

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou**

**Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques**

**Département des Sciences Biologiques**



**THÈSE**

**En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat LMD en Sciences Biologiques**

**Spécialité : Parasitologie Appliquée**

**Thème**

# **Épidémiologie de la leishmaniose dans l'Est algérien**

**Présentée par : Mr. MESSAHEL Nacer Eddine**

**Devant le JURY :**

<b>Président</b>	AOUAR-SADLI Malika	Professeur	U.M.M.T.O
<b>Examineurs</b>	BITAM Idir	Professeur	E.S.S.A.I.A
	MOULOUA Abdelkamel	M.C.A	U.M.M.T.O
	SAIDANI Khelaf	M.C.A	I.S.V.U.B
<b>Directeur</b>	LAFRI Ismail	M.C.A	I.S.V.U.B
<b>Co-directeur</b>	HOUALI Karim	Professeur	U.M.M.T.O

**Année universitaire : 2021/2022**

## REMERCIEMENTS

Par la grâce de DIEU, ce travail a été achevé, de nombreuses personnes y ont contribué, je les remercie infiniment.

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à mon Directeur de thèse, Mr. LAFRI Ismail, Maitre de Conférences "A" à l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida. Tout au long de ce travail, il a su m'apporter un soutien constant, une disponibilité, une écoute, une confiance et des conseils précieux et avisés à la hauteur de ses compétences et de ses réelles qualités humaines. Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi et soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mr. HOUALI Karim, Professeur à l'université de Tizi Ouzou qui a également encadré ce travail de recherche. Merci de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon plus grand respect.

J'exprime toute ma gratitude aux membres du jury: Pr. AOUAR-SADLI Malika, d'avoir bien voulu présider ce jury. Pr. BITAM Idir, d'avoir bien voulu examiner ce travail. Dr. MOULOUA Abdelkamel, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant d'en être l'un des examinateurs de cette thèse et Dr. SAIDANI Khelaf, d'avoir bien voulu participer à l'évaluation de ce travail et faire partie de ce jury.

Mes sincères remerciements s'adressent également à Mr. BENALLAL Kamel Eddine, entomologiste à l'Institut Pasteur d'Alger, et aux professeurs Petr Halada, Petr Volf et Vit Dvorák à l'université de Charles, Tchéque, pour leur contribution à la réalisation de ce travail.

A ma très chère sœur, MESSAHEL Sassia, Maitre de Conférences "A" à l'université de Sétif 1, merci pour tes encouragements et ton aide tout au long de mon cursus académique.

A mon cher ami, MOUALEK Idir, Maitre de Conférences "A" à l'université de Tizi Ouzou, je te remercie pour ton aide précieuse et ton encouragement.

A tous ceux qui ont de près ou de loin apporté un brin d'aide et d'encouragement, je dis merci.

## DÉDICACES

Je dédie ce travail :

A mes deux parents

*Merci pour votre soutien indéfectible. Que Dieu vous prête santé et longue vie.*

A mes frères et sœurs

*Merci pour votre soutien moral et vos encouragements.*

*Permettez-moi de vous exprimer mon amour le plus profond et mes vœux de réussite.*

A ma sœur « Zineb » et ma nièce « Heyam » qui nous ont quitté très tôt

*Que Dieu vous accueille dans son vaste paradis*

A tous mes ami (e) s

A toute personne m'ayant consacré un moment pour m'aider, me conseiller, m'encourager ou simplement me sourire.

# SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction générale..... 1

## Chapitre I : Revue bibliographique

I.1. Les leishmanioses.....	4
I.1.1. Les leishmanioses humaines.....	4
I.1.1.1. Formes cliniques.....	4
I.1.1.2. Incidence de la maladie.....	6
I.1.1.3. Distribution géographique.....	6
I.1.2. La leishmaniose canine.....	7
I.1.2.1. Aperçu général sur la maladie.....	7
I.1.2.2. Distribution géographique, prévalence et importance en santé publique.....	9
I.1.3. Agent causal : <i>Leishmania</i> .....	10
I.1.3.1. Taxonomie.....	10
I.1.3.2. Cycle de vie et transmission.....	11
I.1.3.3. Répartition géographique.....	13
I.1.4. Vecteurs de <i>Leishmania</i> spp. : Phlébotomes.....	14
I.1.4.1. Taxonomie.....	14
I.1.4.2. Morphologie.....	15
I.1.4.3. Répartition géographique.....	17
I.1.4.4. Biologie et éco-éthologie.....	18
I.1.4.5. Préférences trophiques des phlébotomes femelles.....	21
I.1.4.5.1. Techniques d'identification de repas de sang.....	22
I.1.4.6. Incrimination et compétence vectorielle.....	26
I.1.5. Hôtes réservoirs.....	29
I.1.6. Lutte contre la leishmaniose.....	30

I.2. Les leishmanioses et les phlébotomes en Algérie.....	33
I.2.1. Les leishmanioses en Algérie.....	33
I.2.1.1. Types de leishmaniose.....	33
I.2.1.1.1. Leishmanioses humaines.....	33
I.2.1.1.1.1. Leishmaniose cutanée.....	34
I.2.1.1.1.2. Leishmaniose viscérale.....	37
I.2.1.1.2. Leishmaniose canine.....	38
I.2.1.2. Incidence et répartition géographique.....	38
I.2.1.2.1. Leishmanioses humaines.....	38
I.2.1.2.2. Leishmaniose canine.....	41
I.2.2. Les phlébotomes d'Algérie.....	42

**Chapitre II : Analyse de la situation épidémiologique de la leishmaniose cutanée  
dans la wilaya de Batna (nord-est) : Un foyer important en Algérie**

II.1. Introduction.....	45
II.2. Objectifs de recherche.....	46
II.3. Matériel et méthodes.....	47
II.3.1. Présentation de la région d'étude.....	47
II.3.2. Recueil de données.....	49
II.3.2.1. Données épidémiologiques.....	49
II.3.2.2. Données sur les campagnes de lutte.....	50
II.3.2.2.1. Lutte antivectorielle : campagnes d'aspersion d'insecticides.....	50
II.3.2.2.2. Données exploitées.....	51
II.3.3. Cartographie des données.....	51
II.3.4. Analyse statistique des données.....	51
II.4. Résultats.....	52
II.4.1. Répartition temporelle de la LC.....	52
II.4.1.1. Répartition annuelle.....	52
II.4.1.2. Répartition mensuelle.....	53
II.4.2. Répartition démographique de la LC.....	55
II.4.2.1. Selon l'âge.....	55
II.4.2.2. Selon le sexe.....	56
II.4.3. Répartition spatiale et spatiotemporelle de la LC et impact des campagnes	

d'aspersion d'insecticides.....	58
II.4.3.1. Répartition spatiale.....	58
II.4.3.2. Répartition spatio-temporelle.....	61
II.4.3.3. Impact des campagnes d'aspersion d'insecticides sur l'incidence de LC.....	63
II.5. Discussion.....	64
II.6. Conclusion et limites de l'étude.....	71

**Chapitre III: Identification de l'origine du repas sanguin et l'infection par  
*Leishmania* chez les phlébotomes (Diptera : Psychodidae) dans le nord-est algérien**

III.1. Introduction.....	73
III.2. Objectifs de recherche.....	75
III.3. Matériel et méthodes.....	76
III.3.1. Présentation des zones d'étude.....	76
III.3.1.1. Bougaa.....	76
III.3.1.2. Kherrata.....	78
III.3.2. Étude entomologique.....	80
III.3.2.1. Déclaration d'éthique.....	80
III.3.2.2. Méthodes d'échantillonnage des phlébotomes adultes.....	80
III.3.2.2.1. Pièges lumineux (CDC).....	80
III.3.2.3. Sites de capture des phlébotomes.....	81
III.3.2.4. Montage et identification morphologique des phlébotomes.....	82
III.3.3. Analyse de la source du repas sanguin par MALDI-TOF MS.....	82
III.3.3.1. Aperçu général sur la technique.....	82
III.3.3.2. Préparation d'échantillons.....	83
III.3.3.3. Identification de la source des repas de sang.....	84
III.3.4. Surveillance moléculaire des phlébotomes par PCR.....	84
III.3.4.1. Extraction d'ADN.....	84
III.3.4.2. Identification moléculaire des espèces de phlébotomes.....	85
III.3.4.3. Identification moléculaire de la source des repas de sang.....	85
III.3.4.4. Détection moléculaire de <i>Leishmania</i> spp.....	86
III.3.5. Analyse des données.....	87
III.4. Résultats.....	90
III.4.1. Résultats de l'étude entomologique.....	90

III.4.1.1. Identification de la faune de phlébotomes.....	90
III.4.1.2. Abondance et densité de la faune de phlébotomes.....	90
III.4.1.2.1. Résultats globaux.....	90
III.4.1.2.2. Résultats par région de capture.....	91
III.4.2. Résultats de l'identification du repas de sang des phlébotomes.....	94
III.4.2.1. État de réplétion des phlébotomes femelles.....	94
III.4.2.1.1. Résultats globaux.....	94
III.4.2.1.2. Résultats par région de capture.....	95
III.4.2.2. Résultats de l'identification du repas sanguin par MALDI-TOF MS.....	97
III.4.2.2.1. Résultats globaux.....	97
III.4.2.2.2. Résultats par site de capture.....	99
III.4.2.3. Résultats de l'identification moléculaire du repas sanguin.....	100
III.4.2.3.1. Par PCR-Séquençage.....	100
III.4.2.3.2. Par PCR-Multiplex.....	102
III.4.3. Détection moléculaire de l'ADN de <i>Leishmania</i> chez les phlébotomes.....	102
III.5. Discussion.....	102
III.6. Conclusion et limites de l'étude.....	110
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>113</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>116</b>

## **Annexes**

### **Production scientifique**

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNk:</b>	ADN kinétoplastique
<b>ANDI:</b>	Agence Nationale de Développement de l'Investissement
<b>ARN:</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNr:</b>	ARN ribosomique
<b>CDC:</b>	Centers for Disease Control and Prevention
<b>COI:</b>	Cytochrome oxydase I
<b>Cyt b:</b>	Cytochrome b
<b>DAT:</b>	Test d'agglutination direct
<b>DDT</b>	Dichlorodiphényltrichloroéthane
<b>DSA:</b>	Direction des Services Agricoles
<b>DSP:</b>	Direction de la Santé et de la Population
<b>EPSP:</b>	Etablissement Public de Santé de Proximité
<b>ELISA:</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>IFI:</b>	Immunofluorescence Indirecte
<b>INSP:</b>	Institut National de Santé Publique
<b>ITS-1:</b>	Internal transcribed spacer-1/ Espaceur interne transcrit-1
<b>LC:</b>	Leishmaniose cutanée
<b>LC-MS/MS:</b>	Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
<b>LCA:</b>	Leishmaniose cutanée anthroponotique
<b>LCan</b>	Leishmaniose canine
<b>LCC:</b>	Leishmaniose cutanée chronique
<b>LCL:</b>	Leishmaniose cutanée localisée
<b>LCM:</b>	Leishmaniose cutanéomuqueuse
<b>LCN:</b>	Leishmaniose cutanée du Nord
<b>LCS:</b>	Leishmaniose cutanée sporadique
<b>LCZ:</b>	Leishmaniose cutanée zoonotique
<b>LH:</b>	Leishmaniose humaine
<b>LIFT</b>	Laser-induced fragmentation technology
<b>LV:</b>	Leishmaniose viscérale
<b>MALDI-TOF:</b>	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight

<b>MS:</b>	Mass Spectrometry
<b>MS/MS:</b>	Spectrométrie de masse en tandem
<b>OMS:</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PCR:</b>	Polymerase chain reaction
<b>PCR-RT:</b>	Polymerase chain reaction en temps réel
<b>PNOC:</b>	Prépronociceptine
<b>RFLP:</b>	Restriction Fragments Length Polymorphisms
<b>UV:</b>	Ultraviolet
<b>VIH:</b>	Virus de l'immunodéficience humaine

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b>	Manifestations cliniques des différentes formes de LHs : (A) forme viscérale, (B) forme cutanée, (C) forme cutanéomuqueuse.....	<b>6</b>
<b>Figure 2:</b>	Distribution géographique des leishmanioses.....	<b>7</b>
<b>Figure 3:</b>	Exemple de manifestations cliniques chez des chiens infectés par <i>L. infantum</i> .....	<b>9</b>
<b>Figure 4:</b>	Cycle de vie de <i>Leishmania</i> qui implique un vecteur biologique (stade promastigote) et un hôte vertébré (stade amastigote).....	<b>11</b>
<b>Figure 5:</b>	<i>Leishmania</i> spp. sous forme amastigote dans un macrophage (A) et sous forme libre promastigote (B).....	<b>11</b>
<b>Figure 6:</b>	Stades de développement de <i>Leishmania</i> dans un vecteur compétent.....	<b>13</b>
<b>Figure 7:</b>	Répartition mondiale de 21 espèces de <i>Leishmania</i> pathogènes pour l'homme.....	<b>14</b>
<b>Figure 8:</b>	Phlébotomes adultes : (A) Phlébotome au repos, (B) phlébotome femelle, (C) phlébotome mâle.....	<b>16</b>
<b>Figure 9:</b>	Principaux caractères morphologiques utiles pour l'identification des espèces de phlébotomes.....	<b>17</b>
<b>Figure 10:</b>	Distribution géographique des principaux genres de phlébotomes.....	<b>18</b>
<b>Figure 11:</b>	Cycle de vie du phlébotome : Œuf - Larve (quatre stades) - Nymphe – Adulte.....	<b>19</b>
<b>Figure 12:</b>	Phlébotome femelle ; gorgée (A) et gravide (B).....	<b>21</b>
<b>Figure 13:</b>	État de digestion du sang dans l'intestin du phlébotome ( <i>P. papatasi</i> , 0 à 84 heures).....	<b>23</b>
<b>Figure 14:</b>	Schéma représentant les différents types connus d'hôtes réservoirs et les différents critères utiles dans l'incrimination d'un hôte réservoir dans la transmission des leishmanioses .....	<b>30</b>
<b>Figure 15:</b>	Cycles de transmission des principaux zymodèmes dermatropes et viscérotropes de <i>Leishmania</i> spp. en Algérie.....	<b>36</b>
<b>Figure 16:</b>	Distribution de la LC et la LV en Algérie.....	<b>36</b>
<b>Figure 17:</b>	Evolution du nombre de cas de LC et LV entre 2003 et 2017 en Algérie.....	<b>40</b>
<b>Figure 18:</b>	Répartition géographique de cas de LC (A) et LV (B) en Algérie (2003-2017).....	<b>40</b>
<b>Figure 19:</b>	Carte de répartition des phlébotomes vecteurs de <i>Leishmania</i> spp. en Algérie.....	<b>43</b>
<b>Figure 20:</b>	Situation géographique de la wilaya de Batna.....	<b>48</b>
<b>Figure 21:</b>	Évolution annuelle du nombre de cas et de l'incidence (pour 10 <sup>5</sup> habitants) de LC dans la wilaya de Batna (2010 à 2020).....	<b>52</b>

<b>Figure 22:</b>	Répartition mensuelle des cas de LC dans la wilaya de Batna (2010 à 2020).	<b>53</b>
<b>Figure 23:</b>	Répartition des cas de LC selon les groupes d'âges dans la wilaya de Batna (2010- 2020).....	<b>55</b>
<b>Figure 24:</b>	Répartition des cas de LC selon le sexe dans la wilaya de Batna (2010-2020).....	<b>56</b>
<b>Figure 25:</b>	Répartition spatiale des cas de LC dans la wilaya de Batna (% du nombre total des cas) (2010-2020; N=9259).....	<b>59</b>
<b>Figure 26:</b>	Répartition des cas humains de LC dans les 61 communes de Batna.....	<b>60</b>
<b>Figure 27:</b>	Répartition spatiotemporelle des cas de LC dans la wilaya de Batna (2010-2020).....	<b>62</b>
<b>Figure 28:</b>	Evolution annuelle de l'endémicité de la LC compte pour les six communes les plus touchées (2010-2020).....	<b>63</b>
<b>Figure 29:</b>	Évolution annuelle de l'endémicité de la LC par rapport à la proportion d'habitations traitées à la deltaméthrine au niveau des quatre communes les plus touchées.....	<b>64</b>
<b>Figure 30:</b>	Localisation géographique des sites de collecte des phlébotomes à Sétif et Béjaïa.....	<b>77</b>
<b>Figure 31:</b>	Vue générale de la ville de Bougaa.....	<b>78</b>
<b>Figure 32:</b>	Vue générale de la ville de Kherrata.....	<b>79</b>
<b>Figure 33:</b>	Piège lumineux « CDC miniature light trap » (A), Exemple de site de collecte de phlébotomes (B).....	<b>81</b>
<b>Figure 34:</b>	Abondance relative des espèces de phlébotomes récoltées.....	<b>91</b>
<b>Figure 35:</b>	Répartition des espèces de phlébotomes capturées selon le sexe dans chaque région d'étude.....	<b>94</b>
<b>Figure 36:</b>	État de réplétion des espèces de phlébotomes capturées.....	<b>95</b>
<b>Figure 37:</b>	Taux d'identification réussi de l'origine des repas de sang par MALDI-TOF MS.....	<b>97</b>
<b>Figure 38:</b>	Origine du repas de sang des phlébotomes gorgés analysés par MALDI-TOF MS.....	<b>98</b>
<b>Figure 39:</b>	Identification de l'origine du repas de sang du spécimen BO296 par MALDI-TOF.....	<b>98</b>
<b>Figure 40:</b>	Origine du repas de sang des phlébotomes gorgés capturés dans chaque région d'étude et analysés par MALDI-TOF MS.....	<b>99</b>
<b>Figure 41:</b>	Taux d'identification réussi des repas de sang par séquençage du gène <i>Cyt b</i>	<b>100</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b>	Préférences trophiques de quelques espèces de phlébotomes, les techniques appliquées pour l'analyse et leur taux de réussite dans l'identification de l'origine des repas de sang.....	<b>24</b>
<b>Tableau 2:</b>	Principales espèces de phlébotomes vectrices de leishmanioses dans l'Ancien Monde.....	<b>27</b>
<b>Tableau 3:</b>	Résultats de quelques enquêtes sur la LCan réalisées en Algérie.....	<b>41</b>
<b>Tableau 4:</b>	Liste des espèces de phlébotomes inventoriées en Algérie.....	<b>44</b>
<b>Tableau 5:</b>	Nombre de cas mensuels de LC recensés de 2010 à 2020 dans la wilaya de Batna.....	<b>54</b>
<b>Tableau 6:</b>	Répartition des cas de LC recensés de 2010 à 2020 dans la wilaya de Batna selon le sexe et le groupe d'âge.....	<b>57</b>
<b>Tableau 7:</b>	Séquences d'amorces et conditions principales des PCRs utilisées.....	<b>88</b>
<b>Tableau 8:</b>	Répartition des espèces de phlébotomes inventoriées dans les deux régions d'étude.....	<b>92</b>
<b>Tableau 9:</b>	État de réplétion de phlébotomes femelles capturés dans les deux régions d'étude.....	<b>96</b>
<b>Tableau 10:</b>	Origine du repas de sang des phlébotomes gorgés capturés à Bougaa et Kherrata.....	<b>101</b>

## RÉSUMÉ

La leishmaniose est l'une des maladies à transmission vectorielle les plus négligées, infectant les humains ainsi que de nombreux réservoirs animaux (Alvar *et al.*, 2012).

Dans un premier volet, une étude rétrospective sur la leishmaniose cutanée (LC) dans la wilaya de Batna a été menée dans le but de déterminer, d'une part, la situation épidémiologique actuelle de la maladie dans cette région et, d'autre part, d'évaluer si les campagnes d'aspersion d'insecticides ont eu un impact sur l'incidence de LC enregistrée au niveau des foyers les plus endémiques de la wilaya. L'analyse des données obtenues auprès de la «Direction de la Santé et de la Population (DSP) de Batna» et de «l'Établissement Public de Santé de Proximité (EPSP) de Barika» a été faite à l'aide de Microsoft Office Excel 2007 et SPSS.21, tandis que le logiciel ArcGIS 10.3 a été utilisé pour la cartographie des cas notifiés. Au total, 9259 cas ont été rapportés, avec une moyenne de 841,73 cas par an. Une fluctuation du nombre de cas au fil du temps a été observée, avec un pic épidémique en 2010 de 1924 cas. La LC est observée toute l'année, avec un pic en novembre de 1957 cas. Les patients de sexe masculin étaient les plus touchés par la LC avec 5422 cas (58,6%). Les enfants de moins de 9 ans représentaient le groupe d'âge le plus affecté avec 5033 cas (54,4%). L'analyse spatiale et spatio-temporelle indique une forte endémicité de la LC dans les régions qui se situent à l'ouest de Batna. Le plus grand nombre de cas a été enregistré dans la commune de Barika (2979; 32,17%), suivie de Abdelkader Azil (1238; 13,37%), Bitam (1141; 12,32%), Djezzar (803; 8,67%), Ouled Ammar (655; 7,07%) et M'doukal (404; 4,36%). Il n'y a aucune preuve que les campagnes d'aspersion d'insecticides utilisant la deltaméthrine aient un grand impact sur la diminution significative de l'incidence de la LC.

Dans un second volet, une étude entomologique sur les phlébotomes a été menée dans deux foyers de leishmaniose canine (LCan) et viscérale (LV), à savoir Bougaa et Kherrata, situées au nord-est de l'Algérie, dans le but d'étudier la faune des espèces de phlébotomes, de rechercher d'éventuels vecteurs de *Leishmania* et de préciser l'origine des repas de sang des femelles gorgées. La recherche de l'infection par *Leishmania* chez les phlébotomes a été faite par PCR avec des amorces spécifiques de l'ADNk et l'ITS1 de leishmanies. Les repas de sang chez les femelles gorgées ont été identifiés en utilisant la récente approche de MALDI-TOF MS, dite de «cartographie de masses peptidiques», et confirmés ensuite par une analyse PCR-séquençage. Au total, 1940 spécimens (844 mâles, 1096 femelles) ont été collectés, tous appartenant au sous-genre *Larrousius*: *Phlebotomus perniciosus* (94,64%), *P. perfiliewi* (4,74%) et *P. longicuspis* (0,62%). Aucun ADN de *Leishmania* n'a été détecté chez les 106

pools testés (1096 femelles). Le MALDI-TOF MS a identifié avec succès l'origine des repas de sang chez 92% (141/154) des femelles gorgées (135 *P. perniciosus* et 6 *P. perfiliewi*). Tous les repas de sang provenaient de bovins domestiques (*Bos taurus*) à l'exception de deux repas, l'un provenant d'un chien (*Canis lupus familiaris*) et un autre d'un mouton (*Ovis aries*). Le séquençage du gène du *Cytochrome b* de l'hôte a confirmé ces identifications, mais a montré un taux de réussite inférieur (29/50 ; 58%), démontrant la grande efficacité du MALDI-TOF MS pour l'identification de la routine des repas de sang de divers degré de digestion. Nos résultats représentent la première identification de sang bovin et canin chez les phlébotomes en Algérie, et la préférence alimentaire frappante de la population locale de phlébotomes au niveau des régions étudiées pour les bovins peut jouer un rôle important dans la transmission du parasite.

**Mots-clés:** Algérie, Épidémiologie, *Leishmania*, Leishmaniose, MALDI-TOF MS, PCR-Séquençage, Phlébotome, Repas sanguin.

## ABSTRACT

Leishmaniasis are among the most neglected vector-borne diseases, infecting humans as well various animal hosts with clinical outcomes varying from cutaneous disorders to visceral and life-threatening disease (Alvar *et al.*, 2012).

In the first part, a retrospective study on cutaneous leishmaniasis (CL) in the wilaya of Batna was carried out with the aim of evaluating the current epidemiological situation of CL in this region. We also attempted to assess whether the insecticide spraying campaigns had an impact on the incidence of CL recorded in the most endemic foci of the wilaya. Data were obtained from the “Direction de la Santé et de la Population (DSP) of Batna” and the “Etablissement Public de la Santé de Proximité (EPSP) of Barika” and then were analyzed and mapped using Microsoft Office Excel 2007, SPSS.21, and ArcGIS 10.3. A total of 9259 cases were notified, with a peak incidence of 1924 cases in 2010. The annual evolution of the disease showed decreasing and increasing trends during the study period. Cases were detected year-round, with a peak notification in November (1957 cases). CL affects both genders and all age groups with predominance for males (58.6%) and infants less than 9 years old (54.4%). Most cases have occurred in western areas of the wilaya especially in the commune of Barika with 2979 cases (32.17%), followed by Abdelkader Azil (13.37%), Bitam (12.32%), Djezzar (8.67%), Ouled Ammar (7.07%), and Mdoukal (4.36%) communes. Spatiotemporal analysis showed that the highest frequencies of CL were exclusively reported in the western regions. There was no evidence of a possible relationship between Deltamethrin house spraying and leishmaniasis incidence.

In the second part, an entomological study on sandflies was carried out in Bougaa and Kherrata, two foci of canine and visceral leishmaniasis, located in the north-eastern part of Algeria, with the aim of studying the sand fly fauna composition, screening of *Leishmania* parasites and determining the origin of bloodmeals of engorged females. Sand fly females were screened for *Leishmania* DNA using kDNA and ITS1 primers and blood meals in engorged females were identified by peptide mass mapping (PMM)-based MALDI-TOF mass spectrometry and confirmed by DNA sequencing analysis. Overall, 1,940 specimens (844 males, 1096 females) were collected, all belonging to the subgenus *Larroussius*: *Phlebotomus perniciosus*, (94.64%), *P. perfiliewi* (4.74%) and *P. longicuspis* (0.62%). No *Leishmania* DNA was detected in screening 1096 females (106 pools). PMM-based MALDI-TOF MS successfully identified a source of blood in 92% (141/154) of engorged females (135 *P. perniciosus* and 6 *P. perfiliewi*). All blood meals were taken from domestic cattle (*Bos taurus*)

except for one originating from a dog (*Canis lupus familiaris*) and one from sheep (*Ovis aries*). Sequencing of host *Cytochrome b* gene confirmed these identifications but showed lower success rate of 58% (29/50), demonstrating the high effectivity of peptide mass mapping (PMM)-based MALDI-TOF mass spectrometry for routine identification of blood meals of varying degree of digestion. Our findings represent first record of cattle and dog blood in sand flies in Algeria and striking feeding preference of local sand fly population at domestic sites of studied regions for cattle which may play an important role in parasite transmission.

**Keywords:** Algeria, Blood meal, Epidemiology, *Leishmania*, Leishmaniasis, MALDI-TOF MS, PCR-Sequencing, Sandfly.

## ملخص

يعد داء الليشمانيات الذي ينتقل عن طريق ذبابة الرمل أحد أكثر الأمراض المهملة، حيث يصيب البشر وكذلك العديد من الحيوانات (Alvar et al., 2012).

في الجزء الأول من هذا العمل، قمنا بإجراء دراسة بأثر رجعي عن داء الليشمانيات الجلدي في ولاية باتنة بهدف تحديد الوضع الوبائي الحالي للمرض في هذه المنطقة. حاولنا أيضًا من خلال دراستنا تقييم ما إذا كان لحملات رش المبيدات الحشرية تأثير على عدد حالات الليشمانيز المسجلة في أكثر البؤر الموبوءة بالولاية. تم تحليل البيانات التي تم الحصول عليها من "مديرية الصحة و السكان لولاية باتنة" و "المؤسسة العمومية للصحة الجوارية لبلدية بركة" باستخدام برنامج Microsoft Office Excel 2007 و SPSS.21 ، بينما تم استخدام برنامج ArcGIS 10.3 لرسم خرائط توزيع حالات الإصابة التي تم الإبلاغ عنها. في المجمل تم الإبلاغ عن 9259 حالة أي بمعدل 841.73 حالة سنويًا. يُظهر تطور المرض تذبذبًا في عدد الحالات المسجلة على مر السنين، مع ذروة وبائية في عام 2010 قُدرت بـ 1924 حالة. تم تسجيل الحالات على مدار العام وبلغت ذروتها في نوفمبر بـ 1957 حالة. أظهر توزيع المرض حسب الجنس و السن إصابة الذكور و الأطفال دون التاسعة بشكل لافت بنسبة قُدرت بـ 5422 (58.6%) و 5033 حالة (54.4%) على التوالي. يشير التحليل المكاني و الزماني/المكاني إلى تركّز داء الليشمانيات الجلدي في المناطق الواقعة غرب الولاية. تم تسجيل أكبر عدد من الحالات في بلدية بركة (2979 ؛ 32.17%)، متبوعة ببلدية عبد القادر عزيل (1238 ؛ 13.37%)، ثم بيطام (1141 ؛ 12.32%)، الجزائر (803 ؛ 8.67%)، أولاد عمار (655 ؛ 7.07%) و مدوكال (404 ؛ 4.36%). لا يوجد دليل على أن لحملات رش المبيدات الحشرية باستخدام مادة الدلتامثرين تأثير كبير على الحد من حدوث داء الليشمانيات الجلدي.

في الجزء الثاني من هذا العمل، تم إجراء دراسة حشرية على الفواصد في منطقتي بوقاعة و خراطة، وهما بورتين لداء الليشمانيات الحشوية و الكلبية في شمال شرق الجزائر. هدفت الدراسة إلى معرفة تكوين أنواع الفواصد الموجودة في كلتا المنطقتين، و كذلك إمكانية حملها لطفيليات الليشمانيا، كما قمنا كذلك بتحديد أصل وجبة الدم للإناث المحتقنة. تم فحص إناث ذبابة الرمل بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل بحثًا عن الحمض النووي لليشمانيا باستخدام المشرعات التي تستهدف جين الـ kDNA و ITS1، بينما تم تحديد أصل وجبات الدم في الإناث المحتقنة عن طريق رسم خرائط كتلة الببتيد (PMM) المستند إلى MALDI-TOF. تم التأكد أيضًا من نتائج هذه التقنية من خلال تحليل تسلسل الحمض النووي. إجمالاً، تم جمع 1940 عينة (844 ذكر، 1096 أنثى)، جميعها تنتمي إلى جنس الـ *Larrousius*، و هي (*Phlebotomus perniciosus* (64.64%)، *Phlebotomus perfiliewi* (4.74%)، و *Phlebotomus* (0.62%) *longicuspis*. لم يتم الكشف عن الحمض النووي لليشمانيا في جميع الإناث التي تم تحليلها (1096 إناث). حدد الـ MALDI-TOF MS مصدر الدم في 92% (154/141) من الإناث المحتقنة (*Phlebotomus perniciosus* 135 و *Phlebotomus perfiliewi* 6). كشفت التحاليل أنّ جميع وجبات الدم أخذت من الأبقار (*Bos taurus*) باستثناء وجبتين إحداهما أخذت من كلب (*Canis lupus familiaris*) و أخرى من الأغنام (*Ovis aries*). أكد تسلسل جين الـ *Cytochrome* هذه النتائج ولكنه أظهر معدل نجاح أقل بنسبة 58% (50/29)، مما يدل على الفعالية العالية لرسم خرائط كتلة الببتيد (PMM) المستند على أساس مطياف الكتلة MALDI-TOF للتعرف الروتيني على أصل وجبات الدم ذات الدرجات المتفاوتة من الهضم. تمثل النتائج التي توصلنا إليها أول تسجيل لدم الأبقار و الكلاب في ذباب الرمل في الجزائر و تفضيل أنواع الفواصد في المواقع المحلية للمناطق المدروسة للأبقار و التي قد تلعب دورًا مهمًا في انتقال الطفيل.

**الكلمات المفتاحية:** الجزائر، علم الأوبئة، تفاعل البوليميراز المتسلسل، وجبة الدم، الليشمانيا، MALDI-TOF MS، ذبابة الرمل، داء الليشمانيات.

---

# **Introduction générale**

---

## Introduction générale

Les maladies à transmission vectorielle telles que le paludisme, la dengue, le chikungunya et les leishmanioses, pour n'en citer que quelques-unes, représentent aujourd'hui à l'échelle de la planète un enjeu scientifique et social primordial (Bley, 2010). Ces maladies figurent parmi les plus importantes en santé humaine et animale, tant par la morbidité que par la mortalité qu'elles entraînent (Tran *et al.*, 2005). D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les maladies vectorielles représentent plus de 17% des maladies infectieuses au niveau mondial et sont responsables de plus d'un million de décès chaque année (OMS, 2020). Ces infections, provoquées par des bactéries, des virus ou des parasites, présentent des cycles épidémiologiques complexes liés à leur mode de transmission indirecte, faisant intervenir un arthropode (moustique, phlébotome, tique...etc.) désigné sous le terme de vecteur (Tran *et al.*, 2005). Il s'agit le plus souvent de cycles zoonotiques, impliquant une variété d'oiseaux, de rongeurs et d'autres hôtes vertébrés (Ramalho-Ortigao et Gubler, 2020).

Parmi les maladies à transmission vectorielle les plus répandues on distingue notamment les leishmanioses. Ce sont des maladies parasitaires très diverses et complexes dans leur écologie et leur épidémiologie. Elles sont dues à un protozoaire parasite du genre *Leishmania* qui affecte les humains et une variété de populations animales à travers le monde (Akhoundi *et al.*, 2016). Les leishmanioses posent de nos jours d'importants problèmes de santé publique dans de nombreux pays. L'OMS a estimé que 350 millions de personnes, dans 98 pays, sont exposées à la maladie et qu'il y a environ 1,5 à 2 millions de nouveaux cas par an. Cette situation est aujourd'hui susceptible de s'aggraver en raison du réchauffement climatique et des modifications des écosystèmes (OMS, 2011).

Les phlébotomes sont des petits insectes hématophages largement répandus dans le monde. Ils ont une grande importance médicale et vétérinaire en raison de leur rôle de vecteur de nombreux agents infectieux (arbovirus, bactéries, parasites) à l'homme et aux animaux. Approximativement, plus de 800 espèces de phlébotomes sont actuellement décrites à travers le monde. Parmi elles, environ 10% ont été incriminées comme vecteur des leishmanioses (Maroli *et al.*, 2013). La détection et l'identification des infections naturelles par *Leishmania* chez les phlébotomes dans les zones endémiques est un facteur clé dans l'évaluation du risque de leishmanioses et dans la conception de mesures de prévention et de contrôle de cette maladie infectieuse (Kato *et al.*, 2010).

Les leishmanioses surviennent lors du repas sanguin des phlébotomes infectés. A cet effet l'identification de l'origine du repas de sang des phlébotomes vecteurs est un élément essentiel pour mieux comprendre les interactions hôtes/vecteur, l'épidémiologie des maladies

qu'ils transmettent ainsi que pour l'élaboration des stratégies de contrôle. Plusieurs techniques ont été développées pour déterminer l'origine du repas sanguin des phlébotomes afin d'évaluer correctement leurs préférences trophiques. Les techniques sérologiques, y compris l'enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), et moléculaires qui sont basées sur l'amplification de l'ADN sont les plus couramment utilisées (Kent, 2009; Maleki-Ravasan *et al.*, 2009; Afonso *et al.*, 2012). Le MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry), en particulier celui qui se repose sur la cartographie de masses peptidiques (*Peptide Mass Mapping*), s'est récemment avéré être un outil performant pour l'identification rapide et sensible de la source des repas de sang des phlébotomes (Hlavackova *et al.*, 2019).

En Algérie, les leishmanioses sont le premier groupe de maladie à transmission vectorielle. Elles présentent tout un ensemble de syndromes du fait de la variété des parasites et chacun d'entre eux est lié à un vecteur et à un réservoir spécifique. La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) à *Leishmania major* se manifeste de manière endémo-épidémique dans les zones steppiques et nord-sahariennes; la leishmaniose cutanée anthroponotique (LCA) à *L. killicki* limitée principalement à Ghardaïa au sud du pays, et les formes viscérale et cutanée dues à *L. infantum* sévissent notamment au nord du pays sous un mode hypoendémique, correspondant à la leishmaniose canine (LCan) (Eddaikra *et al.*, 2018; Izri *et al.*, 2021). Avec une incidence annuelle de leishmaniose cutanée (LC) plus importante que viscérale (LV), l'Algérie représente le deuxième pays le plus touché au monde après l'Afghanistan (Alvar *et al.*, 2012). Plus d'un quart de million de cas de LC (252 659) ont été enregistrés dans le pays durant la période de 1982 à 2017 (Benikhlef *et al.*, 2021). Quant à la LV, 1562 cas ont été notifiés entre 1998 et 2008 (Adel *et al.*, 2014).

Plusieurs études ont été menées sur la répartition de la leishmaniose humaine (LH) en Algérie (Adel *et al.*, 2014; Eddaikra *et al.*, 2018; Benikhlef *et al.*, 2021). Bien que ces études aient montré la propagation de la maladie sur tout le territoire national; cependant, le plus grand nombre de cas, que ce soit de LC ou de LV, a été signalé principalement dans les zones situées à l'est de l'Algérie. En fait, l'étude de Benikhlef *et al.* a indiqué que cinq wilayas, dont trois se trouvent à l'est de l'Algérie (Batna, Biskra, El Oued), ont enregistré ensemble plus de 70% du total des cas de LC déclarés au cours de la période 1982-2017, avec plus de 10 000 cas recensés pour chacune de ces cinq wilayas (Benikhlef *et al.*, 2021). Quant à la LV, l'étude d'Adel *et al.* a révélé que 81,56% des cas de LV signalés en Algérie durant la période allant de 1998 à 2008 provenaient de wilayas situées dans le centre-nord et le nord-est du pays. Selon la même étude, cinq wilayas ont rapporté le plus grand nombre de cas dont quatre se

localisent à l'Est algérien; Mila, Béjaïa, Sétif et Biskra (Adel *et al.*, 2014). En outre, les études qui ont été menées sur la LCan ont, quant à elles, prouvé la présence des taux d'infection relativement élevées chez des chiens provenant de nombreuses régions de l'Est algérien (Adel *et al.*, 2015; Medkour *et al.*, 2019a).

De nombreuses études ont été effectuées pour évaluer le statut épidémiologique de la LC en Algérie (Gaouaoui *et al.*, 2017; Khezzani et Bouchemal, 2017; Hamiroune *et al.*, 2019; Fellahi *et al.*, 2021; Dahmani *et al.*, 2022), néanmoins, ces études ne concernant que quelques régions du pays et peu de données concernant l'incidence de la LC et de ses caractéristiques épidémiologiques dans d'autres régions sont disponibles à ce jour. En outre, bien que certaines enquêtes entomologiques sur les phlébotomes et leur statut d'infection par *Leishmania* spp. soient effectuées dans de nombreux foyers en Algérie où les leishmanioses sont endémiques (Berdjane-Brouk *et al.*, 2012; Frahtia, 2015; Mouloua *et al.*, 2017; Bennai *et al.*, 2018; Gherbi *et al.*, 2020), néanmoins, des informations documentées font encore défaut dans de nombreux foyers, en particulier en ce qui concerne le statut d'infection par *Leishmania* spp. et les préférences trophiques des phlébotomes vecteurs.

Les principaux objectifs de la présente étude sont, d'une part, de faire le point sur la situation épidémiologique actuelle de la LC dans la wilaya de Batna, l'un des principaux foyers endémiques de la maladie dans notre pays, et d'autre part d'étudier la faune des espèces de phlébotomes présentes à Bougaa et Kherrata, deux foyers endémiques de LCan et LV, de déterminer leur taux d'infection par *Leishmania* et de préciser, à l'aide de MALDI-TOF MS, l'origine de leur repas sanguin pour pouvoir identifier les réservoirs potentiels et les préférences trophiques de ces insectes.

Le présent manuscrit de thèse est organisé autour de 3 chapitres couvrant chacun une thématique différente à savoir (1) une revue bibliographique sur les leishmanioses et les phlébotomes, (2) l'analyse de la situation épidémiologique de la LC dans la wilaya de Batna en déterminant, à travers une étude rétrospective, la répartition temporelle, démographique, spatiale et spatio-temporelle des cas rapportés entre 2010 et 2020 et (3) l'identification de l'origine du repas sanguin et l'infection par *Leishmania* chez les phlébotomes capturés à Bougaa et Kherrata, deux foyers endémiques de LCan et LH dues à *L. infantum*. Le matériel utilisé et les méthodes adoptées lors de l'étude expérimentale y sont détaillés et les résultats obtenus présentés et discutés. Enfin, ce manuscrit sera clôturé par une conclusion générale en ouvrant de nouvelles voies aux perspectives où nous proposons de nouvelles pistes d'études permettant une meilleure compréhension de l'épidémiologie des leishmanioses dans les foyers étudiés et en Algérie.

---

# **Chapitre I**

## **Revue bibliographique**

---

# I. Chapitre I : Revue bibliographique

## I.1. Les leishmanioses

Les leishmanioses sont des parasitoses communes à l'Homme et à certains animaux, provoquées par des parasites protozoaires du genre *Leishmania* (Cardoso *et al.*, 2021). Ces parasites flagellés de la famille des Trypanosomatidae (Kinetoplastida) ont été identifiés pour la première fois au début des années 1900 par Leishman et Donovan (1901), puis décrits par Ross (1903) qui proposa le nom de *Leishmania*. Cependant, la maladie est bien plus ancienne: en effet, dans l'Ancien Monde, des descriptions primitives ont été retrouvées dans des écrits datant de 4500 ans et des traces d'ADN ont été découvertes dans du matériel archéologique antique sur le pourtour du bassin méditerranéen (Akhoundi *et al.*, 2016).

Les parasites *Leishmania* sont transmis d'un hôte vertébré à un autre par la pique d'un diptère hématophage, appelé phlébotome (Psychodidae, Phlebotominae), lors du repas sanguin. Les cycles de transmissions de ces parasites se distinguent en fonction des espèces de parasites, d'hôtes et de vecteurs incriminés, mais ils restent majoritairement zoonotiques (Chavy, 2019).

Aujourd'hui, les leishmanioses sont endémiques dans les régions tropicales, subtropicales et du bassin méditerranéen, affectant des millions de personnes dans le monde, principalement dans les pays pauvres ou en voie de développement. De nombreux facteurs influencent l'émergence de la maladie et le risque de sa transmission, dont les mouvements de population, le statut socioéconomique et/ou les changements environnementaux (OMS, 2022).

### I.1.1. Les leishmanioses humaines

#### I.1.1.1. Formes cliniques

Plusieurs manifestations cliniques différentes sont associées à l'infection causée par le parasite *Leishmania*. Des facteurs liés à l'espèce infectante et au statut immunitaire de l'hôte influencent fortement le développement de la pathologie (Cobo, 2014). Cliniquement, on distingue trois formes différentes de leishmaniose humaine (LH) (Figure 1) :

La première forme est la leishmaniose viscérale (LV) qui induit une forte fièvre, une importante perte de poids, une hépatosplénomégalie et une anémie (Soong, 2009). Elle est due à un parasite qui est endocyté par les cellules phagocytaires mononucléées du système réticulo-endothélial et qui est transporté par les systèmes sanguin et lymphatique vers le foie, la rate et la moelle osseuse (Daneshbod, 1972). La LV est mortelle si elle n'est pas traitée et peut être un cofacteur important dans la pathogenèse de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Bernier *et al.*, 1998). La mort survient le plus souvent

par infection intercurrente ou hémorragie. Les parasites à l'origine de la LV sont *L. donovani*, espèce anthroponotique, dans les foyers indien et Est-africain, et *L. infantum*, espèce zoonotique, dans les foyers centre-asiatique, méditerranéen et américain (Dedet, 2009). De rares cas attribués à certaines espèces dermatotropiques ont également été rapportés; c'est le cas de *L. tropica* (Alborzi *et al.*, 2006) et *L. major* (Karamian *et al.*, 2007).

