

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou

Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biologie



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences Biologiques

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie des Populations et des Organismes

Thème :

***Détection et caractérisation des arbovirus à partir
des phlébotomes de la région de Tizi-Rached***

Présenté par :

Mlle SAIDANI YASMINE

Mlle ALOUACHE OUARDIA

Soutenu publiquement le 09/09/2024

Devant le jury composé de :

Présidente : Mme DJIOUA.O

MAA UMMTO

Promoteur : Mr BENALLAL.K

Chercheur Entomologiste médical à IPA

Co-promotrice : Mme BRAHMI. K

Professeur à UMMTO

Examinatrice : Mme CHAHED. S

MAB UMMTO

Promotion : 2023/2024

Remerciements

Nous remercions « DIEU » le tout puissant, qui nous a accordé la santé, la volonté, le courage et la patience nécessaires pour surmonter les difficultés, les obstacles et mener à bien ce travail de recherche.

Nous adressons nos sincères remerciements à notre promoteur **M. Benallal K.** chercheur en entomologie médicale à l'Institut Pasteur d'Alger, pour avoir accepté de nous guider, pour son aide précieuse et ses conseils avisés, ainsi que pour l'intérêt qu'il a porté à notre travail.

Nous tenons aussi à exprimer nos sincères remerciements à notre Co-promotrice **Mme Brahmi K.** professeur à l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour son aide précieuse, ses conseils avisés, et la confiance qu'elle nous a témoignée tout au long de la réalisation de cette étude.

On tient également à remercier **Mme DJIOUA.O.** maitre assistante classe (A) à l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou et **Mme CHAHED. S.** maitre assistante classe (B) dans la même institution. Pour avoir acceptés d'examiner et d'évaluer notre travail, merci de nous honorer par votre présence.

Nous souhaitons exprimer notre profonde gratitude à l'ensemble des enseignants du département des sciences biologiques et des sciences agronomiques pour leur contribution à notre formation. Leur dévouement, leur patience et leurs précieux conseils ont été d'une valeur inestimable.

Nos remerciements les plus sincères vont également à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réussite de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

À mes très chers parents

Merci d'avoir implanté dans mon cœur la gentillesse, la tolérance et surtout l'envie de réussir, merci d'avoir fait de moi la fille que je suis aujourd'hui, merci pour votre courage votre soutiens votre bienveillance. Je ne pourrais jamais vous remercier assez pour tous ce que vous avez fait et continuer à faire pour moi. J'espère que vous serez fière de moi je vous aime infiniment.

À mes adorables frères et ma mimde.

À vous **Ferhat, Massi et Youva**, vous êtes bien plus que des frères, vous êtes mes piliers. Sans vous, je ne serais jamais arrivée là où je suis. Merci pour votre aide votre soutiens votre amour et toutes les belles choses que vous m'avait données et que vous continuer à me donner encore, je vous aime très fort.ma **mimde** toi ma sœur de cœur ; merci pour tous, ton amour, ta bienveillance, ton soutien, tes conseilles tellement précieux, je t'aime tellement fort.

Au reste de ma famille et à mes amies

À mes tantes, mes oncles, mes belles sœurs, mes amis, mes cousins et cousines, ma binôme chérie Yasmine, et toutes les autres personnes très chères à mon cœur ; merci à tous de m'avoir soutenue, aider, conseiller, fait rire. Tous simplement, merci d'être toujours à mes côtés, je vous aime tous énormément.

Et aussi je tiens à remercier mes enseignants depuis la primaire jusqu' à l'université, merci pour tous.

Ouardia

Dédicace :

Je dédie ce modeste travail à :

Papa et Maman, pour votre sagesse inébranlable et vos conseils qui ont fait de moi la personne que je suis aujourd'hui , pour l'éducation et les valeurs que vous m'avez inculquées , pour votre soutien dans tous les moments difficiles. C'est grâce vous que je me dis que rien n'est impossible car je ne serai jamais seule . Ces quelques mots ne peuvent jamais résumer ce que vous avez fait pour moi . je vous aime .

Les deux familles **SAIDANI** et **HAMRIOUI**, pour tous vos encouragements.

Mes frères **GHILES** et **AMINE**

Mes grand mères **CHABHA** et **DJOUHER**

Ma binôme et ma copine adorée **OUARDIA (DIDOUCHA)**

Toute la promo M2 BPO

Ainsi tous les enseignants et au personnel du département de Biologie.

YASMINE

Listes des abréviations

Abréviations	Signification
OMS	Organisation mondiale de la santé
CDC	center of disease control, Atlanta
CMCP-10	Milieu de culture
PCR	polymerase chain reaction
BSL3	Laboratoire de niveau de sécurité 3
ARN	Acide ribonucléique
BSL 2	Laboratoire de niveau de sécurité 2
PSM	Poste de sécurité microbiologique
ADN	Acide désoxyribonucléique
RAV1	Tampon de lyse
eGFP	Protéine fluorescente verte améliorée
RAW	Tampon de lavage
RT-PCR	Reverse transcriptase polymérase chaîne réaction
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Taq polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> polymérase
TOSV	<i>Toscana Virus</i>

Liste des figures

N° de la figure	Titre de la figure	N° de la page
1	Morphologie générale d'un phlébotome adulte.	04
2	Morphologie d'un phlébotome adulte	05
3	Cycle de développement des phlébotomes	07
4	Distribution géographique des principaux genres de phlébotomes	08
5	Densité de la population par commune dans la wilaya de Tizi-Ouzou, selon le recensement de 2008, modifiée représentant le site d'échantillonnage	16
6	Diagramme de Bagnouls et Gausson de la région de Tizi-Ouzou de 2020 à 2023	19
7	Localisation de la région de Tizi-Ouzou sur le climagramme d'Emberger	20
8	A : Ferme ovine ; B : Refuge pour chiens	21
9	A : piège huilé déposé ; B : piège huilé récupérer	22
10	Pièges CDC lumineux déposé dans notre zone d'étude	22
11	Schéma représentant le Processus de Broyage et de Neutralisation	24
12	Schéma représentant le Processus d'Extraction BSL 2	25
13	Répartition des phlébotomes capturés par les pièges adhésifs en fonction des espèces et par sexe.	36
14	Résultats de la détection moléculaire par la RT-PCR	37
15	Résultats de l'identification moléculaire des échantillons sur gel d'agarose 2% des bandes amplifiées du canal sodique (détails des échantillons analysés)	39
16	Résultats du séquençage de l'ADN des phlébotomes avec la méthode de sanger	41

Liste des tableaux

N° du tableau	Titre du tableau	N° de la page
1	Espèces de phlébotomes, leurs répartitions et leurs rôle vectoriel dans la région du Maghreb.	10
2	Températures minimales et maximales moyennes mensuelles de la région de Tizi-Ouzou sur une période de 04ans (2020-2024)	17
3	Précipitations mensuelles de la wilaya de Tizi Ouzou (2020-2024)	18
4	Les valeurs moyennes d'humidité relative enregistrées dans la région d'étude (Tizi-Rached)2020-2024.	18
5	Séquences d'Amorces et de Sonde pour la Détection du Fragment du Gène N par PCR	26
6	Composition des Réactifs et Concentrations pour la Réaction qPCR de détection du Gène Cible	26
7	Préparation de la Réaction PCR en Temps Réel pour la Détection du Gène eGFP	27
8	Programme de PCR en Temps Réel pour la Détection du Gène eGFP	28
9	Séquences d'Amorces Utilisées pour la Détection du Gène Codant le Canal Sodique Na ⁺ /K ⁺ par PCR.	28
10	Préparation du Mix pour la PCR en Temps Réel Tosv	29
11	Programme de PCR en Temps Réel	29
12	Préparation du Mix d'Amorce Forward pour PCR	31
13	Préparation du Mix Amorce reverse	32
14	Profil thermique de la PCR	32
15	Nombre de phlébotomes capturés par la technique des pièges huilés dans la région de Tizi-Rached.	34
16	Résultats d'espèces de phlébotomes capturés par les pièges adhésifs	35
17	Nombre de phlébotomes capturés par les pièges CDC	36
18	Nombre de phlébotomes dans chaque pool et les résultats de la RT-PCR	37
19	Résultats de l'identification moléculaire des échantillons sur gel d'agarose 2% des bandes amplifiées du canal sodique selon les espèces	38

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale..... 1

Chapitre I : Données bibliographiques

1. Généralités sur les phlébotomes.....	3
1.1. Systématique.....	3
1.2. Morphologie générale.....	3
1.2.1. La Tête.....	4
1.2.2. Le thorax.....	4
1.2.3. L'abdomen.....	4
1.3. Bio-écologies des phlébotomes.....	5
1.3.1. Habitat.....	5
1.3.2. Activité.....	6
1.3.3. Nourriture.....	6
1.3.4. Cycle évolutif.....	6
1.3.5. Reproduction des phlébotomes.....	7
2. Répartition géographique.....	8
2.1. Dans le monde.....	8
2.2. En Algérie.....	8
3. Maladies transmises par les phlébotomes.....	11
3.1. Les leishmanioses.....	11
3.2. La fièvre des trois jour (fièvre à pappataci).....	11
3.3. Le harara.....	12
3.4. La bartonnellose-bactérienne.....	12
4. Les phlébotomes et la transmission des arbovirus.....	12

4.1. Les vecteurs d'arbovirus.....	13
4.2. Quelques arbovirus de phlébotomes.....	14
5. La lutte contre les phlébotomes.....	14

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

1. Région d'études et climats.....	16
1.1. Présentation de la région d'étude.....	16
1.2. Description et choix de la station d'étude.....	17
1.3. Facteurs climatiques de la région.....	17
1.3.1. Température.....	17
1.3.2. Précipitation.....	18
1.3.3. Humidité.....	18
1.3.4. Le Diagramme ombrothermique.....	19
1.3.5. Quotient pluviométrique et étage bioclimatique d'Emberger.....	20
2. Méthode utilisée sur le terrain.....	21
2.1. Les pièges huilés.....	21
2.2. Les pièges lumineux.....	22
3. Méthodes utilisées au laboratoire.....	23
3.1. Traitement des phlébotomes récupérés par les pièges huilés.....	23
3.2. Traitement des phlébotomes récupérés par les pièges lumineux CDC.....	23
3.3. Extraction de l'ARN viral.....	23
3.3.1 Etapes BSL3.....	23
3.3.1.1 Broyage et neutralisation des virus.....	23
3.3.1.2. - Etapes BSL 2.....	25
4. Identification des virus par RT-PCR.....	26
4.1. Principe de la RT-PCR.....	26
4.2. Protocole de la RT-PCR.....	26
4.2.1 Préparation des mixes d'amorces.....	26

4.3. Visualisation des résultats d'amplification sur gel d'agarose à 2%.....	30
4.3.1. Préparation du gel d'agarose	30
5. Séquençage.....	30
5.1. Méthode de Sanger	30

Chapitre 3 : Résultats

1. Résultats de l'inventaire des phlébotomes récoltés dans la région de Tizi-Ouzou.....	34
1.1. Résultats d'effort d'échantillonnage des phlébotomes capturés par les pièges adhésifs.....	34
1.2. Résultats des espèces de phlébotomes capturés par les pièges adhésifs.....	35
2. Résultats de la détection moléculaire	36
2.1. Analyse des phlébotomes capturés par les pièges CDC	36
2.2. Résultats de la RT-PCR.....	37
2.3. Résultats de l'identifications moléculaire des espèces de phlébotomes	38
2.4. Résultats PCR gène résistance.....	38
2.4.1. Résultats du séquençage d'ADN des phlébotomes pour l'étude de la résistance aux insecticides	39

Chapitre 4 : Discussion

1. Discussion des résultats de l'identification des phlebotomes collectés.....	42
2. Discussion des Résultats de la détection moléculaire.....	43
3. Discussion des Résultats PCR gène résistance.....	44
3.1. Discussion Résultats du séquençage d'ADN des phlébotomes pour l'étude de la résistance aux insecticides.....	44
Conclusion & perspectives.....	46
Reference bibliographiques.....	48

Résumé

Introduction générale

Introduction générale

Les phlébotomes sont des insectes hématophages, appartenant à l'ordre des diptères nématocère. Ils ont été largement étudiés dans presque toutes les régions du monde en raison de leur rôle pathogène. Leur classification taxonomique est particulièrement controversée (**Dondji, 2001**) et leur répartition géographique s'étend des zones tropicales aux régions tempérées chaudes (**Dedet et al., 1984**).

Les phlébotomes forment un groupe très homogène qui occupe une place importante dans la transmission des maladies telles que la leishmaniose, les arbovirus, et la bartonellose. Aucun autre arthropode hématophage ne peut se prévaloir de cette aptitude ; les arboviroses sont dues à un ensemble hétérogène de virus à ARN appartenant à trois genres : Phlebovirus, Orbivirus et Vesiculovirus (**Leger et Depaquit., 2001**).

Les virus transmis par les phlébotomes ont un rôle important dans la pathologie humaine tel que le Toscana. Ces infections émergent dans la région méditerranéenne et se propageront probablement dans les décennies à venir, constituant une menace complexe pour la santé humaine (**Papadopoulos, et al., 2020**).

Actuellement, les Centers for Disease Control and Prevention (CDC) répertorient plus de 600 arbovirus connus, dont plus de 80 sont pathogènes à l'homme. Notre compréhension globale des arbovirus est probablement incomplète, ce qui souligne la nécessité d'une surveillance continue pour suivre leur propagation au sein de la population humaine (**Michael et al., 2012**).

En virologie, les études des interactions des virus avec leurs hôtes vecteurs et vertébrés et des mécanismes physiopathologiques des infections permettront une meilleure prévention de ces maladies. En plus des différents pathogènes qu'ils transmettent s'ajoute l'apparition récente dans certains pays comme le Népal la résistance des phlébotomes aux insecticides, ce qui rend plus complexe le combat contre ces maladies (**Adlsteinn et al., 2021**).

Dans cette optique, notre travail s'intéresse au virus transmis par les phlébotomes ainsi que la recherche de mutations probables responsables de l'apparition de la résistance chez les populations de phlébotome dans la région de Tizi-Ouzou.

Ce document est organisé en quatre sections principales. La première fournit une synthèse bibliographique sur les phlébotomes, en insistant sur leur rôle dans la transmission des maladies, telles que les arbovirus, dans la région de Tizi-Ouzou. Cette section explore les espèces présentes dans cette zone, leurs caractéristiques écologiques et les agents

Introduction générale

pathogènes qu'elles véhiculent. La deuxième section décrit le matériel et les méthodes utilisées pour la capture et l'analyse des phlébotomes. Elle détaille les différents types de pièges employés, les procédures d'identification des espèces, ainsi que les conditions géographiques et climatiques de l'étude. La troisième section présente les résultats obtenus, notamment les espèces de phlébotomes identifiées, leur répartition entre les genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia*. Enfin, la quatrième section propose une discussion des résultats, les comparer aux données de la littérature existante et analyser leurs implications pour la santé publique. Une conclusion générale résume les principales découvertes et propose des perspectives pour des recherches futures.

Chapitre I

Données bibliographiques

Ce chapitre aborde différents aspects liés aux phlébotomes. Il commence par une section générale concernant ces insectes couvrant la morphologie, la bio-écologie et la répartition géographique dans le monde et en Algérie. Ensuite il traite les maladies et les arbovirus transmis par les phlébotomes. Enfin, les différentes méthodes de lutter contre ces insectes sont décrites.

I.1. - Généralités sur les phlébotomes :

Les phlébotomes (Diptera: Psychodidae), également appelés mouches de sable, sont des vecteurs importants de divers agents pathogènes affectant les humains et les animaux, tels que *Bartonella bacilliformis*, les phlébovirus, ainsi que des protozoaires du genre *Leishmania*, responsables des leishmanioses, qui figurent parmi les maladies à transmission vectorielle les plus graves. Les pays du Maghreb, dont l'Algérie, couvrent une vaste région de l'Afrique du Nord et figurent parmi les zones les plus touchées par ces maladies. Les conditions climatiques et écologiques variables selon les localités soutiennent une diversité de la faune des phlébotomes (Benallal et al., 2022).

I.1.1. - Systématique

Selon Dolmavota et Demina (1971), les phlébotomes sont classés comme suite :

- Règne : Animalia.
- Embranchement : Arthropoda.
- Sous-Embranchement : Hexapoda.
- Classe : Insecta.
- Sous-Classe : Ptérygotes.
- Super-order : Endoptérygota.
- Ordre : Diptère.
- Famille : Psychodidae.
- Sous-Famille : Phlebotominae.
- Genre : *Phlebotomus* (Loew , 1845).

I.1.2. - Morphologie générale

Les phlébotomes sont de petits insectes dont la taille est comprise entre 3 et 5 mm de longueur. Leur coloration varie du presque blanc au presque noir. Trois caractères permettent de les identifier facilement : au repos, ils tiennent généralement leurs ailes inclinées au-dessus de l'abdomen en forme de V, leur corps est couvert de poils, et lorsqu'ils s'apprêtent à se

nourrir, ils sautillent sur leur hôte avant de se fixer pour piquer. Contrairement aux moustiques, leur attaque est silencieuse. Leur comportement sautillant suggère qu'ils ne s'éloignent pas beaucoup des sites de reproduction (**Killick-Kendrick et al., 1999**).

Le corps des phlébotomes adultes se divise en trois parties qui portent ou non des appendices, la tête le thorax et l'abdomen (**figure 1**).

