

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud MAMMERRI de Tizi-Ouzou

Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biologie

Mémoire de Fin d'Etude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie
Spécialité : *Entomologie appliquée à la médecine, l'agriculture et à la
foresterie.*

Thème :

La séroprévalence et la détection des virus transmis par les phlébotomes à Ouacif et Ouadhia

Présenté par

KHEMMAR Saada Et SILEM Djedjiga.

Soutenu publiquement le 12/10/2017

Devant le jury composé de :

Mme MEDJDOUB professeur à l'UMMTO

présidente

Mme BRAHMI maitres de conférences classe A à l'UMMTO

promotrice

Mr BENALLEL entomologist à l'IPA

co-promoteur

Mme BENBETKA pharmacienne chargée d'études à l'IPA

co-promotrice

Mme LEKMACHE maitres de conférences classe A à l'UMMTO

examinatrice

Promotion 2016-2017

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier dieu le tout puissant, qui nous a donné la force, la patience et la volonté pour accomplir ce modeste travail.

On tient à remercier également :

Nos familles qui par leurs prières et leurs encouragements, on a pu surmonter tous les obstacles.

*Nos co-promoteurs : **M.BENALLAL. K** et **BENBETKA. C** (IPA) pour leur suivi, leur disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi que pour l'inspiration et l'aide accordé jusqu'à la dernière minute,*

*On remercie grandement le professeur **HARRAT. Z** le directeur général de l'IPA de nous avoir acceptés pour notre stage au sein de l'institut pasteur d'Algérie. Notre passage au sein de cette unité restera pour nous une très grande expérience, tant sur le plan professionnel que personnel.*

*On remercie aussi **Dr HACHID. I**, le responsable de laboratoire arbovirus émergents IPA ainsi que toutes les personnes de ce Service, spécialement **Mr. KHARDIN.F**, **Mr. BENMAZOUZ. R** et **Mme KHALDI. A**.*

*Toute l'équipe de Laboratoire d'Eco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations IPA, spécialement **Mme BENBETKA. S**, et **Mr GARNI. R**.*

*Notre promotrice **Mme BRAHMI. K**(MCA) **UMMTO** pour son orientation ses conseils et son encadrement.*

*Les membres du jury la présidente **Mme MEDJDOUB** professeur à **UMMTO** et l'examinatrice **Mme LEKMACHE.Y** (MAA) **UMMTO** pour l'intérêt qu'elles ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

On remercie le personnel des laboratoires au sein des polycliniques de Ouacif et de Ouadhia.

Nos remerciements s'étendent également à tous nos enseignants durant les années des études.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

**A la mémoire de ma grande mère « Yaya »*

**A vous mes très chères parents, pour votre amour et votre confiance, pour votre soutien dans les moments difficiles, pour l'éducation et les valeurs que vous m'avez inculquées, pour tout ce que vous m'avez fait découvrir. Ces quelques lignes ne peuvent jamais résumer les liens qui nous unissent mais vous savez à quel point ils sont forts.*

**A vous mes chères sœurs « Silia , Liza, Sabrina » que dieu vous protège .*

**A toi Djéé « Djedjiga », pour les bons moments qu'on a passé ensemble, pour cette merveilleuse aventure pleine de difficulté et qu'on a vécu avec tant de joie, et aussi à toute ta famille pour m'avoir accueilli Avec tant de gentillesse,*

**A vous mes chères copines : Lila, Imi, Liz, Kamy, Lola Pour tous les fous rires pour toutes les années qu'on a passé ensemble, bref pour tous les bons moments*

**A ma tante Hamama et sa familles.*

**A tous les pasteuriens. (Kamel, Rafik, Chahrazed, Fayez, Aljia, Rachid, Rachid)*

**A Rachid qui m'a ouvert les premières portes de réussites ainsi que sa famille.*

**A vous Saliha et Mhend d'être des bons guideurs dès mes premiers pas.*

**A tous mes enseignants depuis que j'apprenais l'alphabet*

**A toute la promo d'entomologie*

**A tout mes amis*

**A tout ce qui m'ont aidé pour réaliser ce modeste travail soit sur terrain soit sur labo.*

...

SAADA...

Dédicace

Je rends grâce au dieu de m'avoir donné la conscience et la volonté ainsi que la santé pour réussir à faire ce travail.

Je dédie ce travail à :

Mes très chère parents qui m'ont donné tout l'amour et soutienne pour avanacer et arriver à ce stade, Merci pour l'éducation et les sacrifices que vous avez fais pour me voire heureuse.

(Que dieu vous protèges)

Mes frères (Said, Yazid, Belaid, Karim) et mes sœurs (Mekyoussa et Hana), qui m'ont toujours encouragé pour allez de l'avant et tenir mes objectifs, à qui je souhaite le bonheur et la réussite.

A tous mes amis exceptionnellement (Kahina et Kamilia) qui ont été dans tous mon parcoure de vie, merci pour la fidélité et L'amour qui me donne la force et le courage d'allez en avant, et aux quelles je souhaite la réussite et le bonheur.

A la famille de ma binôme qui mon accueilli dans leurs maison avec un grand respect et amour, aux quels je souhaite une longe et heureuse vie.

A ma chère binôme qui ma ouvert la porte de connaitre un monde d'amour et de suspense. Merci de m'avoir accompagné dans cette expérience plaine d'aventure, je te souhaite la réussite dans ta vie Inchalah tu va réaliser tout tes rêves.

A tous les pasteurien exceptionnellement (kamel, rafik et chahrazed, fayez, Aljia et Rachid)

A tous ceux qui m'ont aidé pour réaliser ce modeste travail soit sur terrain soit sur labo.

...

Djédjé

Abréviations

Introduction	1
--------------------	---

CHAPITRE I : synthèse bibliographique

1.Généralités sur les phlébotomes	3
1.1.Taxonomie	3
1.2.Morphologie	2
1.3.Bio-écologie et éthologie.....	4
I.4.Répartition géographique des phlébotomes	5
2. Agents pathogènes transmis par les phlébotomes	7
2.1. Généralités sur les <i>Phlebovirus</i>	8
2.2. Description	8
2.3. Répartition	9
2.4. Réservoir des <i>Phlebovirus</i> et leur transmission	10

CHAPITRE II : matériel et méthodes

1.Présentation de la zone d'étude.....	12
2.Enquête entomologique	13
2.1.Collecte des données météorologiques durant la période de piégeage.....	13
2.2.Méthodes adoptés sur le terrain	14
.2.2.1.Piégeage des phlébotomes.....	14
2.2.2.Tri et conservation.....	15
2.3.Méthodes adoptés au laboratoire	16
2.3.1. Traitement des phlébotomes collectés par les pièges huilés	16
2.3.2. Traitement des phlébotomes collectés par les pièges CDC	17

2.3.2.1. Le principe de la reverse transcriptase RT-PCR	17
2.3.2.2. Protocole.....	18
3. Enquête sérologique	20
3.1. Principe de l'ELISA Indirecte	21
3.2. Phase pré-analytique : traitement des sérums	21
3.3. Protocole	22
2.4. Exploitation des résultats.....	23

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats.....	22
1.1. Résultats de l'enquête entomologique.....	24
1.2. Résultats de l'enquête sérologique.....	27
2. Discussion.....	28
Conclusion et perspectives.....	30

Références

Annexes

Liste d'abréviations :

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

AVL : tompon de lyse (kit QIAamp viral RNA)

AW1, AW2: tompon de lavage (kit QIAamp viral RNA) (washer buffer 1,2)

CDC: centre of disease control, Atlanta

CYPV : *Cypre Virus*

DNTp : mélange des quatre désoxyribonucléotides

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FAM : Fluka-6- Caroxyfluorescein (molécule fluorescente)

ICTV : Comité International pour la Taxonomie des Virus

IgG: immunoglobuline G

Ind : Individus

IPA : Institut Pasteur d'Alger

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PBST: Phosphate-Buffered Saline Tween 20.

PCR : polymérase chaîne réaction

PCR-RT : reverse transcriptase polymérase chaîne réaction

PSM : poste de sécurité microbiologique

RT-PCR : polymérase chaîne réaction en temps réel

RT-qPCR : polymérase chaine réactions en temps réel

SFNV: *Sandfly Fever Sicilian Virus*

SFSV: *Fever Sicilian Virus*

SFV: *Sandfly Fever Virus*

Taq: *thermus aquaticus*

TOSV : *Toscana Virus*

Liste des figures

N° de Figure	Titre	Page
1	Morphologie générale d'un phlébotome adulte	4
2	Cycle de développement des phlébotomes	5
3	Distribution de quelques espèces de phlébotomes autour de la méditerranée	6
4	Schéma d'un virus appartient a la famille des <i>Bunyaviridae</i> .	9
5	Distribution des phlebovirus causées par les phlébotomes, dans le région méditerranéenne	9
6	Carte administrative de la wilaya de tizi ouzou représentant les sites d'enquêtes.	12
7	Répartition des sites de collecte d'échantillons (phlébotomes et sérums) vue par stellite	12
8	(A) pièges huilés déposés (B) pièges huilés récupérés	14
9	pièges CDC lumineux déposés dans deux sites déférents	15
10	Tri des phlébotomes capturés par les pièges huilés	15
11	Tri des phlébotomes capturés par les piège CDC.	15
12	Observation à l'aide d'une loupe binoculaire et montage des phlébotomes entre lame et lamelle	16
13	l'identification des phlébotomes sous un microscope (Gx4, Gx10, Gx40, Gx100)	16
14	Principe de la PCR en temps réel selon la technique «Taqman»	18
15	Principe de l'ELISA indirecte .	21
16	dynamique saisonnière des phlébotomes collectés dans les deux régions.	25
17	Résultats de l'amplification générale de la RT-PCR <i>TOSCANA virus</i> .	27
18	Graphes représentent le pourcentage des cas positifs et négatifs en fonction des tranches d'âge dans La région de Ouadhia à gauche et de Ouacif à droite.	28

Liste des tableaux

N° tableaux	Titre	Page
1	Espèces de phlébotomes présents en Algérie	7
2	Données météorologiques de la wilaya de tizi Ouzou (2017)	13
3	Amorces et sonde utilisées dans la RT PCR.	20
4	Nombre de prélèvements par tranche d'âge et par région.	18
5	Schéma de la plaque.	20
6	Résultat des relevés par pièges adhésif des deux régions durant l'année 2017 d'Avril à Août.	24
7	Résultat de l'inventaire global des phlébotomes capturés.	25
8	Nombre des spécimens et leur abondance relative	26
10	. Nombre de phlébotomes collectés par les pièges CDC et le nombre de femelles analysées par RT-PCR.	26
11	Taux des cas positifs et nombre des sérums récupérés dans les deux régions d'étude.	27

Les arbovirus (virus transmis par des arthropodes) sont classés parmi les pathologies infectieuses émergentes les plus importantes (Gulber, 2001). Ils sont transmis à l'homme et aux animaux lors d'un repas sanguin des vecteurs arthropodes hématophages infectés (les moustiques, les phlébotomes, les tiques et les mouches). Récemment dans l'ancien monde, il a été découvert qu'un nombre significatif de ces arbovirus sont transmis par les phlébotomes. Ces virus appartiennent à la famille des Bunyaviridae, au genre *Phlebovirus* incluant deux types de serocomplexes connus à savoir *Sandfly Fever Naples* et *Salehabad* ainsi que d'autres serocomplexes tentatifs comme *Sandfly Fever Sicilian* et *Corfu Virus* (Alwasouf, 2015). Ils définissent ce qui est communément appelé le groupe des « fièvres à phlébotomes » ou « fièvre à pappataci » ou encore « fièvres des trois jours » (Izri et al., 2006).

Toscana virus qui appartient au serocomplexe *Sandfly Fever Naples* est le plus étudié chez les patients présentant des fièvres neurologiques, son rôle majeur comme étiologie de méningites aseptiques estivales a été démontré non seulement en Italie mais également en Espagne, au Portugal, en France, en Turquie et dans le Maghreb. Il est actuellement l'arbovirus le plus prévalent en Europe et dans le bassin méditerranéen (Depaquit et al., 2010) il est classé comme la 3^{ème} cause de méningites estivales (Nicoletti et al., 1991).

En Algérie plus précisément dans la région de la Kabylie, les travaux menés ont pu mettre en évidence une circulation d'arbovirus transmis par les phlébotomes comme « *Sandfly Fever Sicilian Virus* et *Sandfly Fever Naples Virus* » (Izri et al., 2008 ; Moureau et al., 2010). D'autre part, une nouvelle souche de virus a été reportée dans la région de Draa El Mizan (Alkan et al., 2015). Néanmoins, les travaux réalisés dans le sud Algérien Tamanrasset et Djanet n'ont pas signalé la présence de ces virus (Tesh et al., 1976). En 2015, une étude sérologique a montré la présence de *Phlebovirus* chez les chiens (Tahir et al., 2015).