La deuxième forme appelée leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) se voit surtout en Amérique du Sud. Elle est due principalement à *Leishmania* du complexe *braziliensis*, bien que des cas très rares ont été rapportés avec d'autres espèces, telles que *L. major*, *L. tropica* et *L. aethiopica* (Faucher *et al.*, 2011; Shirian *et al.*, 2012; Mokni, 2019). La LCM se produit lorsque l'infection se propage aux tissus des muqueuses, en particulier du nez et de la bouche causant de graves défigurations. Environ 5% des cas de leishmaniose cutanée (LC) finiront par évoluer en LCM, et la plupart d'entre eux se trouvent au Brésil et dans les pays andins (Bolivie, Pérou, Colombie, Équateur et Venezuela). Le temps d'évolution de l'infection d'une LC à une LCM est très variable, allant de quelques mois à plus de 20 ans (Soong, 2009). La cause de décès est souvent attribuable à une infection bactérienne opportuniste des voies respiratoires (Grevelink et Lemer, 1996).

La troisième forme est la leishmaniose cutanée (LC) qui correspond à des atteintes exclusives de la peau, sans extension aux organes profonds ni aux muqueuses (Bastien et Lachaud, 2016). Les patients atteints de LCs présentent généralement des ulcères ou des nodules, habituellement localisés sur les parties découvertes du corps (Chappuis *et al.*, 2007). La période d'incubation de la maladie varie généralement de 2 semaines à plusieurs mois, mais peut aller jusqu'à plusieurs années (Magill, 2015). Plusieurs formes de LC peuvent être distinguées dont la forme la plus courante est la leishmaniose cutanée localisée (LCL) qui se caractérise par le développement d'une lésion localisée au site de la piqûre de phlébotome. Les lésions de la LCL commencent par le développement d'un érythème, évoluant par la suite en une petite papule qui s'ulcère progressivement sur une période de quelques semaines à plusieurs mois (Natarajan *et al.*, 2014). La LCL est due aux espèces *L. major*, *L. tropica* et *L. aethiopica* dans les régions d'Afrique du Nord et de l'Est, d'Asie centrale et du Moyen-Orient, tandis que *L. mexicana* et *L. amazonensis* causent la LCL dans certaines parties d'Amérique centrale et du Sud, les États-Unis et le Mexique (Reithinger *et al.*, 2007). L'ulcère résultant dans la LCL se résorbe généralement de lui-même, mais laisse une cicatrice avec une hypo- ou une hyperpigmentation. La plaie peut se surinfecter par des bactéries ou des champignons, entraînant un diagnostic erroné (Grevelink et Lerner, 1996).

D'autres types inhabituels de LC comprennent, la leishmaniose cutanée récidivante (*Leishmania recidivans*) qui fait référence au développement d'une nouvelle papule ou nodule autour d'une vieille lésion précédemment guérie. La leishmaniose cutanée diffuse qui se caractérise par de multiples lésions atypiques non ulcéreuses et disséminées sur tout le corps ressemblant à la lèpre lépromateuse et la leishmaniose dermique post-kala-azar qui se distingue par des lésions non ulcéreuses qui peuvent apparaître sur la peau d'individus guéris de LV (Soong, 2009; Kumar, 2013; Mokni, 2019).



**Figure 1:** Manifestations cliniques des différentes formes de LHs (Aronson et Magill, 2020).  
(A) forme viscérale, (B) forme cutanée, (C) forme cutanéomuqueuse.

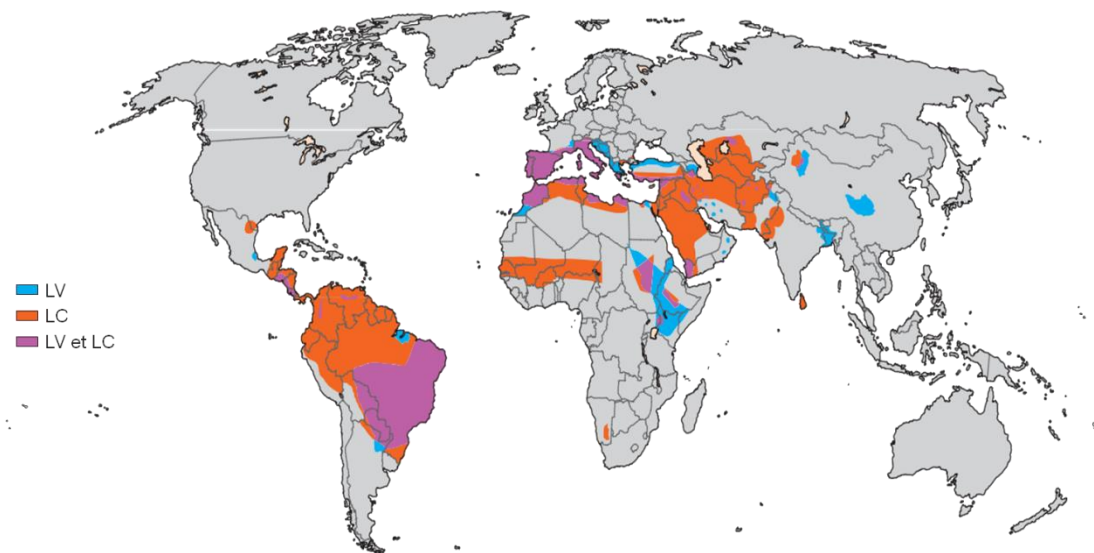
### I.1.1.2. Incidence de la maladie

La leishmaniose est considérée comme un grave problème de santé publique dans de nombreux pays du monde où elle peut avoir un impact économique et social négatif (Okwor et Uzonna, 2016). Il y a environ 350 millions de personnes qui vivent dans des zones à risque. L'incidence mondiale annuelle est estimée à 0,2-0,4 million de cas de LV et 0,7-1,2 million de cas de LC, avec 20 000 à 40 000 décès par an, c'est le deuxième plus grand tueur parasitaire au monde après le paludisme. Cependant, il est difficile de fournir des estimations réalistes du nombre de personnes infectées par rapport à celles à risque. Certaines hypothèses indiquent qu'il existe encore une grande différence entre le nombre réel de cas et le nombre de cas signalés en raison de plusieurs facteurs tels que des cas non diagnostiqués, mal diagnostiqués ou non déclarés (OMS, 2011; Alvar *et al.*, 2012).

### I.1.1.3. Distribution géographique

Au total, 98 pays et 3 territoires sur cinq continents ont signalé une transmission endémique de leishmaniose. Sur ces 98 pays ou territoires, 89 sont considérés comme pays d'endémie pour la LC, 79 comme pays d'endémie pour la LV et 71 sont des pays d'endémie à la fois pour la LC et la LV (OMS, 2021).

La leishmaniose est considérée comme une maladie liée à la pauvreté, affectant principalement les populations les plus pauvres des pays en voie de développement. En fait, plus de 90% des cas de LV sont retrouvés en Inde, au Bangladesh, au Soudan, au Soudan du Sud, en Éthiopie et au Brésil. De plus, environ 70 à 75% des cas de LC surviennent dans dix pays représentés par l'Afghanistan, l'Algérie, la Colombie, le Brésil, l'Iran, la Syrie, l'Éthiopie, le Soudan, le Costa Rica et le Pérou. Au regard de cette distribution géographique, il est aisé de constater que la leishmaniose est associée à la pauvreté et constitue en cela une maladie négligée (OMS, 2011; Alvar *et al.*, 2012). Cependant, les cas d'infections de soldats occidentaux et de voyageurs en zones d'endémies (Di Muccio *et al.*, 2015; Roberts *et al.*, 2015; Söbirk *et al.*, 2018), ainsi que la recrudescence des cas de coinfections VIH/*Leishmania* dans de nombreux pays développés (Monge-Maillo *et al.*, 2014; Lindoso *et al.*, 2016; Palma *et al.*, 2021) font que cette maladie n'est plus seulement restreinte aux régions pauvres de la planète. La répartition géographique de la leishmaniose est illustrée dans la figure 2.



**Figure 2:** Distribution géographique des leishmanioses (Davidson, 2017).

Les régions affectées par la LV sont indiquées en bleu et par la LC en orange. Les régions où les deux formes de leishmaniose coexistent sont indiquées en violet.

## I.1.2. La leishmaniose canine

### I.1.2.1. Aperçu général sur la maladie

La leishmaniose canine (LCan) est une anthroponose d'importance croissante dont le chien est le réservoir majeur et la source principale de parasites pour l'homme et ses congénères (Bourdoiseau, 2015). Bien que les chiens aient été trouvés infectés par au moins 12 espèces de *Leishmania*, *L. infantum* est l'agent étiologique le plus important de la maladie, qui provoque des infections viscérales et cutanées chez l'homme (Dantas-Torres *et al.*, 2012). *L. infantum* zymodème MON-1 est le principal agent responsable de la maladie dans l'Ancien

Monde et dans certaines parties de l'Amérique du Sud dans le Nouveau Monde (Kuhls *et al.*, 2008, 2011; Aït-Oudhia *et al.*, 2011).

La distinction entre la LV et la LC chez l'homme n'est pas fondée chez le chien. En effet, la LCan à *L. infantum* est une maladie générale qui intéresse la peau et les muqueuses, le système lymphoïde (nœuds lymphatiques, rate et moelle osseuse) et potentiellement tous les viscères et appareils, à l'origine d'une maladie très protéiforme (Bourdoiseau, 2013). Le nombre et l'intensité des signes cliniques chez le chien infecté sont déterminés par un ensemble de facteurs, liés notamment à la souche parasitaire ainsi qu'au profil génétique, à l'état nutritionnel, aux infections concomitantes et au statut immunitaire de l'hôte (Campino et Maia, 2018). De ce fait, certains chiens sont capables de contrôler l'infection pendant de nombreuses années, sans l'apparition de signes cliniques (asymptomatiques) et peuvent même parfois évoluer vers une guérison spontanée. D'autre part, certains chiens infectés peuvent présenter une évolution aiguë et une maladie grave, ou une évolution progressive qui conduit inexorablement à la mort, si une gestion et une thérapie appropriées ne sont pas adoptées (Ribeiro *et al.*, 2018). Bien qu'une guérison clinique soit possible, elle n'est cependant pas, associée à une stérilisation parasitaire, le chien restant porteur et redevenant source de parasites pour le phlébotome. Les rechutes après traitement sont également courantes (Bourdoiseau et Chermette, 2015).

Les symptômes commencent à apparaître entre trois mois à plusieurs années après inoculation du parasite (Campino et Maia, 2018). Les signes cliniques (Figure 3) les plus courants de la LCan sont des lésions cutanées et oculaires, un amaigrissement, une anorexie, une lymphadénopathie, une splénomégalie, un saignement nasal, des troubles locomoteurs et une atrophie musculaire. L'insuffisance rénale chronique est l'une des causes de décès les plus fréquentes lors de leishmaniose clinique (Ayele et Seyoum, 2016; Reguera *et al.*, 2016).

De nos jours, il est bien reconnu que les chiens atteints d'infections asymptomatiques sont beaucoup plus fréquents que les chiens symptomatiques. Cependant, ces derniers se sont révélés plus apte à transmettre des leishmanies aux vecteurs que les animaux infectés mais sans signes cliniques. Bien que les chiens de tous âges puissent être infectés, la maladie survient le plus souvent chez les jeunes adultes (4-5 ans). De plus, les chiens errants, les chiens de travail et ceux qui vivent en milieu rural sont les plus exposés aux piqûres de phlébotomes (Campino et Maia, 2018).



**Figure 3:** Exemple de manifestations cliniques chez des chiens infectés par *L. infantum*. (A) alopecie sur le museau; (B) dermatite périoculaire avec kératoconjonctivite et hyperkératose; (C) hyperkératose de la muqueuse nasale; (D) dermite exfoliative généralisée non prurigineuse; (E) lésion ulcérée au niveau de l'oreille; (F) croûte avec lésion vasculaire sur le bout de l'oreille; (G) lymphadénomégalie du ganglion poplité; (H) cachexie; (I) onychogryphose. (Veras *et al.*, 2014).

### I.1.2.2. Distribution géographique, prévalence et importance en santé publique

La LCan est largement répandue dans le monde, présente sur tous les continents, à l'exception de l'Océanie (Dantas-Torres *et al.*, 2012). Elle est endémique dans environ 50 pays parmi les 98 où les LHs sont présentes, affectant principalement deux grandes régions géographiques; le bassin méditerranéen et le Brésil (Campino et Maia, 2018). Cependant, la maladie s'est étendue à un grand nombre de régions et plusieurs rapports ont révélé l'émergence de l'infection canine dans de nouveaux sites, tels que les États-Unis, le Canada (Duprey *et al.*, 2006; Freeman *et al.*, 2010), et le nord de l'Europe continentale (Baldelli *et al.*, 2011; Maia et Cardoso, 2015). Ce phénomène de propagation est le résultat de plusieurs facteurs qui incluent des changements dans l'écologie et la distribution des principaux phlébotomes vecteurs, eux-mêmes en relation avec le réchauffement climatique (Maroli *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2009; Salomon *et al.*, 2011), l'augmentation des voyages des chiens dans les zones à risque (Maroli *et al.*, 2008; Menn *et al.*, 2010) et des déficits ou l'inefficacité des mesures de lutte (Dantas-Torres *et al.*, 2006; Dujardin, 2006).

Plusieurs millions de chiens domestiques seraient infectés dans divers pays du monde (Campino et Maia, 2018). Cependant, un compte rendu précis sur la prévalence réelle de la LCan n'est actuellement pas disponible, en raison du nombre limité de publications dans certains pays, de l'existence de différences méthodologiques entre les études (ex., la taille de l'échantillon et les critères de positivité) et les limites inhérentes à la sérologie (ex., la

possibilité de réactions croisées) (Dantas-Torres, 2009; Otranto et Dantas-Torres, 2013). Les enquêtes sérologiques effectuées chez le chien dans les pays méditerranéens ont rapporté une prévalence allant de 2% à 30%, tandis que des taux de 50% ou plus ont été rapportés dans des foyers hyper-endémiques (Rombolà *et al.*, 2021). En Amérique du Sud, la prévalence de l'infection à *Leishmania* chez les chiens est généralement supérieure à 25%, tandis qu'elle peut atteindre 75% dans les foyers de forte endémicité (Dantas-Torres, 2009).

La LH due à *L. infantum* présente une répartition géographique superposable à celle de la LCan; cette similitude est logique car les espèces de vecteurs sont communes et la source de parasites est représentée essentiellement par le chien (Bourdoiseau et Chermette, 2015). Bien que certaines études suggèrent une association entre la prévalence de la leishmaniose dans les populations canine et humaine, la LCan est plus répandue et plus largement distribuée que la LV, et n'est pas fortement corrélée avec la prévalence chez l'homme. Par exemple, dans les pays d'Europe du Sud, la LCan est très répandue, tandis que la LH est hypodémique. Les personnes vivant dans des régions endémiques qui partagent le même habitat et sont fréquemment en contact physique étroit avec des chiens infectés ont une forte probabilité d'exposition à la leishmaniose (Campino et Maia, 2018).

### **I.1.3. Agent causal : *Leishmania***

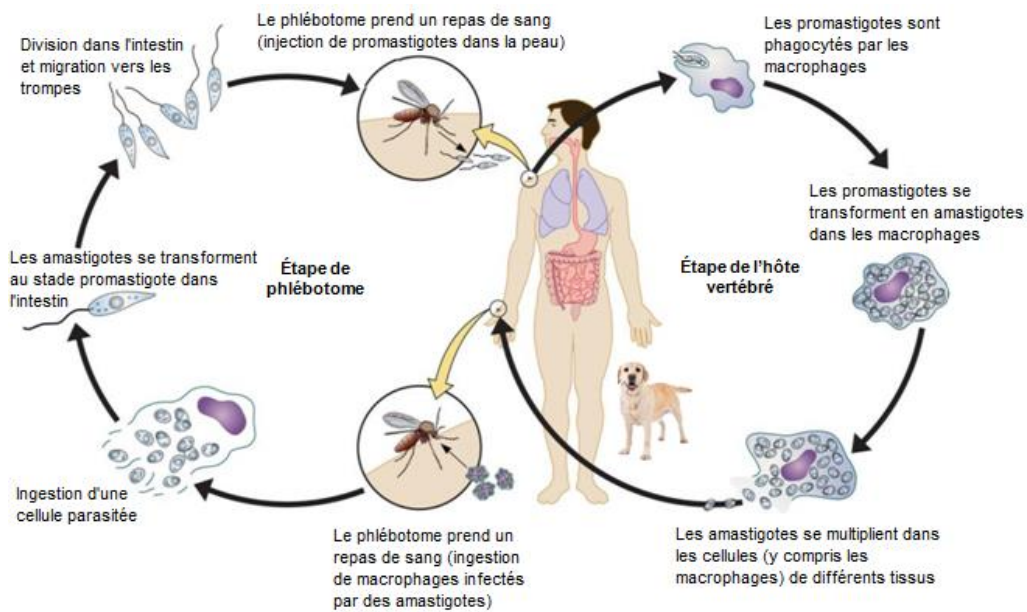
#### **I.1.3.1. Taxonomie**

La classification des *Leishmania* était initialement basée sur des critères extrinsèques, tels que les manifestations cliniques, la distribution géographique, les cycles épidémiologiques et les caractéristiques de développement du parasite dans l'intestin de son phlébotome vecteur (Akhoundi *et al.*, 2017). Cependant, depuis les années 1970, le développement des analyses biochimiques et moléculaires a montré que les critères pathologiques et géographiques étaient souvent inadéquats et par conséquent d'autres critères intrinsèques ont donc été utilisés pour mieux classer les leishmanies (Bañuls *et al.*, 2007).

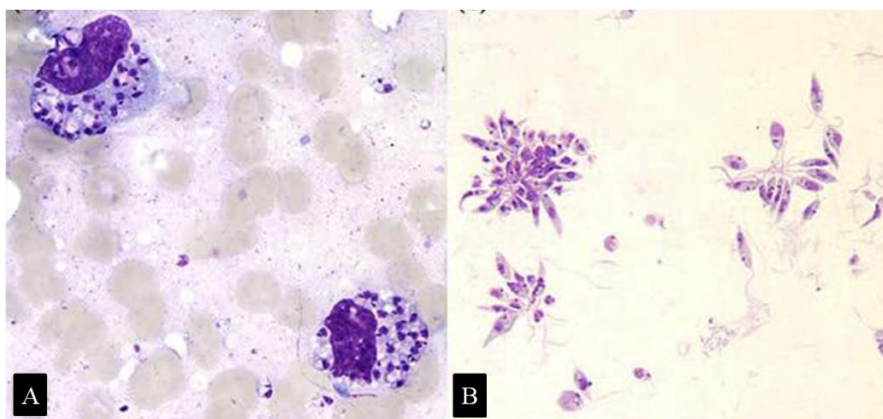
Les leishmanies sont des protozoaires appartenant au genre *Leishmania* Ross, 1903. Ce dernier fait partie de la classe des Kinetoplastida (ou le synonyme Kinetoplastea), bien que Kinetoplastida soit aussi souvent utilisé comme un ordre, de l'ordre des Trypanosomatida, de la famille des Trypanosomatidae et de la sous-famille des Leishmaniinae (Mauricio, 2018). Les membres de la classe Kinetoplastida sont caractérisés par la présence d'une unique grosse mitochondrie qui contient une structure unique nommée kinétoplaste (Simpson et Kretzer, 1997). Le genre *Leishmania* comprend diverses espèces, regroupées souvent en complexes, et sous-genres d'importance médicale et vétérinaire dont la classification est encore en évolution (Akhoundi *et al.*, 2016, 2017).

### I.1.3.2. Cycle de vie et transmission

Le parasite *Leishmania* a un cycle de vie dimorphique (Figure 4) où il alterne entre deux formes principales (Figure 5): chez les mammifères hôtes, le parasite est observé comme un amastigote intracellulaire avec une forme ronde ou ovoïde et immobile, mais lorsqu'il est absorbé dans l'intestin des phlébotomes, il devient un promastigote extracellulaire caractérisé par une forme fusiforme et mobile avec un flagelle externe (Dvorák *et al.*, 2018). Les deux environnements recèlent des conditions physiologiques aux caractéristiques spécifiques et différentes. Certains d'entre eux incluent la température, le pH, l'osmolarité et la quantité et la qualité des nutriments (Díaz et Ponte-Sucre, 2018).



**Figure 4:** Cycle de vie de *Leishmania* qui implique un vecteur biologique (stade promastigote) et un hôte vertébré (stade amastigote) (Esch et Petersen, 2013).



**Figure 5:** *Leishmania* spp. sous forme amastigote dans un macrophage (A) et sous forme libre promastigote (B) (Chavy, 2019).

(A) *Leishmania* spp. amastigotes dans deux macrophages avec préparation teintée au Giemsa. (B) *Leishmania* spp. promastigotes issues de culture.

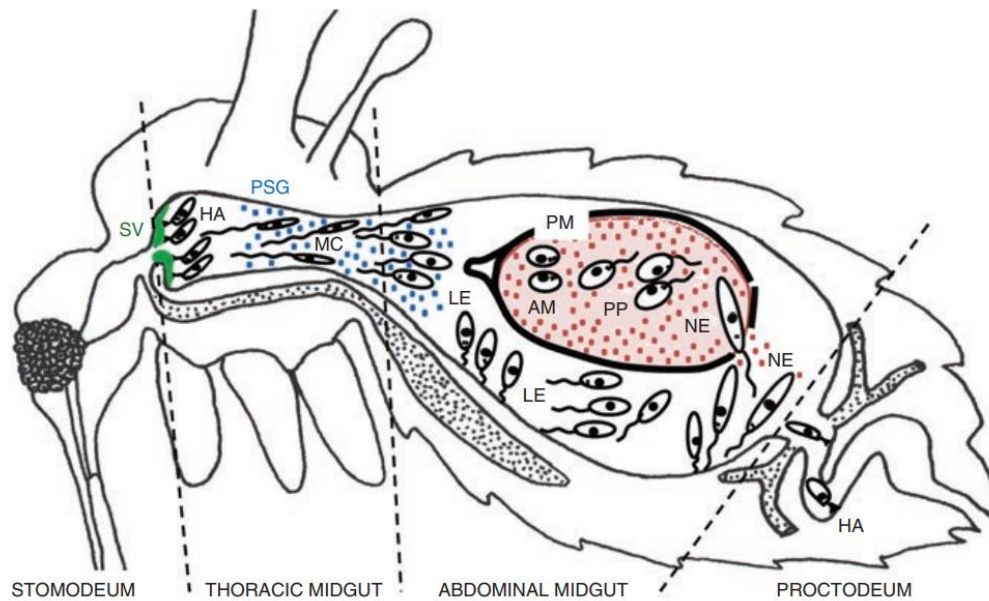
### **Cycle de vie de *Leishmania* chez le phlébotome vecteur**

Le développement de *Leishmania* au sein du phlébotome vecteur est confiné au tube digestif de ce dernier (Dvorák *et al.*, 2018). En fonction des espèces, les parasites vont envahir l'insecte de différentes manières. Les parasites du sous-genre *Leishmania* présentent une infection suprapylarique, c'est-à-dire que leur développement s'effectue dans le mésentéron (intestin moyen) de l'insecte. Les *Leishmania* du sous-genre *Viannia* du Nouveau Monde sont dits péripylariens car ils atteignent le proctodéum (intestin postérieur) avant de retourner vers le mésentéron (Dostálová et Volf, 2012).

Le développement de *Leishmania* chez le vecteur est initié lorsqu'un phlébotome femelle ingère du sang contenant des macrophages infectés par des amastigotes. Le changement des conditions passant de l'hôte mammifère à l'intestin moyen du phlébotome (ex., la diminution de la température et l'augmentation du pH) déclenche la transformation et le développement du parasite en une forme promastigote. Les promastigotes se présentent sous différentes formes morphologiques, différant par la forme de leur cellule, la longueur de leur flagelle, leur motilité, leurs molécules de surface et d'autres propriétés biochimiques. Ces populations ayant des rôles spécifiques au cours du stade vecteur car elles rencontrent diverses barrières mécaniques et/ou biochimiques. La figure 6 et le texte ci-dessous résument les différentes étapes de développement de *Leishmania* au sein du phlébotome vecteur. Les promastigotes métacycliques, formes infectieuses du parasite, sont délivrés sur la peau de l'hôte vertébré lors du prochain repas sanguin (Dostálová et Volf, 2012; Dvorák *et al.*, 2018).

### **Cycle de vie de *Leishmania* chez l'hôte vertébré**

L'hôte vertébré peut être contaminé lorsqu'un phlébotome femelle infecté prend un repas de sang, injectant des promastigotes métacycliques virulents dans la peau de l'hôte (Reithinger *et al.*, 2007). Les parasites sont reconnus par les récepteurs situés à la surface des macrophages et des cellules dendritiques et sont phagocytés avant de se transformer en amastigotes. Dans les vacuoles parasitophores, les amastigotes vont se diviser jusqu'à provoquer l'éclatement des macrophages. Les leishmanies libérées vont coloniser d'autres macrophages. Ainsi, elles atteignent différents tissus, suivant l'espèce de *Leishmania* impliquée. Ce cycle est complet quand le phlébotome femelle pique de nouveau le mammifère infecté ingérant ainsi les macrophages contenant les parasites et en produisant les formes métacycliques infestantes (Díaz et Ponte-Sucre, 2018).



**Figure 6:** Stades de développement de *Leishmania* dans un vecteur compétent.

Les phlébotomes femelles ingèrent des amastigotes (AM) avec le repas de sang. Dans l'intestin moyen du vecteur, le repas de sang est enveloppé par la matrice pérityphique (PM) et les AM se transforment en promastigotes procycliques (PP) capables de proliférer. Après la désintégration de la PM, les PP se transforment en de longues nectomonades (NE) qui se différencient plus tard en une forme plus courte appelée leptomonade (LE). Ces formes se fixent temporairement à l'épithélium de l'intestin moyen et prolifèrent. Dans un stade avancé, les leptomonades migrent vers l'intestin moyen « thoracique », où ils produisent un gel appelé gel sécrétoire promastigote (PSG) et se transforment en une forme métacyclique (MC) ou en haptomonades (HA) attachés au revêtement cuticulaire de la valve stomodéale (SV). (Dvorák *et al.*, 2018).

La leishmaniose peut également être transmise par voie intraveineuse (Herwaldt *et al.*, 2001), à l'occasion d'une transfusion sanguine ou transplantation d'organes/tissus (de Freitas *et al.*, 2006; Antinori *et al.*, 2008), et congénitalement, de la mère à l'enfant (Boehme *et al.*, 2006; Ben Slimane *et al.*, 2014). Cependant, ces modes de transmission sont plus rares. Des cas de transmission par voie sexuelle ont été bien documentés chez le chien (Silva *et al.*, 2009; Naucke *et al.*, 2012), néanmoins, chez l'homme les preuves d'une telle transmission manquent encore (Guedes *et al.*, 2020).

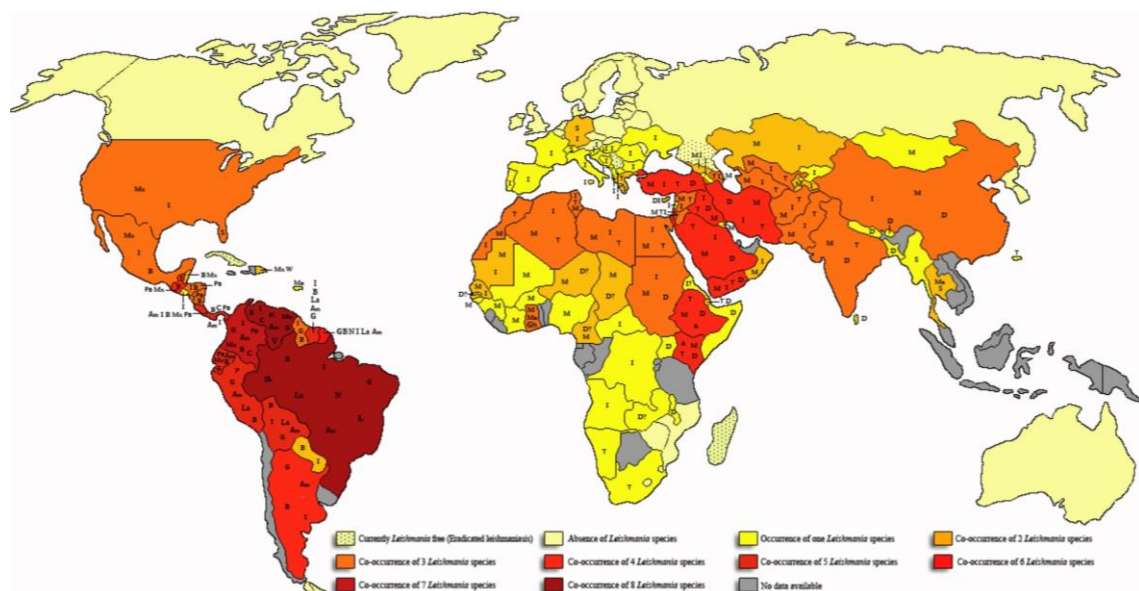
### I.1.3.3. Répartition géographique

La niche écologique de *Leishmania* se divise en deux grandes régions géographiques, soit l'Ancien Monde et le Nouveau Monde, bien que les manifestations cliniques observées soient semblables aux deux localisations. On retrouve le sous-genre *Leishmania* dans les deux régions, tandis que le sous-genre *Viannia* est exclusif au Nouveau Monde (Dedet, 2009).

*Leishmania* est un parasite de vaste distribution géographique, retrouvé dans les zones tropicales et subtropicales, y compris l'Amérique du nord, centrale et du sud, ainsi que dans le bassin méditerranéen, l'Europe du sud-est, le Moyen-Orient, l'Asie centrale et du sud-est, le sous-continent indien et en Afrique. Des rapports récents ont également démontré leur présence en Australie. Dans la région malgache, à l'exception d'un cas de LCan signalé par

Buck *et al.*, en 1951, aucun cas autochtone de leishmaniose n'a été rapporté (Akhoundi *et al.*, 2016). Aujourd'hui, environ 53 espèces de *Leishmania* ont été décrites. Parmi celles-ci, 31 espèces sont connues pour être des parasites de mammifères, d'au moins huit ordres, dont 21 espèces sont pathogènes pour l'homme (Akhoundi *et al.*, 2016; Gradoni, 2018).

Il a été indiqué que dans plus de la moitié des pays d'endémie, au moins deux espèces de *Leishmania* pathogènes pour l'homme sont présentes et sont majoritairement sympatriques (Figure 7) (Akhoundi *et al.*, 2017). La distribution de chaque espèce est déterminée par l'aire de répartition de son phlébotome vecteur, de ses hôtes réservoirs ou des deux (Ashford, 2000; Desjeux, 2004). Les espèces de *Leishmania* sont habituellement divisées en celles responsables de la LC et de la LV. Cependant, cette subdivision est inefficace pour plus de la moitié des espèces, qui ont été jusqu'à présent associées aux deux (Akhoundi *et al.*, 2017).



**Figure 7:** Répartition mondiale de 21 espèces de *Leishmania* pathogènes pour l'homme.

A: *L. aethiopica*; Am: *L. amazonensis*; B: *L. braziliensis*; C: *L. colombiensi*; D: *L. donovani*; G: *L. guyanensis*; Gh: 'Ghana strain'; I: *L. infantum*; La: *L. lainsoni*; L: *L. lindenbergi*; M: *L. major*; Ma: *L. martiniquensis*; Mx: *L. mexicana*; N: *L. naiffi*; Pa: *L. panamensis*; P: *L. peruviana*; S: *L. siamensis*; Sh: *L. shawi*; T: *L. tropica*; V: *L. venezuelensis* et W: *L. waltoni*

(Akhoundi *et al.*, 2017).

#### I.1.4. Vecteurs de *Leishmania* spp. : Phlébotomes

##### I.1.4.1. Taxonomie

La classification des phlébotomes a été largement étudiée, principalement en raison du rôle de ces diptères comme vecteurs de divers parasites, y compris des espèces de *Leishmania*, *Bartonella* et des arbovirus qui causent des maladies chez l'homme et d'autres vertébrés (Galati *et al.*, 2017). La première description reconnaissable d'un phlébotome a été faite par Bonanni en 1691, considéré par lui comme une espèce de *Culex*, ou moustique. Près d'un siècle plus tard, la description de *Phlebotomus papatasi* (Bibio papataci) comme la

première espèce de "Psychodidae" a été donnée par Scopoli en 1786. Cependant, le terme «Flebotomus» n'a été donné qu'en 1840 par Rondani et Berté. Ce terme a été rebaptisé plus tard «Phlebotomus» par Lewis en 1845 (Akhoundi *et al.*, 2016).

Les phlébotomes appartiennent à l'embranchement des Arthropodes, classe des Insectes, ordre des Diptères, sous-ordre des Nématocères, famille des Psychodidés et à la sous-famille des Phlebotominae. Néanmoins, il existe actuellement de nombreuses controverses sur la classification taxonomique des phlébotomes, qui est encore loin d'être définitive. Plusieurs classifications ont été proposées depuis la première étude systématique du genre *Phlebotomus* en 1911 par Newstead, différant en termes de classer les phlébotomes en sous-famille Phlebotominae ou famille Phlebotomidae, et en nombre de genres et sous-genres (Maroli *et al.*, 2013; Akhoundi *et al.*, 2016; Muñoz, 2020).

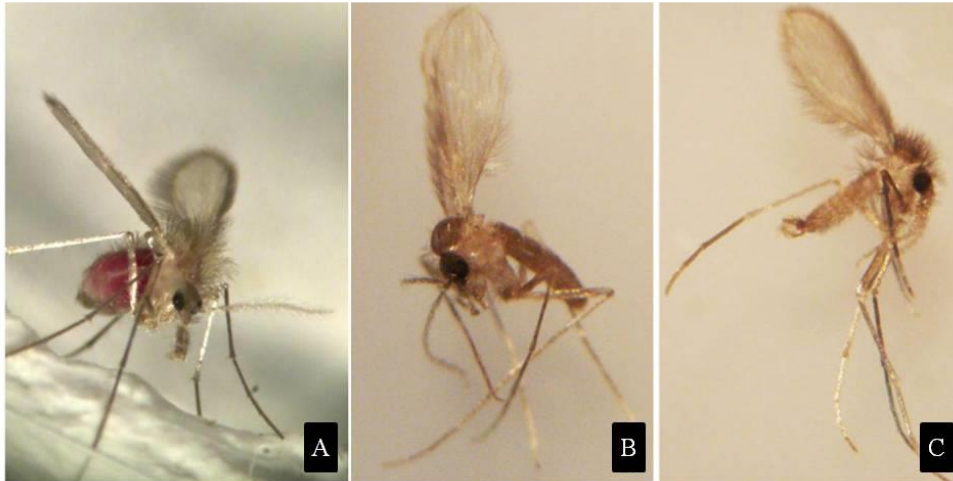
À ce jour, la classification la plus communément acceptée est basée sur une approche conservatrice qui subdivise les Phlebotominae en six genres : *Phlebotomus* (13 sous-genres), *Sergentomyia* (10 sous-genres) et *Chinius* (4 espèces) dans l'Ancien Monde, et *Lutzomyia* (26 sous-genres et groupes), *Brumptomyia* (24 espèces) et *Warileya* (6 espèces) dans le Nouveau Monde (Lewis *et al.*, 1977; Young et Duncan, 1994; Akhoundi *et al.*, 2016). Sous ces genres, environ 988 espèces et sous-espèces ont été décrites à ce jour, et plus de la moitié d'entre elles se trouvent en Amérique (Bates *et al.*, 2015).

#### **I.1.4.2. Morphologie**

Les phlébotomes adultes (Figure 8) sont des insectes délicats et poilus, présentant un corps grêle et allongé de petite taille, de deux à cinq mm de long. Ils sont de couleur claire, jaune pâle, à brune, à peine visible à l'œil nu et ils sont parfois confondus avec des petits moustiques (Lane, 1993; Izri *et al.*, 2006). Comme d'autres insectes, le corps de phlébotome adulte est constitué de trois principaux compartiments: tête, thorax et abdomen.

La tête, formée en grande partie par une capsule chitineuse, est petite et limitée de chaque côté par un œil composé. Sur la région frontale s'insèrent deux antennes filiformes portant chacune 16 segments. L'ensemble des pièces buccales forme une trompe courte et discrète bien adaptée à la succion du sang, mais seules les femelles qui piquent. À leur base se trouve une paire de palpes maxillaires à cinq segments relativement visibles et tombant vers le bas. Le thorax est bossu, bien développé et constitué de trois segments thoraciques (pro-, méso- et méta-thorax) portant chacun une paire de pattes articulées, longues, fines et couvertes de soies (Abonnenc, 1972; Service, 2012). Le thorax porte aussi une paire d'ailes lancéolées très poilues qui se dressent en V à 45° sur le dos lorsque le phlébotome est au repos (Figure 8a) (Lawyer *et al.*, 2017). L'abdomen, cylindrique dans sa plus grande partie,

est moyennement long et composé de dix segments dont les derniers sont transformés en segments génitaux (Abonnenc, 1972). Chez la femelle, il est plus ou moins arrondi à l'extrémité (Figure 8b), tandis que chez le mâle, il à une extrémité avec un aspect renversé (Figure 8c) (Service, 2012).



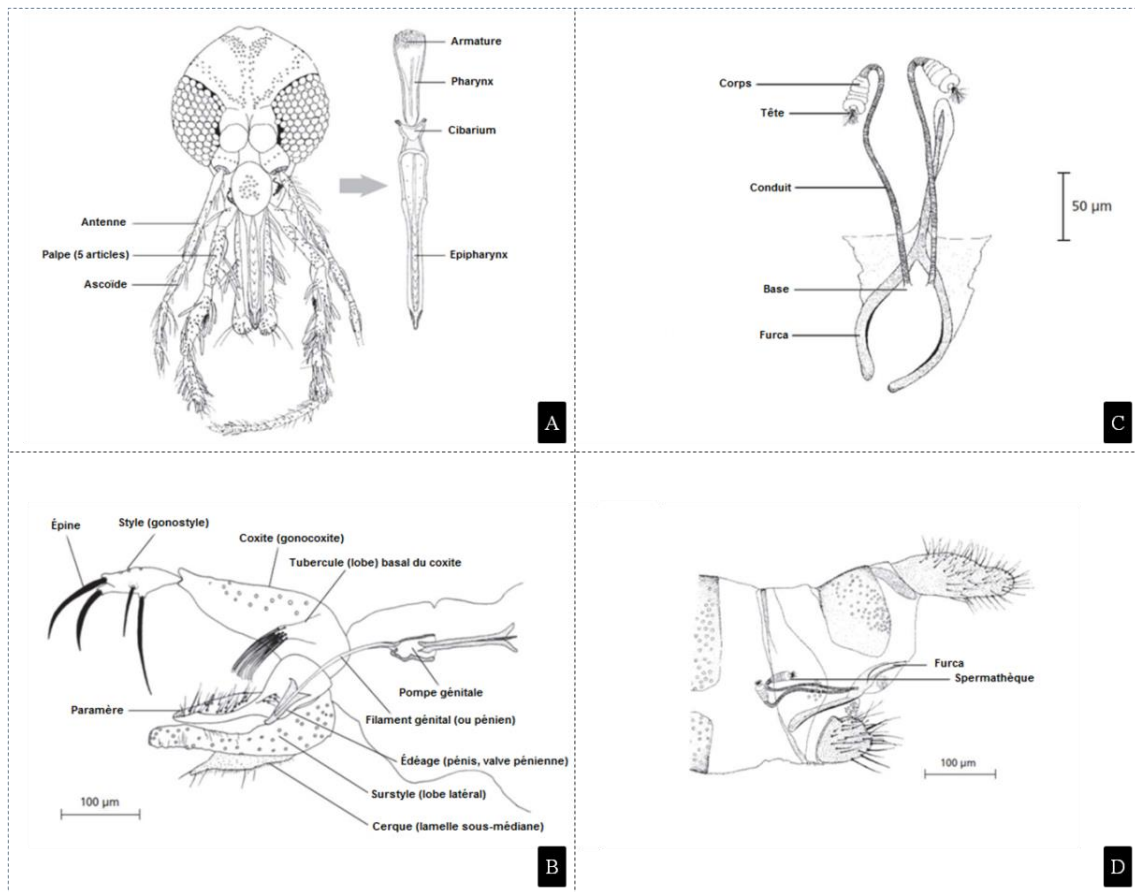
**Figure 8:** Phlébotomes adultes.

(A) Phlébotome au repos, (B) phlébotome femelle, (C) phlébotome mâle.

Source : Gálvez *et al.*, (2018) (A), Dantas-Torres (2009) (B, C).

Parmi les structures morphologiques ayant la plus grande valeur taxonomique et les plus couramment utilisées dans l'identification sont celles trouvées dans la tête et l'abdomen (Figure 9). Les caractères d'identification des espèces les plus utilisés sont les spermathèques, le cibarium et le pharynx pour les femelles et l'armature génitale externe pour les mâles (Young et Duncan, 1994; Kato *et al.*, 2010; Depaquit et Léger, 2017).

Cependant, l'identification morphologique a certaines limites, en particulier pour l'identification des spécimens endommagés ou des espèces cryptiques qui sont morphologiquement indiscernables. Des outils moléculaires, tels que le séquençage de l'ADN, peuvent compléter les techniques traditionnelles (Depaquit, 2014; Contreras Gutiérrez *et al.*, 2014; Nzelu *et al.*, 2014; Dokianakis *et al.*, 2018). De plus, l'analyse des profils protéiques à l'aide de MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry) permet également une identification précise des espèces de phlébotomes (Dvorak *et al.*, 2014; Lafri *et al.*, 2016; Kniha *et al.*, 2021; Mhaidi *et al.*, 2021).

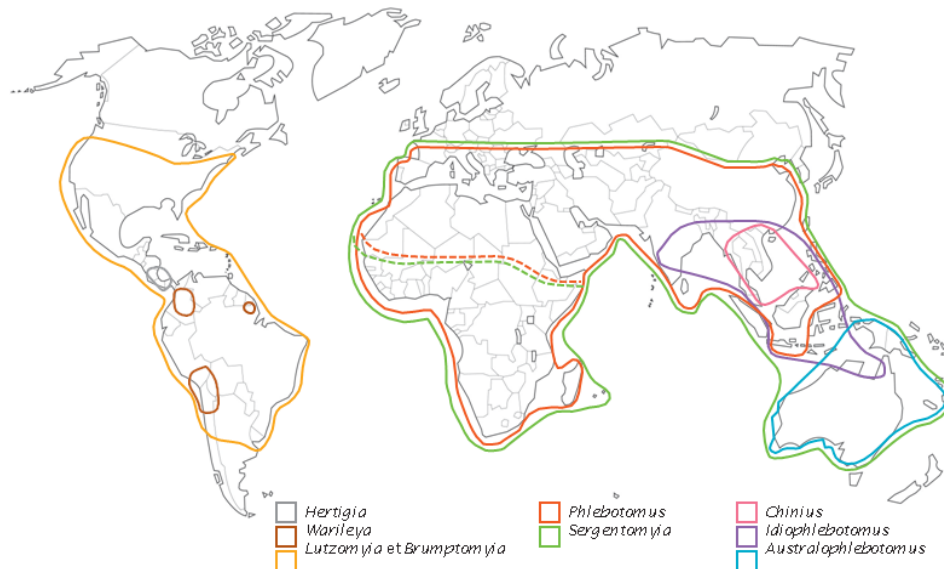


**Figure 9:** Principaux caractères morphologiques utiles pour l'identification des espèces de phlébotomes (Depaquit et Léger, 2017; Muñoz, 2020).