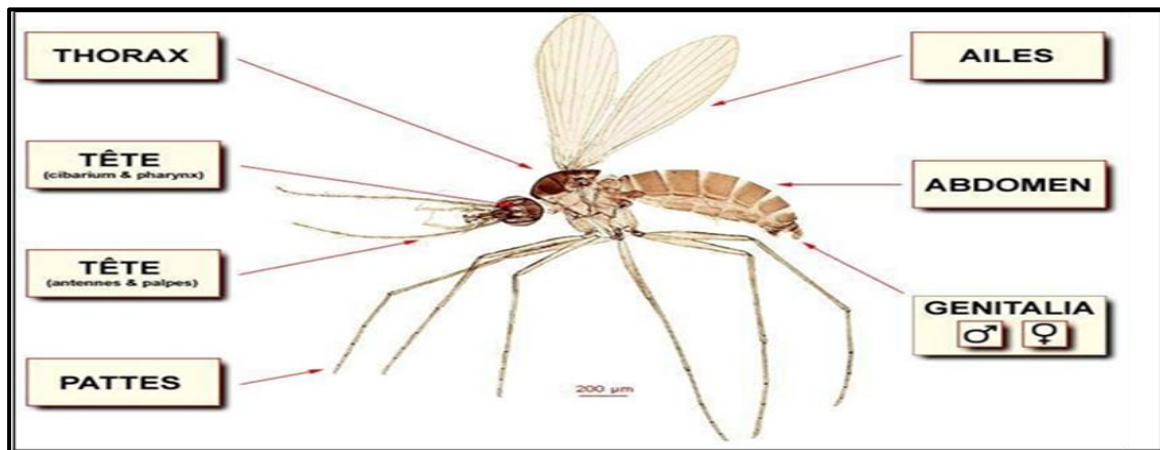


Figure 1 - Morphologie générale d'un phlébotome adulte (Niang et al., 2000).

I.1.2.1. - La tête

La tête est principalement constituée d'une capsule chitineuse appelée épïcraîne, portant à chaque côté un grand œil composé. Sur la partie frontale de la tête, se trouvent deux antennes, chacune composée de 16 segments : deux segments basaux et 14 segments beaucoup plus longs et fins, formant le flagellum. Les pièces buccales forment une trompe courte. Seules les femelles possèdent des mandibules dentelées (Figure 2 A).

I.1.2.2. - Le thorax

Le thorax des phlébotomes présente un développement similaire à celui observé chez tous les Diptères, il porte latéralement les ailes ainsi que les balanciers ou haltères, et ventralement, il soutient les pattes. Le thorax est constitué de trois segments : prothorax, mésothorax et métathorax (**Abonnenc, 1972**) comme le montre la figure 2 B .

I.1.2.3. - L'abdomen

D'après **Abonnenc, 1972**, L'abdomen indiqué dans la figure (2)B est de forme cylindrique et se compose de 10 segments, le premier étant attaché au thorax. Les sept

premiers segments sont non modifiés et portent chacun une paire de stigmates respiratoires, tandis que les trois derniers segments sont transformés pour former les organes génitaux

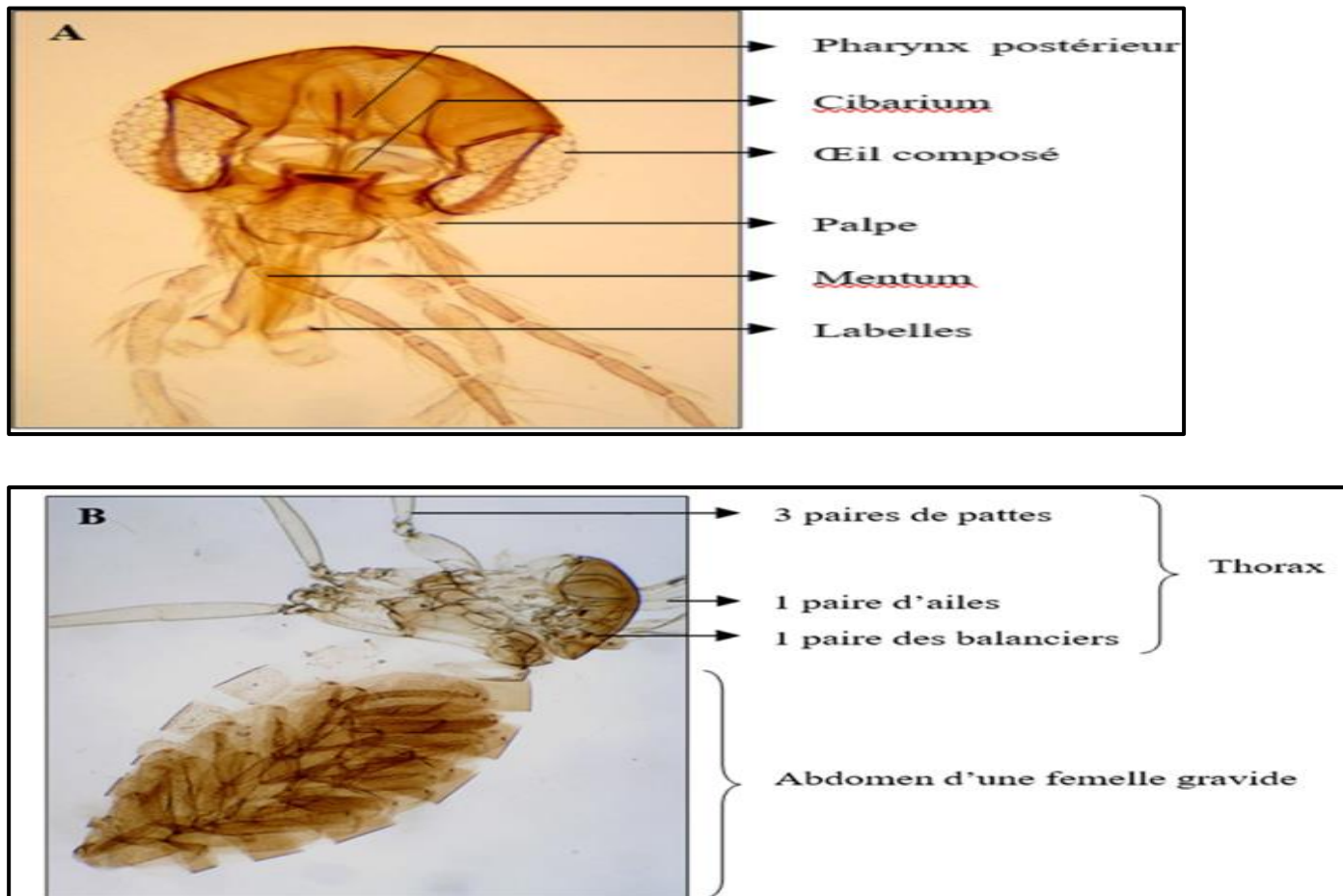


Figure 2 - A : Tête (vue ventrale) ; B : Thorax et l'abdomen (Boussa.S, 2008)

I.1.3. - Bio-écologie des phlébotomes

I.1.3.1. - Habitat

Les phlébotomes, bien que peu efficaces en tant que navigateurs, sont souvent présents dans des zones où les conditions climatiques restent constantes et où la ventilation est limitée. Leur présence est néanmoins observée dans divers habitats. Les espèces anthropophiles reconnues comme des vecteurs majeurs de maladies telles que la leishmaniose et diverses infections virales, se sont particulièrement bien adaptées à l'environnement humain colonisant les espaces sombres tels que les maisons, les caves et les passages étroits. D'autres espèces montrent une préférence pour des environnements spécifiques, comme les troncs d'arbres creux, les abris sous roche, les nids et les terriers, voire même les termitières (Vattier-Bernard., 1972). De manière peu surprenante, certaines espèces de phlébotomes étant adaptées à ces environnements ont réussi à s'établir dans le monde souterrain, en

particulier dans les grottes, où elles se reproduisent et vivent sans nécessité apparente de quitter cet habitat (**Vattier-Bernard, 1972**).

I.1.3. 2. - Activité

Selon **Killick-Kendrick et al., 1991**, l'activité des phlébotomes est principalement crépusculaire ou nocturne. Leurs lieux de repos diurnes sont généralement frais et humides, tels que les habitations, les latrines, les caves, les écuries, les grottes, les fissures dans les murs, les rochers ou le sol, la végétation dense, les trous d'arbres et leurs contreforts, les terriers de rongeurs et d'autres mammifères, les nids d'oiseaux, et les termitières. femelles des espèces qui piquent et se reposent à l'extérieur pour la maturation des œufs sont appelées femelles exophages et exophiles. En revanche, les espèces endophiles (se reposant à l'intérieur pendant la maturation des œufs) peuvent être efficacement ciblées par ces pulvérisations intradomiciliaire.

I.1.3.3. - Nourriture

Les phlébotomes, actifs pendant la nuit, cherchent à se nourrir dès leur émergence. Les mâles se contentent de sucs de plantes et de miellat de pucerons (**Kettle., 1995 ; Moulinier., 2003**), tandis que les femelles ont besoin de sang en plus pour le développement de leurs œufs. Les femelles dites telmophage car lorsqu'elles piquent, leurs maxillaires s'ancrent dans la peau sectionnant les capillaires et formant ainsi une petite mare de sang dans laquelle l'hypopharynx injecte une salive anticoagulante, avant que le sang soit aspiré (**Bouchery., 2007**). Le repas sanguin a généralement lieu 2 jours au maximum après l'émergence, avant ou après la copulation (**Dedet., 1999**). Ces insectes piquent à la fois les humains, principalement sur les parties découvertes telles que le visage, le cou, les mains et les pieds, et les animaux dans les zones moins velues. Une fois rassasié de sang, l'insecte prend une brève période de repos sur un mur ou un support proche avant de rejoindre un abri où il digère son repas (**Leger et Depaquit., 1999**).

I.1.3.4. - Cycle évolutif

La vie pré-imaginale des phlébotomes comprend nécessairement quatre stades larvaires et un stade nymphal. Après l'éclosion de l'œuf, une larve minuscule émerge et commence à se nourrir et mue pour passer au deuxième stade larvaire, laissant derrière elle sa vieille peau. La nouvelle larve, maintenant plus grande, poursuit son développement jusqu'à une nouvelle mue, et ce processus se répète jusqu'à ce qu'elle atteigne le stade nymphal, qui

est le cinquième et dernier stade avant l'émergence de l'adulte. Les larves de phlébotomes se déplacent en rampant, semblables aux chenilles, et s'immobilisent lorsqu'elles sont perturbées (ABONNENC., 1972). La figure 3 ci dessous représente le cycle de développement des phlébotomes.

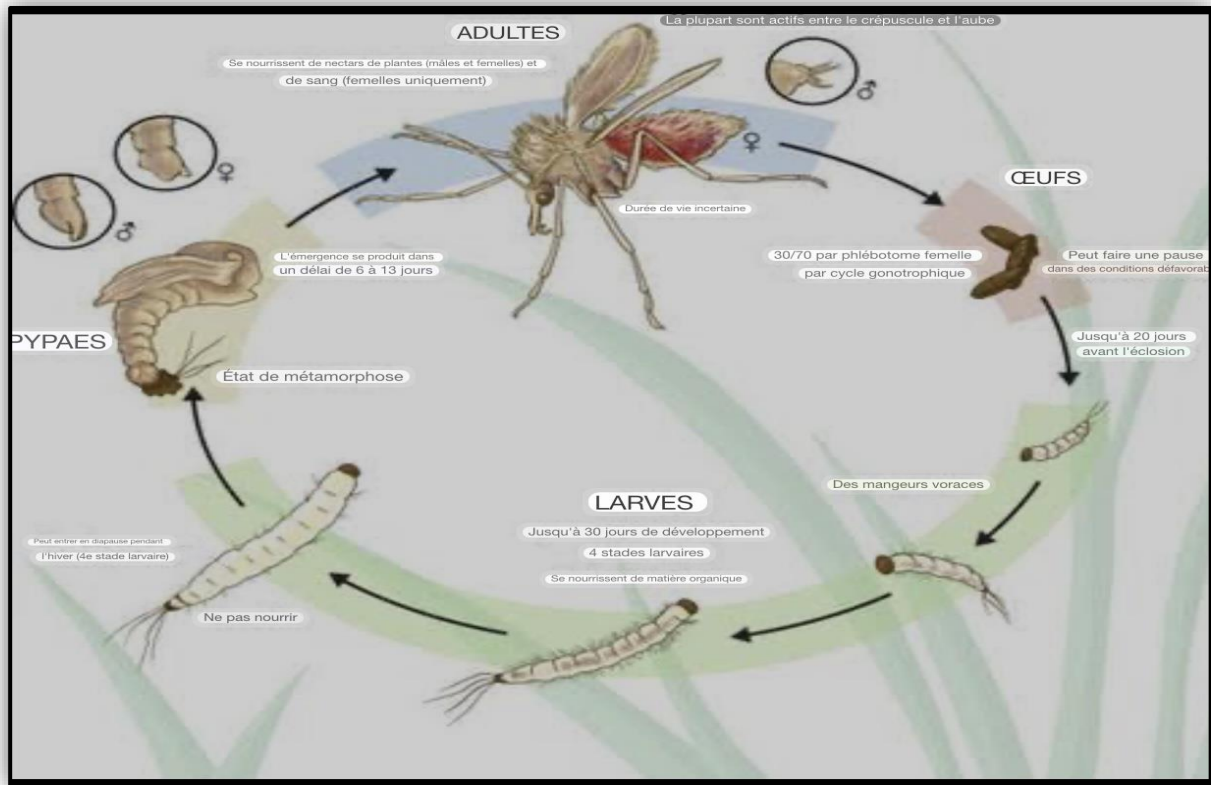


Figure 3 - Cycle de développement des phlébotomes (Pedro Cecílio et al ;2022)

I.1.3.5. - La reproduction des phlébotomes

Le moment de l'accouplement des femelles phlébotomes par rapport à leur prise de sang varie selon les espèces. Les mâles de certaines espèces, comme *Lutzomyia longipalpis* et *Phlebotomus argentipes*, arrivent en premier sur l'hôte, où ils attendent les femelles pour les courtiser et s'accoupler, dans un comportement appelé "lekking". Chez *Phlebotomus duboscqi*, la femelle ne semble accepter l'accouplement qu'après avoir porté un mâle sur son dos pendant un certain temps. Les femelles *Lutzomyia* reconnaissent les mâles grâce à des phéromones, alors que chez *Phlebotomus*, aucun système de phéromones similaire n'a été identifié. Après l'accouplement, un bouchon de sperme se forme dans la spermathèque de la femelle (Killick-Kendrick et al., 1999). Cet accouplement se produit dans les 48 heures suivant l'émergence des adultes. Une fois fécondée, la femelle stocke les spermatozoïdes dans deux spermathèques dont la morphologie est spécifique à chaque espèce qui est essentiel

utilisée pour l'identification des espèces. Les spermatozoïdes sont libérés progressivement au moment de la ponte pour fertiliser les œufs (Izri et al., 2006).

I.2. - La répartition géographique

I.2.1. - Dans le monde

Il existe plus de 800 espèces de phlébotomes réparties entre le Nouveau Monde, où l'on trouve environ 464 espèces, et l'Ancien Monde, qui abrite environ 375 espèces. Les phlébotomes de l'Ancien Monde sont regroupés principalement en trois genres : *Phlebotomus*, *Sergentomyia* et *Chinius*, présents dans les régions paléarctique, afrotropicale, malgache, orientale et australienne. En revanche, les phlébotomes du Nouveau Monde se divisent principalement en trois genres : *Lutzomyia*, *Warileya* et *Brumptomyia*, répartis dans les régions néarctique et néotropicale ((Akhoundi et al., 2016).

La figure ci dessous représente la distribution des phlébotomes dans le monde selon **Depaquit et Léger., 2017**.

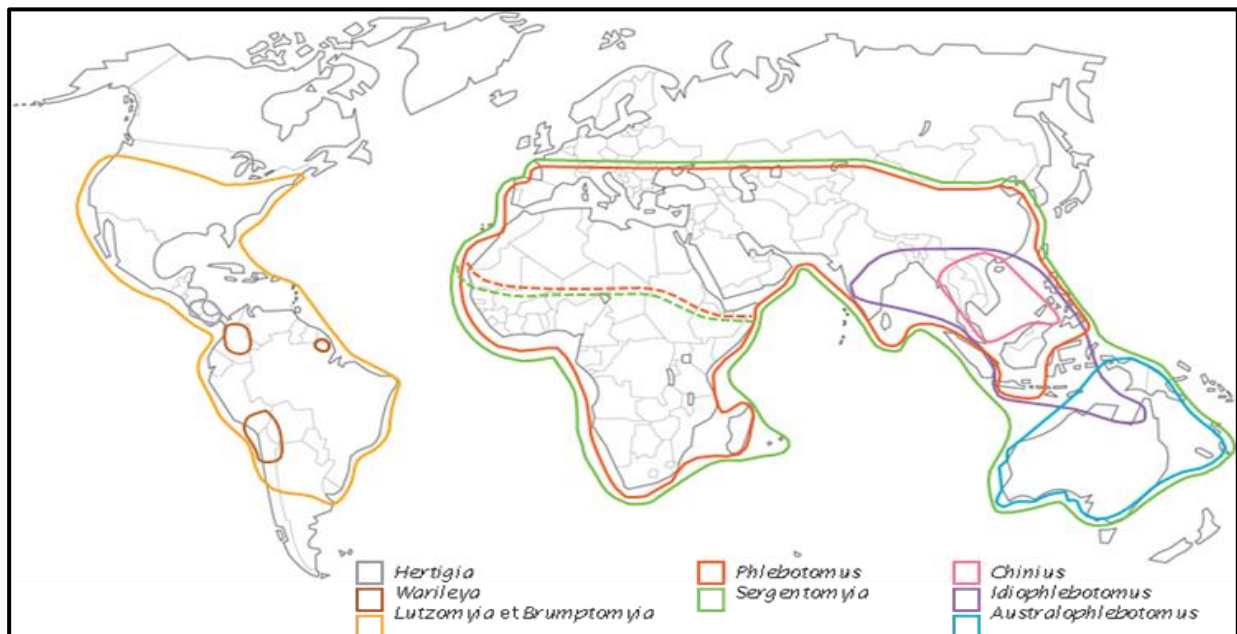


Figure 4 - Distribution géographique des principaux genres de phlébotomes (Depaquit et Léger, 2017).

