

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
[Institut Pasteur d'Alger]



Faculté des sciences Biologiques et des sciences Agronomiques

Département de Biologie Animale Et Végétale



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : **Biologie**

Option : **Parasitologie**

Thème

Étude du microbiote intestinal des phlébotomes de la région de Tizi Ouzou

Présenté par

M^{lle} Dihya FALI

M^{lle} Youssra BOUIZERI

Soutenu le : 31/10/2018

Devant le *jury* composé de

Président : M^{me} BOUKHEMZA –ZEMMOURI N. Professeur à U.M.M.T.O

Encadreur : M^{me} EDDAIKRA N. Maître de recherche à l'IPA

Co-encadreur: M^f BENALLAL K. Chercheur à l'IPA

Examineur : M^f BOUKHEMZA M. Professeur à U.M.M.T.O

REMERCIEMENTS

Louange à Allah, le seigneur des mondes.

Paix et salut sur son prophète Mohammed

Nous remercions nos chers parents pour leurs soutiens, leurs sacrifices durant nos études et durant ce travail.

Nos remerciements les plus vifs à notre Encadreur Mme Eddaikra Naouel pour, ses précieux conseils, son amabilité et la confiance qu'elle nous a accordée en nous proposant un thème aussi intéressant.

Toute notre gratitude et nos remerciements les plus sincères à notre Co-promoteur Mr Bennallal Kamel Eddine. C'est avec un grand plaisir que nous avons pu profiter de vos conseils et de vos innombrables connaissances. Merci pour votre suivi, votre disponibilité, votre attention...et la liste est longue.

Nous remercions vivement le personnel du laboratoire de bactériologie alimentaire à leur tête Mr Bensefia Sid Ahmed pour sa contribution à l'obtention des résultats fiables, lors de l'analyse bactériologique malgré ses multiples occupations, ainsi que Mme Alamire Hanane, Oudina Hadjer et Karim.

Nous remercions également le chef de service du laboratoire de bactériologie médicale Mme Bouhraoua ainsi que Mme Guettou Badiaa pour leur précieuse collaboration.

Nous adressons des remerciements particuliers à Mr Rafik Garni et Mme Djennad Khérachi Ihcen du service d'éco-épidémiologie parasitaire de l'institut pasteur d'Alger Pour l'amabilité, l'aide et le soutien constant apportés au cours de cette étude.

Nos sincères remerciements vont à Mr Taoualit Amar pour son aide précieuse sur le terrain, sa générosité et son extrême gentillesse.

Nous remercions les membres du jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait d'examiner ce travail.

Nous remercions par l'occasion Tous les professeurs qui ont contribué à notre formation durant notre parcours universitaire.

Dédicaces

A nos parents,

Nos frères et sœurs,

A la famille CHAIB,

A Mr et Mme Ghezali,

A tous nos amis,

A toute la promo de parasitologie 2017/2018.

Dihya & Yousra

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Introduction	1
CHAPITRE I : Rappels bibliographique	
1. Les phlébotomes.....	3
1.1.Taxonomie	3
1.2.Morphologie	3
1.2.1. Tête.....	3
1.2.2. Thorax	3
1.2.3. Abdomen	3
1.2.4. Appareil Reproducteur	5
1.3.Anatomie Interne des phlébotomes	6
1.3.1. Tube Digestif.....	6
1.3.2. Les Glandes Salivaires	6
1.3.3. Le Pharynx	6
2. Données biologiques et étho-écologique.....	6
3. Distribution géographique.....	8
3.1.Dans le monde.....	8
3.2.En Algérie	9
4. Les Pathologies transmises par les phlébotomes	11
4.1.Transmission des parasites (les leishmanioses)	11
4.2.Transmission d'arbovirus	11
4.3.Transmission de bactéries(Bartonellose)	12
5. Le microbiote intestinal	12
5.1.Définition	11
5.2.Le microbiote intestinal des Phlébotomes.....	12
5.2.1. L'association entre les insectes vecteurs et leur microbiote intestinal .	14
5.2.2. Influence du microbiote de l'intestin moyen sur l'établissement du parasite chez les insectes vecteurs.....	15
5.2.3. <i>Wolbachia spp</i> : Grand manipulateur de la biologie des phlébotomes.	15

CHAPITRE II : Matériel et méthodes

1. Matériel Biologique.....	17
1.1. Collecte des données météorologiques durant la période de piégeage	17
2. Méthodes	17
2.1. Piégeage des Phlébotomes	17
2.1.1. Pièges huilés	18
2.1.2. Pièges lumineux CDC	19
2.2. Tri et identification des phlébotomes	20
2.3. Dissection des femelles et mise en culture des bactéries	21
2.3.1. Optimisation des différentes techniques.....	21
2.3.2. Traitement des phlébotomes.....	21
2.4. Isolement des différentes bactéries.....	22
2.5. Identification des bactéries.....	23
2.5.1. Coloration de Gram.....	23
2.5.2. Test d'oxydase.....	23
2.5.3. Test de catalase.....	23
2.5.4. Les galeries Biochimiques.	24
2.6. Identification moléculaire des bactéries <i>Wolbachia spp</i>	25
2.6.1. Extraction et amplification d'ADN.....	26
2.6.2. Révélation des produits PCR.....	27

CHAPITRE III : Résultats et discussion

1. Les données météorologiques durant la période de piégeage.	27
2. Résultats de l'enquête entomologique.....	27
2.1. Résultats des phlébotomes capturés par pièges adhésifs.....	28
2.2. Résultats des phlébotomes capturés par pièges lumineux CDC.	30
2.3. Les résultats des espèces phlébotomienne capturées	31
3. Résultats de l'étude bactériologique	32
3.1. Résultats de l'optimisation des techniques de culture de microbiote à partir du <i>Culex pipiens</i>	32
3.2. Résultats de l'incubation des tubes digestifs des phlébotomes sur les milieux d'isollements	33
4. Résultats de l'identification des bactéries composant le microbiote des phlébotomes.....	34
4.1. Aspect microscopiques suit à la coloration de Gram.	34
4.2. Résultats de l'identification des galeries biochimiques.	35

4.2.1. Lecture de l'api 50 CH (Bacillus)	35
4.2.2. Lecture de la galerie Api 20 E (Complément de Api 50 CH).....	36
4.2.3. Lecture de la galerie API STAPH	37
4.2.4. Lecture de la galerie API 20 NE	37
4.3. Synthèse des différents méthodes d'identification du microbiote des phlébotomes de Tizi Ouzou et de M'sila.....	38
5. Résultats de la détection moléculaire des bactéries <i>Wolbachia spp</i>	41
Discussion	42
Conclusion	45
Références bibliographique	
Annexes	

LISTE DES FIGURES

Titres	Page
Figure 01 : Morphologie générale d'un Phlébotome adulte (Original, 2018).	4
Figure 02: Vue générale de la tête d'un phlébotome (Original 2018).	4
Figure 03: Vue latérale de l'appareil génital mâle. (Original, 2018).	5
Figure 04: Vue latérale de l'appareil génital femelle <i>P.longicuspis</i> . (Original, 2018).	5
Figure 05: Tube digestif (Bates, 2007, modifié).	6
Figure 06: Cycle biologique des phlébotomes (Elevage de <i>P. duboscqi</i>) (Pesson., 2004, modifié).	8
Figure 07 : Répartition des principaux genres de phlébotomes dans le monde. (Léger et Depaquit, 2002).	9
Figure 08 : Analyse de réseau montrant les espèces de bactéries partagées retrouvées dans Phlebotomus, notamment (<i>P. argentipes</i> , <i>P. duboscqii</i> , <i>P. halepensis</i> , <i>P. papatasi</i> , <i>P. perlifiliiewi</i> , <i>P. perniciosus</i> , <i>P. sergenti</i> et <i>P. chinensis</i>) représentées dans les carrés entourés en vert et les bactéries retrouvées chez Lutzomyia, notamment <i>L. evansi</i> , <i>L. cruzi</i> et <i>L. longipalpis</i> représentées par les carrés entourés en bleu (Fraihi et al., 2017).	14
Figure 09: Développements clés de stratégies de contrôle de la dengue à base de Wolbachia (Lambrechts et al., 2015).	16
Figure 10 : Carte administrative des Wilaya, Tizi Ouzou et M'sila.	17
Figure 11: (A) Piège huilés déposé/ (B) pièges huilés récupérés (Originale, 2018).	18
Figure 12: Piège lumineux CDC(Akhoundi, 2012).	19
Figure 13 : Les étapes du tri et identification (Originale, 2018).	21
Figure 14 : Les étapes de la dissection (Originale, 2018).	22
Figure 15 : Teste d'oxydase (Originale, 2018).	23
Figure 16 : Teste de Catalase (Originale, 2018).	24
Figure 17 : Les galeries biochimique (a. Api 20 E/ b. Api 50 CH/ c. Api Staph). (Originale, 2018)	25
Figure 18 : Les étapes de détection moléculaire de <i>Wolbachia spp</i> (Originale, 2018).	27
Figure 19 : Données météorologiques de la wilaya de Tizi-Ouzou (2018).	28

Figure 20 : Histogramme des phlébotomes capturés par pièges huilés par nuit de piégeage dans la région de Tizi Ghennif.	30
Figure 21 : Histogramme des phlébotomes capturés par période et par région.	30
Figure 22: Répartition de l'abondance des phlébotomes (Piège adhésifs et CDC) par sexe.	31
Figure 23: Effectif et abondance des espèces phlébotomienne capturées par pièges huilés et CDC à Tizi Ouzou et M'sila.	31
Figure 24: Résultats des pourcentages de positivités en fonction des milieux d'isolements et des régions de Msila et de Tizi Gheniff.	33
Figure 25 : Aspect général des colonies sur milieux de cultures.(A : <i>Bacillus firmus</i> sur GN / B : <i>Bacillus mycoides</i> sur GN/ C : <i>Staphylococcus warneri</i> sur Chapman/ D : <i>Sphingomonas paucimobilis</i> sur GN). (Originale, 2018)	34
Figure 26: Résultats de la coloration de Gram. : A : <i>Bacillus firmus</i> G(+)/ B : <i>Bacillus mycoides</i> G(+)/ C : <i>Staphylococcus warneri</i> G(+)/ D : <i>Sphingomonas paucimobilis</i> G(-). (Originale, 2018)	35
Figure 27: Résultats de la lecture des galeries Api 50 CH (A : <i>Bacillus firmus</i> / B : <i>Bacillus mycoides</i>)	36
Figure 28: Résultats de la lecture des galeries Api 20 E (A : <i>Bacillus firmus</i> / B : <i>Bacillus mycoides</i>)	36
Figure 29 : Résultats de galerie Api STAPH. (<i>Staphylococcus warneri</i>).	37
Figure 30: Résultats de galerie Api 20NE (<i>Sphingomonas paucimobilis</i>).	37
Figure 31 : Résultats des différentes espèces de bactéries isolées en fonction des espèces de phlébotomes à Tizi Ouzou et Msila.	39
Figure 32: Profil électrophorétique des <i>wolbachia sp</i> , (A : échantillons BHIB de Tizi Ouzou / B : Pools de M'sila (originale, 2018).	41

LISTE DES TABLEAUX

Titres	Pages
Tableau I: Phlébotomes d'Algérie (Boudrissa, 2006).	10
Tableau II: Les régions et les périodes de captures.(AndroiTS GPS Test)	20
Tableau III: Protocole expérimental de la PCR et le profil thermique	26
Tableau IV: Phlébotomes capturés par région et par nuit de piégeage (Piège adhésifs et CDC).	29
Tableau V: Bactéries isolées à partir des <i>Culex pipiens</i> et leur Propriétés biochimiques.	32
Tableau VI: Résultats de l'incubation des milieux d'isolements.	33
Tableau VII: Résultats des bactéries appartenant à chaque espèce de phlébotome.	40

Liste des abréviations

ADH : L'Argénine dihydrolase

BHIB: Brain Heart Infusion Broth.

BET: Bromure d'ethidium

CDC: Centers for Disease Control and prevention

GN: Gélose Nutritive

LC : Leishmaniose cutanée.

LV : Leishmaniose viscérale.

LCZ : Leishmaniose cutanée zoonotique.

LCN : Leishmaniose cutanée du Nord.

LCM : Leishmanioses cutanéomuqueuse.

LDC: Lyse décarboxylase

ODC: L'Ornithine décarboxylase

O.M.S. : Organisation Mondiale de la Santé.

P: Phlebotomus

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

SFSV: (*Sandfly Fever Sicilian Virus*)

TOSV : (*Toscana Virus*)

UV : lumière ultraviolet

W.H.O : World Health Organisation.

Introduction

INTRODUCTION

Les phlébotomes sont des diptères Psychodidae, qui forment un groupe très homogène et occupent une place importante, dans la faune terrestre et dans la transmission de maladies par leur piqûre (Dedet, 2009). Parmi les 800 espèces répertoriées dans le monde, les seules vectrices prouvées des leishmanies, représentent 94, pour le genre *Phlebotomus* dans l'Ancien Monde et 379, pour le genre *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde (Munstermann, 2004 in Benarab et Dif, 2015).

Les phlébotomes sont des vecteurs bien connus de leishmanioses. Ces dernières sont des maladies tropicales négligées dont les symptômes cliniques varient de formes cutanées (LC) à des formes viscérales (LV) (Maroli *et al.*, 2013). Elles sont endémiques dans 90 pays de par le monde (Alvar *et al.*, 2012). La forme viscérale est la deuxième cause de mortalité après le paludisme. Elle menacerait 350 millions de personnes et connaît une recrudescence importante, justifiée par son incidence annuelle estimée à plus de 1,3 million de nouveaux cas par an et entre 20 000 et 30 000 décès (OMS, 2014). L'Algérie est l'un des pays les plus endémiques de la LC et de la LV. Plus de 21 000 cas de la forme cutanée ont été enregistrés en 2010, avec un important impact sur la santé publique (Eddaikra *et al.*, 2018). À ce jour, aucun vaccin efficace n'est disponible contre la leishmaniose et les traitements reposent principalement sur la chimiothérapie à l'aide de médicaments pentavalents (Serenio *et al.*, 2012).

Les phlébotomes transmettent également des virus (Depaquit *et al.*, 2010). Les phlébovirus sont considérés comme les plus importants. Ce sont des agents pathogènes humains capables de provoquer des symptômes allant de la fièvre à court terme à la méningite, l'encéphalite et la fièvre hémorragique (Alkanet *et al.*, 2013). Les phlébotomes du genre *Lutzomyia* sont incriminés en tant que vecteurs de la bactérie causant la bartonellose, également connue sous le nom de maladie de Carrion, la fièvre d'Oroya ou de "verruca peruana" (Cohnstaedt *et al.*, 2011 ; Battisti *et al.*, 2015). Cette maladie se caractérise par des symptômes tels que fièvre et anémie hémolytique et peut, à un stade ultérieur, produire des lésions cutanées nodulaires (Maguina *et al.*, 2009 in Telleria *et al.*, 2018).

La connaissance du microbiote des vecteurs de maladies dites vectorielles est essentiel pour comprendre leur relation avec les pathogènes qu'ils transmettent. Le cycle de vie du parasite se déroule dans l'intestin des phlébotomes, son microbiote intestinal pourrait donc jouer un rôle dans le développement de celui-ci, en l'améliorant ou en l'inhibant (Ravasan *et al.*, 2014). Les micro-organismes symbiotes des insectes vecteurs, sont impliqués dans la nutrition, la reproduction, la défense, l'enrichissement de la barrière muqueuse, le métabolisme et la capacité de transmission des agents pathogènes (Weiss and Aksoy 2011 in Ravasan *et al.*, 2014).

Il existe aujourd'hui un réel engouement de la recherche pour décrire la nature des interactions Phlébotome-microbiote avec d'autres agents pathogènes, tels que *Leishmania*. Ces connaissances permettront d'élaboration de nouvelles stratégies pour contrôler la propagation de maladies, telles que la paratransgenèse qui consiste à modifier génétiquement les bactéries présentes chez un insecte spécifique pour interférer avec la transmission des agents pathogènes (Coutinho-Abreu *et al.*, 2010; Hurwitz *et al.*, 2011).

INTRODUCTION

Une autre approche consiste à utiliser les bactéries endosymbiontes, les *Wolbachia spp.* Leur rôle comme mesure de lutte biologique a été prouvé pour bloquer la transmission du virus de la dengue (DENV) (Joshi *et al.*, 2017).

L'objectif visé à travers cette étude originale est d'explorer pour la première fois en Algérie, la diversité de la flore bactérienne qui colonise le tube digestif des phlébotomes originaire des zones endémiques de la leishmaniose. La région de Tizi Ouzou, qui est un foyer de la Leishmaniose viscérale, a été choisie en raison de la diversité de la population phlébotomes qui la compose. De plus, des phlébotomes originaire de la wilaya de M'sila ont été utilisés comme élément de comparaison.

Dans ce travail, nous faisons d'abord un rappel sur les phlébotomes et les maladies qu'ils transmettent. Nous présentons ensuite les zones étudiées : Tizi Ouzou et M'sila, les méthodes utilisées, et les résultats obtenus. Enfin, nous discutons les résultats des bactéries isolées chez les phlébotomes des deux zones ainsi que quelques perspectives.

Chapitre I

Rappels bibliographiques

1. Généralités sur les phlébotomes

1.1. Taxonomie

Les **phlébotomes** appartiennent à l'embranchement des Arthropodes, classe des Insectes, Ordre des Diptères (deux ailes), sous-ordre des Nématocères (antennes longues), famille des **Psychodidae** (Bigot, 1845 et à la sous-famille des **Phlébotominae** (Kertész, 1904). La systématique des phlébotomes ne fait pas l'unanimité parmi les spécialistes. Ils se réfèrent à Lewis *et al.*, (1977), qui reconnaissent **5 genres** : *Brumptomyia*, *Lutzomyia* et *Warileya* dans le **nouveau Monde**, *phlebotomus* et *Sergentomyia* dans **l'ancien Monde** (Abonnenc et Leger, 1976) (Locksley et Louis, 1992), auxquels ils ajoutent le genre monospécifique : *chinius*, postérieurement décrit (Leng, 1987).

En Algérie, il existe 2 genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia* (Belazzoug, 1991 ; Dedet J.P, 1999).

1.2. Morphologie

Les phlébotomes sont des diptères hématophages. Les adultes présentent un corps grêle de petite taille, de 1 à 3 mm de long, de couleur jaune terne au noir. Leurs vol silencieux et saccadé est de courte portée. La tête forme un angle de 45° avec le corps donnant à l'insecte une allure bossue (Boussa, 2008) (Figure 01). Ils apparaissent velus, pourvus de longues pattes, les ailes sont d'une nervation alaire caractéristique et en forme de « V » au repos (Abonnenc, 1972 ; Izri *et al.*, 2006). Ils gisent durant la journée dans les terriers, écuries, alors qu'ils sont particulièrement actifs à la tombée de la nuit à condition que la température soit favorable de l'ordre de 20°C ; et en absence de vent (limite 1km/s). (Killick-Kendrick, 1999).

1.2.1. Tête

La tête comprend 2 antennes longues fines à 16 articles, les organes visuels, et les pièces buccales (Leger et Depaquit, 2001). (Figure 02)

1.2.2. Thorax

Il porte des pattes longues et grêles couvertes de soies et une paire d'ailes lancéolée, ainsi que des balanciers assurant l'équilibration de l'insecte pendant le vol (Dedet *et al.*, 1984).

1.2.3. Abdomen

Il est cylindrique et constitué de dix segments. Le premier est rattaché au thorax, quant aux trois derniers ils sont fortement modifiés selon le sexe pour former le génitalia (Abonnenc, 1972).

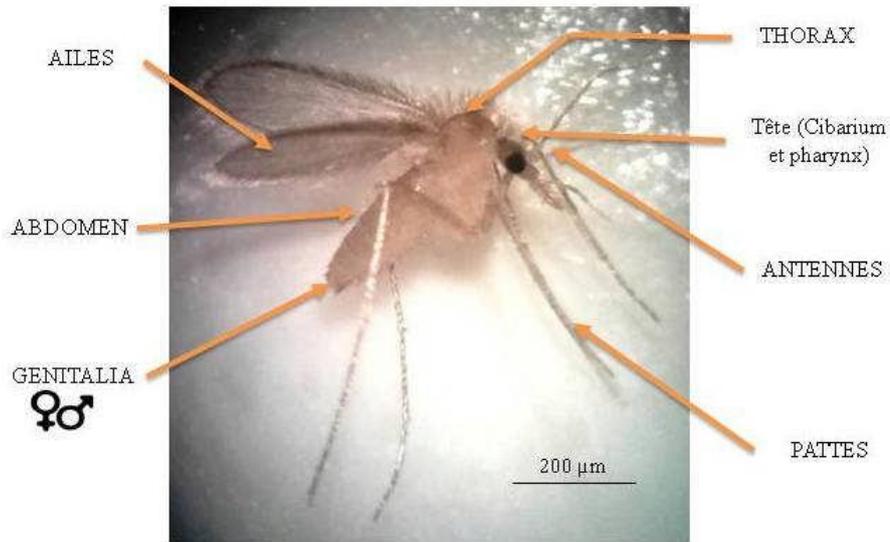


Figure 01 : Morphologie générale d'un Phlébotome femelle adulte (Original, 2018).