(A) tête, (B) génitalia mâle, (C) spermathèque et (D) extrémité postérieure de l'abdomen d'une femelle.

#### I.1.4.3. Répartition géographique

Les phlébotomes se trouvent principalement dans les régions chaudes du monde (ex., Bassin méditerranéen, Asie, Afrique, et Amérique du Sud), cependant, leur aire de distribution est très étendue (entre 50°N et 40°S) (Killick-Kendrick, 1999). Ils sont généralement absents des îles purement volcaniques ou coralliennes isolées, à quelques exceptions près telles les Comores ou l'atoll d'Aldabra aux Seychelles (Depaquit et Léger, 2017). Leur répartition altitudinale est comprise entre 300 mètres au-dessous du niveau de la mer (Jéricho en Palestine) et 3600 mètres au-dessus du niveau de la mer (Mashad en Iran). Il convient d'ajouter que, bien que leurs aires de répartition se chevauchent largement, les *Phlebotomus* ont une affinité pour la région paléarctique, car il s'agit de la principale zone tempérée de l'Ancien Monde, tandis que les *Sergentomyia* sont surtout implantés dans les zones tropicales où les espèces de *Phlebotomus* sont rares (Akhoundi *et al.*, 2016). La répartition géographique des principaux genres de phlébotomes est donnée dans la figure 10.



**Figure 10:** Distribution géographique des principaux genres de phlébotomes (Depaquit et Léger, 2017).

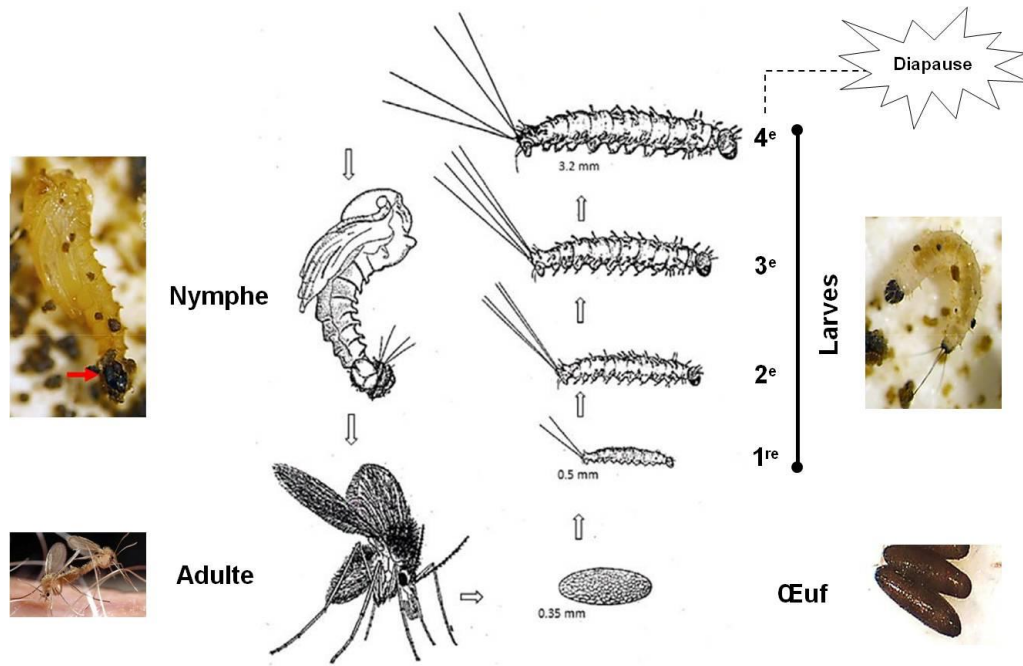
#### I.1.4.4. Biologie et éco-éthologie

Les phlébotomes subissent une métamorphose complète à travers quatre stades de développement: œuf; larve (quatre stades larvaires); nymphe et adulte (Figure 11). Les stades immatures, contrairement à ceux des moustiques, ne nécessitent pas d'eau stagnante pour achever leur développement, bien qu'ils aient besoin d'habitats relativement humides et chauds (Maroli *et al.*, 2013; Lawyer *et al.*, 2017).

Après l'accouplement et la prise d'un repas de sang ou vice-versa, les femelles adultes développent des œufs et pondent individuellement ou en petits lots entre 30 et 70 œufs selon l'espèce en cause, et la taille et la nature du repas de sang précédent (Volf et Volfova, 2011). Les œufs sont déposés dans un habitat approprié riche en matières organiques, tels que les excréments d'animaux et le sol, qui fournit aux larves nouvellement émergées un abri, une nutrition et une humidité (Maroli *et al.*, 2013). L'éclosion des œufs dépend fortement de la température et le développement ultérieur des larves est généralement lent. Il existe quatre stades larvaires qui se différencient principalement par leur taille et le nombre de leurs soies caudales (Lawyer *et al.*, 2017). La durée du développement larvaire varie considérablement, à la fois entre les espèces et au sein de celles-ci, et est principalement régulée par la température (Lane, 1993). Les larves se transforment par la suite en nymphes fixées au substrat par l'intermédiaire de la dernière exuvie larvaire qui persiste à la partie postérieure de l'abdomen (Depaquit et Léger, 2017). Six à treize jours plus tard, l'adulte émerge (Service, 2012).

En général, après que la femelle ait pris un repas de sang et terminé la ponte, les larves du premier stade émergent en 12 à 19 jours, les nymphes en 25 à 29 jours et les adultes en 35 à 69 jours (Volf et Volfova, 2011).

Le cycle de vie, dans des conditions défavorables, pourrait s'étendre à plusieurs mois chez certaines espèces avec des œufs ou des larves en diapause (Lawyer *et al.*, 2017). La durée de vie des adultes est fonction de la température et de l'humidité; plus la température est basse et/ou l'hygrométrie est élevée, plus la durée de vie est élevée. En moyenne, les femelles vivent deux semaines à deux mois et prennent généralement plusieurs repas sanguins, ce qui est indispensable à la transmission des leishmanies, tandis que les mâles ont une durée de vie plus brève (Depaquit et Léger, 2017).



**Figure 11:** Cycle de vie du phlébotome : Œuf - Larve (quatre stades) - Nymphe - Adulte (Lawyer *et al.*, 2017).

Une saisonnalité dans l'abondance des phlébotomes peut être observée. Dans les régions tempérées, elle est généralement associée aux fluctuations de température avec une augmentation de l'abondance pendant l'été, montrant des pics uni-modaux ou bimodaux. Dans les zones tropicales, elle est liée à la pluviométrie, mais les pics d'abondance sont observés en saison sèche ou en saison des pluies selon les espèces (Munstermann, 2019).

Les gîtes de reproduction des phlébotomes restent mal identifiés pour la plupart des espèces et la recherche de stades préimaginaux dans leurs biotopes naturels est difficile, fastidieuse et s'est avérée remarquablement improductive (Felicangeli, 2004). Les lieux de repos sont des micro-habitats frais, humides et ombragés tels que les trous d'arbres, la litière forestière, les fissures dans les murs, les terriers de rongeurs, les nids d'oiseaux et termitières, les abris du bétail, les grottes et les ruines (Service, 2012).

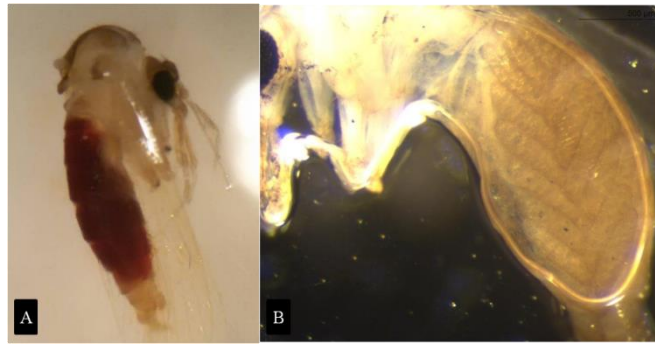
Contrairement aux moustiques, l'attaque des phlébotomes sur l'hôte est silencieuse (Maroli *et al.*, 2013). Leur activité nocturne se compose d'un certain nombre de composants

discrets, principalement à la recherche d'un repas de sang, d'un repas de sucre, de partenaires et de sites de reproduction (Yuval et Schlein, 1986). Un tel comportement des phlébotomes est régi par une série de facteurs tels que l'horloge biologique interne, les changements quotidiens de l'intensité lumineuse et d'autres facteurs abiotiques, notamment la température, l'humidité relative, la pluie et la vitesse du vent (Aklilu *et al.*, 2017). Bien que la majorité des espèces soit exophile, certaines espèces peuvent être attirées par la lumière de faible intensité et donc rentrer dans les habitations ou les abris des animaux (Killick-Kendrick, 1999).

Le vol des phlébotomes est caractéristique: il s'agit d'un vol silencieux par petits bonds aériens et interrompu par de brèves périodes de repos, ce qui a donné lieu à l'hypothèse qu'ils ne se dispersent pas loin des sites de reproduction (Killick-kendrick, 1999; Depaquit et Léger, 2017). La vitesse de vol des phlébotomes est considérablement plus lente (1 m/s) que celle des moustiques. Ils sont incapables de voler à une grande vitesse du vent, qui est le facteur principal limitant leur dispersion (Maroli *et al.*, 2013). Leur rayon maximum de déplacement est variable selon les espèces, soit à peu près un kilomètre (Depaquit et Léger, 2017).

Les phlébotomes adultes, quel que soit leur sexe, ont besoin de glucides comme source d'énergie. Dans la nature, les sucs végétaux et les miellats produits par les pucerons et/ou d'autres homoptères sont les principales sources de glucides. Les sucres jouent un rôle important dans le développement et l'infectiosité de *Leishmania* spp. non seulement en contrôlant la flore intestinale et en agissant comme bactériostatique mais aussi en servant de source d'énergie pour les parasites, qui semblent se multiplier plus facilement dans le tube digestif des phlébotomes en présence de sucres (Brazil et Brazil, 2018).

En plus du sucre, presque tous les phlébotomes femelles ont besoin d'un repas de sang provenant d'hôtes vertébrés pour la production et la maturation d'œufs (Figure 12). Cependant, certaines espèces sont capables de produire leur premier lot d'œufs avant d'avoir pris leur premier repas de sang; elles ont une reproduction autogène ou partiellement autogène (Shymanovich *et al.*, 2019). Pour les phlébotomes non autogènes, le nombre de repas de sang pris au cours d'un cycle gonotrophique varie d'une espèce à l'autre, soit en prenant un seul repas de sang (concordance gonotrophique) ou plus d'un repas de sang (discordance gonotrophique) pour chaque lot d'œufs. D'un point de vue épidémiologique, les phlébotomes à discordance gonotrophique sont des vecteurs plus efficaces à mesure que le contact entre le vecteur et les hôtes vertébrés augmente et, par conséquent, l'efficacité de la transmission de la leishmaniose se trouve aussi augmenté (Killick-Kendrick, 1999).



**Figure 12:** Phlébotome femelle ; gorgée (A) et gravide (B).

Source: Lafri, 2019 (A), Gherbi (2020) (B)

La plupart des phlébotomes se nourrissent de sang au crépuscule et au cours de la nuit, bien que quelques espèces, dont plusieurs vecteurs importants, piquent pendant la journée (habituellement ou lorsqu'ils sont dérangés). L'alimentation sanguine est dirigée vers des zones cutanées plus sensibles et exposées telles que les oreilles, le nez, le cou, les pieds, la queue, le museau et les paupières (Munstermann, 2019). Le volume de sang ingéré varie individuellement selon les espèces, mais il est globalement égal au poids propre de l'insecte, qui peut aller de 0,1 à 0,6 mg (Brazil et Brazil, 2018).

#### **I.1.4.5. Préférences trophiques des phlébotomes femelles**

Les phlébotomes femelles se nourrissent d'un large éventail d'hôtes vertébrés, y compris les humains, les bovins, les équidés, les chiens, les rongeurs, les oiseaux et les reptiles (Service, 2008). Chaque espèce de phlébotome a ses propres préférences en matière d'hôtes, bien que la disponibilité de ces derniers soit un facteur déterminant important pour une telle préférence (Bongiorno *et al.*, 2003). Une compréhension sans équivoque de ce comportement des phlébotomes en général et des espèces vectrices en particulier, est fondamentale pour identifier les cycles de transmission naturels des maladies transmises par ces diptères et pour développer des stratégies de lutte efficaces (Garlapati *et al.*, 2012).

Malgré certaines préférences trophiques, la plupart des espèces de phlébotomes peuvent en effet avoir un comportement alimentaire opportuniste (Afonso *et al.*, 2012). Ce comportement « opportuniste alimentaire » permet aux phlébotomes vecteurs de s'adapter à de nouveaux habitats ou environnements, ce qui constitue par la suite un facteur déterminant dans le processus d'expansion et d'urbanisation de la maladie, ainsi que à l'émergence de nouveaux profils épidémiologiques. A titre d'exemple, en Espagne, les modifications environnementales induites par la création d'un grand parc arboré dans une zone périurbaine, traditionnellement utilisée à des fins agricoles, ont conduit à une augmentation notable de la densité de population de lagomorphes et de phlébotomes vecteurs. Les études menées dans ce foyer ont clairement montré la préférence de *P. perniciosus* pour le sang des lagomorphes,

réservoirs sauvages de la maladie et responsables de la survenue d'une importante épidémie de LH dans la région (González *et al.*, 2017). Bien que certaines espèces animales soient réfractaires au développement du *Leishmania*, certaines études ont montré qu'elles agissent comme source de nourriture pour les phlébotomes et jouent de ce fait différents rôles, soit en diminuant le risque de l'infestation par la leishmaniose chez l'Homme, soit en attirant des réservoirs potentiels du parasite plus près des résidences, rendant possible l'installation et le maintien du cycle de transmission en milieu rural et à proximité des banlieues urbaines (Alexander *et al.*, 2002; Bern *et al.*, 2005).

Le choix d'un animal comme source de nourriture par un phlébotome est contrôlé par de nombreux facteurs, souvent interdépendants et complexes, rendant difficile l'évaluation des préférences trophiques dans des conditions naturelles. Parmi ces facteurs, on trouve des facteurs biotiques qui incluent la composition, la taille, l'abondance et le comportement de la faune locale (Bongiorno *et al.*, 2003; Yared *et al.*, 2019), les habitudes de piqures exo- ou endophiles des populations de phlébotomes et leur comportement nocturne dans les différents milieux prospectés (Guy *et al.*, 1984), ainsi que de facteurs abiotiques, tels que la température, le vent, la chaleur, l'humidité et les niveaux de CO<sub>2</sub> (Yared *et al.*, 2019).

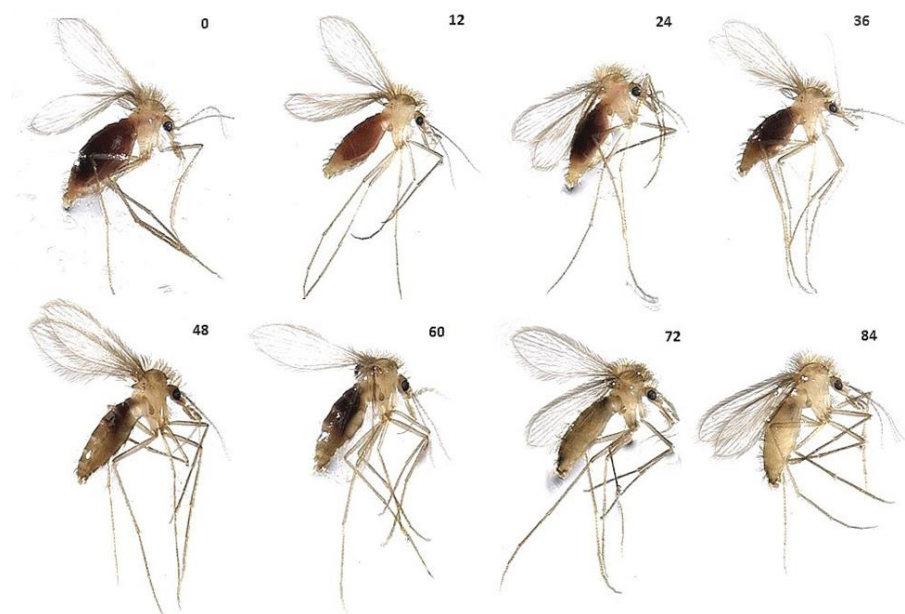
Lorsqu'on pratique des analyses du contenu stomacal, il n'est pas rare de trouver du sang de diverses origines. En effet, lorsqu'un phlébotome est dérangé au cours de son repas, il peut le compléter soit en piquant aussitôt le même hôte, expliquant ainsi certaines lésions multiples au cours de LCs, soit en piquant un autre hôte (Bongiorno *et al.*, 2003). Récemment, il a été prouvé que l'ingestion d'un deuxième repas de sang par des phlébotomes préalablement infectés par *Leishmania* entraîne fortement une différenciation et une amplification des promastigotes métacycliques, améliorant ensuite l'infectiosité des phlébotomes vecteurs et la transmission de la maladie (Serafim *et al.*, 2018). La nature du sang ingéré par les femelles influence également leur productivité et sur le temps de développement des différents stades de phlébotomes (Benito-de Martín *et al.*, 1994; Sant'Anna *et al.*, 2010).

#### **I.1.4.5.1. Techniques d'identification de repas de sang**

Plusieurs techniques ont été développées pour identifier l'origine du repas de sang des arthropodes hématophages afin d'évaluer correctement leurs préférences trophiques (Borland et Kading, 2021). Les techniques sérologiques, y compris les tests de précipitations (Tesh *et al.*, 1971; Da Rocha Nery *et al.*, 2004), et l'enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (De Colmenares *et al.*, 1995; Svobodová *et al.*, 2003) sont les premières méthodes utilisées pour identifier l'origine du repas de sang des phlébotomes et des autres arthropodes, et sont encore utilisées de nos jours. Plus tard, des approches moléculaires basées sur l'amplification de

l'ADN ont été développées et sont largement appliquées (Hlavackova *et al.*, 2019). Parmi elles, on retrouve le séquençage de l'ADN, le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PCR-RFLP), la PCR en temps réel (RT-PCR), la PCR multiplex et hétéroduple, ainsi que le test d'hybridation inverse Ligne Blot (PCR-RLB) (Kent, 2009; Maleki-Ravasan *et al.*, 2009; Ajaoud *et al.*, 2015; da Silva Sales *et al.*, 2015; Yared *et al.*, 2019; Elaagip *et al.*, 2020). Les marqueurs génétiques les plus couramment utilisés sont les gènes mitochondriaux du cytochrome b (*Cyt b*) (Chaskopoulou *et al.*, 2016), du cytochrome c oxydase (COI) (Bennai *et al.*, 2018), les gènes ARNr (12S, 16S) (Valinsky *et al.*, 2014) et le gène codant pour la prépronocéptine nucléaire (PNOC) (Haouas *et al.*, 2007). Les techniques de laboratoire visant à identifier l'origine du repas de sang des arthropodes ont évolué ces dernières années pour inclure celles qui ne reposent pas sur l'amplification de l'ADN, comme la spectrométrie de masse MALDI-TOF (Borland et Kading, 2021). Le MALDI-TOF MS, en particulier celui qui repose sur la cartographie de masses peptidiques (*Peptide Mass Mapping*), s'est récemment avéré être un outil performant pour l'identification rapide et sensible de la source des repas de sang des phlébotomes (Hlavackova *et al.*, 2019).

Le volume de sang ingéré par les phlébotomes, l'état de digestion des repas sanguins (Figure 13) ainsi que le choix de la méthode d'analyse jouent un rôle important dans l'identification réussie de l'origine des repas de sang (Hlavackova *et al.*, 2019). Le tableau 1 présente quelques études menées dans différents pays pour la détermination de l'origine du repas de sang chez les phlébotomes femelles, les techniques appliquées pour l'analyse et leur taux de réussite dans l'identification de la source des repas de sang.



**Figure 13:** État de digestion du sang dans l'intestin du phlébotome (*P. papatasi*, 0 à 84 heures) (Kykaloová, 2019).

**Tableau 1:** Préférences trophiques de quelques espèces de phlébotomes, les techniques appliquées pour l'analyse et leur taux de réussite dans l'identification de l'origine des repas de sang.

Pays	Sites d'étude	Type de foyer	Sites d'échantillonnage de phlébotomes	Méthode d'analyse	Nb. des repas sanguins analysés/identifiés	Espèce engorgée la plus abondante	Hôte préféré	Auteurs
Algérie	Bourkika (Tipaza)	LC, LV	<ul style="list-style-type: none"> <li>A l'intérieur et aux alentours des habitations humaines et des abris pour animaux</li> </ul>	COI PCR	88/86 (97,7%)	<i>P. perniciosus</i> , <i>P. longicuspis</i> et <i>P. perfiliewi</i>	Petits ruminants* (moutons, chèvres), Humains**, ânes	<b>Bennai et al. (2018)</b>
Brésil	Mesquita (Rio de Janeiro)	LC	<ul style="list-style-type: none"> <li>A l'intérieur des habitations.</li> <li>Au péridomicile (où circulent les animaux domestiques, synanthropiques et sylvatiques)</li> </ul>	Test de précipitation	370/187 (50,54%)	<i>L. intermedia</i>	Rongeurs*, oiseaux, humains, équidés, canidés	<b>Afonso et al. (2005)</b>
	Adrianópolis (Paraná)	LC	<ul style="list-style-type: none"> <li>Différents biotopes (péri-domicile, maisons et forêts)</li> </ul>	PNOG PCR	93/27 (29,03%)	<i>L. intermedia</i>	Porcs*, chiens**, chevaux	<b>Baum et al. (2015)</b>
Espagne	Madrid	LV, LC	<ul style="list-style-type: none"> <li>Parc arboré périurbain (lapins, lièvres et occasionnellement de chats errants)</li> </ul>	Cyt b PCR	308/224 (74,36%)	<i>P. perniciosus</i>	Lapins*, lièvres**, chats, humains, chiens	<b>González et al. (2017)</b>
					33/10 (30,3%)	<i>S. minuta</i>	Gecko	
	Estrémadure	LCan	<ul style="list-style-type: none"> <li>Différents biotopes; milieux urbains, périurbains, ruraux et sylvatiques</li> </ul>		55/31 (56,36%)	<i>P. perniciosus</i>	Moutons*, porcs, humains, chevaux, lapins et ânes	<b>Bravo-Barriga et al. (2016)</b>
				<i>P. ariasi</i>	Moutons, porcs, humains, chevaux, lapins et dindes			
Éthiopie	Humera et Metema	LV	<ul style="list-style-type: none"> <li>Habitats extradomiciliaires (ex., forêt d'Acacia-Balanites).</li> <li>Habitats péridomestiques (ex., près des enclos pour animaux)</li> </ul>	ELISA	273/263 (96,34%)	<i>P. orientalis</i>	Bovins*, bovins/humains, et Humains.	<b>Gebre-Michael et al. (2010)</b>
Italie	Sicile	LCan	<ul style="list-style-type: none"> <li>Abris pour animaux dans les zones suburbaines</li> <li>Fermes d'élevage dans les milieux ruraux</li> </ul>	Cyt b PCR	176/108 (61,36%)	<i>P. perniciosus</i>	Lapins sauvages* chèvres**, chevaux, Humains, chiens, cochons, poulets, vaches, chats.	<b>Abbate et al. (2020)</b>
						<i>S. minuta</i>	Humains*, chevaux, cochons, vaches, lapins, chiens, ânes.	

Tableau 1 (suite)

Pays	Sites d'étude	Type de foyer	Sites d'échantillonnage de phlébotomes	Méthode d'analyse	Nb. des repas sanguins analysés/identifiés	Espèce engorgée la plus abondante	Hôte préféré	Auteurs
Grèce	Thessaloniki	LCan	<ul style="list-style-type: none"> <li>Refuges pour animaux, champs ouverts, zones résidentielles</li> </ul>	Cyt b PCR	50/49 (98%)	<i>P. perfiliewi</i>	Humains*, poulets, chèvres/moutons	<b>Chaskopoulou et al. (2016)</b>
						<i>P. simici</i>	Humains*, chèvres/moutons	
Maroc	Ait Makhlof, Guimi, Agmeroul (Azilal)	LC	<ul style="list-style-type: none"> <li>A l'intérieur des habitations humaines et les refuges pour animaux domestiques en milieu rural</li> </ul>	Cyt b PCR	112/64 (57,14%)	<i>P. sergenti</i>	Humains*, poulets, rongeurs, oiseaux, bovins, lapins, chauves-souris, singes	<b>Ajaoud et al. (2015)</b>
Palestine	Jénine, Tubas, Naplouse et Hébron	LC, LV	<ul style="list-style-type: none"> <li>À l'intérieur des refuges pour animaux domestiques et des grottes et à l'extérieur près de leurs entrées</li> </ul>	Cyt b PCR-RDB	396/301 (76,01%)	<i>P. papatasi</i>	Humains*, vaches, chèvres, damans, oiseaux	<b>Azmi et al. (2020)</b>
						<i>P. sergenti</i>	Humains*, vaches, chèvres, damans, rats, chats, oiseaux	
Turquie	Sanliurfa	LC	<ul style="list-style-type: none"> <li>Habitations humaines (caves, chambres, remises et toits)</li> </ul>	ELISA	120/64 (53%)	<i>P. sergenti</i>	Poulets*, souris, rats, moutons/chèvres, bovins, humains	<b>Svobodova et al. (2003)</b>
						<i>P. papatasi</i>	Poulets, souris, rats, chevaux, moutons/chèvres, bovins, humains	
Portugal	Algarve	LCan, LV	<ul style="list-style-type: none"> <li>Environnements domestiques, péri-domestiques et sylvatiques (les humains, les chiens, les bétails, les chevaux, les porcs, les lapins et les volailles)</li> </ul>	Cyt b PCR	78/30 (38,46%)	<i>P. perniciosus</i>	Chevaux*, poulets, lapins, porcs, bovins, moutons	<b>Maia et al. (2015)</b>
						<i>S. minuta</i>	Humains, lézards	
Moldavie	/	Non endémique	<ul style="list-style-type: none"> <li>A l'intérieur des habitations humaines et des poulaillers</li> <li>A l'extérieur des abris pour animaux</li> </ul>	MALDI-TOF MS	25/22 (88%)	<i>P. papatasi</i>	Poulets* Humains**	<b>Șuleșco et al. (2021)</b>

\* Espèce la plus abondante, \*\* Deuxième espèce la plus abondante, LV : Leishmaniose viscérale, LC : Leishmaniose cutanée, LCan : Leishmaniose canine. RDB : dot-blot inverse.

#### I.1.4.6. Incrimination et compétence vectorielle

Il existe deux types de phlébotomes vecteurs: les vecteurs spécifiques, qui assurent le développement d'une seule espèce de *Leishmania* et les vecteurs permissifs, chez lesquels plusieurs espèces peuvent se développer (OMS, 2011).

Sur plus de 800 espèces de phlébotomes répertoriées dans le monde, seules 98 sont des vecteurs avérés ou suspectés de *Leishmania* (Maroli *et al.*, 2013). Le fait que la plupart des espèces ne jouent aucun rôle dans la transmission suggère que l'aptitude d'une espèce donnée de phlébotome à jouer le rôle de vecteur est due à de nombreux facteurs. Les critères d'inclusion d'un phlébotome en tant que vecteur de *Leishmania* sont qu'il doit se nourrir sur le ou les hôtes réservoirs (animal et/ou humain), qu'il ait des infections naturelles avec la même souche de parasite qui cause la LH et qu'il doit être capable de soutenir le développement complet du parasite et de le transmettre à un hôte sensible lors d'un repas de sang (Dvorák *et al.*, 2018). Pour cette dernière, plusieurs interactions parasite-vecteur sont nécessaires pour rendre un phlébotome compétent pour la transmission de *Leishmania*. Premièrement, les parasites devraient être résistants aux enzymes digestives produites par le mésentéron de l'insecte. Deuxièmement, les promastigotes devraient être capables de se lier à la surface interne de l'intestin des phlébotomes (présence de sites de liaison des lipophosphoglycanes (LPG) qui correspondent aux LPG de surface des promastigotes); et enfin, les phlébotomes devraient être capables d'achever la métacyclogénèse des promastigotes, résultant en des stades métacycliques qui puissent survivre dans l'organisme de l'hôte vertébré (OMS, 2011; Ready, 2013).

Les vecteurs de leishmanioses ont fait l'objet de nombreuses études (Killick-Kendrick, 1990; Ready, 2013; Maroli *et al.*, 2013; Akhouni *et al.*, 2016; Dvorák *et al.*, 2018). En bref, la leishmaniose est transmise par *Phlebotomus* spp. dans l'Ancien Monde (Tableau 2) et par *Lutzomyia* spp. dans le Nouveau Monde. En piquant aussi bien l'Homme que l'animal, les phlébotomes permettent la prolifération et la circulation de nombreuses espèces de *Leishmania* qui provoquent, dans la majorité des cas, des infections zoonotiques. Dans l'Ancien Monde, chaque espèce de phlébotome semble être impliquée dans la transmission d'un seul agent de *Leishmania* à quelques exceptions près. Le rôle des espèces appartenant au genre *Sergentomyia* dans la transmission de *Leishmania* spp. chez les hôtes mammifères est suspecté mais n'est pas encore bien élucidé (Maia et Depaquit, 2016; Dvorák *et al.*, 2018).

**Tableau 2:** Principales espèces de phlébotomes vectrices de leishmanioses dans l'Ancien Monde.

Source : D'après Maroli *et al.* (2013), Ready (2013), Dvorák *et al.* (2018).

Espèce de <i>Leishmania</i>	Nombre de vecteurs prouvés et suspectés	Sous-genre	Espèces vectrices prouvées	Régions ou pays
<i>L. infantum</i>	20	<i>Larroussius</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>P. ariasi</i></li> <li>• <i>P. perniciosus</i></li> </ul>	Europe méditerranéenne, Afrique du Nord, Asie du Sud-ouest, Chine
<i>L. donovani</i>	6	<i>Euphlebotomus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>P. argentipes</i></li> </ul>	Nord-est de l'Inde, Népal, Bangladesh, Bhoutan
		<i>Larroussius</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>P. orientalis</i></li> </ul>	Soudan, Éthiopie, Tchad*, Yémen
		<i>Synphlebotomus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>P. martini</i></li> </ul>	Soudan, Éthiopie, Kenya, Ouganda
<i>L. major</i>	7	<i>Phlebotomus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>P. duboscqi</i></li> </ul>	Afrique subsaharienne, Yémen
			<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>P. papatasi</i></li> </ul>	Afrique du Nord, Moyen-Orient
<i>L. tropica</i>	7	<i>Paraphlebotomus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>P. sergenti</i></li> </ul>	Afrique du Nord, Moyen-Orient, Iran, Afghanistan
		<i>Adlerius</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>P. arabicus</i></li> </ul>	Afrique du Nord, Moyen-Orient, Afrique subsaharienne
		<i>Larroussius</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>P. guggisbergi</i></li> </ul>	
<i>L. aethiopia</i>	3	<i>Larroussius</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>P. longipes</i></li> <li>• <i>P. pedifer</i></li> </ul>	Éthiopie, Kenya

\* Non confirmé

Le taux d'infection estimé chez les vecteurs (c.-à-d. le pourcentage de phlébotomes infectés par *Leishmania* spp.) est un bon indicateur de l'intensité de la transmission et est épidémiologiquement important. Il dépend de nombreux facteurs, parmi lesquels la situation épidémiologique dans la zone d'étude, la période de l'année, les préférences trophiques du vecteur, l'état physiologique des femelles et la méthode employée pour estimer l'infection chez le vecteur (Perez *et al.*, 1994; Torina *et al.*, 2008; Mozafari *et al.*, 2020; Shoraka *et al.*, 2021). Pour cette dernière, la méthode habituellement utilisée est celle qui consiste à disséquer le tube digestif des femelles, suivie d'un examen direct au microscope entre lame et lamelle. Dans certains cas, la positivité des échantillons doit être confirmée par l'isolement du parasite sur milieux de cultures, souvent susceptibles de contamination bactérienne ou fongique, ou par inoculation à des animaux de laboratoire. Outre la procédure laborieuse, certains facteurs peuvent limiter l'utilisation de cette technique, y compris sa faible sensibilité, la nécessité de travailler avec des insectes vivants, et la difficulté de traiter un grand nombre d'échantillons nécessaires aux études épidémiologiques (Kato *et al.*, 2010; OMS, 2011; Bowles *et al.*, 2015). Les techniques moléculaires, qui font généralement appel à l'amplification de l'ADN par des méthodes fondées sur la PCR, représentent une alternative pour la détection et l'identification de *Leishmania* chez les insectes vecteurs (Kato *et al.*, 2010). Bien qu'il s'agisse d'une méthode plus coûteuse, la PCR est plus sensible et a une plus grande spécificité (Paiva *et al.*, 2006). Elle offre un autre avantage lié à la possibilité de travailler avec des insectes maintenus au sec, congelés ou conservés dans l'éthanol (Cabrera *et al.*, 2002). L'utilisation de la PCR dans les études de prévalence d'infection par *Leishmania* spp. chez les phlébotomes s'est avérée plus avantageuse par rapport aux autres techniques disponibles, permettant également une identification correcte du parasite au niveau du genre, du sous-genre et de l'espèce, mais il n'est pas toujours possible de déterminer l'espèce (Aransay *et al.*, 2000; Michalsky *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2010). Toutefois, plusieurs facteurs peuvent influencer la sensibilité de la PCR, tels que la méthode utilisée pour l'extraction de l'ADN, les conditions de conservation des phlébotomes, ainsi que le nombre de copies et de la variabilité génétique de la séquence d'ADN à amplifier, tels que l'ITS1, l'ITS2 et l'ADNk (Cabrera *et al.*, 2002; Paiva *et al.*, 2007; Tateng *et al.*, 2018; Resadore *et al.*, 2019; Gherbi *et al.*, 2020). La mise en pools mono-spécifiques est fréquemment utilisée dans les tests PCR pour réduire les coûts et le traitement d'un plus grand nombre d'échantillons (Bowles *et al.*, 2015). Cependant, Alten *et al.* (2015) préviennent que la mise en pools peut également diminuer la sensibilité de détection globale à un taux aussi faible. En revanche, la simple détection de l'ADN leishmanien chez une espèce donnée de phlébotome par PCR, à elle seule, ne permet pas d'affirmer qu'elle est vectrice de cette espèce de *Leishmania*. Le taux d'infection est très variable selon les foyers; il pourrait

être très faible (< 15%) dans certains foyers endémiques (Zoghiami *et al.*, 2014; Barhoumi *et al.*, 2016; Bravo-Barriga *et al.*, 2016; Vahabi *et al.*, 2016; Calzolari *et al.*, 2019; Salah *et al.*, 2020), comme il pourrait être plus élevé dans d'autres, atteignant plus de 50% (Rossi *et al.*, 2008; Jiménez *et al.*, 2013). Néanmoins, plusieurs études réalisées dans différents foyers endémiques ont révélé l'absence de l'infection à *Leishmania* (0%) chez de nombreuses espèces de phlébotomes (El Sawaf *et al.*, 2016; Hadj-Slimane, 2018; Yared *et al.*, 2019).

En plus de leur rôle major dans la transmission des leishmanioses, différentes espèces de phlébotomes sont également connues pour être des vecteurs compétents d'un grand nombre d'arbovirus comme par exemple: le virus Toscana, le virus Sicilien ou le virus Naples. Cependant, mis à part le virus Toscana qui a un tropisme pour le système nerveux central et entraîne des cas de méningites d'encéphalites, les autres virus actuellement connus pour être transmis par les phlébotomes causent généralement des symptômes modérément sévères (Fontenille *et al.*, 2009; Alkan *et al.*, 2013). La bartonellose, ou maladie de Carrión, est une infection bactérienne due à *Bartonella bacilliformis* qui est également transmise par les phlébotomes (principalement *L. verrucarum* et *L. columbiana*). Elle est localisée dans environ 145 000 km<sup>2</sup> de régions montagneuses (600-3200 m) des Andes (Pérou, Colombie, Équateur), où elle s'exprime sous deux formes cliniques différentes. La forme aiguë est appelée fièvre de Oroya. Il s'agit d'une anémie hémolytique, fébrile, grave voire mortelle en l'absence de traitement (dans 88% des cas). La forme chronique est appelée verruga péruvienne. Il s'agit d'une éruption cutanée verruqueuse, bénigne (Depaquit et Léger, 2017). La transmission vectorielle de ces agents infectieux est toujours négligée par rapport à la leishmaniose (Bates *et al.*, 2015).

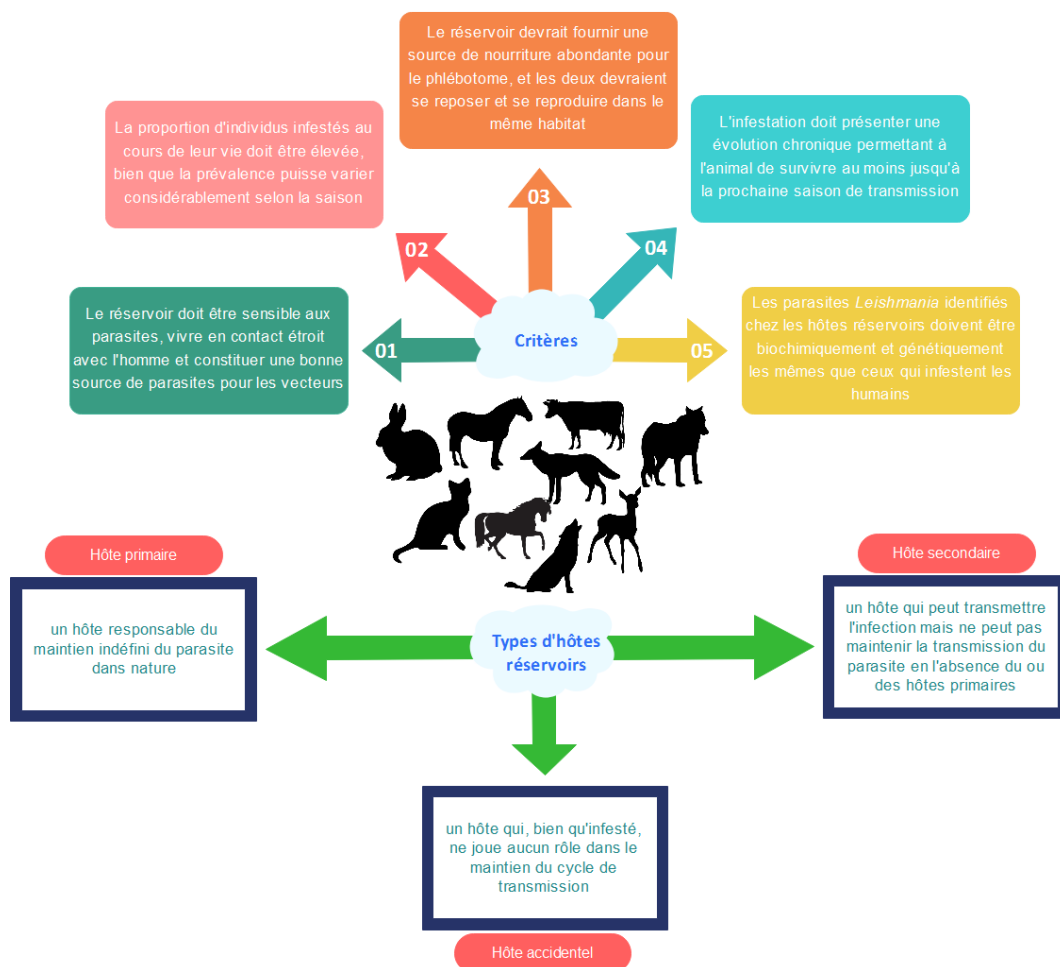
### **I.1.5. Hôtes réservoirs**

Les hôtes réservoirs jouent un rôle très important dans le maintien du cycle parasitaire de *Leishmania*. Selon la source de l'infestation humaine, on peut distinguer deux grandes catégories de la maladie: les leishmanioses zoonotiques pour lesquelles les hôtes réservoirs sont des animaux sauvages et des animaux commensaux ou domestiques, et les leishmanioses anthroponotiques pour lesquelles l'hôte réservoir est constitué par l'Homme. Bien que chaque espèce de *Leishmania* se range généralement dans l'une ou l'autre de ces catégories, il existe tout de même des exceptions où les espèces anthroponotiques (ex., *L. tropica*) provoquent des transmissions zoonotiques (OMS, 2011).

Une espèce déterminée de *Leishmania* peut parasiter des hôtes appartenant à différents groupes et inversement un hôte peut être parasité par différentes espèces de *Leishmania* (Quinnell et Courtenay, 2009). Selon la région concernée et le type de transmission, un grand

nombre d'hôtes réservoirs, appartenant à divers ordres taxonomiques, peuvent être distingués: les carnivores, les rongeurs, les marsupiaux, les édentés, les périssodactyles et les primates. Dans certains cas, l'homme est l'unique réservoir du parasite (Dedet, 2009).

Un hôte réservoir de *Leishmania* est un animal chez lequel un agent infectieux survit de manière persistante de telle sorte que l'animal peut servir de source de parasites aux vecteurs. La simple présence d'une infestation chez une espèce donnée de mammifère, même lorsqu'elle touche un grand nombre de sujets, n'indique pas forcément que l'espèce en question constitue un hôte réservoir (OMS, 2011). La figure 14 résume les différents types connus d'hôtes réservoirs et les différents critères utiles pour les incriminer dans la transmission des leishmanioses.



**Figure 14:** Schéma représentant les différents types connus d'hôtes réservoirs et les différents critères utiles dans l'incrimination d'un hôte réservoir dans la transmission des leishmanioses.

D'après Ashford, 1996, Maia *et al.* 2018.

### I.1.6. Lutte contre la leishmaniose

Il y a rarement eu tentative systématique de contrôler la transmission des leishmanioses et encore plus rarement une évaluation efficace. Il n'y a donc pas de procédure standard pour le contrôle de toute forme de leishmaniose. La mesure de contrôle minimale

recommandée par l'OMS pour toutes les formes de la maladie est la mise en place d'une stratégie de surveillance efficace pour la détection et le traitement des cas. Cela doit être accompagné d'un système efficace de rapports et d'enregistrement. La lutte antivectorielle et, dans la mesure du possible, le contrôle des animaux réservoirs, constituent l'un des volets de la prophylaxie (OMS, 2011).