Afin de voir de près la circulation de virus appartenant au genre *Phlebovirus* dans les régions d'Ouadhia ainsi qu'Ouacif, des captures de phlébotomes par différents types de pièges ont été réalisées dans ces deux régions entre le mois d'Avril et le mois d'Août. D'une part pour suivre la dynamique saisonnière de ces insectes et d'autre part pour détecter la présence du virus Toscana par les techniques moléculaires. Ce travail a été consolidé par une enquête sérologique pour évaluer la prévalence des *Phlebovirus* dans ces deux régions.

Ce manuscrit s'articule autour de 3 chapitres ; le premier comprenant des généralités sur les phlébotomes et des généralités sur les phlébovirus qu'ils transmettent, le deuxième présente les régions d'études, le matériel ainsi que les différentes méthodes qui sont utilisées durant nos enquêtes et le troisième résume les résultats et la discussion.

Enfin, une conclusion met l'accent sur les perspectives et les travaux qui restent à mener.

Ce chapitre comprend deux parties, une sur les généralités des phlébotomes, l'autre sur les virus qu'ils transmettent.

1. Généralités sur les phlébotomes

1.1. Taxonomie

D'après Lewis (1974), Les phlébotomes appartiennent à :

- L'embranchement des arthropodes.
- Classe des Insectes.
- Ordre des Diptères.
- Sous –ordre des Nématocères.
- Famille des Psychodidae.
- Sous familles Phlebotominae.

Léger et Depaquit en 1999, en se basant sur des arguments morphologiques et biogéographiques, retiennent 13 genres. En Algérie, il existe 2 genres seulement *Phlebotomus* et *Sergentomyia* (Belazzoug, 1991).

1.2. Morphologie

Les phlébotomes sont des diptères hématophages, en phase adulte ils présentent un corps grêle de petite taille, de 1 à 3 mm de long, de couleur jaune terne au noir, la tête forme un angle de 45° avec le corps donnant à l'insecte une allure bossue (Boussa, 2008). Ils apparaissent velus, pourvus de longues pattes et les ailes d'une nervation alaire caractéristique et en forme de « V » au repos (Izri et *al.*, 2006).

1.2.1. Tête

Formée essentiellement d'une capsule chitineuse (épicrâne), délimitée de chaque côté d'un œil composé. Elle porte une paire d'antenne composée de 16 articles, deux basaux et 14 segments beaucoup plus minces, ces derniers portent des épines géniculées dont la longueur est un critère de classification. (Dedet et *al.*, 1984).

1.2.2. Thorax

Porte une paire d'ailes et une paire de balanciers qui assurent l'équilibre de l'insecte pendant le vole, ainsi que trois paires de pattes longues, fines et couvertes de soies (Dedet et *al.*, 1984).

1.2.3. Abdomen

Comprend dix segments, les trois derniers sont modifiés pour constituer l'appareil génital qui est invaginé chez la femelle (Figure 1) et fortement développé chez le mâle (Dolmatova, 1971). Les critères d'identification d'espèces les plus utilisés sont les antennes, le pharynx et le cibarium au niveau de la tête, les ailes et l'implantation des soies au niveau du thorax, l'implantation des soies dorsales au niveau abdominal et les appareils génitaux qui permettent aujourd'hui l'identification rapide et précise de nombreuses espèces (Izri *et al.*, 2006).

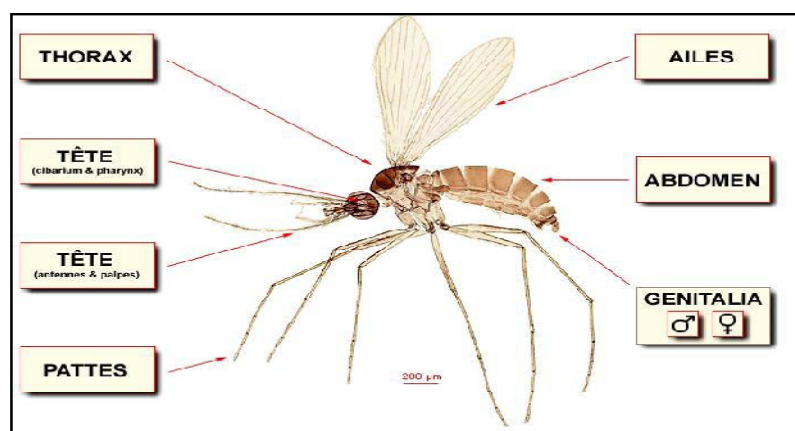


Figure 1 : Morphologie générale d'un phlébotome adulte (femelle), (Niang *et al.* 2000).

1.3. Bio-écologie et cycle de développement

Les phlébotomes sont holométaboles leur développement comporte une métamorphose complète œuf, larve, nymphe et imago (Ba,1999; Dedet,1999) (Figure 2). Dès leurs émergences, les phlébotomes cherchent à se nourrir. Le mâle se nourrit des sucres de plantes et du miellat des pucerons, la femelle a besoin de sang pour le développement des œufs et l'oviposition. Après la ponte, la femelle recommence le cycle en se mettant à la recherche d'un nouvel hôte (Dolmatova et Demina, 1971). La copulation peut avoir lieu deux jours après l'émergence, avant ou après le repas de sang, elle dure de 2 à 4 minutes et parfois plus longtemps (Abonnet, 1972). De 50 à 200 œufs sont pondus dans des endroits humides chacune mesure environ 0,4mm (BA, 1999), la durée entre la ponte et la fin de la maturation des œufs reste inconnue dans les conditions naturelles cependant, la maturation des œufs en élevage varie de 4 à 8 jours pour certaines espèces tropicales. (Dolmatova et Demina, 1971). Ils éclosent au bout de 4 à 15 jours en libérant une larve de premier stade (Baldet, 2004). Les stades larvaires sont au nombre de quatre qui durent de 14 à 60 jours, (Killick-kendrik, 1999).

Elles sont terricoles saprophages et phytophages, leurs gîtes larvaires varient selon les espèces mais tous ces derniers ont en commun de constituer des micro-habitats caractérisés par des conditions constantes : lieux calmes, abrités de courants d'air, humides et sombres (Roudhain et Perez, 1985). Les 4 stades larvaires sont entrecoupés par des mues. La nymphe est inerte ou peu mobile, fixée par son extrémité postérieure au sol. Elle ne s'alimente pas durant toute la durée de ce stade qui est de 6 à 15 jours (Baldet, 2004). La durée de vie des adultes est en fonction de la température et de l'humidité, la longévité de l'adulte dépend aussi du sexe: les femelles vivent en moyenne deux semaines à deux mois, par contre les mâles ont une durée de vie plus courte (Pinto et *al.*, 2001). Les habitats des phlébotomes adultes sont caractérisés par le calme, la tranquillité, la proximité aux hôtes vertébrés nécessaires au repas de sang de la femelle et l'existence des gîtes de pontes propices à la vie des larves (Pinto et *al.*, 2001). Les phlébotomes ont une activité essentiellement nocturne et crépusculaire, mais très sensibles aux courants d'air, ils ne sortent que lorsque la soirée est calme (Boussa, 2008). Ce sont des mauvais voiliers, ils se déplacent par des vols courts avec des arrêts fréquents ; leur rayon maximum de déplacement varie selon les espèces, généralement il est d'environ 1km (Killick-kendrick, 1999). L'attraction des phlébotomes vers l'homme semble dépendre de la production de CO₂ mais également de l'odeur (Pinto et *al.*, 2001)

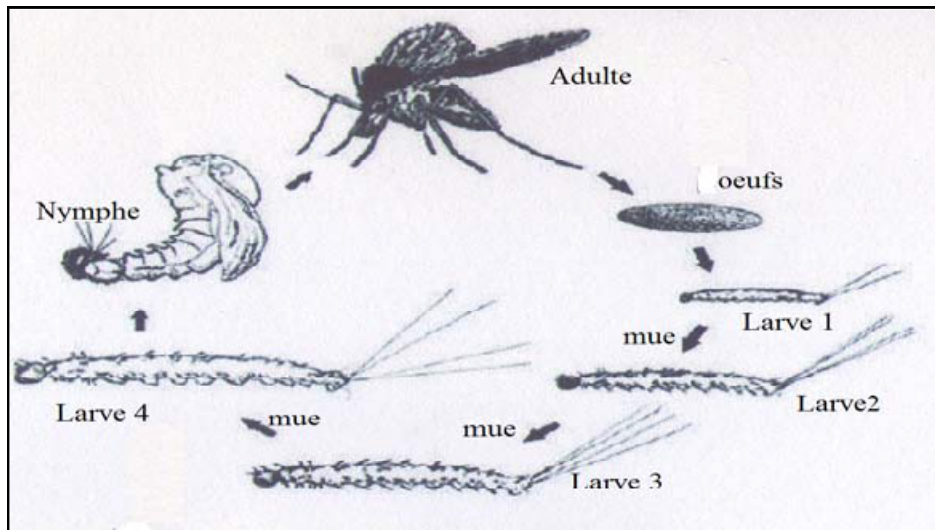


Figure 2 : Cycle de développement des phlébotomes (Niang et *al.*, 2000).

1.4. Répartition géographique des phlébotomes

1.4.1. - Dans le monde

L'aire de répartition des phlébotomes dans le monde est très vaste et se rencontrent sur tout les continents, mais ne dépassent pas certaines latitudes. Deux grandes situations géographiques sont distinguées l'Ancien monde (sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient,

Moyen-Orient et Asie) et le nouveau monde (Amérique du Sud et Centrale). Ils n'ont pas été signalés dans les pays nordiques, très rares en Amérique du Nord, peu abondants en Australie, abondants dans les zones tropicales et équatoriales de l'Afrique, de l'Amérique orientale et de la province malaise. Les phlébotomes sont également fréquents dans le bassin méditerranéen (Figure 3) et en Afrique du Nord (Dedet et *al.*, 1984 ; Belazzoug, 1991).

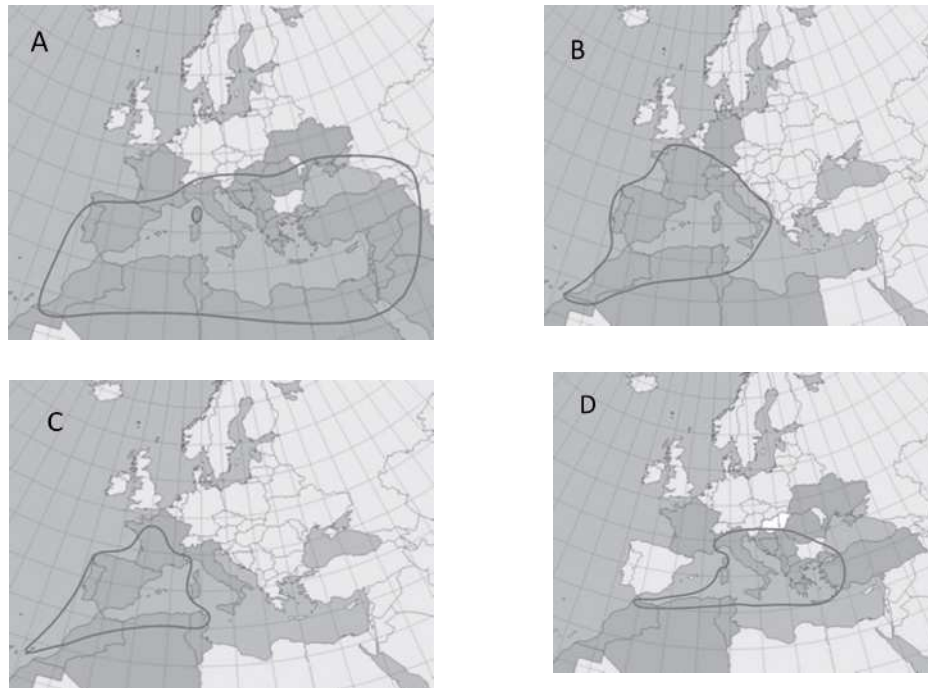


Figure 3 : Distribution de quelques espèces de phlébotomes autour de la méditerranée, (A) *Ph. papatasi*, (B) *Ph. perniciosus*, (C) *Ph. ariasi*, (D) *Ph. perfiliewi* (Depaquit et *al.*, 2010).

1.4.2. En Algérie

Signalés pour la première fois en Algérie par Foley et Leduc (1912), les phlébotomes ont fait l'objet de très importants travaux menés à l'Institut Pasteur d'Algérie, sous la direction de Parrot et des frères Sergent. Aujourd'hui 24 espèces sont connues en Algérie dont 14 appartiennent au genre *Phlebotomus* et 10 au genre *Sergentomyia*. (Dedet et *al.*, 1984, Berdjane-Brouk et *al.*, 2011) (Tableau 1).