I.2.2. - En Algérie

En Algérie, les phlébotomes ont été observés pour la première fois en 1912 par Foley et Leduc. L'Institut Pasteur d'Algérie, dirigé par Parrot et les frères Sergent, a joué un rôle essentiel dans leur étude, avec la description de nouvelles espèces telles que *Phlebotomus*

sergenti en 1917, *Sergentomyia fallax* en 1921, *Se. dreyfussi* en 1933 et *Ph. bergeroti* en 1934, (Dedet et al, 1984).

Dans les années 1980, les populations de phlébotomes du Tassili n'Ajjer et du Hoggar dans le sud de l'Algérie ont été étudiées (Belazzoug et al., 1980,1981), suivies par la première identification de *S. minuta* par la même équipe (Belazzoug et al. 1982). Une enquête épidémiologique menée entre 1972 et 1976 a permis à Dedet et ses collègues de mettre à jour la taxonomie, la distribution, l'écologie et le rôle pathogène de 15 espèces de phlébotomes en Algérie (Dedet et al. 1984), portant la liste à 21 espèces. En 1991, Belazzoug a élargi la faune des phlébotomes algériens à 22 espèces (Belazzoug 1991).

Des études récentes ont exploré l'écologie des phlébotomes dans le nord-est de l'Algérie (Kabbout et al., 2016) ainsi que la distinction morphologique entre *Ph. perniciosus* et *Ph. longicuspis* (Berchi et al. 2007). En 2011, *P. mascittii* a été identifié pour la première fois dans la région de Kabylie, un foyer endémique de leishmaniose viscérale (Berdjane-Brouk et al. 2011). Une nouvelle localisation pour *Ph. kazeruni* a été découverte à Tamanrasset en 2013, augmentant le nombre d'espèces à 25 (Benallal et al. 2013). Enfin, une étude en 2017 a rapporté la présence d'une variante de *Ph. perniciosus* en Algérie (Benallal et al. 2017). le Tableau 1 suivant représente les espèces de phlébotomes, leurs rôle vectoriel en algerie .

Tableau 1 - Espèces de phlébotomes, leurs rôle vectoriel en algérie(Benallal K et al., 2022)

Genre	Sous-genres	Espèces	
<i>phlebotomus</i>	<i>Phlebotomus</i>	<i>Ph. papatasi</i> ×*	
		<i>Ph. bergeroti</i>	
	<i>paraphlebotomus</i>	<i>Ph. sergenti</i> ×*	
		<i>Ph. alexandri</i>	
		<i>Ph. kazeruni</i>	
		<i>Ph. chabaudi</i>	
		<i>Ph. riouxi</i>	
	<i>Larroussius</i>	<i>Ph. perniciosus</i> ×*	
		<i>Ph. perniciosus atypical</i>	
		<i>Ph. longicupis</i> ×**	
		<i>Ph. perfiliewi</i> *	
		<i>Ph. ariasi</i> ×*	
		<i>Ph. chadlii</i>	
	<i>Ph. langeroni</i> *		
	<i>transphlebotomus</i>	<i>Ph. mascittii</i>	
	<i>Sergentomyia</i>	<i>sergentomyia</i>	<i>Se. minuta</i>
			<i>Se. fallax</i>
<i>Se. antennata</i>			
<i>Se. cincta</i>			
<i>Se. scwetzi</i>			
<i>parrotomyia</i>		<i>Se. africanasubsp.eremitis</i>	
		<i>Se. lewissi</i>	
<i>Grassomyia</i>		<i>Se. dreyfussi</i>	
<i>sintonius</i>		<i>Se. Clydei</i> **	
		<i>Se. christophersi</i>	
		<i>Se. hirtus</i>	
		<i>Se. tiberiadis</i>	

**detection de la leishmaniose ADN.

×detection de phlebovirus ARN.

I.3. - Maladies transmises par les phlébotomes

Les phlébotomes sont connus pour être des vecteurs du parasite *Leishmania* sp, agents pathogènes responsables de maladies appelées la leishmaniose dans plus de 80 pays de l'Ancien et du Nouveau Monde. Ils transmettent également d'autres pathogènes humains tels que *Bartonella* et des virus comme les *Phlebovirus* qui affectent les humains et les animaux dans de nombreux pays du monde (**Depaquit et al., 2010**).

I.3.1. - Les leishmanioses

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires causées par des protozoaires du genre *Leishmania*, transmis à diverses espèces de mammifères, y compris l'homme, par la piqûre des phlébotomes. Ces maladies sont présentes dans les régions intertropicales et s'étendent aux zones tempérées de l'Europe du Sud, de l'Afrique du Nord, de l'Asie et de l'Amérique (**Munstermann., 2019**). La leishmaniose se manifeste sous trois formes cliniques endémiques : la leishmaniose viscérale (LV), la leishmaniose cutanée sporadique du nord (LCN), et la leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) (**Harrat et Belkaid., 2002**). La leishmaniose viscérale, particulièrement fréquente dans le nord de l'Algérie (**Belazzoug., 1984**), se rencontre principalement dans les zones humides et subhumides, mais également dans les régions arides et semi-arides comme M'sila, Batna et Biskra. Elle est causée principalement par *Leishmania infantum*, dont le réservoir principal est le chien (**Belazzoug., 1986**), et le vecteur principal est *Phlebotomus perniciosus* (Izri et al., 1990). En Algérie, deux formes de leishmaniose cutanée sont endémiques : la leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ), causée par *Leishmania major* et présente dans les régions steppiques et sahariennes, et la leishmaniose cutanée du nord (LCN), selon Sergent & Gueidon, 1923) elle est causée par *Leishmania tropica* et connue sous le nom de « clou de Mila ».

I.3.2. - La fièvre des trois jour (fièvre à pappataci)

La fièvre des phlébotomes, également connue sous le nom de fièvre papatasi ou fièvre à phlébotome, tire son nom du premier vecteur identifié. Dans les anciens écrits, elle était appelée "fièvre pappataci", dérivé de l'italien pour "phlébotome". Cette maladie courante, non mortelle et spontanément résolutive, dure généralement 3 jours. Les symptômes typiques incluent des maux de tête, une fièvre soudaine, des malaises, des nausées, des douleurs aux membres, au dos, derrière les yeux, ainsi qu'une baisse rapide de la fièvre. Une encéphalite peut survenir en cas d'infection par l'espèce Naples. La période d'incubation est généralement de 3 à 4 jours, pouvant aller jusqu'à 6 jours, et le virus peut être détecté dans le sang

(Munstermann., 2019). Les travaux de Doerr et ses collaborateurs (1908) ainsi que ceux de Whittingham (1924) ont démontré le rôle des phlébotomes dans la transmission de cette maladie. En 1960, Schmidt et ses collègues ont isolé le virus de la fièvre à phlébotomes, qu'ils ont identifié comme étant du type Sicilien, à partir d'un échantillon de 2 500 femelles collectées dans la banlieue du Caire en 1959, parmi lesquelles de nombreux *Ph. papatasi* étaient inclus.

I.3.3. - Le Harara

La piqûre des phlébotomes peut déclencher une réaction cutanée prurigineuse, connue en Palestine sous le nom de « Harara » (Adler & Theodor, 1957). Les individus nouvellement arrivés dans les régions où ces moucheron sont abondants semblent être plus sensibles. Ils développent rapidement une éruption maculo-papuleuse, principalement sur les parties du corps exposées. Theodor (1935), dans une étude expérimentale, a démontré que la piqûre des phlébotomes entraîne une sensibilisation rapide, suivie d'une désensibilisation légère sur le long terme (Abonnenc., 1972).

I.3.4. - La bartonellose -bactérienne (*Bartonella bacilliformis*) microorganisme proche des bactéries

La bartonellose est une maladie humaine causée par une protéobactérie appelée *Bartonella bacilliformis*. Ce micro-organisme doit son nom à Alberto Barton, qui l'a découvert en 1905 dans le sang d'un patient. La bartonellose est également connue sous le nom de maladie de Carrión, en hommage à Daniel Alcides Carrión, un étudiant en médecine péruvien qui a sacrifié sa vie en 1885 lors de recherches sur cette maladie. *B. bacilliformis* se développe naturellement sur les globules rouges et dans le cytoplasme des cellules endothéliales. La période d'incubation de la bartonellose est généralement de 2 à 3 semaines. L'agent pathogène apparaît dans le sang avant l'apparition des symptômes et peut persister pendant des années (Munstermann., 2019).

I.4. - Les phlébotomes et la transmission des Arbovirus

Si les phlébotomes sont surtout connus pour transmettre les leishmanioses, force est de constater que depuis quelques années leur rôle apparaît croissant dans la transmission d'arbovirus. Ce rôle était probablement sous-évalué à cause du caractère peu pathogène de certains d'entre eux et à cause de la difficulté de diagnostiquer les arboviroses. L'avènement de nouvelles technologies moléculaires a permis de mieux comprendre la circulation de ces

arbovirus et d'en découvrir de nouveaux. Les arbovirus transmis à l'Homme par les phlébotomes appartiennent à trois genres : *Phlebotomus* (Bunyaviridae), *Orbivirus* (Reoviridae) et *Vesiculovirus* (Rhabdoviridae). Dans la plupart des cas, il a été démontré que les phlébotomes s'infectent lors des repas de sang sur des vertébrés ou par voie transovarienne ce qui explique pourquoi ces virus peuvent être isolés aussi bien des insectes mâles que des femelles. Le genre *Phlebotomus* renferme les virus, subdivisés en de nombreux sérotypes, responsables de syndromes méningés estivaux stériles appelés fièvres à phlébotomes, fièvres à papatasi ou encore fièvre des trois jours. Ces maladies fébriles sont répandues dans le bassin méditerranéen et le Moyen-Orient), elles sont très largement sous-estimées en raison de leur diagnostic difficile (**Gérard Duvallet et Vincent Robert., 2017**).

La plupart des arbovirus ont un cycle principal qui implique des hôtes vertébrés autres que l'homme. Ces hôtes présentent souvent une infection inapparente, témoignant d'une forme de parasitisme bien adaptée. Pour qu'un agent puisse être considéré comme un arbovirus, il est nécessaire d'observer son cycle de transmission dans la nature et de le reproduire dans des conditions contrôlées. Cependant, peu de virus répondent à ces critères. Certaines techniques expérimentales permettent de répondre partiellement aux critères de la définition des arbovirus. L'une de ces techniques consiste à infecter un hôte en lui inoculant une suspension virale ou en le piquant avec un arthropode infecté naturellement ou en laboratoire. Ensuite, un autre arthropode est nourri sur cet hôte pendant plusieurs jours consécutifs. Une fois écoulé un laps de temps suffisant pour que le virus puisse se multiplier chez l'arthropode et atteindre ses glandes salivaires (cycle extrinsèque), et pour exclure toute possibilité de transmission mécanique du virus, l'arthropode est nourri sur un nouvel hôte sensible. La transmission du virus, qui se manifeste soit par la maladie chez le nouvel hôte, soit par une virémie, soit par l'apparition d'anticorps, prouve que le cycle complet s'est accompli (Yamar BA.1999).

Un arbovirus est considéré comme nouveau lorsque, du point de vue antigénique, il ne peut être rattaché à aucune espèce virale déjà connue. Selon le "Comité américain sur les virus transmis par les arthropodes", on distingue plusieurs catégories : les non-arbovirus, les probablement non-arbovirus, les arbovirus possibles, les arbovirus probables et les arbovirus confirmés (**Yamar BA., 1999**).

I.4.1. - Les vecteurs d'arbovirus

D'après **Yamar BA.1999**, Les principaux vecteurs des arbovirus sont les moustiques, les tiques, les phlébotomes et les *Culicoides*. Pour être vecteur, l'arthropode doit remplir les

conditions suivantes : Le virus doit être isolé chez des spécimens capturés à l'état sauvage et ne portant pas de traces visibles d'un repas de sang.

Il doit être prouvé que l'arthropode peut s'infecter en se nourrissant sur un hôte vertébré virémique ou sur un substitut artificiel. Et Il doit être prouvé que l'arthropode peut transmettre biologiquement le virus par piqûre.

Il faudra posséder suffisamment de preuves pratiques d'une association importante des arthropodes infectés avec une population vertébrée appropriée dans laquelle la maladie ou l'infection sévit.

I.4.2. - Quelques arbovirus de phlébotome

Le virus Pacui, un phlébovirus faisant partie de la famille des *Bunyaviridae*, a été isolé au Brésil à partir de rongeurs forestiers (**Woodall, 1967 et Taylor, 1967**) et de phlébotomes de l'espèce *Lutzomyia Flaviscuetellata* (**Aitken et al., 1975**). Sa transmission transovarienne a été démontrée par **Hervé et ses collaborateurs en 1984**.

Le virus Toscana (TOSV) est un arbovirus appartenant à la famille des *Bunyaviridae*, qui regroupe des virus à ARN simple brin négatif enveloppés. Il est transmis à l'homme par la piqûre d'un phlébotome infecté du genre *Phlebotomus*. L'infection est généralement asymptomatique, mais elle peut provoquer des méningites aseptiques et des méningoencéphalites, notamment entre mai et octobre, dans les pays du nord de la Méditerranée, ainsi que dans certains pays de la Méditerranée orientale (**Tahir et al., 2015**).

Le genre *Orbivirus* est l'un des 15 genres distincts actuellement inclus dans la famille des *Reoviridae* ; le genre contient 22 espèces de virus distinctes reconnues par le Comité international pour la taxonomie des virus (ICTV) (Attoui et al., 2012). Les virus inclus dans le genre *Orbivirus* sont transmis par les moucheron culicoïdes, les tiques, les phlébotomines, ainsi que par les moustiques, anophéline et culicine (**Sandro et Silva., 2014**).

À ce jour, peu de recherches ont été réalisées sur les phlébovirus en Afrique du Nord, notamment en Algérie, malgré le fait que les phlébotomes sont capables de transmettre une large gamme de virus appartenant aux familles des *Phenuiviridae*, *Reoviridae* et *Rhabdoviridae*, tous transmis par les arthropodes (**Hemza Manseur et al., 2022**).

I.5. - La lutte contre les phlébotomes

La lutte contre les maladies transmises par les phlébotomes implique diverses méthodes, notamment la pulvérisation d'insecticides, l'utilisation de moustiquaires imprégnées

d'insecticides, la gestion de l'environnement ou aménagement du territoire et la protection individuelle par l'utilisation de répulsifs.

Chapitre II

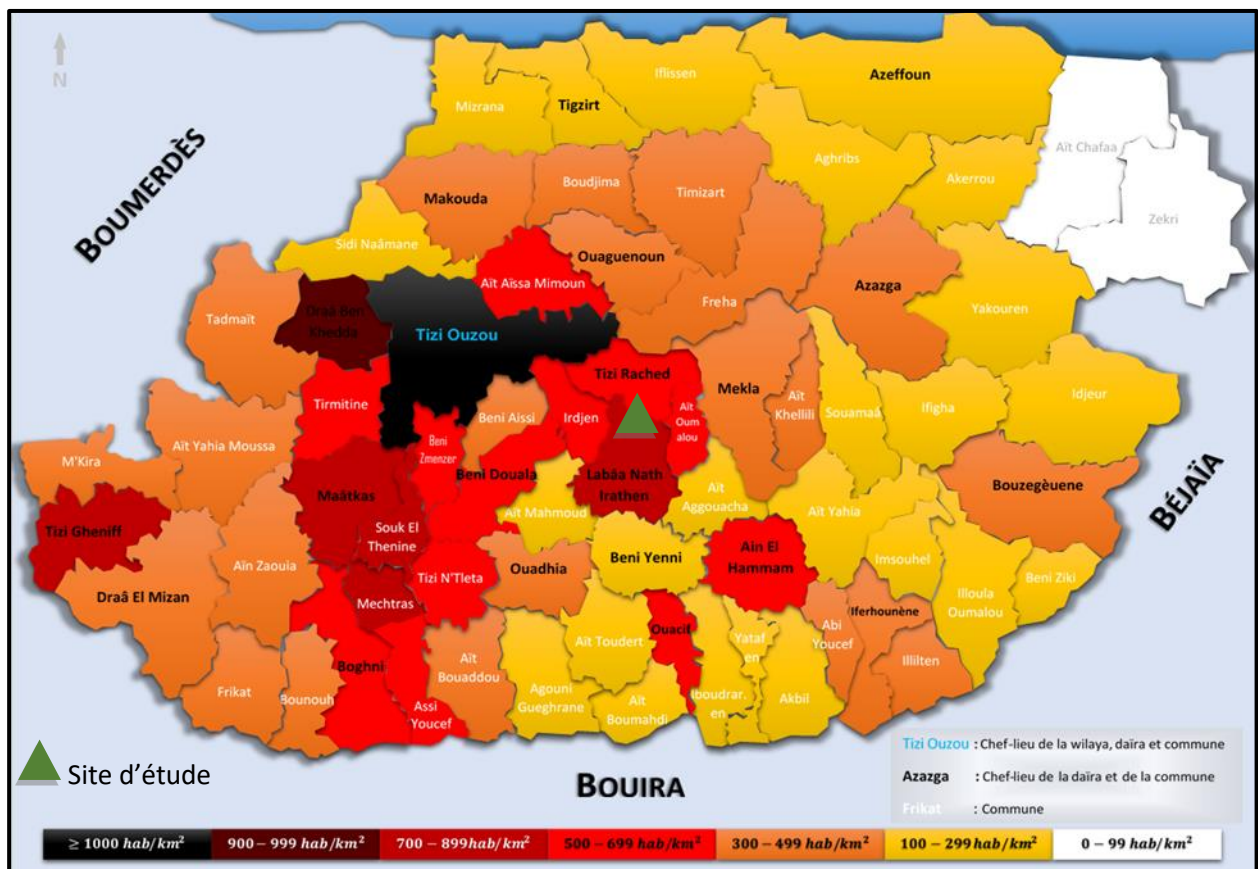
Matériels et méthodes

Ce chapitre présente une description de la région d'étude et le choix des stations d'étude en incluant les facteurs climatiques de la région choisie. Il aborde également Les diverses activités de terrain réalisées dans le cadre de notre recherche, suivies des différentes méthodes employées pour l'analyse des résultats.