Le diagnostic de l'infection à *Leishmania* représente un point critique de la lutte contre cette maladie. Dans un rapport de 2010, l'OMS a listé les différentes méthodes de diagnostic mises en place pour combattre les leishmanioses. Bien que ces méthodes soient variées et différentes, elles ne sont pas toujours adaptées aux moyens des praticiens hospitaliers dans les zones d'endémies, généralement pauvres et sous-équipées en ce qui concerne le matériel requis. De manière générale, ces techniques reposent sur l'observation du parasite, la détection de son ADN ou d'anticorps spécifiques de *Leishmania* dans les échantillons cliniques. Ainsi, les biopsies réalisées à partir d'aspirations de moelle osseuse, du foie ou ganglions lymphatiques sont utilisées dans les cas suspectés de LVs. Les biopsies directes de la peau au niveau de lésions cutanées sont employées dans le cas des LCs. Dans les deux cas, le matériel biologique collecté pourra être examiné directement sous microscope après étalement sur lame, être cultivé pour identification subséquente, ou soumis à des techniques de PCR. L'observation directe des parasites nécessite leur coloration au Giemsa et permet la visualisation directe des parasites sous leur forme amastigote intracellulaire. Elle demeure la technique de choix en zone d'endémie en raison de son faible coût mais requière une bonne expérience en plus de sa sensibilité relativement variable et de son incapacité à distinguer les espèces de *Leishmania*. La culture des parasites, relativement longue, permettra cependant la caractérisation de l'espèce par la technique d'électrophorèse iso-enzymatique ou par PCR. Il existe également deux méthodes sérologiques standardisées et commercialement disponibles pour l'usage «sur le terrain». Il s'agit du test dit «d'agglutination directe» (DAT, Direct Agglutination Test) et du test dénommé «test rK39» (Moreira, 2011; OMS, 2011).

Étant une maladie de pauvreté, le manque d'investissement dans les vaccins contre la LH a entravé leur développement et les vaccins candidats actuels sont encore à l'étude (Singh et Sundar, 2012). Un bon vaccin doit induire un niveau d'immunité protecteur sur le site approprié et cette réponse immunitaire doit avoir une durée adéquate. Il doit aussi être tolérable à l'administration et adapté à la population de façon durable, car les différentes populations peuvent différer génétiquement dans leur réponse. Des progrès récents en immunologie révèlent des facteurs clés dans la protection contre de nombreuses maladies et facilitent la conception des vaccins. Cependant, et malgré les connaissances considérables sur

la réponse immunitaire contre les parasites *Leishmania*, il n'existe actuellement aucun vaccin sûr et efficace contre la LH (Kobets *et al.*, 2012). Un essai d'inoculation de parasites virulents de *L. major* (Leishmanisation) a été tenté sur des personnes vivant dans des régions endémiques afin de les protéger contre la LC. Ce n'est pas un vaccin au sens conventionnel, même si les cultures étaient moins virulentes que les formes inoculées par le phlébotome. Cette pratique a été interrompue en raison de développement de lésions primaires sévères (Nadim *et al.*, 1997).

En l'absence de vaccin efficace contre la leishmaniose, le contrôle de cette maladie est directement lié aux agents chimiothérapeutiques. Le traitement de première ligne pour soigner cette infection est constitué des dérivés de l'antimoine pentavalent, tandis que les traitements de seconde ligne incluent la pentamidine, l'amphotéricine B, la paromomycine et la miltéfosine. Des problèmes liés à la résistance, à la toxicité et aux coûts élevés de ces traitements mettent en évidence le besoin criant de nouvelles molécules thérapeutiques (Díaz et Ponte-Sucre, 2018).

D'autre part, la lutte antivectorielle est difficile, les biotopes larvaires de phlébotomes restent peu connus, innombrables et de petite taille. De ce fait, la lutte se focalise principalement contre les insectes adultes (Depaquit et Léger, 2017). Avant de développer des mécanismes de lutte contre ces insectes, une connaissance adéquate de l'épidémiologie locale de la maladie, ainsi que l'espèce vectorielle en cause, son habitat, sa distance franchissable en vol, ses préférences trophiques, ses lieux de repos, ses rythmes circadiens et sa saisonnalité doivent être prises en compte. Les méthodes de lutte actuellement disponibles contre les phlébotomes sont principalement la lutte chimique, l'aménagement de l'environnement et une prophylaxie individuelle (OMS, 2011).

Les phlébotomes sont très sensibles aux insecticides mais ces derniers peuvent induire une résistance acquise. Les pulvérisations intradomiciliaires et péri-domestiques d'insecticides rémanents ainsi que l'utilisation de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes ont donné de meilleurs résultats surtout dans les foyers de leishmaniose anthroponotique lorsque les vecteurs sont endophiles (Depaquit et Léger, 2017). Cependant, l'utilisation potentielle des moustiquaires pour lutter contre les phlébotomes en Afrique du Nord et de l'Ouest est compliquée par le fait qu'il fait trop chaud pendant l'été pour dormir sous les filets à mailles fines qui réduisent la ventilation (Kimutai *et al.*, 2009). Dans les pays restreints en ressources financières, la lutte antivectorielle par pulvérisation d'insecticides sur les maisons n'est pas durable en raison des contraintes logistiques et des coûts élevés (Bates *et al.*, 2015).

Les mesures préventives pour la protection contre les piqûres de phlébotomes sont principalement d'éviter les activités de plein air, en particulier du crépuscule à l'aube, et d'appliquer du DEET (N, N-diéthyl-méta-toluamide) contenant des insectifuges sur la peau exposée et sur les vêtements. Le port de pantalons et de chemise à manche longues dès la tombée du jour est aussi recommandé. Les phlébotomes sont des insectes faibles et, par conséquent, leur mouvement peut être inhibé par les ventilateurs. Dormir dans des zones climatisées ou bien tamisées est donc conseillé. Les voyageurs dans les zones d'endémie doivent être informés de ces conseils cruciaux afin d'éviter la contraction de la maladie (Pavli et Maltezou, 2010).

De même, le contrôle d'animaux réservoirs par la gestion de l'environnement est coûteux et difficile à mettre en œuvre. Dans les zones de transmission zoonotique canine, l'absence d'euthanasie des chiens infectés empêche l'élimination du réservoir de *Leishmania*. Les colliers imprégnés d'insecticide pour les chiens de compagnie peuvent donc les protéger contre l'acquisition de la leishmaniose (Pace, 2014). Plusieurs vaccins contre la LCan ont été homologués depuis 2004, deux au Brésil (Leishmune<sup>®</sup> et Leish-Tec<sup>®</sup>) et deux en Europe (CaniLeish<sup>®</sup> et LetiFend<sup>®</sup>), mais un vaccin efficace disponible dans le monde entier fait toujours défaut. Ces vaccins ont été principalement conçus pour atténuer les manifestations graves de la maladie et leur impact potentiel sur la transmission est encore inconnu (Velez et Gállego, 2020). Pour les rongeurs réservoirs, plusieurs méthodes de lutte sont disponibles ; la destruction de terriers en labourant le sol, l'empoisonnement de gerbilles en mélangeant du phosphore de zinc à des graines de céréales et de l'huile végétale, l'arrachage de la végétation d'halophytes et le ramassage régulière des ordures ménagères (OMS, 2011). Bien que certaines de ces méthodes aient montré certains avantages dans de nombreux pays en réduisant l'incidence de la leishmaniose (Kamhawi, 1993; Cherif *et al.*, 2012), leur application reste malheureusement limitée en raison de nombreuses contraintes et difficultés.

## **I.2. Les leishmanioses et les phlébotomes en Algérie**

### **I.2.1. Les leishmanioses en Algérie**

#### **I.2.1.1. Types de leishmanioses**

##### **I.2.1.1.1. Leishmanioses humaines**

L'Algérie, comme la plupart des pays circumméditerranéens, est un foyer endémique à la fois pour les formes cutanées et viscérales. Depuis les années 1980 et grâce à l'introduction d'outils biochimiques et moléculaires, de nombreuses équipes de recherche ont tenté d'étudier l'épidémiologie de la leishmaniose dans de nombreuses régions du pays afin de mieux

comprendre la structure des différents foyers de *Leishmania*. Les différents efforts déployés, notamment la caractérisation des souches de parasites, l'identification des hôtes réservoirs et des phlébotomes vecteurs, ont conduit à une description bien détaillée des profils épidémiologiques de chacune des deux formes cliniques (Chaara *et al.*, 2014).

#### **I.2.1.1.1.1. Leishmaniose cutanée**

Trois entités nosoépidémiologiques distinctes de LC coexistent en Algérie : la forme dite du nord (LCN) ou sporadique (LCS), la forme zoonotique (LCZ) et la forme chronique (LCC) ou anthroponotique (LCA) (Aoun et Bouratbine, 2014; Bachi *et al.*, 2019).

La LCZ due à *L. major*, également nommée «clou de Biskra», est la plus ancienne forme de leishmaniose signalée en Algérie. Elle a été décrite pour la première fois en 1860 par Hamel à Biskra (Benikhlef *et al.*, 2021). Toutes les souches isolées du réservoir, de l'Homme et du vecteur sont identiques et sont identifiées biochimiquement comme étant *L. major* MON-25 (Izri *et al.*, 1992; Belazzoug, 1983, 1986; Boudrissa *et al.*, 2012). Cependant, un nouveau zymodème moins répandu, le MON-269, a également été identifié et diffère du MON-25 par le système enzymatique PGD (phosphogluconate déshydrogénase) (Pratlong *et al.*, 2009). *L. major* est de loin l'espèce la plus fréquente en Algérie, avec plus de 90% des cas de LC enregistrés (Aoun et Bouratbine, 2014).

*L. major* a un cycle de transmission zoonotique (Figure 15). Le rat des sables *Psammomys (P.) obesus* et la gerbille *Meriones (M.) shawi* sont les principaux hôtes réservoirs (Belazzoug, 1983, 1986). Récemment, une infection naturelle par *L. major* a été rapportée chez des spécimens de deux espèces de hérissons (*Atelerix algirus* et *Paraechinus aethiopicus*) collectés à M'sila, suggérant leur rôle potentiel en tant qu'hôtes réservoirs de la LCZ (Tomás-Pérez *et al.*, 2014). *P. papatasi* est la seule espèce de phlébotome incriminée dans la transmission de *L. major* (Izri *et al.*, 1992).

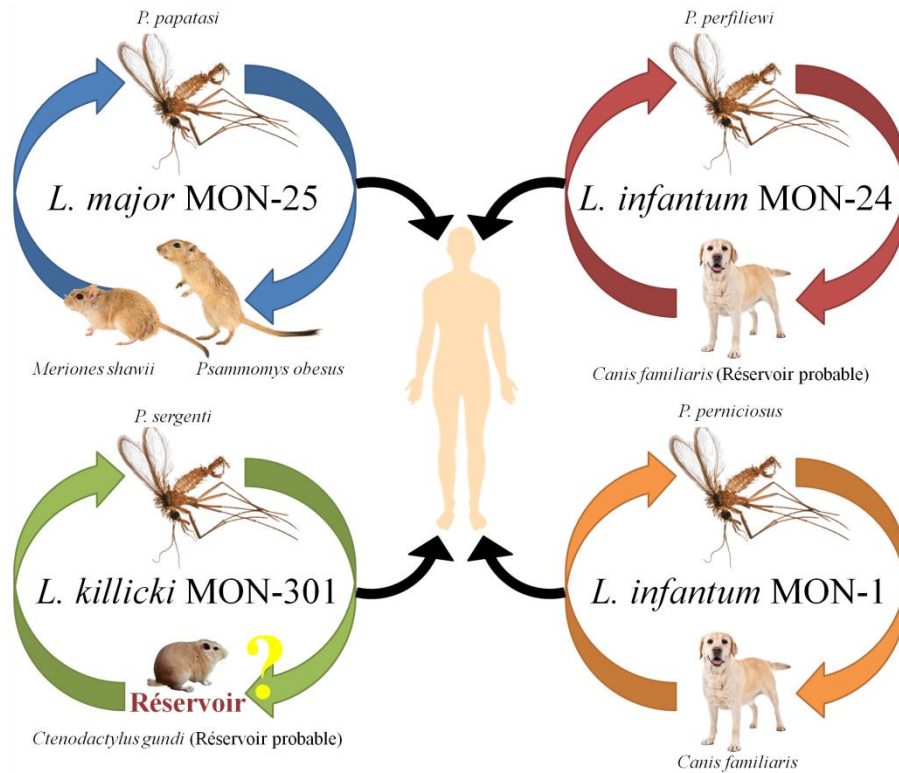
La LC à *L. major* sévit à l'état endémo-épidémique sur toute la frange nord-saharienne correspondant à l'étage bioclimatique aride et semi-aride (Figure 16). Les foyers anciennement connus sont ceux de Biskra à l'Est et d'Abadla à l'Ouest. Depuis les années 1980, plusieurs foyers sont apparus, à savoir ceux d'El Oued, M'Sila, Ksar Chellala, Ghardaïa, Béchar, Laghouat, Batna, Médéa, Tiaret et Bordj Bou Arreridj (Harrat *et al.*, 1996; Bachi, 2006). Récemment, plusieurs études menées au nord de l'Algérie ont indiqué, de manière surprenante, la détection de *L. major* au sein des isolats de patients atteints de LC, suggérant probablement une propagation de la LCZ vers le nord (de Monbrison *et al.*, 2007; Boudrissa *et al.*, 2012; Mansouri *et al.*, 2012; Beldi *et al.*, 2017; Izri *et al.*, 2021).

La deuxième forme est la LC anthroponotique ou chronique due à *L. killicki*. Elle a été décrite pour la première fois au Maghreb en 1986 dans le sud tunisien (Rioux *et al.*, 1986). En Algérie, *L. killicki* a été identifiée pour la première fois à Ghardaïa, lors d'une épidémie survenue en 2005 et qui a fait 2040 cas. A cet endroit, *L. killicki* coexiste en sympatrie avec *L. major* MON-25. En termes de variabilité isoenzymatique, seuls deux zymodèmes différant par l'enzyme malique ont été détectés à ce jour, tous isolés de cas de LC humaine: *L. killicki* MON-301 à Ghardaïa et *L. killicki* MON-306 à Annaba. L'incidence annuelle reste inconnue mais on estime qu'elle cause moins de 100 cas par an (Harrat *et al.*, 2009; Mansouri *et al.*, 2012).

À ce jour, aucun hôte réservoir n'a encore été identifié. A Ghardaïa, Harrat *et al.* (2009) ont souligné que les cas humains de LC liés à *L. killicki* sont exclusivement concentrés dans les villes surpeuplées où plusieurs patients sont souvent issus de la même famille, indiquant une transmission probable de la maladie d'une personne à une autre. En 2011, Boubidi et ses collaborateurs ont prouvé le rôle vectoriel de *P. sergenti* dans la transmission de *L. killicki* dans le foyer de Ghardaïa (Figure 15). Les études entomologiques réalisées par la même équipe de recherche ont démontré la prédominance de cette espèce de phlébotome dans les sites sylvatiques du foyer étudié. Fait intéressant, plus de 99% des *P. sergenti*, dont trois femelles infectées par *L. killicki*, ont été capturés dans des endroits rocheux à proximité des terriers des gundis (*Massoutiera mzabi*). Cette découverte suggère que la LC algérienne due à *L. killicki* est une maladie zoonotique (Boubidi *et al.*, 2011).

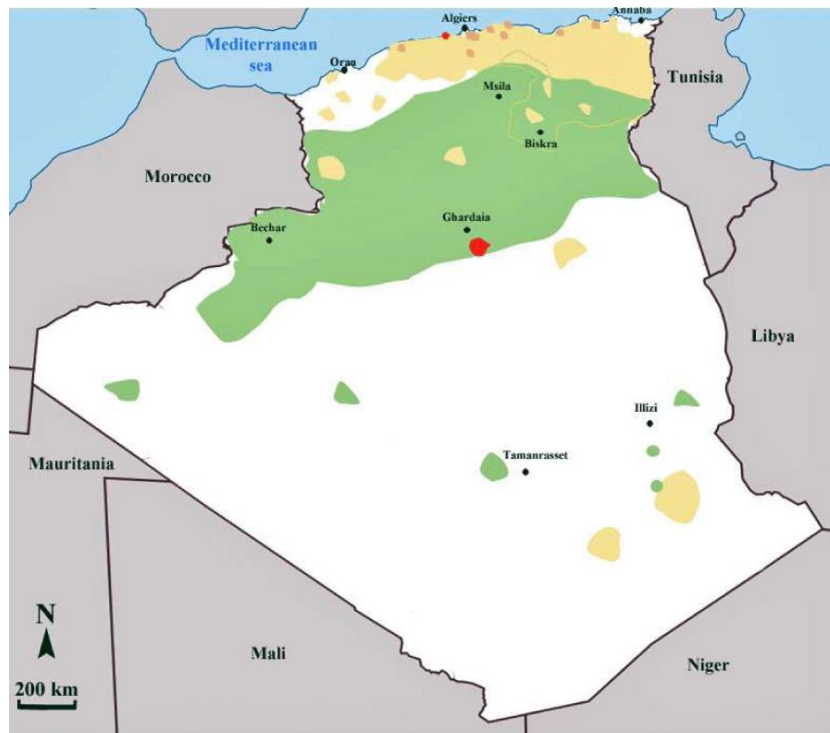
En dehors du foyer principal de la maladie (Ghardaïa, Figure 16), quelques cas de LC attribués au *L. killicki* ont également été signalés récemment chez des patients originaires de nombreuses wilayas du nord, à savoir : Tipaza, Annaba et Constantine (Mihoubi *et al.*, 2008; Mansouri *et al.*, 2012; Beldi *et al.*, 2017; Bachi *et al.*, 2019; Izri *et al.*, 2014, 2021). Étonnamment, une étude plus récente, réalisée dans un foyer hypoendémique de LC dans le sud de Sétif, a montré la présence de l'ADN de *L. tropica* chez une femelle de *P. perniciosus* et non chez le vecteur habituel (Gherbi *et al.*, 2020), soulevant plusieurs questions sur le rôle potentiel de ce phlébotome dans la transmission du parasite dans ce foyer. Dans leurs études expérimentales, Vaselek et Volf (2019) ont indiqué un rôle potentiel de *P. perniciosus* en tant que vecteur de *L. tropica* et dans la circulation de ce parasite dans des foyers endémiques en Europe, au Moyen-Orient et en Afrique du Nord.

Outre les espèces dermatropes *L. major* et *L. killicki*, l'espèce viscérotrope *L. infantum* est également impliquée dans la LC en Algérie et à l'origine de la LCS du nord.



**Figure 15:** Cycles de transmission des principaux zymodèmes dermatropes et viscérotropes de *Leishmania* spp. en Algérie.

Source : D'après Belazzoug (1982, 1983), Izri *et al.* (1992), Izri et Belazzoug (1993), Benikhlef *et al.* (2004), Harrat *et al.* (2009), Boubidi *et al.* (2011), Boudrissa *et al.* (2012), Izri *et al.* (2021).



**Figure 16:** Distribution de la LC et la LV en Algérie : (\*) *L. major* LC, (\*) *L. infantum* LV, (\*) *L. infantum* LC, (\*) *L. killicki* LC (Eddaikra *et al.*, 2017).

Il s'agit d'une forme ancienne de LC puisque déjà décrite depuis 1923 dans la région de Mila (Izri et Belazzoug, 2007). Les caractéristiques parasitologiques et clinico-épidémiologiques liées à cette infection ont été individualisées par Belazzoug *et al.* (1985). L'analyse isoenzymatique des souches de *L. infantum* a révélé l'existence de plusieurs zymodèmes, y compris MON-1, MON-24 et MON-80. Cependant, c'est le zymodème MON-24 qui est le plus fréquemment isolé des lésions cutanées (Harrat *et al.*, 1996).

La transmission du parasite est assurée par *P. perfiliewi*, trouvé naturellement infecté par le variant enzymatique *L. infantum* MON-24 dans la localité de Ténès, foyer actif de LCN (Izri et Belazzoug, 1993). Le chien est un réservoir probable de cette espèce dermatrope (Figure 15) (Benikhlef *et al.*, 2004).

La LCS se répartit en semis tout le long du littoral et du Tell algériens (Figure 16) et sa distribution géographique se confond avec celles de la LV et de la LCan. Tizi Ouzou, Boumerdès, Bouira, Béjaïa, Mila, Jijel, Constantine et Ténès sont les foyers les plus touchés. Une extension de la maladie vers le nord-ouest (Tlemcen, Oran) et le nord-est (Sétif, Annaba et Collo) y a été rapportée (Harrat *et al.*, 1995). Quelques cas sporadiques dus à *L. infantum* ont également été signalés dans les régions arides du pays; c'est le cas de Biskra (Harrat *et al.*, 1996) et d'El Oued (Beldi *et al.*, 2017). On estime le nombre de nouveaux cas liés à *L. infantum* à 200 cas par an (Harrat *et al.*, 1995).

#### **1.2.1.1.1.2. Leishmaniose viscérale**

La LV en Algérie est connue depuis plusieurs décennies. Le premier cas a été décrit par Lemaire en 1911 (Charaa *et al.*, 2014). L'identification isoenzymatique des souches isolées chez des patients infectés a révélée la présence de divers zymodèmes appartenant au même taxon «*L. infantum*»; MON-1, MON-24, MON-33, MON-34, MON-78, et MON-80. *L. infantum* MON-1 est le plus dominant, qui se transmet par *P. perniciosus* (Bachi, 2006). Les vecteurs de nombreux autres zymodèmes restent encore inconnus. Récemment, le rôle probable de *P. longicuspis* dans la transmission de *L. infantum* a été suggéré après la détection de l'ADN de ce parasite chez une femelle capturée dans un foyer endémique de LV (Berdjane-Brouk *et al.*, 2012).

Le réservoir du parasite est le chien malade ou porteur sain (Ait-Oudhia *et al.*, 2009). Récemment, en Kabylie, l'isolement du *L. infantum* chez un chacal doré (*Canis aureus*) et de l'ADN parasitaire chez un âne et un cheval ont en fait également des réservoirs potentiels de la maladie (Bessad *et al.*, 2012; Medkour *et al.*, 2019). Une récente étude réalisée sur des chats sauvages de la région d'Alger révèle 17% des chats séropositifs par IFAT, 22,42% par ELISA

et 36,6% positifs par qPCR, suggérant ainsi un rôle probable pour l'espèce féline dans la chaîne épidémiologique de *L. infantum* (Mohamed-Cherif *et al.*, 2022).

#### **I.2.1.1.2. Leishmaniose canine**

La LCan, due à *L. infantum*, a été signalée pour la première fois en Algérie en 1910. Le polymorphisme enzymatique du parasite est considérable; *L. infantum* MON-1, MON-24, MON-34, MON-77 et MON-281. Le zymodème MON-1 est dominant (Harrat *et al.*, 1996; Ait-Oudhia *et al.*, 2009).

La LCan a une vaste répartition géographique en Algérie (Bachi, 2006). Cependant, elle sévit particulièrement dans le nord du pays (Harrat *et al.*, 1996; Adel *et al.*, 2015; Medkour *et al.*, 2019a). Le taux de séropositivité chez les sujets asymptomatiques peut atteindre plus de 50% dans certains cas (Ait-Oudhia *et al.*, 2009). Les études menées dans notre pays ont montré la prédominance de l'amaigrissement et des lésions cutanées comme signes cliniques les plus courants de la maladie (Harrat et Belkaid, 2003; Ait-Oudhia *et al.*, 2009). Les chiens errants et ceux qui restent à l'extérieur durant la nuit ou qui vivent dans des zones de végétation dense ont montré un risque relativement élevé d'infection par *L. infantum* (Ait-Oudhia *et al.*, 2009; Adel *et al.*, 2010).

#### **I.2.1.2. Incidence et répartition géographique**

##### **I.2.1.2.1. Leishmanioses humaines**

L'Algérie se compte parmi les pays les plus touchés par les leishmanioses dans le monde (Alvar *et al.*, 2012). La population au risque de contracter l'infection est importante et a considérablement augmenté avec l'évolution démographique de la population algérienne au cours des 30 dernières années (Eddaikra *et al.*, 2018).

##### **Leishmaniose cutanée**

L'Algérie est le deuxième plus grand foyer de la LC au monde (Alvar *et al.*, 2012). Historiquement, l'incidence de la maladie était relativement faible et son aire de répartition était principalement limitée à certaines régions du pays, notamment Biskra à l'Est et Abadla à l'Ouest. Cependant, depuis les années 1980, une augmentation significative et alarmante de l'incidence de la LC associée à son extension géographique au nord et au sud du pays a été observée, déclarant, en conséquence, la leishmaniose comme un problème majeur de santé publique (Aoun et Bouratbine, 2014).

Dans une récente étude épidémiologique portant sur la LC en Algérie, Benikhlef *et al.* (2021) ont rapporté que plus d'un quart de million de cas de LC (252 659) ont été enregistrés dans le pays sur une période de 34 ans (de 1982 à 2017), ce qui équivaut à un taux d'incidence

de 1372 cas pour 100 000 habitants. Durant la même période, la dynamique de la LC a révélé un statut endémo-épidémique avec plusieurs pics observés, le plus critique étant celui de 2005 avec plus de 25 500 cas recensés (Figure 17), correspondant à une incidence de 78,68 cas pour 100 000 habitants. Les autres pics enregistrés sont ceux de 1983, 1997, 2010 et 2017 avec une incidence de 30,47, 34,18, 58,41 et 28,19 cas pour 100 000 habitants, respectivement (Eddaikra *et al.*, 2018; Benikhlef *et al.*, 2021).

Les régions les plus touchées par la LC (Figure 18a) se situent dans les steppes des zones subsahariennes (Eddaikra *et al.*, 2018). Selon Benikhlef *et al.*, cinq wilayas à savoir Béchar, El Oued, Batna, Biskra et M'Sila ont enregistré ensemble plus de 70% du total des cas déclarés au cours de la période 1982-2017, avec plus de 10 000 cas recensés pour chacune de ces cinq wilayas. Les mêmes auteurs ont souligné que huit wilayas voisines (Batna, Biskra, Bouira, Djelfa, Sétif, Médéa, M'sila et Bordj Bou Arreridj) représentaient ensemble 74,5% du total des cas de LC déclarés. De plus, deux de ces huit wilayas (M'sila et Biskra) comptaient à elles seules 37,22% des cas recensés dans le pays. La plus forte incidence de LC par wilaya a été enregistrée en 2005 à Biskra, avec plus de 1349 cas pour 100 000 habitants, suivie de celle de M'sila en 1982 avec 875,75 cas pour 100 000 habitants (Benikhlef *et al.*, 2021).

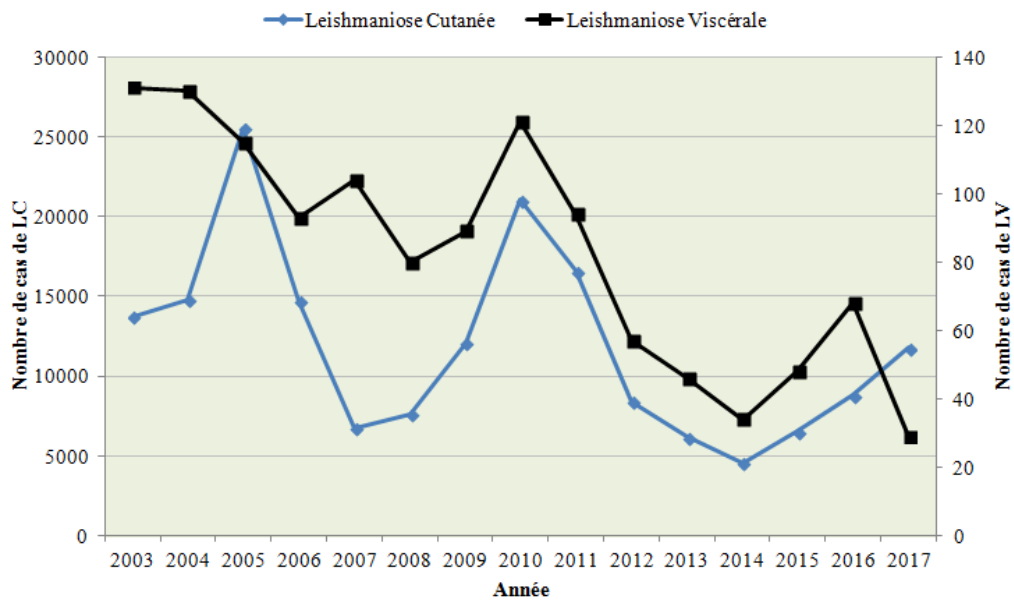
En Algérie, l'endémicité de la LC est observée durant les douze mois de l'année, avec des taux plus élevés en automne et en hiver. Concernant la répartition par âge, ce sont surtout les enfants de moins de 9 ans et les jeunes adultes qui sont les plus touchés (Benelmouffok *et al.*, 2017).

### **Leishmaniose viscérale**

Dès sa première description dans le pays, les atteintes viscérales dues à *L. infantum* ne cessent d'apparaître. Les enquêtes menées sur cette infection durant les périodes 1911-1933, 1965-1974, 1975-1984 et 1985-1990 ont rapportées respectivement 18, 497, 721 et 1121 cas de LV (Bachi, 2006). Une étude récemment publiée par Eddaikra *et al.* (2018) a montré que plusieurs pics de LV ont été enregistrés en Algérie durant la période 1980-2013, étant celui de 1998 le plus important avec 310 cas. Selon la même étude, le taux d'incidence de la LV est passé de 0,23 en 1980 à 1,02 cas pour 100 000 habitants en 1998. Puis, à partir de 2010, une baisse importante du taux d'incidence a été notifiée, passant de 0,34 en 2010 à 0,12 et 0,07 cas pour 100 000 habitants en 2013 et 2017, respectivement (INSP, 2017; Eddaikra *et al.*, 2018).

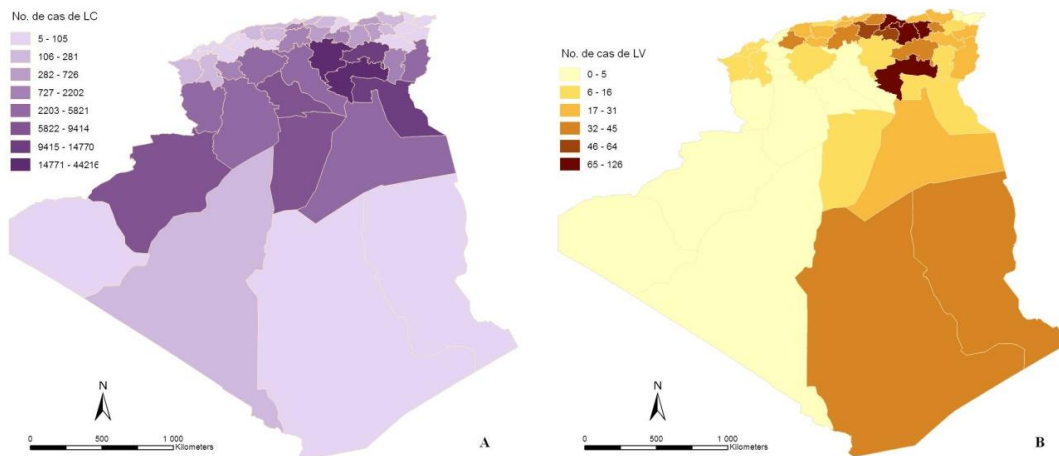
L'ancien foyer de la LV est celui de la Grande Kabylie (Tizi Ouzou et Béjaïa). Une extension de la maladie vers de nombreuses régions du nord (ex., Jijel, Constantine, Mila, Tlemcen, Blida, Chlef) et du sud du pays (ex., Tassili N'Ajjer) a été notée, liée notamment au déplacement du réservoir canin et aux changements environnementaux. Bien que la LV a une

large répartition géographique en Algérie, elle reste cependant une maladie des zones humides et subhumides du nord du pays (Figure 18b), correspondant à la LCan (Harrat *et al.*, 1995; Adel *et al.*, 2014). L'étude publiée récemment par Eddaikra *et al.*, se basant sur les cas de LV signalés de 1994 à 2013, a indiqué que la région de Tell est celle qui a enregistré le nombre le plus important de cas. Selon la même étude, une résurgence de cas de LV a été notée dans le sud-est du pays (Tamanrasset), tandis que dans les anciens foyers du nord du pays, il y a eu une baisse notable du nombre de cas. En effet, l'incidence est tombée de 1,55 et 0,79 cas pour 100 000 habitants durant la période 1994-2003 pour Tizi Ouzou et Bouira, respectivement, à 1,43 et 0,28 cas durant la période 2004 à 2013. Dans d'autres régions, particulièrement dans le nord-ouest du pays et dans certaines wilayas du sud, la situation a radicalement changé, avec une absence totale de notification de cas ces dernières années (Eddaikra *et al.*, 2018).



**Figure 17:** Evolution du nombre de cas de LC et LV entre 2003 et 2017 en Algérie.

Source : D'après l'INSP : <http://www.insp.dz/index.php/Non-categorise/rem.html>.



**Figure 18:** Répartition géographique de cas de LC (A) et LV (B) en Algérie (2003-2017).






Source : D'après l'INSP : <http://www.insp.dz/index.php/Non-categorise/rem.html>.

L'endémicité de la LV est observée durant toute l'année, avec des pics de notification de cas en mai et en juin. Cette maladie a une forme infantile dans le pays, affectant principalement les enfants de moins de cinq ans (Adel *et al.*, 2014).

#### I.2.1.2.2. Leishmaniose canine

Bien que la LCan soit présente à travers tout le pays, les proportions de chiens infectés varient selon les conditions bioclimatiques (Harrat *et al.*, 1996). Les principaux foyers se trouvent dans le nord du pays. Les différentes études menées chez le chien, dont la majorité sont effectués dans le nord du pays, rapportaient une prévalence de la LCan variant entre 11 et 37% (Harrat et Belkaid, 2003; Ait-Oudhia *et al.*, 2009; Mouloua *et al.*, 2017; Medkour *et al.*, 2019a). A Alger, l'augmentation de la prévalence de la LCan est accompagnée d'une recrudescence des cas de LHs (Harrat et Belkaid, 2003). Les résultats de quelques enquêtes sur la LCan réalisées en Algérie sont résumés dans le tableau 3.

**Tableau 3:** Résultats de quelques enquêtes sur la LCan réalisées en Algérie.

Région	Période	Chiens examinés			Tests	Auteurs
		Total	Positifs	%		
Alger 	1990-1997	1800	666	37%	IFI	Harrat et Belkaid (2003)
	2005-2008	1810	454	25,1%	IFI et ELISA	Ait-Oudhia <i>et al.</i> (2009)
Tizi-Ouzou 	/	603	60	9,95%	IFI	Mouloua <i>et al.</i> (2017)
Bouira, Tizi-Ouzou et Sétif 	Juin-2018	214	74	34,5%	IFI, Witness <sup>®</sup> <i>Leishmania</i> , PCR	Medkour <i>et al.</i> (2019)
Bouira 	Mars-Avril 2019	94	9	10%	IFI	Bellatreche <i>et al.</i> (2021)
			17	18%	ELISA	
			3	3%	qPCR	
Tlemcen, Mostaganem, Tipaza, Boumerdes, Bejaia et Jijel 	Février 2008-Février 2009	2184	/	11-38%	IFI et DAT	Adel <i>et al.</i> (2015)

### I.2.2. Les phlébotomes d'Algérie

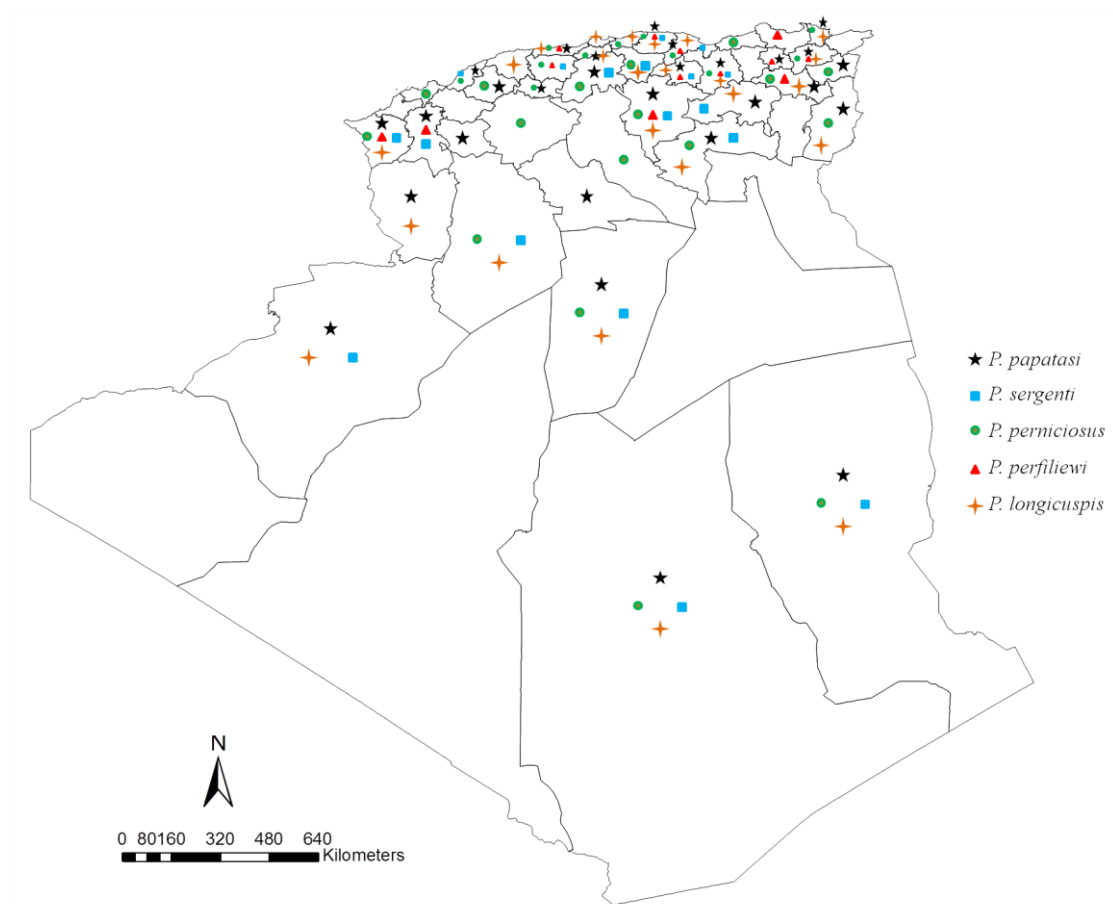
L'étude des phlébotomes en Algérie a commencé au début du siècle dernier lorsque Foley et Leduc, en 1912, signalaient pour la première fois la présence de ces insectes dans le pays (Dedet *et al.*, 1984).

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. Des recherches détaillées dans l'ensemble du territoire algérien, ainsi que, des découvertes capitales concernant tant leur systématique que leur pouvoir pathogène y ont été réalisées. L'étude menée par Dedet et ses collaborateurs (1984) de 1972 à 1976 a contribué à une connaissance approfondie de la faune des phlébotomes présente en Algérie, en fournissant une description morphologique détaillée des espèces recensées ainsi que leur répartition géographique et écologique. Cette étude, ainsi que certaines études ultérieures ont également contribué à lever le voile sur de nouvelles espèces de phlébotomes en Algérie, y compris *P. langeroni* (Dedet *et al.*, 1984), *P. kazeruni* (Berchi *et al.*, 1986) et *P. mascittii* (Berdjane-Brouk *et al.*, 2011).

Ce jour, la faune phlébotomienne algérienne compte 24 espèces. Elles se répartissent en deux genres: *Phlebotomus* et *Sergentomyia* et 8 sous-genres (Tableau 4) (Benallal *et al.*, 2022), dont cinq espèces sont des vecteurs prouvés ou suspectés de leishmaniose dans le pays; *P. papatasi* (Izri *et al.*, 1992), *P. sergenti* (Boubidi *et al.*, 2011), *P. perfiliewi* (Izri et Belazzoug, 1993), *P. perniciosus* (Izri *et al.*, 1990) et *P. longicuspis* (Berdjane-Brouk *et al.*, 2012). Bien que la plupart des autres espèces du genre *Phlebotomus* soient des vecteurs avérés ou suspectés de *Leishmania* spp. dans d'autres pays, leur rôle de vecteur reste, jusqu'à présent, obscur et inconnu dans notre pays (Benallal *et al.*, 2022).

En Algérie, les phlébotomes sont répartis sur tout le territoire national, de l'étage humide au nord jusqu'à l'étage saharien au sud du pays (Benallal *et al.*, 2022). Pour les espèces vectrices, à l'exception de *P. perfiliewi*, qui se propage principalement dans le nord de l'Algérie, les quatre autres espèces vectrices ont une large distribution qui s'étend du nord jusqu'au sud du pays (Figure 19). Les facteurs liés au climat et à l'environnement ont un rôle majeur dans leur distribution et abondance (Dedet *et al.*, 1984; Benallal *et al.*, 2022). Sur la base des récentes prévisions de changement climatique, l'Afrique du Nord devrait devenir plus aride d'ici 2100 lorsque seules les parties côtières conserveront leur zone bioclimatique semi-humide. Ce scénario va entraîner probablement la disparition de certaines espèces de phlébotomes telles que *P. papatasi*, *P. alexandri*, *P. sergenti* et *P. ariasi*, alors que certaines espèces de la partie aride s'étendront plus au nord de leur distribution actuelle, contribuant

éventuellement à améliorer la transmission de divers agents pathogènes (Benallal *et al.*, 2022).



**Figure 19:** Carte de répartition des phlébotomes vecteurs de *Leishmania* spp. en Algérie: *P. papatasi*, *P. sergenti*, *P. perfliewi*, *P. perniciosus* et *P. longicuspis*.

Source : D'après Benallal *et al.* (2022).

**Tableau 4:** Liste des espèces de phlébotomes inventoriées en Algérie (Benallal *et al.*, 2022).

Sous-famille	Phlebotominae							
Genre	<i>Phlebotomus</i> Rondani et Berté 1840				<i>Sergentomyia</i> França et Parrot, 1920			
Sous-genre	<i>Phlebotomus</i> Rondani, 1843	<i>Transphlebotomus</i> Artemiev, 1948	<i>Paraphlebotomus</i> Theodor, 1948	<i>Larroussius</i> Nitzulescu, 1931	<i>Sergentomyia</i>	<i>Parrotomyia</i>	<i>Sintonius</i>	<i>Grassomyia</i>
Espèce	<i>P. papatasi</i> * (Scopoli, 1786)  <i>P. bergeroti</i> (Parrot, 1934)	<i>P. mascittii</i> (Grassi, 1908)	<i>P. alexandri</i> (Sinton, 1928)  <i>P. chabaudi</i> (Croset, Abonnenc et Rioux, 1970)  <i>P. sergenti</i> * (Parrot, 1917)  <i>P. kazeruni</i> (Theodor et Mesghali, 1964)  <i>P. riouxi</i> (Depaquit, Léger et Killick-Kendrick, 1998)	<i>P. perfiliewi</i> * (Parrot, 1930)  <i>P. langeroni</i> (Nitzulescu, 1930)  <i>P. ariasi</i> (Tonnoir, 1921)  <i>P. longicuspis</i> ** (Nitzulescu, 1930)  <i>P. perniciosus</i> * (Newstead, 1911)  <i>P. chadlii</i> (Rioux, Juminer et Gibily, 1966)	<i>S. antennata</i> (Newstead, 1912)  <i>S. fallax</i> (Parrot, 1921)  <i>S. minuta</i> (Adler et Theodor, 1927)  <i>S. schwetzi</i> (Adler, Theodor et Parrot, 1929)	<i>S. africana</i> subsp. <i>eremitis</i> (Parrot et de Jolinière, 1945)  <i>S. lewisi</i> (Parrot, 1948)	<i>S. christophersi</i> (Sinton, 1927)  <i>S. clydei</i> (Sinton, 1928)  <i>S. tiberiadis</i> (Adler, Theodor et Lourie, 1930)	<i>S. dreyfussi</i> (Parrot, 1933)

\* Espèce prouvée comme vecteur de *Leishmania* spp. \*\* Espèce suspectée comme vecteur de *Leishmania* spp.