Tableau 1 : Espèces de phlébotomes présente en Algérie

Sous famille <i>Phlebotominae</i>	
Genre <i>Phlebotomus</i>	Genre <i>Sergentomyia</i>
Sous genre <i>Phlebotomus</i>	Sous genre <i>Sergentomyia</i>
<i>Phlebotomus papatasi</i> Scopoli, 1786 <i>Phlebotomus bergeroti</i> Parrot, 1934	<i>Sergentomyia antennata</i> (Newstead ,1912) <i>Sergentomyia fallax</i> (Parrot, 1921) <i>Sergentomyia minuta parroti</i> (Adler et Theodor, 1927) <i>Sergentomyia schwetzi</i> (Adler, Theodor et Parrot, 1929)
Sous genre <i>Paraphlebotomus</i>	Sous genre <i>Parrotomyia</i>
<i>Phlebotomus sergenti</i> Parrot, 1917 <i>Phlebotomus alexandri</i> Sinton ,1928 <i>Phlebotomus riouxi</i> (Depaquit, Killick-Kendrick et Léger, 1998) <i>Phlebotomus chabaudi</i> Croset, Abonnenc et Rioux ,1970 <i>Phlebotomus kazeruni</i> Theodor et Mesghali ,1964(*)	<i>Sergentomyia africana</i> (Newstead ,1921) <i>Sergentomyia eremetis</i> (Parrot et Jolinière, 1945) <i>Sergentomyia lewisi</i> (Parrot, 1948)
<i>Larrousius</i>	<i>Grassomyia</i>
<i>Phlebotomus perniciosus</i> Newstead 1911 <i>Phlebotomus ariasi</i> Tonnoir ,1921 <i>Phlebotomus langeroni</i> Nitzulescu, 1950 <i>Phlebotomus longicuspis</i> Nitzulescu, 1930 <i>Phlebotomus perfiliewi</i> Parrot, 1930 <i>Phlebotomus chadlii</i> Rioux, Juminer et Gibily, 1966	<i>Sergentomyia dreyfussi</i> Parrot, 1933
<i>transphlebotomus</i>	<i>Sintonius</i>
<i>Phlebotomus mascittii</i> (**)	<i>Sergentomyia clydei</i> Sinton, 1928 - <i>Sergentomyia christophersi</i> Sinton, 1927 <i>Sergentomyia hirta</i> (Parrot et de Jolinière, 1945)

(*) Un spécimen rapporté de Mila (Nord-est Algérien) par Berchi et *al* (1986) et une femelle à Tamanrasset par Benallal et *al* (2013).

(**) Une femelle rapportée en Kabylie par Berdjane-Brouk et *al* (2011).

2. Agents pathogènes transmis par les phlébotomes

Les phlébotomes sont connus pour leurs transmissions des parasites (*Leishmania*), bactéries (*Bartonella*), et virus qui affectent l'homme et l'animal dans plusieurs pays à travers le monde. Ces virus sont principalement les *Phlebovirus*, les *Vesiculovirus* et les *Orbivirus*. Certains de ces virus sont associés à des épidémies ou à des infections de l'homme (Depaquit et *al.*, 2010). Dans la région méditerranéenne, seuls les *Phlebovirus* sont reportés. Ils définissent ce qui est communément appelé le groupe des « fièvres à phlébotomes », « fièvre à pappataci » ou encore « fièvres des trois jours » (Izri et *al.*, 2006).

2.1. Généralités sur les *Phlebovirus*

Selon le 9^{ème} rapport (ICTV), Le genre *Phlebovirus* (famille Bunyaviridae) contient 9 serocomplexes viraux connus et d'autres non connus (Plyusnin et al., 2011), parmi eux certains sont transmis exclusivement ou partiellement par les phlébotomes (Alkan et al., 2015). Dans l'Ancien Monde, deux serocomplexes sont connus *Sandfly Fever Naples Virus* et *Salehabad* (collao et al., 2010 ; Remoli et al., 2014 ; Zhioua et al., 2010). Le serocomplexe des *Sandfly Fever* incluant (*sicilian SFSV*, *Naples SFNV*, *Toscana TOSV* et *Cyprus virus CYPV*) ont été isolés à partir de *Phlebotomus papatasi*, *Ph. perniciosus*, *Ph. perfiliewi*, et *Sergentomyia minuta* (Charrel et al., 2006; Tesh et al., 1976).

Les fièvres à phlébotomes sont des maladies aiguës, généralement bénignes. Elles guérissent spontanément sans séquelles. Cependant, des formes neuro-invasives graves sont parfois observées (Es-sette et al., 2016). La période d'incubation est de 2 à 7 jours, en générale les symptômes sont des fièvres de 40°C accompagnées de céphalées intenses, de nausées et des vomissements, un malaise général, une raideur de la nuque et des myalgies. (Imirzalioglu et al., 2006). Les méningites peuvent se développer comme des complications secondaires avec ou sans crises de fièvre (Pauli et al., 1995) cette particularité est trouvée des fois dans les *SFSV* et souvent chez *TOSV* (Becker et al., 1997).

2.2. Description

Les *Phlebovirus* sont des virus enveloppés de 80 à 120 nm de diamètre, avec un génome d'ARN monocaténaire de sens négatif composé de trois segments de différente taille. Le segment large (L) code l'ARN polymérase dépendante de l'ARN, le segment moyen (M) code les glycoprotéines de l'enveloppe virale GN et GC et le segment petit (S) code la protéine nucléocapside virale (N) et une protéine non structurale (Ns) (Liu et al., 2003; Xu et al., 2007) (Figure 4). Morphologiquement ils se présentent sous forme de particules sphériques ou pléiomorphiques (la capacité de changer de forme sous certaines influences) avec des projections d'une surface de 10 à 15 nm correspondant aux glycoprotéines. (Chareel, 2014).

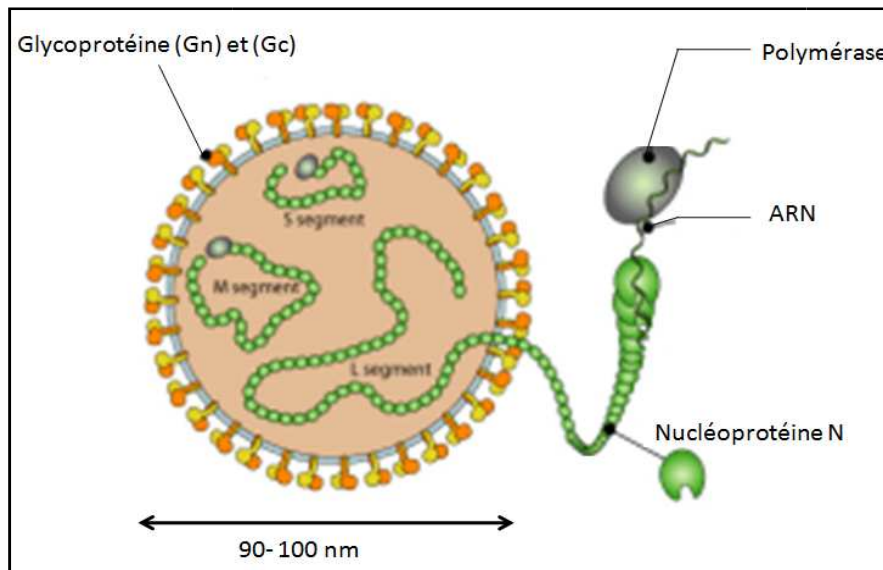


Figure 4: Schéma d'un virus appartenant a la famille des Bunyaviridae. (Christine Prat et *al.*,2013).

2.3. Répartition

Les *Phlebovirus* transmis par les phlébotomes sont distribués dans une vaste zone géographique la méditerranée, Afrique, le moyen orient, l'Asie centrale et occidentale (Figure 5) en relation avec la présence des phlébotomes vecteurs qui appartient au genre *Phlebotomus*. Il existe des preuves de la présence de différents virus dans la même population de phlébotomes (Alwassouf, 2015).

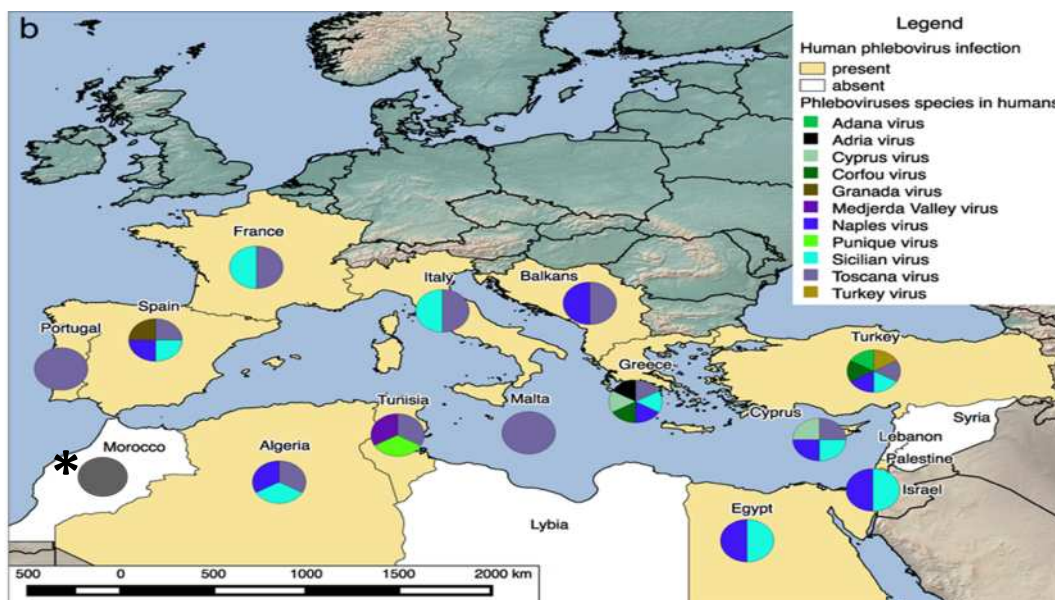


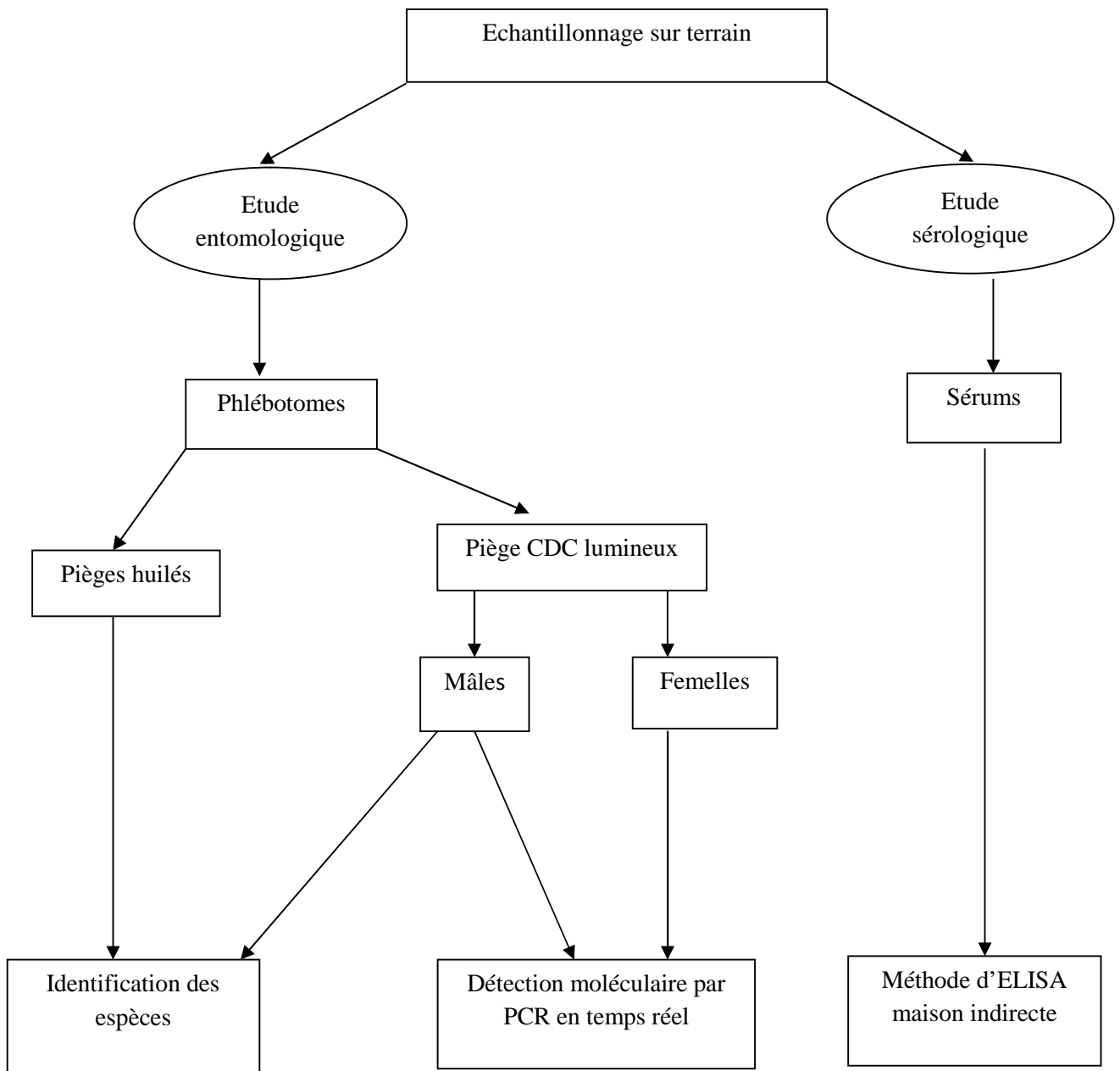
Figure 5 : Distribution des phlebovirus causées par les phlébotomes, dans le région méditerranéenne (Moriconi et *al.*, 2017) carte modifiée.