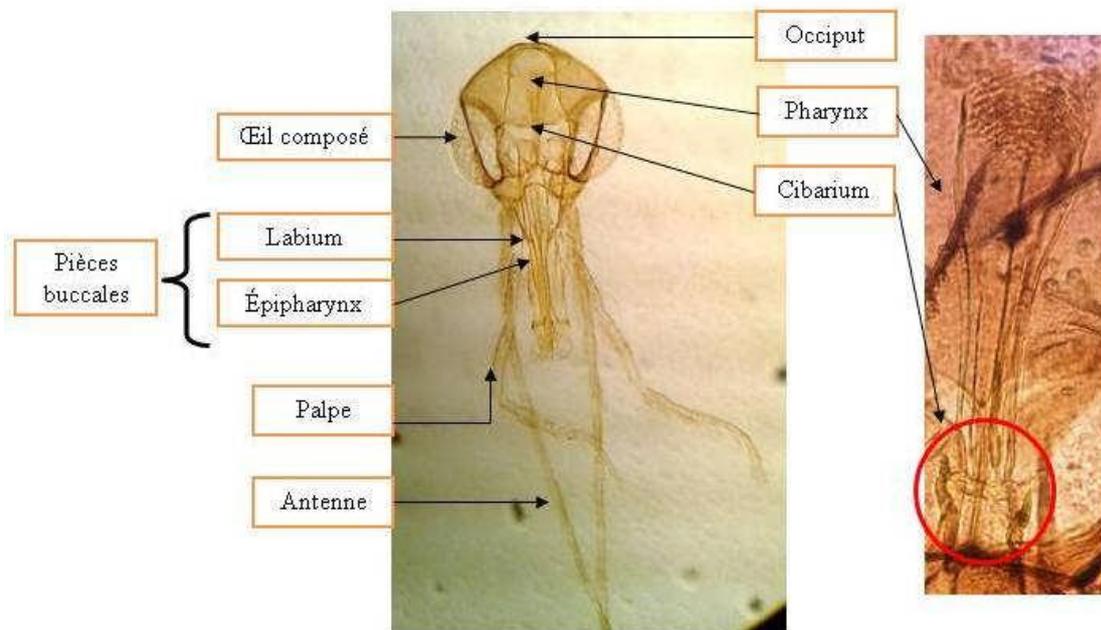


Figure 02: Vue générale de la tête d'un phlébotome (Original 2018).

1.2.4. Appareil reproducteur

Chez le mâle, l'appareil reproducteur est externe, très développé, et se compose de trois paires de prolongements : une paire de coxites suivit d'un stylet, une paire de pièces médianes, et les paramères et des lobes latéraux (Figure 03). (Dolmatova, 1971 ; Frahtia-Benotmane, 2015)

Chez la femelle, il est invaginé, formé de trois organes pairs : deux ovaires, deux glandes annexes et deux spermathèques (figure 04). (Bounamous, 2010).

L'armature génitale du mâle, les spermathèques et l'armature buccale de la femelle varient dans leurs morphologies et sont utilisées pour l'identification et la classification des espèces. (Mouloua, 2014).

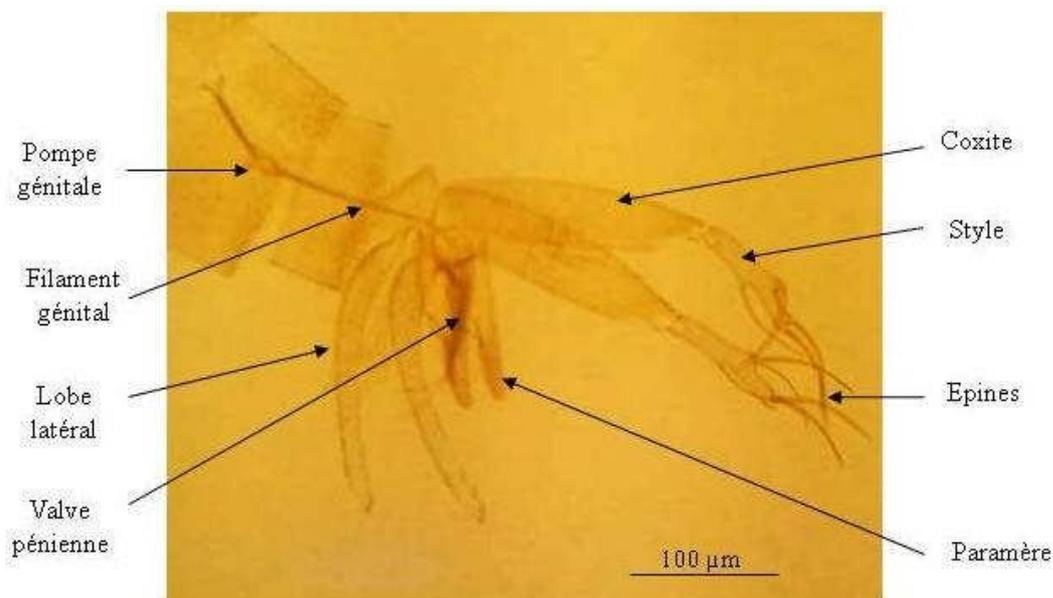


Figure 03: Vue latérale de l'appareil génital mâle (Original, 2018).

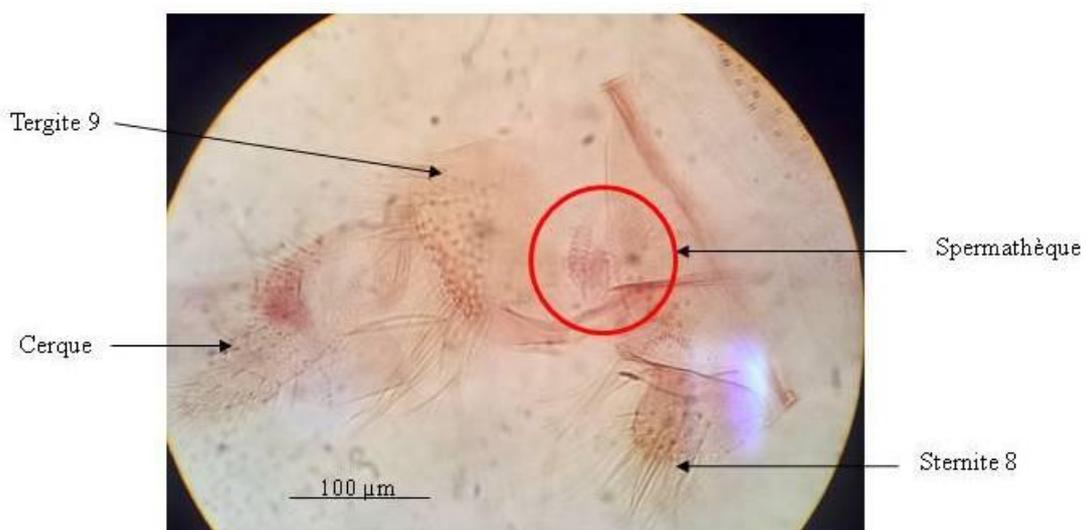


Figure 04: Vue latérale de l'appareil génital femelle *P. longicuspis* (Original, 2018).

1.3. Anatomie interne des phlébotomes

1.3.1. Tube digestif

Il se compose de plusieurs compartiments. L'intestin antérieur commence par la Cavité buccale ou cibarium qui se présente comme une fente assez large, qui aboutit au pharynx.

L'intestin moyen ou estomac, est constitué de deux parties : une partie thoracique antérieure étroite et peu extensible et une partie postérieure élargie. (Dolmatova, 1942).

L'intestin postérieur qui se subdivise en 2 parties séparées par un sphincter : le Duodénum étroit où s'ouvrent les tubes de Malpighi, et le Rectum dilaté qui se rétrécit dans sa partie terminale avant de s'ouvrir dans l'anus (Fig 05). (Leger & Depaquit, 2001).

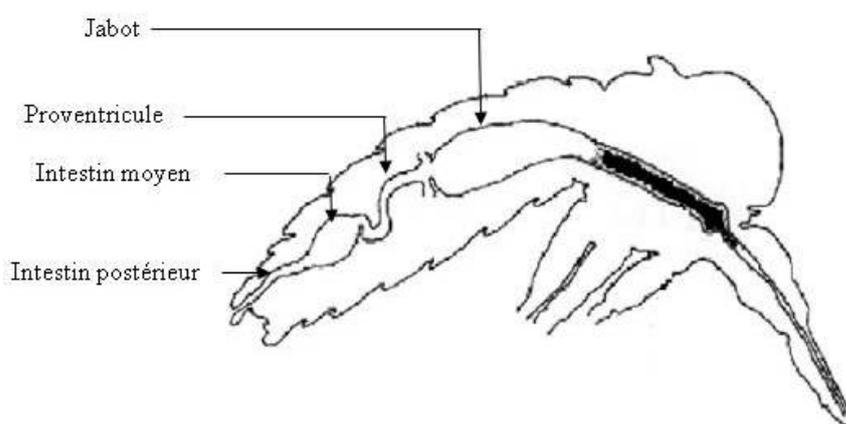


Figure 05: Tube digestif (Bates, 2007, modifié).

1.3.2. Les glandes salivaires

Elles sont volumineuses et situées dans le thorax,. Elles sont plus développées chez la femelle que chez le mâle, et leur taille varie au cours du cycle gonotrophique (Leger & Depaquit, 2001).

1.3.3. Le pharynx

Il aboutit à un œsophage court. Celui-ci reçoit le jabot, assez vaste sac à parois minces. Il est situé dans l'abdomen, sur la face ventrale, sous l'estomac (Leger & Depaquit, 2001).

2. Données biologiques et étho-écologique

Les phlébotomes ont un cycle de vie holométabole qui comprend obligatoirement l'œuf, quatre stades larvaires, une nymphe et l'imago (figure 06). (Bounamous, 2010). Dès leur émergence les phlébotomes cherchent à se nourrir de sucres naturels, en particulier nectars ou

sécrétions de sève. De plus, les femelles telmophages ont besoin d'un repas sanguin pour l'achèvement du cycle gonotrophique (Akhoundi, 2012).

Après s'être gorgées de sang les femelles se reposent dans des endroits sombres à l'abri des vents où la digestion s'effectue en 3 à 10 jours et permet la maturation de 50 à 200 œufs qui sont pondus à même le sol. (Izri et *al.*, 2006).

Après la ponte, la femelle cherche un hôte pour un nouveau repas sanguin, qui est précédé ou suivi d'une copulation avec le mâle. Elle dure 2 à 4 minutes et parfois plus longtemps (Abonnenc, 1972).

Chaque œuf donne naissance à une larve terricole, vermiforme, qui se nourrit de matières organiques en décomposition, les adultes peuvent donc acquérir une partie de leur flore bactérienne au cours de leur développement larvaire. (Akhoundi, 2012).

La larve mue quatre fois avant de donner une nymphe d'où émerge l'imago, c'est ainsi que la femelle qui vit 1 à 3 mois peut se nourrir sur plusieurs hôtes, s'infecter sur l'un d'eux et assurer la diffusion d'agents pathogènes, quant aux mâles ils ont une durée de vie plus brève (Izri et *al.*, 2006)

Le développement dure 20 à 90 jours en fonction des conditions climatiques. Pendant la saison estivale, les émergences d'insectes adultes ont lieu massivement. En saison froide, les phlébotomes hibernent à l'état d'œuf ou de larve. (Izri et *al.*, 2006).

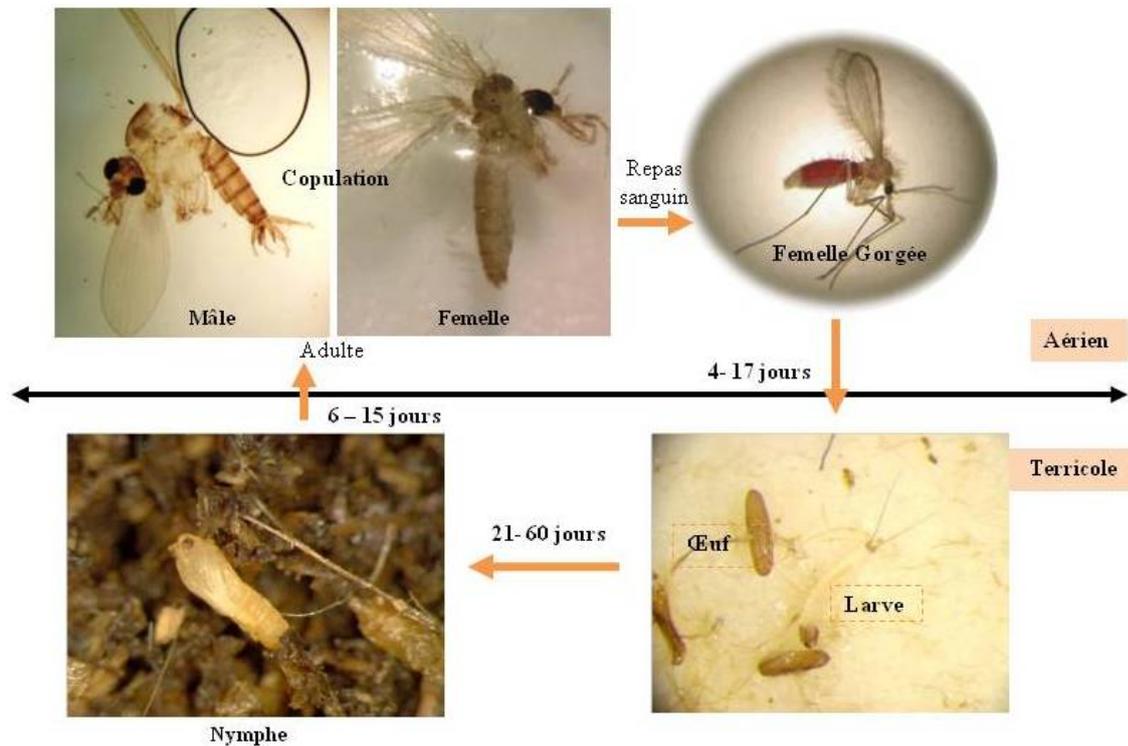


Figure 06: Cycle biologique des phlébotomes (Elevage de *P. duboscqi*) (Pesson., 2004, modifié).

3. Distribution géographique des phlébotomes

On peut rencontrer les phlébotomes dans toutes les régions chaudes du globe. mais leur apparition, leur densité, leur période d'activité et leur disparition varient suivant la latitude, l'altitude, la saison et l'espèce (Abonnenc, 1972).

3.1. Dans le monde

L'aire de répartition des phlébotomes dans le monde est très vaste et se rencontrent sur tous les continents, ils n'ont pas été signalés dans les pays nordiques, très rares en Amérique du Nord, peu abondants en Australie, abondants dans les zones tropicales et équatoriales de l'Afrique, de l'Amérique orientale et de la province malaise (Fig07) (Leger et Depaquit, 2002). Les phlébotomes sont également fréquents dans le bassin méditerranéen et en Afrique du Nord (Dedet et *al.*, 1984, Bellazoug, 1991).

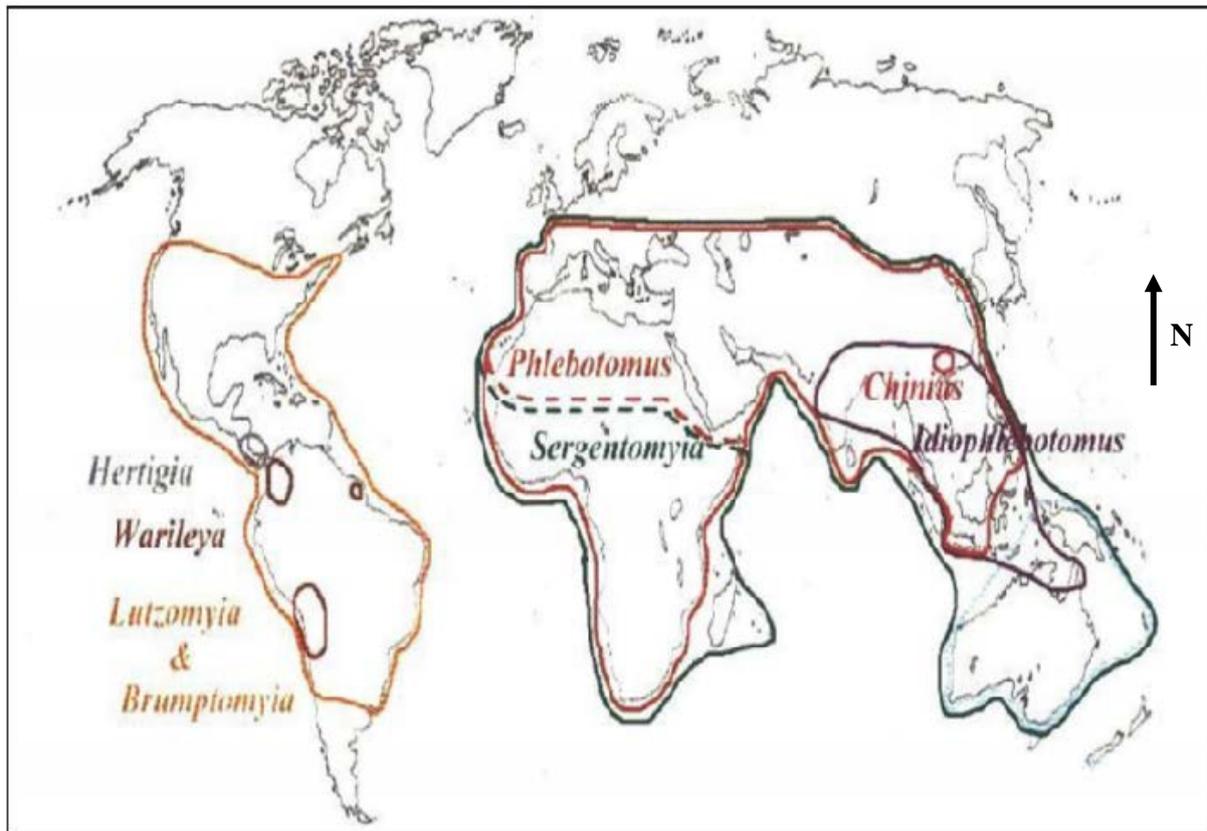


Figure 07 : Répartition des principaux genres de phlébotomes dans le monde (Léger et Depaquit, 2002).

3.2. En Algérie

En Algérie, les phlébotomes sont répartis sur tout le territoire national, de l'étage humide jusqu'à l'étage saharien (Dedet et *al.*, 1984 ; Belazzoug, 1991; Berchi, 1990 ; Izri, 1994). Aujourd'hui, 23 espèces de phlébotomes sont connues en Algérie (Berdjane-Brouk, 2012) (Tableau I)

Tableau I : Phlébotomes d'Algérie (Boudrissa, 2006).

Famille	Genre	Sous genre	Espèce	
Psychodidae	<i>phlebotomus</i>	<i>Phlebotomus</i> (Rondani, 1943)	<i>papatasi</i> (Scopoli, 1786)	
			<i>bergeroti</i> (Parrot, 1934)	
		<i>Paraphlebotomus</i> (Theodor, 1948)	<i>sergenti</i> (Parrot, 1917)	
			<i>alexandri</i> (Sinton, 1928)	
			<i>chabaudi</i> (Croset ; Abonnenc et Rioux, 1970)	
			<i>kazeruni</i> (Theodor et Mesghali, 1964)	
		<i>Larrousius</i> (Nitzulescu, 1931)	<i>chadlii</i> (Rioux ; Juminer et Gibily, 1966)	
			<i>ariasi</i> (Tonnoir, 1921)	
			<i>longicuspis</i> (Nitzulescu, 1930)	
			<i>perniciosus</i> (Newstead, 1911)	
			<i>perfiliewi</i> (Parrot, 1930)	
			<i>langeroni</i> , (Nitzulescu, 1930)	
		<i>Sergentomyia</i>	<i>Sergentomyia</i> (Franca, 1920)	<i>antennata</i> (Newstead, 1912)
				<i>fallax</i> (Parrot, 1921)
				<i>minuta parroti</i> (Adler et Theodor, 1927)
	<i>schwetzi</i> (Adler ; Adler et Parrot, 1929)			
	<i>Parrotomyia</i>		<i>lewisi</i> (Parrot, 1948)	
			<i>eremitis</i> (Parrot et Bouquet de Jolinière, 1945)	
	<i>Grassomyia</i> (Theodor, 1958)		<i>dreyfussi</i> (Parrot, 1933)	
	<i>Sintonius</i>		<i>clydei</i> (Sinton, 1928)	
			<i>christophersi</i> (Sinton, 1927)	
			<i>tiberiadis</i> (Adler ; Theodor et Louire, 1930)	

4. Les Pathologies transmises par les phlébotomes

Les phlébotomes incommodent beaucoup les hommes avec leurs piqûres, beaucoup en souffrent de l'effet toxique de leur salive. Certaines espèces ont une importance médicale en tant que vectrices de plusieurs pathologies affectant l'homme.