---

# **Chapitre II**

## **Analyse de la situation épidémiologique de la leishmaniose cutanée dans la wilaya de Batna (nord-est) : Un foyer important en Algérie.**

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été publiés dans : Messahel *et al.* (2021) Vet.

Parasitol.: Reg. Stud. Rep.; 26; 100621. (ARTICLE 1)

---

## **II. Analyse de la situation épidémiologique de la leishmaniose cutanée dans la wilaya de Batna (nord-est): Un foyer important en Algérie.**

### **II.1. Introduction**

La leishmaniose, causée par des parasites protozoaires du genre *Leishmania*, est une maladie très répandue à transmission vectorielle (Desjeux, 2004). Elle est considérée comme un problème de santé publique dans de nombreuses régions du monde où elle touche près de 98 pays sur cinq continents (OMS, 2011). Selon Alvar *et al.* (2012) parmi les différents types de leishmaniose, la forme cutanée est de loin la plus répandue, avec environ 0,7 à 1,2 millions de nouveaux cas survenant chaque année dans le monde. C'est le plus souvent une maladie zoonotique qui affecte les animaux sauvages ou péri-domestiques comme les rongeurs et les canidés (Mokni, 2019).

L'Algérie, comme d'autres pays méditerranéens, est fortement concernée par ces zoonoses (Harrat *et al.*, 1995). Ces dernières, détiennent la première place parmi les maladies parasitaires et représentent 35% des maladies à déclaration obligatoire à l'échelle nationale (Mihoubi *et al.*, 2012). Les LCs sont connues de longue date pour sévir en Algérie, le premier cas fut découvert en 1860 par Henry Hamel dans le sud-est du pays (Khezzani et Bouchemal, 2017). Chaque année, des milliers de nouveaux cas de LC sont diagnostiqués en Algérie, ce qui met le pays à la deuxième place après l'Afghanistan en termes d'incidence de la maladie (Alvar *et al.*, 2012). Sur les 48 wilayas que compte le pays, 40 sont endémiques pour la LC, où environ 10 millions de personnes sont exposés à un risque élevé de contracter l'infection (OMS, 2015).

La LC est souvent désignée comme un groupe de maladies en raison du spectre varié de ses manifestations cliniques, qui vont de petits nodules cutanés à une destruction massive des tissus muqueux (Reithinger *et al.*, 2007). Trois entités nosoépidémiologiques distinctes de LC coexistent en Algérie : la forme dite du nord, ou sporadique (LCN), la forme zoonotique (LCZ) et la forme anthroponotique (LCA). Pour chacune de ces formes cliniques, on distingue une espèce différente de *Leishmania* avec un hôte (réservoir) et un vecteur (phlébotome) qui lui sont propre (Bachi *et al.*, 2019).

La leishmaniose est une maladie réémergente en Algérie (Benikhlef *et al.*, 2021). De nombreux facteurs, liés notamment aux changements climatiques ou environnementaux, ont grandement favorisé sa propagation en dehors de ses foyers naturels, ainsi que la survenue d'importantes épidémies affectant des milliers d'individus dans le pays (Harrat *et al.*, 2009; Boudrissa *et al.*, 2012; Khezzani et Bouchemal, 2017; Benikhlef *et al.*, 2021). La wilaya de

Batna, située au nord-est, est considérée comme l'une des régions les plus touchées par la LC dans notre pays, vu l'augmentation globale de l'incidence de la maladie (Benikhlef *et al.*, 2021). Comme c'est le cas pour d'autres régions d'Algérie, l'émergence de l'infection dans ce foyer remonte aux années quatre-vingt, avec *L. major* comme l'agent causal de la maladie le plus probable (Harrat *et al.*, 1995). La commune de Barika, enregistre chaque année l'incidence la plus élevée, celle-ci atteint en 2002, 72% des cas enregistrés dans la wilaya, ce qui en fait un foyer important de l'infection, non seulement dans la wilaya mais aussi dans le pays entier (INSP, 2002). Selon Benikhlef *et al.* (2021), la plupart des cas de LC signalés en Algérie proviennent de cinq régions à savoir Batna, Béchar, El Oued, Biskra et M'Sila. Au cours de la première décennie de ce nouveau siècle, un pic alarmant en 2003 de 5400 cas (378,10 cas/100.000 habitants) a été signalé à Batna (Kalla et Guettouche, 2017). Par la suite, en 2005, l'Algérie a enregistré le plus grand nombre de cas avec plus de 25 000 individus infectés (Eddaikra *et al.*, 2018) dont 2476 cas provenaient de notre région d'étude (Kalla et Guettouche, 2017). Cette situation alarmante a conduit à la création, en 2006, d'un programme national de lutte basé essentiellement sur la pulvérisation d'insecticides (Deltaméthrine) (OMS, 2015). Néanmoins, malgré une baisse significative de l'incidence de la LC, la maladie reste toujours un réel problème de santé publique et contrainte importante pour le budget de l'état (Aoun et Bouratbine, 2014; Kalla et Guettouche, 2017).

## II.2. Objectifs de recherche

Jusqu'à présent, à notre connaissance, aucune étude approfondie n'a été réalisée pour évaluer le statut épidémiologique de la LC dans la wilaya de Batna, l'un des principaux foyers de la maladie dans notre pays. À cette fin, notre travail a pour objectif de faire le point sur la situation épidémiologique actuelle de la LC dans cette région en analysant la répartition temporelle, démographique, spatiale et spatio-temporelle des cas rapportés entre 2010 et 2020.

Comme objectif secondaire, nous avons tenté d'évaluer si les campagnes d'aspersion d'insecticides (proportion des habitations traitées à la deltaméthrine) dans leur ensemble ont eu un impact sur l'incidence de LC enregistrée au niveau des foyers les plus endémiques de la wilaya.

Cette étude est nécessaire et indispensable pour déterminer et explorer la situation de la LC au niveau de la wilaya de Batna et les résultats obtenus seront d'un grand intérêt pour les services d'hygiène impliqués dans la lutte antivectorielle pour mieux mener les actions de lutte et de prévention.

## II.3. Matériel et méthodes

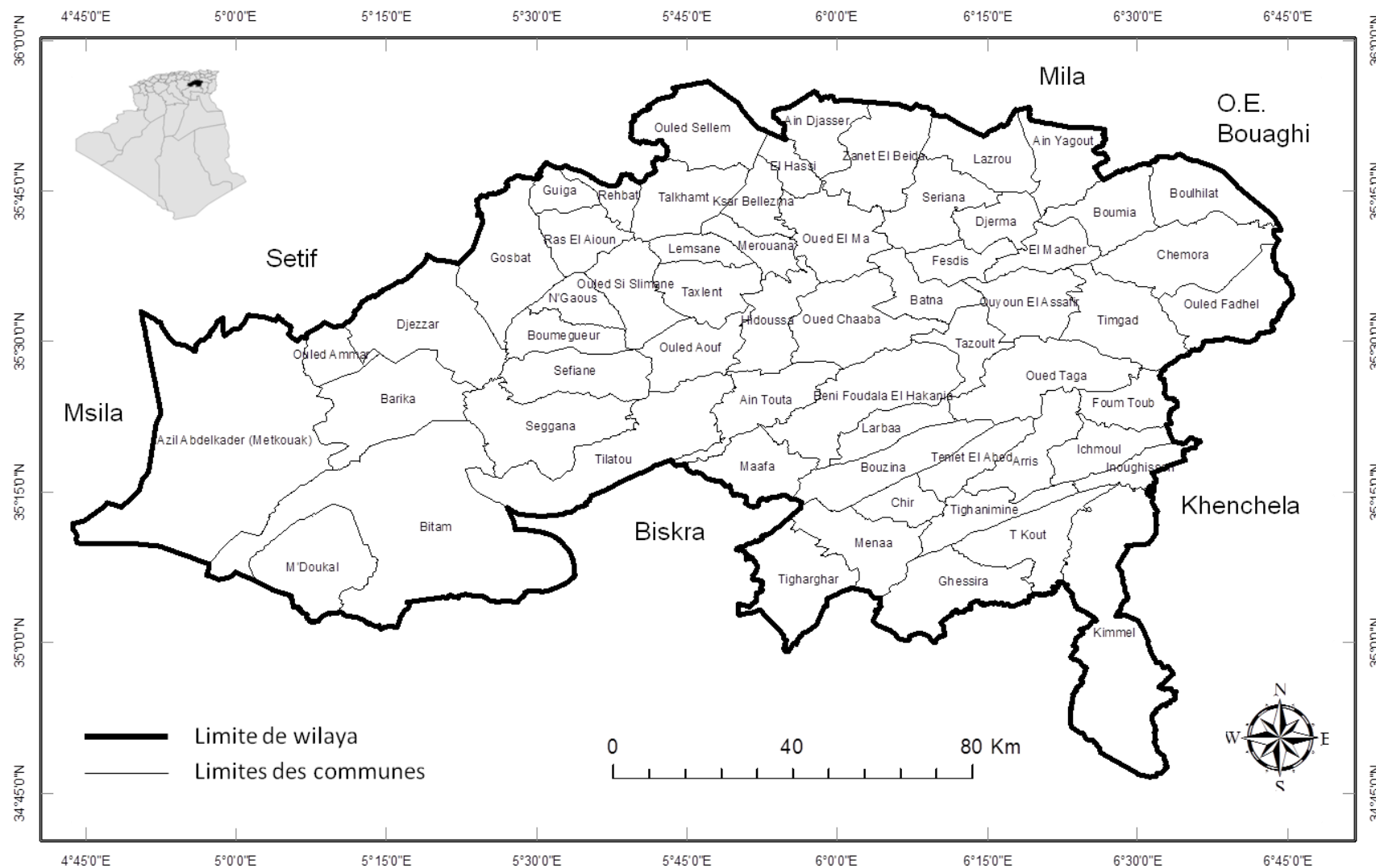
### II.3.1. Présentation de la région d'étude

La wilaya de Batna se situe au nord-est de l'Algérie entre les "4° et 7°" de longitude Est et "35° et 36°" de latitude Nord, dans la région des Aurès (Figure 20). Elle occupe une superficie de 12,038 km<sup>2</sup>, couvrant 0,51% du territoire total de l'Algérie. Cette wilaya, qui est divisée administrativement en 21 daïras et 61 communes, est délimitée par six autres wilayas dont Biskra au sud et M'sila à l'ouest, sont parmi les principaux foyers endémiques de LC en Algérie (Benikhlef *et al.*, 2021). Les autres wilayas bordant notre région d'étude sont Mila au nord, Sétif au nord-ouest, Oum El Bouaghi au nord-est et Khenchela à l'est.

La LCZ due à *L. major* MON-25 est la forme clinique prédominante de leishmaniose dans la région de Batna. En 1982, environ 900 cas ont été signalés dans ce foyer (Chauvet, 1984). D'après les chiffres officiels de l'INSP, 1331 cas ont été rapportés en 2000, puis 2820 cas en 2004. Ensuite, le nombre annuel de nouveaux cas a progressivement diminué pour atteindre 116 cas en 2007 avant d'augmenter à nouveau en 2009 pour atteindre 1374 cas (<http://insp.dz/index.php/Non-categorise/rem.html>).

La population résidente totale de la wilaya est estimée à 1 377 000 habitants, soit une densité de 114 habitants par km<sup>2</sup>. La commune de Batna, avec 350 000 habitants, est de loin la commune la plus peuplée de la wilaya, suivie de Barika à l'ouest avec 125 000 habitants. La population urbaine et rurale constitue respectivement 58,07% (799 634 habitants) et 41,93% (577 366 habitants) de l'ensemble de la population de la wilaya. La population masculine et la population ayant un âge inférieur à 9 ans représentent, respectivement, 50,8% et 18,9% de la population totale de la wilaya (Données du recensement de 2019, Direction de la Santé et de la Population (DSP) de Batna).

Le territoire de la wilaya de Batna s'inscrit presque entièrement dans l'ensemble physique constitué par la jonction de deux Atlas (Tellien et Saharien), ce qui représente la particularité physique principale de la wilaya et détermine de ce fait les caractères du climat et les conditions de vie humaine, ainsi que la répartition des différents milieux physiques. Ces derniers sont définis par; les hautes plaines telliennes qui matérialisent la limite nord de la wilaya avec des altitudes variant de 800 à 1000 m; les reliefs montagneux qui constituent l'ensemble physique le plus important du point de vue superficie (environ 45% de la surface totale de la wilaya); et les hautes plaines steppiques à l'ouest qui se trouvent encadrées au nord, à l'est et au sud par de nombreux montagnes (ex., les monts de Hodna et Bellezma) avec une superficie de 3764 km<sup>2</sup> (31%) et une altitude moyenne inférieure à 500 m. Les hautes plaines steppiques peuvent être divisées en 3 zones : la zone des Glacis immédiatement en



**Figure 20:** Situation géographique de la wilaya de Batna.

Source : carte produite avec le logiciel ArcGIS version 10.3 à partir des shape files extraits du site web « <http://gadm.org> ».

contrebas des reliefs montagneux (N'Gaous, Djezzar, Sefiane, Boumagueur et Gosbat), la plaine du Hodna (M'doukal, Barika, Bitam et Ouled Ammar) et la zone des chotts (Azil Abdelkader) (Agence Nationale de Développement de l'Investissement (ANDI), 2013).

Le climat de la wilaya de Batna est celui d'une région semi-aride. La température moyenne est de 4 °C en janvier et 35 °C en juillet. Durant l'été la température peut atteindre les 45 °C à l'ombre. La pluviométrie moyenne est de 210 mm par an. L'humidité relative est importante durant les mois de décembre et de janvier dépassant 72%, tandis qu'elle est basse durant le mois le plus chaud, juillet, avec 35,78% (ANDI, 2013; Boukhtache, 2019).

La région de Batna est à vocation agro-sylvo-pastorale. La superficie allouée à l'agriculture est très importante car elle occupe 61,80% de la superficie totale de la wilaya, avec une prédominance pour la céréaliculture. Avec près de 68 878 travailleurs le secteur agricole occupe le troisième rang, parmi tous les secteurs d'activité (ANDI, 2013; Boukhtache, 2019).

### **III.3.2. Recueil de données**

Les données présentées dans cette étude ont été traitées selon de leur disponibilité.

#### **II.3.2.1. Données épidémiologiques**

Les données épidémiologiques de notre étude rétrospective nous ont été fournies par le service de prévention qui fait partie de la DSP de Batna.

Les différents établissements de santé (ex., l'hôpital universitaire, les hôpitaux régionaux publics, les établissements public de santé de proximité (EPSP)) couvrant les différentes daïras et/ou communes de la wilaya, sont chargés du diagnostic et de la prise en charge des patients atteints de LCs confirmées biologiquement ainsi que de la déclaration obligatoire de tous les cas détectés au bureau d'hygiène communale auquel ils appartiennent administrativement. Au niveau de ce dernier, les cas de LC détectés sont d'abord collectés puis organisés sous forme de rapports contenant des données sur le sexe, l'âge, la date du diagnostic et l'origine géographique de tous les cas enregistrés dans chaque commune. Ces rapports sont transmis hebdomadairement et mensuellement à la DSP sous forme de fichiers électroniques. On note ici l'absence des renseignements cliniques (nombre, taille, type et siège des lésions), thérapeutiques (type et durée de traitement) et socioéconomiques (profession, milieu urbain/rural) dans les données déclarées à la DSP. Bien que le diagnostic de la leishmaniose soit également réalisé au niveau du secteur privé, ce dernier n'est pas impliqué dans la déclaration des cas de LC.

Le diagnostic des LCs au niveau des services sanitaires de la wilaya de Batna est basé sur la confirmation biologique qui se fait généralement par la mise en évidence à l'examen microscopique des corps de Leishman « amastigotes » sur de frottis dermiques colorés au May-Grünwald Giemsa.

Dans la présente étude, nous avons exploité les données recueillies et disponibles pour analyser la distribution temporelle (annuelle et mensuelle), démographique (âge et sexe), spatiale et spatiotemporelle (origine géographique des patients) de la LC sur une période de 11 années allant de 2010 à 2020. En raison du manque de données, la répartition mensuelle des cas de LC en 2019 n'a pas été incluse.

### **II.3.2.2. Données sur les campagnes de lutte**

#### **II.3.2.2.1. Lutte antivectorielle : Campagnes d'aspersion d'insecticides**

La lutte contre les populations de phlébotomes est la principale méthode utilisée pour prévenir et contrôler les leishmanioses dans les régions endémiques de Batna. Elle est essentiellement basée sur la pulvérisation d'insecticides à effet rémanent dans les habitations des communes affectées en milieux urbains, périurbains et ruraux. La deltaméthrine, sous forme d'une poudre mouillable ou d'un liquide, est l'insecticide le plus couramment utilisé pour lutter contre le phlébotome adulte. Elle est appliquée au moyen d'un pulvérisateur à pression préalable sur les murs extérieurs et intérieurs des habitations au niveau du rez-de-chaussée (visant à tuer les espèces endophiles et péri-domestiques), ciblant particulièrement les fissures et les crevasses. Une fois pulvérisé sur les murs d'une habitation, cet insecticide continue à tuer les insectes pendant plusieurs mois. Il convient de noter que l'opération d'aspersion d'insecticides couvre également divers habitats situés à proximité des habitations humaines, tels que les abris pour animaux (bergeries, étables, poulaillers, clapiers à lapins, niches à chiens, etc.), les maisons abandonnées et les trous d'arbres, qui peuvent être des sites de repos ou de reproduction pour les phlébotomes.

Les campagnes de lutte antivectorielle, qui ont pour but de réduire ou d'interrompre la transmission de la maladie, se font souvent en deux phases par an, dans chaque zone d'endémie avec le concours des bureaux communaux d'hygiène, généralement au mois d'avril/mai pour la première phase et au mois de septembre/octobre pour la deuxième phase. Les modalités de mise en œuvre et d'évaluation des campagnes d'aspersion ainsi que les mesures de protection nécessaires lors d'une opération d'aspersion, selon les recommandations du Ministère de la Santé, sont montrées dans l'Annexe 1.

### II.3.2.2. Données exploitées

Pour la récolte des données concernant les campagnes de lutte antivectorielle, nous sommes adressés au bureau d'hygiène à l'EPSP de Barika qui a mis à notre disposition les fiches d'évaluation des campagnes d'aspersion d'insecticides (voir quelques exemplaires en Annexe 2) pour les quatre communes les plus touchées, de 2013 à 2020. Les données utilisées pour la réalisation de cette étude comprennent, le nombre total d'habitations ciblées pour la pulvérisation d'insecticides et le nombre total d'habitations pulvérisées avec succès chaque année. L'indicateur sélectionné pour mesurer l'impact des campagnes d'aspersion d'insecticides contre les leishmanioses dans les quatre communes sélectionnées était l'incidence des cas. Les données recueillies nous permettent d'évaluer si les campagnes d'aspersion d'insecticides (proportion d'habitations traitées à l'insecticide) dans leur ensemble ont eu un impact sur la morbidité imputable à cette parasitose, et si elles ont atteint ses objectifs. Notons ici qu'aucun essai n'a été réalisé par les autorités sanitaires locales pour évaluer la bio-efficacité et l'action résiduelle de deltaméthrine contre les phlébotomes vecteurs; des données complètes ne sont donc pas disponibles.

### II.3.3. Cartographie des données

Afin de cartographier la distribution spatiale de la LC dans notre région d'étude, nous avons utilisé le logiciel ArcGIS 10.3 (<http://www.esri.com>). Les fichiers de formes « en anglais Shapefiles » qui montrent les limites administratives des 61 communes de la wilaya de Batna ont été téléchargés à partir du site web « Global Administrative Areas Project ; <http://gadm.org/> ». Les données concernant l'incidence de la LC ont été saisies dans le logiciel et distribuées par commune. Les cartes géographiques obtenues nous permettent de connaître la répartition générale de la maladie ainsi que les zones d'endémicité élevée et faible.

### II.3.4. Analyse statistique des données

Les données relatives à notre étude épidémiologique ont été saisies au logiciel Microsoft Office Excel 2007 puis analysées au logiciel IBM SPSS Statistics version 21.0 (IBM SPSS, Chicago, USA). Un  $p < 0,05$  était considéré comme statistiquement significatif.

L'équation suivante a été utilisée pour calculer la proportion d'habitations traitées à la deltaméthrine durant chaque année et pour chaque commune étudiée:

$$\% \text{ des habitations traitées à la deltaméthrine} = \left( \frac{\text{Nb. d'habitations traitées avec succès à la deltaméthrine durant la phase 1 et 2}}{\text{Nb. d'habitations ciblées pour la pulvérisation de deltaméthrine durant la phase 1 et 2}} \right) \times 100$$

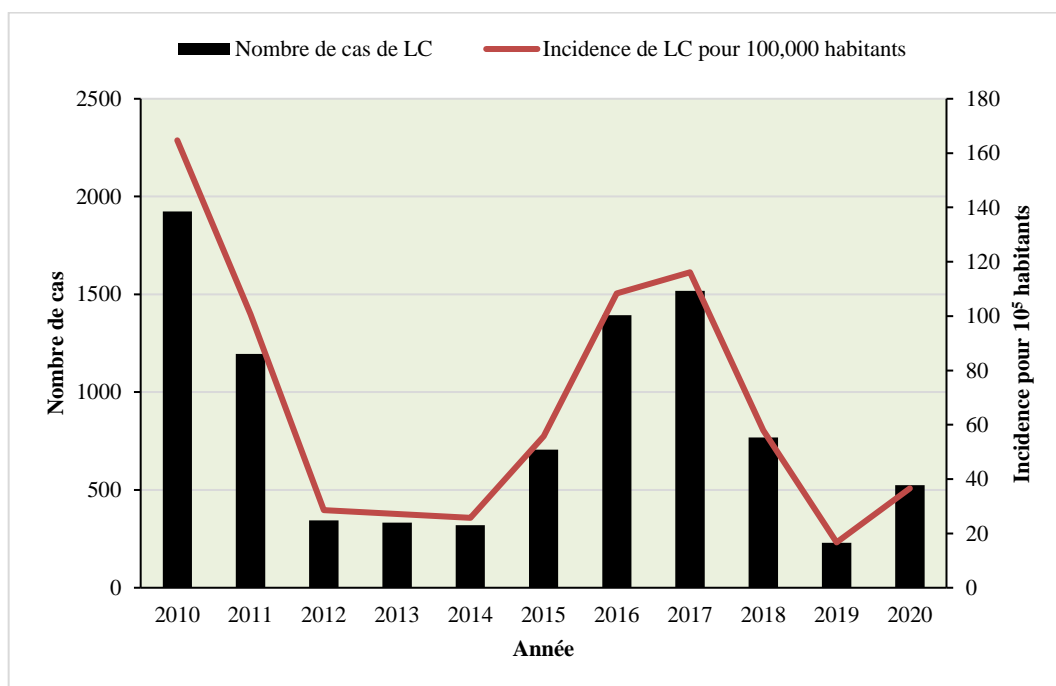
Nb. Nombre

## II.4. Résultats

### II.4.1. Répartition temporelle de la LC

#### II.4.1.1. Répartition annuelle

L'évolution annuelle du nombre de cas et de l'incidence (pour  $10^5$  habitants) de LC dans la wilaya de Batna durant la période de 2010 à 2020 est montrée dans la figure 21.



**Figure 21:** Évolution annuelle du nombre de cas et de l'incidence (pour  $10^5$  habitants) de LC dans la wilaya de Batna (2010 à 2020).

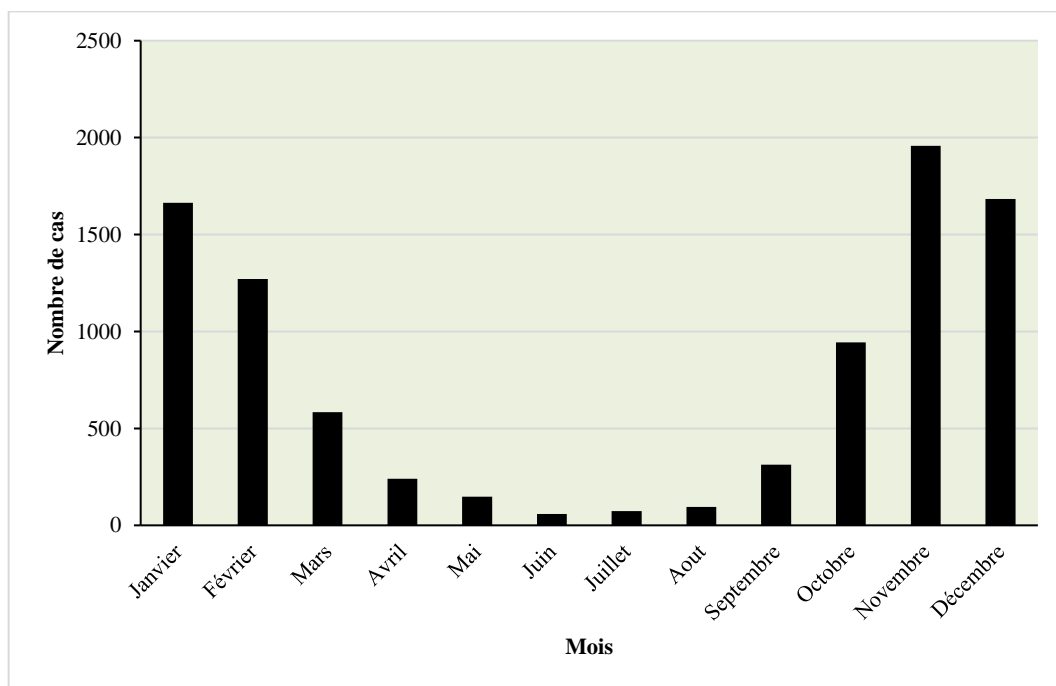
De janvier 2010 à décembre 2020, il a été recensé et notifié 9259 cas de LC au niveau de la DSP de Batna avec une moyenne de 841,73 cas par an ( $67,11/10^5$  habitants). Nous remarquons que le nombre de cas enregistrés en onze ans varie d'une année à l'autre avec cependant deux pics : le premier pic, qui est le plus élevé, a été signalé en 2010 avec 1924 cas, soit un taux d'incidence de  $164,7/10^5$  habitants. Le deuxième pic a été signalé en 2017 avec 1518 cas ( $116,1/10^5$  habitants). Toutefois, la plus basse incidence a été enregistrée en 2019 avec 230 cas, soit 16,7 cas pour  $10^5$  habitants.

Comme le montre la figure 21, le nombre annuel de nouveaux cas entre 2010 et 2014 a progressivement diminué, passant de 1924 à 320 cas annuels ( $164,7$  à  $25,7/10^5$  habitants). Cependant, une augmentation importante de l'incidence de la maladie a été notée entre 2015 et 2017. Durant cette période, le nombre de nouveaux cas de LC est passé de 706 à 1518 cas ( $55,8$  à  $116,1/10^5$  habitants). Ensuite, l'incidence de la LC a fortement baissé en 2018 et 2019, avant d'augmenter à nouveau en 2020 pour atteindre 524 cas, soit 36,54 cas pour 100 000

habitants. Il existe une différence statistiquement significative entre les années d'étude ( $p < 0,05$ ).

#### II.4.1.2. Répartition mensuelle

La répartition des cas de LC selon les mois de l'année entre 2010 et 2020 est donnée dans le tableau 5 et la figure 22.



**Figure 22:** Répartition mensuelle des cas de LC dans la wilaya de Batna (2010 à 2020).

D'après les résultats obtenus, on note que la maladie est observée au cours des 12 mois de l'année, mais avec une distribution hétérogène. Le nombre de cas était plus important aux mois de novembre (en 2010 et 2013), de décembre (de 2014 à 2017 et en 2020), de janvier (en 2012 et 2018) et de février (en 2011). Par contre, le nombre le plus bas a été remarqué durant les mois estivaux, en particulier au mois de juin. Il y a une différence statistiquement significative entre les différents mois ( $p < 0,05$ ).

Au total, on note que la maladie atteint son pic en novembre (1957 cas; 21,7%) puis commence à décliner progressivement pour atteindre sa valeur la plus basse en juin (59 cas; 0,7%) (Figure 22).

**Tableau 5:** Nombre de cas mensuels de LC recensés de 2010 à 2020 dans la wilaya de Batna.

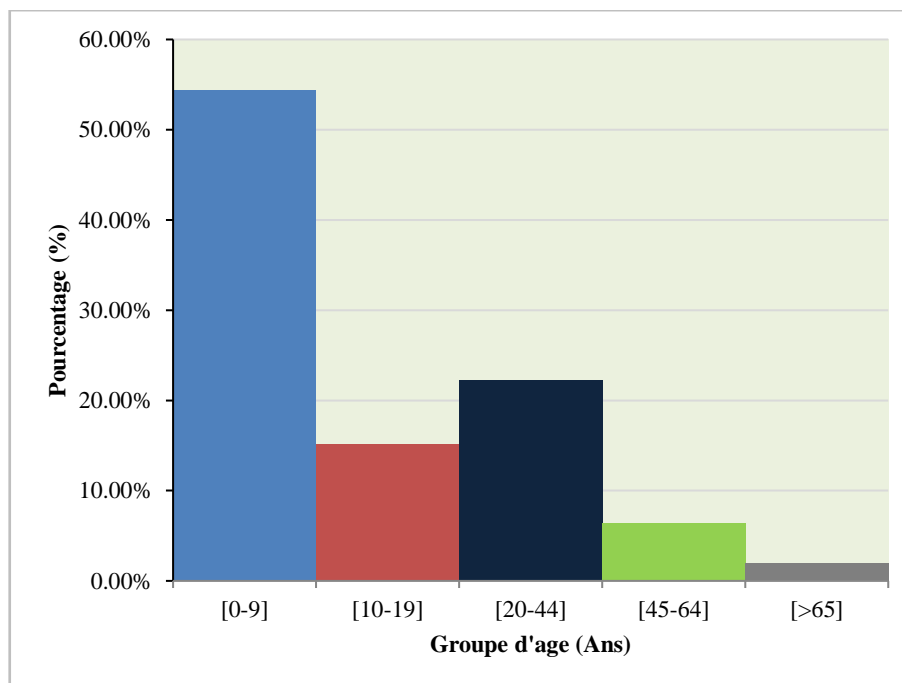
Mois	Année											Total Nb. %	<i>p-value</i>
	2010 Nb. %	2011 Nb. %	2012 Nb. %	2013 Nb. %	2014 Nb. %	2015 Nb. %	2016 Nb. %	2017 Nb. %	2018 Nb. %	2019 Nb. %	2020 Nb. %		
Janvier	331 (17.2)	254 (21.2)	101 (29.3)	60 (18.0)	29 (9.1)	93 (13.2)	185 (13.3)	283 (18.6)	229 (29.8)	N.D.	98 (18.7)	1663 (18.4)	<i>P</i> <.001
Février	249 (12.9)	460 (38.5)	41 (11.9)	36 (10.8)	27 (8.4)	35 (5.0)	74 (5.3)	158 (10.4)	115 (15.0)	N.D.	75 (14.3)	1270 (14.1)	
Mars	123 (6.4)	171 (14.3)	23 (6.7)	14 (4.2)	10 (3.1)	47 (6.7)	36 (2.6)	69 (4.5)	45 (5.9)	N.D.	45 (8.6)	583 (6.5)	
Avril	61 (3.2)	54 (4.5)	17 (4.9)	11 (3.3)	06 (1.9)	13 (1.8)	16 (1.1)	28 (1.8)	25 (3.3)	N.D.	10 (1.9)	241 (2.7)	
Mai	22 (1.1)	11 (0.9)	43 (12.5)	07 (2.1)	04 (1.3)	08 (1.1)	05 (0.4)	22 (1.4)	19 (2.5)	N.D.	06 (1.1)	147 (1.6)	
Juin	07 (0.4)	09 (0.8)	03 (0.9)	05 (1.5)	03 (0.9)	05 (0.7)	04 (0.3)	05 (0.3)	9 (1.2)	N.D.	09 (1.7)	59 (0.7)	
Juillet	13 (0.7)	11 (0.9)	08 (2.3)	02 (0.6)	04 (1.3)	03 (0.4)	00 (0.0)	10 (0.7)	9 (1.2)	N.D.	14 (2.7)	74 (0.8)	
Août	26 (1.4)	10 (0.8)	05 (1.4)	07 (2.1)	00 (0.0)	05 (0.7)	07 (0.5)	13 (0.9)	13 (1.7)	N.D.	09 (1.7)	95 (1.1)	
Septembre	85 (4.4)	39 (3.3)	05 (1.4)	17 (5.1)	15 (4.7)	09 (1.3)	31 (2.2)	59 (3.9)	23 (3.0)	N.D.	30 (5.7)	313 (3.5)	
Octobre	300 (15.6)	38 (3.2)	20 (5.8)	39 (11.7)	25 (7.8)	51 (7.2)	154 (11.0)	197 (13.0)	67 (8.7)	N.D.	53 (10.1)	944 (10.5)	
Novembre	621 (32.3)	41 (3.4)	40 (11.6)	79 (23.7)	72 (22.5)	124 (17.6)	498 (35.7)	331 (21.8)	84 (10.9)	N.D.	67 (12.8)	1957 (21.7)	
Décembre	86 (4.5)	98 (8.2)	39 (11.3)	56 (16.8)	125 (39.1)	313 (44.3)	384 (27.5)	343 (22.6)	131 (17.0)	N.D.	108 (20.6)	1683 (18.6)	
<b>Total</b>	1924 (100)	1196 (100)	345 (100)	333 (100)	320 (100)	706 (100)	1394 (100)	1518 (100)	769 (100)	/	524 (100)	9029 (100)	

N.D. : non disponible

## II.4.2. Répartition démographique de la LC

### II.4.2.1. Selon l'âge

La répartition des cas de LC en fonction de groupes d'âge de 2010 à 2020 est montrée dans le tableau 6 et la figure 23.



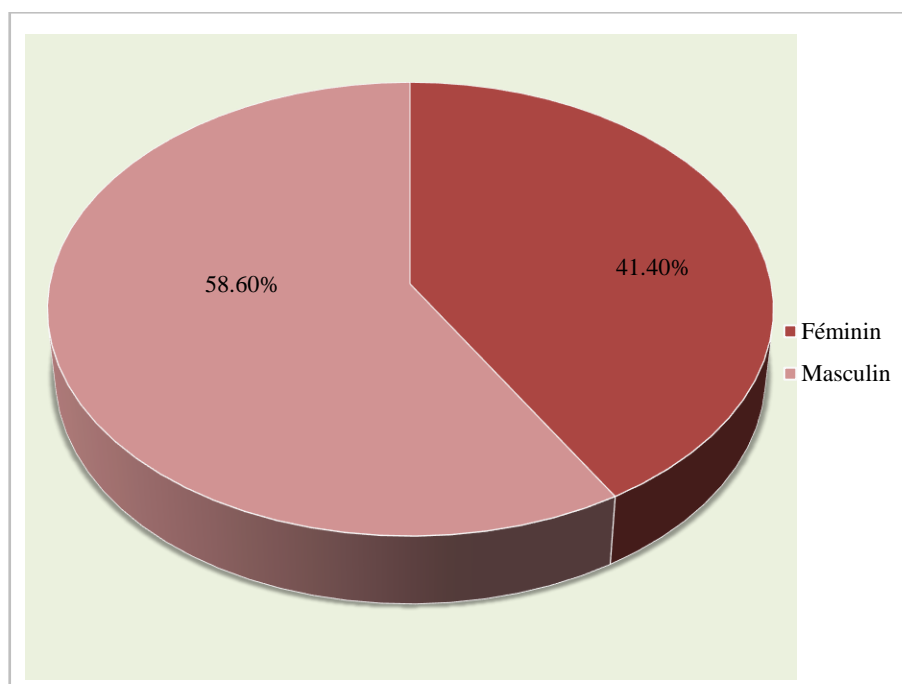
**Figure 23:** Répartition des cas de LC selon les groupes d'âges dans la wilaya de Batna (2010-2020).

L'analyse des résultats obtenus a montré que toutes les tranches d'âge ont été touchées par la LC. Cependant, c'est dans la tranche d'âge des enfants de moins de 9 ans que le plus grand nombre de cas a été signalé, représentant 54,4% (5033 cas) de l'ensemble des cas de LC (Figure 23). Cette prédominance a été observée durant toutes les années d'étude sauf en 2012 où la tranche d'âge des 20-44 ans était la plus atteinte (38%). Les patients âgés de 65 ans et plus représentent le groupe d'âge le moins affecté, avec des taux allant de 0,3% à 3,2%. Les tranches d'âge de 10 à 19 ans et de 45 à 64 ans étaient faiblement touchées, représentant chacune moins de 15,2% de l'ensemble des individus infectés. Il existe une différence statistiquement significative entre les différents groupes d'âge ( $p < 0,05$ ).

Un autre point qui mérite attention est l'augmentation significative de l'incidence de la LC chez les enfants de moins de 9 ans au cours de la période 2014-2016, variant entre 60% et 71,7% (Tableau 6).

#### II.4.2.2. Selon le sexe

La répartition des cas de LC selon le sexe de 2010 à 2020 est montrée dans la figure 24 et le tableau 6.



**Figure 24:** Répartition des cas de LC selon le sexe dans la wilaya de Batna (2010-2020).

L'analyse des résultats obtenus a montré que les deux sexes étaient touchés par la LC. Néanmoins, comme le montre la figure 24, les masculins sont plus sensibles à l'infection par la LC que les féminins avec 58,6% (n = 5422) des cas signalés et un sexe-ratio de 1,41. Cette prédominance masculine a été observée durant toutes les années d'étude, représentant entre 54,4% et 72,5% de cas rapportés. Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les deux sexes ( $p > 0,05$ ).

Une incidence très élevée de la maladie a été notée chez les masculins durant l'année 2012 avec 72,5% des cas rapportés contre 27,5% pour les féminins, alors qu'elle était légèrement proche chez les deux sexes en 2015 (45,6% F ; 54,4% M) et en 2016 (45,5% F ; 54,5% M) (Tableau 6).

**Tableau 6:** Répartition des cas de LC recensés de 2010 à 2020 dans la wilaya de Batna selon le sexe et le groupe d'âge.

Variables		Année											Total Nb. (%)	p- value
		2010 Nb. (%)	2011 Nb. (%)	2012 Nb. (%)	2013 Nb. (%)	2014 Nb. (%)	2015 Nb. (%)	2016 Nb. (%)	2017 Nb. (%)	2018 Nb. (%)	2019 Nb. (%)	2020 Nb. (%)		
Sexe	Féminin	816 (42.4)	492 (41.1)	95 (27.5)	125 (37.5)	123 (38.4)	322 (45.6)	634 (45.5)	619 (40.8)	316 (41.1)	90 (39.1)	205 (39.1)	3837 (41.4)	P>0.05
	Masculin	1108 (57.6)	704 (58.9)	250 (72.5)	208 (62.5)	197 (61.6)	384 (54.4)	760 (54.5)	899 (59.2)	453 (58.9)	140 (60.9)	319 (60.9)	5422 (58.6)	
Groupe d'âge (ans)	[0-9]	934 (48.5)	507 (42.4)	109 (31.6)	128 (38.4)	192 (60.0)	500 (70.8)	999 (71.7)	896 (59.0)	435 (56.6)	92 (40)	241 (46.0)	5033 (54.4)	P<.001
	[10-19]	286 (14.9)	216 (18.1)	70 (20.3)	67 (20.1)	53 (16.6)	80 (11.3)	156 (11.2)	201 (13.2)	112 (14.6)	48 (20.9)	110 (21.0)	1399 (15.1)	
	[20-44]	503 (26.1)	336 (28.1)	131 (38.0)	118 (35.4)	62 (19.4)	87 (12.3)	172 (12.3)	317 (20.9)	162 (21.1)	65 (28.3)	105 (20.0)	2058 (22.2)	
	[45-64]	148 (7.7)	99 (8.3)	29 (8.4)	14 (4.2)	12 (3.8)	30 (4.2)	60 (4.3)	82 (5.4)	48 (6.2)	19 (8.3)	51 (9.7)	592 (6.4)	
	[>65]	53 (2.8)	38 (3.2)	6 (1.7)	6 (1.8)	1 (0.3)	9 (1.3)	7 (0.5)	22 (1.4)	12 (1.6)	6 (2.6)	17 (3.2)	177 (1.9)	

### **II.4.3. Répartition spatiale et spatiotemporelle de la LC et impact des campagnes d'aspersion d'insecticides**

#### **II.4.3.1. Répartition spatiale**

La répartition des cas de LC sur le plan administratif d'une commune à l'autre est donnée dans les figures 25 et 26.

Durant la période d'étude, sur un total de 61 communes que compte la wilaya, 58 ont rapporté des cas de LC. Aucun cas n'a été signalé dans les régions de Larbaa, Ain Yagout et Hidoussa. Il existe une différence statistiquement significative entre les différentes communes ( $p < 0,05$ ).

Les résultats obtenus montrent une répartition géographique non homogène de la maladie avec une nette concentration des cas notifiés dans les communes situées dans la partie ouest de la wilaya. C'est dans la commune de Barika que le plus grand nombre de cas a été signalé (2979 cas), soit 32,17% du nombre total des cas notifiés. Le nombre annuel moyen de nouveaux cas dans ce foyer était de 270,82 cas par an. Le deuxième plus grand nombre de cas a été enregistré dans la commune d'Abdelkader Azil (1238; 13,37%), suivi de Bitam (1141; 12,32%), Djezzar (803; 8,67%), Ouled Ammar (655; 7,07%), et M'doukal (404; 4,36%). Le nombre annuel moyen de nouveaux cas de LC dans ces cinq régions endémiques se situe entre 36,73 et 112,55 cas par an. Au total, les six communes mentionnées ci-dessus représentaient ensemble environ 78% (7220 cas) de tous les cas de LC rapportés durant la période d'étude.

Les communes restantes, principalement situées dans le centre et l'est de la wilaya, ont notifiées le plus faible nombre de cas (entre 0 et 2,88% de tous les cas de LC rapportés).





**Figure 26:** Répartition des cas humains de LC dans les 61 communes de Batna.

### II.4.3.2. Répartition spatio-temporelle

En ce qui concerne la répartition spatio-temporelle de la LC, nous avons remarqué une importante concentration des cas dans l'Ouest de Batna et cela pour chacune des années que nous avons prospecté ( $p < 0,05$ ) (Figure 27). La commune de Barika avait l'incidence la plus élevée de la maladie où elle représentait plus de 23% de l'ensemble des cas notifiés au cours de chaque année étudiée, constituant de ce fait le principal foyer de la maladie dans la wilaya. Outre Barika, cinq autres communes, toujours à l'Ouest de Batna, nommées Bitam, M'doukal, Abdelkader Azil, Djezzar et Ouled Ammar, ont également rapporté un nombre important de cas. Les six communes susmentionnées réunis comptaient plus de 50% du total des cas rapportés durant chaque année d'étude et plus de 88% de tous les cas notifiés durant la période allant de 2015 à 2017 (Figure 28).

