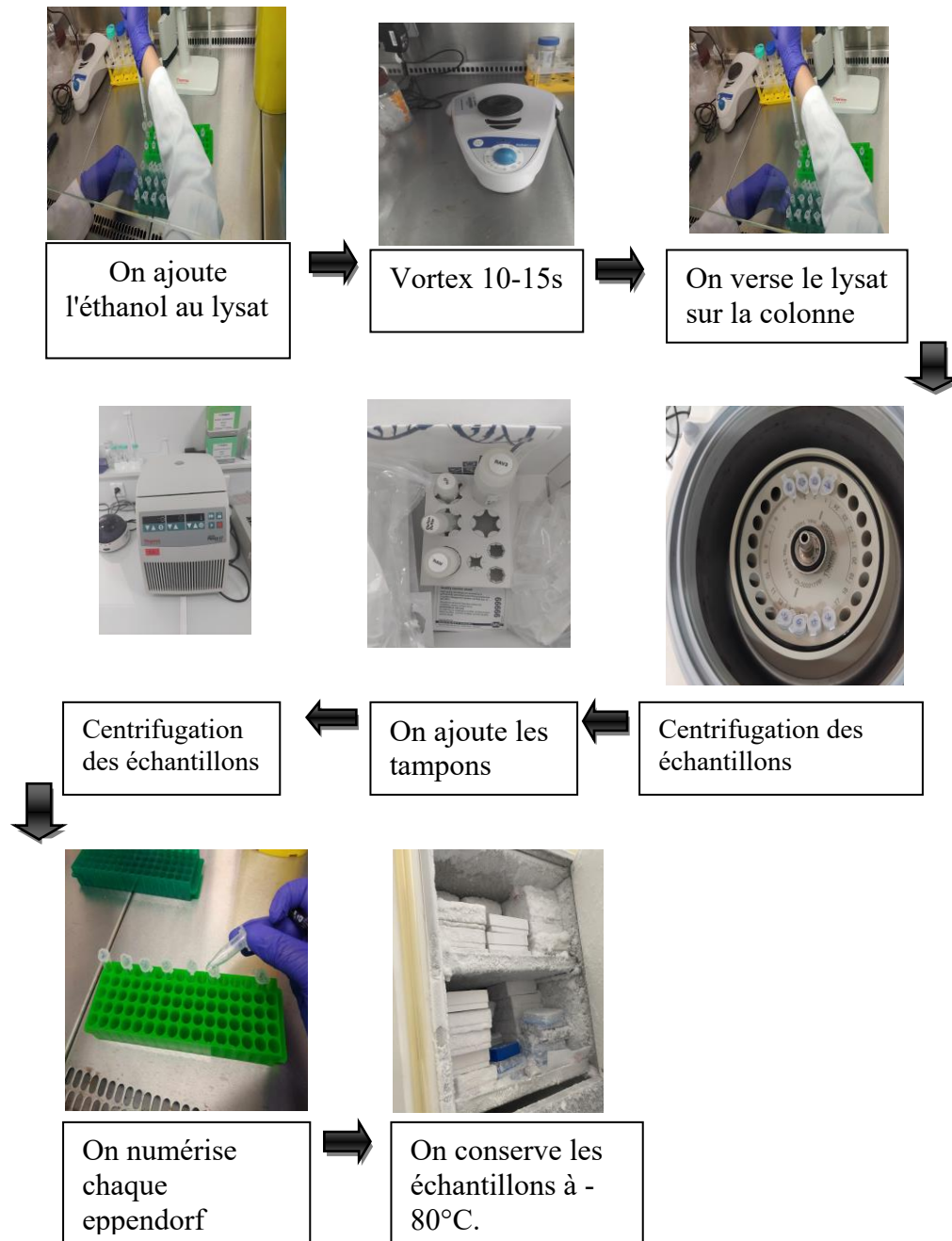


Figure 16 - Schéma des étapes suivies dans la BSL2.

II.6. - Identification par RT-PCR

II.6.1. - Principe de RT-PCR

La RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) est une technique de biologie moléculaire utilisée pour détecter l'ARN viral et l'amplifier et qui permet de visualiser les résultats en temps réel sans passer par la migration sur gel d'agarose grâce à la fluorescence émise par les sondes dite TaqMan qui une fois coupées par l'enzyme ADN polymérase ou les agents intercalants Sybergreen. Elle combine la rétrotranscription (RT) de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) et l'amplification de l'ADNc en plusieurs copies (Cavé et al., 2003) (**Figure 17**).



Figure 17 - Automate "Smart Cycler" piloté par un ordinateur

II.6.2. - Préparation du Mix

Cette étape est réalisée dans un laboratoire P2. Le mix doit être préparé dans un bac réfrigéré et les manipulations se font avec des gants pour éviter les contaminations des échantillons (**Figure 18**).



Figure 18 - un schéma des étapes de Mix.

II.6.2.1. Mix qRT PCR du virus de la fièvre hémorragique du Crimée-Congo (CCHF)

Pour commencer la réaction de RT-PCR, un mélange de Mix du VCCHF (**Tableau 2**) à été préparé.

Tableau 2 - Calculs des volumes du mélange de Mix qRT-PCR (CCHF)

| Réactif | Conc. initiale | Conc. Final | Volume N=1 |
|--|----------------|-------------|------------|
| Luna universal probe 1-step reaction MiX2X | / | 1X | 5 µl |
| Luna Warmstaet RTEnzyme Mox 20X | / | 1X | 0.5 µl |
| CCHFV/NP/1/+F | 20 µM | 1 mM | 0.5 µl |
| CCHFV/NP/122/-R | 20 µM | 1 mM | 0.5 µl |
| CCHFV/NP/21P | 25 µM | 1.25µM | 0.25 µl |
| H ₂ O | / | / | 0.75 µl |
| Total | / | / | 7.5 µl |

Volume final de 10 µl, soit : 7.5 µl du mix et 2.5 µl de l'extrait

II.6.2.2. - Mix qRT PCR du virus de l'encéphalite à tique (TBE)

Pour initier la réaction de RT-PCR, un mélange de Mix du TBEV (**Tableau 3**) à été préparé.

Tableau 3 - Calculs des volumes du mélange de Mix qRT-PCR (TBE)

| Réactif | Conc. initiale | Conc. Final | Volume N=1 |
|--|----------------|-------------|------------|
| Luna universal probe 1-step reaction MiX2X | / | 1X | 10 µl |
| Luna Warmstaet RTEnzyme Mox 20X | / | 1X | 1 µl |
| Amorce Forward | 10 µM | 1mM | 0,1 µl |
| Amorce Reverse | 10 µM | 1mM | 1.8 µl |
| Probe | 25 µM | 1,25 µM | 0,20 µl |
| H ₂ O | / | / | 1,9 µl |
| Total | / | / | 15 µl |

Volume final de 20 µl, soit : 15 µl du mix et 5 µl de l'extrait.

II.6.2.3. Mix Real time RT-PCR eGFP

Pour lancer la réaction de RT-PCR, un mélange de Mix de l'eGFP (**Tableau 4**) à été préparé.

Tableau 4 - Calculs des volumes du mélange de Mix Qrt-PCR (eGFP)

| Réactif | Conc. initiale | Conc. Final | Volume N=1 |
|--|----------------|-------------|------------|
| Luna universal probe 1-step reaction MiX2X | 2X | / | 5 µl |
| MgSO | 50 µM | 0.625 mM | 0.125 µl |
| eGF-P Forxard | 10 µM | 0.5 µM | 0.25 µl |
| eGF-P Reverse | 10 µM | 0.5 µM | 0.25 µl |
| eGF-P probe | / | 0.15 µM | 0.15 µl |
| ROX*optionel | / | / | 0.025 µl |
| RNasin® Ribonuclease inhibitor | / | / | 0.1 µl |
| Luna Warmstaet RTEnzyme Mox 20X | 2 UI/µl | / | 0.5 µl |
| H ₂ ORNA-free | / | / | 1.4 µl |
| Total | / | / | 7.5 µl |

Volume final de 10 μ l, soit : 7.5 μ l du mix et 2.5 μ l de l'extrait.

II.6.3. - Profile thermique de RT-PCR

Les échantillons ont été placés dans le thermocycleur pour réaliser une RT-PCR à 47 cycles selon le programme suivant (**Tableau 5**).

Tableau 5 - Programme thermocycleur de RT-PCR.

| | Programmer | | cycles |
|----------------|--------------|------------------|--------|
| | Target (°C) | Hold (hh:mm:ss) | |
| Stage 1 | 55 | 00:10:00 | 1 |
| Stage 2 | 95 | 00:01:00 | 1 |
| Stage 3 | 95 | 00:00:10 | 45 |
| | 60 | 00:00:40 | |

II.7. - Identification moléculaire des tiques

L'identification moléculaire des espèces de tiques repose sur l'amplification et le séquençage du gène du cytochrome oxidase I de l'ADN mitochondrial largement utilisé dans la systématique des arthropodes (Folmer et al., 1994).

II.7.1. - Réaction en chaine de polymérisation (PCR)

La technique de réaction en chaine de polymérisation (PCR) repose sur l'utilisation des propriétés physicochimiques des brins de l'ADN. Cette technique permet l'amplification d'un fragment d'ADN cible grâce à des amorces spécifiques en millier de copies grâce aux cycles répétés de la dénaturation, l'hybridation et l'élongation (généralement 25-40 fois), ce qui permet d'amplifier de façon exponentielle la séquence d'ADN cible (Garibyan et Avashia, 2013, Mullis et al, 1987, Bell, 1989 ; Ishmael et al., 2008) pour qu'il soit visualisable sur gel d'agarose ou pour être séquencer.

II.7.2. - Préparation du Mix PCR mtADN

Ce tableau (**Tableau 6**) présent les réactifs utilisé, leur concentration initiale et finale, ainsi que le volume nécessaire pour chaque réactif dans le cadre de l'analyse par PCR mt ADN

Tableau 6 - Calculs des volumes du mélange de Mix mtADN

| Réactifs | Conc. Initiale | Conc. Finale | Volume N=1 |
|------------------|----------------|--------------|------------|
| MasterMix * | | | 12.5 µl |
| H ₂ O | | | 7.5 µl |
| Amorce 1 | 10 µM | 0.2 µM | 1 µl |
| Amorce 2 | 10 µM | 0.2 µM | 1 µl |
| Total | | | 23 µl |

* « EmeraldAmp GT PCR Master Mix».

-La quantité du mix est préparée en fonction du nombre d'échantillons à analyser.

Volume final de 25 µl, soit : 23 µl du mix et 2 µl de l'extrait.

II.7.3. - Profil thermique

Le tableau ci-dessous présente le profil thermique utilisé, incluant les différents programmes et cycle appliqués durant l'amplification. Chaque étape du cycle est détaillée avec les températures spécifiques et les durées correspondantes (**Tableau 7**).

Tableau 7 - Programme thermocycleur de PCR mtADN

| Programme | | Cycle |
|---------------------------------|--------------------|-------|
| Température (-°C) | Temps (hh :mm :ss) | |
| Etape 1 RT | | 1 |
| 95° | 00 :05 :00 | |
| Etape 2 | | 37 |
| 94° | 00 :00 :30 | |
| 55° | 00 :00 :30 | |
| 72° | 00 :01 :30 | |
| Etape 3 élévation finale | | 1 |
| 72° | 00 :10 :00 | |
| 25° | Hold | |

II.8. - Electrophorèse sur gel d'agarose à 2%

Les produits d'amplification sont séparés et visualisés sur gel d'agarose à 2% sous un trans-illuminateur dans une chambre noire.

II.8.1. - Préparation du gel d'agarose

-2 grammes d'agarose en poudre sont pesés et mélangés à 50mL de tampon TBE 0,5X.

-La solution est chauffée au microonde jusqu'à ce qu'elle soit claire et homogène, puis laissée refroidir sans trop attendre pour éviter la solidification.

-3µl de Sybersafe (un agent intercalant qui permet de visualiser les bandes d'ADN sous lumière UV) sont ajoutés à la solution d'agarose puis le tout est ensuite délicatement versée

dans un plateau de gel contenant un peigne pour former les puits de dépôt des échantillons en prenant soin d'éliminer les bulles d'air.

- Après solidification du gel à température ambiante, le peigne est retiré le gel est placé dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon de migration TBE à 0.5X.

- Les échantillons d'ADN sont mélangés au tampon de charge et déposés dans les puits un par un à l'aide d'une micropipette.