II.1. - Région d'étude et climats

II.1.1. - Présentation de la région d'étude :

La wilaya de Tizi Ouzou est située dans la région de la Kabylie au nord de l'Algérie, s'étend sur 2 956 km² et compte plus de 1,1 million d'habitants. Cette région montagneuse est dominée par le massif du Djurdjura. Elle est bordée par la mer Méditerranée au nord, la wilaya de Boumerdès à l'ouest, Bouira au sud, et Béjaïa à l'est(figure7). Le climat est méditerranéen, avec des étés chauds et secs et des hivers doux (*Algerie-Monde.com*).



II.1.2. - Description et choix de la station d'étude

Notre étude s'est déroulée dans la région de Tizi-Rached, située dans la wilaya de Tizi-Ouzou. Elle est bordée au nord par Frèha et Assif n'Sibaou, au sud par Larbaâ n'ath Irathen et Irdjen, à l'ouest par Tizi-Ouzou (le chef-lieu de la wilaya), et à l'est par Mekla et Ath Oumalou. D'après **Matet., 2008**, le paysage de la daïra de Tizi Rached présente une grande diversité topographique : au nord, on trouve une vallée avec une altitude moyenne de 350 mètres, tandis qu'au sud, le relief montagneux atteint en moyenne 900 mètres d'altitude. Cette région se compose de trois types principaux de relief : vallées, coteaux et montagnes.

Le choix de cette localité repose sur la présence d'un grand nombre d'animaux, tels que des bovins, ovins, chats, rongeurs, ainsi qu'un refuge canin. Parmi ces chiens, plusieurs sont infectés par la leishmaniose, une maladie causée par un parasite dont le phlébotome est le vecteur, et le chien en est le réservoir. De plus, la présence du fleuve Sebaou crée un environnement humide, idéal pour le développement des phlébotomes. Cette combinaison de facteurs rend cette zone particulièrement pertinente pour l'étude de ces insectes.

II.1.3. - Facteurs climatiques de la région d'étude

II.1.3.1. - Température

La température joue un rôle crucial dans l'écologie et la biogéographie de tous les êtres vivants de la biosphère selon **Dajoz., 1985**. Elle constitue un élément écologique essentiel car elle exerce une influence continue sur les œufs, les larves, les nymphes et les adultes des insectes, comme l'indique **Chararas., 1980**.

Tableau 2 - Température minimales et maximales moyennes mensuelles de la région de Tizi-Ouzou durant la période du mois de janvier au mois de juillet 2024(O.N.M.TO., 2024).

	Jan	Fev	Mar	Avr	Mai	Juin	Juil
T°Moy/mensu en °C	13,7	14,1	16,8	17,2	21,4	26,0	30,1
T°Moy/mensu MINI	9,1	9,7	10,8	11,5	14,7	19,4	22,5
T°Moy/mensu MAX	18,3	18,5	22,8	22,8	28,1	32,6	37,2

Pour la période allant du mois de janvier au mois de juillet, le mois le plus chaud est juillet avec une température moyenne de 30,1°C, et le plus froid est le mois de Janvier avec une température de 13,7 (Tableau 2).

II.1.3.2. - Précipitation

Les précipitations mensuelles de la wilaya de Tizi-Ouzou sont importantes durant la période hivernale (O.N.M.TO, 2024) (Tableau 3).

Tableau 3 - Précipitations mensuelles de la wilaya de Tizi-Ouzou (2024).

	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai
2024	54,9	181,7	35,5	49	8,5

Le tableau 3 présente les Précipitations mensuelles de la wilaya de Tizi-Ouzou (2024). des précipitations de janvier à mai 2024 montre une forte variabilité mensuelle. Février se distingue par des précipitations exceptionnellement élevées (181,7 mm), tandis que mai est extrêmement sec avec seulement 8,5 mm. Janvier (54,9 mm), mars (35,5 mm), et avril (49 mm) enregistrent des niveaux de précipitations modérés, reflétant une alternance entre des périodes de pluie et des phases plus sèches. Cette tendance suggère un début d'année marqué par des événements météorologiques importants en février, suivi de conditions plus sèches à partir de mars jusqu'en mai.

II.1.3.3. - Humidité

Selon Dreux (1980), l'humidité représente la quantité de vapeur d'eau présente dans l'air. D'après Dajoz (1985), cette humidité affecte la longévité, la vitesse de développement, la fécondité et le comportement des espèces. Les valeurs moyennes d'humidité relative enregistrées dans la région d'étude sont répertoriées dans le Tableau 4.

Tableau 4 - Les valeurs moyennes d'humidité relative enregistrées dans la région d'étude (Tizi-rached) 2024.

	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai
2024	79	80	71	71	67

L'humidité reste globalement élevée de janvier à avril, avec des pourcentages autour de 70-80%, correspondant à des mois probablement assez humides. Cependant, en mai, l'humidité baisse davantage à 67%, indiquant un mois plus sec, en accord avec les précipitations très faibles de ce mois.

II.1.3.4. - Le diagramme ombrothermique de la région de Tizi-Ouzou

Le diagramme ombrothermique de Bagnouls et Guassen permet de suivre l'évolution des températures et des précipitations au fil du temps. Ce diagramme représente, sur le même graphique, les variations des températures moyennes et des précipitations, tracées sur deux axes parallèles en fonction du temps, avec une échelle où P= 20 mm correspond à T= 10 °C . Selon Bagnouls et Guassen, un mois est considéré comme sec lorsque le total mensuel des précipitations est inférieur ou égale à deux fois la valeur de la température moyenne mensuelle en °C (Figure 8).

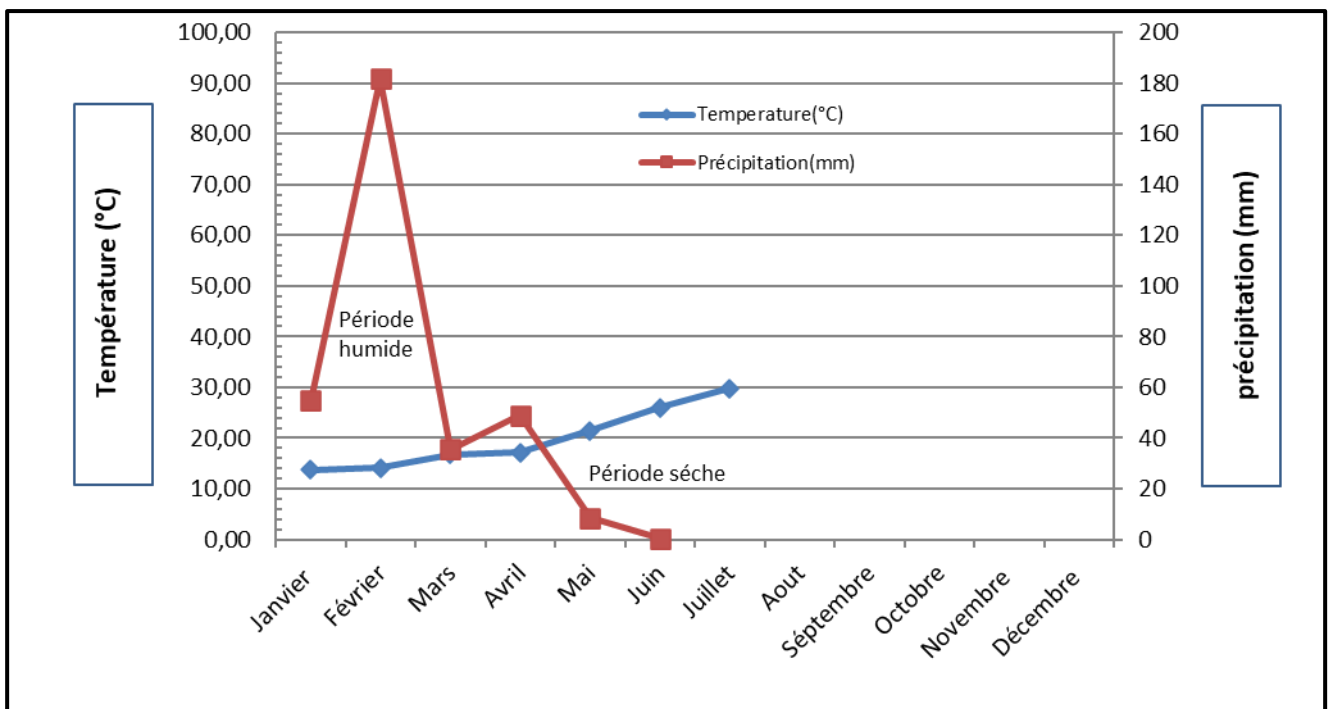


Figure 6 - Diagramme de Bagnouls et Guassen de la région de Tizi-Ouzou durant l'année d'étude 2024 (ONM 2024).

Le graphique montre trois périodes distinctes au cours de l'année. La **période humide** s'étend de janvier à mars, avec un pic de précipitations en février (environ 180 mm), tandis que les températures restent stables autour de 20°C à 25°C. En avril, il y a une **transition vers la période sèche**, marquée par une chute drastique des précipitations et une légère augmentation des températures. La **période sèche** s'installe de mai à juin, avec des précipitations très faibles voire nulles, et des températures qui continuent de grimper, atteignant environ 25°C à 30°C. Cette alternance saisonnière illustre une variation marquée entre une saison pluvieuse en début d'année et une saison sèche à partir du milieu de l'année.

II.1.3.5. - Quotient pluviométrique et étage bioclimatique d'Emberger :

Le climagramme d'Emberger permet de déterminer l'étage bioclimatique d'une région donnée. Emberger a défini cinq étages bioclimatiques : humide, sub-humide, aride, semi-aride et saharien. L'étage bioclimatique est déterminé à l'aide de la formule suivante :

Pour l'Algérie, on applique la formule élaborée par STEWART (1968 ; 1975) :

$$Q = 3.43/(M-m)$$

Q : le quotient pluviométrique d'Emberger .

P : pluviométrie annuelle moyenne en mm.

M : moyenne maximale du mois le plus chaud en °C .

m : moyenne minimale du mois le plus froid en °C .

Le quotient pluviométrique d'Emberger est calculé pour une période de 10 ans (2015-2024) pour la région de Tizi-Ouzou. Il est égal à 79,03 avec $p= 651.42$ MM, $m = 5,2^{\circ}\text{C}$ et $M= 39,1^{\circ}\text{C}$. Cela classe la région d'étude dans l'étage bioclimatique subhumide à l'hiver tempéré (Figure 8).

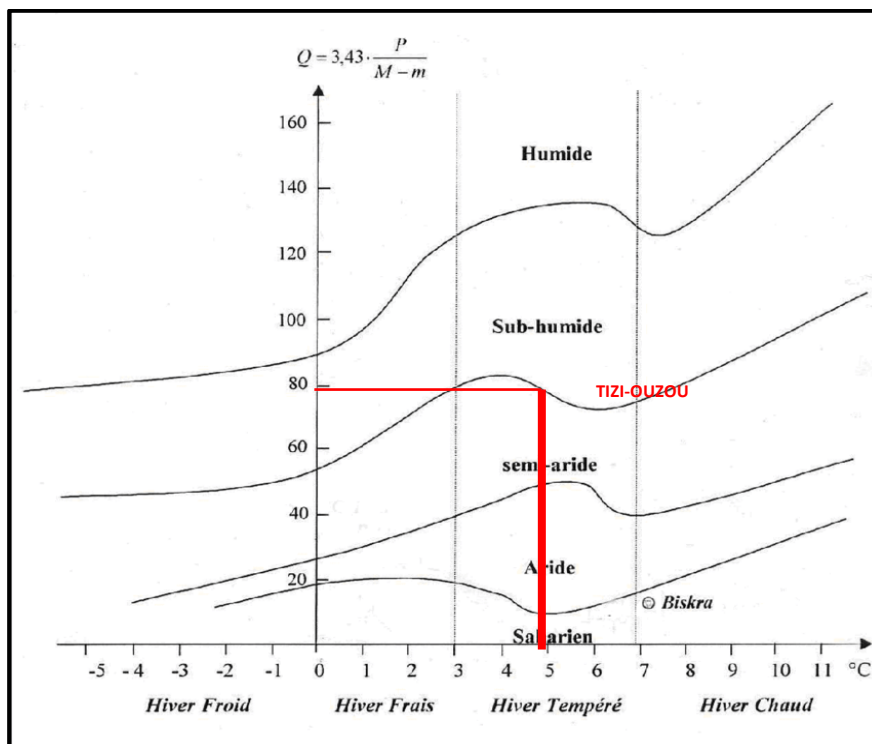


Figure 7 - Localisation de la région de Tizi-Ouzou sur le climagramme d'Emberger (ONM de Tizi-Ouzou, 2024).

Le graphique **figure 7** montre la localisation de la wilaya de Tizi-Ouzou sur le climagramme d'Emberger.

II.2. - Méthodes utilisés sur le terrain

L'objectif de ce travail est de quantifier la population de phlébotomes dans la région d'étude sélectionnée et d'identifier les espèces susceptibles de transmettre les arboviroses. Les captures et les échantillonnages ont été réalisés dans des biotopes favorables au développement des phlébotomes, tels que le refuge pour chiens (**Figure 8 B**) et la ferme ovines (**Figure 8 A**) situés dans la zone sélectionnée.



Figure 8 - A : Ferme ovine ; B : Refuge pour chiens (originale 2024)

II.2.1. - Les pièges huilés

Ce mode de capture repose sur les propriétés inodore et collante de l'huile de ricin. Les pièges mesurent 20 cm x 15 cm, recouvertes profondément d'huile de ricin sur les deux faces et suspendue à l'aide d'une ficelle (figure 9). Cette technique est probablement la plus appropriée pour réaliser un inventaire qualitatif et quantitatif des phlébotomes en région méditerranéenne, notamment pour les études chronologiques.

Les pièges sont placés tous les 15 jours de mois de Mars au mois de Juillet. Les feuilles adhésives sont suspendues dans des sites abritant des animaux (bovins, ovins, caprins, chiens, chats, etc.) à environ deux mètres au-dessus du sol (Figure 9).

Après 24 heures, les feuilles sont récupérées, comptées et regroupées par station, par date, géolocalisés puis placées dans des sacs en plastique parfaitement identifiés. Les phlébotomes pris aux pièges sont délicatement prélevés à l'aide d'un pinceau et conservés dans des tubes contenant de l'alcool à 95%.



Figure 9- A : piège huilé déposé ; B : piège huilé récupérer (originale, 2024).

II.2.2. - les pièges lumineux (CDC) :

Les pièges lumineux CDC sont largement utilisés pour capturer les phlébotomes vivants ainsi que tous les insectes attirés par la lumière, l'échantillonnage et peu sélectif afin de pouvoir identifier les principales espèces vectrices de maladies. Le piège se compose d'un ventilateur entraîné par un moteur, une lampe et un collecteur en toile de tissu à mailles fines, le système est alimenté par une batterie de 6 volts. Le dispositif aspire les phlébotomes en vol autour de l'appareil attirés par la lumière.

Les pièges sont installés en fin de journée, au crépuscule, et récupérés très tôt le matin. Ils sont placés dans des abris d'animaux (bovins, ovins, caprins) (figure 10). Pour éviter que les insectes capturés ne se dessèchent, les cages sont placées dans des sacs en plastique noir contenant une gaze ou un chiffon humide. Les sacs sont soigneusement scellés et envoyés rapidement au laboratoire, où les phlébotomes sont prélevés et mis à -80°C . Ce type de piège permet de collecter des spécimens vivants, soit pour établir des élevages, soit pour la détection moléculaire de divers pathogènes tels que les arbovirus, les parasites et les bactéries.