4.1. Transmission des parasites: Les Leishmanioses

Ce sont des maladies parasitaires dues à un protozoaire flagellé du genre *leishmania* dimorphique (forme amastigote intracellulaire chez l'hôte vertébré, et forme promastigote qui se déroule chez l'insecte). Chez l'homme il existe trois tableaux cliniques principaux : La leishmaniose viscérale humaine (LVH) ou kala azar, La leishmaniose cutanée (LC), et La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM). (Nathalie Carré et *al.*, 2010).

De par sa situation géographique, sa diversité biologique, et sa forte population rurale, l'Algérie, présente un terrain favorable à l'émergence de plusieurs formes cliniques de la maladie. D'ailleurs, elle est la plus exposée dans les pays du pourtour méditerranéen, deux formes cliniques y sévissent à l'état endémique, la leishmaniose viscérale et la leishmaniose cutanée. Ces affections connues depuis le début du dernier siècle posent actuellement un réel problème de santé publique du fait de la recrudescence du nombre de cas et l'extension de la maladie à des régions jusque-là indemnes (Boudrissa, 2014).

4.2. Transmission d'arbovirus

Les phlébotomes sont incriminés dans la transmission de divers arbovirus, qui restent insuffisamment connus. Dans le pourtour méditerranéen Izri et *al.*, (2006) rapportent que, seul les Phlebovirus sont impliqués en médecine.

Dans l'Ancien Monde, au moins 250 millions de personnes sont exposées aux infections à phlébovirus (Moriconi et *al.*, 2017). Les virus siciliens SFSV (*Sandfly Fever Sicilian Virus*) et TOSV (*Toscana Virus*), sont transmis par les phlébotomes (Ayhan et *al.*, 2017). Ils définissent ce qui est communément appelé le groupe des « fièvres à phlébotomes », « fièvres à papatasi » ou encore « fièvres de trois jours ». Le TOSV évoque un syndrome méningé estival, des réservoirs pour ce virus n'ont pas été identifiés mais il est peu probable que les humains constituent le réservoir de TOSV car la virémie humaine a une durée de vie trop courte (Depaquit et *al.*, 2010).

En Algérie plus précisément dans la région de la Kabylie, les travaux menés ont pu mettre en évidence une circulation d'arbovirus transmis par les phlébotomes comme « *Sandfly Fever*

Sicilian Virus et *Sandfly Fever Naples Virus* » (Izri et al., 2008 ; Moureau et al., 2010) d'autre part, une nouvelle souche de virus a été reportée dans la région de Draa El Mizan (Alkan et al., 2015). Par contre, les travaux réalisés dans le sud Algérien Tamanrasset et Djanet n'ont pas signalé la présence de ces virus (Tesh et al., 1976).

4.3. Transmission de bactéries : Bartonellose

La Bartonellose humaine, encore appelée maladie de Carrion. L'agent causale est *Bartonella bacilliformis*, une bactérie bacilliforme retrouvée dans les érythrocytes et les cellules réticulo-endothéliales des organes internes (foie, rate, ganglions lymphatiques, intestin) (Yamar Ba, 1999). Les vecteurs sont des *Lutzomyia sp* avec pour principal représentant *L. verrucarum*. (Boulouis et al., 2008).

Cette infection est caractérisée dans sa première phase par la fièvre et une anémie hémolytique mais plus tard par des affections cutanées avec formation de nodules et de verrues. La maladie sévit sous deux formes la Verruga péruvienne où sa forme grave est la fièvre d'Oroya ou maladie de Carrion dont le réservoir est l'animal (Frahtia-Benotmane, 2015).

5. Le microbiote intestinal

5.1. Définition

La flore, ou microbiote, est l'ensemble des micro-organismes non pathogènes dits commensaux, vivant dans un environnement spécifique appelé microbiome, chez un hôte qui peut être animal ou végétal ou une matière pouvant être elle-même d'origine animale ou végétale (Burcelin et al., 2016). Les bactéries intestinales jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie immunitaire et métabolique et dans la protection contre les agents pathogènes. Elles protègent le tube digestif et l'organisme contre l'implantation et la multiplication de bactéries potentiellement dangereuses, et freinent le développement des levures et des champignons. Elles peuvent aussi neutraliser certaines substances toxiques, telles que les toxines, fabriquées par les germes à l'origine d'infections intestinales (Thursby et Juge, 2017).

Selon les propriétés de leur paroi, les bactéries peuvent être classées en deux groupes :

- **les GRAM -** : il s'agit d'une paroi cellulaire fine constituée de 1 à 3 à couches de peptidoglycane

- les **GRAM +** : il s'agit d'une paroi cellulaire épaisse constituée de plusieurs couches (au moins 10 à 20) de peptidoglycane (Prescott et *al.*, 2013).

5.2. Le microbiote intestinal des Phlébotomes

Il y a peu d'informations sur le microbiote intestinal des phlébotomes. Les travaux menés sur ces diptères ont démontrés qu'ils abritent une grande variété de microorganismes, faisant partie de leur microbiote naturel (McCarthy et *al.*, 2011 in Akhoundi et *al.*, 2012), mais également ceux qui sont originaire de leurs l'environnement extérieur (Killick-Kendrick et *al.*, 1986 in Akhoundi et *al.*, 2012). Par conséquent, l'environnement et les habitudes alimentaires (phytophagie et hematophagie), du phlébotome peuvent influencer sur le contenu de son microbiome intestinal. En outre, une grande partie de cette flore bactérienne est acquise durant les stades larvaire, (Cameron et *al.*, 1995).

Des études antérieures ont révélées une forte prévalence de bactéries appartenant au Gram négatif qu'au Gram positif colonisant l'intestin des phlébotomes (Midori et *al.*, 2001 ; volf et *al.*, 2002). *P. agglomerans* et *Bacillus* spp, ont été fréquemment observés dans les populations de phlébotomes capturées et d'élevage. *Bacillus subtilis*, et *Pantoea* spp de la famille Enterobacteries étaient présents dans *Phlebotomus papatasi* originaire d'Inde, Turquie, Tunisie et d'Egypte (Hillesland et *al.*, 2008 ; Mukhopadhyay et *al.*, 2012). Cependant, *Firmicutes*, *Acintobacteria*, *Proteobacteria*, sont considérés comme étant les phylums les plus isolés (Fig 08) (Fraihy et *al.*, 2017).

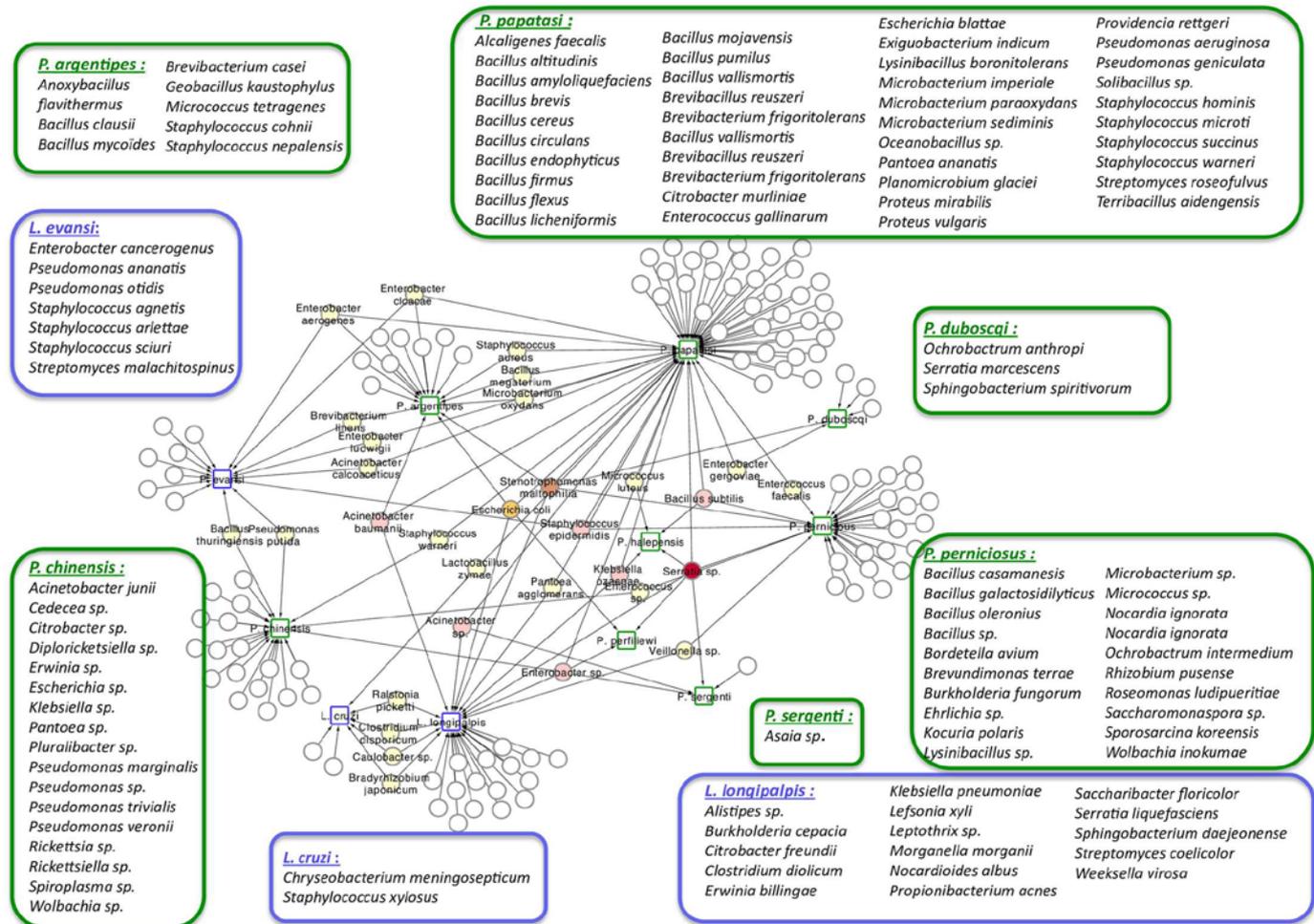


Figure 08 : Analyse de réseau montrant les espèces de bactéries partagées retrouvées dans *Phlebotomus*, notamment (*P. argentipes*, *P. duboscqii*, *P. halepensis*, *P. papatasi*, *P. perlifiliiewi*, *P. perniciosus*, *P. sergenti* et *P. chinensis*) représentées dans les carrés entourés en vert et les bactéries retrouvées chez *Lutzomyia*, notamment *L. evansi*, *L. cruzi* et *L. longipalpis* représentées par les carrés entourés en bleu (Fraïhi et al., 2017).

5.2.1. L'association entre les insectes vecteurs et leur microbiote intestinal

L'importance des bactéries dans le développement des insectes vecteurs a été démontrée chez les moustiques, notamment *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* et *Georgacraigius atropalpus* (Coon et al., 2014). Chez ces trois espèces, il a été montré que les larves étaient incapables de se développer et que l'introduction d'une bactérie a permis le développement des larves de *A. aegypti*. D'autre part, les interactions complexes entre les micro-organismes et les agents pathogènes tels que les virus et le *Plasmodium* ont été étudiées. Les interactions complexes du microbiote et des moustiques vecteurs qui vont jusqu'à influencer la compétence des vecteurs sont également abordées (Caragata et Walker, 2012 ; Hegde et al., 2015).

Dans le cas des mouches de sable, les bactéries semblent jouer un rôle important dans de nombreux aspects de leur cycle de vie, à commencer par leur développement précoce. En effet, Peterkova-Koci *et col* (2012), ont démontré l'importance de la présence et de la spécificité des bactéries pour le développement des ces insectes. La pertinence des études sur le microbiote de phlébotomes a été renforcée dans un travail récent dans lequel les auteurs ont identifié un rôle crucial pour le microbiote de phlébotomes dans l'infection à *Leishmania donovani* chez les mammifères (Dey *et al.*, 2018).

5.2.2. Influence du microbiote de l'intestin moyen sur l'établissement du parasite chez les insectes vecteurs

Il existe des rapports sur l'influence du microbiote intestinal vecteur sur le cycle de vie du parasite. Chez les moustiques, il a été démontré que les infections bactériennes dans l'intestin moyen pouvaient considérablement inhiber le développement sporogonique (Pumpuni *et al.*, 1996; Gonzalez-Ceron *et al.*, 2003).

Chez les arthropodes vecteurs, le microbiote intestinal joue un rôle important dans leur physiologie comme la nutrition et la digestion (Dillon et Dillon, 2004). La relation entre les agents pathogènes à transmission vectorielle et le microbiote intestinal d'insectes a été étudiée, les données produites suggèrent que le microbiote peut influencer l'infection parasitaire par l'activation des voies immunitaires innées des vecteurs conduisant à l'induction de molécules effectrices qui aideront à contrôler l'infection par des agents pathogènes véhiculés par des insectes. Par exemple, la suppression des ROS (Reactive Oxygen Species) de *L. longipalpis* dans l'intestin moyen a révélé le rôle important du microbiote dans la facilitation de l'infection par *Leishmania* (Diaz-Albiter *et al.*, 2011).

Dans l'intestin de certains insectes vecteurs, le nombre de parasites ingérés avec le repas de sang diminue avant d'entrer en contact avec les tissus de l'hôte. De nombreux facteurs pourraient être responsables de cette réduction, Des preuves d'une possible influence du microbiote intestinal sur le cycle de vie du parasite ont été rapportées pour des insectes vecteurs, y compris les phlébotomes et les glossines (Schlein *et al.*, 1985; Welburn et Maudlin, 1999). Ainsi, les infections microbiennes dans les intestins des phlébotomes (*Phlebotomus papatasi*) ont considérablement réduit les taux d'infection par *Leishmania major* (Schlein *et al.*, 1985).

5.2.3. *Wolbachia* spp : Grand manipulateur de la biologie des phlébotomes

Wolbachia spp sont des bactéries intracellulaires courantes présentes dans les tissus reproducteurs des arthropodes et des nématodes. Ces alphaproteobacteries endosymbiotes sont transmises verticalement à travers les œufs de l'hôte. Elles modifient la biologie de l'hôte de diverses manières, y compris l'induction de manipulations dans la reproduction, telles que la parthénogenèse par féminisation, la mort des mâles et l'incompatibilité cytoplasmique entre le sperme et l'œuf (Figure 09). Les *Wolbachia* peuvent également se transmettre horizontalement entre divers espèces, ce qui entraîne une propagation et une répartition mondiale chez divers hôtes invertébrés (Werren et al., 2008).

L'utilisation de certaines souches de *Wolbachia* est considérée comme une alternative prometteuse pour réduire la densité de population des espèces de *Lutzomyia* et interférer avec la multiplication des parasites et, par conséquent, la transmission de *Leishmania* (Matsumoto et al., 2008 ; Azpurua et al., 2010 In Vivero et al., 2017).

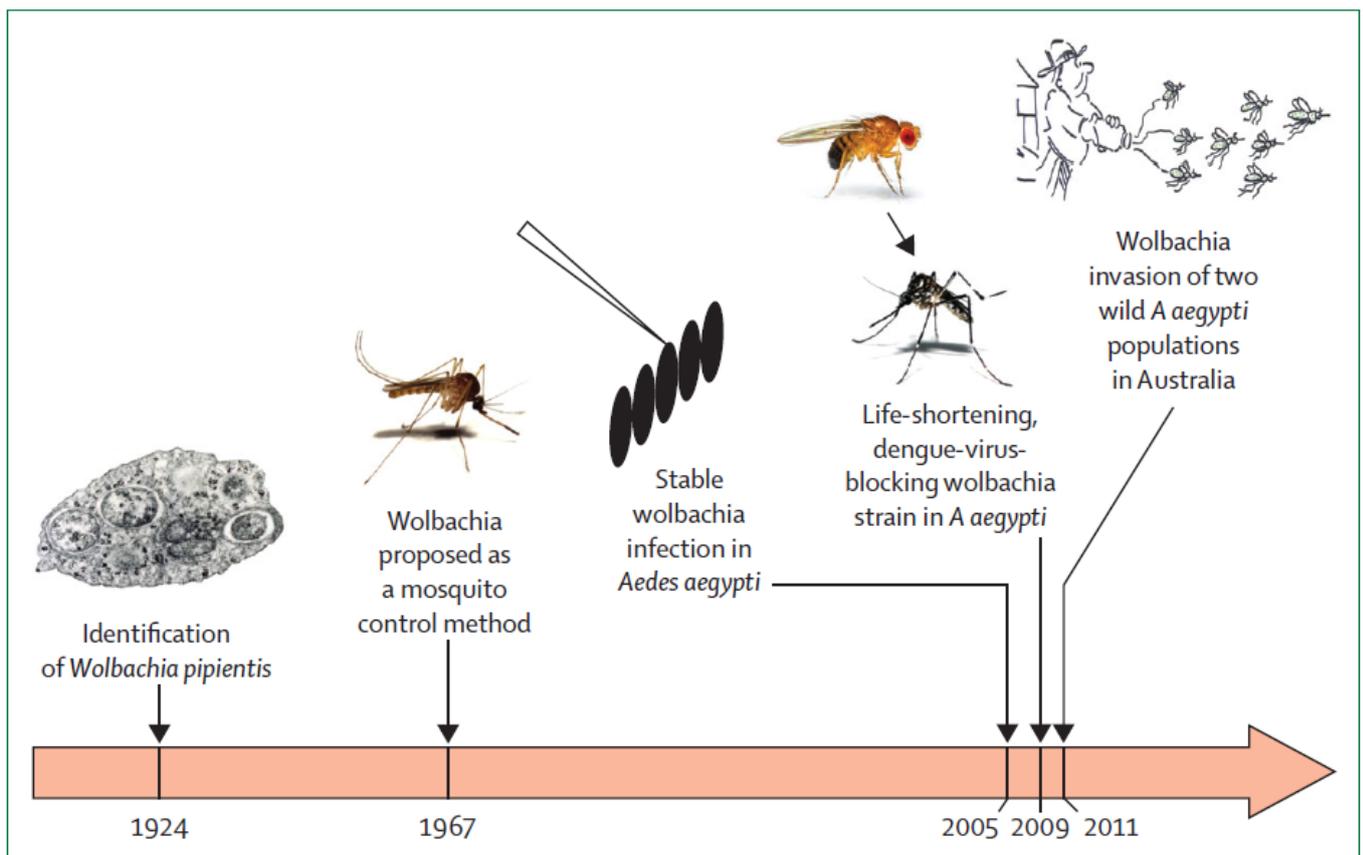


Figure 09: Développements clés de stratégies de contrôle de la dengue à base de *Wolbachia* (Lambrechts et al., 2015).

Chapitre II

Matériel et méthodes

1. Matériel Biologique

La collecte des phlébotomes s'est faite principalement dans la wilayade Tizi Ouzou en utilisant deux types de pièges : pièges huilés et pièges lumineux type CDC. La région de Tizi Ouzou, est située au Nord du territoire Algérien, entre 36°42'42' de latitude Nord et 4°02'45' de longitude Est, d'une surface de 3568 km². Elle fait face à la mer méditerranéenne au Nord. Elle est caractérisée par un climat méditerranéen, un hiver froid pluvieux et un été sec et chaud. Le chef lieu de la ville de Tizi Ouzou est bordé du nord par le massif montagneux du Djurdjura celui-ci donne naissance dans sa partie occidentale à la dépression de Draa el Mizan, la principale région qui a fait l'objet de notre étude (figure 10).

Par ailleurs, nous avons aussi au cours de notre travail utilisé des phlébotomes capturés dans la wilaya de M'sila. Cette dernière est située dans la région du Hodna dans le Nord Est du pays d'une surface de 18175 Km². Sa position lui confère un aspect écologique représenté par la prédominance des steppes (60%) avec une surface de (20%) affectée par l'agriculture. Le climat est de type semi aride à aride.