*la modification est dans la présence de *TOSV* au Maroc (Es-sette et *al.*, 2016).

2.4. Réservoir des *Phlebovirus* et leur transmission

En dehors des arthropodes, les espèces vertèbres qui jouent le rôle de réservoir de ces virus ne sont pas identifiées. Leurs rôles dans la maintenance de ces derniers est peu claire (Chareel et *al.*, 2012) ainsi que celui de l'homme (Alkan et *al.*, 2013). Les espèces de phlébotomes pourraient constituer des réservoirs dans le cycle viral (Maroli et *al.*, 1993) par la maintenance des *Phlebovirus* dans la nature soit par la transmission verticale (transovarienne) (Chareel et *al.*, 2012) et/ ou par la transmission horizontale (vénérienne) (Tech, 1988). Seules quelques études ont été effectuées sur des animaux pour vérifier leur rôle en tant que réservoirs de *Phlebovirus*. En 1984, le *TOSV* a été isolé d'une chauve-souris en Italie, alors que la fréquence élevée de l'ARN viral et des anticorps spécifiques pour le *TOSV* dans la population canine en Tunisie et en Turquie suggèrent que les chiens peuvent servir de réservoirs de *TOSV* (Sakhria et *al.*, 2014).

Méthodologie et les différentes étapes suivies dans la partie expérimentale.



Le deuxième chapitre du mémoire traitera les méthodes utilisées pour la collecte des phlébotomes, sérums humains ainsi que les techniques d'analyses.

1. Présentation de la zone d'étude

Deux régions de Tizi Ouzou ont fait l'objet de notre étude à savoir Ouacif située au sud ouest de la wilaya, avec une population de 24947 habitants. D'autre part, la deuxième région Ouadhia située au sud de la wilaya avec une population de 55377 habitants. Les deux régions appartiennent au massif de Djurdjura (Figure 6 et 7), elles ont fait l'objet d'enquêtes entomologiques et sérologiques.

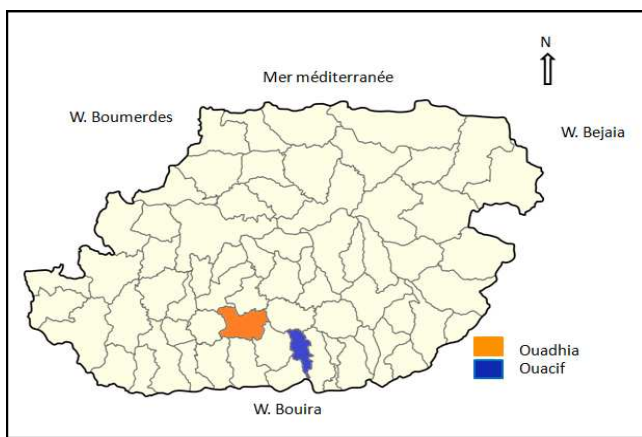


Figure 6: carte administrative de la wilaya de tizi ousou représentant les sites d'enquêtes.



Figure 7: Répartition des sites de collecte d'échantillons (Phlébotomes et sérums)
Vue par stellite (Google Earth, 2017).

2. Enquête entomologique

2.1. Collecte des données météorologiques durant la période de piégeage

Les facteurs climatiques ont des effets multiples sur la physiologie et sur le comportement des animaux et notamment les arthropodes (Dajoz, 1982). Ils jouent un rôle primordial dans la fluctuation et l'abondance de nombreuses espèces d'invertébrés terrestres et aquatiques (Ramade, 1984). Cela implique avant toute chose d'exposer et d'étudier les principaux facteurs climatiques tels que la température, la pluviométrie, l'humidité et le vent (Tableau 2).

La ville de Tizi-Ouzou se caractérise par deux périodes, l'une sèche est courte s'étale de mois de Juin jusqu'au mi septembre. L'autre est humide et longue, elle s'étale de mois de mi septembre jusqu'au mois de mai. Le quotient pluviométrique d'Emberger de la ville de Tizi-Ouzou est calculé pour une période de 11 ans (2005 – 2015), et montre que la région appartient à l'étage bioclimatique Subhumide à hiver tempéré. (Kahil et Ait Idir, 2016).

Tableau 2 : Données météorologiques de la wilaya de tizi Ouzou (2017)

Le mois	température	Humidité relative %	Vitesse de vent m/s	Précipitations
Janvier	9,9	80	1,6	-
Février	13,8	71	2,6	-
Mars	16,1	65	2,5	-
Avril*	18,2	62	2,9	-
Mai*	24	55	2,9	-
Juin*	28	50	3,6	-
Juillet*	31,8	43	3,3	-
Aout*	31,6	50	3,6	-
septembre	26,1	53	2,8	-

(https://rp5.ru/Archives_m%C3%A9t%C3%A9o_%C3%A0_Tizi_Ouzou).

**les mois où l'échantillonnage a été effectué.*

2.2. Méthodes adoptées au terrain

2.2.1. Piégeage des phlébotomes

Deux types de pièges ont été utilisés pour capturer les phlébotomes sur le terrain selon les objectifs et les résultats attendus.

2.2.1.1. Les pièges adhésifs ou pièges huilés

Le piège adhésif permet de calculer la densité relative des phlébotomes dans la zone de piégeage et d'étudier la diversité des espèces de phlébotomes ainsi que leurs dynamiques saisonnière. Le seul inconvénient c'est que les spécimens collectés sont morts.

Il s'agit de feuilles de papiers sulfurisées de format 20cm x 15cm (Figure 8, B) largement imbibées d'huile de ricin (ne présente pas d'odeur et permet d'agglutiner les phlébotomes et autres insectes) soluble dans l'alcool ce qui facilite la récupération ultérieure des phlébotomes.

Les pièges sont déposés chaque 15 jours à partir du mois d'Avril jusqu'au mois d'Août. Les pièges sont suspendus dans les abris d'animaux (ovin, bovin, caprin, lapin), crochés sur les murs et sur les grillages des fenêtres à l'aide des brochettes de bois (Figure 8 A) à une hauteur de deux mètres ou plus. Après deux jours, ces feuilles sont récupérées, comptées et regroupées par station dans des sacs en plastiques bien identifiés (Figure 8).



Figure 8 : (A) pièges huilés déposés (B) pièges huilés récupérés (originale, 2017)

2.2.1.2. Pièges lumineux CDC

Les pièges lumineux type CDC sont très largement utilisés dans la capture des phlébotomes vivants ainsi que d'autres insectes volants. Ils sont composés d'une cage couverte d'une toile de tissu de très petites mailles, d'un ventilateur muni d'un moteur et une petite lampe alimentée par une batterie de 06 volts, ce système permet d'aspirer les

phlébotomes qui s'envolent autour de cet appareil. Ces pièges sont placés dans les abris d'animaux (ovin, bovin, caprin, lapin) plusieurs fois pendant les mois Juillet et Août en fin de journée à la tombé de la nuit et récupérés très tôt le matin pour éviter le dessèchement des insectes (Figure 9). Ce type de piège permet la collecte des spécimens vivants soit pour la mise en place d'un élevage soit pour la détection moléculaire des différents types de pathogènes (virus, parasites, bactéries) ainsi que leurs isolements.



Figure 9 : pièges CDC lumineux déposés dans deux sites différents (originale, 2017),

2.2.2. Le tri et la conservation

Les spécimens collectés par les pièges huilés ont été récupérés à l'aide d'un pinceau imbibé d'alcool absolu puis conservés dans l'alcool 75° dans des tubes bien identifiés. Pour les pièges CDC, les phlébotomes sont d'abord anesthésiés au froid à -20°C pendant 15 minutes. Le tri se fait à l'aide de pinces fines et une loupe de poche à fort grossissement (Figure 10 et 11), les spécimens sont ensuite conservés dans des cryotubes. Le transport des échantillons du terrain jusqu'au laboratoire se fait soit dans l'azote liquide soit dans des bouteilles remplies d'eau préalablement glacés placées dans une glacière qui contient des carboglaces, une fois au laboratoire, ces tubes sont conservés à -80°C .

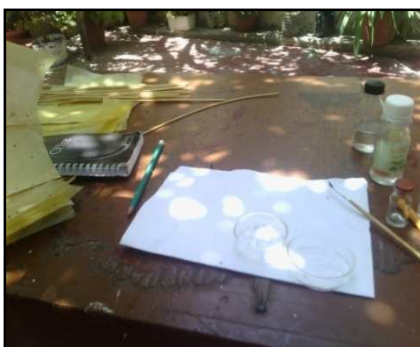


Figure 10 : Tri des phlébotomes capturés par les pièges huilés.



Figure 11: Tri des phlébotomes capturés par les pièges CDC.

2.3. Méthodes adopté au laboratoire

2.3.1. Traitement des phlébotomes collectés par les pièges huilés

Les phlébotomes (mâles et femelles) récupérés des pièges huilés ont fait l'objet d'identification morphologique pour cela ils sont éclaircis comme suit:

- Prélever l'alcool à l'aide d'une pipette Pasteur et mettre la solution KOH à 20% (Annexe 3) pendant 2h ;
- Rincer avec l'eau distillée (3 bains consécutifs de 15 min chacun), puis les laisser dans la solution du Marc Andrée (Annexe 3) une nuit complète ;
- Une fois les phlébotomes éclaircis, ils sont montés entre lame et lamelle sous loupe binoculaire dans une goutte de Marc Andrée puis identifiés sous microscope suivant les clés d'identification d'Abonnenc (1972) et de Dedet (1984). Pour la bonne visualisation des critères d'identification à savoir pharynx, cibarium et génitalia (organe de reproduction) la tête des phlébotomes est orientée dans le sens dorso-ventrale et le reste du corps est orienté sur le côté latéral (Figure 12 et 13).



Figure 12 : Observation à l'aide d'une loupe binoculaire et montage des phlébotomes entre lame et lamelle, photos originales, 2017.



Figure 13: Identification des phlébotomes à l'aide un microscope (Gx4, Gx10, Gx40); photos originales, 2017.

2.3.2. Traitement des phlébotomes collectés par les pièges CDC

Les phlébotomes collectés à l'aide des pièges CDC ont fait l'objet de détection moléculaire des virus.

La recherche de *TOSV* dans les phlébotomes collectés par les pièges CDC a été réalisée par la technique PCR en temps réel. Cette méthode est sensible et permet de visualiser les résultats de l'amplification en temps réel et ne nécessite pas l'étape de migration des produits d'amplification sur gel utilisée pour la technique PCR conventionnelle.

2.3.2.1. Le principe de la reverse transcriptase RT-PCR

La PCR est basée sur la répétition d'un processus de trois étapes : la dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin, l'hybridation des amorces à l'ADN simple brin et l'extension enzymatique des amorces par la Taq polymérase qui synthétise un brin d'ADN complémentaire de l'ADN. Plusieurs cycles sont réalisés et il en résulte une amplification de type exponentielle du fragment d'ADN cible. Pour cela une transcription inverse des ARN en ADNc est effectuée grâce à une enzyme dite reverse transcriptase (RT).

Les RT-PCR ont été réalisées dans un thermocycleur (Applied Biosystems, France) en utilisant les réactifs suivants : Master mix (Tampon, MgCl₂, DNTP), H₂O Rnase Free, amorce sens (Forward) et amorce anti sens (Reverse), sonde type «Taqman» et une Taq polymérase type Script $\square \square$ One Step Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, France).