L'analyse de l'évolution de l'endémicité de la LC dans l'Ouest de Batna a montré des résultats variables. Dans les communes de Barika et Abdelkader Azil, nous constatons une nette diminution du nombre de cas de 2010 à 2013 puis une augmentation jusqu'en 2016. Au niveau des communes de Bitam, M'doukal, Djezzar et Ouled Ammar, nous observons une baisse du nombre de nouveaux cas de 2010 à 2014 puis une hausse jusqu'en 2017. L'incidence de la LC a subi ensuite une chute en 2018 et 2019 au niveau de toutes les communes avant d'augmenter à nouveau en 2020 (Figure 27, Annexe 3).

Une augmentation notable des cas de LC est survenue en 2016 au niveau de la commune d'Abdelkader Azil, atteignant 351 cas (25,2%). Une situation similaire a été observée en 2017 à Djezzar avec 232 cas (15,3%). À l'opposé, une diminution de l'incidence de la LC a été notée à Ain Touta, Sefiane et Boumaguer, où les cas enregistrés sont passés respectivement de 61, 90 et 77 cas en 2011 à 11, 3 et 1 cas en 2020 (Figure 27 et 28, Annexe 3).

La situation épidémiologique de la maladie au niveau des autres communes, telles que Oued El Ma, Béni Fedhala, et Timgad, reste inchangée durant toutes les années d'étude, montrant clairement le plus faible nombre de cas rapportés (Figure 27 et 28, Annexe 3).

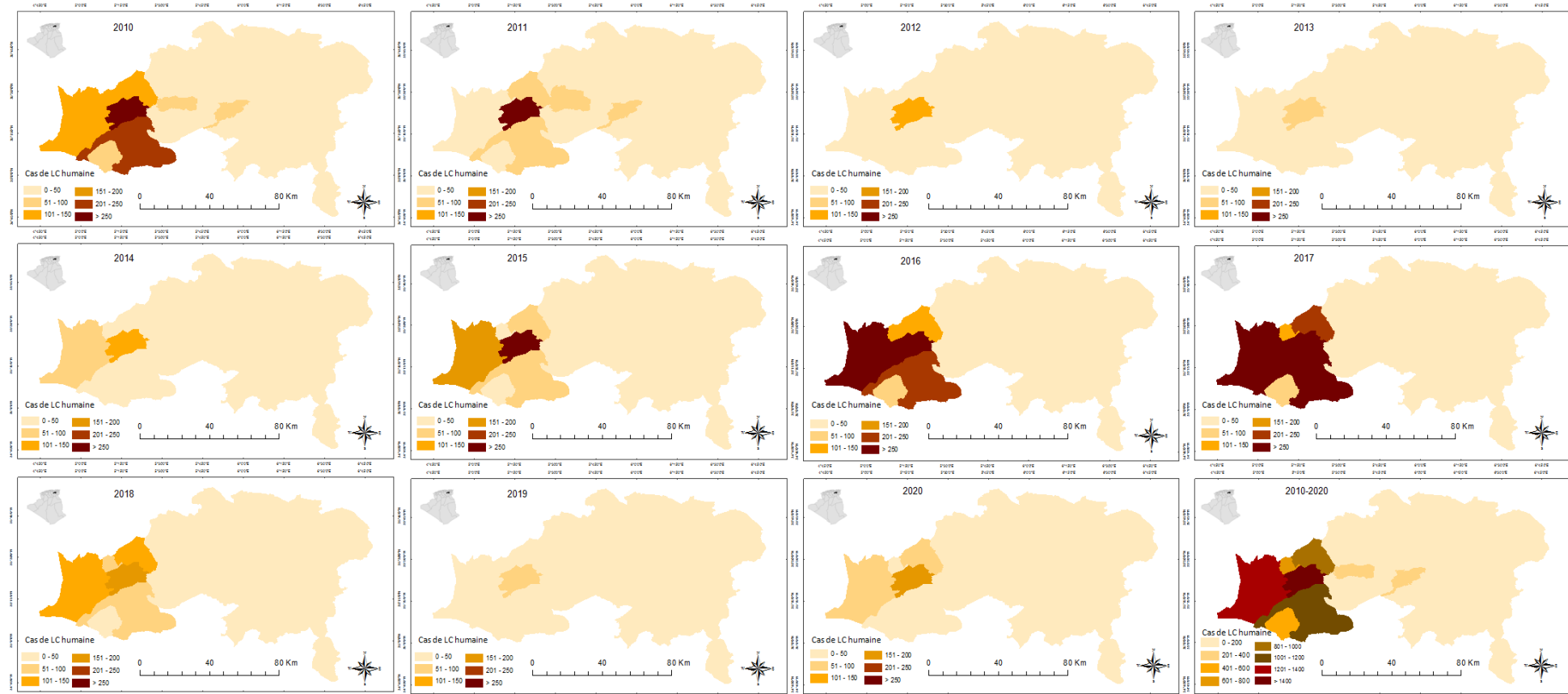
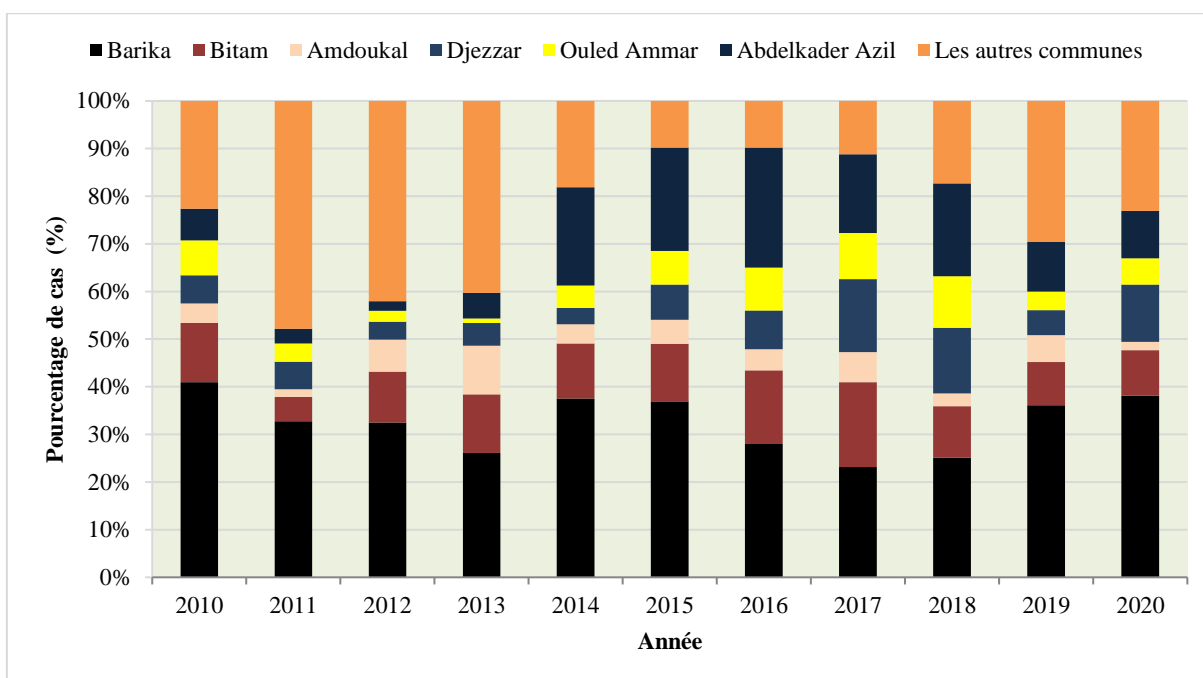


Figure 27: Répartition spatiotemporelle des cas de LC dans la wilaya de Batna (2010-2020).

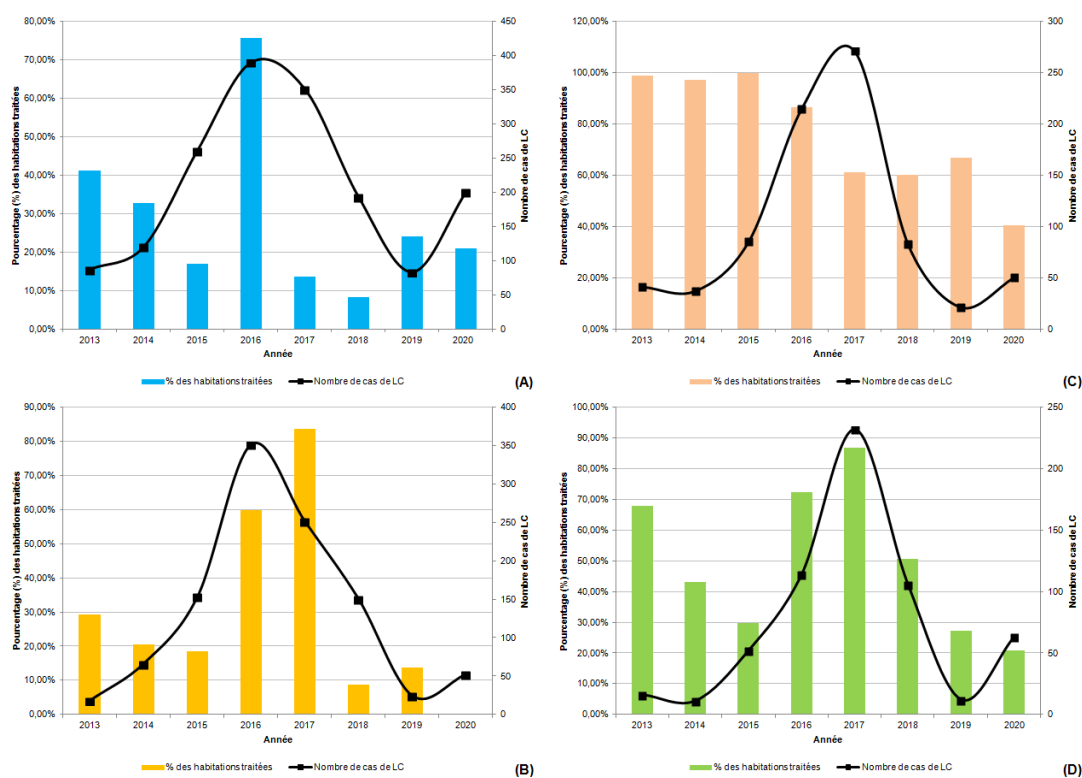


**Figure 28:** Evolution annuelle de l'endémicité de la LC compte pour les six communes les plus touchées (2010-2020).

#### II.4.3.3. Impact des campagnes d'aspersion d'insecticides sur l'incidence de LC

Au cours de la période d'étude, la proportion d'habitations traitées à la deltaméthrine a été estimée inégale, variant d'une année à l'autre et d'une commune à l'autre (Figure 29).

L'analyse des résultats obtenus montre qu'il y a eu une diminution progressive des taux des opérations d'aspersion de 2013 à 2015 dans les trois communes de Barika, Abdelkader Azil et Djezzar, ceci a été clairement accompagnée d'une augmentation de l'incidence de la LC. Cependant, à Bitam, malgré le taux de couverture élevé de l'opération d'aspersion dans cette commune ( $\approx 100\%$ ) au cours de la même période, une nette augmentation du nombre de cas y a été observée en 2015. En revanche, malgré les taux modérés à élevés des habitations traitées en 2016, puis en 2017 (sauf à Barika), le nombre de cas de LC était considérablement plus élevé au niveau de toutes les communes étudiées. En 2018 et 2019, la proportion d'habitations traitées à la deltaméthrine était relativement faible dans certaines communes et modérée dans d'autres, variant généralement entre 8,30% et 66,84%. Néanmoins, il y a eu une baisse très importante du nombre d'infections dans chacune des quatre communes étudiées pendant ces années-là. La baisse du taux d'habitations aspergées au cours de l'année 2020, au niveau des communes de Barika, Bitam et Djezzar, et l'absence d'interventions de lutte antivectorielle à Abdelkader Azil durant la même année, ont été accompagnées d'une augmentation notable des cas de LC (Figure 29).



**Figure 29:** Évolution annuelle de l'endémicité de la LC par rapport à la proportion d'habitations traitées à la deltaméthrine au niveau des quatre communes les plus touchées. (A) Barika, (B) Abdelkader Azil, (C) Bitam, (D) Djezzar.

## II.5. Discussion

Batna, située au nord-est de l'Algérie, est considérée comme une zone à haut risque de leishmanioses. Cette wilaya est apparue comme un nouveau foyer de la maladie après la grande épidémie survenue au début des années 1980. En effet, dans leur publication, Harrat *et al.* (1996) ont mentionné l'émergence de certains foyers de LC dans plusieurs régions d'Algérie, en premier lieu à M'sila et Ksar-Chellala, puis Sidi-Aïssa, Batna, Barika et Laghouat. En 1982, environ 900 cas de LC ont été rapportés à Batna (Chauvet, 1984). Plus récemment, selon une étude publiée sur la LC en Algérie, Benikhlef *et al.* (2021) ont indiqué que Batna est l'un des cinq principaux foyers de LC en Algérie avec plus de 10 000 cas signalés entre 1980 et 2017. Ce foyer de leishmaniose est entouré par de nombreux autres foyers connus pour être endémiques soit pour les formes cutanées, viscérales ou les deux (Adel *et al.*, 2014; Kabbout *et al.*, 2015; Gaouaoui *et al.*, 2017; Gherbi *et al.*, 2020; Benikhlef *et al.*, 2021; Amira *et al.*, 2022).

Au cours d'une période de 11 ans, les services de santé publique de Batna ont recensé 9259 cas de LC, soit une moyenne de 841,73 cas par an. Le plus grand nombre de cas a été rapporté durant l'année 2010 avec 1924 cas. Différentes enquêtes épidémiologiques menées en Algérie ont indiqué des résultats similaires où le plus grand nombre de cas de LC a été

observé en 2010 (Benelmouffok *et al.*, 2017; Gaouaoui *et al.*, 2017; Khezzani et Bouchemal, 2017). Ceci pourrait s'expliquer par les fortes pluies survenues durant l'année 2009, comme l'ont montré ces études (Gaouaoui *et al.*, 2017; Khezzani et Bouchemal, 2017). En effet, la pluviométrie est considérée comme un facteur prépondérant dans la propagation de la maladie; des pluies abondantes favorisent l'abondance de la végétation et donc l'augmentation du nombre et de la qualité des sites de reproduction tant pour les rongeurs que pour les phlébotomes, ce qui affecte donc la transmission de la leishmaniose dans les années suivantes (Bounoua *et al.*, 2013; Benelmouffok *et al.*, 2017; Gaouaoui *et al.*, 2017; Khezzani et Bouchemal, 2017).

Nos résultats ont montré que le nombre de cas signalés a diminué de manière significative au cours des cinq premières années, celui-ci est passé de 1924 cas en 2010 à 320 cas en 2014, ce qui est en accord avec les études antérieures menées en Algérie (Gaouaoui *et al.*, 2017; Khezzani et Bouchemal, 2017). Néanmoins, une augmentation substantielle du nombre de cas incidents de LC a été notée entre 2015 et 2017, ce qui contraste fortement avec ce qui s'est produit dans la région de Biskra où une baisse continue du nombre de nouveaux cas a été remarquée de 2010 à 2017, comme indiqué par l'INSP (<http://insp.dz/index.php/Non-categorise/rem.html>). En 2018 et 2019, une nette diminution du nombre de nouveaux cas a été observée, ce qui est conforme aux résultats de Benikhlef *et al.* (2021) dans la wilaya de M'sila au cours de la même période. Au sein de la même région, les auteurs ont rapporté une baisse notable de l'incidence de la LC au cours de l'année 2020 (Benikhlef *et al.*, 2021), ce qui est incohérent avec nos résultats étant donné que nous avons observé une légère augmentation de la fréquence de la maladie durant cette année-là. L'intervention de multiples facteurs dans les épidémies de LC, tels que ceux liés aux mesures de lutte, aux changements climatiques et environnementaux ou encore au statut socio-économique (Oryan et Akbari, 2016) est fortement suggérée. Malheureusement, nos données ne nous permettent pas de démêler l'effet de ces facteurs.

La LC est observée au cours des douze mois de l'année. Cependant, c'est dans les mois froids, notamment en novembre (21,7%) et en décembre (18,6%), que les taux les plus élevés ont été enregistrés. Selon l'INSP (2013), la répartition mensuelle de l'incidence de la LC en Algérie présente la même tendance, avec des valeurs très basses en été et élevées au cours de la saison d'hiver (novembre, décembre et janvier), confirmant ainsi, le caractère saisonnier de la maladie dans le pays. À l'échelle internationale, plusieurs études menées dans différentes régions ont indiqué des résultats similaires, où la plupart des cas se sont produits en novembre ou entre novembre et février, comme c'est le cas pour la République Islamique d'Iran (Nazari

*et al.*, 2017; Jorjani *et al.*, 2019) et la Libye (Belal *et al.*, 2012). Nos résultats peuvent s'expliquer par la dynamique saisonnière des phlébotomes et leurs pics d'activité, ainsi que par la longue période d'incubation de la maladie. En Algérie, les phlébotomes présentent différents pics d'activité selon les espèces et la région en cause, dont le maximum est en période estivo-automnale (Cherif, 2014; Ramdane *et al.*, 2018; Gherbi *et al.*, 2020). Selon deux études menées à proximité de notre région d'étude, un pic de densité pour *P. papatasi* a été observé en août et/ou en septembre (Cherif, 2014; Gherbi *et al.*, 2020). Selon Zait et Hamrioui (2009), les malades qui s'infectent durant l'été n'affluent au laboratoire qu'après une durée d'incubation et d'évolution réunies d'en moyennes de 3 mois, c'est-à-dire vers la fin de l'automne et au début de l'hiver (Zait et Hamrioui, 2009). Lorsque le phlébotome pique un hôte en août ou en septembre, par exemple, des cas apparaissent en novembre ou en décembre, ce qui justifie les résultats obtenus dans cette étude.

Notre étude a montré que toutes les tranches d'âge ont été touchées par la LC. Cependant, 54,4% des cas notifiés ont moins de 9 ans, démontrant que les enfants sont la population à risque la plus importante dans ce foyer. Ce résultat est comparable à ce qui a été rapporté par les études de Gaouaoui *et al.* (2017) à Biskra, Jorjani *et al.* (2019) en République Islamique d'Iran et Sebti *et al.* (2015) au Maroc où la tranche d'âge la plus touchée était celle des enfants de moins de neuf ans. Néanmoins, les études menées à l'oasis de Souf et Djelfa ont rapporté des résultats différents où les tranches d'âge de 10-19 et 20-50 ans sont respectivement les plus touchées par cette maladie (Khezzani et Bouchemal, 2017; Hamiroune *et al.*, 2019). Les résultats de notre étude pourraient être justifiés par l'absence d'immunité acquise chez les populations infantiles vis-à-vis de cette parasitose car elles n'ont pas eu d'exposition antérieure au parasite. Le taux d'infection chez les autres tranches d'âge s'est avéré moins élevé comparativement à celui des enfants. Cela peut s'expliquer par le fait qu'une grande partie de la population adulte a développé une immunité protectrice vis-à-vis du parasite après avoir guéri d'une première infection à *Leishmania*, compte tenu de l'ancienneté de la maladie dans la région de Batna. Cette hypothèse peut être étayée par la récente étude menée par Abou-Elaaz *et al.* (2019) au Maroc. Dans cette étude, la fourchette d'âges à risque s'est avérée relativement la même au cours de chaque année d'étude dans le foyer de la province d'Azilal, où les enfants de moins de 9 ans était le groupe le plus touché, tandis que dans la province de Béni Mellal et Fquih Ben Salah, les tranches d'âge étaient plus larges et fluctuaient considérablement. Selon les mêmes auteurs, cela pourrait être dû à l'acquisition d'une immunité protectrice contre le parasite car la maladie est ancienne dans le foyer d'Azilal contrairement à Béni Mellal et Fquih Ben Salah où la maladie est émergente (Abou-Elaaz *et al.*, 2019).

Dans la présente étude nous avons indiqué que les mâles (58,6%) sont plus à risque que les femelles (41,4%), cependant, la différence entre les deux sexes est statistiquement non significative. Les résultats des études antérieures menées en Algérie (Gaouaoui *et al.*, 2017; Khezzani et Bouchemal, 2017; Hamiroune *et al.*, 2019) et dans d'autres pays tels que la République Islamique d'Iran (Jorjani *et al.*, 2019), la Libye (Abdellatif *et al.*, 2013), le Pakistan (Ali *et al.*, 2016) et l'Irak (Al-Warid *et al.*, 2017) ont montré une nette prédominance pour les sujets de sexe masculin. La prédominance masculine peut être expliquée par le fait que les hommes sont plus exposés aux piqûres de phlébotomes en raison de nombreux facteurs, notamment leur participation à des activités de plein air (ex., l'agriculture) et leurs habitudes vestimentaires, surtout en été, où les surfaces corporelles découvertes sont plus importantes que chez les femmes qui passent la plupart des périodes estivales à la maison, portant des vêtements longs et couvrants. De plus, certains comportements humains peuvent à terme augmenter ou diminuer leur exposition aux phlébotomes (Oryan et Akbari, 2016). En fait, certains habitants du sexe masculin préfèrent dormir dehors dans les cours des maisons pendant la période estivale lorsqu'il fait trop chaud à l'intérieur ce qui les rend plus vulnérables au risque de piqûres de phlébotomes. D'un autre côté, compte tenu de nos résultats précédents qui ont confirmé que les enfants de moins de 9 ans sont plus vulnérables à l'infection, nous pouvons également conclure que les garçons sont plus susceptibles que les filles d'être touchés par ce fléau probablement parce qu'ils passent plus de temps à l'extérieur et sont donc plus exposés aux piqûres d'insectes.

L'analyse de la répartition géographique a montré une incidence élevée de la maladie dans les régions de l'ouest de Batna, où les conditions géographiques et climatiques locales sont censées faciliter sa propagation. Il a été indiqué dans une étude réalisée à Batna à l'aide d'outils géomatiques que les régions les plus fortement touchées par la LC sont celles situées sur les latitudes sahariennes (sud-ouest) et à une altitude allant de 336 à 975 m, donnant un gradient thermique élevé pour les cas de Barika, Bitam, Djezzar, M'doukal et Abdelkader Azil. La même étude a révélé que les régions situées au dessus de 975 m d'altitude sont celles les plus faiblement touchées (Kalla et Guettouche, 2017). Plusieurs études ont démontré qu'une altitude basse à modérée et un niveau croissant d'aridité sont deux facteurs propices à la pullulation de *P. papatasi*, favorisant ainsi la transmission de la maladie (Dedet *et al.*, 1984; Guernaoui *et al.*, 2006; Boudrissa *et al.*, 2012). Cette espèce de phlébotome a été inventoriée dans de nombreuses wilayas voisines telles que Sétif, M'sila et Biskra (Zeroual *et al.*, 2016; Gherbi *et al.*, 2020; Benikhlef *et al.*, 2021). D'après Kalla et Guettouche (2017), la faible pente, en tant que variable topographique, qui caractérise principalement le sud-ouest et le nord-est de la wilaya, est un autre facteur de risque important pour la survenue de

nombreux cas de leishmanioses. Ceci est justifié par le fait que les faibles pentes sont souvent associées à une stagnation de l'eau qui entraîne l'apparition d'un environnement humide, offrant, de ce fait, un terrain idéal pour le développement de nombreux insectes vecteurs dont les phlébotomes. Les régions les plus touchées selon la même étude (Kalla et Guettouche, 2017), dont les résultats sont similaires aux nôtres, sont celles qui ont une faible pente, situées autour du lac endoréique de Chott El Hodna qui traverse la partie occidentale de la wilaya de Batna (Abdelkader Azil, M'doukal, Bitam et Barika) ainsi que de nombreuses régions de la wilaya de M'sila. Dans une étude menée à M'sila, Belazzoug (1982) a rapporté que la plupart des cas de LC se sont produits dans les zones rurales de la région de Chott El Hodna, où les cours d'eau habituellement secs s'étaient remplis l'hiver précédent et l'humidité avait permis une augmentation significative de la densité des phlébotomes et des rongeurs. De plus, une autre étude a montré que le plus grand nombre de terriers actifs de rongeurs ont été recensés dans les communes situées en bordure du Chott El Hodna (Cherif *et al.*, 2012). Contrairement aux régions de l'ouest de Batna où la LC est fortement endémique, les communes restantes ont enregistré une faible incidence de la maladie. Cette faible incidence s'explique par l'absence de propagation locale de la maladie et les cas qui y sont déclarés proviennent le plus souvent des régions endémiques, que ce soit dedans ou en dehors de la wilaya.

En ce qui concerne la répartition spatio-temporelle de la LC, nos résultats ont montré une nette concentration des cas dans les régions qui se trouvent à l'ouest de Batna et cela pour chaque année d'étude avec Barika comme commune la plus touchée. Cependant, le statut de la maladie dans les zones d'endémie est fluctuant. L'analyse des variations de l'incidence de la LC par rapport aux proportions des habitations traitées à l'insecticide dans les quatre communes les plus touchées a montré des résultats variables. Le fait qu'il y ait eu une incidence élevée de la LC durant certaines années où le taux de couverture de l'opération d'aspersion était élevé et vice-versa, soulève de nombreuses questions sur l'efficacité des campagnes de lutte effectuées et du type d'insecticide utilisé ainsi que de la sensibilité des phlébotomes à ce produit « deltaméthrine ». De plus, l'hypothèse de l'intervention des autres facteurs, tels que ceux liés aux changements climatiques ou environnementaux ou encore aux mesures de lutte mises en œuvre dans les wilayas voisines, dans l'évolution de l'endémicité des leishmanioses ne peut être exclue. En général, on peut dire qu'il n'y a aucune preuve que les campagnes d'aspersion d'insecticides utilisant la deltaméthrine aient un grand impact sur l'incidence de la LC. L'étude de l'efficacité d'une campagne de lutte par la deltaméthrine sur la densité des phlébotomes dans une étude menée par Manseur (2015) à Kherrata a montré que cette campagne n'a pas donné les résultats attendus. Selon le même auteur, cela pourrait être dû au fait que les aspersion d'insecticides n'ont pas été effectuées dans les normes et selon les

instructions faite par le comité de lutte contre les zoonoses, et de la diminution probable de la sensibilité des phlébotomes à l'insecticide utilisé. En raison du manque de données concernant la bio-efficacité de la deltaméthrine sur la densité des phlébotomes vecteurs et le taux de transmission de la maladie au niveau des habitations traitées et non traitées, nos résultats restent limités. Les prochaines études devraient s'efforcer d'évaluer l'impact réel des pulvérisations d'insecticides à effet rémanent sur la densité des phlébotomes et l'incidence de la maladie.

Les stratégies de lutte antivectorielle utilisant l'aspersion intra- et extra-domiciliaire d'insecticides à effet rémanent sont souvent confrontées à de nombreuses contraintes et insuffisances dans les foyers endémiques de Batna. Il s'agit notamment du non-respect des opérations d'aspersions dans certaines communes, et de la restriction du processus d'aspersion le plus souvent aux surfaces extérieures (aspersion extra-domiciliaire), ce qui rend difficile le contrôle des populations de phlébotomes endophiles. A cela s'ajoute l'absence d'études sur l'écologie et le comportement du vecteur local et du degré de la sensibilité de celui-ci aux insecticides utilisés, ainsi que de l'insuffisance des équipements (ex., pompes portables, moyens de protection pour les manipulateurs; masques, gants, lunettes...etc.) et des agents mobilisés pour les interventions à grande échelle. Selon l'OMS, les principaux défis auxquels l'Algérie est confrontée dans la mise en œuvre des campagnes de lutte sont le manque de législation sur la lutte antivectorielle et l'insuffisance de la collaboration intersectorielle. De plus, selon la même source, la supervision des opérations d'aspersion est déficiente et les techniques et équipements d'aspersion sont également inadéquats (OMS, 2015). Le non avertissement préalable de la population de la date de pulvérisation et la répugnance de certains habitants à accepter les méthodes d'aspersion sont autant de facteurs qui contribuent à l'échec de l'éradication de la maladie.

En ce qui concerne les mesures de lutte contre les rongeurs réservoirs, elles ne sont pratiquées que dans les périmètres agricoles où l'on retrouve le *M. shawii*, un réservoir naturel de *L. major*. Les campagnes de lutte contre ce rongeur sont habituellement menées entre octobre et avril de chaque année où de nombreux types de rodenticides sont utilisés, comme le difenacoum. Ce poison provoque une hémorragie interne chez l'animal, entraînant sa mort au bout de 3 ou 4 jours. Cependant, l'objectif principal de ces campagnes de lutte est de protéger les cultures et non d'éradiquer la maladie. À l'instar de la lutte antivectorielle, les stratégies de lutte contre les rongeurs réservoirs ne sont pas exemptes de certaines contraintes et insuffisances, posant ainsi un véritable frein à l'éradication de la maladie. Il s'agit, dans certains cas, de l'insuffisance ou de l'absence de rodenticides utilisés pour le contrôle, et de

l'interdiction de l'usage de ceux-ci à proximité des habitations humaines (OMS, 2015). Il convient également de noter que le rat des sables, *P. obesus*, est considéré comme une espèce protégée dans notre pays (loi du 20 août 1983) (Benelmouffok *et al.*, 2017). Les procédés préconisés pour lutter contre ce rongeur, sont l'arrachage manuel des chénopodes et le labour profond des colonies, deux méthodes exigeantes et coûteuses, ce qui fait que leur application reste rare ou quasi inexistante.

Outre la défaillance des mesures de lutte, un certain nombre d'autres facteurs pourraient avoir une influence considérable sur l'apparition de nouveaux cas et la persistance de la LC à l'ouest de Batna. Il s'agit notamment de l'urbanisation croissante, particulièrement à Barika (Redjem et Tacherift, 2010), et de l'élevage de bétail en milieux urbains. Selon les recommandations de la Direction Générale de la Prévention et de la Promotion de la Santé, les campagnes d'aspersion d'insecticides doivent être associées à des actions environnementales en renforçant l'hygiène du milieu par l'enlèvement des plantes chénopodiacées, des dépotoirs sauvages et le ramassage et l'élimination des déchets entreposés autour des habitations. Ainsi, elles doivent être appuyées par la mise en œuvre d'un programme d'information-éducation-communication en direction du grand public sur les moyens de prévention des maladies à transmission vectorielle et sur le respect de règles d'hygiène collective. Cependant, ces recommandations sont souvent ignorées par les autorités locales et les habitants, ce qui se manifeste par la dégradation de la qualité d'hygiène environnementale dans la quasi-totalité des communes affectées, posant de ce fait un facteur de risque important. Une étude ayant pour objectif le contrôle de LC, réalisée par Cherif *et al.* (2012) dans la wilaya de M'sila, a indiqué que la lutte contre cette parasitose est plus difficile dans les villes connaissant un accroissement urbain rapide. Ici, les services communaux ne parviennent pas à prendre en charge correctement l'opération de collecte des déchets ménagers. Conséquemment à cela, les ordures ménagères s'amoncellent à la périphérie des nouvelles extensions urbaines attirant vecteurs et réservoirs de leishmaniose, notamment *M. shawii*, rongeur stercoraire, attiré lui aussi par les ordures ménagères et les débris de végétaux. En outre, le développement de l'agriculture ainsi que l'augmentation de l'activité humaine qu'elle induit, constituent un facteur supplémentaire amplificateur de la maladie. De nombreuses études ont confirmé le rôle de ces derniers dans la propagation de leishmanioses, voir une implication dans la survenue d'épidémies (Nouiri *et al.*, 2015; Khezzani et Bouchemal, 2017). La superficie des périmètres agricoles et irriguées dans la wilaya de Batna a connu un développement notable au cours des dernières décennies, comme indiqué par l'ONS (2017). Ces modifications environnementales pourraient favoriser la création de microclimats humides dans les zones à risque, les rendant, par conséquent, plus propice à la prolifération des vecteurs et réservoirs

ainsi qu'à la transmission de leishmanioses (Desjeux, 2001; Bellali *et al.*, 2015; Nouiri *et al.*, 2015). Enfin, le risque de propagation de la maladie vers des zones non endémiques reste non nul, particulièrement si toutes les conditions appropriées y sont réunies.

## **II.6. Conclusion et limites de l'étude**

En Algérie, les LCs représentent un problème majeur de santé publique par une importante incidence de cas et une large répartition géographique. Elles suscitent de plus en plus d'intérêt dans notre pays, cela est dû aux cicatrices indélébiles que les lésions cutanées laissent sur les parties découvertes du corps. L'actualisation des données épidémiologiques relatives aux LHs dans les zones d'endémie sera sans doute utile dans l'évaluation de l'efficacité des mesures de lutte mises en place d'une part, et dans la prise de décision d'autre part.

A travers la présente étude rétrospective, qui s'est intéressée à l'analyse temporelle, démographique et spatiale des cas de LC déclarés à Batna de 2010 à 2020, nous avons pu contribuer à l'actualisation des données sur la situation épidémiologique de la leishmaniose dans cette wilaya, qui est considérée comme l'un des principaux foyers de la maladie en Algérie. Nous avons tenté également dans cette étude d'évaluer si les campagnes d'aspersion d'insecticides (proportion des habitations traitées à la deltaméthrine) ont eu un impact sur l'incidence de LC enregistrée au niveau des foyers les plus endémiques de la wilaya. En outre, notre étude nous a permis de clarifier les stratégies de lutte mises en place par les autorités sanitaires locales pour le contrôle de la maladie, ainsi que de lever le voile sur les différentes contraintes et insuffisances qui existent dans leur application sur le terrain.

Les résultats de la présente étude ont révélé une forte endémicité de la maladie dans les régions qui se situent à l'ouest de Batna à savoir; Barika, Bitam, Azil Abdelkader, Djezzar, Ouled Ammar et M'doukal. Barika était clairement la commune la plus fortement touchée, constituant de ce fait le principal foyer de la maladie dans la wilaya. Toutes les tranches d'âge sont atteintes avec une prédominance chez 0-9 ans. La LC affecte les deux sexes, avec un sexe-ratio de 1,41. Cette étude a permis de mettre en évidence le caractère saisonnier épidémique de l'affection, la majorité des cas se concentrant au cours des mois de novembre à février, avec un pic au mois de novembre. Des fluctuations du nombre de cas signalés au fil du temps ont été observées, avec cependant deux pics (2010 et 2017), reflétant des conditions écologiques favorables au développement des vecteurs et des réservoirs, mais aussi la défaillance des moyens de lutte contre la maladie. En ce qui concerne les campagnes de lutte utilisant l'aspersion d'insecticide à effet rémanent, notre étude a montré une incidence élevée de la maladie dans certaines années où le taux de couverture de l'opération d'aspersion était

élevé, ce qui nous amène à nous interroger sur l'efficacité réelle de ces méthodes de lutte et la sensibilité des phlébotomes au produit utilisé « deltaméthrine ». Selon les responsables de la santé dans la zone d'étude, le traitement à l'aide des antimoniés pentavalents a échoué pour certains patients atteints de LC, reflétant probablement l'apparition des souches résistantes, ce qui pourrait aggraver la situation actuelle de la maladie dans les années prochaines.

Le caractère rétrospectif avec absence de plusieurs variables intéressantes à analyser sur les fiches de notification des cas a représenté la limite principale de cette étude. La deuxième limite de l'étude, était la difficulté rencontrée pour avoir des données sur l'effectif de la population par commune, durant toutes les années de l'étude, ce qui a été le motif de choix de présenter les données en valeurs absolues au lieu de taux d'incidence par commune. Il est également important de noter que les données recueillies entre 2010 et 2020 ne reflètent probablement pas la situation exacte de cette parasitose puisque certains cas de LC identifiés n'ont pas été déclarés et d'autres ont été diagnostiqués au niveau des laboratoires privés, ce qui est en faveur d'une sous-estimation.

---

## Chapitre III

# Identification de l'origine du repas sanguin et l'infection par *Leishmania* chez les phlébotomes (Diptera : Psychodidae) dans le nord-est algérien.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été publiés dans : Messahel *et al.* (2022) Vet.  
Parasitol.: Reg. Stud. Rep.; 31; 100729. (ARTICLE 2).

---

### III. Identification de l'origine du repas sanguin et l'infection par *Leishmania* chez les phlébotomes (Diptera : Psychodidae) dans le nord-est algérien.

#### III.1. Introduction

Les phlébotomes (Diptera : Psychodidae) sont de petits insectes nocturnes, prouvés comme vecteurs de divers agents pathogènes, dont les bactéries *Bartonella bacilliformis*, des virus de plusieurs genres et surtout des parasites protozoaires du genre *Leishmania* qui provoquent des maladies connues sous le nom de « Leishmanioses » chez les hôtes humains et animaux (Maroli *et al.*, 2013; Ready, 2013). Jusqu'à présent, environ 1 000 espèces et sous-espèces de phlébotomes ont été décrites, regroupées en plusieurs genres dont trois se trouvent exclusivement dans l'ancien monde à savoir : *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840, *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 et *Chinius* Leng, 1987 (Bates *et al.*, 2015; Munstermann, 2019). Parmi ces genres, seules les espèces du genre *Phlebotomus* sont considérées comme vecteurs avérés ou suspectés de *Leishmania* spp. qui infectent les humains et les animaux (Maroli *et al.*, 2013).

La LCan causée par *L. infantum* est une zoonose parasitaire largement répandue dans le pourtour méditerranéen où elle représente un problème vétérinaire majeur et soulève des inquiétudes quant à la santé humaine (Vélez *et al.*, 2019). En Algérie, cette zoonose concerne tout le territoire national mais avec une prévalence qui varie d'une région à l'autre (de 11% à 37%) (Harrat *et al.*, 1996; Bessad *et al.*, 2012). Cependant, les principaux foyers endémiques de la maladie se situent surtout dans les régions nord du pays, caractérisées par un climat méditerranéen subhumide à humide. Dans ces étages bioclimatiques, un taux d'infection élevé par *L. infantum* a été signalé chez les chiens (Harrat et Belkaid, 2003; Ait-Oudhia *et al.*, 2009; Adel *et al.*, 2015; Medkour, 2017, Medkour *et al.*, 2019a). Outre le fait que l'agent causal de la LCan est responsable des cas sporadiques de LC enregistrés chez l'homme, en particulier dans le nord de l'Algérie, son plus grand risque réside cependant dans sa capacité à provoquer une LV qui est une maladie mortelle si elle n'est pas traitée (Harrat *et al.*, 1996). Les résultats de l'étude réalisée par Adel *et al.* (2014) ont montré que 81,56% des cas de LV humaine enregistrés en Algérie au cours de la période allant de 1998 à 2008 provenaient de régions situées au nord-est et le centre-nord du pays.

Dans la région méditerranéenne, les phlébotomes du sous-genre *Larroussi* sont les principaux vecteurs incriminés dans la transmission de *L. infantum* (Killick-Kendrick, 1990). En Algérie, sur les vingt-quatre espèces de phlébotomes décrites, six ont été identifiées comme appartenant au sous-genre *Larroussi*: *P. perniciosus* Newstead, 1911 avec des

formes morphologiques typiques et atypiques, *P. perfiliewi* Parrot, 1930, *P. ariasi* Tonnoir, 1921, *P. langeroni* Nitzulescu, 1930, *P. longicuspis* Nitzulescu, 1911 et *P. chadlii* Rioux, Juminer et Gibily, 1966 (Dedet *et al.*, 1984; Berchi *et al.*, 1986; Berdjane-brouk *et al.*, 2011; Lafri et Bitam, 2021; Benallal *et al.*, 2017, 2022). La méthode classique de détection de leishmanies qui nécessite la dissection de phlébotomes fraîchement capturés, puis l'isolement et la culture des parasites provenant de l'intestin de femelles infectées, a permis l'incrimination de *P. perniciosus* et *P. perfiliewi* comme vecteurs de *L. infantum* en Algérie (Izri *et al.*, 1990; Izri et Belazzoug, 1993). Cependant, cette approche traditionnelle est laborieuse, chronophage et souvent difficile à réaliser pour des raisons logistiques, car elle nécessite du matériel et une expertise en dissection. Les avancées récentes des techniques de biologie moléculaire basées sur la PCR, ont permis leur utilisation en complément des méthodes conventionnelles de dissection qui sont de moins en moins utilisées dans les études épidémiologiques dans notre pays. Les approches moléculaires ont les avantages d'être plus rapides, plus robustes et plus sensibles ce qui en fait un outil de choix dans le domaine des maladies infectieuses vectorielles. Leur application dans les recherches sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie a révélée différentes espèces de *Leishmania* au sein de diverses espèces de phlébotomes (Boubidi *et al.*, 2011; Berdjane-Brouk *et al.*, 2012; Mouloua *et al.*, 2017; Bennai *et al.*, 2018; Gherbi *et al.*, 2020).

Le spectre d'application des techniques de biologie moléculaire basées sur la PCR, en particulier le séquençage ciblant différents marqueurs génétiques des hôtes, a également été étendu à l'étude des sources d'alimentation sanguine des phlébotomes, en tant qu'alternative aux techniques sérologiques (Kent, 2009). Bien qu'ayant fourni une information notable, les techniques sérologiques sont limitées notamment par les difficultés d'approvisionnement en antisérums contre une diversité d'hôtes et l'identification des repas mixtes (Abbasi *et al.*, 2009). Jusqu'à présent, en Algérie, une seule étude a été réalisée pour déterminer les préférences trophiques des phlébotomes femelles. En utilisant le séquençage du gène COI, les auteurs ont noté un comportement alimentaire opportuniste pour les phlébotomes gorgés de sang capturés sur le terrain (Bennai *et al.*, 2018). Outre les avantages apparents, la plupart des techniques moléculaires sont encore confrontées à certaines complications et limitations, principalement liées au processus de dégradation rapide du sang et leur dépendance à la quantité et la qualité d'ADN contenu dans l'abdomen des phlébotomes (Hlavackova *et al.*, 2019). En effet, pour dépasser ces limites immunologiques et moléculaires, l'application d'un outil alternatif comme le MALDI-TOF MS serait capital. Récemment, une nouvelle approche, l'analyse par cartographie de masse peptidique (*Peptide Mass Mapping*) du peptide d'hémoglobine spécifique à l'hôte à l'aide de la spectrométrie de masse MALDI-TOF, a été

introduite en tant qu'outil sensible et rentable pour l'identification de l'origine des repas de sang des insectes hématophages (phlébotomes, moustiques). Cette approche, avec un protocole simple et rapide, permet également une détermination concluante et fiable de l'hôte dans un délai prolongé après la prise du repas sanguin (Hlavackova *et al.*, 2019).

Bien que certaines enquêtes entomologiques sur les phlébotomes et leur statut d'infection par *Leishmania* spp. soient effectuées dans de nombreux foyers du nord Algérien (Berdjane-Brouk *et al.*, 2012; Mouloua *et al.*, 2017; Bennai *et al.*, 2018) où la LCan est endémique (Harrat et Belkaid, 2003; Ait-Oudhia *et al.*, 2009; Adel *et al.*, 2015; Mouloua *et al.*, 2017; Medkour *et al.*, 2019a; Bellatreche *et al.*, 2021), néanmoins, des informations documentées font encore défaut dans de nombreux foyers, en particulier en ce qui concerne le statut d'infection par *Leishmania* spp. et les préférences trophiques des phlébotomes vecteurs. Parmi ces foyers, nous citons les deux communes de Bougaa et Kherrata, situées au nord-est Algérien, où l'infection par *L. infantum* chez le chien a été bien documentée (Tahir, 2014; Adel *et al.*, 2015; Medkour, 2017; Medkour *et al.*, 2019a), soutenant la nécessité d'une surveillance vectorielle.