-Le gel est soumis à un courant électrique (80-120 V) durant 50 minutes pour permettre la migration des fragments d'ADN (**Figure 19**)

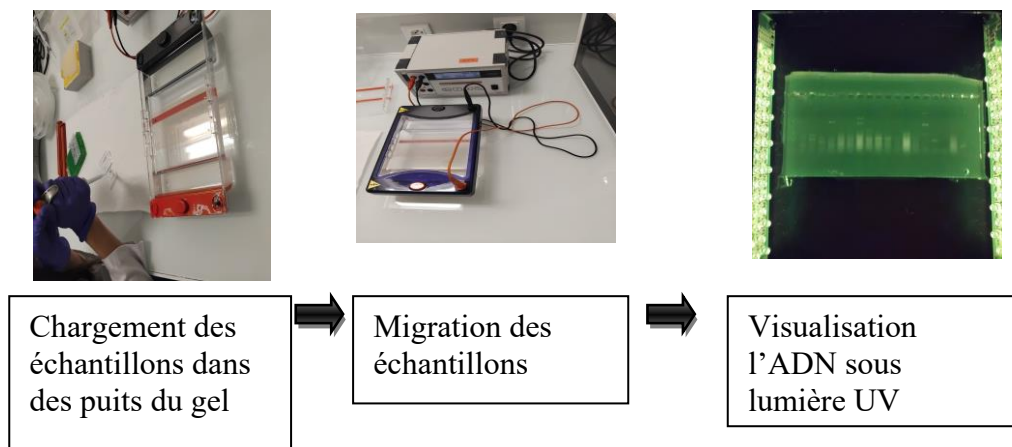


Figure 19 - un schéma des étapes de la migration sur le gel d'agarose

II.9. - Séquençage

Le séquençage de l'ADN est une méthode utilisée pour déterminer l'ordre des nucléotides (A, C, G, T) présents dans un brin d'ADN. Il existe plusieurs méthodes de séquençage tel que méthode de Sanger, séquençage à haut débit NGS utilisant différentes technologies tel que Illumina et Nanopore Oxford (Lamoril et al., 2008). Pour notre étude, la méthode de Sanger a été utilisée.

II.9.1. - Méthode de Sanger

Également connue sous le nom de séquençage par terminaison de chaîne, elle repose sur la réplication de l'ADN avec incorporation aléatoire de nucléotides modifiés fluorescents (ddNTP), suivie d'une séparation des fragments par taille et d'une détection optique par électrophorèse pour lire la séquence (Tutoweb, 2021).

Le séquençage se fait en plusieurs étapes : la purification des amlicants à séquencer, une réaction PCR-séquençage et une deuxième purification des produits PCR (Tutoweb, 2021).

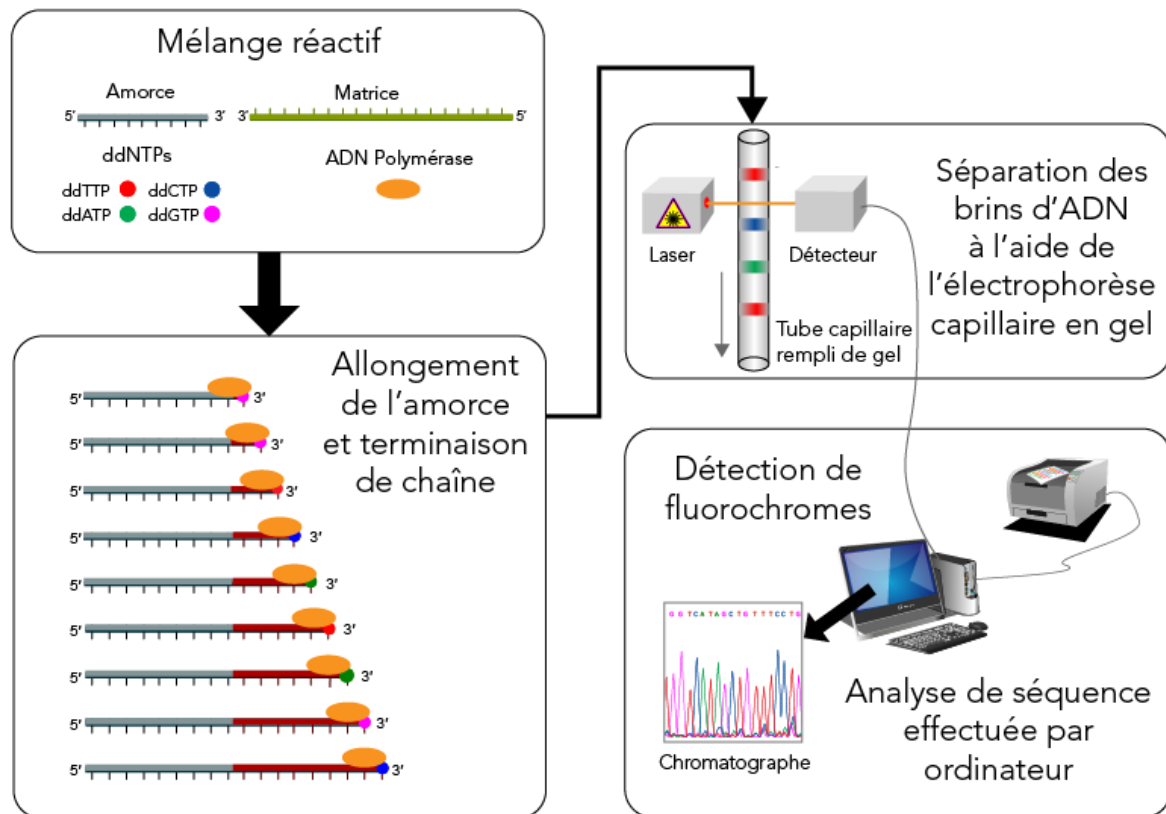


Figure 20 - Principe du séquençage de l'ADN à l'aide d'électrophorèse capillaire en gel (Estevezj.2012).

II.9.2. - Purification post-amplification

La purification post-amplification est une étape clé après une PCR pour éliminer les amorces et les dNTPs non incorporés, la méthode enzymatique ExoSAP-IT utilise l'Exonucléase I pour dégrader les amorces et l'ADN monocaténaire, ainsi que la Shrimp Alkaline Phosphatase pour hydrolyser les dNTPs restants. Cette méthode offre une purification efficace et fiable, avec des résultats cohérents et sans pertes significatives (USB corporation. 2000 ; Bell, 2008).

La purification s'effectue de la manière suivante : 5 µL de chaque produit amplifié ainsi que 2 µL d'ExoSAP sont mélangés et déposés dans des micro-tubes. Les échantillons sont ensuite placés dans thermocycleur, où la réaction est réalisée selon le programme suivant: 37°C pendant 4 minutes suivies d'une étape de 80°C pendant 1 minute.

Une fois les produits positifs purifiés, la réaction PCR séquençage est ensuite réalisée comme suite : Chaque produits PCR est amplifié séparément avec chacun des amorces sens et anti-

sense pour générer des brins de différentes longueurs en utilisant le kit PCR ABI Prism BigDye terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 3.01.

II.9.3. - Echantillons PCR mitochondrie HCO/LCO

II.9.3.1. - Mix Amorce HCO

Le **Tableau 8** ci-dessous présente les réactifs et les concentrations utilisées pour le mélange du Mix Amorce HCO.

Tableau 8 - Composition du mélange pour le Mix Amorce HCO

| Réactifs | Conc. initiale | Conc. Finale | Volume 1 tube |
|----------------|----------------|--------------|---------------|
| Buffer Dye | | | 1 µl |
| HCO | 10 µM | 0.5 µM | 0.5 µl |
| Big dye | | | 2 µl |
| Eau Rnase free | | | 5.5 µl |
| Total | | | 9 µl |

Volume final de **10 µl**, soit: 9 µl du +mix et **1 µl d'ADN purifié**

II.9.3.2. - Mix Amorce LCO

Le **Tableau 9** ci-dessous détaille les réactifs et les concentrations utilisés pour préparer le mélange du Mix Amorce LCO.

Tableau 9 - Composition du mélange pour le Mix Amorce LCO

| Réactifs | Conc. initiale | Conc. Finale | Volume 1 tube |
|----------------|----------------|--------------|---------------|
| Buffer Dye | | | 1 µl |
| LCO | 10 µM | 0.5 µM | 0.5 µl |
| Big dye | | | 2 µl |
| Eau Rnase free | | | 5.5 µl |
| Total | | | 9 µl |

Volume final de **10 µl**, soit : 9 µl du +mix et **1 µl d'ADN purifié**

II.9.4. - Profil thermique

Le **Tableau 10** présente le profil thermique appliqué durant la réaction de RT-PCR.

Tableau 10 - Profil thermique pour la réaction de RT-PCR

| Programme | | Cycle |
|------------------|------------------|-------|
| Température (°C) | Temps (hh:mm:ss) | |
| Etape 1 | | 1 |
| 96° | 00 :01 :00 | |
| Etape 2 | | |
| 96° | 00 :00 :10 | X25 |
| 50° | 00 :00 :05 | |
| 60° | 00 :04 :00 | |
| 4° | Hold | |

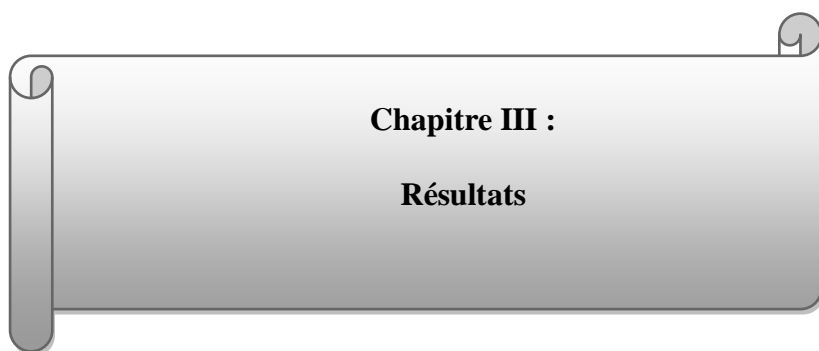
Une deuxième phase de purification post réaction PCR-séquençage est effectuée pour éliminer l'excès d'amorce, amplicants et réactifs en utilisant les billes de séphadex. Deux centrifugations sont réalisées pour la préparation des plaques de purification. 400µl de séphadex sont déposés dans la plaque de purification et centrifugée à 1800tr pendant 10 minutes, l'excès d'eau est éliminé puis 200µl de séphadex sont à nouveau ajoutés et centrifugée à 1800tr pendant 5 minutes. Une fois la plaque préparée, 10µl de chaque produit PCR-séquençage sont mélangés à 10µl d'eau distillée puis déposés dans la plaque de purification. La plaque est finalement centrifugée à 1800tr pendant 10 minutes pour récupérer les produits de séquençage qui seront ensuite soumis au séquençage dans le séquenceur durant toute la nuit.

II.10. - Analyse des produits de séquençage

Les séquences sont éditées et nettoyées dans le logiciel BioEdit v.7.2.5 (Hall TA, 1999) avant d'être blastées en ligne dans la base de données GenBank pour la confirmation des espèces. Les séquences sont considérées correctes si le pourcentage de ressemblance était $\geq 98\%$, E value égal à 0 et le taux de couverture égal to 100%.

II.11. Construction de l'arbre phylogénétique

Les séquences sont alignées en utilisant le l'algorithme alignement multiple Muscle et un arbre neighbor joining (NJ) est générée pour visualiser les séquences suivant leurs ressemblances en utilisant le logiciel Mega v10.1.7 (Tamura et al., 2021).



Chapitre III :
Résultats

Dans ce chapitre, nous présenterons les différents résultats obtenus au cours de notre étude, notamment concernant l'effectif des tiques, l'analyse et l'identification des tiques, ainsi que les résultats de la RT-PCR (pour l'eGFP, TBE, CCHF). Nous aborderons également les résultats de l'identification moléculaire et l'arbre phylogénétique .

III.1.- Résultats de l'effectif des tiques dans la région de Tizi-Ouzou

Les résultats obtenus sont exploités en fonction du nombre total de tiques collectées dans les deux régions ainsi que des stades de développements.

III.1.1. - Résultats globale de la récolte des tiques

Lors de notre étude, s'étalant sur une période de 4 mois (Février- mai 2024) un total de 316 tiques a été collecté au niveau des deux sites d'étude (Bouzeguène et Mekla) (**Tableau 11**). La majeure partie des tiques était collecté en phase parasitaire (sur les animaux) et peu en phase libre (sur la végétation) par la technique du drapeau.

Tableau 11 - Résultats de la récolte.

| | Février | mars | Avril | Mai | Totale |
|------------|---------|------|-------|-----|--------|
| Mekla | 8 | 22 | 96 | 47 | 173 |
| Bouzeguene | 75 | 68 | / | / | 143 |
| Totale | 83 | 90 | 96 | 45 | 316 |

Pour les deux sites d'étude, le nombre de tique varie selon les mois, le pic est observé au mois d'avril et mars correspondant à la période du printemps où les conditions climatiques sont favorables à la réactivation des insectes après la période d'hibernation durant l'hiver (**Figure 21**).

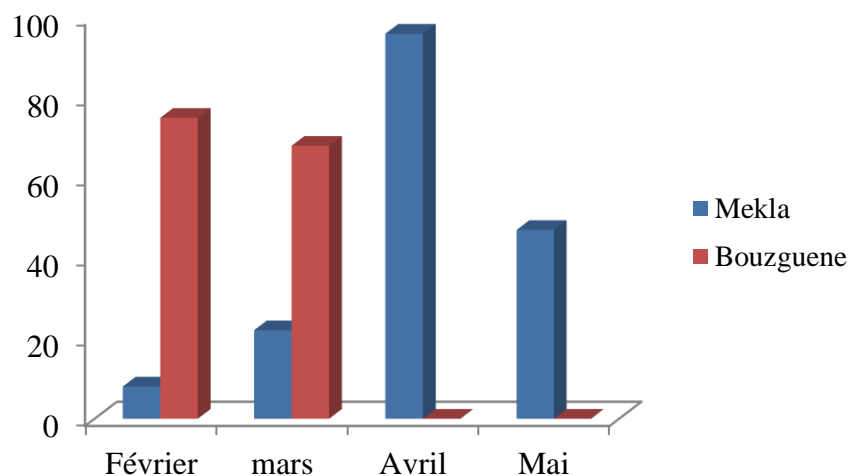


Figure 21 - Représentation graphique des résultats de la récolte des tiques.