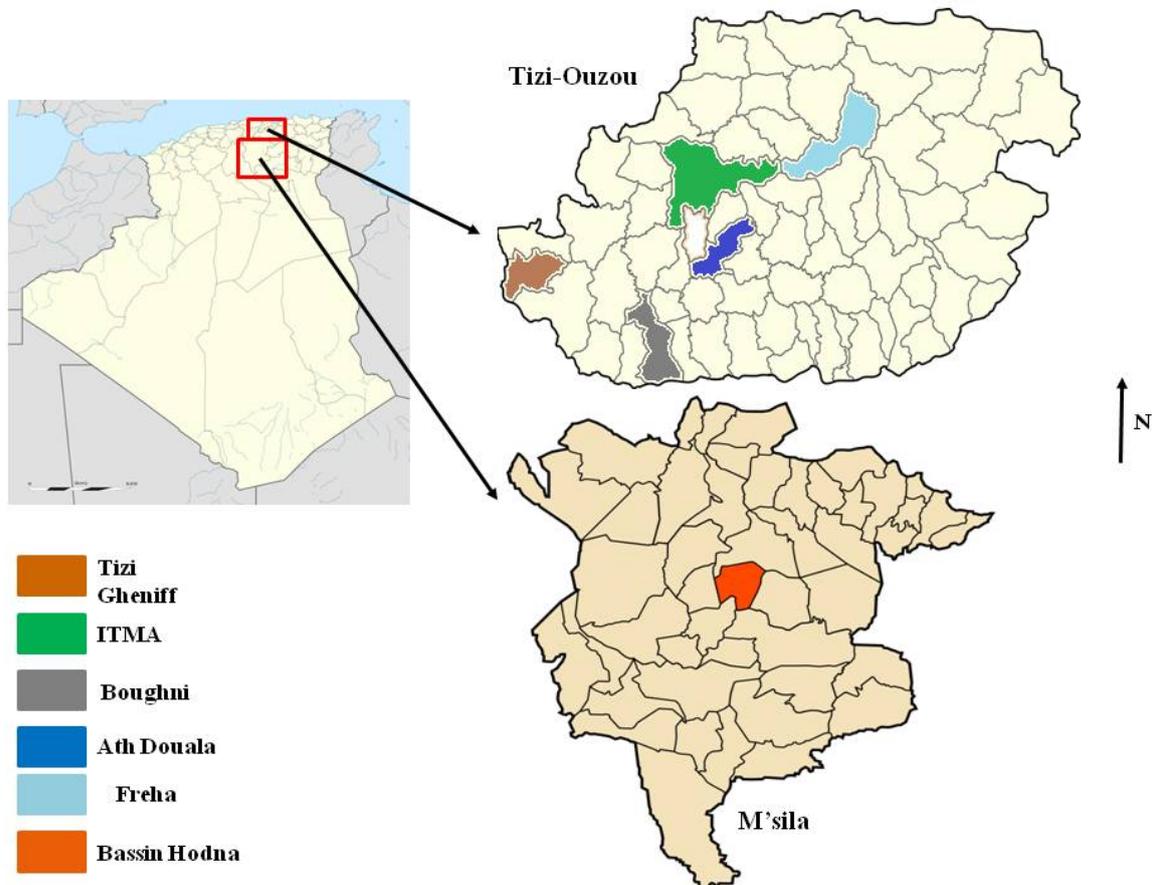


Figure 10 : Carte administrative des Wilayas de Tizi Ouzou et M'sila.

1.1. Collecte des données météorologiques durant la période de piégeage

Afin de déterminer la meilleure période de piégeage des phlébotomes en fonction des conditions climatiques, la température, l'humidité et pluviométrie ont été collectés, chaque semaine pour les trois mois de collecte, à savoir Mai, Juin et Juillet 2018. Ces données ont été relevées du site web "Réelles prévisions" (http://rp5.ru/archive.php?wmo_id=60395&lang=fr).

2. Méthodes

2.1. Piégeage des Phlébotomes

2.1.1. Pièges huilés

Ce sont des feuilles de papier blanc carrée (20x20 cm) imprégnées d'huile de ricin (Fig 11). Ce type de piège permet de faire une étude sur la dynamique saisonnière des phlébotomes, et la faune résiduelle. Il permet aussi de détecter les différents agents pathogènes, bactéries, virus et parasites par des techniques de biologie moléculaire à partir des spécimens de phlébotomes ainsi que d'autres insectes morts collés sur les pièges.

Chaque début de semaine durant trois mois : de Mai à Juillet 2018, les pièges huilés ont été déposés dans des écuries (bovins et ovins) et au niveau des clapiers dans différentes régions de la wilaya de Tizi Ouzou (Tableau II). Ils ont été récupérés trois jours après leurs dépôts puis les feuilles ont été comptés et acheminés au laboratoire dans des sachets en plastiques bien identifiés suivant leurs origines.



Figure 11: (A) Piège huilé déposé / (B) pièges huilés récupérés (Originale, 2018)

2.1.2. Pièges lumineux CDC

Le dispositif type CDC (Centers for Disease Control and prevention) est composé d'une cage couverte d'un tissu à mailles très fines, d'un ventilateur muni d'un moteur et une petite lampe alimentée par une batterie de 6V (Fig 12). Ce système permet d'aspirer les phlébotomes qui s'envolent autour de l'appareil. Ce type de pièges permet de collecter des spécimens vivants destinés à l'isolement d'agents pathogènes, (virus, bactéries et parasites) à partir des phlébotomes.

Trois pièges CDC ont été déposés chaque début de semaine du mois de Juillet, dans la région de Tizi Ouzou au niveau des écuries, sur un support à environ 1m au-dessus du sol, loin d'une source de lumière, au crépuscule. Ils ont été récupérés le lendemain matin à l'aube. Ils ont été ensuite transportés vers le laboratoire dans des sacs noirs contenant du papier journal mouillé pour préserver l'humidité et éviter le dessèchement des phlébotomes qui sont très sensibles à la température et à la lumière.

Afin de connaître la faune bactérienne des phlébotomes de Tizi Ouzou et celle de M'sila, d'autres spécimens de la seconde wilaya sont inclus dans l'étude, capturés par l'équipe d'entomologistes du laboratoire avec les pièges CDC dans des écuries.



Figure 12: Piège lumineux CDC (Akhoundi, 2012).

Tableau II: Les régions et les périodes de captures. (AndroiTS GPS Test)

Région	Point de position (GPS)	Période
Chef lieu de la Ville de Tizi-Ouzou (ITMA)	Lat 36°28.7798'N / Lon 003°57.6036'E	Juillet
Tizi-Ghennif (Adila)	Lat 36°36.0325'N / Lon 003°45.3070'E	Mai/Juin/ Juillet
Boughni	Lat 36°43.2493'N / Lon 004°02.0311'E	Juin
Fréha	Lat 36°47.4627' N / Lon 004°13.7544'E	Mai
Ath Douala	Lat 37°00 N Lon 4°04E	Juin
M'sila	Lat 35.614900°N Lon 4.497299°E	Juillet

2.2. Tri et identification des phlébotomes

Suite à la récupération des pièges huilés, les phlébotomes englués ont été prélevés à l'aide d'un pinceau imbibé d'alcool absolu, puis ont été conservés dans l'alcool à 70° en attendant leur traitement. Pour ceux des pièges CDC, un aspirateur à bouche a été utilisé pour leur collecte (fig 13).

Après le tri des insectes récoltés, les phlébotomes mâles et femelles collectés par les pièges huilés, ainsi que ceux récupérés mort des pièges CDC, ont été éclaircis dans de la potasse à 20% pendant 2 heures puis trempés dans la solution de Marc André (Annexe 01) au minimum une heure après deux lavages successifs à l'eau.

L'identification s'est faite selon les clés dichotomiques d'Abonnenc (1972) et Dedet (1984) (Annexe 02), sous microscope optique à différents grossissements (GX4, GX10, GX40, et G X100).Après montage dans une goutte de Marc André pour la bonne visualisation des critères d'identification à savoir pharynx, cibarium et génitalia (organe de reproduction), la tête des phlébotomes est orientée dans le sens dorso-ventral et le reste du corps est orienté dans le sens latéral.



Figure 13: Les étapes du tri et identification (Originale, 2018).

A : Phlébotomes aspiré par un aspirateur à bouche. **B:** Tri sous une loupe. **C :** Identification des phlébotomes sous microscope optique.

2.3. Dissection des femelles et mise en culture des bactéries

2.3.1. Optimisation des différentes techniques

Les différentes techniques utilisées lors de l'étude : dissection et isolement des bactéries, ont été réalisées sur 30 femelles *Culex pipiens* provenant de l'élevage maintenu au niveau du laboratoire afin d'optimiser les réactions.

Après dissection des femelles, 10 tubes digestifs ont pu être récupérés et mis dans des BHIB, leur incubation a duré 24H à 37°C. Seulement 6 étaient troubles (positifs), ils ont été ensuite ensemencés chacun sur les milieux Chapman, Hektoen et sur GN, et incubés dans une étuve simple à 37°C pendant 24 à 48H.

2.3.2. Traitement des phlébotomes

Les femelles phlébotomes collectées par les pièges lumineux CDC des deux régions sont d'abord anesthésiées par le froid à -20°C pendant 15min. les femelles sont plongées dans un bain d'alcool 70° puis dans l'eau distillée stérile avant de procéder à la dissection dans des conditions tout à fait stérile à l'aide de deux aiguilles entomologique, sous loupe binoculaire.

Le tube digestif de 105femelles : dont 75 collectées de Tizi Ouzou et 30 de M'sila, a été retiré en appuyant légèrement sur le thorax par une aiguille stérile et en tirant par l'autre aiguille la partie distale de la femelle (à partir du 8^{ème} segment) (figure

14).Chaque tube digestifa été ensuite mis dans un milieu d'enrichissement Brain Heart Infusion Broth(BHIB)bien identifié par région et par espèce puis incubé dans l'étuve à 37°C pendant 24h,pour permettre aux différentes bactéries présentes de pousser.

La partie distale de chaque femelle a été montée entre lame et lamelle pour l'identification de l'espèce sous microscope photonique à différent grossissements (X4, X10, X40, X100)suivant les clés dichotomiques d'Abonnenc (1972) et Dedet (1984).

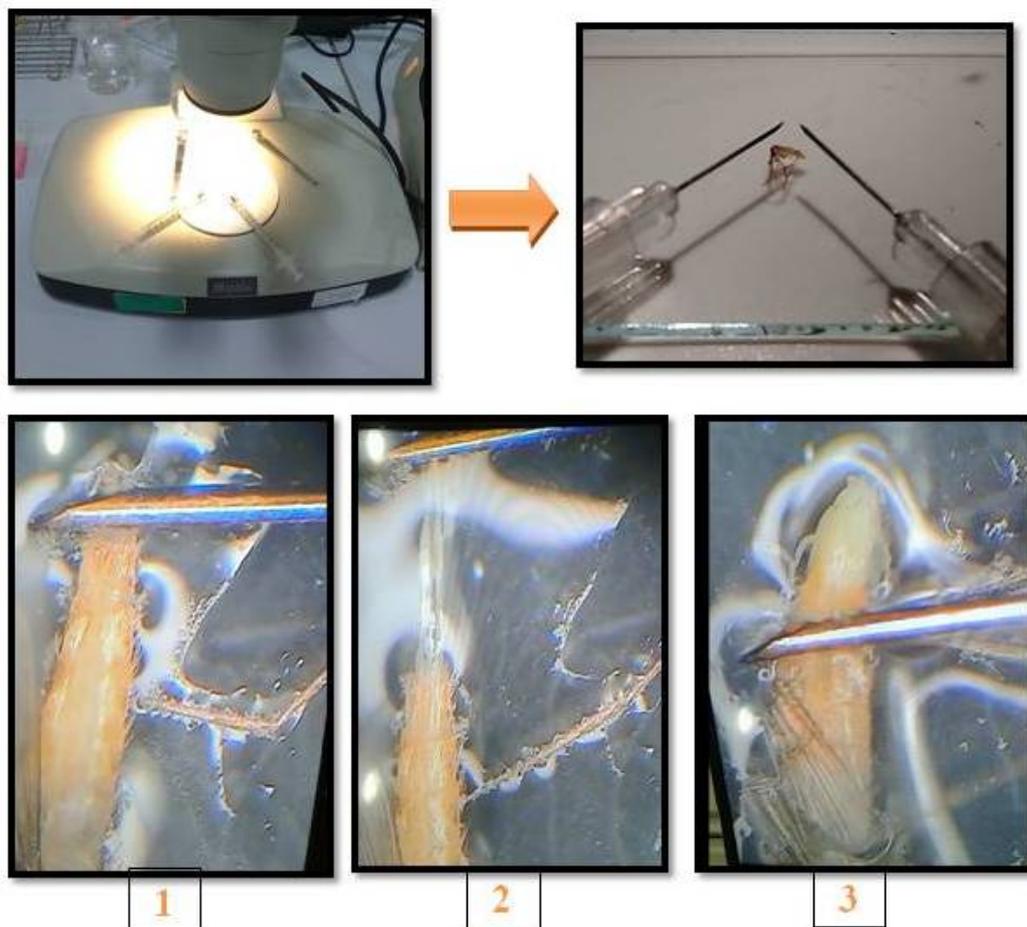


Figure 14 : Les étapes de la dissection (Originale, 2018)

2.4. Isolement des différentes bactéries

L'isolement des bactéries s'est fait sur différents milieux de culture (Chapman, Hektoen et GN) préalablement coulés dans des boîtes pétris et incubées 24h à 37°C afin de vérifier la qualité des boîtes (contaminées ou pas) avant leurs usages.

Les BHIB positifs ont étéensemencés sur Géllose Nutritive (GN) ainsi que sur des milieux de culture spécifiques à savoir le milieu Chapman, Hektoen et laissés en

incubation de 24 à 48 heures à 37°C.

2.5. Identification des bactéries

L'identification initiale des espèces bactériennes a été basée sur les caractéristiques de la colonie (taille, forme, couleur, contour,) ainsi que le changement de la couleur du milieu. La morphologie des isolats a été basée sur la procédure de coloration de Gram.

2.

Les boîtes pétris dont les colonies se ressemblent ont été regroupées et une boîte d'entre elles a été choisie pour effectuer un repiquage sur GN afin d'avoir une souche pure nécessaire pour effectuer les autres tests d'identification à savoir :

2.5.1. Coloration de Gram : série de colorations effectuées sur un frottis. Les bactéries Gram positif (Gram+) sont colorées en violet, les bactéries Gram négatif (Gram-) sont colorées en rose, ceci étant dû à une différence de composition de la paroi. (voir Annexe 03).

2.5.2. Test d'oxydase : le test a été effectué en prenant une colonie bactérienne et la froter sur le carré blanc, afin de détecter l'enzyme cytochrome. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylène diamine qui est incolore en présence de l'enzyme, il libère un composé rose-rouge, noircissant à l'air. (fig 15)

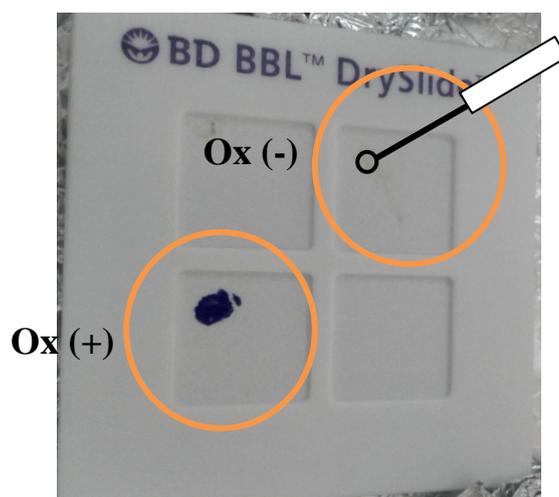


Figure 15 : Test d'oxydase (Originale, 2018).

2.5.3. Test de catalase : Le test consiste à mettre des colonies bactériennes en contact de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles. (fig 16)

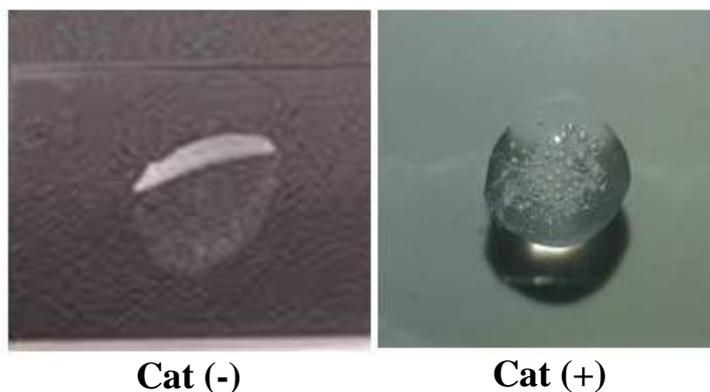


Figure 16 : Test de Catalase (Originale, 2018).

2.5.4. Les galeries Biochimiques

L'ultime étape de l'identification bactérienne a été basée sur l'utilisation de quatre types de galeries biochimiques, seules des cultures pures contenant un seul type de micro-organisme doivent être utilisées :

Api 20 E pour les Gram(-) : sont utilisés pour l'identification des Enterobactériaceae et autres bacilles à gram négatif comprend 21 tests biochimiques miniaturisés.

Api 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, etc.) combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation.

Api STAPH est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus*, comprenant 32 tests biochimiques

Api 50 CHB/E Medium est destiné à l'identification des bacillus et apparentés à des bacilles à Gram négatif appartenant aux Enterobactériaceae et Vibrionaceae, ce milieu est prêt à l'emploi et permet l'étude de la fermentation des 49 sucres déshydratés de la galerie. La galerie API 20 E peut être utilisée en complément de la galerie API 50 CH (optionnelle pour Bacillus et apparentés mais indispensable pour Enterobactériaceae et Vibrionaceae).

Mode opératoire

Tous d'abord une quantité d'eau distillée a été versé dans la boîte pour maintenir l'humidité de la galerie, ensuite le microorganisme à tester est mis en suspension bactérienne (réalisée dans 10 ml d'Api médium ou d'eau distillée), puis inoculée dans chaque tube de la galerie en prenant soin de remplir aussi bien le tubes et la cupule du microbiote encadré, quant au tube

souligné remplir juste le tube, et lui rajouter l'huile de paraffine. Les galeries ont été incubées à 37°C.

L'incubation qui a durée 24 à 48h, a entraîné le virage de l'indicateur de pH, qui est dû aux acides organiques produits par le catabolisme des glucides. Des réactifs ont été ensuite rajoutés et laisser incubé 10 min. Une goutte de Chlorure de fer III pour le Tryptophane(TDA), Une goutte de Kovacs pour L'indole(IND), Une goutte de VP1 et VP2 le Pyruvate de sodium(VP) et Une goutte de NIT 1 et NIT 2 pour Nitrates réductases (NO_3^-) Concernant l'api 20NE

Les résultats obtenus (changement de couleur) ont constitués le profil biochimique de la souche testée et ont servi à son identification à l'aide d'un logiciel d'identification apiWeb/ Biomérieux. La lecture des galeries figure en Annexe 04.



Figure 17: Les galeries biochimique :a. Api 20 E/ b. Api 20 NE/ c.Api 50 CH/ d. Api STAPH.

(Originale, 2018)

2.6. Identification moléculaire des bactéries *Wolbachia spp*

Ce genre de bactéries sont intracellulaires et ne poussent pas sur milieu de culture, leurs identification nécessite l'utilisation d'autres techniques telle que la réaction de polymérisation en chaine (PCR).

Huit pools des *P.papatasi* de la région de M'sila ainsi que 08 tubes de BHIB positifs (contenant l'extrait frais du tractus digestif de phlébotomes) (02) échantillons de chaque (*P.longicuspis*, *P.perniciosus*, *P.perfliewi*, *P.papatasi*) de la région de Tizi Ouzou ont été sélectionnés de manière aléatoire pour la détection moléculaire de *Wolbachia spp* par PCR.

Le principe de cette technique est d'amplifier un fragment d'ADN en utilisant des amorces spécifiques de la région d'intérêt. Elle se fait en trois étapes à différentes température : une étape de dénaturation qui induit l'ouverture des deux brins d'ADN suivie par une étape d'hybridation où les amorces W16s F (5'-ATACCTATTCGAAGGGATAG-3') et Amorce W16s R (5'-AGTCTTCGAGTGAAACCAATTC-3') se collent à leurs cibles au niveau de chaque brin puis, une étape d'élongation pour synthétiser les brins d'intérêt.

2.6.1. Extraction et amplification d'ADN

Les extractions d'ADN à partir des phlébotomes ont été réalisées par le kit d'extraction Invitrogen PureLink® Genomic DNA Mini Kit en suivant les recommandations du fabricant. (Figure 18). Huit pools de phlébotomes de M'sila et huit milieux BHBI de la région de Tizi Ouzou contenant l'extrait frais du tube digestif des femelles disséquées ont fait l'objet d'une extraction d'ADN. Après une nuit de lyse cellulaire à 37°C au bain marie, les tubes sont centrifugés et les culots récupérés pour d'autres lavage et centrifugation avec les différents tampons du kit avant la précipitation d'ADN (Annexe 05) et son stockage à -20°C.

Chaque extrait d'ADN est utilisé pour l'amplification d'une région de 438pb correspondante à la région 16s ADNr. Cette région contient un site de restriction qui différencie deux grand groupe de *Wolbachia* A et B fournissant ainsi une confirmation du genre (Werren et al., 1995). L'amplification de la région 16s ADNr est résumée dans le tableau III.

Tableau III: Protocole expérimental de la PCR et le profil thermique.

Solution	Concentration finale	Volume un échantillon	Profil thermique
H ₂ O	/	8 µl	95°C 2 min
Amorce W16s F	0.4 mM	1 µl	95°C 2 min 60°C 1 min } 2X 72°C 1 min 95°C 30 sec 60°C 1 min } 35X 72°C 45 sec 72°C 5 min
Amorce W16s R	0.4 mM	1 µl	
RedTaq Master Mix	/	12.5 µl	
Volume total	/	22.5 µl	

/:

Chaque tube contient au final 22.5 µl de mix et 2.5 µl d'échantillon d'ADN.