### **III.2. Objectifs de recherche**

Cette étude, menée à Bougaa et Kherrata, deux foyers endémiques de LCan et LHs, avait pour objectifs: d'étudier la faune des espèces de phlébotomes, de rechercher d'éventuels vecteurs de *Leishmania* et de préciser, en utilisant la cartographie de masse peptidique par spectrométrie de masse MALDI-TOF, l'origine du repas sanguin des phlébotomes femelles pour pouvoir identifier les réservoirs potentiels et les préférences trophiques de ces insectes.

Comme objectif secondaire, nous essayerons de comparer deux approches utilisées pour l'identification de l'origine des repas de sang chez les phlébotomes gorgés, en évaluant une approche peptidique «la cartographie de masse peptidique par MALDI-TOF MS», et une approche moléculaire par la recherche de l'ADN de l'hôte vertébré par PCR.

Les résultats de cette étude peuvent aider à estimer le risque de transmission de la leishmaniose dans les deux zones d'étude et à mieux planifier des programmes de contrôle efficaces.

### III.3. Matériel et méthodes

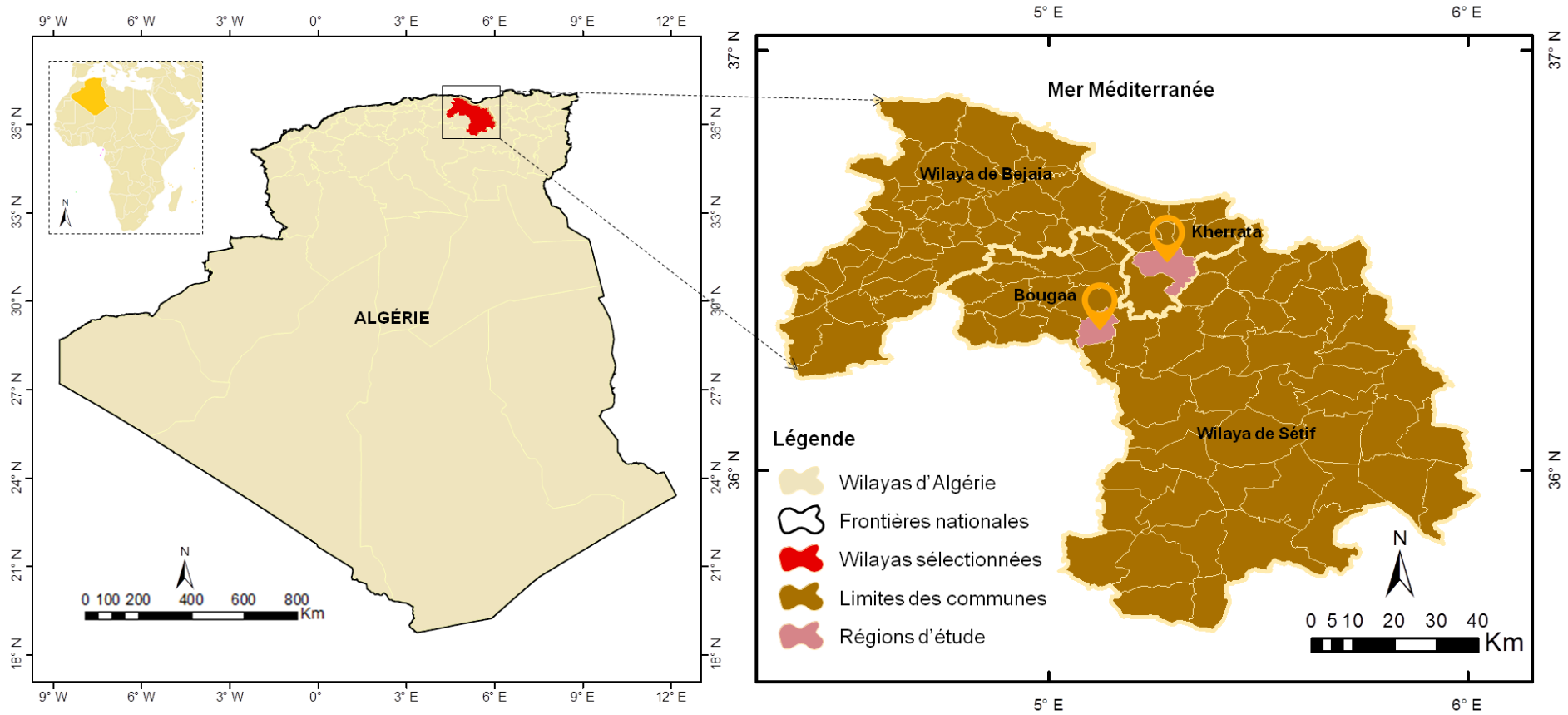
#### III.3.1. Présentation des zones d'étude

La présente étude a été menée dans deux régions de la Petite Kabylie, à savoir Bougaa et Kherrata, situées au nord-est de l'Algérie (Figure 30). La distance entre les deux régions d'étude est d'environ 42,2 km. Dans les deux communes, la LCan et les LHs (cutanées et viscérales) sont des maladies endémiques qui constituent, respectivement, un important problème de santé animale et de santé publique (Tahir, 2014; Adel *et al.*, 2015; Medkour, 2017; Medkour *et al.*, 2019a).

D'après les chiffres officiels des DSP des deux wilayas, vingt cas autochtones de LV et seize cas de LC ont été notifiés à Kherrata durant la période 2003-2012 (Tahir, 2014). Tandis qu'à Bougaa, de 2006 à 2018, un total de quinze cas de LV et huit cas de LC ont été signalés chez l'Homme (DSP Sétif). Ces chiffres font de ces communes les principaux foyers de LV dans les deux wilayas de Béjaïa (pour Kherrata) et Sétif (pour Bougaa). Quant à la LCan, Medkour *et al.* (2019a) ont estimé une séroprévalence de 39,8% chez des chiens provenant de Sétif, alors qu'une prévalence allant jusqu'à 38% a été rapportée chez des chiens prélevés à Béjaïa (Adel *et al.*, 2015). Pour les régions retenues pour cette étude, Tahir (2014) a signalé une prévalence de 12,12% chez des chiens examinés à Kherrata, tandis qu'à Bougaa, Medkour (2017) a estimé une séroprévalence de 77,87%. En outre, lors de notre étude de terrain, quelques cas de LCan ont également été observés chez des chiens vivant dans les deux régions prospectées.

##### III.3.1.1. Bougaa

Bougaa, anciennement appelée « La Fayette », est l'une des soixante communes de la wilaya de Sétif (Figure 30, 31). Elle est située à 45 km au nord-ouest de Sétif « chef lieu de la wilaya » et à 80 km au sud de Béjaïa, dont les coordonnées sont 5°05'19" de longitude Est et 36°19'57" de latitude Nord. Elle s'étend sur une superficie d'environ 70 km<sup>2</sup> avec une altitude comprise entre 650 et 1250 m au-dessus de la mer. Cette commune est limitée par Maoklane et Draa El Gaid au nord, Béni Hocine et Hammam Guergour au sud, Ain Roua à l'est et Hammam Guergour à l'ouest. Bougaa est une région tampon entre la « Petite Kabylie » et les « Hauts Plateaux ». Elle est caractérisée par un relief spécifiquement montagneux et dotée d'un climat méditerranéen de type subhumide. Elle reçoit une pluviométrie annuelle moyenne d'environ 604,4 mm avec une température annuelle moyenne de 15,6°C (Kouadra et Demdoug, 2020). L'humidité relative est d'environ 77% et 47% en janvier et juillet, respectivement (<https://power.larc.nasa.gov/data-access-viewer/>).



Selon le Recensement de 2008, la commune de Bougaa avait une population totale de 30987 habitants (ONS, 2008), répartis dans 21 localités. La région de Bougaa a une importante potentialité agricole. La surface agricole utile est de l'ordre de 3216,45 ha exploitée par les agriculteurs pour la culture de fruits, tels que les amandes et les figues, et d'autres pour la production de blé et l'élevage de bétail (comptant jusqu'à 500 vaches et 4200 moutons). La région de Bougaa est réputée pour l'élevage de volailles de toutes sortes, ainsi que pour l'engraissement des veaux et l'élevage des vaches laitières (Direction des Services Agricoles (DSA) de Sétif).

La formation végétale est composée essentiellement de chênes, de pins d'Alep, de cèdres, et de quelques arbres fruitiers dont les plus importants sont l'olivier et le figuier.



**Figure 31:** Vue générale de la ville de Bougaa (Google Earth, 24-08-2021).

### III.3.1.2. Kherrata

Kherrata, au nord-est de l'Algérie, est l'une des cinquante-deux communes de la wilaya de Béjaïa (Figure 30, 32). Elle est située à environ 58,9 km au sud-est du chef lieu de la wilaya, soit entre la latitude N 36°29'34" et la longitude E 5°16'39". Elle couvre une superficie de 97,30 km<sup>2</sup> dont l'altitude varie entre 498 et 1896 m. La commune est délimitée à l'est par la wilaya de Sétif, au sud et à l'ouest par la commune de Draa El Gaid et au nord par les communes de Taskriout et Darguina. La région de Kherrata appartient dans sa totalité au domaine des Babors à la limite orientale de la chaîne de Kabylie, c'est un domaine très

accidenté où les reliefs culminent à plus de 1800 m d'altitude (Manseur, 2015). Elle bénéficie d'un climat méditerranéen de type subhumide, avec des précipitations annuelles moyennes estimées à plus de 800 mm (Boumar, 2014). L'humidité relative est d'environ 77% et 58% en janvier et juillet, respectivement (<https://power.larc.nasa.gov/data-access-viewer/>).

La commune de Kherrata compte 35 077 habitants au recensement 2008 (ONS, 2008), répartis dans 29 localités. Elle est caractérisée par la présence d'un barrage de type remblai «Ighil Emda», qui est exploité pour de nombreuses activités humaines dont, notamment, l'irrigation des périmètres agricoles. La région de Kherrata recèle d'importantes potentialités en matière de production agricole (végétale et animale). Les cultures principales pratiquées se composent des céréales et de l'olivier, auxquelles s'ajoutent aussi les cultures maraichères et de figuiers mais avec moins de densité. L'élevage est diversifié; on trouve principalement les ovins (3141 têtes), les bovins (1297 têtes) et les caprins (2836 têtes) (DSA de Béjaïa).

La couverture végétale est très diversifiée. Elle se compose principalement de chênes, de cèdres, du peuplier, de pins d'Alep, du sapin de Numidie et de quelques arbres fruitiers dont les plus importants sont l'olivier et le figuier.



**Figure 32:** Vue générale de la ville de Kherrata (Google Earth, 24-08-2021).

### **III.3.2. Étude entomologique**

#### **III.3.2.1. Déclaration d'éthique**

Un consentement verbal des propriétaires de zones privées (refuges pour animaux) a été obtenu au préalable avant de commencer toute activité de capture des phlébotomes.

#### **III.3.2.2. Méthodes d'échantillonnage des phlébotomes adultes**

La surveillance vectorielle vise à détecter la présence d'un vecteur dans une population donnée ou à déterminer l'abondance du vecteur pour estimer le risque de transmission de la maladie, et donc les méthodes d'échantillonnage requises dépendront des questions à traiter. Pour les phlébotomes, des méthodes d'échantillonnage existent tant pour les stades adultes, que pour les stades immatures. Parmi celles-ci, les plus couramment utilisées sont les pièges lumineux pour les femelles en quête d'hôtes, les pièges adhésifs, ou la collecte à l'aide d'un aspirateur pour les populations au repos, bien que selon l'objectif spécifique de recherche, une gamme d'autres pièges et techniques soient disponibles et puissent être utilisés sur le terrain (Alten *et al.*, 2015). Dans cette étude, nous avons utilisé des pièges lumineux de type CDC (Miniature light traps) (John W. Hock Company, Gainesville, FL, USA. Centers for Disease Control) pour la capture des phlébotomes.

##### **III.3.2.2.1. Pièges lumineux (CDC)**

Cette technique est basée essentiellement sur le pouvoir attractif de la lumière. Les pièges lumineux sont largement utilisés dans les « études de terrain » pour la récolte des phlébotomes (Alexander, 2000). Comme l'ont souligné Davies *et al.* (1995), leur utilisation est moins laborieuse que les autres méthodes et le positionnement pose moins de problèmes de standardisation. Les pièges lumineux attirent les phlébotomes en quête d'hôtes (à la recherche d'un repas de sang), mais aussi les femelles gravides et les mâles (Alten *et al.*, 2015). En général, cette méthode est un premier choix pour l'étude des phlébotomes et des moustiques vecteurs (Vilela *et al.*, 2018).

Le piège (Figure 33A) se compose d'un moteur qui assure le fonctionnement d'un petit ventilateur destiné à entretenir une aspiration continue de faible intensité. Au dessus du ventilateur se trouve une petite ampoule de 0,3 ampère. Le tout est alimenté par une batterie fournissant un courant continu de 6 volts. L'ensemble moteur-ventilateur-lampe se trouve à l'intérieur d'un cylindre transparent en matière plastique dont la partie supérieure est couverte d'un grillage métallique empêchant l'entrée d'insectes de grande taille et dont la partie inférieure est creusée d'une gorge destinée à l'ajustement de la cage de recueil. Le piège

dispose également d'une cage recouverte d'un tissu à mailles très serrées dont la partie supérieure vient s'adapter à l'aide d'un élastique à la partie inférieure du cylindre.

### III.3.2.3. Sites de capture des phlébotomes

Les phlébotomes de cette présente étude ont été capturés entre juin et septembre 2019, correspondant à leur période d'activité. Dix sites pour la collecte des phlébotomes (cinq sites dans chacune des deux régions d'étude) situés en milieu rural ont été sélectionnés, représentés typiquement par des abris d'animaux qui abritent des bovins (9 à 13), des ovins (5 à 7) et des caprins (2 à 3). La présence de chats et de chiens de ferme ( $\leq 3$ ) à proximité et/ou autour des abris d'animaux était également notable. Les ânes sont présents dans presque tous les biotopes sélectionnés, mais en nombre très faible ( $\leq 2$ ).

Les pièges lumineux CDC sont déposés à l'intérieur d'abris d'animaux en les suspendant à environ 1,5 m au-dessus du sol et pour une durée de 13 heures à compter de 18h00 jusqu'à 7h00 du matin. Une fois tous les 10 jours, un des dix sites sélectionnés a été échantillonné pendant une nuit à l'aide de quatre pièges CDC. Au total, 10 nuits de piégeage ont été effectuées pendant toute la période d'étude. Les phlébotomes capturés ont été répartis afin d'avoir 30 spécimens par tube, prenant en compte la zone de piégeage, et stockés ensuite dans l'éthanol (70%) à une température de  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation ultérieure.



**Figure 33:** Piège lumineux « CDC miniature light trap » (A), Exemple de site de collecte de phlébotomes (B) (Photos : Lafri, 2019).

#### **III.3.2.4. Montage et identification morphologique des phlébotomes**

L'identification taxonomique des phlébotomes récoltés au niveau de l'espèce a été réalisée à l'aide d'un microscope binoculaire en observant les caractères morphologiques décisifs de la tête (dents du pharynx et cibarium) et des organes génitaux (l'armature génitale externe chez le mâle et les spermathèques chez la femelle). Chaque phlébotome a été transféré sur une lame en verre stérilisée et disséqué à l'aide de micro-aiguilles stériles. Ensuite, la tête et le segment terminal de l'abdomen ont été montés sur une lame couverte d'une lamelle dans une goutte de milieu de montage CMCP-9 (Low viscosity Mountant medium, Polysciences, Hirschberg, Allemagne). Le reste du corps a été stocké dans des microtubes de 1,5 ml stériles contenant de l'éthanol pour une analyse ultérieure (recherche de l'ADN de *Leishmania*, identification des phlébotomes par DNA Barcoding, identification de l'origine du repas de sang). L'identification morphologique a été réalisée à l'aide des clés d'identifications habituelles d'Abonnenc (1972) et de Dedet *et al.* (1984).

Les critères pris en compte pour la répartition et l'organisation des phlébotomes dans les microtubes contenant l'éthanol sont: la même espèce de phlébotome, le même sexe (mâle ou femelle), le même état de réplétion pour les femelles (gorgées ou non-gorgées) et la même zone de piégeage.

#### **III.3.3. Analyse de la source du repas sanguin par MALDI-TOF MS**

L'identification de l'origine du repas de sang des phlébotomes gorgés a été tout d'abord effectuée à l'aide de l'approche récente de cartographie de masse peptidique par spectrométrie de masse MALDI-TOF, selon le protocole décrit par Hlavackova *et al.* (2019). L'analyse des repas de sang par cette technique a été menée pour tous les spécimens collectés au niveau des deux régions d'étude, Bougaa et Kherrata. L'efficacité de cette approche peptidique pour la détermination de l'origine des repas sanguins a ensuite été comparée à une approche moléculaire (section III.3.4.3), le séquençage de l'ADN, qui représente aujourd'hui la méthode conventionnelle d'identification de l'hôte vertébré à l'origine du repas sanguin chez les arthropodes hématophages. À cette fin, certaines femelles gorgées, dont le repas de sang avait été préalablement analysé par MALDI-TOF, ont été soumises à une analyse d'identification des repas de sang à l'aide du séquençage du gène mitochondrial du Cyt *b*.

##### **III.3.3.1. Aperçu général sur la technique**

L'analyse par le PMM ou cartographie de masses peptidiques «en anglais *Peptide Mass Mapping*-based MALDI-TOF MS» cible l'hémoglobine, l'une des protéines les plus abondantes dans le sang (Hlavackova *et al.*, 2019). Bien que hautement conservée à travers les taxons, l'hémoglobine présente également de petites variations dans la séquence qui peut

être utilisée pour une identification précise du sang de l'hôte au niveau de l'espèce (Song *et al.*, 2015). L'approche de cartographie de masses peptidiques est principalement connue comme un outil d'identification de protéines utilisant une digestion protéolytique de la protéine d'intérêt suivie d'une analyse par spectrométrie de masse du mélange de peptides résultant (Steen et Mann, 2004). Les masses mesurées des peptides détectés sont comparées à celles prédites qui peuvent être générées à partir d'une séquence protéique connue en utilisant un programme tel que PeptideMass (Wilkins *et al.*, 1997). Le spectre enregistré, appelé carte de masse peptidique, représente un ensemble de signaux peptidiques caractéristiques non seulement de la protéine en question, mais également de l'organisme d'où provient la protéine. Les séquences de ces fragments peptidiques spécifiques, ici les peptides de l'hémoglobine de l'hôte, sont ensuite déterminées par séquençage MS/MS à l'aide du spectromètre de masse MALDI-TOF afin de réaliser l'identification de la source du repas sanguin (Hlavackova *et al.*, 2019).

L'approche de *Peptide Mass Mapping* (PMM), contrairement au profilage protéique par MALDI-TOF MS, ne nécessite pas la création d'une base de données spécifique car elle utilise des bases de données publiques déjà existantes telles que la base de données de protéines UniProt. Cette nouvelle approche peptidique est très simple et rapide et ne nécessite aucune séparation par chromatographie en phase liquide (Liquid Chromatography, LC) avant la spectrométrie de masse comme les approches basées sur la LC-MS/MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry). L'échantillon est mesuré directement après digestion à la trypsine sans aucune étape de purification et l'identification de l'hôte à partir de l'échantillon analysé est réalisée en moins d'une heure. Comme plusieurs échantillons peuvent être traités en parallèle, le débit réel de la méthode est en fait beaucoup plus élevé (Hlavackova *et al.*, 2019).

### **III.3.3.2. Préparation d'échantillons**

Les échantillons ont été préparés selon le protocole décrit par Hlavackova *et al.* (2019). Tout d'abord, les échantillons d'abdomens ont été séchés à l'air. Ensuite, ils sont homogénéisés individuellement dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml dans 50 µL d'eau distillée pendant 15 s (Merck KGaA) à l'aide d'un homogénéisateur manuel BioVortexer (BioSpec) et des pilons jetables stériles. Les homogénats ont été brièvement centrifugés à 10 000 g pendant 15 s, et 10 µL du surnageant de chaque échantillon ont ensuite été mélangés dans un nouveau microtube contenant 10 µl de tampon acétate de N-éthylmorpholine (50 mM, pH 8,1; Sigma-Aldrich) et 100 ng de trypsine Promega (*Sequencing Grade Trypsin*). Le mélange résultant a ensuite été incubé pendant 30 min à 37 °C. Après la digestion, 0,5 µl du mélange a été déposé

en double sur une plaque MALDI, soumis à un séchage à l'air à température ambiante et ensuite recouvert avec 0,5 µl de la matrice MALDI préparée avec l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (5mg/ml) dans un mélange de solutions contenant l'acétonitrile 50% et l'acide trifluoroacétique 0,1% (Sigma-Aldrich) (Hlavackova *et al.*, 2019).

### III.3.3.3. Identification de la source des repas de sang

Les échantillons ont été mesurés sur un spectromètre de masse Ultraflex III MALDI-TOF (Appareil Bruker Daltonics) dans une plage de masse comprise entre 700 et 4000 Da. Pour déterminer la source des repas sanguins, les cartes de masses peptidiques obtenues ont été comparées avec des peptides tryptiques générés *in silico* à partir d'hémoglobines de tous les hôtes vertébrés potentiels. Pour les repas de sang identifiés de manière équivoque (19 femelles) avec un faible nombre de fragments peptidiques appariés, au moins deux peptides par échantillon ont été sélectionnés pour le séquençage MS/MS en utilisant la technologie LIFT. Les spectres MS/MS obtenus ont été comparés à la base de données SwissProt avec le moteur de recherche MASCOT 2.4 (Matrix Science) pour confirmer l'attribution correcte de l'origine du repas de sang (Annexe 4).

### III.3.4. Surveillance moléculaire des phlébotomes par PCR

#### III.3.4.1. Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée à partir des 40 µL restants de l'homogénat d'abdomen «Protocole de MALDI-TOF», à l'aide du kit d'extraction manuelle d'ADN génomique: High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche®, Allemagne), et selon les recommandations du fabricant. Les extraits d'ADN obtenus ont été utilisés pour vérifier l'identification taxonomique de quelques spécimens de phlébotomes «par DNA Barcoding» et pour confirmer ainsi la source du repas sanguin de certaines femelles gorgées préalablement analysées par MALDI-TOF.

L'ADN génomique a également été extrait de la partie restante de chaque spécimen de phlébotome femelle «gorgé et non gorgé», en utilisant le même kit d'extraction et les mêmes instructions du fabricant. Les extraits d'ADN obtenus ont été utilisés pour la recherche de l'infection par *Leishmania* spp.

Les extraits d'ADN ont ensuite été stockés à -20 °C dans des conditions stériles jusqu'à l'amplification par PCR.

### III.3.4.2. Identification moléculaire des espèces de phlébotomes

Afin de confirmer l'identification taxonomique de quelques spécimens de phlébotomes, qui ont été difficilement identifiés au niveau de l'espèce par morphologie, une amplification par PCR standard et un séquençage de l'ADN ont été réalisés.

Une portion d'ADN correspondant à la fin de la région 5' du gène mitochondrial codant pour la cytochrome oxydase I (COI) (658 paires de bases (pb)), a été choisie comme barcode moléculaire universel «DNA Barcoding». Le barcoding est l'utilisation d'un seul marqueur génétique (i.e. COI) pour assigner un nom d'espèce connue à un spécimen non identifié. Les amorces universelles (LCO1490 et HCO2198) qui permettent l'amplification de ce fragment pour la majorité des arthropodes dont les phlébotomes, ont été utilisées comme décrit par Folmer *et al.* (1994).

Les extraits d'ADN obtenus précédemment ont servi de matrice pour l'amplification d'une portion du gène COI. Afin de vérifier l'amplification du gène cible, 10 µL d'amplicons ont été chargés sur un gel d'agarose (2%) contenant 2 µL de bromure d'éthidium. Les échantillons correctement amplifiés ont été tout d'abord purifiés avec le kit High Pure PCR Product Purification (Roche®, Allemagne) puis soumis à un séquençage Sanger dans les deux sens (forward and reverse) en utilisant le kit BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems™) et les mêmes amorces que pour l'amplification d'ADN. Les chromatogrammes obtenus ont été assemblés et édités en utilisant les logiciels BioEdit et Chromas, puis comparés à ceux disponibles dans la base de données GenBank en utilisant la recherche de BLAST nucléotide (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pour déterminer l'identification de l'espèce.

### III.3.4.3. Identification moléculaire de la source des repas de sang

Afin d'identifier la source des repas sanguins des phlébotomes collectés sur le terrain et qui ont été préalablement analysés par MALDI-TOF, une amplification par PCR standard et un séquençage de l'ADN des vertébrés sur lesquels ils se sont gorgés ont été réalisés.

Un total de 50 femelles a été choisi pour confirmer l'identification du repas de sang par PCR-Cyt-*b*. Cyt *b* est le gène le plus couramment utilisé pour identifier les sources de repas de sang chez les phlébotomes et de nombreux autres insectes hématophages (Kent, 2009). Parmi les femelles choisies, treize pour lesquelles le MALDI-TOF n'a fourni aucune identification d'hôte, ont été sélectionnées. De plus, 19 spécimens qui ont fourni des spectres de masse de moindre qualité, nécessitant une vérification supplémentaire par séquençage MS/MS, ont également été sélectionnés. Enfin, 18 spécimens (9 de chaque commune) avec

une identification concluante de l'hôte vertébré, à l'aide de MALDI-TOF, ont également été choisis au hasard pour le séquençage de l'ADN.

L'ADN des femelles gorgées a été utilisé comme matrice pour l'amplification d'un fragment (359 pb) du gène *Cyt b* à l'aide d'amorces universelles «*Cyto1* et *Cyto 2*» pour les vertébrés (Abbasi *et al.*, 2009) dans 50 µL de mélange réactionnel avec Emerald Amp GT PCR Master Mix (Takara Bio, Inc.). Comme précédemment, les amplicons ont été tout d'abord vérifiés sur gel d'agarose à 2%, purifiés avec le kit High Pure PCR Product Purification (Roche®, Allemagne), puis soumis à un séquençage Sanger dans les deux sens (forward and reverse) en utilisant le kit BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems™) et les mêmes amorces que pour l'amplification d'ADN. Les séquences obtenues ont été assemblées et éditées en utilisant les logiciels BioEdit et Chromas, puis comparées à celles disponibles dans la base de données GenBank en utilisant le programme NCBI BLAST.

De plus, afin de confirmer l'identification des repas de sang bovin, canin et ovin, un test PCR multiplex utilisant des amorces spécifiques à l'espèce cible, pour amplifier des fragments dont la taille est spécifique du gène *Cyt b* des hôtes vertébrés, a été effectué comme précédemment publié (Garros *et al.*, 2011). La PCR multiplex a été réalisée dans un mélange réactionnel de 50 µL avec Emerald Amp GT PCR Master Mix (Takara Bio, Inc.) pour les échantillons KA37 (sang canin amplifié par l'amorce directe UNIV1 et l'amorce inverse CANIS), KA60 (sang ovin amplifié par l'amorce directe UNIV2 et l'amorce inverse OVIS), KA23 et KA24 (sang bovin amplifié par l'amorce directe UNIV2 et l'amorce inverse BOS). Les amplicons ont été visualisés sur un gel d'agarose à 2% à côté de GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) après coloration au SYBR Safe (Invitrogen) pour déterminer leur différence de taille.

#### **III.3.4.4. Détection moléculaire de *Leishmania* spp.**

Tous les phlébotomes femelles capturés, quelques soient gorgés (154 spécimens) ou non gorgés (942 spécimens) de sang, ont été soumis à une analyse moléculaire par PCR afin de détecter la présence éventuelle d'ADN de *Leishmania* spp.

Les ADNs de ces phlébotomes ont été organisés dans 106 pools monospécifiques (environ dix spécimens par pool; 4 µL d'ADN de chaque spécimen), afin d'étudier la présence de *Leishmania* spp. par PCR en utilisant des amorces spécifiques au genre ciblant l'ADNk (F et R) et l'ITS1 (L5.8S et LITSR) des leishmanies comme décrit par Rodgers *et al.* (1990) et Schönian *et al.* (2003), respectivement. Pour chaque pool, nous avons pris en compte: la même espèce de phlébotome, le même état de réplétion et le même lieu d'échantillonnage.

La réaction de PCR a été réalisée avec le Master Mix DreamTaq (Thermo Scientific) dans un mélange réactionnel de 50 µL pour la PCR-ITS1 et dans un mélange de 25 µL pour la PCR-ADNk. Des contrôles négatifs (eau exempte d'ADN) et positifs (ADN extrait des promastigotes de *L. major*) ont été inclus pour les deux tests PCR, afin de détecter toute contamination possible pendant la préparation du mélange. Les produits de PCR amplifiés ont été séparés et visualisés sur un gel d'agarose à 2% à l'aide d'une machine à ultraviolet après coloration au bromure d'éthidium.

Les séquences d'amorces ainsi que les conditions de réactions utilisées dans notre investigation moléculaire sont détaillées dans le tableau 7.

### III.3.5. Analyse des données

Une analyse statistique a été également effectuée afin d'estimer la prévalence (P) de l'infection parasitaire chez les femelles de phlébotomes testées dans cette étude. C'est-à-dire le rapport en pourcentage du nombre de femelles infectées (N) sur le nombre des femelles testées (S).

$$P (\%) = (N/S) \times 100$$

Le taux d'identification réussie des repas sanguins pour chaque méthode utilisée est calculé en divisant le nombre de repas identifiés (I) sur le nombre de repas analysés (A), multiplié par 100.

$$T (\%) = (I/A) \times 100$$

En outre, l'abondance de chaque espèce de phlébotomes par rapport au nombre total collecté a été également calculée.

**Tableau 7:** Séquences d'amorces et conditions principales des PCR utilisées.

L'ADN cible	Nom des amorces	Séquence d'amorces (5'- 3')	Conditions d'amplification	Conditions de réaction PCR	Référence
le gène du cytochrome c oxydase I (COI) des phlébotomes	LCO 1490 HCO 2198	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG3 TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAATCA		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Taq DNA Polymerase: 0.3 µl</li> <li>• 10x PCR buffer (NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>): 5 µl</li> <li>• MgCl<sub>2</sub>: 5 µl</li> <li>• dNTP: 5 µl</li> <li>• Amorce sens: 2.5 µl</li> <li>• Amorce anti-sens: 2.5 µl</li> <li>• Matrice d'ADN: 4 µl</li> <li>• H<sub>2</sub>O: 25,7 µl</li> </ul>	<b>Folmer et al. (1994)</b>
le gène du cytochrome- <i>b</i> des vertébrés	Cyto1 Cyto2	CCATCAAACATCTCAGCATGATGAAA CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC		<ul style="list-style-type: none"> <li>• EmeraldAmp GT PCR Master Mix: 25 µl</li> <li>• Amorce sens: 2 µl</li> <li>• Amorce anti-sens: 2 µl</li> <li>• Matrice d'ADN: 5 µl</li> <li>• H<sub>2</sub>O: 16 µl</li> </ul>	<b>Abbasi et al. (2009)</b>
le gène kinétoplastique de <i>Leishmania</i>	F R	GTGGGGGAGGGGCGTTCTG AAACTGGGGGTTGGTGTAATAAT		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dream Taq Master Mix: 12,5 µl</li> <li>• Amorce sens: 1 µl</li> <li>• Amorce anti- sens: 1 µl</li> <li>• Matrice d'ADN: 2 µl</li> <li>• H<sub>2</sub>O: 8,5 µl</li> </ul>	<b>Rodgers et al. (1990)</b>

Tableau 7. (Suite)

L'ADN cible	Nom des amorces	Séquence d'amorces (5'- 3')	Conditions d'amplification	Conditions de réaction PCR	Référence
le gène ribosomal ITS1 de <i>Leishmania</i>	L5.8S LITSR	TGATACCACTTATCGCACTT CTGGATCATTTCGGATG		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dream Taq Master Mix : 25 µl</li> <li>• Amorce sens : 2 µl</li> <li>• Amorce anti-sens : 2 µl</li> <li>• Matrice d'ADN : 4 µl</li> <li>• H<sub>2</sub>O : 17 µl</li> </ul>	Schönian <i>et al.</i> (2003)
le gène du cytochrome- <i>b</i> des vertébrés	UNIV1 CANIS	GACCAATGATATGAAAAACCATCGTTGT CAAGCATACTCCTAGTAAGGATCCG		<ul style="list-style-type: none"> <li>• EmeraldAmp GT PCR Master Mix: 25 µl</li> <li>• Amorce sens: 2 µl</li> <li>• Amorce anti-sens : 2 µl</li> <li>• Matrice d'ADN : 4 µl</li> <li>• H<sub>2</sub>O : 17 µl</li> </ul>	Garros <i>et al.</i> (2011)
	UNIV2 OVIS	TGAGGACAAATATCATTYTGAGGRGC GGCGTGAATAGTACTAGTAGCATGAGGATGA		<ul style="list-style-type: none"> <li>• EmeraldAmp GT PCR Master Mix: 25 µl</li> <li>• Amorce sens: 2 µl</li> <li>• Amorce anti-sens : 1 µl</li> <li>• Matrice d'ADN : 4 µl</li> <li>• H<sub>2</sub>O : 17 µl</li> </ul>	
	UNIV2 BOVIS	TGAGGACAAATATCATTYTGAGGRGC TAAGATGTCCTTAATGGTATAGTAG		<ul style="list-style-type: none"> <li>• EmeraldAmp GT PCR Master Mix: 25 µl</li> <li>• Amorce sens: 2 µl</li> <li>• Amorce anti-sens : 1 µl</li> <li>• Matrice d'ADN : 4 µl</li> <li>• H<sub>2</sub>O : 17 µl</li> </ul>	

**EmeraldAmp GT PCR Master Mix:** Optimized reaction buffer, PCR enzyme, dNTPs mixture, gel loading dye (green), and a density reagent,

**Dream Taq Master Mix:** DreamTaq DNA Polymerase, optimized DreamTaq buffer, MgCl<sub>2</sub>, and dNTPs.

### **III.4. Résultats**

#### **III.4.1. Résultats de l'étude entomologique**

##### **III.4.1.1. Identification de la faune de phlébotomes**

Les phlébotomes ont été présents dans les deux communes prospectées. Un total de 1940 phlébotomes a été collecté entre Juin et Septembre 2019, durant leur saison d'activité.

Selon les résultats de l'identification taxonomique, la faune de phlébotomes dans les différents sites prospectés était composée de trois espèces. Elles appartenaient toutes au genre *Phlebotomus* et au sous-genre *Larroussius*; *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus*, *P. (L.) perfiliewi* et *P. (L.) longicuspis*. Aucune forme atypique de *P. perniciosus* n'a été observée.

Une confirmation supplémentaire a été obtenue en utilisant le "DNA Barcoding (COI gène)" pour douze spécimens gorgés, qui ont présenté des caractères morphologiques non concluants. Il s'agit de six spécimens de *P. perfiliewi* et six spécimens de *P. perniciosus*. Les séquences obtenues ont été alignées avec succès avec les entrées présentes dans GenBank en utilisant l'algorithme BLAST (tous les spécimens identifiés par «DNA Barcoding» sont marqués d'un astérisque, voir Annexe 4).

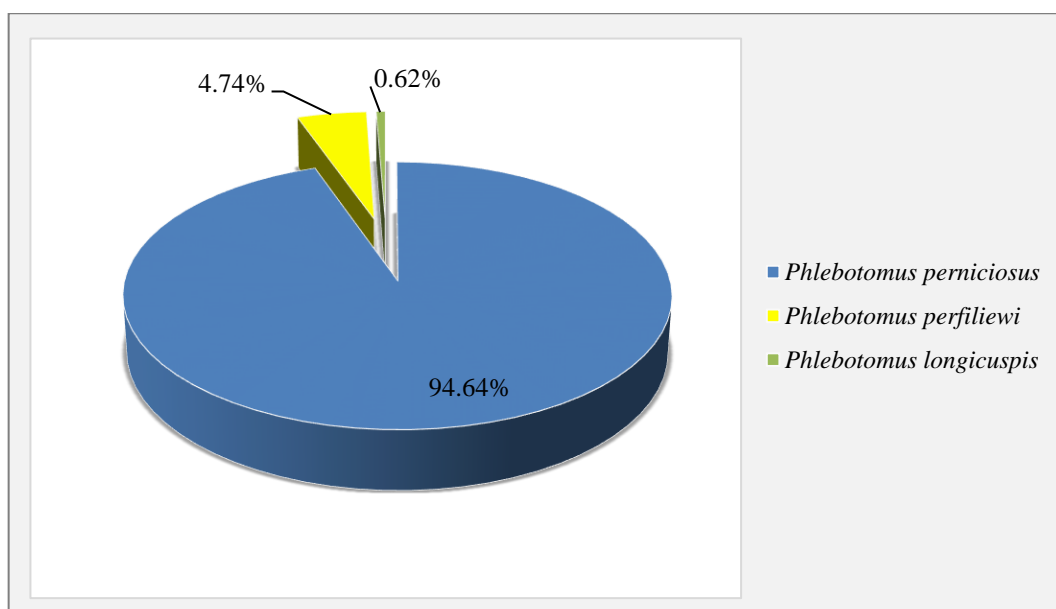
En conclusion, les résultats de l'identification moléculaire des douze spécimens de phlébotomes sélectionnés étaient en parfait accord avec l'identification morphologique.

##### **III.4.1.2. Abondance et densité de la faune de phlébotomes**

###### **III.4.1.2.1. Résultats globaux**

La capture des phlébotomes à l'aide des pièges CDC a permis la collecte d'un total de 1940 exemplaires. Les résultats des études entomologiques utilisant des pièges lumineux CDC sont résumés dans la figure 34 et le tableau 8.

*P. perniciosus* était l'espèce la plus abondante, totalisant 94,64% (N = 1836) des individus piégés, suivi de *P. perfiliewi* (4,74% ; N = 92). Ces deux espèces représentaient ensemble 99,38% des espèces identifiées. *P. longicuspis* était une espèce rare, comptant pour 0,62% (N = 12) de la faune.



**Figure 34:** Abondance relative des espèces de phlébotomes récoltées.

La densité globale de phlébotomes capturés était de 48,5 phlébotomes/piège/nuit. En ce qui concerne la densité de chaque espèce de phlébotome récoltée, on note une importante densité pour *P. perniciosus* avec 45,9% phlébotomes/piège/nuit, alors qu'elle était plus faible pour *P. perfiliewi* et *P. longicuspis*, avec respectivement 2,3 et 0,3 phlébotomes/piège/nuit.

Globalement, une prédominance de femelles (N = 1096; 56,49%) par rapport aux mâles (N = 844; 43,51%) a été notée, avec un sexe-ratio (M/F) de 0,77.

#### III.4.1.2.2. Résultats par région de capture

Les résultats de l'étude entomologique en fonction de sites de capture sont rapportés dans le tableau 8.

D'après les résultats du tableau 8 on note que plus de la moitié des phlébotomes a été capturée à Bougaa avec 1188 spécimens, soit 61,24%. La densité des phlébotomes dans ce site est de 59,4 phlébotomes/piège/nuit. A Kherrata, un total de 752 spécimens a été collecté, représentant 38,76% des spécimens récoltés. La densité des phlébotomes à Kherrata est de 37,6 phlébotome/piège/nuit.

La composition de la faune des phlébotomes s'est révélée similaire dans les deux zones d'étude, avec la présence des mêmes espèces mentionnées ci-dessus dans chaque site.

**Tableau 8:** Répartition des espèces de phlébotomes inventoriées dans les deux régions d'étude.

Genre	Sous-genre	Espèce	Sites d'étude											
			Bougaa				Kherrata				Total			
			M/F	Nb	AR (%)	D	M/F	Nb	AR (%)	D	M/F	Nb	AR (%)	D
<i>Phlebotomus</i>	<i>Larrousius</i>	<i>P. perniciosus</i>	536/588	1124	94.61	56,2	276/436	712	94.68	35,6	812/1024	1836	94.64	45,9
		<i>P. perfiliewi</i>	08/48	56	4.71	2,8	16/20	36	4.79	1,8	24/68	92	4.74	2,3
		<i>P. longicuspis</i>	08/00	08	0.67	0,4	00/04	04	0.53	0,2	08/04	12	0.62	0,3
<b>Total</b>			552/636	1188	100%	59,4	292/460	752	100%	37,6	844/1096	1940	100%	48,5

M : nombre de spécimens mâles, F : nombre de spécimens femelles, Nb : nombre d'individus mâle et femelle capturés, AR: abondance relative (%), D: densité des espèces (Individu/piège/nuit)

L'abondance relative et la densité de chaque espèce de phlébotome dans chacune des deux régions de collecte sont comme suit (Tableau 8, Figure 35):

**1). *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* Newstead.**

C'était l'espèce la plus abondante dans les deux zones d'étude. Au total, 1124 (94,61%) spécimens ont été collectés à Bougaa. Parmi eux, 588 (52,31%) étaient des femelles. Cette espèce représentait 94,68% (N = 712) des phlébotomes récoltés à Kherrata, avec un nombre de femelles plus élevé (N = 436 ; 61,24%) que celui des mâles (N = 276 ; 38,76%).

La densité de *P. perniciosus* à Bougaa était de 56,2 phlébotome/piège/nuit, alors qu'elle était de 35,6 phlébotome/piège/nuit à Kherrata.

**2). *Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi* Parrot.**

Il s'agit de la deuxième espèce la plus abondante dans les deux zones d'étude. Cinquante-six spécimens (4,71%) ont été collectés à Bougaa, dont 48 (85,71%) étaient des femelles. Cette espèce représentait 4,79% (N = 36) des phlébotomes inventoriés à Kherrata, avec une légère prédominance des femelles (N = 20 ; 55,56%).

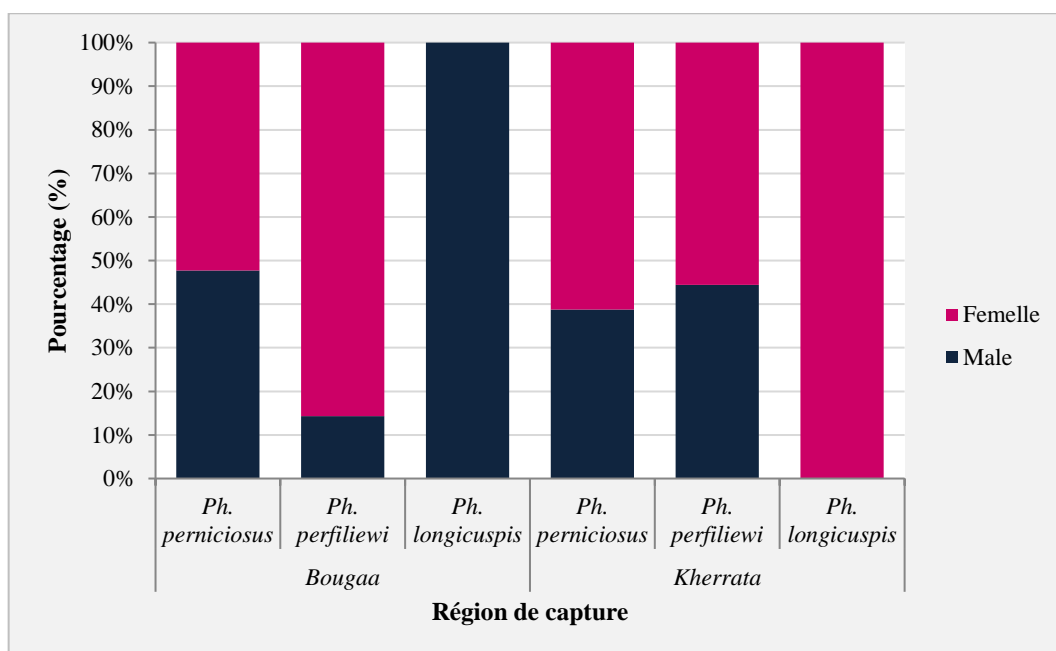
La densité de *P. perfiliewi* est généralement faible dans les deux sites prospectés (2,8 phlébotome/piège/nuit pour Bougaa et 1,8 pour Kherrata).