Figure 10 - Pièges CDC lumineux déposé dans notre zone d'étude (Original,2024)

II.3. - Méthodes utilisés au laboratoire**II.3.1. - Traitement des phlébotomes récupérés par les pièges huilés :**

Chaque tube contenant les phlébotomes est renversé dans une boîte pétrie contenant de l'alcool 70%. Pour l'identification morphologique, chaque phlébotome est disséqué sur une lame, la tête et les trois derniers segments de l'abdomen sont montés dans une goutte du milieu de montage du CMCP-10 (Polyscience) et le reste du spécimen (ailes, thorax et abdomen) est conservé dans un tube PCR contenant de l'alcool 70% à +4°C pour analyses ultérieures.

II.3.2. - Traitement des phlébotomes récupérés par les pièges lumineux (CDC) :

Les phlébotomes collectés par les pièges CDC sont poolés par 30 spécimens dans des tubes Eppendorf 2mL pour la détection et l'isolement des arbovirus.

II.3.3. - Extraction de l'ARN viral

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

II.3.3.1. - Etapes BSL 3**II.3.3.1.1. - Broyage et neutralisation des virus**

Cette étape est réalisée dans un laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 (BSL3) sous une hotte à flux laminaire (PSM) en utilisant des poches de glace pour assurer la conservation des virus (figure 11).

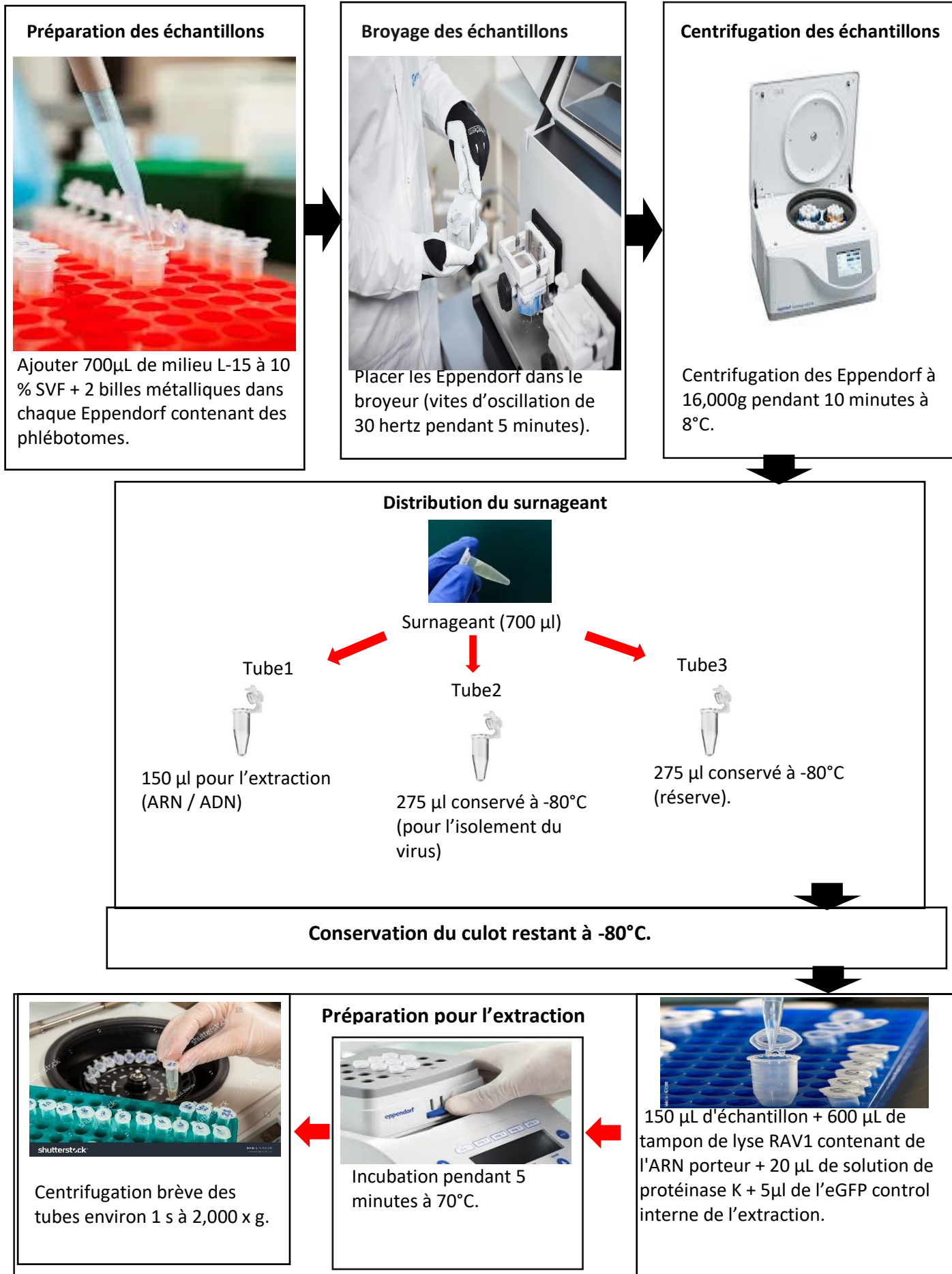


Figure 11- Schéma représentant le Processus de Broyage et de Neutralisation

II.3.1.1.2. - Etapes BSL 2 :

Après la phase de neutralisation des virus dans le BSL3, les échantillons sont envoyés vers le BSL2 pour la suite de l'extraction.

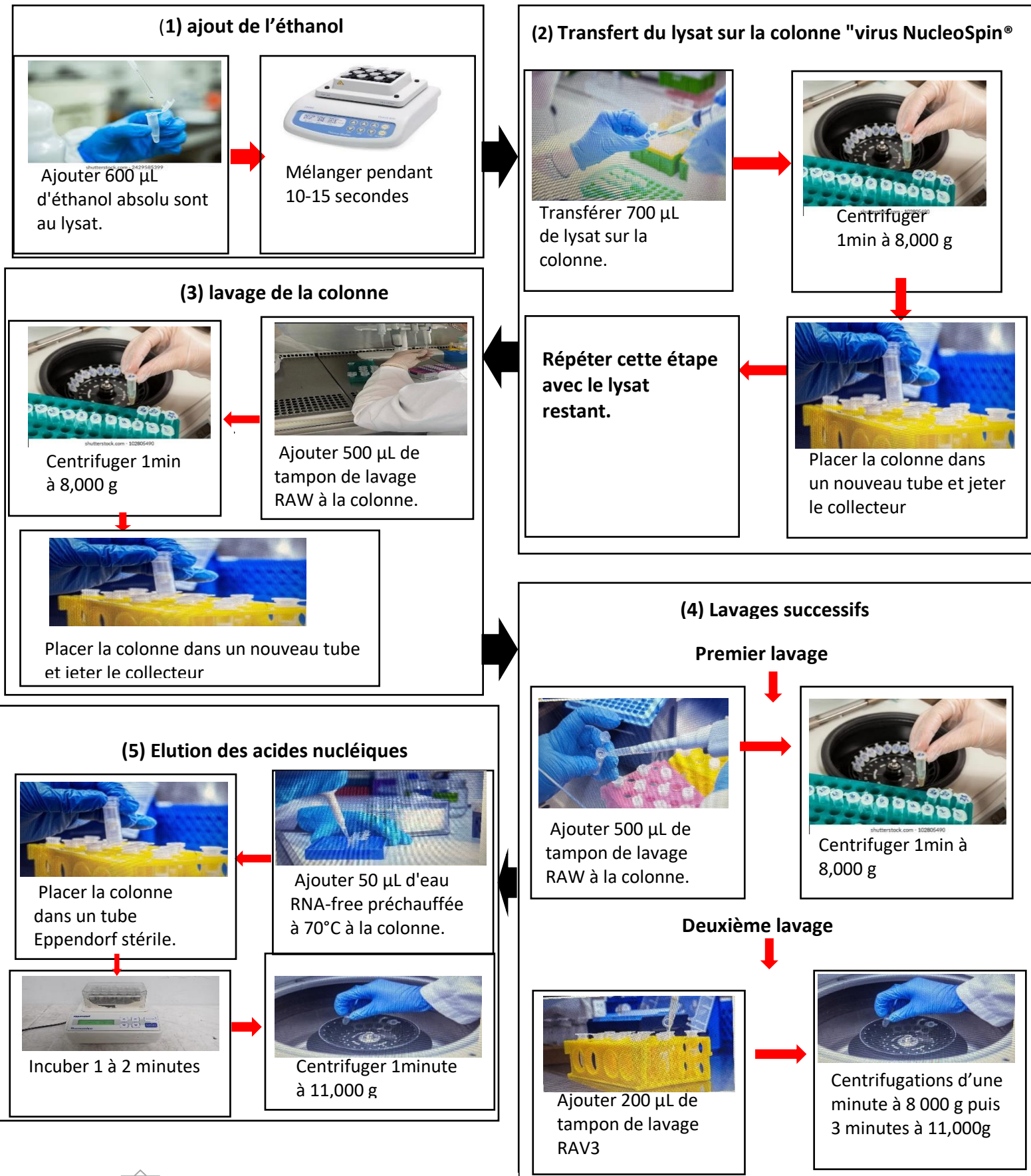


Figure 12- schéma représentant le Processus d'Extraction BSL-2

II. 4. Identification des virus par RT-PCR :**II.4.1. Principe de la RT-PCR :**

La RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) est une technique de biologie moléculaire utilisée pour détecter et amplifier l'ARN. Elle combine la transcription inverse (RT) de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) et l'amplification de l'ADNc en plusieurs copies.

II. 4.2. Protocole de la RT-PCR :**II.4.2.1- Préparation des mix d'amorces :**

Dans le cadre d'une réaction en chaîne par polymérase (PCR), visant à identifier le *virus Toscana*, nous avons utilisé des amorces et une sonde pour détecter la région du fragment du gène N (Tableau 5).

Tableau 5 - Séquences d'Amorces et de Sonde pour la Détection du Fragment du Gène N par PCR.

Amorce/Sonde	Séquence	Cible
TOS-50F	5'TGCTTTTCTTGATGAGTCTGCAG 3'	Région du fragment du gène N
TOS-138-R	5'CAATGCGCTTYGGRTCAAA 3'	
TOS-84 T probe	FAM- ATCAATGCATGGGTRAATGAGTTTGCTTACC- TAMRA	

Le tableau 5 décrit les éléments clés utilisés dans une technique PCR pour détecter un fragment du gène N du *virus Toscana*. Les amorces TOS-50F et TOS-138-R sont conçues pour se lier aux séquences spécifiques du gène cible, tandis que la sonde TOS-84 T Probe permet la détection en temps réel de l'ADN amplifié grâce à la libération de signal fluorescent.

Les mix de RT-PCR ont été préparés en respectant les volumes suivants (tableau 6). Les proportions sont les mêmes pour les deux plateformes et les trois panels.

Tableau 6 - Composition des Réactifs et Concentrations pour la Réaction qPCR de détection du Gène Cible.

Réactif	Conc. initiale	Conc. finale	Volume N=1
Nuclease-free water			7 µl
Primer F TOS-50-F	10 µM	0.4 µM	1 µl
Primer R TOS-138-R	10 µM	0.4 µM	1 µl
Probe TOS-84- P	5µM	0.2 µM	1 µl

Quanta			10 µl
Total			20 µl

Pour effectuer une réaction de PCR en temps réel afin de détecter le plasmide eGFP (témoin positif d'extraction), nous avons utilisé des réactifs avec des volumes précis, des amorces spécifiques et une sonde de détection, comme illustré dans le Tableau 7.

Tableau 7 - Préparation de la Réaction PCR en Temps Réel pour la Détection du Gène eGFP

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

Ce tableau 7 présente les quantités précises des réactifs nécessaires pour préparer une réaction de PCR en temps réel afin de détecter le gène eGFP, en utilisant des amorces spécifiques et une sonde de détection. Tous ces éléments jouent un rôle très important ; le **Luna Universal Probe Mix 2X** fournit les composants nécessaires à la réaction ; le **MgSO₄** fournit les ions magnésium essentiels à la polymérase ; les **amorces eGFP Forward et Reverse** ciblent le gène eGFP pour l'amplification ; la **sonde eGFP** permet la détection en temps réel par fluorescence ; le **ROX** (optionnel) sert de colorant de référence pour normaliser les signaux ; le **RNasin®** protège les ARN de la dégradation ; la **Luna WarmStart RT Enzyme Mix 20X** catalyse la transcription inverse et la PCR ; et l'**H₂O RNA-free** ajuste le volume final de la réaction. Le Volume final de 10 µl, soit : 7.5 µl du mix et 2.5 µl de l'extrait.

❖ **Le programme thermique de la PCR :**

Le programme thermique pour la réalisation d'une PCR en temps réel visant à détecter le gène eGFP inclut des températures et des durées précises pour chaque étape, ainsi qu'un nombre spécifique de cycles afin d'optimiser l'amplification et la détection du gène cible (Tableau 8).

Tableau 8 : Programme de PCR en Temps Réel pour la Détection du Gène eGFP

Programme			Cycles
	Target (°C)	Hold (hh :mm :ss)	
Stage 1	50	00 :10 :00	1
Stage 2	95	00 :01 :00	1
Stage 3	95	00 :00 :15	40
	60	00 :01 :00	

Le programme commence par une étape d'hybridation des sondes, suivie par une dénaturation initiale, puis par une série de cycles d'amplification. Chaque cycle comprend une dénaturation à 95 °C, suivie d'une étape d'hybridation des amorces à 60 °C, facilitant l'extension de l'ADN.

❖ **L'amplification des séquences de gène de résistance Vssg :**

Nous avons utilisé des amorces spécifiques pour cibler la séquence du gène de résistance Kdr comportant la mutation au niveau du canal ionique (Tableau 9), plus précisément le canal sodique Na⁺/K⁺ du canal sodique du potentiel d'action responsable entre autres de la dépolarisation du neurone, de la propagation du signal nerveux suivant le protocole de Bruno Gomes (Gomes et al, 2017).

Tableau 9 : Séquences d'Amorces Utilisées pour la Détection du Gène Codant le Canal Sodique Na⁺/K⁺ par PCR.

Amorce/Sonde	Séquence	Cible
Vssc8-F	5'AATGTGGGATTGCATGCTGG 3'	Canal sodique Na ⁺ /K ⁺
Vssc1b-R	5'CGTATCATTGTCTGCAGTTGGT 3'	

❖ Composition du mix pour la PCR :

Voici la composition du mix utilisé pour une réaction de PCR en temps réel destinée à détecter le gène Tosv, incluant les volumes et concentrations des réactifs utilisés pour chaque échantillon (Tableau 10).

Tableau 10: Préparation du Mix pour la PCR en Temps Réel Tosv

Réactif	Conc. initiale	Conc. finale	Volume N=1
Nucléase-free water			8 µl
Amorce Vssc8-F	20 µM	0.4 µM	0.5 µl
Amorce Vssc1b-R	20 µM	0.4 µM	0.5 µl
Master Mix			10 µl
Total			19 µl

Le tableau 10 présente la composition du mix de PCR en temps réel pour la détection du gène Tosv. Il détaille les volumes et concentrations des réactifs, avec un total de 19 µl de mix PCR, auquel on ajoute 1 µl d'extrait d'échantillon pour obtenir un volume final de 20 µl.

❖ Le programme thermique de la PCR :

Le programme thermique pour la réaction de PCR en temps réel, qui inclut les températures, les durées et les cycles nécessaires pour l'amplification et la détection de l'ADN cible, est décrit dans le tableau 11.

Tableau 11 : Programme de PCR en Temps Réel

Programme			Cycles
	Target (°C)	Hold (hh :mm :ss)	
Stage 1	95	00 :05 :00	1
Stage 2	95	00 :00 :30	35
	56	00 :00 :30	
	72	00 :00 :30	
Stage 3	72	00 :07 :00	1

Le tableau 11 représente Le Programme de PCR en Temps Réel ; il commence par une dénaturation initiale à 95 °C pour séparer les brins d'ADN, suivie de 35 cycles comprenant une

dénaturation à 95 °C, une hybridation à 56 °C et une extension à 72 °C. Il se termine par une extension finale à 72 °C pour compléter l'amplification des produits.

II.4.3. Visualisation des résultats d'amplification sur gel d'agarose à 2% :

Nous avons utilisé la technique d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % pour vérifier la qualité de notre extraction. Si l'ADN est présent, il apparaîtra sous forme de bandes fluorescentes lorsque le gel est visualisé sous un transilluminateur dans une chambre noire. En cas d'échec de l'extraction, aucune trace d'ADN ne sera visible.

II.4.3.1. Préparation du gel d'agarose :

2 comprimés d'agarose sont pesés pour préparer un gel à 2% dans 50mL de tampon TBE 0,5X. La solution est chauffée au micro-ondes jusqu'à ce qu'elle soit claire et homogène, puis laissée refroidir sans trop attendre pour éviter la solidification. Un colorant d'ADN est ajouté à la solution. Celle-ci est ensuite délicatement versée dans un plateau de gel, en prenant soin d'éliminer les bulles d'air.

Un peigne est positionné à une extrémité pour former les puits. Après 20-30 minutes de solidification à température ambiante, le peigne est retiré et le gel est placé dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon de migration.

Les échantillons d'ADN, mélangés à un colorant de charge, sont ensuite chargés dans les puits à l'aide d'une micropipette. Puis le gel est soumis à un courant électrique (80-120 V) pour permettre la migration des fragments d'ADN, qui pourront être visualisés sous lumière UV après l'électrophorèse.