2.6.2. Révélation des produits PCR

Les produits d'amplifications ont été révélés par une électrophorèse horizontale sur gel d'agarose 1.5% (Annexe 06). Les bandes d'ADN ont été visualisées grâce à la fluorescence émise par le bromure d'Ethidium (BET) agent intercalant qui se fixe sur l'ADN et ARN sous lumière ultraviolet (UV) du transilluminateur.



Figure 18 : Les étapes de détection moléculaire de *Wolbachia spp* (Originale, 2018).
1 : Préparation du mix. **2** : Rajout du mix aux ADN d'échantillons. **3** : Amplification d'ADN dans un thermocycleur pendant 2h. **4** : dépôt des échantillons dans les puits sur gel d'agarose et Migration pendant 2 heures.

Chapitre III

Résultats et Discussion

Ce chapitre englobe les résultats de la récolte des phlébotomes sur terrain et ceux des techniques d'analyses adoptées au laboratoire ainsi que l'optimisation des cultures bactérienne de microbiote faites sur des *Culex*.

1. Les données météorologiques durant la période de piégeage

Afin de déterminer la période climatique la plus propice au piégeage des phlébotomes, les données météorologiques de la région de Tizi Ouzou ont été collectées chaque semaine de Mai à Juillet 2018. Le climat de la région de Tizi Ouzou durant l'année 2018 a été marqué par un prolongement de la période hivernale jusqu'au mois de Mai qui s'est caractérisé par une variabilité apparente de l'humidité, et une pluviométrie faible. La température maximale a atteint 30°C, les mois de Juin et Juillet ont été distingués par une température élevée et une humidité décroissante correspondante aux pluies faibles (Fig 19).

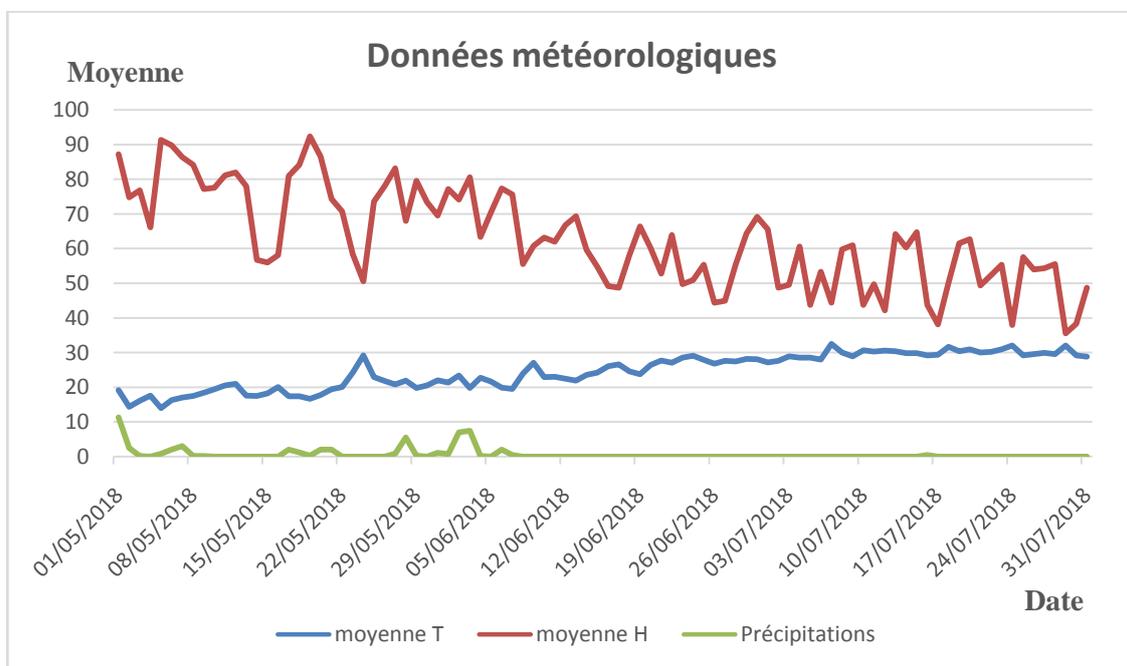


Figure 19 : Données météorologiques de la wilaya de Tizi-Ouzou (2018).

2. Résultats des piégeages des phlébotomes

Au cours des 03 mois de piégeage (Mai – Juillet), nos deux méthodes de capture, à savoir les pièges huilés, et pièges CDC, ont permis la récolte de 596 phlébotomes appartenant à 6 espèces. Ces résultats ont été obtenus suite à 12 nuits de piégeage, réparties en 09 nuits pour le dépôt des pièges huilés et 03 nuits pour le dépôt des pièges lumineux CDC.

Les résultats de l'enquête entomologique sont représentés dans le tableau IV.

Le taux de capture le plus élevé est enregistré à Tizi Ghennif avec 533 spécimens, en 03 nuits de piégeage et ce via les pièges lumineux qui ont été déposés dans des bâtiments d'élevages de bovins. En revanche, les récoltes faites par pièges huilés se sont avérées moins fructueuses.

Tableau IV: Phlébotomes capturés par région et par nuit de piégeage (Piège adhésifs et CDC).

Régions	Période	Nombre de nuits		Nombre de phlébotomes	
		Huilés	CDC	Huilés	CDC
Chef lieu de la Ville de Tizi-Ouzou (ITMA)	Juillet	01	/	05	/
Tizi-Ghennif (Adila)	Mai	03	/	00	/
	Juin	04	/	09	/
	Juillet	02	03	11	533
Boughni	Juin	02	/	00	/
Fréha	Mai	03	/	00	/
Ath Douala	Juin	01	/	00	/
M'sila	Juillet	/	01	/	38
Total		17	03	596	

/ : Piège CDC non déposé.

2.1. Résultats des phlébotomes capturés par pièges adhésifs

Les résultats de l'inventaire des phlébotomes capturés par pièges adhésifs durant les 03 mois de notre étude, sont au total de 25 spécimens dont 20 ont été capturés dans la région de Tizi Ghennif entre les mois de juin et juillet (Figure19).

Nos résultats montrent clairement qu'au niveau de cette région, le mois de Juillet a été le plus fructueux en termes de collecte de phlébotome, avec des périodes de capture beaucoup plus courtes que pour les mois précédents.



Figure 20 : Histogramme des phlébotomes capturés par pièges huilés par nuit de piégeage dans la région de Tizi Ghennif

2.2. Résultats des phlébotomes capturés par pièges lumineux CDC

Nos résultats ont montré que le mois de juillet était le plus fructueux sur les 3 mois de piégeage à Tizi-Ghennif (Adila).

Nombre de phlébotomes

Figure 21 : Histogramme des phlébotomes capturés par période et par région

Les résultats de l'échantillonnage de 596 phlébotomes ont permis de trouver un sexe ratio de la population phlébotomienne qui est au profit des mâles (ratio égal à 1.56), avec une prédominance légère des mâles (fig 22).

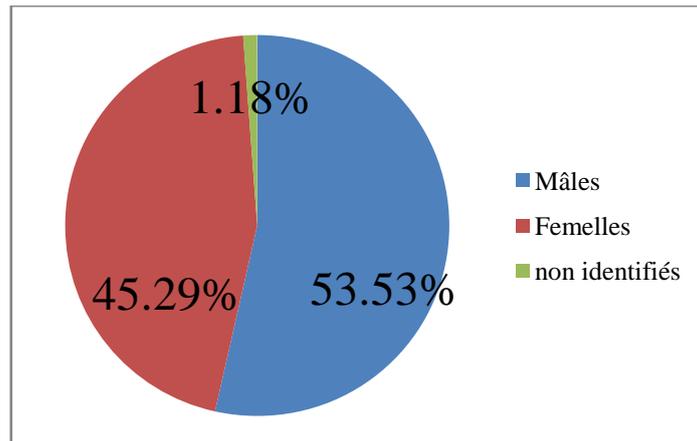


Figure 22: Répartition de l'abondance des phlébotomes (Piège adhésifs et CDC) par sexe.

2.3. Les résultats des espèces phlébotomienne capturées

Au total, six espèces ont été recensées dans la région de Tizi Ouzou (Tizi Ghennif) : *P. longicuspis*, *P. perniciosus*, *P. papatasi*, *P. perfliewi*, *S. minuta* et *P.chadlii* appartenant à deux genres : *Phlebotomus* et *Sergentomyia*. (fig 23).

L'espèce la plus abondante est *P. Perfliewi* constituant (48.15 %) des captures, suivie par *P. perniciosus* (16.33%), *P.papatasi* (12.12) *P. longicuspis* (7.24%), *P.chadlii* (0.67%) et *S. minuta* (0.34%).

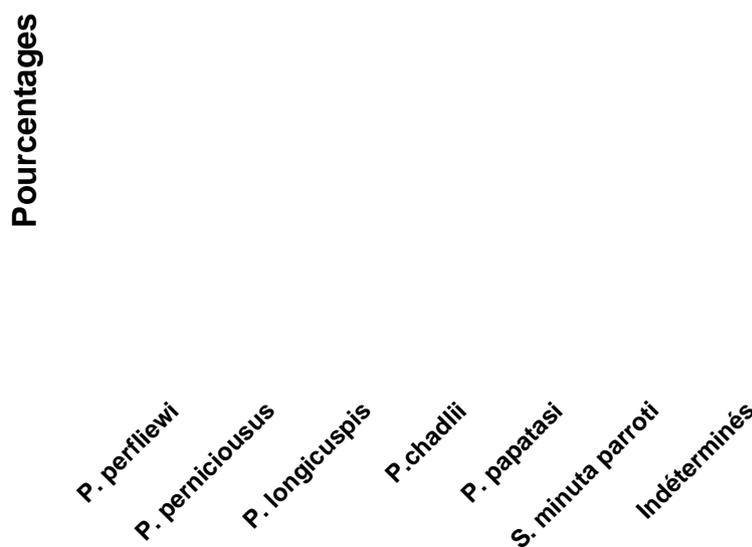


Figure 23: Effectif et abondance des espèces phlébotomienne capturées par pièges huilés et CDC à Tizi Ouzou et M'sila.

3. Résultats de l'étude bactériologique

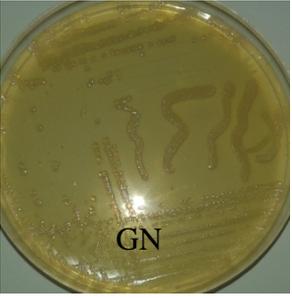
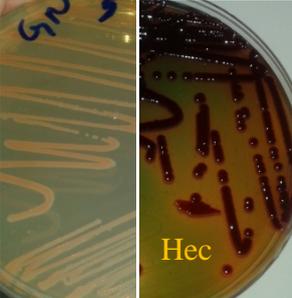
3.1. Résultats de l'optimisation des techniques de culture de microbiote à partir du *Culex*

Afin d'optimiser la technique de dissection et d'ensemencement sur les milieux de cultures, 30 femelles de *Culex pipiens* ont été utilisées. A partir des 30 femelles disséquées, 10 tubes digestifs ont pu être récupérés et mis dans des BHIB. Leur incubation a duré 24h à 37°C.

Nos résultats ont montré que seulement 6 étaient troubles (positifs). Les BHIB positifs ont été ensuite ensemencés chacun sur les milieux Chapman, Hektoen et sur GN, et incubés dans une étuve à 37°C pendant 24 à 48H.

Les résultats des cultures de BHIB sont présentés dans le tableau V. Trois genres de bactéries ont été isolés à partir du tube digestif de *Culex pipiens* il s'agit de *Pantoea* spp, *Serratia* spp, et *Staphylococcus* spp.

Tableau V: Bactéries isolées à partir des *Culex pipiens* et leur Propriétés biochimiques.

N° du tube	Culture	Test de Gram	Test d'oxydase	Indole	Espèce
02		Bacille Gram (-)	(-)	/	<i>Pantoea</i> spp
04					
07					
08					
05		Cocci Gram (-)	(-)	(+)	<i>Serratia</i> spp
06		Grappe de raisin Gram (+)	(-)	(-)	<i>Staphylococcus</i> spp

3.2. Résultats de l'incubation des tubes digestifs des phlébotomes sur les milieux d'isolements

L'ensemble des milieux d'isolement incubés de Tizi Ouzou et M'sila ainsi que les résultats de leurs positivités sont représentés dans le tableau VI.

Sur les quatre milieux de culture bactériens utilisés, le milieu BHIB a donné les meilleurs résultats pour les phlébotomes des deux régions étudiées (fig 24 et 25). L'incubation de 75 BHIB de la région de Tizi Ouzou a constitué un total de 77% d'échantillons positifs. En revanche 84 % ont été obtenus pour la région de M'sila. La gélose nutritive a permis l'obtention d'un résultat important d'échantillons positifs par rapport aux autres milieux, avec 45% concernant Tizi Ouzou, et 80% à M'sila. Quant au milieu Chapman, le même résultat a été obtenu dans les deux régions avec un pourcentage de 33%. Par contre la positivité des échantillons sur Hektoen a été faiblement observée pour la région de Tizi Ouzou où elle constitué 1.7%, mais de façon plus importante dans la deuxième région (37%).

Tableau VI : Résultats de l'incubation des milieux d'isolements.

Milieu	Région			
	Tizi Ouzou		M'sila	
	Nombre d'échantillons incubés	positifs	Nombre d'échantillons incubés	Positifs
BHIB	75	58 (77%)	30	25 (84%)
Hektoen	58	1 (1.7%)	30	11 (37%)
GN	58	26 (45%)	30	24 (80%)
Chapman	58	19 (33%)	30	10 (33%)

BHIB GN
Chapman Hektoen

Figure 24: Résultats des pourcentages de positivités en fonction des milieux d'isolements et des régions de Msila et de Tizi Gheniff.



Figure 25: Aspect général des colonies sur milieux de cultures. **A** : *Bacillus firmus* sur GN / **B** : *Bacillus mycoides* sur GN/ **C** : *Staphylococcus warneri* sur Chapman/ **D** : *Sphingomonas paucimobilis* sur GN. (Originale, 2018)

4. Résultats de l'identification des bactéries composant le microbiote des phlébotomes

4.1. Aspect microscopiques suite à la coloration de Gram

Le but de ce test était porté sur l'indication morphologique des isolats, il a permis la détermination de trois genres ; le genre *Bacillus* qui présente la forme bâtonnet à Gram positif sporulée (Fig 26 A et B), Il a été isolée à partie de toutes les espèces de phlébotomes des deux régions. Le genre *staphylococcus* qui sont des coques à Gram positifs arrondis (Fig 26 C), a été retrouvé à partie des *P.perniciousus*, *P.longicuspis* et *P.papatasi* de Tizi Ouzou . Les bâtonnets en chainettes à Gram négatif (Fig 26 D) ont été observés uniquement chez *P.papatasi* de M'sila.

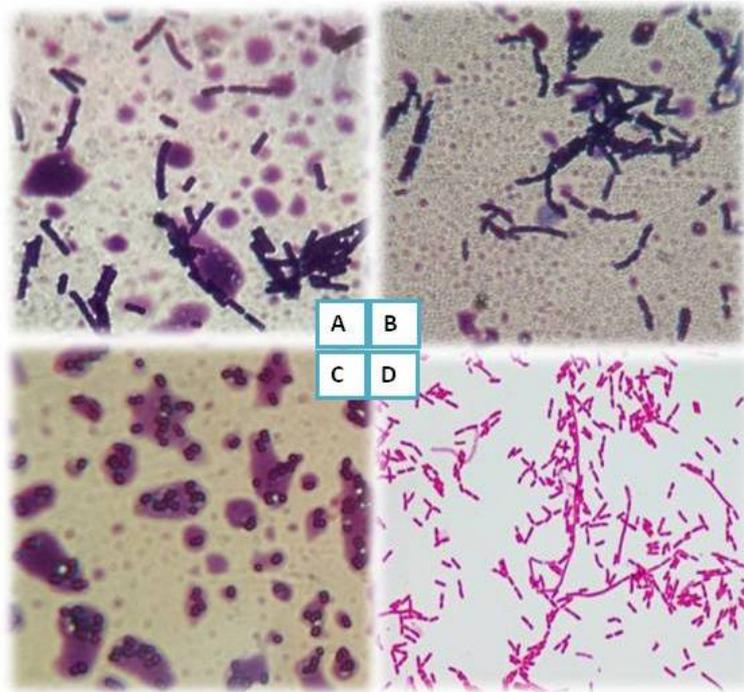


Figure 26: Résultats de la coloration de Gram. : **A** : *Bacillus firmus* G(+)/ **B** : *Bacillus mycoides* G(+)/ **C** : *Staphylococcus warneri* G(+)/ **D** : *Sphingomonas paucimobilis* G(-). (Originale, 2018)

4.2. Résultats de l'identification des galeries biochimiques

4.2.1. Lecture de l'Api 50CH (*Bacillus*)

Afin d'identifier l'espèce de *Bacillus* testée. Les galeries api 50CH ont permis l'étude de la fermentation de 49 sucres. Les réactions positives ont été traduites par le changement de couleur vers le JAUNE du rouge de phénol contenu dans le milieu.

Le profil biochimique obtenu après lecture finale a été identifié à partir du logiciel d'identification apiweb.

Les galeries 50CH ont été utilisées pour 20 isolats de *Bacillus*, un exemple de *Bacillus firmus* et de *Bacillus mycoides* est représenté dans la figure 27.



Figure 27: Résultats de la lecture des galeries Api 50 CH (A : *Bacillus firmus*/ B : *Bacillus mycooides*)

4.2.2. Lecture de la galerie Api 20 E (Complément de Api 50CH)

Les galeries api 20 E ont été utilisées comme compléments des galeries api 50CH, qui sont optionnelles pour le genre *Bacillus*, permettant d'apporter d'autres résultats pour le profil biochimique de la souche étudiée. Les réactions biochimiques ont été identiques dans tous les microtubes (Fig 28), la seule différence entre les deux bactéries réside dans le test de la mise en évidence de Bêta-galactosidase (ONPG) *Bacillus firmus* (-) (incolore) ne possède pas la bêta-galactosidase. *Bacillus mycooides* (+) (jaune) possède la bêta-galactosidase.

Sur les 20 Isolats de *Bacillus*, l'espèce *Bacillus firmus* a été retrouvée chez quatre espèces de phlébotomes, *Bacillus mycooides* chez trois (Voire le Tableau 08).



Figure 28: Résultats de la lecture des galeries Api 20 E (A : *Bacillus firmus*/ B : *Bacillus mycooides*)

4.2.3. Lecture de la galerie API STAPH

Les galeries api STAPH ont été utilisées pour l'identification d'espèces de 05 isolats appartenant au genre *staphylococcus*. Les réactions qui ont été produites pendant la période d'incubation se sont traduites par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les isolats de *staphylococcus* ont été isolés chez *P.perniciousus*, *P.longicuspis* et *P.papatasi* capturées à Tizi Ouzou (Tableau 08).

La révélation des espèces a été obtenue grâce au logiciel d'identification. Ci-dessous un exemple des réactions de *staphylococcus warneri* (Fig29).



Après 24H d'incubation à 37°



Figure 29 : Résultats de galerie Api STAPH. (*Staphylococcus warneri*).

4.2.4. Lecture de la galerie API 20 NE

Suite a la coloration de gram, 06 isolats étaient des bacilles à Gram négatifs, leur identification a nécessité l'utilisation de la galerie api 20NE. Après lecture grâce au logiciel apiweb-Biomérieux l'espèce *Sphingomonas paucimobilis* a été révélée chez *P.papatasi* de M'sila (Tableau 08).



Figure 30: Résultats de galerie Api 20NE (*Sphingomonas paucimobilis*).

4.3. Synthèse des différentes méthodes d'identification du microbiote des phlébotomes de Tizi Ouzou et de M'sila

Les colonies bactériennes isolées dans la présente étude appartiennent à deux embranchements ; Firmicutes (83%) et Proteobacteria (17%).

Bacillus a été le genre le plus commun dans les deux régions, il a été isolé à partir de toutes les espèces de phlébotomes capturées (*P.perfliewi*, *P.perniciosus*, *P.longicuspis* et *P.papatasi*). Les deux espèces de *Bacillus* ont pu être identifiées via des galeries Api 20 E et Api 50 CH. La première est *Bacillus firmus*, qui est une bactérie Gram+ et Oxydase-. L'aspect macroscopique des colonies sur GN apparaît en rhizoïdes de couleur blanche crème. La deuxième espèce est *Bacillus mycoides*, qui est une bactérie Gram +, Catalase + Oxydase -

Staphylococcus warneri a été retrouvé dans le tube digestif de toutes les espèces capturées excepté *P.perfliewi*. (Tableau VII). Une bactérie Gram +, Catalase + et oxydase -. Elle apparaît sur milieu Chapman sous forme sphérique jaunâtre à orangée.

Sphingomonas paucimobilis a été isolée uniquement de *P.papatasi* provenant de M'sila. Elle appartient aux Gram -, Oxydase+ catalase+, sur GN Les colonies sont jaunes pigmentées et sphériques, sur Hektoen. Elles apparaissent de couleur vert bleuté.

Selon les espèces de phlébotomes étudiés, chez *P.perniciosus*, 2 espèces bactériennes ont été isolées pour cette espèce, à savoir *B.mycoides* et *B.firmus* (Fig 31).