La sonde est spécifique à chaque virus et à chaque fragment d'ADN à amplifier. Elle est composée de nucléotides portant aux deux extrémités deux molécules, une molécule fluorescente, appelée fluorophore et une autre appelée quencher (Figure 14). Le principe repose sur la fonction exonucléase 5' => 3' de la Taq-polymérase. La sonde est un oligonucléase spécifique de gène N de protéine de nucléocapside N encodées par le segment S qui est spécifique au virus *TOSV*. Le spectre d'émission du «reporter» chevauche le spectre d'excitation du «quencher». L'émission du «reporter» est atténuée par la proximité du «quencher». Si la sonde est dégradée par l'activité exonucléase de la Taq, les fluorophores ne seront plus reliés entre eux et l'émission du «reporter» sera alors détectable. L'augmentation du signal correspondant à l'émission du fluorophore «reporter» est proportionnelle au nombre de copies polymérisées à chaque cycle de la PCR. Dans une PCR, seule la phase exponentielle est représentative du nombre initial des copies d'ADN.

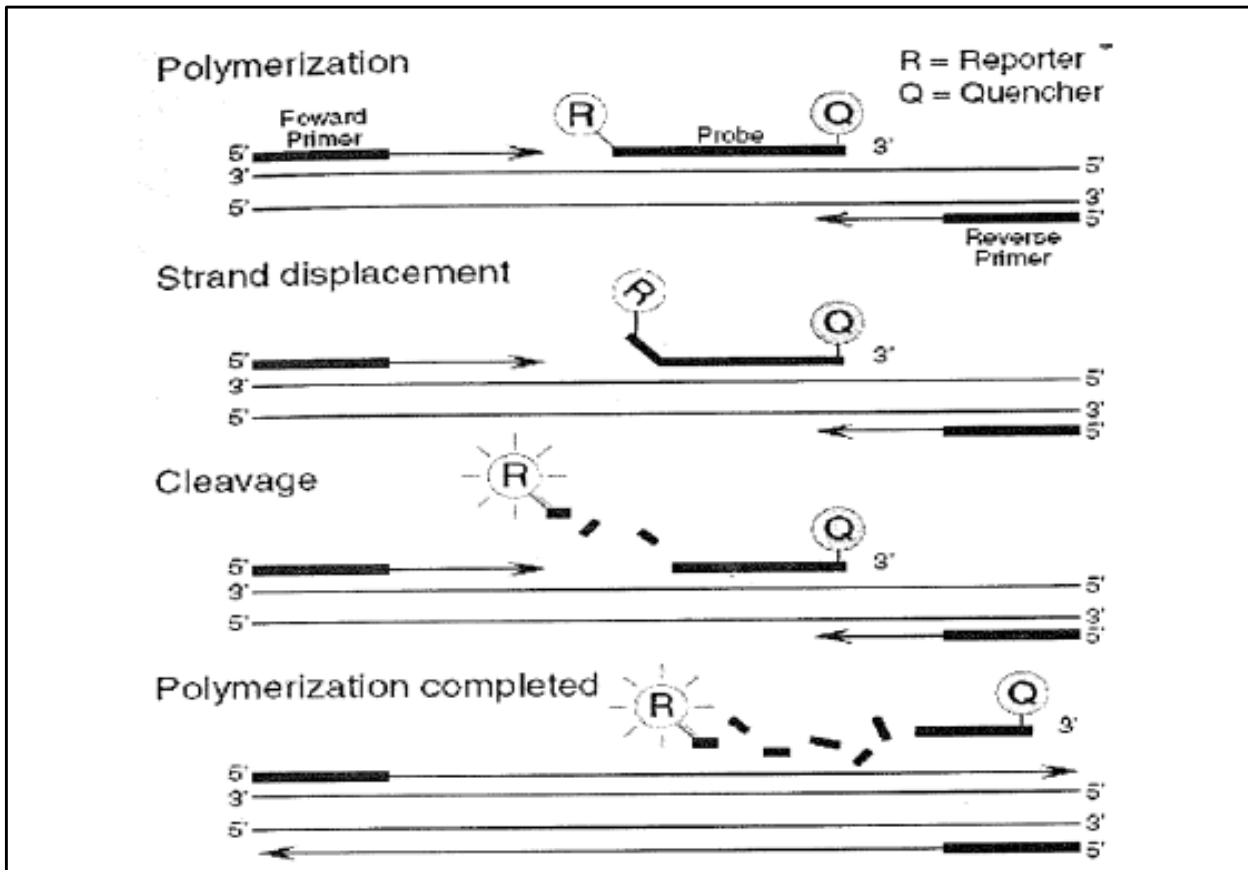


Figure 14 : Principe de la PCR en temps réel selon la technique «Taqman» Schéma du manuel d'utilisation du kit « gene expression assay » Applied Biosystème.

2.3.2.2. Protocole

2.3.2.2 .1. Broyage des phlébotomes

Les phlébotomes, du même sexe et ayant été capturés le même jour au même endroit, ont été regroupés en pools de 30 à 40 spécimens dans des Eppendorf de 2 ml contenant deux billes de tungstène de 3 mm et un milieu Leibovitz supplémenté avec 20% sérums de vaux foetal, 1% d'antibiotique et 0.005% de Fungizon.

Les pools de phlébotomes ont été broyés au moyen d'un broyeur électrique (Retsch MM400[®]). Après centrifugation, le surnageant de chaque pool a été réparti en 3 aliquotes : un pour la recherche d'ARN viral par la PCR en temps réel le deuxième pour la mise en culture du virus et son isolement en cas de positivité et le dernier pour conservation à -80°C.

2.3.2.2.2. Extraction d'ARN

L'ARN a été extrait à partir de 14 pools de phlébotomes à l'aide d'un kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN) suivant le protocole du fabricant.

Dans un premier temps, les échantillons ont été inactivés (pour des raisons de sécurité, cette étape a été réalisée dans un laboratoire d'un niveau de confinement 3 « Laboratoire P3 » et sous PSM classe II).

Pour cela, 140 µl de chaque échantillon ont été déposés dans un tube d'Eppendorf auquel 560 µl de tampon de lyse (AVL) contenant 5,6 µl de l'ARN entraîneur ont été ajoutés ce qui permet de protéger les ARN de la dégradation et de libérer le matériel génétique contenu dans le noyau. Après homogénéisation les échantillons ont été laissés 10 min à température ambiante.

Afin de précipiter l'ARN, un volume de 560 µl d'éthanol 99% a été ajouté au mélange. Après homogénéisation, 675 µl du mélange ont été prélevés et déposés dans les colonnes, puis centrifugé 1 min à 8000 rpm à 4°C.

Deux lavages avec les tampons AW1 et AW2 ont été réalisés. Les tubes ont été centrifugés à 8000 rpm à 4°C pendant 1 min. Une centrifugation supplémentaire à sec a été effectuée à vitesse maximale afin d'éliminer tous les résidus.

Afin de détacher les liaisons ioniques formées entre l'ARN et la colonne, 60 µl du tampon d'éluion ont été déposés au fond de la colonne. Après 1 min d'incubation à température ambiante les colonnes sont centrifugées à vitesse maximale pendant une minute. Les éluas d'ARN ont été récupérés dans des tubes et conservés directement à -20°C puis à -80°C pour éviter la dégradation du virus.

2.3.2.2.3. Amplification par RT-PCR

La RT-PCR est réalisée dans un thermocycleur (Applied Biosystems, France). Chaque tube contient un mélange de 20 µl (12.5 µl du Master Mix, 0.5 µl de l'enzyme, 1 µl de chaque amorce sens et anti-sens, 1 µl de sonde TaqMan spécifique, 4 µl d'H₂O) et 5 µl de l'extrait d'ARN.

Tableau 3 : Amorces et sonde utilisées dans la RT PCR. (Mercedes et al., 2007).

Amorce	Séquence 5'-3'
Amorce sens forward (Stos 50F)	TGC TTT TCT TGA TGA GTC TGC AG
Amorce anti-sens Reverse (Stos138R)	CAA TGC GCT TYG GRT CAA A
La sonde (Stos84FAM)	6FAM-ATC AAT GCA TGG GTR AAT GAG TTT GCT TAC C-Dabcyl

L'étape de la RT-PCR a été réalisée suivant le protocole de Mercedes et al (2007).

Une retro-transcription de l'ARN viral en ADNc pendant 30 min à 50°C a été réalisée, suivi par une dénaturation de l'hybride ARN/ADNc formé et l'activation de l'enzyme Quanta one step (qScript □ □ One Step RT) pendant 2 minutes à 95°C.

L'amplification de l'ADN était réalisée par un processus appelé « PCR ». Cette technique est basée sur la répétition d'un processus en trois étapes : La dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin à 95°C, l'hybridation des amorces à l'ADN simple brin à 60°C et l'extension enzymatique des amorces par une ADN polymérase thermostable qui synthétise un brin d'ADN complémentaire de l'ADN simple brin qui sert de cible pour les amorces oligonucléotidiques. 40 cycles de 15 secondes à 95°C puis 60 secondes à 60° C ont été réalisés.

3. L'enquête sérologique

3.1. Collecte des sérums

L'enquête de séroprévalence permet de mesurer et de connaître à posteriori le pourcentage des personnes qui ont contracté ou ils ont été en contact avec le virus par la technique d'ELISA. Cette technique permet de détecter les anticorps IgG spécifiques des virus transmis par les phlébotomes à savoir : *Toscana*, *Naples* et *Sicilian*. La collecte des sérums a été faite d'une façon aléatoire. Des sérums de patients qui sont originaires des deux régions d'étude « Ouacif » et « Ouadhia », venus au laboratoire pour des analyses de routines durant le mois d'Août de cette année ont été analysés. 200 sérums ont été collectés en respectant les pourcentages de différentes tranches d'âge représentatifs de la population Algérienne âgée de moins de 5 ans à plus de 75 ans (Tableau 4). Les prélèvements ont été conservés à +4°C jusqu'au jour d'analyse.

Le tableau 4 : Nombre de prélèvements par tranche d'âge et par région.

	<5 ans	5-9 ans	10-14 ans	15-24 ans	25-54 ans	55-64 ans	65-74 ans	>75 ans	total
Pourcentage des tranches d'âge dans la population Algérienne	12%	10%	8%	17%	42%	6%	3%	2%	100%
Nbr de sérums Ouadhia	12	10	8	17	42	6	3	2	100
Nbr de sérums Ouacif	11	10	8	17	42	6	3	2	99

3.1. Le Principe de l'ELISA indirecte :

L'ELISA est une technique enzymo-colorimétrique qui permet la détection et la révélation des réactions antigène/anticorps. Une coloration est produite suite à la dégradation du substrat par une enzyme conjuguée à un anticorps.

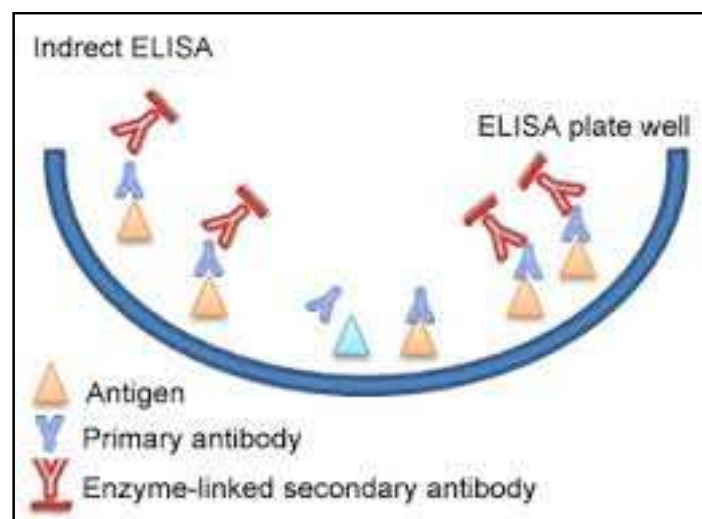


Figure 15 : Principe de l'ELISA indirecte - <http://www.elisa-antibody.com>

3.2. Phase pré-analytiques : traitement des sérums

Les prélèvements sont conservés à +4°C et transportés dans des glacières vers le laboratoire pour analyse. Un total de 199 prélèvements ont été aliquotés sous une hotte à flux laminaire (PSM de Classe II) puis inactivés dans le bain marie à 56°C pendant 20 minutes.

3.3. Le protocole

Une microplaque de 96 puits est sensibilisée par alternance des rangés entre l'antigène cellulaire du virus Toscana et le surnageant cellulaire (milieu de culture du virus). La plaque a été incubée à +4°C toute la nuit.

Une aspiration du contenu des cupules a été effectuée, à l'aide d'un laveur automatique (PW40, BIORAD[®]). Afin de saturer les sites non spécifiques, une solution de PBS-lait à 5% a été déposée dans chaque cupule pendant 1h à température ambiante. Après une série de 4 lavages par le PBS-Tween 20 à 0,05%, les sérums ont été dilués à 1/100^{ème} dans les cupules correspondantes (Tableau 5). La plaque a été incubée à 37°C pendant 1h.