III.1.2. - Résultats de la récolte des tiques en fonction des stades de développements

La densité des tiques par mois et par stades, offrant une vue d'ensemble des variations saisonnières qui est regroupées dans le tableau 12.

Tableau 12 : Densité des tiques par mois et par stades.

| | Février | mars | Avril | Mai | Totale |
|---------|---------|------|-------|-----|--------|
| Adulte | 50 | 61 | 19 | 4 | 134 |
| Nymphes | 25 | 9 | 7 | 4 | 45 |
| Larve | 9 | 20 | 71 | 36 | 137 |
| Totale | 83 | 90 | 96 | 50 | 316 |

Entre le mois de février et mars les adultes sont présents en grande quantité traduisant ainsi l'hibernation des tiques en phase adulte puisqu'elles sont les premières à apparaître suivi par la phase larvaire correspondant à l'éclosion des œufs pondus par les femelles adultes issues de l'hibernation (**Figure 22**).

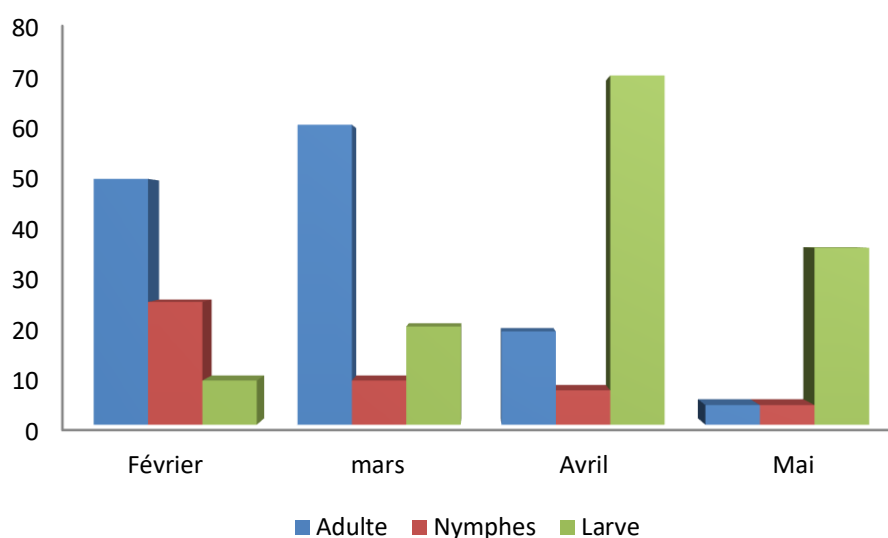


Figure 22 - densité des tiques par stades.

III.2. - Analyse des tiques

Sur les 316 tiques collectées 286 ont été analysées et 30 tiques ont été éliminées de l'analyse moléculaires car elles étaient pleinement gorgées.

III.3. - Identification des tiques

En utilisant la clé dichotomique de Bouattour (2002), les 316 individus collectés ont été identifiés comme appartenant à l'ordre des Ixodida et à la famille des Ixodidae. Ces tiques se répartissent en trois genres : *Rhipicephalus*, *Hyalomma* et *Ixodes*.

III.4. - Résultats de la RT-PCR

Les échantillons utilisés pour la PCR comprenaient 53 échantillons, plus un témoin positif et un témoin négatif. Ces échantillons correspondent aux codes RD 1 à RD53.

III.4.1. - Résultats de la RT-PCR eGFP

L'amplification du témoin de l'extraction eGFP s'est révélée positif pour tous les échantillons confirmant ainsi une bonne extraction des ARNs. Le **tableau 13** résume les données obtenues, y compris les valeurs de seuil de cycle (Ct).

Tableau 13 - Résultats de la RT PCR pour eGFP.

| Echantillon | Ct eGFP | Observation |
|-------------|---------|-------------|
| NC | / | |
| RD 1 | 28,54 | Positif |
| RD 2 | 25,70 | Positif |
| RD 3 | 23,74 | Positif |
| RD 4 | 25,10 | Positif |
| RD 5 | 25,57 | Positif |
| RD 6 | 25,04 | Positif |
| RD 7 | 23,46 | Positif |
| RD 9 | 25,32 | Positif |
| RD 10 | 27,83 | Positif |
| RD 11 | 30,01 | Positif |
| RD 12 | 25,77 | Positif |
| RD 13 | 24,09 | Positif |
| RD 14 | 26,35 | Positif |
| RD 15 | 28,45 | Positif |
| RD 16 | / | / |
| RD 17 | 25,83 | Positif |
| RD 18 | 25,98 | Positif |
| RD 19 | 29,28 | Positif |
| RD 20 | 25,78 | Positif |
| RD 21 | 23,64 | Positif |

| | | |
|-------|-------|---------|
| RD 22 | 22,80 | Positif |
| RD 23 | 24,12 | Positif |
| RD 24 | 21,88 | Positif |
| RD 25 | 21,88 | Positif |
| RD 26 | 25,35 | Positif |
| RD 27 | 29,16 | Positif |
| RD 28 | 26,74 | Positif |
| RD 29 | 22,18 | Positif |
| RD 30 | 24,25 | Positif |
| RD 31 | 23,71 | Positif |
| RD 32 | 25,04 | Positif |
| RD 33 | 25,73 | Positif |
| RD 34 | 23,41 | Positif |
| RD 35 | 23,24 | Positif |
| RD 36 | 20,35 | Positif |
| RD 37 | 23,46 | Positif |
| RD 38 | 24,38 | Positif |
| RD 39 | 23,36 | Positif |
| RD 40 | 25,21 | Positif |
| RD 41 | 23,26 | Positif |
| RD 42 | 24,35 | Positif |
| RD 43 | 25,63 | Positif |
| RD 44 | 24,23 | Positif |
| RD 45 | 24,37 | Positif |
| RD 46 | / | / |
| RD 47 | / | / |
| RD 48 | / | / |
| RD49 | / | / |
| RD 50 | / | / |
| RD 51 | / | / |
| RD 52 | / | / |

Le graphique suivant (**Figure 23**) illustre les résultats d'amplification obtenus pour l'eGFP, montrant la dynamique des cycles de RT-PCR.

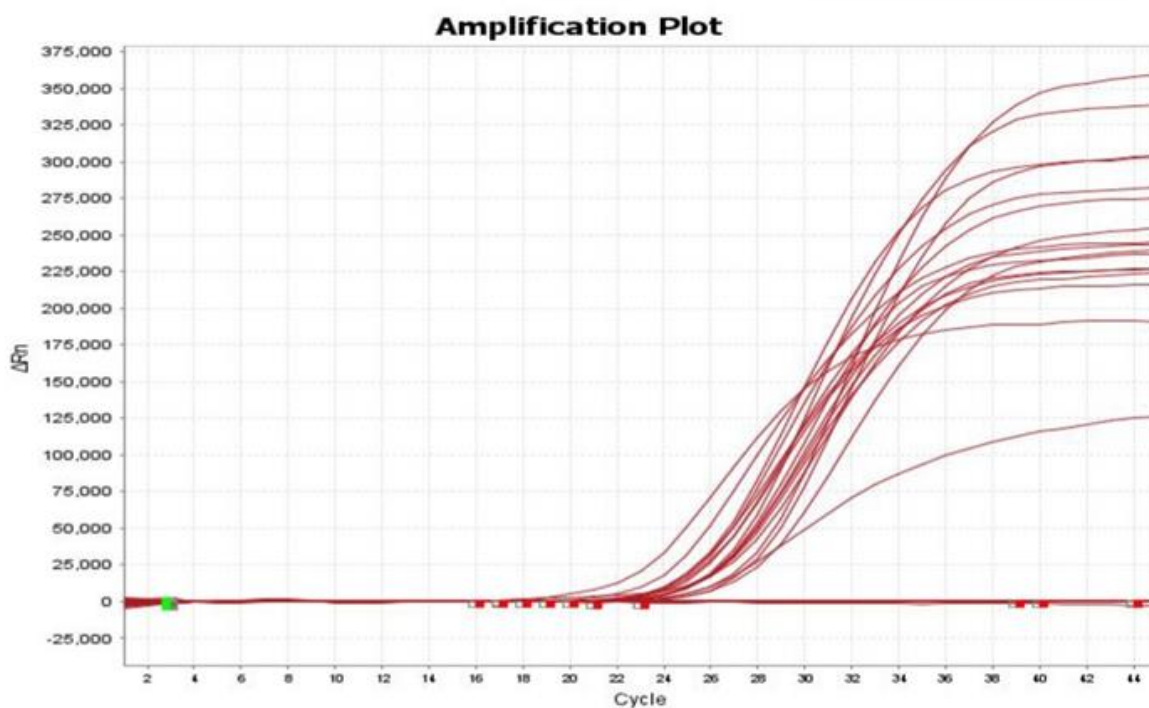


Figure 23 - Graphe représentant des résultats de L'eGFP.

III.4.2. - Résultats de la RT-PCR TBE

Les résultats de la RT-PCR pour le virus TBE se sont révélés négatifs pour l'ensemble des échantillons examinés (**Tableau 14**).

Tableau 14 - Résultats de la RT PCR pour TBE.

| Echantillon | Ct TBE | Observation |
|--------------|--------|-------------|
| NC | / | Négatif |
| PC-TBE 10 -6 | 25.6 | Positif |
| RD 1 | / | Négatif |
| RD 2 | / | Négatif |
| RD 3 | / | Négatif |
| RD 4 | / | Négatif |
| RD 5 | / | Négatif |
| RD 6 | / | Négatif |
| RD 7 | / | Négatif |
| RD 9 | / | Négatif |

| | | |
|-------|---|---------|
| RD 10 | / | Négatif |
| RD 11 | / | Négatif |
| RD 12 | / | Négatif |
| RD 13 | / | Négatif |
| RD 14 | / | Négatif |
| RD 15 | / | Négatif |
| RD 16 | / | Négatif |
| RD 17 | / | Négatif |
| RD 18 | / | Négatif |
| RD 19 | / | Négatif |
| RD 20 | / | Négatif |
| RD 21 | / | Négatif |
| RD 22 | / | Négatif |
| RD 23 | / | Négatif |
| RD 24 | / | Négatif |
| RD 25 | / | Négatif |
| RD 26 | / | Négatif |
| RD 27 | / | Négatif |
| RD 28 | / | Négatif |
| RD 29 | / | Négatif |
| RD 30 | / | Négatif |
| RD 31 | / | Négatif |
| RD 32 | / | Négatif |
| RD 33 | / | Négatif |
| RD 34 | / | Négatif |
| RD 35 | / | Négatif |
| RD 36 | / | Négatif |
| RD 37 | / | Négatif |
| RD 38 | / | Négatif |
| RD 39 | / | Négatif |
| RD 40 | / | Négatif |
| RD 41 | / | Négatif |

| | | |
|-------|---|---------|
| RD 42 | / | Négatif |
| RD 43 | / | Négatif |
| RD 44 | / | Négatif |
| RD 45 | / | Négatif |
| RD 46 | / | Négatif |
| RD 47 | / | Négatif |
| RD 48 | / | Négatif |
| RD49 | / | Négatif |
| RD 50 | / | Négatif |
| RD 51 | / | Négatif |
| RD 52 | / | Négatif |
| RD 53 | / | Négatif |

Le graphique ci-dessous (**Figure 24**) montre la courbe d'amplification obtenue par RT-PCR, du témoin positif et d'un échantillon négatif de TBE.

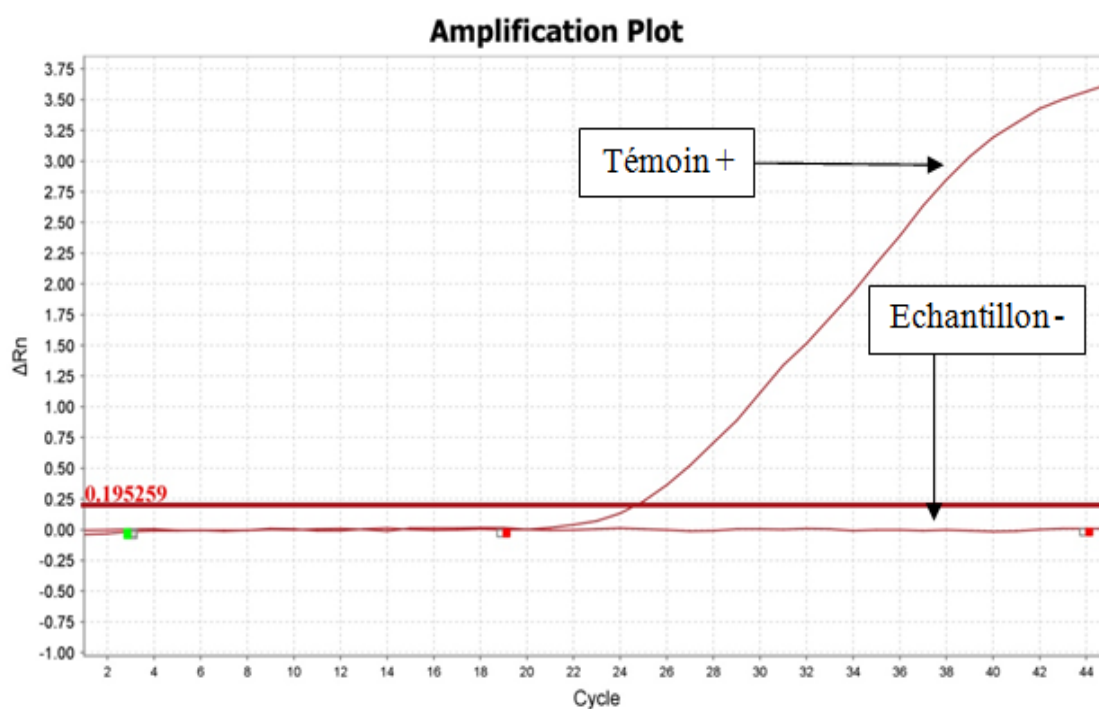


Figure 24- Graphe représentant un résultat négatif de TBE.