Pour *P.longicuspis*, 2 bactéries au total ont été isolées. Il s'agit de *B.mycoides*, et *S.warneri*.

Bacillus mycoides à été fortement retrouvé chez *P.perfliewi*, et une *B.firmus* seulement a été isolée chez cette espèce.

P.papatasi récoltée à Tizi-Ouzou semble moins pathogène la comparant à *P.papatasi* de M'sila. 2 espèces bactériennes ont été isolées pour cette espèce à savoir *B.firmus* et *S.warneri*.

P.papatasi provenant de M'sila était plus potentiellement pathogène, où sur 16 spécimens testés, 7 espèces de *B.firmus*, et 3 *B.mycoides* ont été mis en évidence. Et pour la première fois l'isolement de *Sphingomonas paucimobilis* chez cette espèce uniquement.

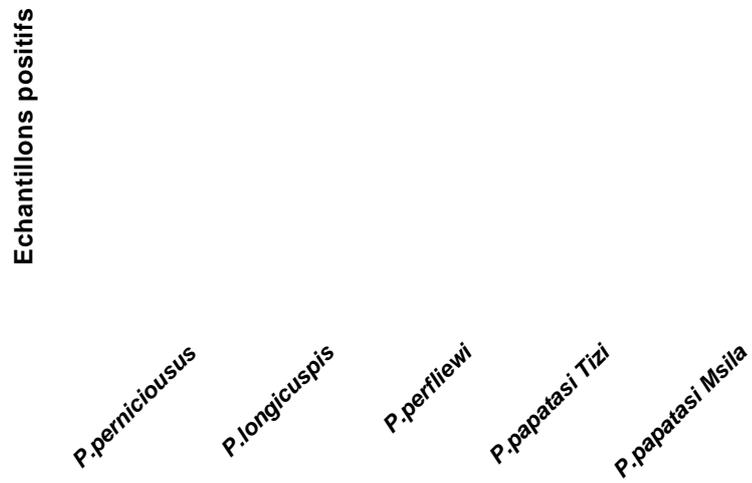


Figure 31 : Résultats des différentes espèces de bactéries isolées en fonction des espèces de phlébotomes à Tizi Ouzou et Msila

Tableaux VII: Résultats d'identification des bactéries par espèce de phlébotome.

Embranchement		Firmicutes			Proteobacteria	Total	
Espèces phlébotomes	Echantillons	<i>Bacillus firmus</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>		
Tizi-Ouzou	<i>P. perniciosus</i>	Ech1	+			02	
		Ech2			+		
		Ech3			+		
	<i>P. longicuspis</i>	Ech4			+	02	
		Ech5			+		
		Ech6		+			
		Ech7		+			
	<i>P. perfliewi</i>	Ech8	+			02	
		Ech9		+			
		Ech10		+			
		Ech11		+			
		Ech12		+			
	<i>P. papatasi</i>	Ech13			+	02	
		Ech14	+				
		Ech15	+				
M'sila	<i>P. papatasi</i>	Ech16	+			03	
		Ech17	+				
		Ech18	+				
		Ech19	+				
		Ech20	+				
		Ech21	+				
		Ech22	+				
		Ech23					+
		Ech24					+
		Ech25					+
		Ech26					+
		Ech27					+
		Ech28					+
		Ech29			+		
		Ech30			+		
		Ech31			+		
Total		11	09	05	06		

5. Résultats de la détection moléculaire des bactéries *Wolbachia* spp

Afin de détecter la présence de *Wolbachia* spp chez les phlébotomes, une PCR a été réalisée sur 16 échantillons, dont 08 échantillons de BHIB contenant l'extrait frais du tube digestifs de phlébotomes de Tizi Ouzou, et 08 pools de phlébotomes *P.papatasi* de M'sila.

Les résultats de la détection moléculaire sont présentés par le profil de migration dans la figure 32, Les BHIB se sont révélés tous négatifs, alors que, les Pools 1, 3, 4, 8, ont été positifs, avec un signal faible pour le n° 7.

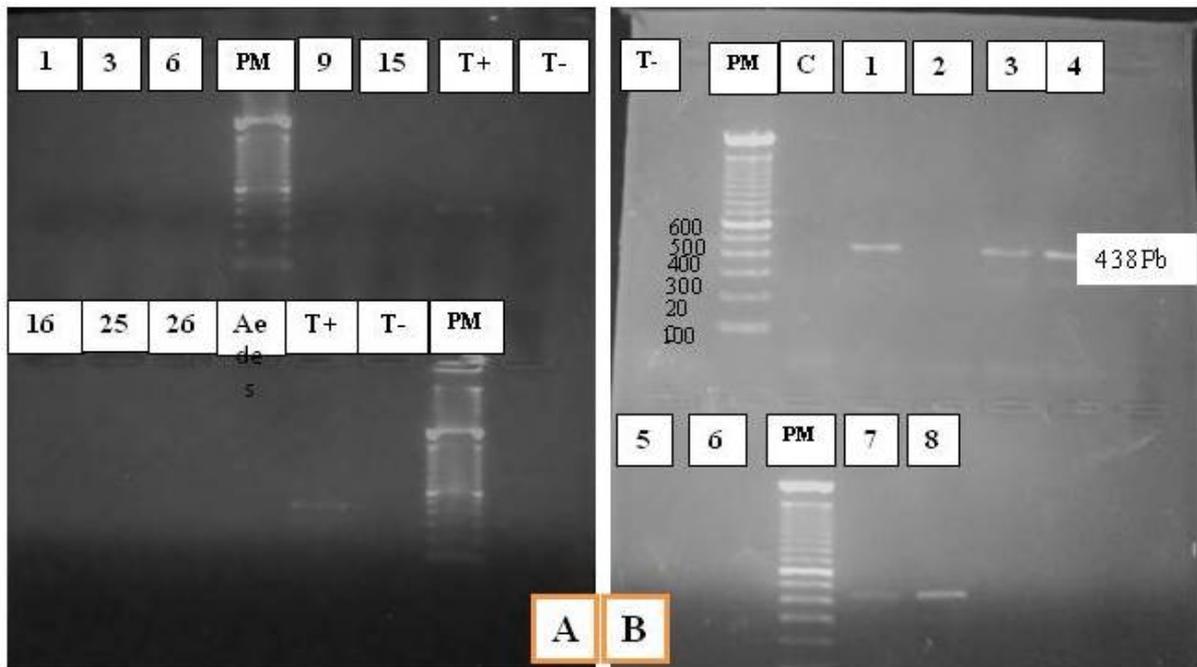


Figure 32: Profil électrophorétique des PCR des *wolbachia* sp, (A : échantillons BHIB de Tizi Ouzou / B : Pools de M'sila (originale, 2018)).

Discussion

La Dépression de Draa El Mizan qui renferme les localités (Draa El Mizan, Boughni, Tizi Gheniff, Ain Zaouia, Mechtras), est connue pour être un foyer très actif de leishmaniose, c'est cette même région qui a fait l'objet de cette étude. Le piégeage s'est fait principalement au niveau de Tizi Gheniff.

L'ensemble des captures réalisées lors de cette étude, nous a permis de retrouver six espèces de phlébotomes, sur les 23 recensées en Algérie (Belazzoug, 1991 ; Berdjane-Brouk, 2011).

C'est avec les pièges lumineux CDC que les récoltes ont été les plus fructueuses, déterminant: *P. perfiliewi*, *P. perniciosus*, *P. longicuspis*, *P.papatasi*, *P. chadlii* et *S. minuta parroti*, les mêmes espèces furent retrouvées par Mouloua et ses collaborateurs en 2017. Une étude antérieure, menée par Harrat et ses collaborateurs a déterminée dix espèces au total dans la région de Draa el Mizan et Boughni (Harrat *et al.*, 2006).

P.perfliewi, vecteur de la LC sporadique (Izri M.A. & Belazzoug S., 1993), a été majoritaire dans les captures, représentant 48.15%. Cela est probablement due au fait que *P. perfiliewi* est une espèce qui s'installe vers la fin du mois de juillet et c'est durant cette période qu'il ya eu la pose des pièges CDC. D'autre part, *P. perniciosus*, vecteur avéré de la LV et de la leishmaniose canine en Afrique du Nord (Izri *et al.*, 1990), a été retrouvé dans ce site de capture occupant la deuxième position au cours de notre étude.

En dépit du statut du phlébotome le plus abondant d'Algérie (vu sa présence dans tout les étages bioclimatiques) (Belazzoug *et al.*, 1982), *Sergentomyia minuta parroti* été très peu observée lors des captures, contrairement a son recensement élevé par Harrat en 2006, représentant un taux de 3071 spécimens dans la région de DEM et Boughni. Cela est probablement du à l'endroit de piégeage qui est en effet des écuries de bovins qui ne sont pas propices a ses exigences trophiques vu qu'elle est inféodée au reptiles.

En 2011, Berdjane-Brouk *et al.*, ont rapporté pour la première fois la présence d'une femelle *P.(Larroussius) chadlii*, capturée à Larba Nath Irathen, Tizi-Ouzou. Le mâle de cette dernière espèce fut déjà retrouvé par Rioux, Juminer et Gibily en 1966. Dans cette présente étude 4 male *P. (Larroussius) chadlii* ont été identifiés.

Il faut toutefois noter que le nombre faible de phlébotome recensés est du au prolongement de la période hivernale cette année qui a influencée leur dynamique saisonnière.

Dès 1929, Adler et Theodor avaient suggéré que la présence des microorganismes dans l'intestin des phlébotomes pouvait avoir un impact sur le développement des *leishmanies*. Dans les années 80' l'équipe de Shleine et ses collaborateurs avaient observés un nombre important de bactéries dans l'intestin des femelles *P.papatasi* capturées. Cependant la composition du microbiote intestinale des phlébotomes a été étudiée un peu plus tard par Dillon *et al.* (in Fraihi *et al.*, 2017).

Dans la nature, les larves de phlébotomes se nourrissent de matière organique en décomposition, les adultes peuvent donc acquérir une partie de leur flore bactérienne au cours de leur développement larvaire. Les adultes mâles et femelles s'alimentent de sucs végétaux

Discussion

et de miellat de puceron. En outre la femelle étant hématophage puise du sang sur différents hôtes pour l'achèvement du cycle gonotrophique (Schlein et *al.*, 1986 in Akhoundi et *al.*, 2012). Par conséquent, on s'attend à ce que l'intestin du phlébotome comprenne une mosaïque de micro-organismes.

L'optimisation des réactions de culture de microbiote ont été faites sur des femelles de *Culex pipiens* d'élevage a révélée trois genres bactériens *Serratia* spp, *Staphylococcus* spp, *Pantoea* spp. Ces genre semblent être retrouvés chez les phlébotomes, (Telleria et *al.*, 2018).

Sur les 596 phlébotomes capturés au cours de notre étude, 105 tubes digestifs de Phlébotomes femelles ont été mis en culture sur BHIB. Sur les 75 BHIB positifs, 58 ont étéensemencés sur GN, Chapman et Hektoen. Les différents isolats obtenus ont été identifiés grâce aux différents tests bactériologiques et biochimiques, déterminant ainsi cinq espèces bactériennes du tractus digestif de *P.perfliewi*, *P.perniciousus*, *P.longicuspis* et *P.papatasi*. Les galeries biochimiques ont permis l'identification des genres *Bacillus*, *staphylococcus*. Le genre *Wolbachia* spp a été détecté par voie moléculaire (PCR). Le fait intéressant, c'est l'isolement de *Sphingomonas* pour la première fois à partir des Phlébotomes.

Bacillus étant le genre le plus isolé dans cette étude, cela correspond aux autres études menées sur les phlébotomes de l'ancien monde (Hillesland et *al.*, 2008 ; Akhoundi et *al.*, 2012 ; Fraihi et *al.*, 2017, Karakuş et *al.*, 2017).

Bacillus firmus a été isolée de manière importante chez *P.papatasi* de M'sila, et faiblement à partir de *P.papatasi*, *P.perniciousus* et *P.perfliewi* de Tizi Ouzou. Cette espèce fut signalée chez *P.papatasi* par Karakuş et *al.*, en 2017. *B. firmus* n'est pas pathogène pour l'homme et pour l'animale (Kozáková et *al.*, 2002).

D'autre part *Bacillus mycoides* à été isolée chez *P.perfliewi* et *P.longicuspis* dans cette présente étude, et chez *P. argentipes* par (Hillesland et *al.*, 2008 ; Karakuş et *al.*, 2017), d'après Woodley et Park, (2013) cette bactérie est retrouvée dans le sol et l'eau, en effet il a été démontré que *B. mycoides* était un agent pathogène responsable de lésions et de nécroses musculaires chez les poissons-chats d'Amérique (Goodwin, 1994). Son isolement à partir des phlébotomes est peut être du a son acquisition durant les stades juvéniles sous terrains.

Staphylococcus warneri a été isolée dans cette étude chez *P.papatasi* provenant de M'sila et chez *P.perniciousus* de la région de Tizi Ouzou. Cette espèce fut retrouvée par Fraihi et ses collègues en 2017 dans *P.papatasi* et *P.chinensis*. Il s'agit d'un organisme commensal commun qui fait partie de la flore cutanée chez l'homme et l'animal. Elle provoque rarement des maladies, mais peut occasionnellement causer une infection (Campoccia et *al.*, 2010). Sa présence chez le phlébotome est peut être liée a sa prise de sang sur les téguments de l'hôte.

Sphingomonas paucimobilis, qui n'a jamais été signalée auparavant à partir de phlébotomes a été isolée dans la présente étude. Cependant, en 2011 Dinparast et ses collaborateurs, ont retrouvés cette dernière chez *Anopheles stephensi*. Isolée à partir du sol, des plantes et des échantillons cliniques, sa présence dans le tractus digestif des phlébotomes est peut être liée

Discussion

soit à leur mode de nutrition puisqu'ils se nourrissent de sucres végétaux, soit à son acquisition durant les stades larvaires. *S.paucimobilis* peut causer des infections nosocomiales chez l'homme et les animaux (bactériémie, infections du tractus urinaire, pneumonie, et infections des plaies) (Ryan et Adley, 2010 ; Makanera et al., 2017).

Wolbachia spp est un groupe de bactéries héréditaires cytoplasmiques communes et répandues, retrouvées dans les tissus reproducteurs des arthropodes, y compris les phlébotomes (Akhoundi et al., 2012). Elles provoquent des altérations dans la reproduction, notamment la parthénogenèse, incluant l'incompatibilité dans la reproduction, la féminisation et la mort des mâles (Werren et al., 2000).

Dans la présente étude, 5/8 pools de *P.papatasi* de M'sila se sont avérés positifs en *Wolbachia spp* par détection moléculaire.

Sur les 31 espèces bactérienne isolées au cours de ce travail, 25 étaient des Gram + et 6 appartenaient aux Gram-, alors que plusieurs études ont rapportées une prévalence élevée de bactéries Gram négatif par rapport aux Gram positif dans l'intestin des insectes vecteurs (Akhoundi et al., 2012). Ceci n'a pas pu être démontré, car nous n'avons pas pu procéder à l'identification de toutes les souches bactérienne isolées.

Récemment plusieurs publications ont été dédiées à l'étude de la flore intestinale, pour développer de nouvelles stratégies pour contrôler la transmission de leishmaniose, tel la paratransgenèse, qui consiste à manipuler génétiquement des bactéries symbiotiques pour exprimer une molécule antiparasitaire, puis la réintroduire dans l'intestin du phlébotome, ce qui permet ainsi de réduire la transmission de l'agent pathogène (Chavshin et al., 2013; Fraihi et al., 2017). Cette méthode a été appliquée avec succès sur quelques insectes vecteurs, tels que *Rhodnius prolixus*, vecteur de *Trypanosoma cruzi*, (Beard et al., 2001), *Glossina morsitans*, vecteur de la maladie du sommeil africaine (Aksoy et al., 2008, Pontes et Dale 2011) et *Anopheles stephensi*, un vecteur du paludisme en Asie (Wang et al., 2012) in (Ravasan et al., 2014).

En 2012, Mukhopadhyay et ses collaborateurs ont réussi à introduire *Bacillus flexus*, de *B. pumilus*, de *B. licheniformis*, de *B. megaterium* et de *B. subtilis* en tant qu'espèces candidates la paratransgenèse, mais actuellement seule (*Bacillus subtilis*) est retenue, isolée de (*P. papatasi*, *P. halepensis*, et *P. perniciosus*), est proposée comme candidat possible pour cette approche paratransgénique. Facile à cultiver et à effectuer des manipulations génétiques. Néanmoins Son utilisation pour le contrôle de *Leishmania* peut être remise en cause par sa capacité à établir des colonies à long terme dans les intestins de divers phlébotomes

Conclusion

Conclusion

En piquant aussi bien l'Homme que l'animal, les phlébotomes permettent la prolifération et la circulation de nombreux agents pathogènes. Dans la majorité des cas, ces agents provoquent des zoonoses qui évoluent sous forme d'enzooties.

L'Algérie est l'un des pays les plus endémiques de la leishmaniose cutanée dans le Monde et où la maladie est un important problème de santé publique. L'un des principaux moyens de lutte contre cette zoonose est la lutte anti vectorielle. Parmi les créneaux prometteurs, l'étude du microbiote intestinal des phlébotomes suscite un grand intérêt dans la communauté scientifique, car il s'avère que certaines bactéries ont la capacité de rentrer en compétition avec le parasite et d'éliminer l'infection leishmanienne.

A travers ce premier travail original sur le microbiote des phlébotomes dans la région de Tizi Ouzou et de Msila, nous avons pour objectif l'identification de la flore bactérienne des phlébotomes d'Algérie. Notre travail constitue dans ce domaine un premier essai d'isoler et d'identifier les germes susceptibles d'être rencontrés dans le tube digestif des phlébotomes et de détecter une éventuelle pathogénicité vis-à-vis de l'homme.

Dans un premier temps, l'enquête entomologique a permis de retrouver six espèces de phlébotomes, dont trois majoritaires. *P.perfliewi* occupant la première position, suivi de *P.perniciosus* et de *P.longicuspis*. Ces espèces sont prouvées comme étant vectrices de leishmaniose. En revanche, *S.minuta parroti* était peu abondante, dans cette étude.

Dans un deuxième temps, nous avons identifié cinq espèces bactériennes isolées à partir des microbiotes des phlébotomes de Tizi Ouzou et M'sila ; *Bacillus firmus*, *Bacillus mycoides*, *Staphylococcus wernerii*, *Sphingomonas paucimobilis*, et *Wolbachia spp*.

Fait intéressant, *Sphingomonas paucimobilis* a été isolée pour la première à partir de phlébotomes, bien qu'elle ait été auparavant retrouvée chez *Anopheles stephensi*. C'est une bactérie gram négative liée au sol et à l'eau et qui peut causer des maladies nosocomiales.

Wolbachia spp une bactérie retrouvée dans les tissus reproducteurs des arthropodes, et qui entraîne des altérations notamment la féminisation des mâles et leur mort. Sa détection moléculaire s'est révélée positive dans 5 pools *P.papatasi* testés dans notre étude.

Peu d'études ont été menées sur la diversité bactérienne des phlébotomes. Nous avons tenté à travers cette étude d'accroître nos connaissances sur la composition du microbiote intestinal des phlébotomes en Algérie. Le but étant de mieux comprendre et d'élucider le rôle spécifique des bactéries dans le processus de modulation des fonctions du vecteur, le cycle de vie du parasite ou éventuellement les maladies engendrées pour l'hôte.

L'information compilée dans ce travail révèle qu'il existe une relation complexe entre le phlébotome, *Leishmania* et le microbiote commensal. Une meilleure compréhension de la relation et du mécanisme qui la sous-tendait pourrait permettre d'identifier des cibles pour l'élaboration de stratégies visant à contrôler la capacité de la mouche du sable à transmettre la leishmaniose à l'homme.

**Références
bibliographiques**

A

Abonnenc E. (1972) : *Les phlébotomes de la région Ethiopienne (Diptera, Psychodidae)*. Ed. Office de la Recherche Scientifique et Technique d'Outre-Mer (O.R.S.T.M.), Paris, France. 285p.

Abonnenc E., Leger N. (1976) : *Sur une classification rationnelle des Diptères Phlebotomidae*. ORSTOM, Ent. Sér. Méd. Parasitol., 289p.

Akhoundi M., Kuhls K., Cannet A, VotyÂpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D. (2016): *A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies*. PLoS Negl Trop Dis. 10(3).

Akhoundi A., Bakhtiari R., Guillard T., Baghaei A., Tolouei R., Sereno D., Toubas D., Depaquit J, Abyaneh MR. (2012) : *Diversity of the bacterial and fungal microflora from the midgut and cuticle of Phlebotomine sand flies collected in North-Western Iran*. PloS ONE. 7:11.

Alkan C., Allel-Ikhlef AB., Alwassouf S. (2015): *Vrus isolation: genetic characterisation and seroprevalence of Toscana virus in Algeria*. *Clin Microbiol Infect*; 21(11): 1040-2169.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team, (2012): *Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence*. PLoS One;7(5).