II.5. - Séquençage

Le séquençage de l'ADN est une méthode utilisée pour déterminer l'ordre des nucléotides (A, C, G, T) présents dans un brin d'ADN. Il existe plusieurs méthodes de séquençage tel que méthode de Sanger, séquençage par synthèse, par hybridation.

On utilise la méthode de Sanger dans notre étude.

II.5.1. - Méthode de Sanger

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

Les amplicants PCR ont été purifiés en utilisant le protocole Exosap qui consiste à éliminer l'excès des amorces, des nucléotides et les trainés d'ADN.

La réaction de séquençage se fait comme suit :

Purification à l'ExoSap

2 µl ExoSap + 5 µl d'amplicon d'échantillon

Echantillons :

Profil thermique (ExoSAP Express):

4 min 37°C

1 min 80°C

Echantillons PCR Kdr

❖ La composition du mix forward pour la PCR :

Voici la composition du mélange pour l'amorce forward, en indiquant les volumes des réactifs nécessaires pour préparer le mélange, que ce soit pour un seul tube ou pour cinq tubes, ainsi que le volume final de la réaction(tableau12).

Tableau 12: Préparation du Mix d'Amorce Forward pour PCR

Réactif	Conc. initiale	Conc. Finale	Volume 1 tube	Volume 5 tubes
Buffer Dye			1 µl	5 µl
Amorce Vssc8-F	10 µM	0.5 µM	0.5 µl	2.5 µl
Big dye			2 µl	10 µl
Eau Rnase free			5.5 µl	27.5 µl
Total			9 µl	45 µl

Le **tableau 12** fournit les volumes nécessaires pour préparer le mix d'amorce forward utilisé dans la PCR, avec des quantités spécifiques pour un seul tube et pour cinq tubes. Le mélange final de 10 µl par tube est composé de 9 µl du mix et de 1 µl d'ADN purifié.

❖ La composition du mix pour l'amorce reverse :

Le tableau 13 décrit la composition du mélange pour l'amorce reverse, en fournissant les détails sur les volumes des réactifs nécessaires pour une préparation optimale des tubes de PCR.

Tableau 13 : preparation du Mix Amorce reverse:

Réactif	Conc. initiale	Conc. Finale	Volume 1 tube	Volume 5 tubes
Buffer Dye			1 µl	5 µl
Amorce Vssc1b-R	10 µM	0.5 µM	0.5 µl	2.5 µl
Big dye			2 µl	10 µl
Eau Rnase free			5.5 µl	27.5 µl
Total			9 µl	45 µl

Le **Tableau 13** détaille la préparation du mix pour l'amorce reverse dans une réaction de PCR, incluant les volumes nécessaires pour chaque réactif : 1 µl de Buffer Dye, 0.5 µl d'amorce Vssc1b-R, 2 µl de Big Dye, et 5.5 µl d'eau RNase-free pour un tube, avec des quantités ajustées pour cinq tubes. Le mélange total de 9 µl est complété par 1 µl d'ADN purifié, pour obtenir un volume final de 10 µl par tube.

❖ **Le profil thermique de la PCR :**

Le **tableau 14** ci-dessous présente le profil thermique détaillé pour la réaction de PCR, incluant les températures, durées et cycles spécifiques nécessaires pour chaque étape du programme.

Tableau 14 - Profil thermique de la PCR

Programme			Cycles
	Targat (C°)	Hold (hh :mm :ss)	
Stage 1	50	00 :30 :00	1
Stage 2	94	00 :01 :00	1
Stage 3	94	00 :00 :30	55
	55	00 :01 :00	
	72	00 :01 :00	
	72	00 :10 :00	1

Le profil thermique commence par une étape d'hybridation à 50 °C, suivie d'une dénaturation initiale à 94 °C. Ensuite, il passe par 55 cycles comprenant une dénaturation à 94

°C, une hybridation à 55 °C, et une extension à 72 °C. Le programme se termine par une extension finale de 10 minutes à 72 °C.

Chapitre III

Résultats

Dans ce chapitre, nous synthétisons les résultats de nos différentes expériences sur les phlébotomes, incluant les inventaires réalisés avec les pièges CDC et les pièges huilés, les résultats de la détection moléculaire du *virus Toscana*, ainsi que les résultats des tests PCR concernant le gène de résistance aux insecticides.

III.1. - Résultats de l'inventaire des phlébotomes récoltés dans la région de Tizi-Ouzou

Au cours d'une période de cinq mois, nous avons pu capturer un total de 759 phlébotomes à l'aide de pièges huilés tableau (15), répartis en trois espèces différentes. En comparaison, les pièges CDC ont permis de capturer 150 phlébotomes, toutes espèces confondues.

III.1.1. - Résultats d'effort d'échantillonnage des phlébotomes capturés par les pièges adhésifs

L'identification des phlébotomes récupérés par les pièges huilés est résumé dans le **tableau 16**.

Tableau 15 : le nombre de phlébotomes capturés par la technique des pièges huilés dans la région de Tizi-Rached.

	Nombre de pièges		Nombre individus		Total
	Déposés	Récupérés	Mâles	Femelles	
Mars	20	15	25	5	30
Avril	30	25	45	19	64
Mai	60	50	95	85	180
Juin	75	65	58	112	170
Juillet	85	75	65	250	315
Total	270	230	288	471	759

Au total, 230 pièges huilés ont été récupérés ce qui représente $13,8 \text{ m}^2$ ($0,2\text{m} * 0,15\text{m} * 2$ faces du pièges) de surface couverte par les pièges récupérés avec une densité moyenne de 55 femelles et 34,13 mâles par mètre carré. Le tableau montre le nombre de phlébotomes capturés dans la région de Tizi-Rached à l'aide des pièges huilés, réparti sur 05 mois, de mars à juillet. Au total, 270 pièges ont été déposés, dont 230 ont été récupérés. Le nombre d'individus capturés

varie au fil des mois, avec un pic en juillet où 75 pièges ont permis de capturer 65 mâles et 250 femelles. Sur l'ensemble de la période, 288 mâles et 471 femelles ont été capturés, pour un total illustre une variation saisonnière dans la capture des phlébotomes, avec une activité plus intense en été, notamment en juillet suggérant des périodes spécifiques de prolifération des phlébotomes dans cette région.

III.1.2. - Résultats des espèces de phlébotomes capturés par les pièges adhésifs

Les résultats des espèces de phlébotomes récoltés par les pièges adhésifs durant cinq mois d'échantillonnage sont regroupés dans le tableau 15 et 16.

Tableau 16 - Résultats d'espèces de phlébotomes capturés par les pièges adhésifs.

Genres	Sous genres	Espèces	Mâles	Femelles	Richesse totale
<i>Phlebotomus</i>	<i>Phlebotomus</i>	<i>papatasi</i>	96	128	3 espèces
	<i>Paraphlebotomus</i>	<i>sergenti</i>	147	174	
<i>Sergentomyia</i>	<i>Sergentomyia</i>	<i>minuta</i>	45	169	
Totale			288	471	

Le tableau présente une analyse des phlébotomes capturés dans la zone de Tizi-Rached , montrant la présence de 03 espèces appartenant à deux genres différents: *Phlebotomus* et *Sergentomyia*. Le nombre de femelles capturés est nettement supérieur à celui des mâles puisque plus les captures avancent dans le temps plus de femelles sont rencontrées dans la nature ce qui est lié à la longévité moins importante des mâles comparée à celle des femelles qui vivent plus longtemps (Figure 13).

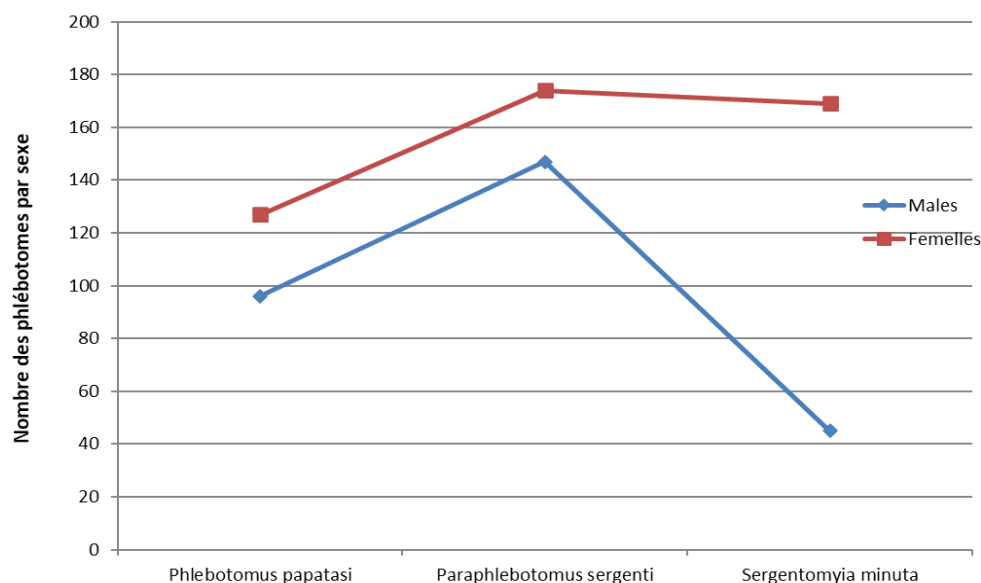


Figure 13 - Répartition des phlébotomes capturés par les pièges adhésifs en fonction des espèces et par sexe.

III.2. - Résultats de la détection moléculaire

III.2.1. - Analyse des phlébotomes capturés par les pièges CDC

Les pièges lumineux de type CDC on était placés dans la région de Tizi-Rached pendant 5 nuits entre le mois de juin et juillet. On a pu récupérer un total de 150 phlébotomes qui ont été répartis en 5 Pools de 30 phlébotomes chacun pour la détection du virus *Toscana* par la technique RT-PCR. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 17 - Nombre de phlébotomes capturés par les pièges CDC

Région	Date	Totale des phlébotomes
Tizi-Rached	27 juin 2024	10
	2 juillet 2024	26
	3 juillet 2024	48
	4 juillet 2024	66
Totale		150

Le tableau présente une augmentation progressive du nombre de phlébotomes capturés à Tizi-Rached entre le 27 juin et le 04 juillet. On constate que le nombre de phlébotomes capturés passe de 10 le 27 juin à 66 le 04 juillet, en passant par 26 à 48 les 2 et 3 juillet respectivement. Cette tendance à la hausse pourrait refléter une augmentation de l'activité des phlébotomes dans

la région durant cette période. Cette évolution peut être liée à divers facteurs environnementaux ou climatique, ou à une croissance de la population des phlébotomes.

III.2.2 - Résultats de la RT-PCR

Les 150 phlébotomes ont été poolés en 5 pools et tous se sont avérés négatifs au Toscana virus (**Tableau 15**).

Tableau 18 - Nombre de phlébotomes dans chaque pool et les résultats de la RT-PCR

Pools	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 3	Pool 4	Pool 5	Total
Nombre des phlébotomes	30	30	30	30	30	30	150
Résultats de la RT-PCR	Négatifs	Négatifs	Négatifs	Négatifs	Négatifs	Négatifs	

Les résultats de la RT-PCR pour les 5 pools de 30 phlébotomes chacun pour la détection du virus *Toscana* sont tous négatifs.

Les résultats montrent l'absence du virus dans les espèces de phlébotomes échantillonnés dans la région de Tiz-Rached (Figure 14).

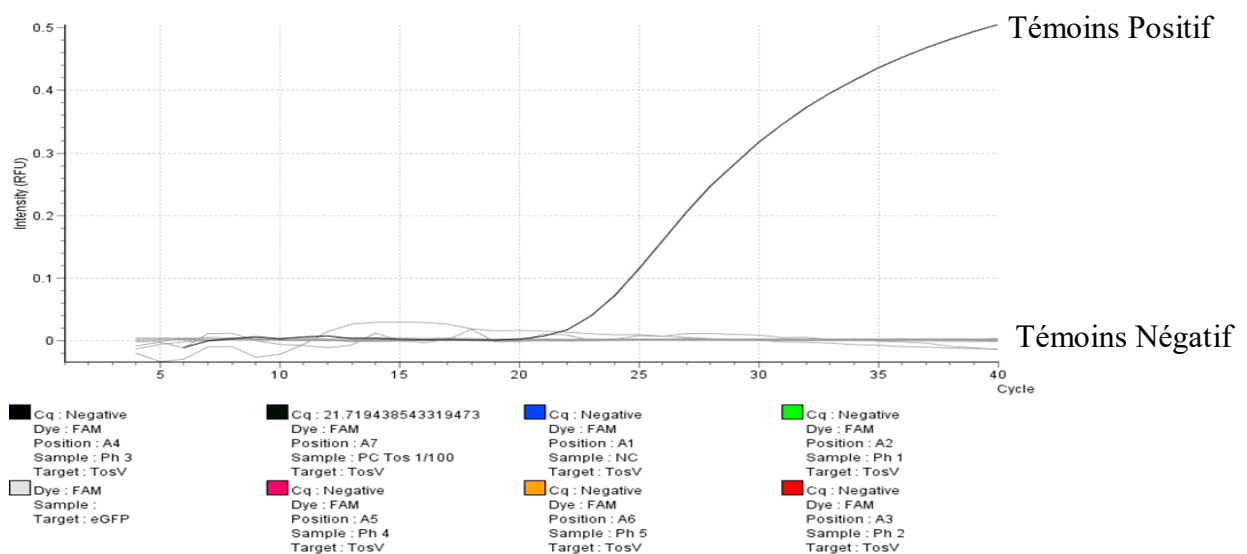


Figure 14 - Résultats de la détection moléculaire par la RT-PCR

Le graphique de qPCR montre une amplification positive pour l'échantillon de contrôle (PC TosV) avec un Cq de 21,7, indiquant la présence du virus Toscana. Tous les autres échantillons, ainsi que le contrôle négatif (NC), n'ont pas montré d'amplification, suggérant l'absence de TosV dans ces échantillons. Le test est valide avec un résultat positif uniquement pour l'échantillon de contrôle.

III.2.3. - Résultats de l'identification moléculaire des espèces de phlébotomes

Les résultats de l'identification moléculaire des espèces de phlébotomes sur le gel d'agarose à 2% des bandes amplifiées du canal sodique selon les espèces, sont représentés dans le tableau 19.

Tableau 19 - Résultats de l'identification moléculaire des échantillons sur gel d'agarose 2% des bandes amplifiées du canal sodique selon les espèces.

	Résultats	Espèces	Echantillon	Résultats	Remarque
P 2	+/-	<i>Se. minuta</i>	P 11	/	<i>Se. minuta</i>
P 3	+	<i>Ph. papatasi</i>	P 12	/	<i>Se. minuta</i>
P 4	+	<i>Ph. papatasi</i>	P 13	/	<i>Se. minuta</i>
P 5	+	<i>Ph. papatasi</i>	P 14	/	<i>Se. minuta</i>
P 6	+	<i>Ph. papatasi</i>	P 16	+	<i>Ph. papatasi</i>
P 7	+/-	<i>Ph. papatasi</i>	P 17	+	<i>Ph. papatasi</i>
P 8	+/-	<i>Ph. sergenti</i>	P 18	+	<i>Ph. sergenti</i>
P 9	+	<i>Ph. sergenti</i>	P 19	+	<i>Se. minuta</i>
P 10	+	<i>Ph. sergenti</i>	P 20	+	<i>Se. minuta</i>

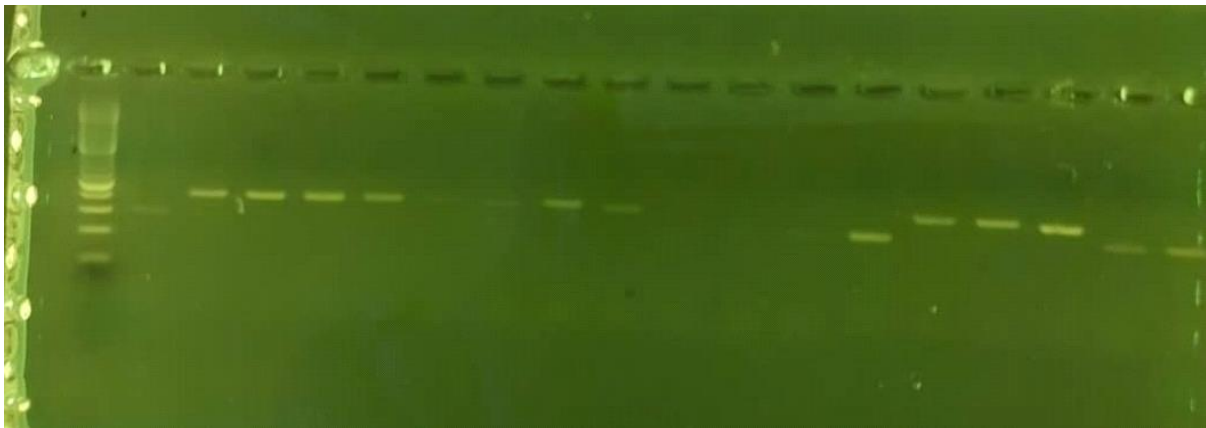
/ : absence d'amplification de la cible ; + : amplification de la cible ; +/- : amplification faible de la cible.

Ce tableau présente les résultats d'amplification de la cible Vssg la région du gène du canal sodique qui pourrait porter la mutation responsable de la résistance des phlébotomes aux insecticides tel que les pyréthriinoïdes (ex : Deltaméthrine) et la DDT. 4 *Sergentomyia minuta* n'ont pas pu être amplifiés qui pourrait être lié à la qualité d'extraction de l'ADN génomique ou échec d'hybridation des amorces à la cible par la présence d'une éventuelle mutation au niveau des sites d'attachement des amorces.