III.4.3. - Résultats de la RT-PCR CCHF

Tous les résultats de la RT-PCR pour le virus CCHF se sont révélés négatifs pour l'ensemble des échantillons examinés (**Tableau 15**).

Tableau 15 : Résultats de la RT PCR pour CCHF.

| Echantillon | Ct CCHF | Observation |
|---------------|---------|-------------|
| NC | / | / |
| PC-CCHF 10 -6 | 26.54 | Positive |
| RD 1 | / | Négatif |
| RD 2 | / | Négatif |
| RD 3 | / | Négatif |
| RD 4 | / | Négatif |
| RD 5 | / | Négatif |
| RD 6 | / | Négatif |
| RD 7 | / | Négatif |
| RD 9 | / | Négatif |
| RD 10 | / | Négatif |
| RD 11 | / | Négatif |
| RD 12 | / | Négatif |
| RD 13 | / | Négatif |
| RD 14 | / | Négatif |
| RD 15 | / | Négatif |
| RD 16 | / | Négatif |
| RD 17 | / | Négatif |
| RD 18 | / | Négatif |
| RD 19 | / | Négatif |
| RD 20 | / | Négatif |
| RD 21 | / | Négatif |
| RD 22 | / | Négatif |
| RD 23 | / | Négatif |
| RD 24 | / | Négatif |
| RD 25 | / | Négatif |
| RD 26 | / | Négatif |

| | | |
|-------|---|---------|
| RD 27 | / | Négatif |
| RD 28 | / | Négatif |
| RD 29 | / | Négatif |
| RD 30 | / | Négatif |
| RD 31 | / | Négatif |
| RD 32 | / | Négatif |
| RD 33 | / | Négatif |
| RD 34 | / | Négatif |
| RD 35 | / | Négatif |
| RD 36 | / | Négatif |
| RD 37 | / | Négatif |
| RD 38 | / | Négatif |
| RD 39 | / | Négatif |
| RD 40 | / | Négatif |
| RD 41 | / | Négatif |
| RD 42 | / | Négatif |
| RD 43 | / | Négatif |
| RD 44 | / | Négatif |
| RD 45 | / | Négatif |
| RD 46 | / | Négatif |
| RD 47 | / | Négatif |
| RD 48 | / | Négatif |
| RD49 | / | Négatif |
| RD 50 | / | Négatif |
| RD 51 | / | Négatif |
| RD 52 | / | Négatif |
| RD 53 | / | Négatif |

Le graphique ci-dessous (**Figure 25**) montre la courbe d'amplification obtenue par RT-PCR, comparant les résultats du témoin positif et de l'échantillon négatif CCHF.

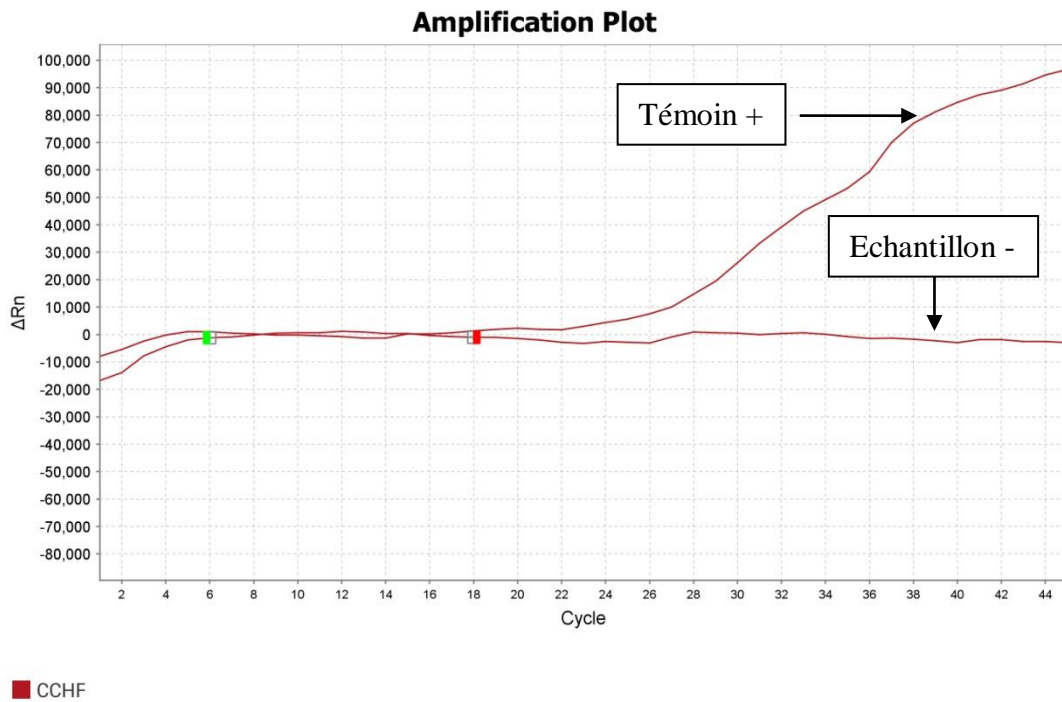


Figure 25 - Graphe représentant un résultat négatif de CCHF.

III.5. - L'identification moléculaire

Les échantillons utilisés pour l'identification moléculaires pris au hasard comprenaient 10 échantillons plus un témoin négatif (**Tableau4**).

Tableau 16 - Liste des échantillons utilisés pour l'identification moléculaire.

| Echantillon | Résultat |
|-------------|----------|
| NC | Négatif |
| RD17 | Positif |
| RD20 | Positif |
| RD34 | Positif |
| RD38 | Positif |
| RD39 | Positif |
| RD40 | Positif |
| RD46 | Positif |

Les résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose pour les différents échantillons sont présentés ci-dessous (**Figure 26**), montrant les bandes obtenues après amplification par PCR

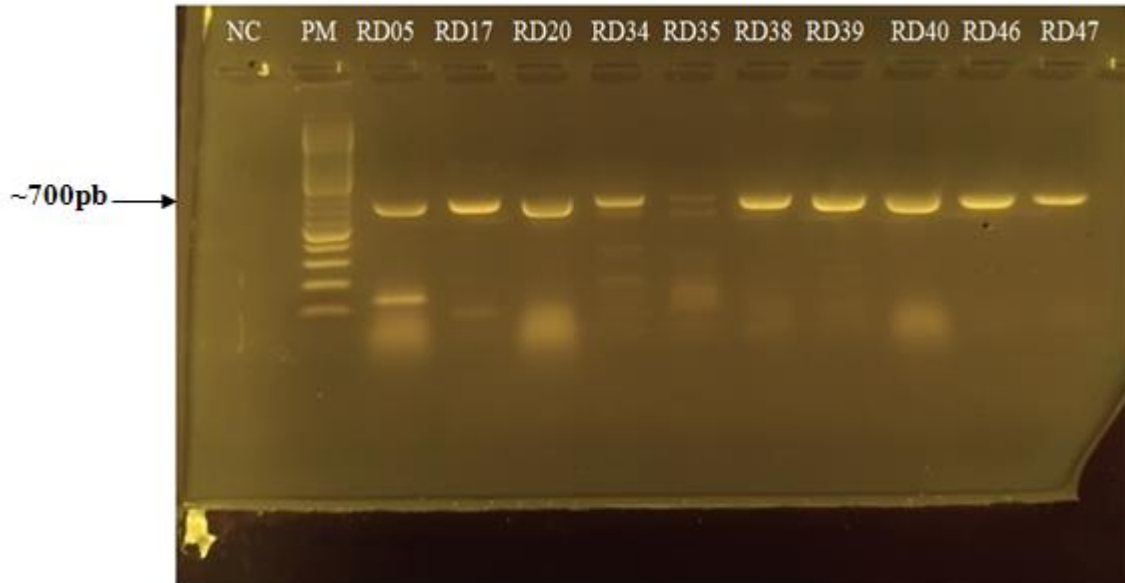


Figure 26 - Résultats de l'identification moléculaire des échantillons sur gel d'agarose.

III.6. - Résultats du séquençage

Le succès de cette réaction a été vérifié et les résultats de chaque échantillon a été visualisé à l'aide du logiciel "BioEdit" qui permet de lire les données du séquenceur, représentés sous forme de pics de quatre couleurs différentes (A=vert, T=rouge, C=bleu, G=noir) et d'intensité variable (**figure 27**).

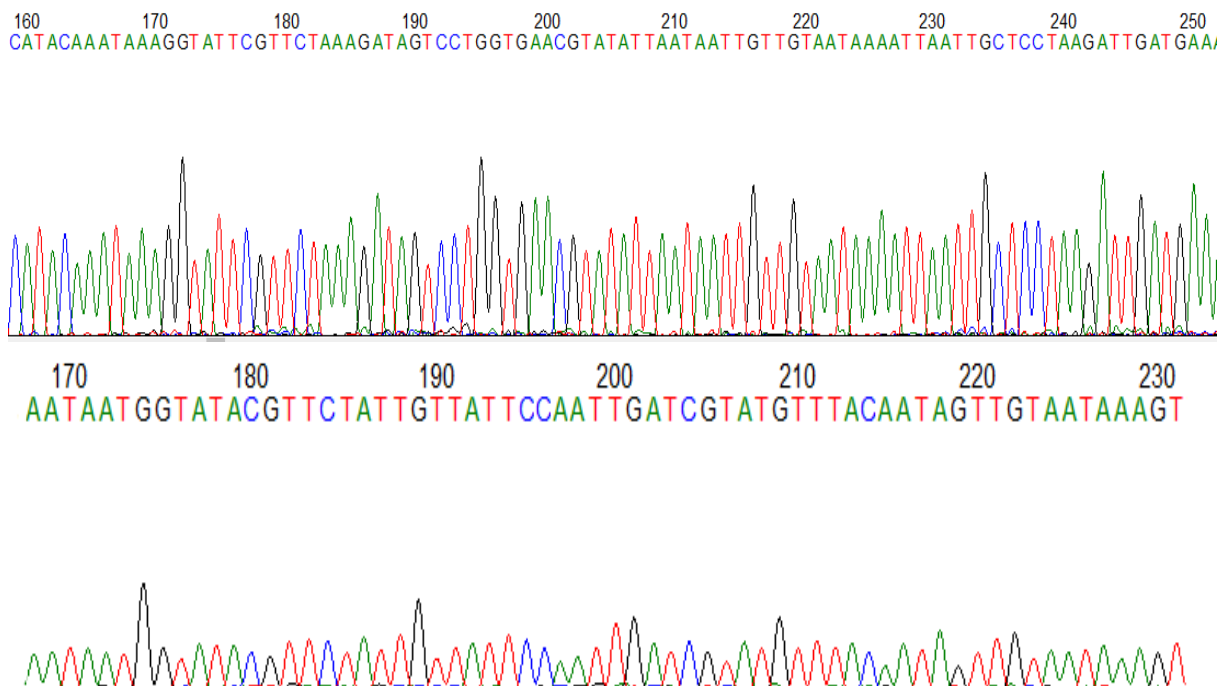


Figure 27 - Exemple de résultats obtenus après une lecture par le logiciel "BioEdit".