Une solution d'anticorps conjugué à la peroxydase diluée à 1/10000^{ème} a été rajoutée dans les cupules après une deuxième série de lavage puis la plaque est incubée 1h à 37°C. A la fin de l'incubation, une nouvelle série de lavage a été effectuée.

Pour révéler la réaction, un volume de substrat TMB a été déposé dans chaque puits, à l'abri de la lumière. La réaction enzymatique induit l'apparition d'une coloration bleue. Après 5 minutes, la réaction est arrêtée par l'H₂SO₄, la coloration vire du bleu au jaune.

La concentration des IgG est directement proportionnelle à l'intensité de la coloration. Elle est mesurée par un spectrophotomètre (PR 4100 BIORAD[®]) à la longueur d'onde de 450 nm et 620 nm.

Tableau 5 : Schéma de la plaque.

Sur	Ag	Sur	Ag	Sur	Ag	Sur	Ag	Sur	Ag	Sur	Ag
NC W302/1 4 SII	NC W302/1 4 SII	Ouacif 07	Ouacif 07	Ouacif 16	Ouacif 16						
PC W285/1 4 SII	PC W285/1 4 SII	Ouacif 09	Ouacif 09	Ouacif 17	Ouacif 17						
Ouacif 01	Ouacif 01	Ouacif 10	Ouacif 10	Ouacif 18	Ouacif 18						
Ouacif 02	Ouacif 02	Ouacif 11	Ouacif 11	Ouacif 19	Ouacif 19						
Ouacif 03	Ouacif 03	Ouacif 12	Ouacif 12	Ouacif 20	Ouacif 20						
Ouacif 04	Ouacif 04	Ouacif 13	Ouacif 13	Ouacif 21	Ouacif 21						
Ouacif 05	Ouacif 05	Ouacif 14	Ouacif 14	Ouacif0 8	Ouacif 08						
Ouacif 06	Ouacif 06	Ouacif1 5	Ouacif1 5	Ouacif0 9	Ouacif 09						

NC : Control négatif / PC : Control Positif

4. Méthodes d'exploitation des résultats

4.1. Résultats d'identification des phlébotomes

Exploitation des résultats d'identification des phlébotomes par les indices écologiques de composition à savoir :

La richesse totale, la richesse moyenne et l'abondance relative.

4.1.1. Richesse totale (spécifique S)

La richesse totale S est l'ensemble des espèces que comporte un peuplement considéré dans un écosystème donnée (Ramade ,1984).

4.1.2. Abondance relative

La fréquence F est le pourcentage des individus d'une espèce Ni par rapport au nombre totale des individus N (Dajoz, 1975).

$$F_c = (n_i * 100) / N$$

ni : nombre des individus de l'espèce prise en considération.

N : nombre total des individus de toutes les espèces.

4.2. L'exploitation des résultats sérologiques :

La densité optique (DO) des différentes cupules est calculée par une soustraction de la DO du surnagent et la DO de l'antigène.

Si la différence de DO est inférieure ou égale à 0,1 le résultat est négatif. En revanche si elle est supérieure ou égale à 0,3 le résultat est positif. Une valeur comprise entre 0,1 et 0,3 correspond à un résultat indéterminé.

Ce chapitre résume les résultats des deux enquêtes entomologiques et sérologiques ainsi que la discussion

1. Résultats

1.1. Résultats de l'enquête entomologique

1.1.1. Inventaire global des phlébotomes

Au total, 29 nuits de piégeages par pièges huilés (tableau 06) ont permis la collecte de 3715 phlébotomes appartenant à 7 espèces et 1928 phlébotomes par piège CDC dans les deux régions d'études (Ouacif et Ouadhia) entre le mois d'Avril et le mois d'Aout 2017.

1.1.1.1. Inventaire des phlébotomes capturés par pièges adhésifs

L'identification des 3715 phlébotomes capturés grâce aux pièges adhésifs dans les régions d'Ouacif et Ouadhia sont résumés dans le Tableau 07.

Tableau 6 - Résultat des relevés par pièges adhésif des deux régions durant l'année 2017 d'Avril à Août.

	Mois	Nbr. de pièges		Surface en m ²	mâles	Femelles	Total
		déposés	récupérés				
Ouacif	Avril	23	20	1,2	0	0	0
	Mai	97	88	5,28	20	3	23
	Juin	185	166	9,96	238	93	321
	Juillet	163	157	9,42	209	81	290
	Août	30	20	1,2	22	6	28
	Total	494	451	27,06	489	183	672
Ouadhia	Avril	20	14	0,84	0	0	0
	Mai	70	59	3,54	32	10	42
	Juin	166	154	9,24	256	99	355
	Juillet	259	246	14,76	486	99	585
	Août	95	55	3,3	81	52	133
	Total	610	528	31,68	855	260	1115
Total		1104	979	58,74	1344	443	1787

Au niveau de la région d'Ouacif un total de 494 pièges ont été déposés et 451 ont pu être récupérés soit une surface de 27.06 m². Ces pièges ont permis de collectés 672 spécimens tous genres confondus soit une densité de 24.83 phlébotomes par mètre carré. Par contre au niveau de la région d'Ouadhia un total de 610 pièges ont été déposés et 528 ont pu être récupérés soit une surface de 31.68 m², ces pièges ont permis de collectés 1115 spécimens tous genres confondus soit une densité de 35.20 phlébotomes par mètre carré.

Tableau 7 : Résultat de l'inventaire global des phlébotomes capturés.

Genre	Sous genre	Espèce	Richesse totale
<i>Phlebotomus</i>	<i>Ph. Phlebotomus</i>	<i>Ph. papatasi</i>	7 espèces
	<i>Ph. Paraphlebotomus</i>	<i>Ph. sergenti</i>	
	<i>Ph. Larroussius</i>	<i>Ph. perfiliewi</i>	
		<i>Ph. longicuspis</i>	
		<i>Ph. perniciosus</i>	
<i>Sergentomyia</i>	<i>S. Sergentomyia</i>	<i>Ph. antennata</i>	
		<i>Ph. minuta parroti</i>	

Ce tableau représente l'ensemble des phlébotomes capturés dans les deux régions d'étude durant une période de 5 mois.

1.1.1.1. Variation temporelle du nombre de phlébotomes capturés par mois.

L'étude de l'évolution temporelle des espèces Phlébotomiennes dans la région d'Ouacif et Ouadhia sera présentée et regroupée dans la figure 16.

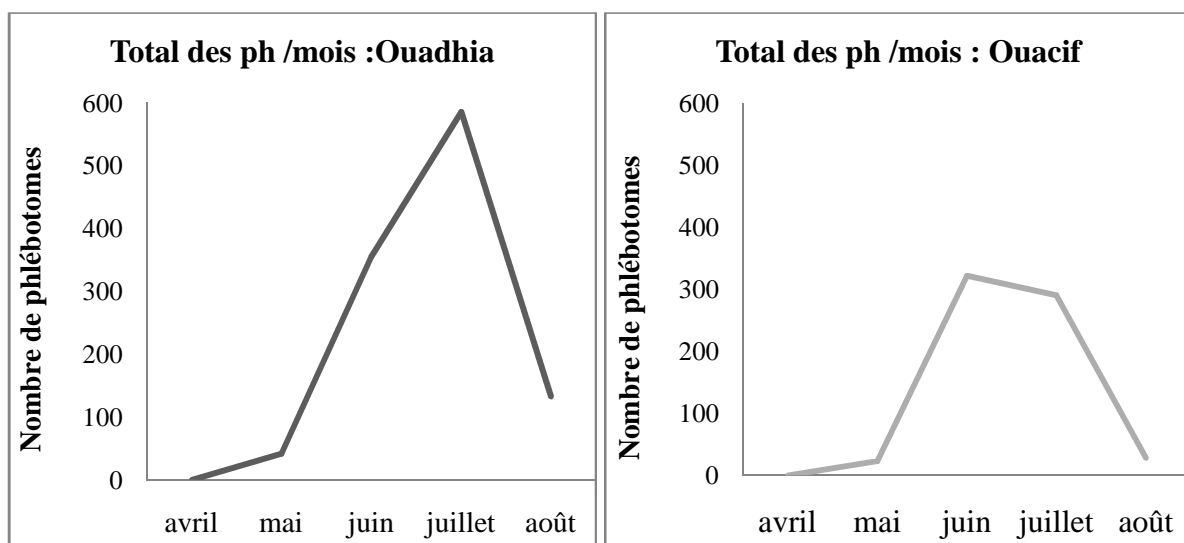


Figure 16 : Dynamique saisonnière des phlébotomes collectés dans les deux régions.

La dynamique saisonnière des phlébotomes dans les deux régions n'est pas la même puisque le pic enregistré à Ouacif correspond au mois de juin par contre celui enregistré à Ouadhia correspond au mois de juillet sauf que la densité est plus importante dans la région d'Ouadhia qu'à Ouacif.

L'identification morphologique des phlébotomes collectés par les pièges huileux à révéler la présence de 07 espèces appartenant à quatre sous genres à savoir le sous genre *Phlebotomus*, *Paraphlebotomus*, *Larroussius* et *Sergentomyia*. L'espèce dominante dans les

deux régions est *Ph. perniciosus* avec une abondance relative (AR) de 71.12 % et 82.44% suivi par *Ph. papatasi* 9.24% et 3.57% et *Ph. longicuspis* 7.98% et 5.5% à Ouadhia et Ouacif respectivement (Tableau 09, figure 17 et figure 18).

Tableau 8 : Nombre des spécimens et leur abondance relative.

Espèces	Ouadhia		Ouacif	
	Nbre. Ind.	AR%	Nbre. Ind.	AR%
<i>Ph. perniciosus</i>	793	71,12	554	82,44
<i>Ph. papatasi</i>	103	9,24	24	3,57
<i>Ph. longicuspis</i>	89	7,98	37	5,50
<i>Ph. perfiliewi</i>	6	0,36	3	0,45
<i>Ph. sergenti</i>	88	7,89	30	4,47
<i>S. minuta</i>	33	2,96	18	2,68
<i>S. antennata</i>	3	0,27	6	0,89
Total	1115	100%	672	100%

1.1.1.2. Inventaire des phlébotomes récoltés dans les régions d'études par pièges CDC

Les pièges lumineux type CDC sont déposés à raison de 4 nuits consécutives entre le mois de juillet et Août. Un total de 1928 phlébotomes a été capturé dans les deux régions. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Nombre de phlébotomes collectés par les pièges CDC et le nombre de femelles analysées par RT-PCR.

région	date	Total des phlébotomes capturés par piège CDC	Femelles analysées en RT-PCR
Ouadhia	24/07/2017	219	30
	26/07/2017	190	48
	25/08/2017	380	66
	19/08/2017	333	/
	26/08/2017	311	30
Ouacif	20/07/2017	241	74
	17/07/2017	188	113
	18/08/2017	79	53
Total		1941	414

Parmi les phlébotomes recensés avec les pièges CDC lumineux, seulement 414 femelles ont été analysées par la real time PCR pour la détection des virus soit 174 d'Oudhia et 240 d'Ouacif.

1.1.1 2.1. Résultats de la détection moléculaire

Les 414 femelles prises au hasard ont été poolées en 14 pools soit 7 pools pour chaque région. Tous les pools se sont révélés négatifs pour le virus Toscana seul ciblé par la technique real time PCR (Figure 17).

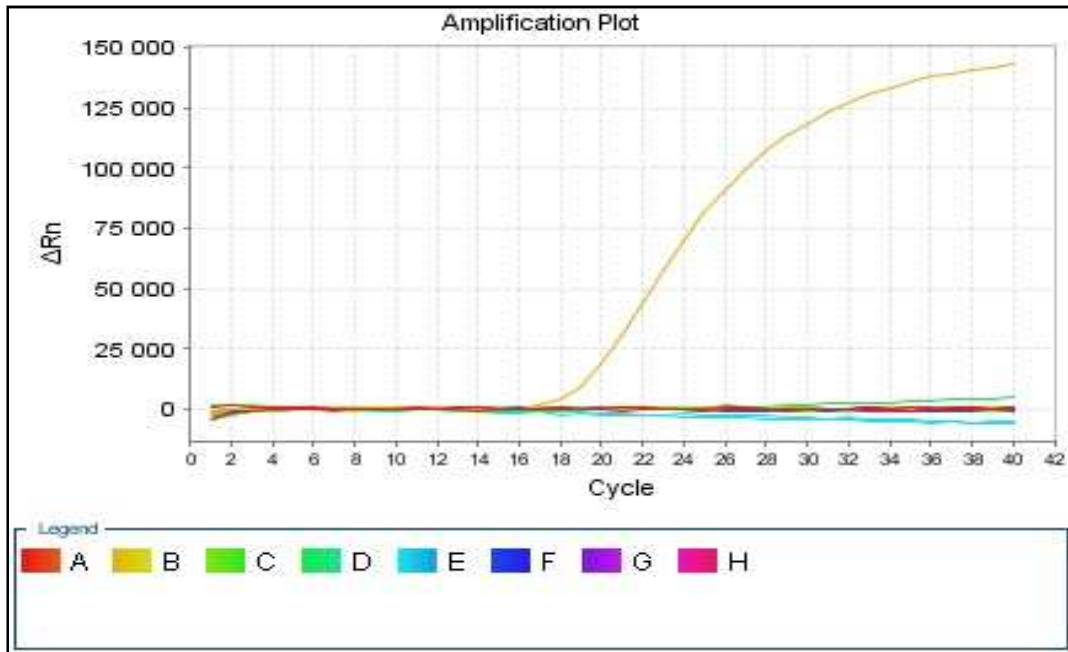


Figure 17 : Résultat de la RT-PCR *TOSCANA virus*.