III.2.4. - Résultats PCR gène résistance

18 spécimens appartenant aux trois espèces ont été analysés pour la détection éventuelle de la mutation responsable de l'apparition de la résistance chez les phlébotomes pour

l'insecticide DDT et la deltaméthrine au niveau du pompe Na^+/K^+ localisée au niveau des élongations nerveuses qui permettent au signal nerveux de se propager. Les spécimens appartenant au genre *Phlebotomus* ont donné une bande d'environ 400pb (Ph3 au Ph 10 et Ph 16, 17 et 18) tandis que le reste des spécimens appartenant au genre *Sergentomyia* ont exhibé une bande d'environ 300pb (Figure 15). Seulement un témoin négatif a été utilisé et pas de témoin positif car c'est le premier travail effectué en Algérie et au Maghreb concernant la détection de cette mutation.



T- PM P2 P3 P4 P5 P6 P7 P8 P9 P10 P11 P12 P13 P14
P16 P17 P18 P19 P20

Figure 15 - Résultats de l'identification moléculaire des échantillons sur gel d'agarose 2% des bandes amplifiées du canal sodique (détails des échantillons analysés).

L'analyse génétique de 18 spécimens de phlébotomes a révélé une distinction entre les genres **Phlebotomus** et **Sergentomyia** concernant la résistance aux insecticides DDT et deltaméthrine. Les spécimens de *Phlebotomus* ont montré une bande de **400 pb**, suggérant la présence potentielle d'une mutation liée à la résistance, tandis que ceux de *Sergentomyia* ont exhibé une bande de **300 pb**, indiquant une différence génétique. L'absence de témoin positif complique l'interprétation, mais ces résultats préliminaires laissent penser que *Phlebotomus* pourrait être plus résistant aux insecticides, ce qui a des implications pour les stratégies de lutte contre ces vecteurs.

III.2.4.1. - Résultats du séquençage d'ADN des phlébotomes pour l'étude de la résistance aux insecticides

Tous les spécimens qui ont données un signal positif ou faiblement positif ont été séquencés et blastés dans la base de données GenBank pour la recherche de la mutation responsable de l'apparition de la résistance à la DDT et à la deltaméthrine. La traduction en

acide aminé de la séquence amplifiée 300 et 400 pb de la région Vssc du gène du canal sodique a révélé l'absence de mutation leucine => phénylalanine (L1014F) ou la mutation leucine => sérine (L1014S) à la position 1014. Ce qui est écrit en grande police c'est la position 1014 du gène canal sodique où la mutation pour la résistance devrait être trouvée, dans notre cas les spécimens sont sensibles puisqu'il n'y a pas de mutation. le codon TTA code pour l'acide aminé Leucine, pour les résistants la mutation correspond au code TTC ou TTT qui code pour l'acide aminé phénylalanine et sérine respectivement (Figure 16).

<i>Phlebotomus</i>	<i>papatasi_souche</i>	sensible_MH401417_	
MWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVVLNLFLALLLSNFGSSSLAAPTADNDT			
<i>Phlebotomus</i>		<i>papatasi_TiziOuzou_</i>	
MWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVVLNLFLALLLSNFGSSSLAAPTADNDT			
<i>Phlebotomus</i>		<i>sergenti_TiziOuzou_</i>	
MWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVVLNLFLALLLSNFGSSSLAAPTADNDT			
<i>Sergentomyia</i>		<i>minuta_TiziOuzou_</i>	
MWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGNLVVLNLFLALLLSNFGSSSLAAPTADNDT			
<i>Phlebotomus</i>	<i>papatasi_TiziOuzou</i>		1
ATGTGGGATTGCATGCTGGTGGGAGATGTGTCATGCATTCCTTTCTTCTTGGCAACT			
GTA 62			
<i>Phlebotomus</i>	<i>sergenti_TiziOuzou</i>		1
ATGTGGGATTGCATGCTGGTGGGAGATGTGTCATGCATTCCTTTCTTCTTGGCAACT			
GTA 62			
<i>Sergentomyia</i>	<i>minuta_TiziOuzou</i>		1
ATGTGGGATTGCATGCTGGTGGGGGATGTGTCGTGCATCCCCTTCTTCTTAGCAACT			
GTA 62			
<i>Phlebotomus</i>	<i>papatasi_souche</i>	référence	1
ATGTGGGATTGCATGCTGGTGGGAGATGTGTCATGCATTCCTTTCTTCTTGGCAACA			
GTA 61			
<i>Phlebotomus</i>	<i>papatasi_TiziOuzou</i>		63
GTAATTGGGAATTTAGTCGTGAGTATGAAATTGAATATGATATTCAACACTCCTGGT			
TGG 122			
<i>Phlebotomus</i>	<i>sergenti_TiziOuzou</i>		63
GTAATTGGGAATTTAGTCGTGAGTATGAAATTGAATATGATATTCAACACTCCTGGT			
TGG 122			
<i>Sergentomyia</i>	<i>minuta_TiziOuzou</i>		63
GTTATTGGGAATTTAGTCGTGAGTATGAAATT-AATAT 99			
<i>Phlebotomus</i>	<i>papatasi_souche</i>	référence	62
GTAATTGGGAATTTAGTCGTGAGTATGAAATTGAATATGATATTCAACACTCCTGGT			
TGG 121			

Figure 16 - Résultats du séquençage de l'ADN des phlébotomes avec la méthode de sanger.

Les analyses génétiques des phlébotomes ont révélé l'absence de mutations au niveau de la position 1014 du gène du canal sodique, mutations généralement associées à la résistance aux insecticides DDT et deltaméthrine. Aucun spécimen n'a montré les mutations **L1014F** (leucine en phénylalanine) ou **L1014S** (leucine en sérine), indiquant que les phlébotomes restent sensibles à ces insecticides. Cela suggère une absence de résistance génétique dans cette population, probablement en raison d'une exposition limitée aux insecticides dans la région étudiée.

Chapitre IV

Discussion

Ce chapitre analyse les différents résultats obtenus lors de notre recherche d'arbovirus transmis par les phlébotomes dans la région de Tizi Rached. Nous discuterons des résultats issus de l'identification des phlébotomes capturés par les pièges huilés et de pièges CDC, Nous aborderons également les résultats de la détection moléculaire du virus Toscana et de l'analyse du gène de résistance.

IV.1. - discussion des résultats de l'identification des phlebotomes collectés :

Les phlébotomes sont de petits insectes volants de la famille des Psychodidae ils ont été signalés pour la première fois en Algérie en 1912 par FOLEY et LEDUC. Reconnus pour leur rôle en tant que vecteurs de maladies comme la leishmaniose et certains arbovirus. A ce jour, 24 espèces de phlébotomes appartenant aux genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia* ont été recensées en Algérie et certaines espèces sont impliquées principalement dans la transmission de la leishmaniose et également des arbovirus (**Lafri et al., 2021, Benallal et al., 2022**). Les phlébotomes transmis par les phlébotomes (SBP) sont largement répandus dans le monde entier avec une épidémiologie et une menace pour la santé publique variables.

Au cours de notre étude, nous avons capturé un total de 909 phlébotomes, dont 150 à l'aide de pièges CDC et 759 grâce à des pièges huilés. Parmi les spécimens identifiés, trois espèces ont été répertoriées, réparties en deux genres : *Phlebotomus* (71,8 %) et *Sergentomyia* (28,19 %).

Ces résultats sont en accord avec d'autres études menées en Algérie. En **2015., Alkan et al.** ont identifié cinq espèces de phlébotomes dans la région de Draa El Mizan, réparties entre les genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia*. De même, **Mouloua et al., 2014** ont répertorié un total de sept espèces appartenant à ces deux genres. En **2017., Khemar et Silem** ont rapporté des résultats similaires dans les régions de Ouacif et Ouadhia, confirmant la présence de plusieurs espèces des deux genres.

Des études antérieures montrent également une grande diversité de phlébotomes en Algérie. **Harrat., 2006** a recensé dix espèces dans la région de Draa El Mizan et Boghni, tandis que **Belazzoug., 1991** a identifié vingt-deux espèces à l'échelle nationale, dont 12 appartenant au genre *Phlebotomus* et 10 au genre *Sergentomyia*.

Parmi les trois espèces identifiées, *Paraphlebotomus sergenti* est la plus abondante dans la région, représentant 42,3 % des spécimens capturés, suivie de *Phlebotomus papatasi* avec 29,5 %, et enfin *Sergentomyia minuta*, qui constitue 28,19 % de l'ensemble.

En 2011., **Berdjane-Brouk et al.** ont signalé la découverte d'une nouvelle espèce de phlébotome capturée à Larba Nath Irathen, en Kabylie. Il s'agit de *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* **GRASSI., 1908**, ainsi que de la femelle de *Phlebotomus (Larroussius) chadlii* (**RIOUX, JUMINER et GIBILY., 1966**). Il convient de noter que le mâle de cette dernière espèce avait déjà été signalé en Algérie par Rioux en 1970, puis par Dedet et al. en 1984 (**Dedet et al., 1984**).

Paraphlebotomus sergenti (**Guglielmo., 1917**) a longtemps été suspecté d'être impliqué dans les foyers de leishmaniose cutanée causée par *Leishmania tropica* (**Adler et al., 1929 ; Nadim et al., 1979**). Toutefois, son identification en tant que "vecteur principal" ne date que de 1988, lorsque deux souches ont été isolées en Arabie Saoudite et déterminées par des méthodes enzymatiques (**Al-Zahrani et al., 1989**).

Dans notre étude, *Paraphlebotomus sergenti* est l'espèce la plus dominante et la plus abondante, probablement en raison de son adaptation au climat subhumide, à la présence de microhabitats favorables et à la proximité des réservoirs naturels et des habitations humaines et aussi sa résistance à la sécheresse contribue également à sa prédominance. Plusieurs études précédentes confirment cette prédominance. **Berdjane-Brouk et al., 2011, Harrat et al., 1996, et Mouloua et al., 2014** ont tous enregistré la domination de *P. sergenti* dans la région de Tizi Ouzou, ce qui valide les résultats obtenus durant notre étude.

IV.2. - Discussion des Résultats de la détection moléculaire :

Les 150 phlébotomes capturés à l'aide des pièges CDC ont été regroupés en cinq pools de 30 spécimens chacun pour la détection du virus Toscana par RT-PCR. Cependant, les résultats des cinq pools analysés se sont révélés négatifs. Cela pourrait être attribué au faible nombre de pools testés. En effet, dans une étude menée par **Alkan et al en 2015**, plus de 200 pools et 21 998 phlébotomes ont été nécessaires pour identifier un seul pool positif. De plus, les conditions climatiques défavorables et le manque de matériel adéquat ont influencé négativement le nombre de phlébotomes capturés avec les pièges CDC. À cela s'ajoute la sensibilité des arbovirus, dont l'ARN peut se détériorer facilement en cas de manipulation inadéquate ou si les phlébotomes sont transportés dans des conditions non optimales. Toutefois l'études (**alkan et al; 2015**) indiquent une possible circulation du virus dans la région, notamment grâce à la présence de *Phlebotomus*, les principaux vecteurs du TOSV, en Algérie. Cependant, les preuves directes de la présence du virus en Algérie sont rares, et des recherches supplémentaires sont

nécessaires pour évaluer l'étendue de la transmission du virus et son impact potentiel sur la santé publique. D'autres études indiquent une possible circulation d'autres phlebovirus comme le type *SFSV* (Izri et al., 2008) détecté chez *Ph. ariasi* et *SFNV* détecté *Ph. papatasi* mâle (Moureau et al., 2010). Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour confirmer la circulation ou la présence de ces phlebovirus en Algérie.

IV.3. – Discussion des Résultats PCR gène résistance :

Sur les 18 spécimens de phlébotomes analysés génétiquement, les spécimens du genre *Phlebotomus* ont montré une bande de 400 pb, suggérant la présence potentielle d'une mutation liée à la résistance, tandis que ceux de du genre *Sergentomyia* ont exhibé une bande de 300 pb, indiquant une différence génétique. L'absence de témoin positif complique l'interprétation. Néanmoins, ces résultats préliminaires laissent penser que *Phlebotomus* pourrait être plus résistant aux insecticides, hypothèse soulevée par Benallal et al; 2020 et Zahra Saeidi et al; 2021. Ces premiers résultats montrent une distinction génétique entre *Phlebotomus* et *Sergentomyia* concernant la mutation responsable de la résistance aux insecticides. Il est essentiel de continuer les recherches, avec l'utilisation de témoins positifs dans les futures études, pour confirmer ces observations et mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de résistance dans les populations de phlébotomes en Algérie.

IV.3.1 – discussion Résultats du séquençage d'ADN des phlébotomes pour l'étude de la résistance aux insecticides :

Les résultats du séquençage des phlébotomes montrent que ces derniers restent sensibles aux insecticides DDT et deltaméthrine, car aucune mutation L1014F ou L1014S n'a été détectée dans le gène du canal sodique. Ces mutations sont pourtant bien connues pour conférer une résistance aux pyréthroides et au DDT chez plusieurs insectes. Par exemple, l'étude de Diabaté et al., 2004 a démontré que la mutation **L1014F** est associée à une résistance accrue aux insecticides chez *Anopheles gambiae* en Afrique de l'Ouest. De plus, Martinez-Torres et al., 1999 ont également mis en évidence cette même mutation dans des populations de moustiques résistants en Asie et en Amérique du Sud, confirmant son rôle clé dans l'évolution de la résistance dans divers contextes géographiques. Ces résultats suggèrent que la résistance n'a pas encore émergé dans cette population spécifique, bien que des études supplémentaires avec une

plus grande échelle d'échantillons et d'autres méthodes d'analyse des mécanismes de résistance (comme la résistance métabolique) soient nécessaires pour confirmer la situation globale dans la région.

Conclusion & perspectives

Conclusion et perspectives

Les phlébotomes jouent un rôle crucial en tant que vecteurs de divers arbovirus et pathogènes responsables de maladies graves telles que la leishmaniose et certaines fièvres virales. Ces insectes représentent une menace importante pour la santé publique dans plusieurs régions du monde, y compris en Algérie, où leur étude revêt un intérêt majeur. Dans ce mémoire, nous avons exploré différentes méthodes de capture, les techniques d'analyse des phlébotomes, ainsi que des approches moléculaires visant à détecter la présence d'arbovirus et à identifier des mutations liées à la résistance aux insecticides.

Le déroulement de l'étude a été influencé par des contraintes externes, notamment le prolongement inhabituel de la période hivernale et les limitations d'accès aux équipements de piégeage au laboratoire de l'Institut Pasteur d'Algérie, affectant ainsi les résultats obtenus. Toutefois, malgré ces difficultés, notre travail mené dans la région de Tizi-Rached a permis de capturer un total de 909 phlébotomes, dont trois espèces distinctes ont été identifiées : *Sergentomyia minuta*, *Phlebotomus papatasi* et *Phlebotomus sergenti*. Parmi celles-ci, *P. sergenti* est apparue comme l'espèce la plus dominante, représentant 42,3 % des spécimens collectés, confirmant son rôle potentiel en tant que vecteur principal de la leishmaniose cutanée.

En ce qui concerne la détection moléculaire des arbovirus, notamment le virus Toscana (TOSV), les résultats se sont avérés négatifs sur les cinq pools de phlébotomes testés par RT-PCR. Ce résultat est probablement lié au faible nombre de pools et de spécimens analysés, ainsi qu'aux contraintes climatiques et techniques rencontrées lors de l'échantillonnage. De plus, aucune mutation génétique responsable de la résistance aux insecticides n'a été détectée, bien que des résultats préliminaires suggèrent des différences génétiques entre les genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia*, nécessitant des investigations plus poussées.

Pour obtenir des résultats plus robustes et concluants, il est recommandé d'étendre l'étude à un échantillon plus large de phlébotomes, d'inclure davantage de pools à analyser et de prolonger la période de collecte sur plusieurs saisons. Ces améliorations permettraient de mieux cerner la présence d'arbovirus, tels que le TOSV et d'autres phlébovirus, ainsi que d'approfondir notre compréhension des mécanismes de résistance aux insecticides dans les populations de phlébotomes en Algérie. Ces informations seraient cruciales pour la prévention des maladies vectorielles et pour l'élaboration de stratégies de lutte contre ces vecteurs dans les zones endémiques.

Conclusion et perspectives

Pour approfondir les recherches sur les phlébotomes et les pathogènes qu'ils transmettent, plusieurs pistes sont envisageables. D'abord, l'élargissement de l'échantillonnage géographique et temporel ainsi que l'utilisation de méthodes de capture diversifiées permettraient de mieux cerner la diversité des espèces et les risques sanitaires. Des études longitudinales et génétiques approfondies pourraient éclairer l'évolution des populations de phlébotomes, leur résistance aux insecticides, et la circulation d'arbovirus variés. Par ailleurs, des tests ciblés sur la résistance aux insecticides et la collaboration interdisciplinaire optimiseraient les stratégies de lutte vectorielle. Enfin des campagnes de sensibilisation auprès des populations locales contribueraient à réduire les risques de maladies transmises par ces insectes.