-RD34 : > PQ228202_ *Rhipicephalus sanguineuse*

GATATTGGAACAATATATTTAATTTTTGGAGCATGATCAGGTATATTAGGACTTA
 GTATAAGAATATTAATTCGTATAGAATTtGGACAACCTGGAACCTTAATTGGAAAT
 GATCAGATTTATAATGTAATCGTAACAGCACACGCATTTATTATAATTTTTTTTAT
 AGTTATACCAATCATAATCGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATATTA
 GGTGCCCCAGATATAGCATTTCACGAATAAATAATATAAGATTTTGACTTTTAC
 CTCCTTCACTATTTTTATTAATTAACTCTTCATTAATTGAATCTGGAACCTGGTACA
 GGATGAACAGTTTACCCTCCTCTATCTTCAAATTTATCACATTATGGCCCTTCAGT
 AGATTTAGCTATCTTTTCTCTTCATCTTGCTGGTGCTTCTTCAATTTTAGGTGCAAT
 TAACTTTATTACAACCTATTGTAAACATACGATCAATTGGAATAACAATAGAACGT
 ATACCATTATTTGTTTGATCTGTTTTAATTACAGCTATTTTATTACTTTTATCTTTA
 CCTGTATTAGCAGGTGCCATTACAATATTGTTAACTGATCGAAACCTTAATACATC
 ATTTTTTGATCCTTCA GGGGGAGGAGATCCAATTTATATCAAC

- RD38 : > PQ228200 _ *Hyaloma marginatum*

GGATCATGAGCCGGAATATTAGGCTTAAGTATAAGAATTTTAATTCGAATAGAAT
 TAGCAAATCCAGGTACATTAATTGGTAATGATCAAATTTATAACGTAATTGTAAC
 AGCCCATGCTTTTGTATAATTTTTTTCATAGTTATACCTATTATAATTGGAGGATT
 TGGCAATTGATTAGTTCCAATCATATTAGGGTCCCCAGATATAGCATTTCCTCGAA
 TAAATAACATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTTTTTTACTGTAAATTCAT
 CTTTAATTGAATCAGGAGCAGGAACCTGGATGAACAGTTTACCCTCCACTTTCTTC
 AAACCTTATCTCATTACGGACCTTCAGTTGATTTAGCTATTTTTTCTTTACATCTTGC
 GGGTGCATCATCAATTCTTGGGGCCATTAATTTTATTACAACCTATTATTAATATAC
 GATCAATTGGATTAACAATAGAACGTATACCTTTATTTGTTTGATCTGTTTTAATT
 ACAGCAATTTTACTATTACTTTCACTTCCAGTTCTTGCTGGGGCAATTACCATATT
 GTTAACAGATCGAAATTTAATACTTCATTTTTTTGACCCTTCAGGCGGTGGAGATC
 CAATTCCTTATCAACATCTATTTTGA

- RD39 : > PQ228201 _ *Hyaloma marginatum*

GGATCATGAGCCGGAATATTAGGCTTAAGTATAAGAATTTTAATTCGAATAGAAT
 TAGCAAATCCAGGTACATTAATTGGTAATGATCAAATTTATAACGTAATTGTAAC
 AGCCCATGCTTTTGTATAATTTTTTTCATAGTTATACCTATTATAATTGGAGGATT
 TGGCAATTGATTAGTTCCAATCATATTAGGGTCCCCAGATATAGCATTTCCTCGAA
 TAAATAACATAAGATTTTGATTATTACCCCTTCTCTTTTTTTACTGTAAATTCAT
 CTTTAATTGAATCAGGAGCAGGAACCTGGATGAACAGTTTACCCTCCACTTTCTTC
 AAACCTTATCTCATTACGGACCTTCAGTTGATTTAGCTATTTTTTCTTTACATCTTGC
 AGGTGCATCATCAATTCTTGGGGCCATTAATTTTATTACAACCTATTATTAATATAC
 GATCAATTGGATTAACAATAGAACGTATACCTTTATTTGTTTGATCTGTTTTAATT
 ACAGCAATTTTACTATTACTTTCACTTCCAGTTCTTGCTGGGGCAATTACCATATT
 GTTAACAGATCGAAATTTAATACTTCATTTTTTTGACCCTTCAGTGCCTGTGGAGA
 TCCAA

- **RD40** : > PQ228197_ *Rhipicephalus sanguineus*

AGCATGATCAGGTATATTAGGACTTAGTATAAGAATATTAATTCGTATAGAATTA
 GGACAACCTGGAACCTTTAATTGGAAATGATCAGATTTATAATGTAATCGTAACAG
 CACATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAGTTATACCAATCATAATCGGAGGATTT
 GGAAATTGATTAGTCCCTATCATATTGGGTGCCCCAGATATAGCATTTCACGAA
 TAAATAATATAAGATTTTGACTTTTACCTCCTTCACTATTTTTATTAATTAACCTCTT
 CATTAAATTGAATCTGGAGCTGGTACAGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTATCTTCA
 AATTTATCACATTATGGCCCTTCAGTAGATTTAGCTATTTTTTCTCTTCATCTTGCT
 GGTGCTTCTTCAATTTTAGGTGCAATTAACCTTTATTACAACCTATTGTAAACATACG
 ATCAATTGGAATAACAATAGAACGTATACCATTATTTGTTTGATCTGTTTTAATTA
 CAGCTATTTTATTACTTTTATCTTTACCTGTATTAGCAGGTGCCATTACAATATTGT
 TAACTGATCGAAACTTTAATACATCATTTTTTTGATCCTTCAGGGGGAGGAGAT

- **RD46** : > PQ228196_ *Rhipicephalus sanguineus*

GGAGCATGATCAGGTATATTAGGACTTAGTATAAGAATATTAATTCGTATAGAAT
 TAGGACAACCTGGAACCTTTAATTGGAAATGATCAGATTTATAATGTAATCGTAAC
 AGCACACGCATTTATTATAATTTTTTTTATAGTTATACCAATCATAATCGGAGGAT
 TTGGAAATTGATTAGTCCCTATTATATTAGGTGCCCCAGATATAGCATTTCACGAA
 ATAAATAATATAAGATTTTGACTTTTACCTCCTTCACTATTTTTATTAATTAACCTCT
 TCATTAATTGAATCTGGAGCTGGTACAGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTATCTTC
 AAATTTATCACATTATGGCCCTTCAGTAGATTTAGCTATCTTTTCTCTTCATCTTGCT
 TGGTGCTTCTTCAATTTTAGGTGCAATTAACCTTTATTACAACCTATTAACATACGA
 TCAATTGGAATAACAATAGAACGTATACCATTATTTGTTTGATCTGTTTTAATTAC
 AGCTATTTTATTACTTTTATCTTTACCTGTATTAGCAGGTGCCATTACAATATTGTT
 AACTGATCGAAACTTTAATACATCATTTTTTTAATCCTTCAGGGGGAGGAGAT

Ensuite, un arbre phylogénétique a été construit à l'aide du logiciel MEGA pour analyser les relations évolutives entre les séquences virales. Les séquences pertinentes ont été collectées depuis la base de données GenBank, suivies d'un alignement multiple pour identifier les positions homologues. La méthode du Maximum de parcimonie a été utilisée pour minimiser le nombre de changements évolutifs. Les résultats ont été examinés pour comprendre les relations entre les virus, en tenant compte des ancêtres communs et de la longueur des branches. Enfin, l'arbre a été personnalisé et exporté dans un format graphique (**figure 28**).

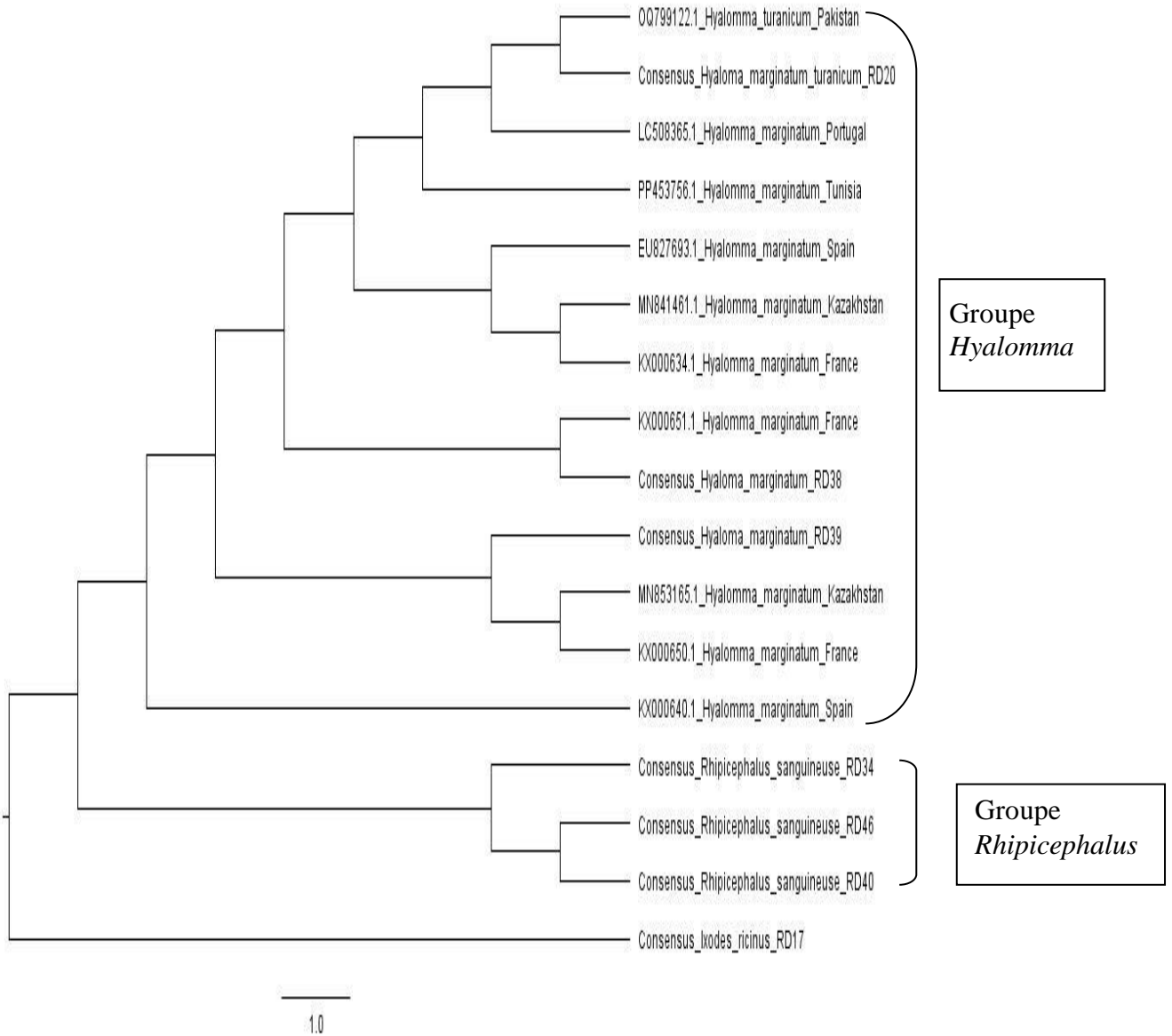


Figure 28 - Arbre phylogénétique des tiques.



Discussion

Dans ce chapitre, nous aborderons les discussions sur l'effectif des tiques parasites des animaux domestiques dans la région de Tizi-Ouzou, en examinant également les espèces identifiées dans cette région. Nous discuterons des résultats de l'identification moléculaire. Enfin, nous examinerons les résultats de la RT-PCR effectuée pour détecter les virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHF) et de l'encéphalite à tiques (TBE) dans les échantillons de tiques.

Les tiques sont des arthropodes hématophages d'importance médicale et animales très importante puisqu'elles peuvent transmettre des zoonoses et causer des pertes économiques chez les animaux parasités en particulier les vaches et dromadaires au niveau des mamelles (Mechouk et al., 2022 ; Bellabidi Meriem, 2021 ; Djouaher et al., 2023).

Notre étude visait à évaluer la détection et la circulation des virus transmis par les tiques en particulier le virus la fièvre hémorragique de Crimée-Congo(CCHF) et le virus de l'encéphalite à tique (TBEV). En Algérie, la présence du virus CCHF a été reporté chez les tiques *Hyalomma aegyptium* en 2016 collectées sur une tortue dans la région d'Afflou (Laghouat) une souche peu pathogène du virus de la fièvre de Crimée-Congo, similaire à la souche AP92 initialement isolée en Grèce, ce lignage, appelé Europe 2, a été identifié (Kautman et al., 2016) , puis récemment, des anticorps contre le virus CCHF ont été détectés chez le dromadaire dans le sud de l'Algérie indiquant la présence et la circulation de ce virus en Algérie (Guidoum et al., 2023). La présence de la tique *Ixodes ricinus* en Algérie en particulier dans la région de Tizi-Ouzou et la récente montée des cas de TBEV en Europe (Cirad, 2024) souligne l'importance de cette surveillance.

IV.1. - Discussion des résultats de l'effectif des tiques dans la région de Tizi-Ouzou

Les résultats montrent une différence dans l'effectif des tiques collectées entre les stations de Mekla et Bouzeguène. À Mekla, 173 tiques ont été récoltées, tandis qu'à Bouzeguène, seulement 143 tiques ont été trouvées. Cela peut s'expliquer par la différence d'altitude entre les différentes stations, la durée de l'étude et par la période de l'année choisie, la présence de la végétation et les conditions climatiques. Un autre paramètre qui pourrait justifier cette différence, le fait que les animaux soient tout le temps à l'extérieur ou bien confinés dans leurs étables. Nos résultats sont cohérents avec ceux d'Almandounas et Bedrane (2023), qui ont collecté 194 tiques dans la région de Mekla. Cette similitude d'effectifs souligne l'importance de l'environnement local et des pratiques d'élevage sur l'effectif.

Cependant, une autre étude menée par Simona et al. (2004) dans la région de Tizi-Ouzou a révélé un effectif considérablement plus élevé, avec 3571 tiques collectées. Cette différence marquée par rapport à nos résultats peut être attribuée à des facteurs environnementaux ayant évolué au fil des ans, notamment le réchauffement climatique, qui pourrait avoir un impact sur la répartition et l'abondance des tiques dans la région.