Ayhan N, Sherifi K, Taraku A, Berxholi K and Charrel RN (2017): *High rates of neutralizing antibodies to Toscana and Sandfly Fever Sicilian viruses in Livestock, Kosovo*. *Emerging Infectious Diseases*; 23(6), 989–992.

Azambuja P, Garcia ES and Ratcliffe NA (2005) *Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors*. *Trends in Parasitology* 21, 568–572.

B

BA Yamar (1999). *Phlébotomes du Sénégal : dynamique des populations de trois régions biogéographiques : rôle dans la transmission des arbovirus*. Dakar : ORSTOM, 155 p. multigr.Th. : Biol.Animale, UCAD.

Bates P.A. (2007): *Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies*. *Int J Parasitol*; 37(10-3): 1097–1106.

Références bibliographiques

- Battisti JM., avocat PG. et Minnick MF. (2015) : Colonisation des *phlébotomes* *Lutzomyia verrucarum* et *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) par *Bartonella bacilliformis*, l'agent étiologique de la maladie de Carrion. *Maladies tropicales négligées de Plos* 9(10): e0004128.
- Benarab DJ. Et Dif S., (2015) : *Revue bibliographique sur les phlébotomes (Diptera : Psychodidae) et leur rôle dans la transmission de la leishmaniose. Memoir de fin d'étude.* Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie. 35p.
- Berdjane-Brouk Z., Kone A.K., Djimde A.A., Charrel R.N., Ravel C., Delaunay P., Giudice P., Diarra A.Z., Doumbo S., Goita S., Thera M.A., Depaquit J., Marty P., Doumbo O.K. et Izri A. (2012) : *First Detection of Leishmania major DNA in Sergentomyia (Spelaeomyia) darlingi from Cutaneous Leishmaniasis Foci in Mali.* PLUS ONE ; 7: 1.
- Belazzoug S.,(1991): *The sand flies of Algeria. Parassitologia.* Parassitologia.33 (Suppl.), 85–87.
- Berchi S., (1990) : *Ecologie des oglébotomes (Diptera, Psychodidae) de l'Est algérien.* Mém. Mag. Ent. Appl. Univ. Constantine, 116p.
- Boudrissa A., Harrat Z., Cherif K., Benthamienne et Belkaid. (2006) : *Leishmaniose cutanéozoonotique et facteurs de risque (Cas du foyer Chott El Hodna),* Séminaire de formation sur leishmaniose. Ecole de formation para-médicale, Biskra. Institut Pasteur d'Algérie, Agence satellitaire Algérienne. Université Mohamed Boudiaf M'sila. Algérie.
- Boulkenafet F. (2006) : *Contribution à l'étude de la biodiversité des phlébotomes (Diptera : Psychodidae) et appréciation de la faune Culicidienne (Diptera : Culicidae) dans la région de Skikda. Mémoire de Magistère.* Université de Constantine, Algérie.191p.
- Boulouis H.J., Marignac G., Haddad N., Maillard R. et Chomel B. (2008) : *Les animaux réservoirs et victimes des Bartonella.* *Bull. de l'académie Vétérinaire de France.* Tome 16 : p 211-219.
- Bounamouss A. (2010) : *Biosystématique et caractérisation par la biologie moléculaire des phlébotomes dans l'Est Algérien.* Thèse de doctorat. Université Mentouri. Constantine, Algérie. 304 p.
- Boussaa S. (2008) : *Épidémiologie des leishmanioses dans la région de Marrakech, Maroc Effet de l'urbanisation sur la répartition spatio-temporelle des phlébotomes et caractérisation*

moléculaire de leurs populations. Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur. Strasbourg I, France. 181 p.

Burcelin, R., S. Nicolas, et V. Blasco-Baque. (2016) : *Microbiotes et maladies métaboliques - De nouveaux concepts pour de nouvelles stratégies thérapeutiques*. médecine/sciences ; 32 (11): 952-60.

C

Caragata EP and Walker T (2012) Using bacteria to treat diseases. *Expert Opinion on Biological Therapy*; 12, 701–712.

Carré N., Collot M., Guillard P., Horellou M., Gangneux J.P. (2010) : *La leishmaniose viscérale*. *Journal de Pharmacie Clinique* ; 29.3.

Cameron MM, Milligan PJ, Llanos-Cuentas A and Davies CR, (1995): *An association between phlebotomine sandflies and aphids in the Peruvian Andes*. *Medical and Veterinary Entomology*; 9, 127–132.

Campoccia D., Montanaro L., L., Corazzari, Poggio, Francesco, Alessandra Maso, Valter Pirin, Ravaioli S., Cangini I, Speciale P., et Arciola CR. (2010) : *Characterization of 26 Staphylococcus warneri isolates from orthopedic infections*. *Int J Artif Organs* ; 33 (9): 575-581.

Chavshin A. R., Oshaghi M. A., Vatandoost H., Pourmand M. R., Raeisi A., Enayati A. A., et al. (2012). *Identification of bacterial microflora in the midgut of the larvae and adult of wild caught Anopheles stephensi: a step toward finding suitable paratransgenesis candidates*. *Acta Trop* ; 121:129–134.

Cohnstaedt LW, Beati L, Caceres AG, Ferro C and Munstermann LE (2011): *Phylogenetics of the phlebotomine sand fly group Verrucarum (Diptera: Psychodidae: Lutzomyia)*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 84, 913–922.

Coon KL, Vogel KJ, Brown MR and Strand MR (2014) Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Molecular Ecology*; 23(11): 2727–2739.

Coutinho-Abreu IV, Zhu KY and Ramalho-Ortigao M (2010): *Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: current status and future challenges*. *Parasitology International* 59, 1–8.

D

Dedet J.P. (2009) : *Leishmanies, leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique*. *Maladies infectieuses*. 8-506-A-10. 14p.

Références bibliographiques

- Dedet J.P. (1999) : *Les leishmanioses*. Collection Méd. Trop. Ed. Ellipses, Paris, France. 249p.
- Dedet J.P., Addadi K. et Belazzoug S. (1984) : Les phlébotomes (Diptera, Psychodidae) d'Algérie. *Ent. Méd. et Parasitol* ;22(2,) 1984p : 99-127.
- Dedet J.P., Abbadi K. et Lannuzel B. (1977): Épidémiologie des leishmanioses en Algérie. La leishmaniose viscérale dans le foyer de Grande Kabylie. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 70 : p 250-265.
- Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry PE and Peyrefitte C (2010) : *Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review*. *Euro Surveill*; 15(10).
- Depaquit J., Ferté H., Léger N., Lefranc F., Alves-Pires C., Hanafi H., Maroli M., Morillas-Marquez F., Rioux J.A., Svobodova M. et Volf P. (2002) : *ITS2 sequences heterogeneity in Phlebotomus sergenti and Phlebotomus similis (Diptera, Psychodidae): Possible consequences in their ability to transmit Leishmania tropica*. *Int. J. Parasitol* ; 32: p 1123-1131.
- Depaquit J. et Léger N. (1999) : *Les phlébotomes*. In : Dedet J.P *les leishmanioses* Ed. Ellipses.249 : p 63-70.
- Depaquit J., Léger N. et Killick-Kendrick R. (1998) : Description de *Phlebotomus (Paraphlebotomus) riouxi* n. sp. (Diptera: Psychodidae) d'Afrique de Nord. *Parasite* ; 5: p 151-158.
- Dey R, Joshi AB, Oliveira F, Pereira L, Guimaraes-Costa AB, Serafim TD, de Castro W, Coutinho-Abreu IV, Bhattacharya P, Townsend S, Aslan H, Perkins A, Karmakar S, Ismail N, Karetnick M, Meneses C, Duncan R, Nakhasi HL, Valenzuela JG. and Kamhawi S. (2018) : Gut microbes egested during bites of infected sand flies augment severity of leishmaniasis via inflammasome-derived IL-1beta. *Cell Host & Microbe*; 23: 134–143.
- Diaz-Albiter H, Mitford R, Genta FA, Sant'Anna MR and Dillon RJ (2011) Reactive oxygen species scavenging by catalase is important for female *Lutzomyia longipalpis* fecundity and mortality. *PLoS ONE*; 6.
- Dillon RJ and Dillon VM (2004): The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology*; 49: 71–92

Références bibliographiques

Dinparast Djadid N., Jazayeri H., Raz A., Favia G., Ricci I., Zakeri S. (2011) : *Identification of the midgut microbiota of An. stephensi and An. maculipennis for their application as a paratransgenic tool against malaria*. PLoS One. 6(12).

Dolmatova A.V. et Demina N.A. (1971): *Les phlébotomes (phlebotorninae) et les maladies qu'ils transmettent*. Initiations-Documentation-Techniques N° 18. O. R. S. T. O. M. Paris, France. 168p.

F

Frahtia-Benotmane k. (2015) : *Détection moléculaire des leishmanies à partir du genre phlebotomus (Diptera : Psychodidae) : Tendances vers la régression de la leishmaniose à Constantine*. Thèse de Doctorat. Université Mentouri. Constantine, Algérie. 141p.

G

Goodwin A. E., Spencer Roy J., John M. Grizzle Jr. Terrell Goldsby M. (1994): *Bacillus mycoides: a bacterial pathogen of channel catfish*;18: 173-179.

H

Harrat Z. (2006) : *La Leishmaniose canine en Algérie. Analyse épizootologique, écologique et étude du parasite*. Thèse de doctorat soutenue en science vétérinaire. Université d'El Taref. Algérie.158p.

Harrat Z., Pralong F., Belazzoug S., Dereure J., Deniau M., Rioux J.A., Belkaid M. et Dedet J.P. (1996): *Leishmania infantum and Leishmania major in Algeria*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* ; 90(6): p 625-629.

Harrat Z., Hamrioui B., Belkaïd M. et Tabet-Derraz O. (1995): Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie. *Bull. Soc. Pathol.Exot* ; 88: p 180-184.

Harrat Z., Izerouel S., Belkaid M. et Tabet-Derraz O. (1993) : *Fluctuations saisonnières des Phlébotomes de la région d'Alger et sa banlieue*. *Arch. Inst. Algérie* ; T:59, 245-255

Hassan MI, Al-Sawaf BM, Fouda MA, Al-Hosry S, Hammad KM. (2014): *A recent evaluation of the sandfly, Phlebotomus papatasi midgut symbiotic bacteria effect on the survivorship of Leishmania major*. *J Anc Dis Prev Rem*.2 Suppl 1:110.

Hillesland H, Read A, Subhadra B, Hurwitz I, McKelvey R, Ghosh K, Das P, Durvasula R. (2008): Identification of aerobic gut bacteria from the Kala Azar vector, *Phlebotomus*

argentipes: A platform for potential paratransgenic manipulation of sand flies. *Am J Trop Med Hyg.*79:881-86.

Hegde S., Rasgon JL., and Hughes GL. (2015): The microbiome modulates arbovirus transmission in mosquitoes. *Current Opinion in Virology*; 15, 97–102.

Hurwitz I, Fieck A, Read A, Hillesland H, Klein N, Kang A and Durvasula R (2011): *Paratransgenic control of vector borne diseases*. *International Journal of Biological Sciences* 7, 1334–1344.

I

Izri A., Temmam S., Moureau G., Hamrioui B., de Lamballerie X., Charrel RN. (2008) : Sandfly fever Sicilian virus, Algeria. *Emerg Infect Dis*; 14: 795-7.

Izri A., Depaquit J. et Parola P. (2006) : Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes autour du bassin méditerranéen. *Med. Trop.* 66:429-35.

Izri M.A., Marty P., Fauran P., Le Fichoux Y., Rousset J., (1994) : *Phlebotomus Perfliewi Parrot, 1930 (Diptera : Psychodidae) dans le Sud-Est de la France*. *Parasite* 1 : 286.

Izri M.A. & Belazzoug S. (1993): *Phlebotomus (Larroussius) perfliewi. Naturally infected with dermatropic Leishmania infantum at Tenes, Algeria*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*,87, 399

Izri M.A., Belazzoug S., Boudjebba Y., Dereure J., Pratlong S., Delalbre-Belmonte A., Rioux J.A. (1990) : *Laishmania infantum MON-1 isolé de Phlébotomus perniciosus , en Kabylie (Algérie)*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* ; 65(3) : 151-152pp.

J

Joshi D, Pan X, McFadden MJ, Bevins D, Liang X, Lu P, Thiem S and Xi Z (2017): The maternally inheritable *Wolbachia* wAlbB induces refractoriness to *Plasmodium berghei* in *Anopheles stephensi*. *Frontiers in Microbiology* 8, 366.

K

Khemmar S. et Silem D. (2017): *La séroprévalence et la détection des virus transmis par les phlébotomes à Ouacif et Ouadhia .Mémor de fin d'étude*. Université Mouloud Mammeri.Tizi-Ouzou, Algérie. 30p.

Références bibliographiques

Killick-kendrick R., Killick-kendrick M. (1999). Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. *Canine leishmaniasis an update*. p26-32.

Killick-Kendrick R. (1990): Phlebotominae vectors of leishmaniasis:.. *Med. Vet. Entomol.*, 4 : p 1-24.

Killick-Kendrick R ; Wilkes T ; Bailly M ; Bailly I; Righton LA. (1986): *Preliminary field observations on the flight speed of a Phlebotomine sand fly*. *Trans R Soci Trop Med Hyg* 80: 138–142.

Karakuş M., Burçin Karabey, Şaban Orçun Kalkan, Güven Özdemir, Gizem Oğuz, Özge Erişöz Kasap, Bülent Alten, Seray Töz et Yusuf Özbel, (2017) : *Midgut Bacterial Diversity of Wild Populations of Phlebotomus (P.) papatasi, the Vector of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) in Turkey*. *Scientific Reports*.vol 7: 14812.

Kozáková H., Mlcková P., Kolínská J., Cechová D, Stěpánková R., Reháková Z., Prokesová L. (2002): Differential effect of *Bacillus firmus* on immune response and enterocyte brush border enzyme levels in BALB/c and B10.BR mice. *Folia Microbiol (Praha)*. ;47(6):759-65.

L

Lambrechts L, Ferguson NM, Harris E, Holmes EC, McGraw EA, O'Neill SL, Ooi EE, Ritchie SA, Ryan PA, Scott TW, Simmons CP, Weaver SC. (2015): *Assessing the epidemiological effect of wolbachia for dengue control*. *Lancet Infect Dis*;15(7):862-6.

Léger N. et Depaquit J. (2002) : Systématique et biogéographie des phlébotomes (Diptera, Psychodidae). *Ann. Soc. Entomol*;38 (1-2):p 163-175.

Léger N. et Depaquit J. (2001) : Les phlébotomes et leur rôle dans la transmission des leishmanioses. *Fr. Labo* ; 338 : p 41-48.

Lewis D.J., Young D.G., Fairchild G.B. et Minter D.M.(1977): *Proposals for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae)*. *Syst. Ent.* 2: p 319-332.

Louis C. (2009) : *La leishmaniose canine : ce que doit savoir le pharmacien d'officine*. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Nancy I. France. 108p.

Lewis D.J. (1982): A taxonomic review of genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bull. Brit. Mus.Nat. Hist. Ent.*, 4: P 121-209.

Lewis D.J. (1973): *Phlebotominae and Psychodidae (sand-flies and moth-flies in insects and other arthropods of medical importance*. Ed. Kenneth G. V. Smith, London, Angleterre; p 155-179.

M

Maroli M, Feliciangeli MD, Bichau L, Charrel RN, Gradoni L. (2013): *Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern*. *Med Vet Entomol*; 27:123-47.

Maleki-Ravasan N, Oshaghi MA, Hajikhani S, Saeidi Z, Akhavan AA, Gerami- Shoar M, et al., (2014) : *Aerobic microbial community of insectary population of Phlebotomus papatasi*. *J Arthropod Borne Dis*.8 Suppl 1:69–81.

Makanera A., Conde M., Mamadou Alpha Diallo, Daouda Camara, Conde M., AO., Barry, Tiguidanké Diakite. (2017) : *Profil de sensibilite des souches de sphingomonas paucimobilis isolees de divers produits pathologiques a l'hopital de l'amitie sino-guineenne kipe/ conakry (guinee)*. *CAMES* ; 5(1).

McCarthy C.B. ; Diambra LA ; Rivera Pomar R.V. (2011): *Metagenomic Analysis of Taxa Associated with Lutzomyia longipalpis, Vector of Visceral Leishmaniasis, Using an Unbiased High-Throughput Approach*. *PLoS Negl Trop Dis* 5: 1–10.

Moriconi M., Rugna G., Calzolari M., Bellini R., Albieri A, Angelini P., Cagarelli R., Landini MP., Charrel RN. and Varani S. (2017): *Phlebotomine sand fly-borne pathogens in the Mediterranean Basin: human leishmaniasis and phlebovirus infections*. *Plos Neglected Tropical Diseases*; 11(8).

Michon A.L., Dubreuil L., Marchandin H. (2014) : Bactéries anaérobies : généralités. *Biologie Médical. Biologie Médicale*. (14)

Moureau G., Bichaud L., Salez N., Ninove L., Hamrioui B., Belazzoug S. (2010) : *Molecular and serological evidence for the presence of novel phleboviruses in sandflies from Northern Algeria*. *Open Virol J*; 4: 15-21.

Moulahem T., Fendri A.H., Harrat Z., Benmezzad A., Aissaoui K., Ahraou S. et Addadi K. (1998) : *Contribution à l'étude des phlébotomes de Constantine : espèces capturées dans un appartement urbain*. Courte note n° 1952. " Ent. méd.

Références bibliographiques

Mouloua A., Boubidi S.C., Bouiba L., Mezai G., Madiou M., Harrat Z. (2017) : Impact environnemental sur la répartition des leishmanioses dans le foyer de Tizi-Ouzou (Algérie). *Revue Méd. Vét.*, 168, 10-12, 252-261.

Mouloua A. (2014) : *Etude éco-épidémiologique de la leishmaniose canine en Kabylie*. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie. 267p.

Mukhopadhyay J, Braig HR, Rowton ED, Ghosh K. (2012): Naturally occurring culturable aerobic gut flora of adult *Phlebotomus papatasi*, vector of *Leishmania major* in the Old World. PLoS ONE. 7.

N

Niang A-A., Geoffroy B., Angel G., Trouillet J., Killik-Kendrick R., Hervy J-P. et Brunhes J. (2000) : *Les phlébotomes de l'Afrique de l'Ouest*. Logiciel d'identification et d'enseignement, IRD édition.

O

O.M.S. (2014) : Leishmaniose. Aide-mémoire N°375. Janvier 2014.

P

Parrot L. et Picheyre R. (1941) : *Notes sur les phlébotomes, Phlébotomes du Hogar*. Arch. Inst. Past. Alger; 4: p 441-442.

Pesson B., Ready J.S., Benabdennbi I., Martin-Sanchez J., Esseghir S., Cadi-Soussi M., Morillas-Maequez F. et Ready P.D. (2004): *Sandflies of the Phlebotomus perniciosus complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of P. longicuspis in the Moroccan Rif*. *Med. Vet. Ent* ; 8: p 25-37.

Peterkova-Koci K, Robles-Murguia M, Ramalho-Ortigao M and Zurek L (2012) Significance of bacteria in oviposition and larval development of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasites and Vectors* 5, 145.

Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L., Woolverton, C. J. & Prescott, L. M. (2013): *Microbiologie*. De Boeck 4 ème edition.

R

Rodhain F. et Perez C. (1985) : *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire*. Ed. Maloine. Paris, France. Chapitre 5. p 157-175.

Rousset J.J. (1995) : *Maladies parasitaires*. Ed. Masson. Paris, France. 192p.

Ryan MP., Adley CC. (2010): *Sphingomonas paucimobilis*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. *J Hosp Infect.*;75(3):153-7.

S

Sangare I., Gantier J.C., Koalaga G., Deniau M., Ouari A. et Guiguemdé R.T. (2009) : *Sandflies of the south part of Ouagadougou City, Burkina Faso*. P 16: p 231-233.

Schlein Y. (1993): Leishmania and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol.Today*.9: 255-258.

Schlein Y, Polacheck I and Yuval B (1985) Mycoses, bacterial infections and antibacterial activity in sandflies (Psychodidae) and their possible role in the transmission of leishmaniasis. *Parasitology* 90(Pt 1), 57–66.

Seblova V, Oury B, Eddaikra N, Aït-Oudhia K, Pratlong F, Gazanion E, Maïa C, Volf P, Sereno D. (2014): Transmission potential of antimony-resistant *Leishmania* field isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:6273-76.

Sereno D, Maia C, Aït-Oudhia K. (2012): Antimony resistance and environment: Elusive links to explore during *Leishmania* life cycle. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2:200-03.

T

Tesh RB., Saidi S., Gajdamovic SJ., Rodhain F., Vesenjok-Hirjan J. (1976): Serological studies on epidemiology of sandfly fever in the Old World. *Bull.World.Health.Organ*; 54: 663-74.

Thursby E. and Juge N. (2017) : *Introduction to the human gut microbiota*. *Biochem J.*; 474(11): 1823–1836.