A : contrôle négatif, B : contrôle positif, C, D, E, F, G, H... : échantillons des deux régions.

1.2. Résultat de l'étude sérologique

199 sérums (100 de la région d'Ouadhia et 99 de la région d'Ouacif) ont été analysés par la technique d'ELISA indirecte maison ciblant les IgG anti-*Phlebovirus*. Sur les 199 sérums testés, 83 ses ont révélés positifs soit 39% pour Ouadhia et 41% pour Ouacif. Les résultats de cette étude sont représentés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Taux des cas positifs et nombre des sérums récupérés dans les deux régions d'étude.

	Ouacif	Ouadhia
Taux de positivité	41%	39%
Total des sérums	99	100

L'analyse des résultats de la sérologie des deux régions a montré la présence d'anticorps anti *Phlebovirus* chez les sujets de toutes les tranches d'âges avec une prédominance chez les adultes (figure 18).

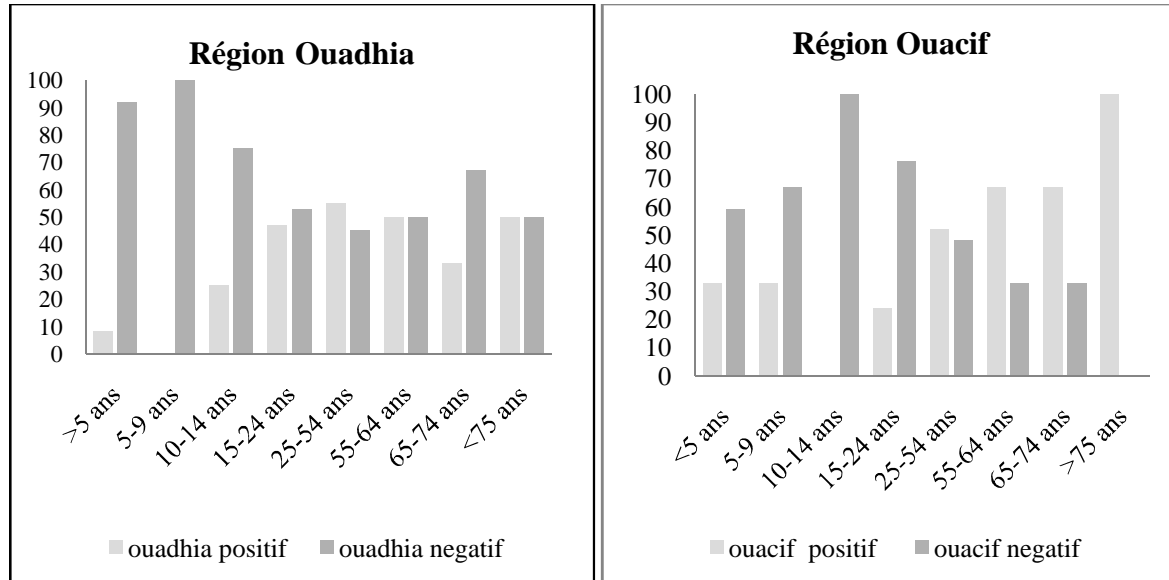


Figure 18 : Graphes représentant le pourcentage des cas positifs et négatifs en fonction des tranches d'âge dans la région d'Ouadhia et d'Ouacif.

2. Discussion

Les phlébotomes sont des insectes diptères dont les femelles sont hématoiphages et responsables de la transmission de plusieurs types de pathogènes tel que les parasites, les bactéries et les virus.

Dans la région méditerranéenne et en particulier en Algérie, ils constituent un véritable problème de santé publique car ils sont responsables de la transmission du parasite *Leishmania*. L'identification des espèces de phlébotomes collectés a permis de distinguer 07 espèces dans les deux régions un résultat déjà reporté par Mouloua et *al* (2014) sauf que dans la région de Boughni et Draa El Mizan 10 espèces ont été dénombrées (Harrat et *al.*, 2006). L'espèce *Phlebotomus perniciosus* vecteur prouvé du parasite *Leishmania infantum* responsable de la leishmaniose viscérale (Izri et *al.*, 1990; WHO, 2010) et aussi vecteur de *Toscana virus (TOSV)* puisque en 1971 le virus a été isolé pour la première fois de cette espèce phlébotomes en Italie (Virani et *al.*, 1980). *Phlebotomus perniciosus* est l'espèce la plus dominante et la plus abondante dans les deux régions car elle est très inféodée au climat subhumide, par contre le classement de *Ph. papatasi* en deuxième position est une surprise puisque cette espèce est plus inféodée au climat aride et semi aride et saharien (Abonnenc,

1972). Dans le futur elle pourrait causée un autre problème à cette région en introduisant la troisième forme de leishmaniose cutanée causée par *Leishmania major* si le rongeur *Meriones* sp gagne plus de terrain puisque ce dernier a été reporté dans la vallée de la Soumame en 2009 (Boudrissa et al., 2012). Mise à part le risque parasitaire qui pourrait être causé par les phlébotomes, la recherche de virus *Toscana* responsable de fièvres durant la période d'été n'a pas été fructueuse probablement due au nombre réduit de pools testés puisque dans la région de Draa El Mizan il a fallut plus de 200 pools et 21998 phlébotomes pour trouver un seul pool positif (Alkan et al., 2015). Les conditions environnementales de cette année tel que les feux de forêt ont sensiblement diminuer le nombre de phlébotomes dans les pièges, néanmoins les travaux antérieurs ont montré qu'il y a une circulation du virus *Toscana* dans la région de Tizi Ouzou (Alkan et al., 2015) ainsi que d'autre type de virus *SFSV-like* (Izri et al., 2008) détecté chez *Ph. ariasi* et *SFNV-like* détecté *Ph. papatasi* mâle (Moureau et al., 2010), par contre aucun virus n'a été reporté des régions du grand sud comme la région de Tamanrasset et Djanet (Tesh et al., 1976). La recherche du virus *TOSV* dans les phlébotomes a concerné que ceux qui ont été collectés entre le mois de Juillet et le mois d'Août, car c'est la période propice pour la détection en raison de la densité importante des phlébotomes durant cette période. D'autre part, les données fournies par le Laboratoire des Arbovirus de l'Institut Pasteur d'Algérie montrent que tous les cas humains enregistrés en Algérie et particulièrement en Kabylie ont été enregistrés durant cette période.

La dépistage passive par la technique Elisa des IgG anti virus appartenant au genre *Phlebovirus* (Schwarz et al., 1995) chez les personnes choisis a permis de montrer la grande circulation de ces virus dans la région de Ouacif et de Ouadhia. Cette détection concerne les sujets de toutes tranches d'âge particulièrement les adultes. Ces données confirment les résultats rapportés dans la région de Draa El Mizan où 45% de la population testée par la technique de séroneutralisation ont contracté le virus *TOSV* (Alkan et al., 2015).

Tenant compte des données d'Alkan et al., 2015, nos données sérologiques peuvent suggérer la présence du virus *TOSV*. En revanche, en raison des réactions croisées avec d'autres *Phlebovirus*, les résultats doivent être confirmés par la technique de séroneutralisation.

Intéressant de signaler la présence des IgG chez 3 nouveaux nés dans la région de Ouacif (deux jumelles de 2 jours avec un taux de positivité identique et un nouveau né de 3 jours). Ces anticorps peuvent être dus au passage transplacentaire des IgG anti *TOSV* de la maman vers le fœtus, car l'apparition des IgG chez dans un organisme ne se fait qu'à partir du 7^{ème} jours post infection (Imizzaliogu, 2006).

Au terme de notre travail dans les deux régions à savoir Ouadhia et Ouacif, les résultats ont montré la présence de 7 espèces de phlébotome. *Phlebotomus perniciosus* est classée au premier rang pour les deux régions suivi par *Ph. papatasi* dans la région d'Ouadhia une espèce qui est connu a été inféodé au climat aride et semi aride. Malheureusement la détection moléculaire du virus *Toscana* s'est révélée négative sur les pools testés mais l'enquête sérologique a permis de mettre en évidence la présence d'IgG anti *Phlebovirus* chez 41% des prélèvements testés pour les deux régions confirmant ainsi qu'il y une circulation importante de ces virus dans les zones d'étude surtout chez les sujets adultes. D'autre part une nouvelle en Algérie, c'est la détection d'IgG anti *Phlebovirus* chez 3 nouveau nés prouvant ainsi que ce type d'anti corps peut passer la barrière placentaire de la maman.

Afin d'améliorer notre travail, cette étude doit être menée sur un échantillonnage de phlébotome plus important pour tester un très grand nombre de pools, effectuer sur les échantillons testés d'autres techniques moléculaires type PCR classique niché pour la détection d'autres virus qui appartiennent au genre *Phlebovirus*. Il est aussi important de réaliser une séroneutralisation sur les sérums positifs pour mieux caractériser le virus circulant dans ces régions. Enfin, nous devons identifier les différents réservoirs potentiels de ces virus pour mieux adapter les mesures de luttés.

Références bibliographiques

Abonnenc E., 1972 - Les phlébotomes de la région Ethiopienne (Diptera : Psychodidae). *Mem ; O.R.S. T. O. M, Ser. Ent. Med. Parasitol.*, 289p.

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.

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.

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

Ba Y., Trouillet J., Thonnon J., Fontenille D., 1999 - *Phlebotomus* of Senegal: survey of the fauna in the region of Kedougou. Isolation of arbovirus. *Bull Soc Pathol Exot.* 92, 131–135.

Baldi L., Mizzoni V, Guarino A., 2004 - Canine leishmaniasis in Campania: new and old foci. *Parasitologia*, 46, 217-220.

Becker M, Zielen S, Schwarz TF, Linde R, Hofmann D., 1997 - Pappataci fever. *Klin Padiatr*; 209:377-379.

Belazzoug S. 1991. The sandflies of Alegria. *Parasitologia* 33 (Suppl 1), pp. 85- 87.

Benallal K., Gasseu B., Bouiba L., Depaquit J., Harrat Z., 2013 - Visceral leishmaniasis in the Hoggar (South Algeria): a former neglected focus. (Sous presse)

Berchi S., Rioux J.-A., Belmonte A., Russo J., 1986 - Un phlébotome nouveau pour l'Algérie, *Phlebotomus (Paraphlebotomus) kazeruni*. *Annale parasitologie humaine comparée*. n° 4,61 :507-508.

Berdjane-Brouk Z., Charrel R.N., Bitam I., Hamrioui B., Izri A., 2011 - Record of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908 and *Phlebotomus (Larroussius) chadlii* Rioux, Juminer & Gibily, 1966 female in Algeria. *Parasite*, p :18, 337-339.

Boussa S., 2008 - *Epidemiologie des leishmanioses dans la région de Marrakech, Maroc : effet de l'urbanisation sur la repartition spatio-temporelle des Phlébotomes et caractérisation moléculaire de leurs populations*. Th. Doc. Univ. Louis Pasteur Strasbourg I. Fr.181p

Boudrissa, A, Chrif K, I.Kherrachi, S. Benbetka. L, Bouiba.S.C Boubdi, R. 2012 - Extension de la leishmaniose de leishmaniose major au nord de l'Algérie. *Bull. soc. pathol. Exact.*, 105:30-35

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.

Charrel, R.N., Bichaud, L., and de Lamballerie, X., 2012 - Emergence of Toscana virus in the

mediterranean area. *World J. Virol.* 1, 135–141.

Chareel 2014 - Infection par virus Toscana. *EMC biologie médicale.*, 9(2):1-9

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.

Christine Prat, Isabelle Leparç-Goffart, 2015 - Evaluation des kits de diagnostic de la dengue et du chikungunya rôle du CNR et implications pour la surveillance. CNR des arbovirus – Evaluation de kits de diagnostic - CNR des Arbovirus P18 .