IV.2. - Discussion résultats globale de la récolte des tiques

Au cours de notre échantillonnage, réalisé sur une période de quatre mois (de février à mai), nous avons collecté un total de 316 tiques. La densité des tiques a révélé qu'entre le mois de février et mars les adultes sont présents en grande quantité traduisant ainsi la sortie de l'hibernation des tiques en phase adulte puisqu'elles sont les premières à apparaître suivi par la phase larvaire correspondant à l'éclosion des œufs pondus par les femelles adultes issues de l'hibernation. Nous avons noté une prédominance des tiques en mars et avril correspondant à la période du printemps, De manière similaire une recherche effectuée dans l'ouest algérien effectué par Yousfi-Monod et Aeschlimann (1996) ont montré que les espèces connaissent une phase de reproduction du printemps à l'automne et une phase d'inactivité hivernale. Aussi l'étude de Bouchama et al. en 2020 sur les tiques parasites des bovins à Sétif, en Algérie, a révélé que les espèces du genre *Rhipicephalus*, sont actives presque toute l'année, avec des pics d'activité respectivement de mai à septembre et de mars à octobre. Les tiques du genre *Hyalomma*, comme *Hy. excavatum* et *Hy. marginatum*, se rencontrent de mars à novembre, avec des pics en mai-juin et septembre-octobre. Les stades immatures apparaissent de fin août à novembre, illustrant ainsi la variabilité saisonnière des infestations dans cette région semi-aride (Bouchama et al., 2020).

IV.3. - Discussion des résultats de l'identification

En Algérie, 36 espèces de tiques répartis en deux grande familles les Argasidae et Ixodidae sont reportées à nos jour (Mechouk et al., 2022). Notre étude a révélé que tous les individus collectés appartiennent à l'ordre des Ixodida et à la famille des Ixodidae, comprenant trois genres principaux : *Rhipicephalus*, *Hyalomma* et *Ixodes* ce qui est en accord avec les observations menée par Benchikh-Elfegoun et al., (2007) sur l'infestation des bovins dans la région de Taher (Jijel, Algérie) qui a examiné 1058 tiques adultes, identifiant trois genres : *Boophilus*, *Rhipicephalus* et *Hyalomma*. Une autre recherche réalisée par Bouhous et al., en 2008 dans le sud de l'Algérie, dans des abattoirs, a suivi l'infestation des dromadaires et

a révélé la présence de neuf espèces de tiques, principalement du genre *Hyalomma* (99,97 %). Dans la région de Mila et d'El Tarf, Benchikh-Elfegoun et son équipe 2007 ont effectué une étude de suivi sur l'infestation des tiques sur 48 bovins dans six élevages pendant un mois. Ils ont identifié quatre genres et dix espèces d'Ixodides, avec *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* étant la plus fréquente (62,7 % des tiques collectées), suivie par *Rhipicephalus turanicus* (13,6 %) et *Hyalomma scupense* (13,6 %).

IV.4. - Discussion des résultats de l'identification moléculaire

L'identification moléculaire réalisée sur un sous-échantillon de 7 tubes parmi les 53 collectés a permis d'identifier quatre espèces de tiques : *Ixodes ricinus*, *Hyalomma marginatum turanicum*, *Rhipicephalus sanguineus*, et *Hyalomma marginatum*. Ces résultats concordent avec une étude menée par Derradj et Kohil (2020) qui visait à identifier et à évaluer l'incidence des espèces de tiques dures durant la saison estivale de 2019 dans la Wilaya de Jijel, au nord-est de l'Algérie. Cette recherche, basée sur les caractéristiques morphologiques, a permis d'identifier sept espèces de tiques : *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Hyalomma marginatum*, *Hyalomma lusitanicum*, *Hyalomma scupense*, et *Hyalomma anatolicum*. Pour notre connaissance, l'espèce *Hyalomma marginatum turanicum* est signalée pour la première fois en Algérie car sa distinction morphologique de *Hy. marginatum* est très difficile voire impossible d'où l'intérêt de la biologie moléculaire dans ce type d'étude. Cette espèce est signalée dans le Moyen Orient, l'Afrique du sud et le sous-continent Indien (GBIF Secretariat, 2023), ce qui élève le nombre de tique en Algérie à 37 espèces.

IV.5. - Discussion des résultats de RT-PCR

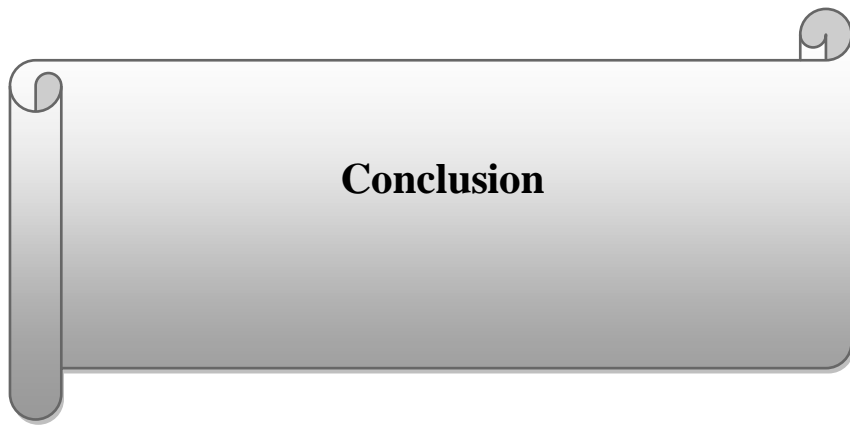
Bien qu'aucun arbovirus n'ait été détecté dans notre étude, plusieurs facteurs pourraient expliquer ces résultats négatifs. Tout d'abord, la période de collecte des échantillons pourrait avoir coïncidé avec une faible activité virale. Ensuite, les méthodes de détection utilisées, bien que standardisées, pourraient ne pas avoir été suffisamment sensibles pour identifier des niveaux faibles de virus. Enfin, il est possible que les tiques collectées n'aient pas été exposées à des hôtes infectés ou que la circulation de ces arbovirus dans cette région soit effectivement faible.

IV.5.1. - Discussion des résultats de RT-PCR TBE

Sur les 316 tiques examine aucun n'est positif, cette situation est comparable aux travaux de Fares et al., (2021) qui ont étudié l'éco-épidémiologie du virus de l'encéphalite à tiques (TBEV) en Tunisie, car aucune donnée concernant le TBEV en Afrique du Nord n'est disponible. Dans leur recherche ils ont examiné 877 tiques adultes *Ixodes ricinus* pour détecter la présence du TBEV par nRT-PCR. Ils ont réussi à détecter l'ARN viral dans un pool de trois tiques engorgées, ce qui a donné un taux d'infection minimum de 0,11 % (1/877). Cela démontre que, bien que le TBEV soit rare dans la région, Par conséquent, tout comme Fares et al., (2021) soulignent la nécessité de poursuivre les recherches sur le TBEV pour évaluer son importance pour la santé publique en Afrique du Nord, notre étude met également en évidence l'importance d'approfondir la surveillance des arbovirus dans notre région.

IV.5.2. - Discussion des résultats de RT-PCR CCHF

Les résultats concernant la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHF) sont tout négatif on compare avec une recherche menée par Rastgoo et al., (2023) qui ont examiné le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo isolé chez des tiques de ruminants à Jahrom, dans la province de Fars, au sud de l'Iran. Dans cette étude ils ont conclu que, sur 200 tiques collectées et testées, 12 tiques (6 %) étaient positives pour le virus ce qui reste une minorité. Ces résultats n'exclut pas la présence du CCHF en Algérie contrairement au TBE car En 2016, Kautman et al., a détecté le virus CCHF chez des tiques *Hyalomma aegyptium* collectées sur une tortue dans la région d'Aflou (Laghouat), récemment en 2023, Guidoum et al., ont trouvés chez les dromadaires dans le sud de l'Algérie des anticorps contre le virus CCHF, indiquant ainsi la présence et la circulation du virus dans le pays.



Conclusion

Les tiques, en tant qu'ectoparasites, sont des organismes largement répandus qui parasitent presque tous les vertébrés. Lors de notre inventaire, nous avons observé leur présence sur divers hôtes, notamment des bovins, des ovins et des chats, bien qu'elles puissent également piquer l'homme de manière occasionnelle. Ces arthropodes sont reconnus comme des vecteurs de maladies, ce qui soulève des préoccupations importantes pour la santé publique.

Les résultats de la présente étude menée sur une période de quatre mois (février à mai) dans la région de Tizi-Ouzou ; a permis de collecter un total de 316 tiques dans deux stations (173 à Mekla et 143 à Bouzegane). Deux méthodes ont été utilisées : la collecte directe sur les animaux, qui a permis de collecter 312 tiques, et la technique du drapeau sur la végétation, qui a permis de collecter 4 individus.

Nos résultats ont révélé que tous les individus collectés appartenaient essentiellement à la famille ixodidae répartie entre trois genres : *Ixodes*, *Hyalomma* et *Rhipicephalus*. La détection moléculaire a permis d'identifier quatre espèces, à savoir : *Ixodes ricinus*, *Hyalomma marginatum turanicum*, *Rhipicephalus sanguineus* et *Hyalomma marginatum*.

Ce qui nous a permis de mettre en évidence pour la première fois la présence de *Hyalomma marginatum turanicum*, souvent confondue avec *Hyalomma marginatum marginatum*. Cette découverte importante a ainsi augmenté le nombre d'espèces de tiques en Algérie à 37 espèces. Cette découverte est significative pour la taxonomie des tiques dans la région.

En ce qui concerne la détection des agents pathogènes, les résultats de la RT-PCR n'ont révélé aucune présence des virus ciblés, ce qui constitue un indicateur rassurant pour la santé publique locale. Toutefois, il est important de noter que cette absence ne confirme pas définitivement l'absence de ces virus, car la période d'échantillonnage était relativement courte et le nombre de stations limité. De plus, des facteurs tels que la conservation et le transport des tiques peuvent influencer les résultats, étant donné la sensibilité des virus aux conditions environnementales. Ainsi, bien que les résultats soient encourageants, ils soulignent la nécessité d'une surveillance continue et d'études supplémentaires pour mieux

évaluer le risque potentiel que représentent ces tiques et les maladies qu'elles pourraient transmettre.

Notre étude ouvre la voie à de futures investigations qui pourraient enrichir notre compréhension de la dynamique des arbovirus en Algérie. En effectuant des recherches futures pour explorer d'autres zones géographiques de la région de Tizi-Ouzou et inclure des analyses sur d'autres vecteurs potentiels. La vigilance et la recherche continue restent essentielles pour prévenir l'émergence de maladies virales dans cette région. La découverte de la nouvelle espèce de tique *Hyaloma marginatum turanicum* grâce à la détections moléculaires motive les chercheur à utilisé les nouvelles techniques d'identification des espèces de tique ou lieux d'utilisé l'identification morphologique, par exemple cette nouvelle espèce et similaire à *Hy. marginatum* ce qui rend son identification très difficile voire impossible d'où l'intérêt de la biologie moléculaire.



Références

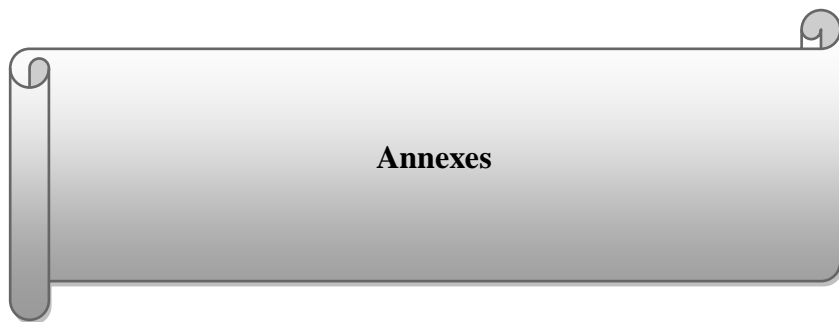
- Ait Hamou, Z., Chekroun, A., Abdelli, A., et Boudouma, M. (2012). Impact des tiques et des maladies transmises par les tiques sur l'élevage dans le nord-est algérien. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 163 : (4), 200-205.
- Bendary, H. A., Rasslan, F., Wainwright, M., Alfarraj, S., Zaki, A., et Abdulall, A. K. (2022). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks collected from imported camels in Egypt. *Saudi Journal Of Biological Sciences*, 29 : (4), 2597-2603.
- Benchikh-Elfegoun, M. C., Benakhla, A., Bentounsi, B., Bouattour, A., et Piarroux, R. (2007). "Identification et cinétique saisonnière des tiques parasites des bovins dans la région de Taher (Jijel) Algérie." *Ann. Méd. Vét.*, 151(3-4), 209-214.
- Benchikh-Elfegoun, M.C., Gharbi, M., Djebir, S., et Kohil, K. (2007). "Dynamique d'activité saisonnière des tiques ixodidés parasites des bovins dans deux étages bioclimatiques du nord-est algérien." *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire*, 60(2), 117-122.
- Bouhous A.1, Aissi M.2, Haroura K.H. 2 1. (2008) : Etude des Ixodidae chez le dromadaire dans le sud algérien, région d'Adrar Manuscrit déposé le 26/03/2008 *Ann. Méd. Vét.* 152, 52-58.
- Bellabidi, M. (2021). Inventaire de quelques arthropodes d'intérêt médical et vétérinaire et étude de deux maladies (trypanosomose et fièvre Q) chez le dromadaire dans le Sud-est du Sahara algérien [Thèse de doctorat, Université Kasdi Merbah – Ouargla].
- Bell, J. (1989). "The polymerase chain reaction: a new method for the amplification of DNA." *Nature*, 339(6220), 305.
- Bell, J. (2008). "PCR: Principles and Applications." *Molecular Biology and Biotechnology*, 2nd ed.
- Bonnet, S., Huber, K., Joncour, G., René-Martellet, M., Stachurski, F., et Zenner, L. (2015). "Biologie des tiques." Dans *Tiques et maladies à tiques* (pp. 53-84).
- Boulanger, N., et McCoy, K. D. (2017). "Chapitre 25. Les tiques (Acari : Ixodida)." Dans *Entomologie médicale et vétérinaire* (pp. 553-596). Édité par G. Duvallet, D. Fontenille, et V. Robert. Marseille : IRD Éditions ; Quae.
- Bourdeau, P. (1993). "Les tiques d'importance vétérinaire et médicale, deuxième partie : principales espèces de tiques dures (Ixodidae et Amblyommidae)." *Le Point Vétérinaire*, 25(151), 27-41.