Telleria. , Martins-da-Silva A., Tempone A.J., and Yara Maria Traub-Csekö (2018): *Leishmania*, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology*; 145(10): 1336–1353.

V

Références bibliographiques

Vivero RJ., Cadavid-Restrepo G., Herrera CX., Uribe Soto S. (2017) : Molecular detection and identification of *Wolbachia* in three species of the genus *Lutzomyia* on the Colombian Caribbean coast. *Parasit Vectors*; 10:110.

Volf P, Kiewegova A. and Nemeč A. (2002) : *Bacterial colonisation in the gut of Phlebotomus duboseqi (Diptera: Psychodidae): transtadial passage and the role of female diet*. *Folia Parasitologica (Praha)*; 49, 73–77.

W

Werren J.H., Baldo L. and Clark M.E. (2008): *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol*;6:741–51.

Werren J.H. and Windsor D.M. (2000): *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium?. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267, 1277-1285.

Werren JH et al., (1995): *Distribution of Wolbachia among neotropical arthropods*. *Proceedings of the Royal Society of London series B*, 262:197–204.

Welburn, S.C. and Maudlin, I. (1999) *Tsetse–trypanosome interactions: rites of passage*. *Parasitol. Today* 15, 399–403.

WHO. (2007) : WHO/CDS/NTD/IDM/.3 *Cutaneous leishmaniasis. Why are you neglecting me?*

Web

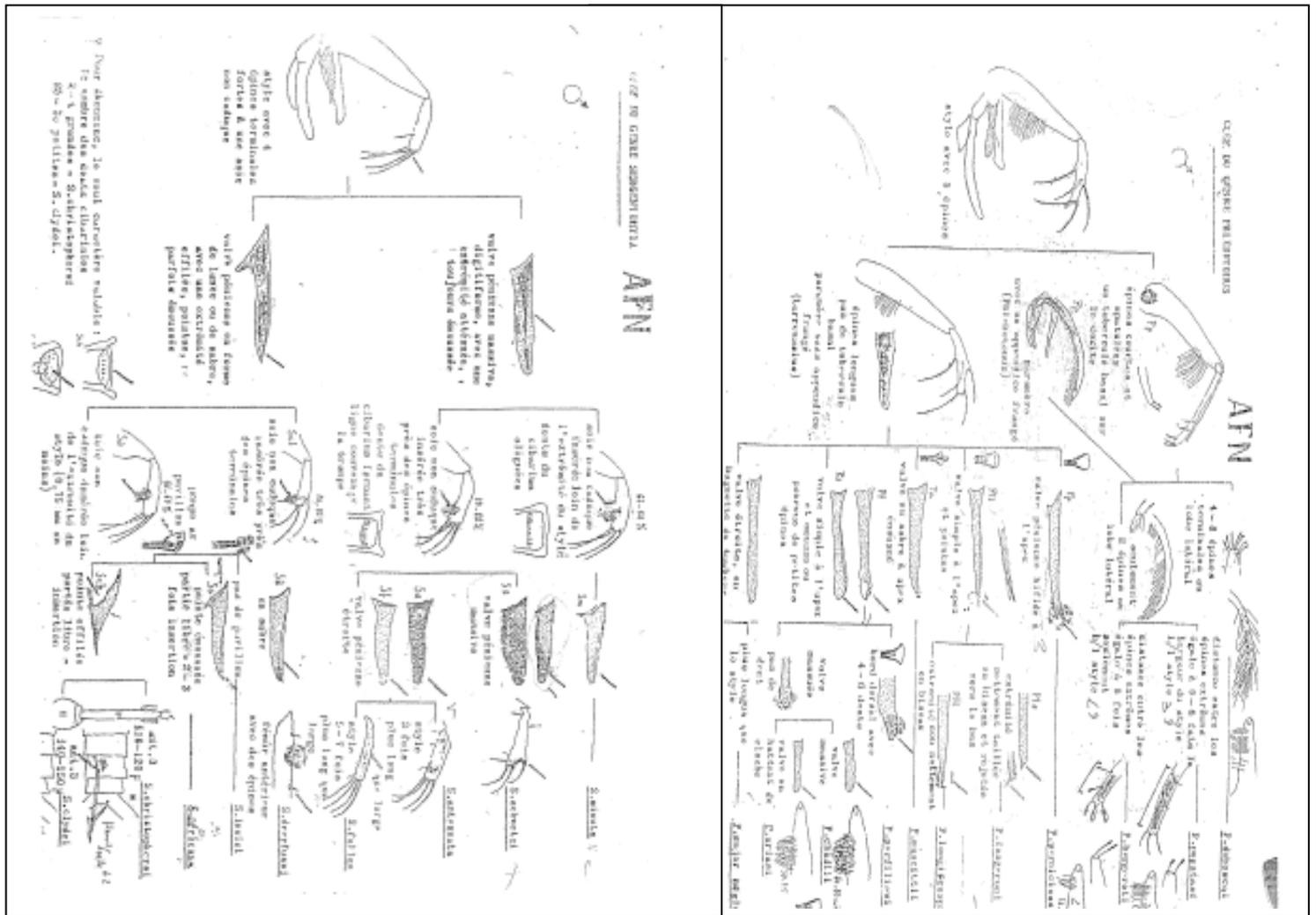
-Anonyme 01: <https://www.googleearth.2018>

-Anonyme 02 : <http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/milieux.html>

-Anonyme 08: <http://www.sonodis.fr/p5291/galleries-api-20-ne>

-AndroiTS GPS Test

ANNEXES



ANNEXE 03 : Coloration de GRAM

1. Réaliser un frottis ou un étalement.
2. Fixer la préparation à la flamme, sécher soigneusement puis laisser refroidir la lame.
3. Immerger les lames dans la solution de Violet gentiane pendant 1 mm.
4. Laver à l'eau en transvasant les lames.
5. Verser sur les lames du lugol et laisser agir pendant 45 s.
6. Laver à nouveau à l'eau.
7. Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée ou en immergeant les lames pendant une dizaine de secondes dans le décolorant.
8. Laver à l'eau.
9. Colorer avec la Fuschine pendant 20 à 30 secondes.
10. Laver à l'eau et sécher à l'air.
11. Observer à l'objectif x100, en immersion avec de l'huile.

ANNEXE 04 : lecture des galeries

Caractère	Substrat	Enzyme	Produit(s) formé(s)	indicateur	Réactif(s) ajouté(s)	Lecture +	Lect -
ONPG	ONPG	ONPG-hydrolase ----- β-galactosidase	ONP (jaune) galactose	/	/	Jaune	Incolore
ADH	Arginine	Arginine Dihydrolase (ADH)	Ornithine NH ₃ CO ₂	RP	/	Rouge - orange	Jaune (2)
LDC	Lysine	Lysine Décarboxylase (LDC)	Cadavérine CO ₂	RP	/	Rouge - orange	Jaune (2)
ODC	Ornithine	Ornithine Décarboxylase (ODC)	Putrécine CO ₂	RP	/	Rouge - orange	Jaune (2)
CIT	Citrate	/	CO ₂ H ₂ O	BBT	/	Bleu	Vert (3)
H ₂ S	S ₂ O ₃ ²⁻	(Thiosulfate Réductase)	S ²⁻ (H ₂ S)	Fer III	/	Noir	Incolore (jaune)
URE	Urée	Uréase	NH ₄ ⁺ (HCO ₃ ⁻)	RP	/	Rouge	Jaune
TDA	Tryptophane	Tryptophane Désaminase (TDA)	Acide indole pyruvique NH ₃	/	TDA / immédiat (Fer III)	Marron Brun	Jaune
IND	Tryptophane	Tryptophanase	Indole A. pyruvique NH ₃	/	James / immédiat ou Kovacs / 2min	Rouge	Incolore Jaune
VP	Pyruvate	/	Acétoïne	/	VP1 (KOH) + VP2 (α-naphtol) / 10min	Rouge	Incolore (4)
GEL	Gélatine	Gélatinase	Acides Aminés	/	/	Noir	Incolore (+part intact)
GLU	Glucose	/	Acides	BBT	/	Jaune	Bleu bleu (4)
SUCRES (AUXAN.)	Man, Ino, Sor, Rha, Sac, Mel, Amy, Ara	/	Acides	BBT	/	Jaune	Bleu bleu (4)
NO ₂ /N ₂	NO ₃ ⁻ (cupule GLU)	Nitrate Réductase	NO ₂ ⁻ ----- N ₂	/	Nit1 + Nit2 / 2min (Zinc)	Rouge Incolore	Incolore Rouge

- (1) une très légère couleur jaune est positive
- (2) une couleur orange après 48H D'INCUBATION doit être considérée comme négative
- (3) le résultat se lit dans la cupule (zone aérobie)
- (4) la fermentation commence dans la partie inférieure des tubes et l'oxydation dans la cupule
- (5) une légère coloration rose après 10 minutes doit être considérée comme négative

ANNEXE 5 : Précipitation de l'ADN

Après une lyse over night au bain marie de tous les échantillons centrifuger et jeter les surnagants, rajouter 200ul de PLGU binding buffer ensuite mélanger quelques minutes jusqu'à disparition des débris.

Précipitation d'ADN

Mettre 200ul Ethanol absolu froid et mélanger délicatement

Noter absence ou présence de méduse

Récupération du contenu de tous les ependorfs et les mettre dans des colonnes

Centrifuger pendant 1 minute à 10000 tours ensuite jeter le tube collecteur et garder la colonne où se trouve l'ADN

Rinçage de la colonne avec 500ul de Wash buffer (1) et centrifuger à 10000 tours pendant 1minute

Deuxième rinçage avec 500ul de Wash buffer (2) et centrifuger pendant 3minutes à vitesse maximale

Elution en 2 fois (2 X40 ul pour les BHIB)

(2X30 ul pour les pools de phlébotomes de M'sila)

Laisser 7minutes

Conservation de l'ADN à +4°C

ANNEXE 06 : Préparation du Gel d'agarose

Mélanger 1.5 g d'Agarose avec 100 ml de TAE

Porter à ébullition pendant 2 minutes au micro-onde.

ANNEXE 07 : La détection moléculaire

Date de réalisation : 02/09/18

Manipulateur : Mr Benallal Kamel

Echantillons et témoins

Préparation du mix

Réactif	Conc. Initiale	Conc. Finale	1 tube	10 tubes
H ₂ O	/	/	8 µl	80µl
Amorce W16s F	10mM	mM	1µl	10µl
Amorce W16s R	10mM	mM	1µl	10µl
RedTaq Master Mix	/	/	12.5µl	125µl
Volume total	/	/	22.5µl	225µl

Répartition de 25µl, soit : 22.5 µl de mix + 2.5 µl d'échantillon d'ADN.

Echantillon testés :

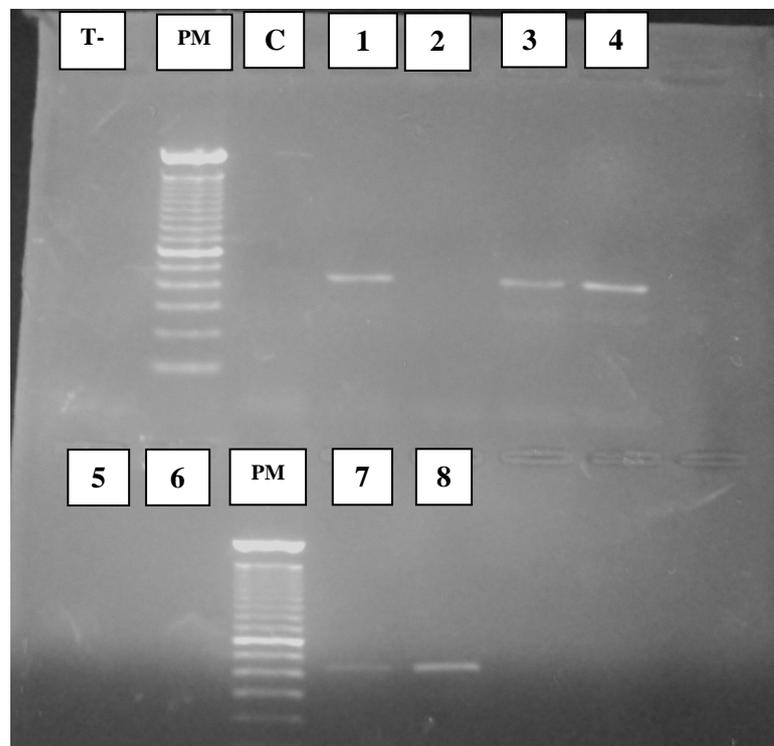
T (H₂O), Culex perexiguus, Pool Phle_Msila1, Pool Phle_Msila2, Pool Phle_Msila3, Pool Phle_Msila4, Pool Phle_Msila5, Pool Phle_Msila6, Pool Phle_Msila7, Pool Phle_Msila8,

Appareil : Techne

Profil thermique

Température	Temps	Nombre de cycle
95°C	2 min	1
95°C	2 min	X 2
60°C	1 min	
72°C	1 min	
95°C	30 sec	X35
60°C	1 min	
72°C	45 sec	
72°C	5 min	1

Profil de migration sur gel d'agarose 1.5% :



Résultats :

échantillons positifs : 1, 3, 4, 7 (signal faible) et 8.

Date de réalisation : 04/09/18

Manipulateur : Dihya FALI et Yousra BOUIZERI

Echantillons et témoins

Préparation du mix

Réactif	Conc. Initiale	Conc. Finale	1 tube	10 tubes
H ₂ O	/	/	8 µl	80µl
Amorce W16s F	10mM	mM	1µl	10µl
Amorce W16s R	10mM	mM	1µl	10µl
RedTaq Master Mix	/	/	12.5µl	125µl
Volume total	/	/	22.5µl	225µl

Répartition de 25µl, soit : 22.5 µl de mix + 2.5 µl d'échantillon d'ADN.

Echantillon testés :

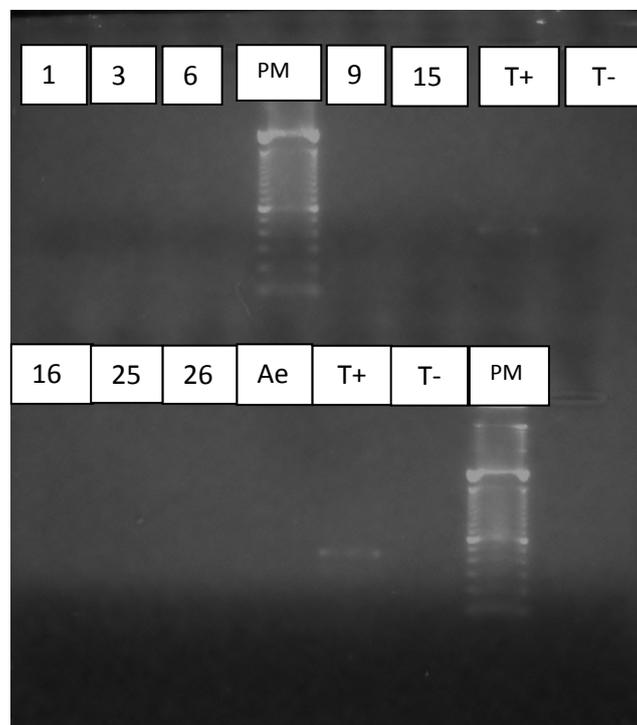
T (H₂O), Pool Phle_Msila4, Ech TO_BHIB1, Ech TO_BHIB3, Ech TO_BHIB6, Ech TO_BHIB9, Ech TO_BHIB15, Ech TO_BHIB16, Ech TO_BHIB25, Ech TO_BHIB26.

Appareil : Techne

Profil thermique

Température	Temps	Nombre de cycle
95°C	2 min	1
95°C	2 min	X 2
60°C	1 min	
72°C	1 min	X35
95°C	30 sec	
60°C	1 min	
72°C	45 sec	
72°C	5 min	1

Profil de migration sur gel d'agarose 1.5% :



Résultats :

Tous les échantillons sont négatifs.

ANNEXE 08 : Composition des milieux de cultures

1. Gélose nutritive

composition		Caractères recherchés	Résultats
Extrait de viande	1,0 g	Ces milieux permettent la culture des bactéries peu exigeantes.	Certaines colonies peuvent avoir des couleurs caractéristiques.
Extrait de levure	2,0 g		
Peptone	5,0 g		
Chlorure de sodium	5,0 g		
Agar	15,0 g		
pH	7		

2. Gélose de Chapman

Le milieu de Chapman est un milieu sélectif, surtout utilisé en microbiologie médicale. Parmi ces germes figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, les *Bacillus*, et de rares bactéries à Gram négatif.

composition		Caractères recherchés	Résultats
Peptones	11,0 g/l	On peut étudier la fermentation du mannitol par virage au jaune de l'indicateur coloré.	Les colonies mannitol + sont entourées d'une auréole jaune. Ne pas confondre la pigmentation des colonies et le virage de l'indicateur coloré. Ainsi des colonies pigmentées en jaunes et mannitol + : forte suspicion de <i>S. aureus</i>
Extrait de viande	1,0 g/l		
Chlorure de sodium	75 g/l		
Mannitol	10,0 g/l		
Rouge de phénol	0,025 g/l		
Agar	15,0 g/l		
pH	7.4		

3. Gélose de Hektoen

La gélose Hektoen est un milieu d'isolement des Salmonelles et des Shigelles, bien que de nombreuses bactéries à Gram négatif puissent se développer sur ce milieu.

composition		Caractères recherchés	Résultats
Peptones	11,0 g/l	trois types de glucides: la salicine (qui est un hétéroside), le saccharose et le lactose. La production d' H_2S à partir de thiosulfate	Colonies saumon : <i>Escherichia</i> , <i>Levinea</i> , <i>Citrobacter diversus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Yersinia</i> Colonies saumon à centre noir : <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , Colonies bleu-vert à centre noir : Suspicion de <i>Salmonella</i> , à différencier de <i>Proteus mirabilis</i> Colonies bleu-vert ou vertes : Suspicion de <i>Shigella</i> ou de <i>Salmonella</i>
Extrait de viande	1,0 g/l		
Chlorure de sodium	75 g/l		
Mannitol	10,0 g/l		
Rouge de phénol	0,025 g/l		
Agar	15,0 g/l		
PH	7.4		

Résumé

Les phlébotomes sont des insectes qui comptent environ 900 espèces largement réparties dans les régions tropicales et tempérées et dont certaines sont des vecteurs de pathogènes humains, parasitaires (*Leishmania* spp), bactériens (*Bartonella bacilliformis*) et viraux (*Phlebovirus*). Très peu est connu sur la diversité bactérienne du microbiote colonisant le tube digestif des phlébotomes, mais aucun rapport n'a été publié en Algérie.

Six espèces de phlébotomes : *P. perniciosus*, *P. perfliewi*, *P. longicuspis*, *P. papatasi*, *P. chadlii*, *Sergentomyia minuta parroti* ont été capturées dans la région de Tizi Ouzou et de M'sila qui sont des foyers bien connus de leishmaniose au Nord de l'Algérie. Un total de 105 femelles ont été disséquées, leurs tubes digestifs ont fait l'objet d'une analyse bactériologique déterminant 31 isolats appartenant à trois genres *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Sphingomonas*. La détection moléculaire a mis en évidence la présence de *Wolbachia* spp chez 08 pools de *P. papatasi* testés.

La présente étude fournit les premières données sur la diversité microbienne des phlébotomes en Algérie, et pour la première fois l'isolement d'une nouvelle espèce bactérienne *Sphingomonas paucimobilis* chez les phlébotomes qui est une bactérie reconnue pathogène pour l'homme. Cependant d'autres études plus approfondies demeurent cruciales pour une meilleure compréhension du complexe vecteur-microbiote. Cette information permettra de développer des stratégies de lutte antivectorielles.

Mots clés: Phlébotome, Microbiote, Algérie, *Wolbachia* spp, Bactérie.

Abstract

Around 900 species of phlebotomine sandflies are widely distributed in tropical and temperate areas. Some sand flies are vectors of human disease agents including parasitic protozoa, (*Leishmania* spp), bacteria (*Bartonella bacilliformis*) and viruses (*Phlebovirus*).

Little is known about the bacterial diversity of the microbiota colonizing the digestive tract of sandflies, but no report has been published in Algeria

Six species of sandflies: *P. perniciosus*, *P. perfliewi*, *P. longicuspis*, *P. papatasi*, *P. chadlii*, *Sergentomyia minuta parroti* were captured in the region of Tizi Ouzou and M'sila which are well known foci of leishmaniasis in Northern Algeria. A total of 105 females were dissected, their digestive tubes were processed to a bacteriological analysis determining 31 isolates belonging to three genera *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Sphingomonas*. Molecular detection revealed the presence of *Wolbachia* spp in 08 pools of *P. papatasi* tested.

The present study provides the first data on the microbial diversity of sandflies in Algeria, and for the first time the isolation of a new bacterial species *Sphingomonas paucimobilis* in sandflies which is a bacterium recognized as pathogenic for humans. However, more in-depth studies remain crucial for a better understanding of the vector-microbiota complex. This information will help to develop vector control strategies.

Key words: Phlebotomine, Microbiota, Algeria, *Wolbachia* spp, Bacteria.