Dedet J. P., 1999 - *Les leishmanioses*. Edition Ellipses, Paris, 253 p.

Dedet J.-P., Addadi K., Belazzoug S., 1984 - Les Phlébotomes (Diptera: Psychodidae) d'Algérie. Cah. ORSTOM. *Serie Entomologie Médicale et Parasitologie* .vol XXII, n° 2, 99-127.

Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry PE, Peyrefitte C.2010. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe. *Euro Surveill.*; 15(10):19507.

Dolmatova A.V., Demina N.A., 1971 - Les Phlebotomes (Phlebotominae) et les maladies qu'ils transmettent. *Cah. ORSTOM Documentation tech.*, N. 55, p. 289.

Es-Sette M. Ajaoud R.N. Charrel M. Lemrani, 2016 - Épidémiologie moléculaire des *Phlebovirus* dans quatre provinces du Maroc, 109:143-150.

Foley et Leduc, 1912 - Phlébotomes de sud oranais. Accidents simplement locaux dus à leurs piqures. *Bull. Soc. Path. Exot. T.V*, pp 511,513.

Gubler, D.J., 2001 - Human arbovirus infections worldwide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 951, 13–24.

Harrat Z., 2006 - *La leishmaniose canine en Algérie. Analyse épizootologique, écologique et étude du parasite*. Th. doc. Science vétérinaire, Centre Univ. El Tarf, Algérie 119p.

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

Izri, M.A., Belazzoug, S., Boudjebba, Y., Dereure, J., Pratlong, F., Delalbre-Belmonte A., Rioux J.A., 1990 - *Leishmania infantum* MON-1 isolé de *Phlebotomus perniciosus*, en Kabylie (Algérie). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 65,151–152.

Izri a, Depaquit j., Parola P, 2006 - Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes autour du bassin méditerranéen. *Médecine Tropicale* 66(5) 429-435.

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.

- DAJOZ R., 1982 - *Précis d'écologie*. Ed., Dunod, Paris, 280p.
- Killick-Kendrick R., 1999 - The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17, 279–289.
- Kahil et Ait Idir, 2016 - *Contribution à l'étude des phlébotomes dans la région de Iloula Oumalou et Beni Zmenzer*. Memo. Master. Univ. Mouloud Mammerie Tizi-Ouzou, 67p.
- LEWIS, D. J. 1974. The phlebotomid sandflies of Yemen Arab Republic. Tropenmedizin Parasitologie Vol.25 No.2 pp.187-97
- Léger N., Depaquit J., 1999 - Les phlebotomes. In: *J-P. Dedet (ed.)*, les leishmanioses, Paris: Ellipses : 90-108.
- 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.
- 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.
- Mercedes Perez-Ruiz, Ximena Collao Jos'e-Maria Navarro-Mar, Antonio Tenorio, 2007 - Reverse transcription, real-time PCR assay for detection of Toscana virus. *Journal of Clinical Virology* 39 (2007) 276–281
- Moriconi M, Rugna G, Calzolari M, Bellini R, Albieri A, Angelini P, et al., 2017 - Phlebotomine sandfly borne pathogens in the Mediterranean Basin: Human leishmaniasis and phlebovirus infections. *PLoS Negl Trop Dis* 11(8).
- Moureau G, Bichaud L, Salez N, Ninove L, Hamrioui B, Belazzoug S., 2010 - Molecular and serological evidence for the presence of novel phleboviruses in sandflies from Northern Algeria. *Open Virol J*;4: 15–21.
- Mouloua A., 2014 - *Etude éco-épidémiologique de la leishmaniose canine en Kabylie Algérie*. Thé. Doc. Univ., Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, 182p.
- Niang A-A., 2000. Les phlebotomes de l'Afrique de l'Ouest. *Logiciel d'identification et d'enseignement, IRD edition*.
- Nicoletti L, Verani P, Caciolli S, Ciufolini MG, Renzi A, Bartolozzi D., 1991 - Central nervous system involvement during infection by *Phlebovirus toscana* of residents in natural foci in central Italy (1977–1988). *Am J Trop Med Hyg*;45:429–34.
- Pinto M.C, Campbell-Lendrum D.H, Lozovei A.L, Teodoro U et Davies C.R., 2001 - Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Med. Vet. Entomol.* 15, 132-139.
- Plyusnin A, Beaty BJ., Elliott RM, Goldbach R, Kormelink R, Lundkvist A, Schmaljohn CS, and Tesh RB., 2011 - Bunyaviridae, In *Virus taxonomy: classification and nomenclature of*

viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *San Diego: Elsevier*. pp. 693–70

Pauli C, Schwarz Tf, Meyer CG., Jager G., 1995 - Neurological symptoms after an infection by the sandfly fever virus. *Dtsch Med Wochenschr*; 120;:1468-1472.

RAMADE F., 1984 - *Eléments d'écologie. Ecologie fondamentale*. Ed. Mc Graw-Hill. Paris, 397p.

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

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.

Schwarz, Jäger, Gilch, Pauli., 1995 - Serosurvey and laboratory diagnosis of imported sandfly fever virus, serotype Toscana, infection in germane. *Epidemiol infect*; 14:501-510.

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

Tesh, R. B., 1988 - The Genus *Phlebovirus* and its Vectors. *Annu. Rev. Entomol.* 33, 169–181.

Tahir, Alwassouf, Loudahi, Davust, Chareel, 2015 - Seroprevalence of Toscana virus in dogs from Kabylia (Algeria). *Clin Microbiol Infect*; 22:e 16-e17.

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

Verani P, Ciufolini, Nicoletti L, Balducci M. Sabatinelli, Cluzzi, 1982 - Ecological and epidemiological studies of Toscana virus. An arbovirus isolated from *Phlebotomus*, *Ann ist supper sanita*; 18:397-9

WHO, 2010 - Control of the leishmaniases: *Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22±26 March. 2010.*

Xu F, Chen H, Travassos da Rosa AP, Tesh RB, Xiao SY. 2007 - Phylogenetic relationships among sandfly fever group viruses (*Phlebovirus*: Bunyaviridae) based on the small genome segment. *J Gen Virol* 88: 2312–2319.

Zhioua E, Moureau G, Chelbi I, Ninove L, Bichaud L, Derbali M, Champs M, Cherni S, Salez N, Cook S, de Lamballerie X, Charrel RN., 2010 - Punique virus, a novel *Phlebovirus*, related to sandfly fever Naples virus, isolated from sandflies collected in Tunisia. *J Gen Virol.* 91(Pt 5):1275-83. doi: 10.1099/vir.0.019240-0.

Sites consultés

<http://archive.wikiwix.com/cache/?url=http%3A%2F%2Fwww.tiziouzou-dz.com%2Fpopulation-evolu-intercensit.htm>

(https://rp5.ru/Archives_m%C3%A9t%C3%A9o_%C3%A0_Tizi_Ouzou)

<http://www.elisa-antibody.com>

Google earth 2017

Annexe : 1

les *Phlebovirus* pathogènes ou potentiellement pathogènes à l'Homme dans la région Méditerranéenne (Moriconi *et al.*, 2017)

	Genre	Sérocomplexe	Espèces
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Phlebovirus</i>	<i>Sand fly fever naples</i>	<i>Sandfly fever Naples virus (SFNV)</i> <i>Toscana virus (TOSV)</i> <i>Massilia virus (MASV)</i> <i>Tehran virus (TEHV)</i> <i>Granada virus (GRV)</i> <i>Punique virus (PUNV)</i> <i>Fermo virus</i> <i>Saddaguia virus (SADV) [d/ni]</i> <i>Arrabida virus</i> <i>Zerdali virus (ZERV)</i>
		<i>Salehabad</i>	<i>Salehabad virus (SALV)</i> <i>Arbia virus (ARBV)</i> <i>Adria virus (ADRV) [d/ni]</i> <i>Alcube virus</i> <i>Edirne virus [d/ni]</i> <i>Adana virus (ADAV)</i> <i>Medjerda Valley virus (MVV)</i>
		<i>Sandfly fever sicilian (ts)</i>	<i>Sandfly fever Sicilian virus (SFSV)</i> <i>Cyprus virus (SFCV)</i> <i>Turkey virus (SFTV)</i> <i>Utique virus [d/ni]</i>
		<i>Corfu (ts)</i>	<i>Corfou virus (CFUV)</i> <i>Toros virus (TORV)</i> <i>Sicilian-like virus</i> <i>Girne 1 virus [d/ni]</i> <i>Girne 2 virus [d/ni]</i> <i>Olbia virus [d/ni]</i> <i>Provencia virus [d/ni]</i>
		<i>Karimabad</i>	<i>Karimabad virus (KARV)</i>

(ts) sérocomplexe tentatif

[d/ni] : détection moléculaire mais jamais isolé.

Annexe 2 :

Matériel utilisé

	Appareillage	Consommable et autre matériel
Partie Entomologique	<ul style="list-style-type: none"> - Piège lumineux CDC - Loupe binoculaire - Microscope photonique 	<ul style="list-style-type: none"> - pipettes pasteur - Lames et lamelles - Verrerie - Huile de ricin - Papier sulfurisé
Partie sérologique	<ul style="list-style-type: none"> - PSM (poste de sécurité microbiologique) classe I et II - Bain marie - Centrifugeuse - Vortex - Balance de précision de 0,0001 mg - Incubateur à 37°C - Laveurs automatique - Réfrigérateur +4°C - Congélateur -20°C et -80°C - Spectrophotomètre - Broyeurs électrique - Thermocycleur - Autoclave 	<ul style="list-style-type: none"> - glacières - Plaques ELISA - Tubes secs - Eppendorfs (1,5ml, 0,5ml...) - Jeu de pipettes (10, 100, 200, 300, 1000 µL)

Annexe 3:**Les solutions utilisées :**Solution de KOH à 20 %

- KOH (sous forme de pastille).....20g
- Eau distillée100ml

La solution de Marc André :

- Eau distillée30ml
- Hydrate de chloral.....30g
- Acide acétique cristallisable.....30ml

Préparation du PBS :

- 1L H₂O ultra pure fraîche
- 9,55 g poudre PBS « GIBCO : lot : 426965, exp : 02/2011 »

Résumé :

Les phlébotomes sont des vecteurs de phlebovirus qui sont associés à des épidémies ou à des infections de l'homme afin de voir les circulations de ces virus dans deux régions d'étude de la Kabylie à savoir Ouacif et Ouadhia. deux types d'enquêtes ont été réalisés, une entomologique et une autre sérologique. de la première enquête 3715 phlébotomes ont été récupérés en utilisant deux types de pièges : huilés et CDC, durant la période d'échantillonnage qui s'étale sur 5 mois. l'inventaire et l'identification morphologique des phlébotomes ont montré la présence de 7 espèces appartenant à deux genres différents *Phlebotomus* et *Sergentomyia*. Dans ces deux régions la dominance est en faveur de *Ph. perniciosus*, dans la région de Ouadhia elle est suivie par *Ph. papatasi*. La détection moléculaire par PCR en temps réel a révélé négative vis-à-vis le virus *Toscana*. dans la deuxième enquête les sérums ont été collectés au près des laboratoires d'analyse de ces régions d'études, cela a permis d'une part de mettre en évidence la présence d'IgG anti *Phlebovirus* chez 41% des prélèvements testés par la méthode d'ELISA indirecte. D'autre part, la détection d'IgG anti Phlebovirus chez 3 nouveau nés ce qui est une nouvelle en Algérie.

Mots clés : phlébotomes, *Phlebovirus*, *Toscana virus*, détection moléculaire, enquête sérologique, ELISA indirecte.

Abstrat:

Sandflies are vector of phlebovirus that are associated with epidemics or human infections. in order to evaluate the circulations of these viruses in two study areas of Kabylie namely Ouacif and Ouadhia. two types of surveys were conducted, entomological and serological one. from the first survey 3715 sandflies were recovered using two types of traps: oiled and CDC, during the sampling period which spanned 5 months. the inventory and the morphological identification of the sandflies showed the presence of 7 species belonging to two different genes *Phlebotomus* and *Sergentomyia*. In these two regions dominance is in favor of *Ph. perniciosus*, in the region of Ouadhia it is followed by *Ph. papatasi*. Molecular detection by real-time PCR revealed negative against *Toscana* virus. in the second survey, the sera were collected near the laboratories of analysis of these study areas, this made it possible, on the one hand, to demonstrate the presence of anti-phlebovirus IgG in 41% of the samples tested by the method. Indirect ELISA. On the other hand, the detection of anti-Phlebovirus IgG in 3 newborns which is new in Algeria.

Key words: phlebotomes, *Phlebovirus*, *Toscana virus*, molecular detection, serological survey, indirect ELISA .