- Bouattour, A. (2002). Clé dichotomique et identification de tiques (Acari: Ixodidae) parasites du bétail au Maghreb. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 43, 43-50.
- Blary A., (2004) : Les maladies bovines autres que la piroplasmose transmises par les tiques dures : inventaire des vecteurs en cause dans 15 exploitations laitières de l'Ouest de la France, Thèse de doctorat vétérinaire, Nantes ; 110p.
- Cavé, H., Acquaviva, C., Bièche, I., Brault, D., De Fraipont, F., Fina, F., Loric, S., Maisonneuve, L., Namour, F., et Tuffery, S. (2003). La RT-PCR en diagnostic clinique. *Annales de Biologie Clinique*, 61(6), 635-644.
- Carrera-Fajardo, L., Espuñes, J., Cardells, J., Fernández-Aguilar, X., Pailler-García, L., Napp, S., et Cabezón, Ó. (2023). "Dynamics of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in two wild ungulate hosts during a disease-induced population collapse.
- Chippaux, A. (2003). Généralités sur arbovirus et arboviroses. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 33(8), 377-384.
- Deubel, V., et Georges-Courbot, M. (2002). "Les arbovirus et les virus épizootiques." *Comptes Rendus Biologies*, 325(8), 855-861.
- Derradj, L., et Kohil, K. (2020). "Identification and incidence of hard tick species during summer season 2019 in Jijel Province (northeastern Algeria)." *Journal of Parasitic Diseases*, 45(1), 211–217.
- Djouaher, T., Chahed, S., Beneldjouzi, A., Eddaikra, N., et Brahmi, K. (2023). "Diversity of hard ticks (Acari: Ixodidae) infesting small ruminants in some breeding farms in Tizi-Ouzou area (Northern Algeria)." *Bulletin de la Société Royale de Liège*, 92(1), 53-70.
- Duvallet, G., Fontenille, D., et Robert, V. (2017). *Entomologie médicale et vétérinaire*. Marseille, Versailles : IRD Éditions ; Quae.
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., et Walker, A.R. (2004). *Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region. A Guide to Identification of Species*. Zaragoza : Université de Zaragoza. 131 p.
- Estrada-Pena. A (2015) – Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 34 (1) : 53-65.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). "DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse

- metazoan invertebrates." *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.
- Florence. (2015). "Chaleur et humidité - les tiques en Lorraine, leur mode de vie, les maladies." NancyBuzz.
 - Flusin, O., Iseni, F., Rodrigues, R., Paranhos-Baccala, G., Crance, J., Marianneau, P., Bouloy, M., et Peyrefitte, C. (2010). "La fièvre hémorragique de Crimée-Congo : l'essentiel pour le praticien." *Médecine et Maladies Infectieuses*, 40(6), 431-438.
 - Hall, T.A. (1999). "BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
 - Ishmael, N., & Hossain, M. (2008). "Molecular detection of pathogens in the environment: a review." *Environmental Science and Technology*, 42(17), 6462-6468.
 - Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). "Applications of the Polymerase Chain Reaction (PCR) in Medical Diagnostics." *BioTechniques*, 54(3), 141-146.
 - Goodman, S.-M., Rakotomanga, M.-N., Soarimalala, V., Boyer, S., et Apanaskevich, D. (2017). "Les tiques dures (Acari : Ixodidae) ectoparasites de micromammifères non-volants dans la forêt d'Ambohitantely, Madagascar." *Malagasy Nature*, 12, 59-67.
 - Gritsun, T., et Gould, E. A. (2008). "Tick-borne encephalitis viruses." Dans *The Tick-Borne Encephalitis Virus: A Comprehensive Overview* (pp. 45-54). Elsevier
 - Guetard Maud, 2001. Quelques données de morphologie et de biologie. In *Ixodes ricinus : morphologie, biologie, élevage et données bibliographiques*. Thèse de docteur vétérinaire ; Ecole National de Toulouse France ; 52-53p.
 - Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J., Bouizegarène, P., et Bogard, M. (2008). Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée*, 23(5), 260-279.
 - McCoy, K. D., et Boulanger, N. (2016). Tiques et maladies à tiques : biologie, écologie évolutive et épidémiologie. Marseille : IRD Éditions. 336 p.
 - McCoy, K. D., et Boulanger, N. (dir.). (2015). Tiques et maladies à tiques : biologie, écologie évolutive, épidémiologie. Marseille : IRD Éditions. 344 p
 - Morel, P.-C., Troncy, P.-M., Chartier, C., Itard, J., et Pagès, F. (2000). *Précis de parasitologie vétérinaire tropicale*. Éditions Médicales Internationales. 796 p.

- Moulinier, C. (2003). Parasitologie et mycologie médicales. Éditions E.M.I. Lavoisier. 796 p.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods in Enzymology*, 155, 335-350.
- Neveu-Lemaire M., *Traité d'entomologie médicale et vétérinaire*, Vigot frères 1938, 349-400.
- Parola, P., et Raoult, D. (2001). Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases*, 32(6), 897-928.
- Perez-Eid. C. (2007) – *Les tiques : Identification, biologie, importance médicale et vétérinaire*. Ed. E. M. Inter. Paris. 316p.
- Reynard, O., Ritter, M., Martin, B., et Volchkov, V. E. (2021). La fièvre hémorragique de Crimée-Congo, une future problématique de santé en France ? *M S-medicine Sciences*, 37(2), 135 140.
- Ripert, C. (2007). *Épidémiologie des maladies parasitaires - Tome 4 : Affections provoquées ou transmises par les arthropodes*. Lavoisier. 581 p.
- Rodhain, F., et Pérez, C. (1985). *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire*. Éditions Maloine, Paris. 458 p.
- Sankhe, S., Talla, C., Thiam, M. S., Faye, M., Barry, M. A., Diarra, M., Dia, M., Ndiaye, O., Sembène, P. M., Diop, B., Fall, G., Faye, O., Diagne, M. M., et Loucoubar, C. (2023). "Seroprevalence of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus and Rift Valley Fever Virus in the human population in Senegal from October to November 2020." *IJID Regions*, 7, 216-221.
- Serrettiello, E., Astorri, R., Chianese, A., Stelitano, D., Zannella, C., Folliero, V., Santella, B., Galdiero, M., Franci, G., et Galdiero, M. (2020). The emerging tick-borne Crimean-Congo haemorrhagic fever virus : A narrative review. *Travel Medicine And Infectious Disease*, 37, 101871.
- Socolovschi, C., Doudier, B., Pages, F., Parola. (2008). Tique et maladie transmises à l'homme en Afrique. *Médecine tropicale*, 68(2), 119-133.
- Sonenshine, D. E. (1991). *Biology of Ticks, Volume 1*. Oxford: Oxford University Press. 331-339.
- Sonenshine, D. E., et Roe, R. M. (2014). *Biology of Ticks*. Oxford: Oxford University Press.

- Sudhindra, P. (2018). "Tick-Borne Infections of the Central Nervous System." In Tick-Borne Diseases and the Central Nervous System: Clinical and Immunological Aspects (pp. 173-195).
- Tamura, K., Stecher, G., et Kumar, S. (2021). "MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11." *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027.
- Tutoweb. (2021). "Les techniques de séquençage de l'ADN." Tutoweb. Consulté le 11 septembre 2024.
- Vassallo, M., Pérez-Eid, C. (2002). Comparative behavior and questing strategies of *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks (Acari: Ixodidae). *Experimental et Applied Acarology*, 27(1), 29-37.
- Velay, A., Argemi, X., Wendling, M.-J., Martinot, M., Hansmann, Y., et Fafi-Kremer, S. (2019). "L'encéphalite à tique en France : qu'en savons-nous aujourd'hui ?" *Revue Francophone des Laboratoires*, 2019(513), 34-43.
- Vredevoe, L. (2016). "Background Information on the Biology of Ticks." University of California Davis Department of Entomology and Nematology.
- Yılmaz, S., Yılmaz, S., Alay, H., Koşan, Z., et Eren, Z. (2023). "Temporal tendency, seasonality and relationship with climatic factors of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever cases (East of Turkey: 2012–2021)." *Heliyon*, 9(9), e19593.
- Yuill, T. M. (2023). "Présentation des infections à arbovirus, à arénavirus et à filovirus." *Manuels MSD Pour le Grand Public*.



Annexe 1 : les divers types de laboratoires (figure 1, 2,3)

Laboratoire P1

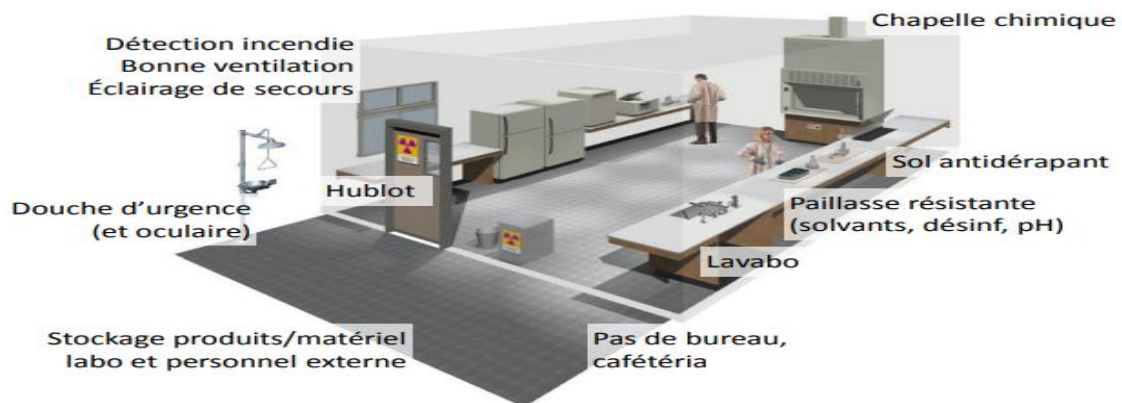


Figure 1 : organisation et caractéristiques du laboratoire P1.

Laboratoire P2

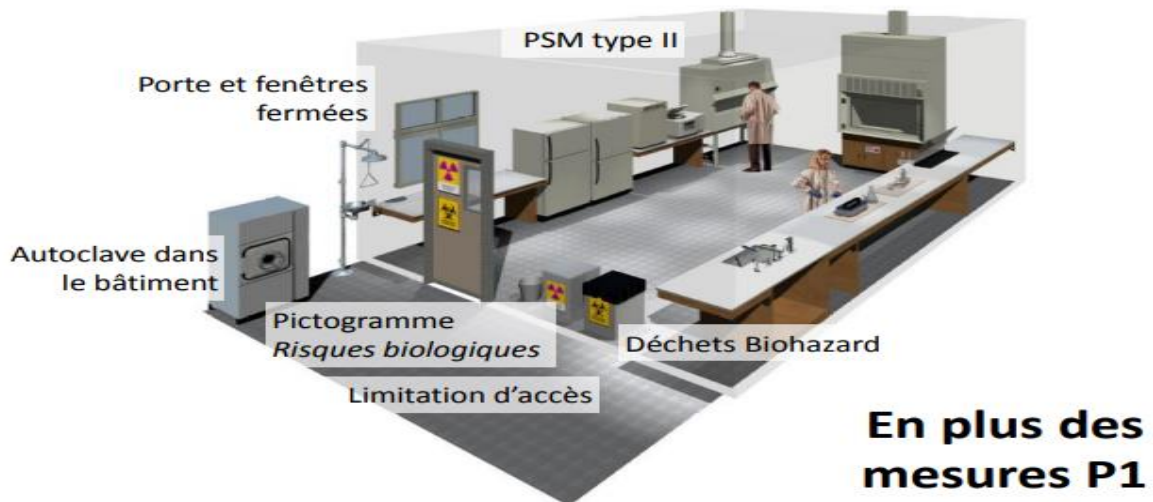
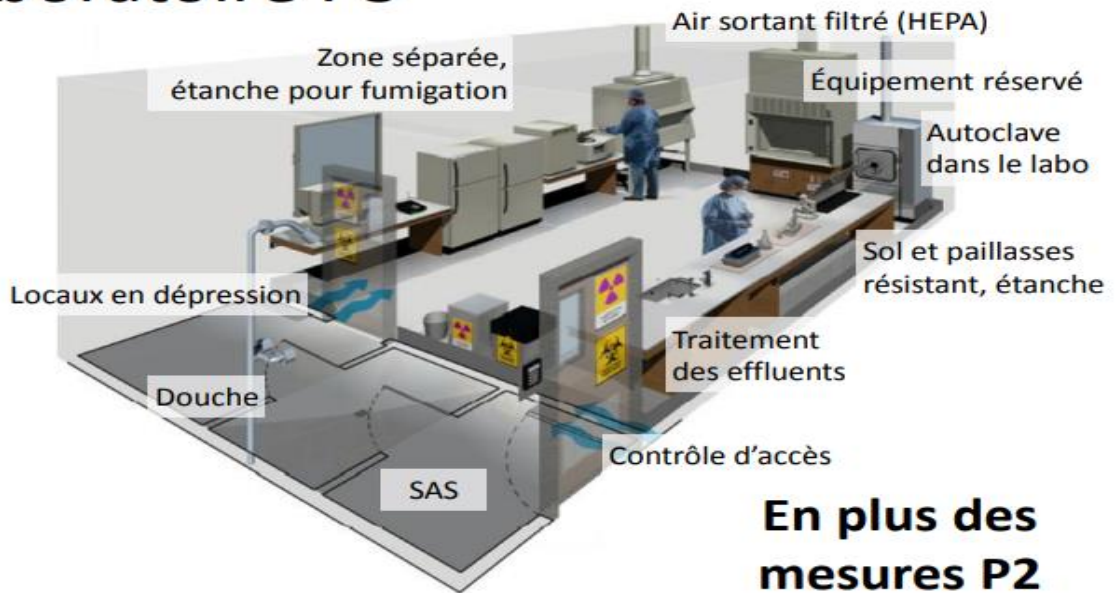


Figure 2: organisation et caractéristiques du laboratoire P2.