Références bibliographiques

Les références bibliographiques

- 1) A. Diabaté, C. Brengues, T. Baldet, KR Dabiré, JM Hougard, M. Akogbeto, P. Kengne, F. Simard, P. Guillet, J. Hemingway, F., 2004 - ChandreLa propagation de la mutation Leu-Phe kdr à travers le complexe Anopheles gambiae au Burkina Faso ; introgression génétique et phénomènes de novo.
- 2) Abdel Kamal Mouloua., 2014 - these doctorat ; Etude eco-epidemiologique de la leishmaniose canine en kaabylie.
- 3) Adler S., Theodor O., 1929 - The distribution of sandflies and leishmaniasis in Palestine, Syria and Mesopotamia. Ann. Trop. Med. Parasit., 23, 269-306.
- 4) Ahir D, Alwassouf S, Loudahi A, Davoust B, Charrel RN., 2016 - Séroprévalence du virus de la Toscane chez les chiens de Kabylie (Algérie). Clin d'infection par microbiol. ; 22(3) ;e16-7.
- 5) Ait-Oudhia, K., Hamrioui, B., & Dib, A., 2009 - Leishmaniose cutanée en Algérie ; rôle de l'hôte et du climat. Revue française de parasitologie et de santé publique, 17(3), 153-159.
- 6) Alkan C, Allal-Ikhlef AB, Alwassouf S., 2015 - Virus isolation, genetic characterization and seroprevalence of Toscana virus in Algeria. ClinMicrobiol Infect 21(11):1040-2169.
- 7) Alkan C, Bichaud L, de Lamballerie X., Alten B, Gould E. A., Charrel RN., 2013 - Sandfly borne phleboviruses of Eurasia and Africa; epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. Antiviral Res.; 100 (1):54 -74.
- 8) Alwassouf S., 2015 - Seroepidemiology of emerging sandfly-borne phleboviruses: Technical optimization and seroprevalence studies in the Mediterranean basin. Th. Doc. Univ. Aix Marseille, pp 170.
- 9) Al-Zahrani M. A., Peters W., Evans D. A., Smith V., Ching Chin I., 1989 - Leishmania infecting man and wild animals in Saudi Arabia; Cutaneous leishmaniasis of man in the south-west. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 83, 621-628.
- 10) Ayhan N, Charrel RN., 2020 - Une mise à jour sur la distribution du virus Toscana ; les aspects génétiques, médicaux et diagnostiques. Clin d'infection par microbiol;26(8)
- 11) Ba Y., 1999 - Phlébotomes du Sénégal ; Dynamique des populations de trois régions biogéographiques - Rôle dans la transmission des Arbovirus. Thèse docteur de troisième cycle de Biologie Animale ; Université Cheikh Anta Diop de Dakar Faculté des Sciences et Techniques, 154p.
- 12) Baldi L., Mizzoni V, Guarino A., 2004 - Canine leishmaniasis in Campania; new and old foci. Parasitologia, 46, 217-220.
- 13) Benallal, K.E., et al., 2020 - Susceptibility of Phlebotomus papatasi to DDT and pyrethroids in the M'Sila region of Algeria.
- 14) Berchi S., Rioux J.-A., Belmonte A., Russo J., 1986 - Un phlébotome nouveau pour l'Algérie.
- 15) BERDJANE-BROUK Z., CHARREL R.N., BITAM I., HAMRIOUI B. & IZRI A., 2011 - Record of Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii grassi, 1908 and Phlebotomus (Larrousius) chadlii rioux, juminer & gibily, 1966 female in Algeria, Parasite,18, 337-339

- 16) Boudrissa, A., Boubidi, S. C., et al., 2012 - Phlebotomine sand flies (Diptera; Psychodidae) in five Provinces of Algeria; Results of a survey. *Journal of Medical Entomology*, 49(4), 697-701.
- 17) C. Alkan et al., 2015 - Virus isolation, genetic characterization and seroprevalence of Toscana virus in Algeria.
- 18) Charrel, R.N., Bichaud, L., and de Lamballerie, X., 2012 - Emergence of Toscana virus in the mediterranean area. *World J. Virol.* 1, 135–141.
- 19) Charrel, R.N., Izri, A., Temmam, S., de Lamballerie, X., and Parola, P., 2006- Toscana Virus RNA in *Sergentomyia minuta* Flies. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1299–1300.
- 20) Collao X, Palacios G, de Ory F, Sanbonmatsu S, Pérez-Ruiz M, Navarro JM, Molina R, Hutchison SK, Lipkin WI, Tenorio A, Sánchez-Seco MP., 2010 - Granada virus: a natural Phlebovirus reassortant of the sandfly fever Naples serocomplex with low seroprevalence in humans. *Am J Trop Med Hyg.* 83(4) ;760-5.
- 21) D. Tahir, S. Alwassouf A., Loudahi B. Davoust, R.N. Charrel., novembre 2015 - Seroprevalence of Toscana virus in dogs from Kabylia (Algeria).
- 22) David Martinez-Torres, C Chevillon, Un Brun-Barale, J.B. Bergé, N Pasteur, David Pauron, 1999 - Canaux Na + voltage-dépendants chez les moustiques *Culex pipiens* L résistants aux pyréthroides.
- 23) Dedet J-P, Addadi K, Belazzoug S., 1984 - Les phlébotomes (Diptera, Psychodidae) d'Algérie. *Cah ORSTOM sér Ent Med Parasitol.* ;12 (2) :99-127.
- 24) Dedet, J.P., 1999 - Les leishmanioses. Edition Ellipses, 253pp.
- 25) Dedet, J.-P., 2009 - Leishmanies, leishmanioses ; biologie, clinique et thérapeutique. EMC - Maladies Infectieuses, 6(1), 1–14.
- 26) Depaquit, J., Grandadam, M., Fouque, F. et al., 2010 - Arthropod-borne viruses transmitted by phlebotomine sandflies in Europe; a review *Euro Surveillance*, 11March, 15(10), 19507 p.
- 27) Esma RAMDANE, Sélima B ERCHI & Kamel LOUADI., 2018 - Les phlébotomes (Diptera, Pshycodidae), vecteurs d'agents pathogènes responsables de la leishmaniose humaine dans la région de Constantine (Algérie).
- 28) Es-Sette M. Ajaoud R.N. Charrel M. Lemrani., 2016 - Épidémiologie moléculaire des Phlebovirus dans quatre provinces du Maroc, 109 :143-150.
- 29) Foley H, Jeduc H., 1912 - Phlébotomes dans le Sud-Oranais. L'accident des locaux est un accident à leurs piqûres. *Bull Soc Pathol Exot.* ;5 (1) :511-3
- 30) Gérard Duvallet et Vincent Robert., 2017 - Entomologie médicale et vétérinaire Didier Fontenille.
- 31) Gomes B, Purkait B, Deb RM, Rama A, Singh RP, Foster GM, et al., 2017 - Knockdown resistance mutations predict DDT resistance and pyrethroid tolerance in the visceral leishmaniasis vector *Phlebotomus argentipes*. *PLoS Negl Trop Dis* 11(4).
- 32) Hemza Manseur, Aissam Hachid, Ahmed Fayeze Khardine, Kamal Eddine BENALLAL, Bière Taha, Merbouha Temani et AHCÈNE ARBITRE, Maria Paz Sánchez Seco, Idir Bitam, Ana Vázquez, Ismail LAFRI., Août 2022 - Premier isolement d'un virus punique à partir de phlébotomes collectés en Nord de l'Algérie.

- 33) https://www.researchgate.net/figure/Situation-et-decoupage-administratif-de-la-wilaya-de-Tizi-Ouzou_fig1_331173575 accessed., 2 Sept 2024 - Le tourisme culturel-patrimonial : une contribution à la valorisation des villages kabyles du Djurdjura - Scientific Figure on ResearchGate. Available from.
- 34) Imizzaliogu. Schaller, Bretsel., 2006 - Sandfly fever Naples virus (serotype Toscana) infection with meningeal involvement after a vacation in Italy. *Dtsch Med Wochenschr* ;15 :2838- 2840.
- 35) Izri, A., Temmam, S., Moureau, G., Hamrioui, B., de Lamballerie, X., & Charrel, R. N., 2008 - Sandfly Fever Sicilian Virus, Algeria.
- 36) J. Depaquit., 2021 - *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *kazeruni*. *Annale parasitologie humaine comparée*.
- 37) Kamal Eddine Benallal, Rafik Garni, Zoubir Harrat, Petr Volf, Vít Dvorak *PLOS x.*, January 2022 - *Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Maghreb region: A systematic review of distribution, morphology, and role in the transmission of the pathogens.*
- 38) Killick-Kendrick R., 1999 -The biology and control of *Phlebotomine sand flies*. *Clin Dermatol.*;17 (3):279–89.
- 39) Lafri, I. ; Bitam, I., 2021 - *Phlébotomes et agents pathogènes associés en Algérie ; mise à jour et aperçu complet. Vet. Ital., 57*
- 40) Lewis DJ, *Bull Br Mus Nat Hist.*, 1982 - Une révision taxonomique du genre *Phlebotomus*(*Diptera: Psychodidae*).:121-209.
- 41) Liu DY, Tesh RB, Travassos da Rosa AP, Peters CJ, Yang Z, Guzman H, Xiao SY., 2003 - Phylogenetic relationships among members of the genus *Phlebovirus* (*Bunyaviridae*) based on partial M segment sequence analyses. *J Gen Virol.* 84:465–473.
- 42) Maroli M, Ciufolini MG, Verani P., 1993 - Vertical transmission of Toscana virus in the sandfly, *Phlebotomus perniciosus*, via the second gonotrophic cycle. *Med Vet Entomol*; 7(3):283-6.
- 43) Mouloua A., 2014 - Etude éco-épidémiologique de la leishmaniose canine en Kabylie Algérie. *Thé. Doc. Univ., Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou*,182p.
- 44) 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;15–21.
- 45) Munstermann LE., 2018 - Les mouches de sable de phlebotomine et les mouches de papillon (*Psychodidae*). *Med Vet Entomol. Elsevier Inc.* ; 191-211 p.
- 46) Munstermann, L. E., 2019 - *Phlebotomine Sand Flies and Moth Flies (Psychodidae)*. *Medical and Veterinary Entomology*, 191–211.
- 47) Nadim A., Javadian E., Noushin M. K., Nayil A. K., 1979 - Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Afghanistan. *Bull. Soc. Pathol. Ex.*, 5-6, 461-466.
- 48) Ndiaye, E. H., et al., 2018 - Leishmaniasis in North Africa: current challenges for epidemiological surveillance. *Tropical Medicine and International Health*, 23(3), 212-222.
- 49) Papadopoulos, O., et al., 2020 - Emerging and re-emerging phleboviruses in the Mediterranean area: The role of the Toscana virus and other phleboviruses in human pathology; *Frontiers in Microbiology*, 11, 579025.

- 50)** R. A. T. Adalsteinn et al., 2021 - Resistance to Insecticides in Phlebotomine Sandflies; A Growing Challenge for Vector Control in Endemic Areas. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(12), 6343.
- 51)** Sakhria S, Alwassouf S, Fares W, Bichaud L, Dachraoui K, Alkan C., 2014 - Presence of sandfly-borne phleboviruses of two antigenic complexes (Sandfly fever Naples virus and Sandfly fever Sicilian virus) in two different bio-geographical regions of Tunisia demonstrated by a microneutralisation-based seroprevalence study in dogs. *Parasit Vectors*, 7:476.
- 52)** Sandro P. Silva , Meik Dilcher , Franziska Weber, Frank T. Hufert, Manfred Weidmann, Jedson F. Cardoso, Valéria L. Carvalho, Jannifer O. Chiang 44, L'via C. Martins, Clayton P. S. Lima, Daisy E. A. Da Silva, Joao L. S. G. Vianez-Jienor, Vsevolod L. Popov, Amélia P. A. Travassos da Rosa , Robert B. Tesh, Pedro F. C. Vasconcelos et M. M. R. T. Nunes., octobre 2014 - Caractérisation génétique et biologique de certains virus Changuinola (Reoviridae, Orbivirus) du Brésil.
- 53)** Schwarz,Jäger, Gilch, Pauli., 1995 - Serosurvey and laboratory diagnosis of imported sandfly fever virus, serotype Toscana, infection in germane. *Epidemiol infect*; 14:501-510.
- 54)** Seccomb A., Ready PD, Huddleston L., 1993 - Catalogue de la flottaison de pyjatomine de l'ancien monde (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae).
- 55)** Sghaier W, Bahri O, Kedous E, Fazaa O, Rezig D, Touzi H, et al., 2012 - Étude rétrospective des étiologies virales des infections neuroméningées en Tunisie (2003-2009). *Med Sante Trop.* ;22 (4) :373-8.
- 56)** Verani P, Lopes MC, Nicoletti L, Balducci M., 1980 - Studies on Phlebotomus transmitted viruses in Italy: Isolation and characterization of a sandfly fever Naples-like virus, editors. *Arboviruses in the Mediterranean countries*. Stuttgart-New York: Gustav Fischer on behalf of the Federation of European Microbiological Societies; p. 195–201
- 57)** Z. Harrat,F. Pratlong ,S. Belazzoug ,J. Dereure ,M. Deniau ,J.A. Rioux ,M. Belkaid, JP Dede., 1996 - *Leishmania infantum* et *L. major* en Algérie.
- 58)** Zahra Saeidi et al., 2021 - Évaluation de la sensibilité de *Phlebotomus papatasi*, principal vecteur de la leishmaniose cutanée zoonotique, à différents insecticides recommandés par l'OMS dans un foyer endémique du centre de l'Iran.

Résumé

Resumé :

Durant une période de cinq mois dans la région de Tizi-Rached, nous avons capturé 759 phlébotomes avec des pièges huilés et 150 à l'aide de pièges CDC. Les résultats ont révélé trois espèces dominantes : *Phlebotomus papatasi* (29,5%), *Phlebotomus sergenti* (42,3%), et *Sergentomyia minuta* (28,19%). L'analyse moléculaire, effectuée par RT-PCR, n'a pas permis de détecter la présence du virus Toscana dans les 5 pools de phlébotomes testés. Par ailleurs, les tests sur la résistance aux insecticides, notamment le DDT et la deltaméthrine, ont montré que les phlébotomes étaient sensibles, sans trace de mutations L1014F ou L1014S dans le gène du canal sodique, responsables de la résistance aux insecticides. Bien que des résultats préliminaires suggèrent des différences génétiques entre les genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia*, des investigations plus poussées sont nécessaires. Ces résultats suggèrent que la population de phlébotomes dans cette région n'a pas développé de résistance génétique significative aux insecticides, ce qui pourrait être lié à une utilisation modérée de ces produits dans la zone étudiée.

Mots clés : Phlébotomes, Tizi-Rached, *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus sergenti*, *Sergentomyia minuta*, virus Toscana, résistance aux insecticides, DDT, deltaméthrine, différences génétiques.

Abstract

Over a five-month period in the Tizi-Rached region, we captured 759 sandflies using oil traps and 150 with CDC traps. The analysis revealed three dominant species: *Phlebotomus papatasi* (29.5%), *Phlebotomus sergenti* (42.3%), and *Sergentomyia minuta* (28.19%). Molecular testing through RT-PCR found no Toscana virus in the 5 pools of sandflies analyzed. Additionally, resistance tests to insecticides, particularly DDT and deltamethrin, showed that the sandflies remained susceptible, with no detected mutations in the sodium channel gene (L1014F or L1014S) linked to insecticide resistance. While preliminary results suggest genetic differences between the *Phlebotomus* and *Sergentomyia* genera, further investigation is needed. These findings indicate that sandfly populations in this region have not developed significant genetic resistance to insecticides, possibly due to limited use of these chemicals in the study area.

Keywords: Sandflies, Tizi-Rached, *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus sergenti*, *Sergentomyia minuta*, Toscana virus, insecticide resistance, DDT, deltamethrin, genetic differences.

ملخص

على مدار خمسة أشهر في منطقة تيزي راشد، قمنا باصطياد 759 ذبابة رملية باستخدام مصائد زيتية و150 مصائد باستخدام مصادد CDC. أظهرت التحليلات وجود ثلاث أنواع رئيسية: *Phlebotomus papatasi* بنسبة (29.5%)، *Phlebotomus sergenti* بنسبة (42.3%)، و *Sergentomyia minuta* بنسبة (28.19%). كشفت التحليلات الجزيئية باستخدام RT-PCR عدم وجود فيروس توسكانا في العينات المأخوذة. إضافةً إلى ذلك، أظهرت الاختبارات على مقاومة المبيدات الحشرية، خاصة DDT والدلتامثرين، أن الذبابات الرملية لا تزال حساسة لهذه المبيدات، حيث لم تظهر أي طفرات في جين قناة الصوديوم (L1014F أو L1014S) التي ترتبط بالمقاومة. على الرغم من أن النتائج الأولية تشير إلى وجود اختلافات جينية بين الجنسين *Phlebotomus* و *Sergentomyia*، إلا أن هناك حاجة لإجراء تحقيقات أعمق. تشير هذه النتائج إلى أن مجموعات الذبابات الرملية في هذه المنطقة لم تطور مقاومة وراثية كبيرة للمبيدات الحشرية، مما قد يرجع إلى الاستخدام المحدود لهذه المواد في المنطقة المدروسة.

الكلمات المفتاحية: الذبابات الرملية، تيزي راشد، *Phlebotomus papatasi*، *Phlebotomus sergenti*، *Sergentomyia minuta*، فيروس توسكانا، مقاومة المبيدات الحشرية، DDT، الدلتامثرين، اختلافات جينية.