Laboratoire P3



Laboratoire P3

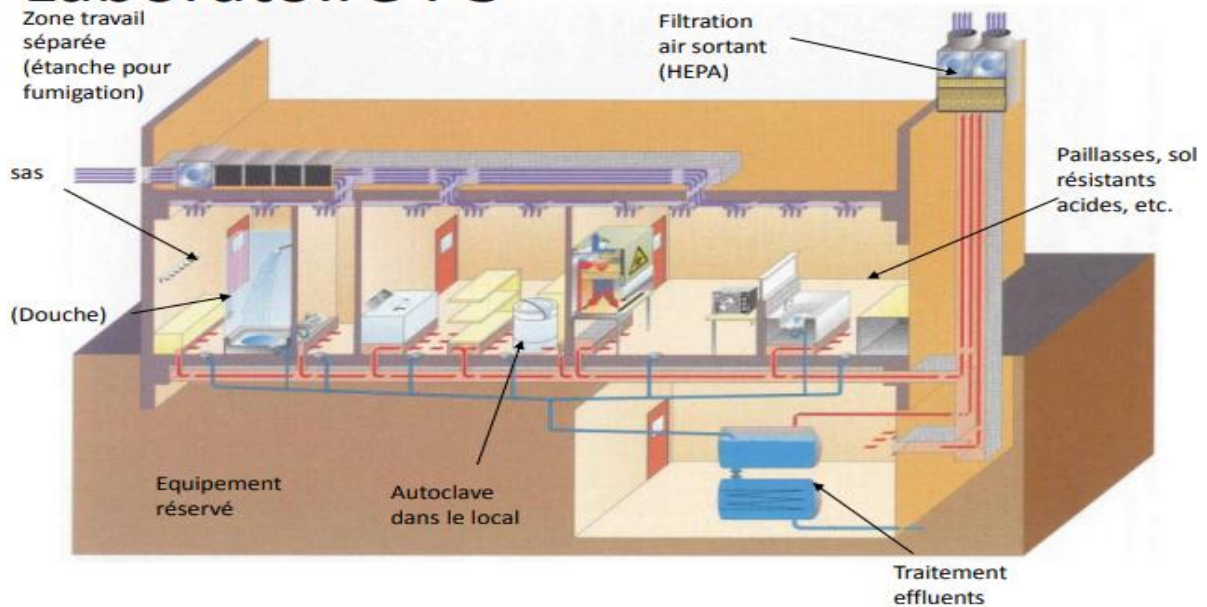


Figure 3 : organisation et caractéristiques du laboratoire P3.

Annexe 2 : Caractéristiques des tiques dans chaque tube et leur région de collecte (tableau 2).

Tableau 2 : Caractéristiques des tiques dans chaque tube et leur région de collecte.

| Echantillon | Observation | Région |
|--------------------|--|-------------------|
| RD 1 | 4 Femelles non gorgées | Mekla |
| RD 2 | 4 Femelles non gorgées | |
| RD 3 | 3 Femelles non gorgées | Bouzeguene |
| RD 4 | 4 Femelles non gorges (<i>Hyalomma</i>) | |
| RD 5 | 2Nymphes | |
| RD 6 | 4 Larves | |
| RD 7 | 5 Larves | |
| RD 9 | 5 Adutes semi gorgés | |
| RD 10 | 5 Adultes semi gorgés | |
| RD 11 | 6 Adultes semi gorgés | |
| RD 12 | 11 Nymphes | |
| RD 13 | 12 Nymphes | |
| RD 14 | 7 Ixodes males | |
| RD 15 | 3Ixodes femelles non gorges | |
| RD 16 | 5 Femelles semi gorgées | |
| RD 17 | 3 Males | |
| RD 18 | 6 Nymphes <i>Boophilus</i> gorgées | |
| RD 19 | 3 <i>Ixodes</i> nymphes semi gorges | |
| RD 20 | 2 <i>Ixodes</i> Femelles non gorges | |
| RD 21 | 5 <i>Hyalomma</i> non gorges | |
| RD 22 | 5 <i>Hyalomma</i> non gorges | |
| RD 23 | 5 <i>Hyalomma</i> non gorges | |
| RD 24 | 6 <i>Hyalomma</i> non gorges | |
| RD 25 | 6 <i>Hyalomma</i> non gorges | |
| RD 26 | 7 <i>Hyalomma</i> non gorges | Mekla |
| RD 27 | 3 semi gorges | |
| RD 28 | 3 semi gorges | |
| RD 29 | 10 larves | |
| RD 30 | 11 larves | |
| RD 31 | 4 Femelles non gorges | Mekla drapeau |
| RD 32 | 3 larves | |
| RD 33 | 1 Femelle gorgée | Mekla (sur ovin) |
| RD 34 | 1 Femelle semi gorge | |
| RD 35 | 9 larves | |
| RD 36 | 9 larves | Mekla (sur bovin) |
| RD 37 | 2 larves | |
| RD 38 | 1 Femelle | Mekla |
| RD 39 | 1 Femelle | |
| RD 40 | 2Nymphes gorges | |
| RD 41 | 4 Nymphes non gorges | |
| RD 42 | 10 larves | |
| RD 43 | 13 larves | |

| | | |
|-------|-------------------------|--|
| RD 44 | 12 larves | |
| RD 45 | 12 larves | |
| RD 46 | Drapeau(1) | |
| RD 47 | Chat(5) | |
| RD 48 | 1 Nymphé gorgée bovin | |
| RD 49 | 4 Femelles non gorgéess | |
| RD50 | 10 larves non gorges | |
| RD51 | 3 nymphes gorges | |
| RD52 | 13 larves | |
| RD53 | 13 larves | |

Annexe 3 : compositions des milieux utilisés

1- Ampicilline “ampiline®” 1g/5ml : (SAIDAL,N°Lot :088 /1, fab :02/15, exp :11/17)

Préparation d'une solution de travail à 100 ug/ml avec milieu L-15+10ù SNN/Faire une dilution au 1/2000^{éme} : 25 ul Ampicilline 200mg/ml +L-15 Qsp 50ml

2-Gentamycine “ Gentaxyn” 40mg/2ml : (Frater-Razes,N°Lot : 005, fab :01/14, exp :01/16)

Préparatiopn d'une solution de travail a50 ug/ml avec milieu L-15+10ùSNN : Faire une dilution au 1/400^{éme} : 125 ul G éntamycine 20 mg/ml ++L-15 Qsp 50ml

3-AmphotércineB250 ug/ml : (GIBCO ?N°Lot :158660,fab :01/14,exp :10/15)

Préparation d'une solution de travailà2.5ug/ml avec milieuL-15+10ùSNN : faire une dilution au 1/100^{éme} :250ul Amphotércine B250ug/ml+L-15Qsp50ml

Annexe 4 : Les compositions de tampon TBE et leurs rôle.

1-Tris (hydroxyméthyl) aminométhane : utilisé comme tampon pour maintenir le pH de la solution, généralement à 8,0 à 8,3.

2-Acide borique : contribue également à la capacité tampon et aide à la migration des acides nucléiques.

3-EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) : un agent chélateur qui se lie aux ions métalliques, empêchant leur interaction avec les acides nucléiques, ce qui est crucial pour éviter la dégradation de l'ADN et de l'ARN.

Annexe 5 : les matériaux biologiques utilisés.

Tableau 2 : les matériaux biologiques utilisés.

| |
|--------------------------------|
| Materiel non biologique |
| Micropipettes |
| Ambouts a filtre |
| Eppendof |
| Vortex |
| Spiner |
| Centrifugeuse |
| psm |
| Thermocycleur |
| Colecteur |
| Colone |
| Autoclave |
| Réfrigérateur |
| Congélateur |
| loupe binoculaire |
| Blouse blanche |
| Tubes à essai |
| Etiquettes |
| Marqueur |
| pince souple |
| Mivroonde |
| Plateau de gal |
| Cuve d'electrophorèse |
| Séquanceur |
| Paraffine |
| Gants |
| Matériel informatique |
| Transilluminateur UV |
| Hotte à UV |
| Micro-centrifugeuse |
| bloc réfrigérant |
| Kits d'extraction d'ADN/ARN |
| Réactifs de PCR |
| Plaques et tubes PCR |
| Portoirs |
| Boite |
| Flacon |

Résumé

Le travail sur la détection et caractérisation des arbovirus à partir des tiques a été effectué dans les deux stations Mekla et Bouzegeune de la région de Tizi-Ouzou. Deux techniques ont été utilisées : la collecte directe sur les animaux, qui a permis de collecter 312 tiques, et la méthode du drapeau, qui a permis de collecter 4 tiques. On a recensé 3 genres : *Ixodes*, *Hyalomma* et *Rhipicephalus*, l'identification moléculaire nous a permis d'identifier 4 espèces : *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Hyalomma marginatum* et *Hyalomma marginatum turanicum*, cette dernière est détecté pour la 1^{er} fois en Algérie. Cependant, les résultats des RT-PCR n'ont révélé aucune détection des virus de l'encéphalite à tiques (TBE) et de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHF).

Mots clés : Tiques, Identification moléculaire, *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Hyalomma marginatum*, *Hyalomma marginatum turanicum*, RT-PCR, arbovirus (TBE, CCHF), Tizi-Ouzou (Mekla, Bouzegeune).

Abstract:

The work on the detection and characterization of arbovirus from ticks has been in the two stations Mekla and Bouzegeune in the Tizi-Ouzou region. Two techniques were used: direct collection from animals, which allowed the collection of 312 ticks, and the flag method, which allowed the collection of 4 ticks. Three genera were identified: *Ixodes*, *Hyalomma* and *Rhipicephalus*, molecular identification allowed us to identify four species: *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Hyalomma marginatum* and *Hyalomma marginatum turanicum*, the latter being detected for the first time in Algeria. However, the results of RT-PCR did not reveal any detection of tick-borne encephalitis (TBE) and Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) viruses.

Keywords: Ticks, Molecular identification, *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Hyalomma marginatum*, *Hyalomma marginatum turanicum*, RT-PCR, arbovirus (TBE, CCHF), Tizi-Ouzou (Mekla, Bouzegeune).

ملخص:

تم تنفيذ العمل على كشف وتوصيف الفيروسات المفصلية من القراد في محطتي مقلع وبوزجون بمنطقة تيزي وزو. تم استخدام تقنيتين: الجمع المباشر من الحيوانات، مما جعل من الممكن جمع 312 قراد، وطريقة العلم، التي مكنت من جمع 4 قراد. حددنا 3 أجناس: *Ixodes* و *Hyalomma* و *Rhipicephalus*، وقد سمح لنا التحديد الجزيئي بتحديد 4 أنواع: *Ixodes ricinus* و *Rhipicephalus sanguineus* و *Hyalomma Marginatum* و *Hyalomma Marginatum turanicum*، وقد تم اكتشاف هذا الأخير لأول مرة في الجزائر. ومع ذلك، كشفت نتائج RT-PCR عن عدم اكتشاف فيروسات التهاب الدماغ المنقول بالقراد (TBE) وحمى القرم والكونغو النزفية (CCHF).

كلمات مفتاحية: القراد، التحديد الجزيئي، *Ixodes ricinus*، *Rhipicephalus sanguineus*، *Hyalomma Marginatum*، *Hyalomma Marginatum turanicum*، RT-PCR، arbovirus (TBE, CCHF)، تيزي وزو (مقلع، بوزجون).