**3). *Phlebotomus (Larroussius) longicuspis* Nitzulescu.**

Cette espèce était rare à la fois à Kherrata et à Bougaa. Un total de huit spécimens (tous étaient des femelles, 0,67%) a été collecté à Bougaa, alors que quatre spécimens (tous étaient des mâles, 0,53%) provenaient de la région de Kherrata.

La densité de *P. longicuspis* est nettement très faible, elle représente moins de 0,4 phlébotome/piège/nuit dans chaque site.

En général, on note une abondance relativement élevée et une densité plus importante pour *P. perniciosus* par rapport aux deux autres espèces récoltées.



**Figure 35:** Répartition des espèces de phlébotomes capturées selon le sexe dans chaque région d'étude.

### III.4.2. Résultats de l'identification du repas de sang des phlébotomes

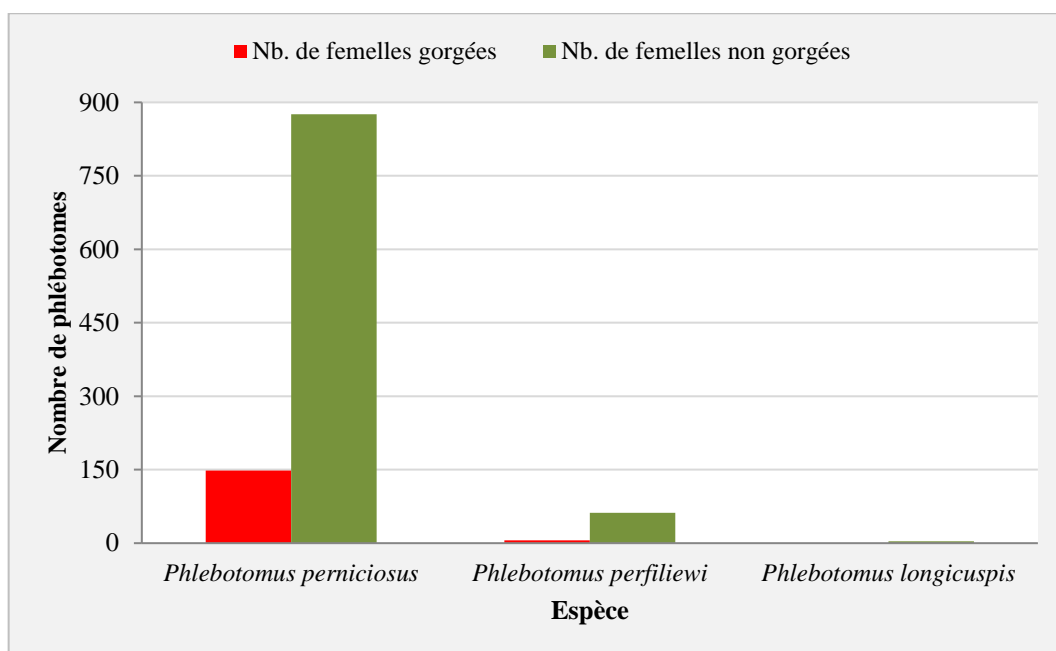
#### III.4.2.1. État de réplétion des phlébotomes femelles

Les phlébotomes femelles capturés ont été classés en deux catégories suivant leur état de réplétion: femelles à jeun (ou non gorgées) et femelles gorgées. On appellera « phlébotome femelle gorgé » un phlébotome dont l'abdomen plus ou moins volumineux présente par transparence une tache sombre occupant tout l'abdomen (réplétion totale) ou seulement une partie (réplétion partielle). L'étendue de cette tache dépend de l'ancienneté du repas de l'insecte et du volume de ce dernier. Par opposition, le « phlébotome femelle non gorgé » sera celui dont l'abdomen est blanchâtre, sans tache nettement visible.

##### III.4.2.1.1. Résultats globaux

La répartition des femelles inventoriées selon leur état de réplétion est donnée dans la figure 36 et le tableau 9.

Au total, 154 femelles sur 1096 recensées ont pris au moins un repas de sang, ce qui représente 14,05% de toutes les femelles de phlébotomes récoltées. Les femelles gorgées ont été identifiées comme appartenant à *P. perniciosus* (N = 148 ; 96,10%) et *P. perfiliewi* (N = 6 ; 3,90%). Aucune femelle gorgée n'a été observée pour *P. longicuspis*.



**Figure 36:** État de réplétion des espèces de phlébotomes capturées.

#### III.4.2.1.2. Résultats par région de capture

La répartition des femelles capturées selon leur état de réplétion dans chacune des deux régions d'étude est représentée dans le tableau 9.

Les femelles gorgées de sang ont été faiblement représentées, constituant 12,58% des femelles récoltées à Bougaa et 16,09% des femelles récoltées à Kherrata. Les non gorgées représentaient l'état de réplétion le plus fréquent avec un taux de 87,42% pour Bougaa et 83,91% pour Kherrata.

Pour chaque espèce de phlébotome et pour chaque région d'étude on note :

##### 1) *Phlebotomus (Larrousius) perniciosus* Newstead.

Sur un total de 588 femelles de *P. perniciosus* inventoriées à Bougaa, 79 (13,44%) étaient fraîchement gorgées. Les non gorgés constituaient l'état de réplétion le plus fréquent, soit 86,56% (N = 509) des femelles capturées. Le même constat a été fait pour cette espèce à Kherrata où la catégorie la plus abondante est celle des femelles non gorgées avec un taux de 84,17% (N = 367), contre 15,83% (N = 69) pour les femelles gorgées.

##### 2). *Phlebotomus (Larrousius) perfiliewi* Parrot.

Sur les 20 femelles recensées à Kherrata, cinq présentaient du sang dans leur abdomen, ce qui représente 25% du total des femelles récoltées dans ce site. Un seul spécimen a été trouvé gorgé de sang à Bougaa, soit 2,08% des effectifs.

**Tableau 9:** État de réplétion de phlébotomes femelles capturés dans les deux régions d'étude.

Espèces	Bougaa			Kherrata			Total		
	Femelles collectées <i>Nb.</i>	Femelles non gorgées <i>Nb. (%)</i>	Femelles gorgées <i>Nb. (%)</i>	Femelles collectées <i>Nb.</i>	Femelles non gorgées <i>Nb. (%)</i>	Femelles gorgées <i>Nb. (%)</i>	Femelles collectées <i>Nb.</i>	Femelles non gorgées <i>Nb. (%)</i>	Femelles gorgées <i>Nb. (%)</i>
<i>P. perniciosus</i>	588	509 (86.56)	79 (13.44)	436	367 (84.17)	69 (15.83)	1024	876 (85.55)	148 (14.45)
<i>P. Perfiliewi</i>	48	47 (97.92)	01 (2.8)	20	15 (75)	05 (25)	68	62 (91.18)	06 (8.82)
<i>P. longicuspis</i>	0	0	0	04	04 (100)	0	04	04 (100)	0
<b>Total</b>	636	556 (87.42)	80 (12.58)	460	386 (83.91)	74 (16.09)	1096	942 (85.95)	154 (14.05)

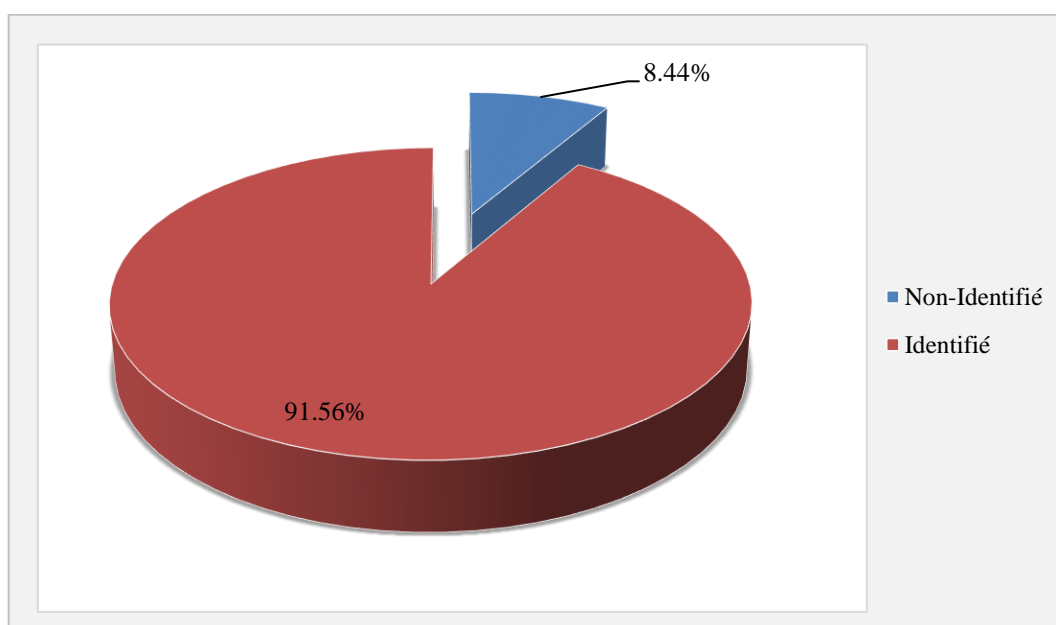
*Nb.* Nombre de phlébotomes femelles

### III.4.2.2. Résultats de l'identification du repas sanguin par MALDI-TOF MS

#### III.4.2.2.1. Résultats globaux

L'identification de l'origine du repas sanguin des phlébotomes femelles, partiellement ou totalement gorgées de sang, par le MALDI-TOF MS, a été réalisée avec succès, à partir de 141 spécimens, soit un taux de 91,56% du total analysé. Il s'agit de 135 femelles de *P. perniciosus* et 6 femelles de *P. perfiliewi*.

L'identification a échoué pour 8,44% des spécimens de phlébotomes gorgés. Il s'agit de treize femelles de *P. perniciosus* (Figure 37, Tableau 10, Annexe 4).

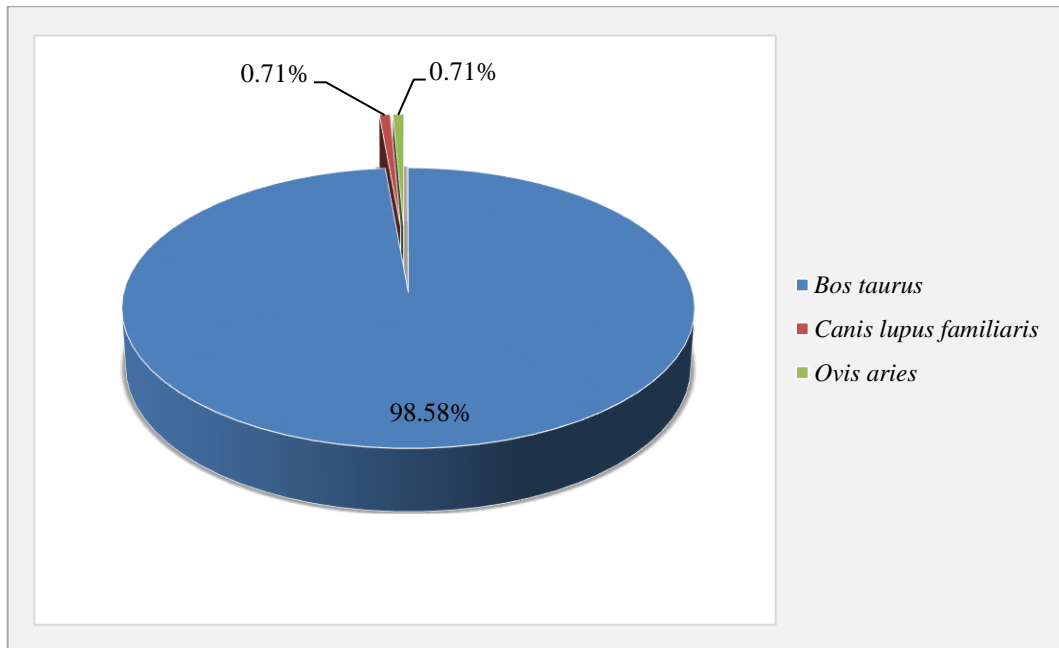


**Figure 37:** Taux d'identification réussi de l'origine des repas de sang par MALDI-TOF MS.

La majorité des échantillons identifiés (122 sur 141 ; 86,52%) ont produit des spectres de haute qualité permettant une détermination concluante de la source des repas de sang. Pour 19 échantillons (13,48%) donnant des spectres avec un nombre inférieur de peptides appariés, l'attribution de l'hôte a été confirmée à l'aide d'un séquençage MS/MS supplémentaire (Annexe 4).

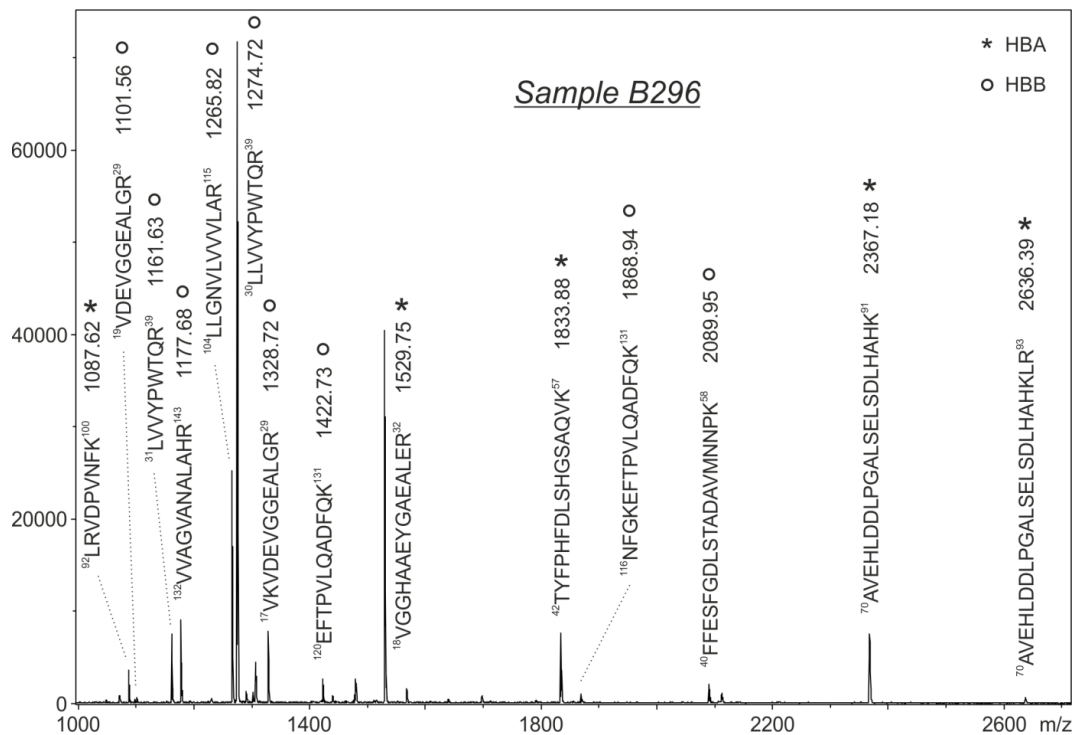
Dans tous les échantillons identifiés avec succès, les bovins (*Bos taurus*) ont été détectés comme la seule source des repas de sang (N = 139 ; 98,58%), à l'exception de deux femelles de *P. perniciosus* où le sang de chien domestique (*Canis lupus familiaris*) et de mouton (*Ovis aries*), respectivement, a été identifié (0,71%).

Un seul hôte a été noté chez toutes les femelles analysées et aucun repas mixte n'a été enregistré (Figure 38, Annexe 4).



**Figure 38:** Origine du repas de sang des phlébotomes gorgés analysés par MALDI-TOF MS.

La figure suivante représente la carte de masse peptidique de l'abdomen d'une femelle de *P. perniciosus* digéré à la trypsine et analysé par MALDI-TOF MS.



**Figure 39:** Identification de l'origine du repas de sang du spécimen BO296 par MALDI-TOF.

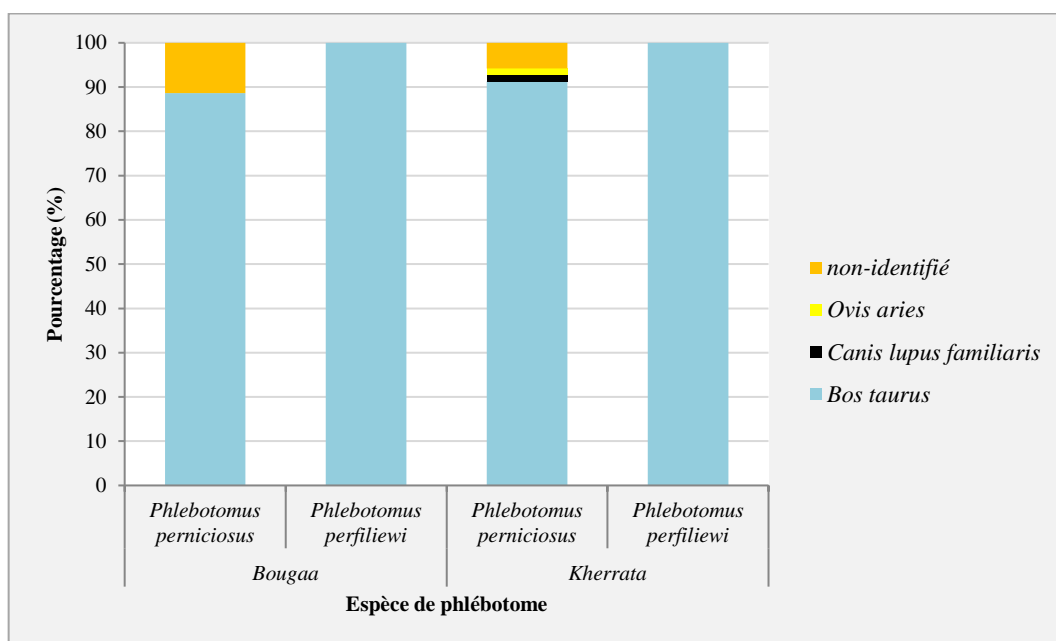
Carte de masse peptidique de l'abdomen digéré à la trypsine du spécimen BO296 capturé à Bougaa. Les pics attribués sont marqués par des séquences peptidiques de la sous-unité alpha (HBA ; astérisques) et de la sous-unité bêta (HBB ; cercles) de l'hémoglobine de bovin.

### III.4.2.2.2. Résultats par site de capture

Les résultats de l'identification de l'origine des repas de sang par MALDI-TOF MS en fonction de la région où les phlébotomes ont été capturés sont rapportés dans la figure 40, le tableau 10 et l'annexe 4.

Le MALDI-TOF MS a permis l'identification de la source des repas de sang chez 70 (94,59%) et 71 (88,75%) femelles gorgées capturées respectivement à Kherrata et à Bougaa.

Pour chaque espèce de phlébotome et pour chaque région d'étude on note:



**Figure 40:** Origine du repas de sang des phlébotomes gorgés capturés dans chaque région d'étude et analysés par MALDI-TOF MS.

#### 1) *Phlebotomus (Larrousius) perniciosus* Newstead.

L'identification réussie de l'origine du repas de sang réalisée chez 70 femelles de *P. perniciosus* capturées à Bougaa a montré la dominance exclusive de bovins comme source de repas de sang pour cette espèce de phlébotome. Neuf repas de sang n'ont pas été identifiés (11,39%).

L'analyse de 69 femelles de *P. perniciosus*, récoltées à Kherrata, pour leur origine de repas de sang a montré un taux d'identification réussi de 94,20%, avec la présence de trois espèces différentes de vertébrés. Cependant, le nombre de phlébotomes qui présentaient du sang de bovin dans leur abdomen était plus fréquent, soit 96,92% (N = 63) des repas identifiés. Les deux autres repas de sang identifiés concernaient deux espèces de vertébrés domestiques, dont un canin et un autre ovin.

## 2). *Phlebotomus (Larrousius) perfiliewi* Parrot.

En ce qui concerne *P. perfiliewi*, les origines des repas de sang ont été identifiées avec succès pour tous les spécimens gorgés capturés (5 à Kherrata et 1 à Bougaa). Toutes les femelles gorgées de cette espèce avaient pris leur repas sanguin de bovins (*Bos taurus*).

### III.4.2.3. Résultats de l'identification moléculaire du repas sanguin

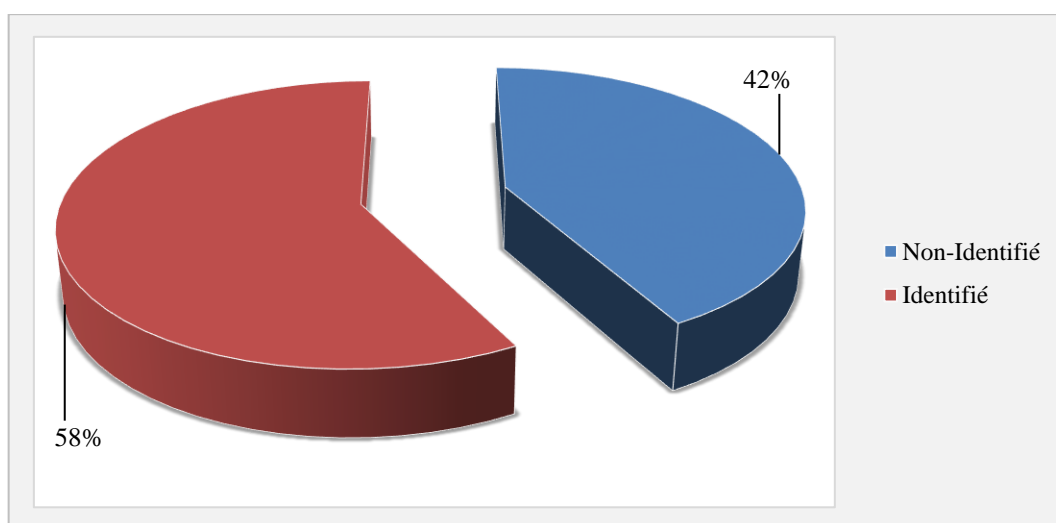
#### III.4.2.3.1. Par PCR-Séquençage

Les résultats de l'identification moléculaire des repas de sang par le séquençage d'ADN sont donnés dans la figure 41, le tableau 10 et l'annexe 4.

Au total, 50 femelles gorgées ont été sélectionnées pour l'analyse de l'origine de leur repas sanguin en utilisant le séquençage du gène *Cyt b* de l'hôte vertébré.

Parmi les femelles choisies, treize échantillons (*P. perniciosus*) pour lesquels le MALDI-TOF MS n'a fourni aucune identification d'hôte, aucune amplification du fragment de gène ciblé n'a été obtenue. Pour 18 échantillons (12 *P. perniciosus* et 6 *P. perfiliewi*) où le MALDI-TOF MS a permis d'identifier sans ambiguïté l'hôte vertébré, la source du repas de sang a été confirmée pour tous les spécimens (16 repas de sang bovins, 1 canin et 1 ovin) lorsque les séquences ont été interrogées contre la base de données GenBank à l'aide de l'algorithme BLAST. Pour les 19 échantillons restants (19 *P. perniciosus*) où l'origine du repas sanguin a été vérifiée par séquençage MS/MS, l'amplification et le séquençage du gène *Cyt b* ont été couronnés de succès pour 12 échantillons (repas de sang bovins).

Le taux de réussite global de l'identification de l'origine des repas de sang par PCR-séquençage, ciblant le gène *b* du cytochrome mitochondrial, était de 58% (29/50).



**Figure 41:** Taux d'identification réussi des repas de sang par séquençage du gène *Cyt b*.

**Tableau 10:** Origine du repas de sang des phlébotomes gorgés capturés à Bougaa et Kherrata.

Espèce de phlébotome	Sources des repas de sang	Site d'étude					
		Bougaa		Kherrata		Total	
		Cyt <i>b</i> N = 29	MALDI-TOF N = 80	Cyt <i>b</i> N = 21	MALDI-TOF N = 74	Cyt <i>b</i> N = 50	MALDI-TOF N = 154
<i>P. perniciosus</i>	Bovin ( <i>Bos taurus</i> )	15	70	6	63	21	133
	Chien ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	0	0	1	1	1	1
	Ovin ( <i>Ovis aries</i> )	0	0	1	1	1	1
	Non identifié	13	9	8	4	21	13
<i>P. perfiliewi</i>	Bovin ( <i>Bos taurus</i> )	1	1	5	5	6	6
	Chien ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	0	0	0	0	0	0
	Ovin ( <i>Ovis aries</i> )	0	0	0	0	0	0
	Non identifié	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	Bovin ( <i>Bos taurus</i> )	16	71	11	68	27	139
	Chien ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	0	0	1	1	1	1
	Ovin ( <i>Ovis aries</i> )	0	0	1	1	1	1
	<b>Identifié</b>	<b>16 (55,17)</b>	<b>71 (88,75)</b>	<b>13 (61,9)</b>	<b>70 (94,59)</b>	<b>29 (58,0)</b>	<b>141 (91,56)</b>
	<b>Non identifié</b>	<b>13 (44,83)</b>	<b>9 (11,25)</b>	<b>8 (38,10)</b>	<b>4 (5,41)</b>	<b>21 (42,0)</b>	<b>13 (8,44)</b>

N : Nombre de phlébotomes analysés

### III.4.2.3.2. Par PCR-Multiplex

Pour un échantillon canin, un échantillon ovin et deux échantillons bovins choisis au hasard, le test PCR multiplex, utilisant des amorces inverses spécifiques à l'espèce, a amplifié avec succès les produits-PCR de tailles attendues spécifiques à l'espèce (*Bos taurus* : 287 pb, *Ovis aries* : 336 pb, *Canis lupus familiaris* : 170 pb), qui ont confirmé l'identification de l'hôte dans ces échantillons lorsqu'ils sont séparés et visualisés sur gel d'agarose.

### III.4.3. Détection moléculaire de l'ADN de *Leishmania* chez les phlébotomes

La recherche de l'infection à *Leishmania* spp. a été réalisée en utilisant des extraits d'ADN préparés à partir d'un total de 1096 spécimens de phlébotomes femelles répartis en 106 pools monospécifiques.

Un total de 636 phlébotomes femelles répartis en 60 pools (52 pools monospécifiques pour *P. perniciosus* et 8 pour *P. perfiliewi*) et capturés à Bougaa ont été analysés pour la détection de l'infection naturelle par *Leishmania*. Aucun de ces pools ne s'est révélé positif, que ce soit par PCR-ADNk ou PCR-ITS1.

Des résultats similaires ont également été obtenus à partir de 46 pools (460 femelles) de phlébotomes (40 pools pour *P. perniciosus*, 4 pools pour *P. perfiliewi* et 2 pools pour *P. longicuspis*) collectés à Kherrata.

Au total, la prévalence (P) de l'infection par *Leishmania* chez les phlébotomes capturés est de 0%.

## III.5. Discussion

Les phlébotomes sont des insectes d'une grande importance médicale et vétérinaire en raison de leur implication dans la transmission de diverses espèces de *Leishmania* à plusieurs hôtes vertébrés, y compris les humains et les chiens. La pertinence de rassembler les connaissances associées aux phlébotomes dans un foyer donné est cruciale pour comprendre l'épidémiologie de la leishmaniose et pour mieux contrôler sa transmission et sa propagation.

Dans cette étude, nous avons rapporté la faune de phlébotomes vecteurs, leur statut d'infection par *Leishmania* spp. ainsi que leur préférence trophique, dans les zones rurales de Bougaa et Kherrata, deux communes situées dans la région de Kabylie, où une importante prévalence d'infection par *L. infantum* a été rapportée chez les chiens (Tahir, 2014; Adel *et al.*, 2015; Medkour, 2017; Medkour *et al.*, 2019a, b). Ces deux régions sont également les principaux foyers de LV dans les deux wilayas auxquelles elles appartiennent, bien qu'une forte diminution de l'incidence de cette maladie y ait été observée ces dernières années (DSP de Sétif et Béjaïa).

Nos échantillonnages de phlébotomes ont été effectués à l'aide de pièges lumineux du type « miniature C.D.C light-trap ». Ces pièges ont été validés comme système de collecte de phlébotomes dans le cadre d'études de surveillance entomologique de leishmanioses. Leur utilisation dans la collecte d'autres insectes responsables de la transmission d'autres maladies vectorielles émergentes et réémergentes est également faisable (Berdjane-Brouk *et al.*, 2011; Boubidi *et al.*, 2011; Branco *et al.*, 2013; Bravo-Barriga *et al.*, 2016; Lafri *et al.*, 2016; Bennai *et al.*, 2018; Gherbi *et al.*, 2020). Les spécimens capturés vivants au moyen des pièges CDC permettent d'entreprendre de multiples examens de génomique et/ou de protéomique nécessaires à l'identification des espèces de phlébotomes et à la caractérisation de leurs hôtes préférentiels, ainsi qu'à la détection des agents pathogènes transmis par ces insectes vecteurs. De ce fait, ils restent un outil de choix pour les études de surveillance épidémiologique (Vilela *et al.*, 2018).

La composition du peuplement des phlébotomes à l'issue de cette enquête révèle l'existence de trois espèces parmi les vingt-quatre inventoriées en Algérie. Il s'agit de *P. perniciosus*, *P. perfiliewi* et *P. longicuspis*, appartenant à un seul sous-genre «*Larroussius*». Dans le nord Algérien, ces trois espèces vivent en sympatrie (Bounamous, 2010; Benallal *et al.*, 2022). Fait intéressant, la composition de la faune de phlébotomes s'est révélée similaire dans les deux régions d'étude; ce résultat peut, en grande partie, être attribué aux caractéristiques assez similaires des sites prospectés concernant le type de climat, de topographie et d'utilisation du sol.

Nos résultats s'alignent sur les études antérieures menées dans le nord de l'Algérie, où une nette prédominance des espèces du sous-genre *Larroussius* a été observée, supposant que les caractéristiques environnementales et climatiques qui s'y trouvent offrent des conditions favorables à la propagation des phlébotomes de ce sous-genre (Izri *et al.*, 1990; Izri et Belazzoug, 1993; Harrat et Belkaid, 2003; Berdjane-Brouk *et al.*, 2012; Allal-Ikhlef *et al.*, 2017; Bennai *et al.*, 2018). D'autre part, selon les mêmes études, les populations d'autres sous-genres de *Phlebotomus* étaient moins abondantes avec des densités nettement plus faibles.

Les résultats de la présente étude ont montré une faible richesse spécifique de la faune phlébotomienne. Cependant, des études réalisées dans d'autres régions du nord de l'Algérie, qui partagent généralement un schéma bioclimatique similaire «typiquement méditerranéen» à nos régions d'étude, ont montré des résultats différents concernant la richesse en espèces de phlébotomes. À titre d'exemple, en Grande Kabylie, foyer principal de la LCan et les LHs dues à *L. infantum*, la richesse spécifique des phlébotomes varie entre six et dix espèces selon le site étudié (Izri *et al.*, 1990; Berdjane-Brouk *et al.*, 2011; Allal-Ikhlef *et al.*, 2017; Mouloua

*et al.*, 2017), tandis qu'à Tipaza, située au centre-nord de l'Algérie, Bennai *et al.* (2018) ont rapporté la présence de sept espèces de phlébotomes. Bien que les mêmes types de piégeages aient été employés «Pièges lumineux CDC», la différence entre ces résultats et les nôtres peut s'expliquer notamment par le nombre de récoltes et de prospections réalisées, le type de biotope inventorié, et les caractéristiques environnementales locales des sites prospectés.

Il apparaît d'après nos résultats que *P. perniciosus* est l'espèce la plus dominante. Elle compte à elle seule 94,64% de l'ensemble des captures. Ce résultat est en accord avec d'autres études antérieures réalisées dans le nord de l'Algérie où des taux de présence élevés pour cette espèce de phlébotome ont été enregistrés (Izri *et al.*, 1990; Berdjane-Brouk *et al.*, 2012; Bennai *et al.*, 2018). Ce phlébotome est largement répandu dans la partie ouest du bassin méditerranéen (Seccombe *et al.*, 1993; Benallal *et al.*, 2022). En Algérie, on le trouve dans tous les étages bioclimatiques du pays, allant des régions humides au nord jusqu'à la lisière saharienne du Tassili et du Hoggar à l'extrême sud (Dedet *et al.*, 1984; Benallal *et al.*, 2017, 2022). Cependant, la région du Tell, où prévaut un climat méditerranéen sub-humide et semi-aride, est largement la zone qui a enregistré la plus forte abondance de cette espèce (Dedet *et al.*, 1984; Bounamous, 2010). Étant donné que les sites prospectés, dans notre étude, se situent dans la principale aire de répartition de cette espèce, notre résultat n'était pas surprenant. Fait intéressant, contrairement à ce qui avait été précédemment rapporté par certains auteurs dans quelques régions en Algérie (Berchi *et al.*, 2007; Benallal *et al.*, 2017), nous n'avons pas observé des formes atypiques pour cette espèce de phlébotome.

Alors que les caractéristiques climatiques ont un impact profond à l'échelle macro-environnementale, des facteurs anthropiques peuvent être déterminants à une échelle micro-géographique (Risueño *et al.*, 2017). Les sites de capture des phlébotomes pour cette étude ont été choisis dans des fermes qui abritent principalement des bovins, des ovins et des caprins, ce qui constitue un autre facteur pertinent pour la survenue d'une forte abondance de *P. perniciosus*. En fait, ces biotopes se caractérisent par l'accumulation de grandes quantités de matière organique et la présence de microclimats stables, offrant par conséquent des sites de reproduction et de repos idéaux pour cette espèce de phlébotome (Branco *et al.*, 2013). Cette observation a été soulignée par plusieurs études qui ont mis en évidence le risque accru de rencontrer ce vecteur dans les endroits où les animaux domestiques, notamment le bétail, sont à proximité immédiate (Guernaoui et Boumezzough, 2009; Gálvez *et al.*, 2010; Barón *et al.*, 2011; Branco *et al.*, 2013; Alcover *et al.*, 2014; Bravo-Barriga *et al.*, 2016).

Outre l'influence exercée par les conditions climatiques et environnementales, le caractère très endophile (Benabid *et al.*, 2017) et zoo-anthropophile de *P. perniciosus* (Gilot

*et al.*, 1983; Bravo-Barriga *et al.*, 2016; Gherbi *et al.*, 2020), qui lui permet de s'adapter aux différents types de biotopes, pourrait également expliquer ses fréquences relativement élevées.

Les résultats de notre prospection entomologique ont révélé la présence de deux autres espèces de phlébotomes. Il s'agit de *P. perfiliewi* et *P. longicuspis*, qui représentent respectivement une abondance relative égale à 4,75% et 0,6%. Ces résultats sont concordants avec les travaux réalisés par Berdjane-Brouk *et al.* (2012) à Larbaa Nath Irathen (Tizi-Ouzou) où *P. perfiliewi* est moins représentée (0,79%). Cependant, ils contrastent avec ceux obtenus par Allal-Ikhlef *et al.* (2017) à Draa El Mizan (Tizi-Ouzou) où une forte prédominance a été observée pour cette espèce (51,47%). Bien que les méthodes de piégeage (Pièges CDC) soient les mêmes, l'apparente divergence entre ces résultats et les nôtres s'explique, notamment, par des différences entre les types de biotopes prospectés (exclusivement rural vs. plus diversifié), leur altitude (environ 1000 m vs. <400 m), leur diversité en espèces animales, ainsi qu'à d'autres facteurs environnementaux (ex., le type de végétation), qui pourraient avoir influencé la distribution et l'abondance des différentes espèces de phlébotomes (Guernaoui *et al.*, 2006; Barón *et al.*, 2011; Alcover *et al.*, 2014; Bravo-Barriga *et al.*, 2016). En ce qui concerne *P. longicuspis*, elle se distribue essentiellement dans les zones bioclimatiques semi-arides et arides du Sahara (Dedet *et al.*, 1984; Berdjane-Brouk *et al.*, 2012), ce qui explique ses faibles effectifs obtenus. Des études antérieures ont déjà signalé sa faible abondance dans le nord de l'Algérie (Berdjane-Brouk *et al.*, 2012; Allal-Ikhlef *et al.*, 2017), conformément à nos résultats.

Dans le présent travail, aucun spécimen du genre *Sergentomyia* n'a été identifié dans les échantillons de phlébotomes récoltés. Contrairement à ce que nous avons observé, une étude menée par Belazzoug *et al.* en 1982 a mis en évidence la présence de *S. minuta*, espèce la plus répandue en Algérie, dans les deux régions que nous avons prospectées; Bougaa et Kherrata. De plus, lors d'une précédente prospection entomologique réalisée à Kherrata, Manseur (2015) a révélé la présence de trois espèces de *Sergentomyia* (*S. minuta*, *S. antennata* et *S. fallax*), mais avec une abondance relativement faible (4,08%). L'absence des espèces attribuées à ce genre, dans nos captures, par rapport aux études susmentionnées, pourrait notamment être due aux différentes méthodes de piégeage employées. Ces études ont principalement utilisé des papiers adhésifs (enduites d'huile de ricin), alors que dans notre étude, nous avons utilisé des pièges lumineux connus pour être moins attractifs pour ces espèces de phlébotomes (Branco *et al.*, 2013; Allal-Ikhlef, 2018). Outre la méthode d'échantillonnage, le fait que la plupart des espèces de *Sergentomyia* trouvent les conditions

optimales pour leur développement dans des milieux sylvatiques où elles se nourrissent préférentiellement d'animaux à sang froid (ex., lézards et geckos) (Lewis, 1978; Lisi *et al.*, 2014; Maia et Depaquit, 2016), pourrait nous fournir une autre explication de leur absence dans nos captures.

Durant notre enquête de terrain, plus de femelles (56,49%) que de mâles (43,51%) ont été collectés, soit un sexe-ratio de 0,77. Cela pourrait s'expliquer par une moindre attraction des mâles pour la lumière des pièges CDC dans les sites prospectés. De nombreuses études ayant recours à un piégeage lumineux entrepris à proximité immédiate du bétail affichent également une large prépondérance des femelles (Benallal *et al.*, 2013; Bennai *et al.*, 2018). La proportion assez faible de femelles gorgées de sang (14,05%) laisse supposer que les femelles des espèces de phlébotomes capturées étaient particulièrement moins actives au cours de la période d'échantillonnage.

L'identification de l'origine du repas de sang ingéré par les arthropodes hématophages est indispensable pour déterminer leurs hôtes réservoirs préférés et, par conséquent, leur capacité vectorielle pour les agents pathogènes (Boakye *et al.*, 1999). Étant donné que la plupart des espèces de *Leishmania* sont des agents pathogènes zoonotiques, la connaissance des phlébotomes et de leurs préférences trophiques dans un foyer endémique donné est cruciale pour incriminer les vecteurs et les hôtes réservoirs putatifs, ainsi que pour développer des stratégies de contrôle efficaces (Alexander et Maroli, 2003; Afonso *et al.*, 2012; Azmi *et al.*, 2020).

Au cours des dernières décennies, diverses méthodes ont été déployées pour identifier l'origine du repas de sang chez les arthropodes hématophages, bénéficiant des progrès et de l'accessibilité croissante des tests basés sur la PCR qui ont progressivement remplacés les méthodes sérologiques traditionnelles en raison de leur spécificité et sensibilité plus élevées (Kent, 2009). Néanmoins, les méthodes moléculaires basées sur l'amplification de l'ADN ne sont pas sans limites, souffrant principalement de la faible quantité de sang ingérée par les petits insectes hématophages, comme les phlébotomes, et de l'état avancé du processus de digestion du sang qui dégrade rapidement le modèle utilisé dans les protocoles basés sur la PCR. Pour pallier ces limites, une nouvelle méthode de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, appelée «cartographie de masses peptidiques (*Peptide Mass Mapping*)», ciblant les peptides d'hémoglobine spécifiques à l'hôte, a été récemment introduite en tant qu'une alternative sensible et rentable qui offre un protocole de préparation rapide et simple (Hlavackova *et al.*, 2019). Cette approche peptidique permet l'identification précise de l'hôte dans un intervalle plus long après le repas de sang ainsi que la détection possible des repas

mixtes. De plus, les hôtes proches peuvent également être distingués (entre chèvre et mouton, entre différents rongeurs), grâce aux propriétés peptidiques de l'hémoglobine. D'après l'étude expérimentale de Hlavackova *et al.* (2019) qui a porté sur un panel de 54 phlébotomes gorgés collectés sur le terrain, la sensibilité de cette technique était de 96%. Selon les résultats de cette même étude, une concordance entre identification moléculaire et MALDI-TOF était observée pour 31 des 32 spécimens. En cas d'hôtes multiples, un seul des deux hôtes était identifié au niveau moléculaire alors qu'en spectrométrie de masse, les deux hôtes étaient identifiés.

Dans notre étude, cette récente approche a réussi à révéler l'origine du repas de sang chez 92% des spécimens analysés. Les résultats obtenus ont montré que la quasi-totalité des femelles gorgées avaient pris leur repas sanguin, exclusivement, sur des bovins domestiques "*Bos taurus*", ceci étant la première identification de sang de bovins chez des phlébotomes gorgés en Algérie. Une seule femelle "*P. perniciosus*" a pris son repas du sang sur chien et une autre sur mouton. Ces rares détections des repas de sang d'origine autre que bovine dans un échantillon considérablement important de femelles gorgées suggèrent une forte préférence des populations locales de phlébotomes, sur les sites étudiés, pour les bovins en tant que source de sang abondante et facilement accessible. Par ailleurs, le taux de réussite élevé de l'identification de l'origine des repas de sang, obtenu par MALDI-TOF, indique un haut degré de sensibilité de la méthode utilisée. Les sources d'alimentation non identifiées chez treize spécimens s'expliquent probablement par la faible quantité de sang de l'hôte ingérée par ces derniers, ou par le fait que le repas a été partiellement digéré avant que les spécimens soient capturés. En fait, une inspection visuelle de toutes les femelles gorgées de sang capturées a montré divers degrés de volume de sang contenu dans l'abdomen, soutenant les hypothèses susmentionnées. En revanche, le taux d'identification réussi de l'origine des repas de sang, fourni par le séquençage du gène *Cyt b*, était nettement plus faible, ce qui suggère que l'analyse par MALDI-TOF MS, ciblant des peptides d'hémoglobine spécifiques à l'hôte, est un outil prometteur qui pourrait rivaliser avec les techniques basées sur l'ADN pour l'identification des repas sanguins chez de petits insectes hématophages comme les phlébotomes. Lorsque le séquençage MS/MS a été appliqué, une identification concluante de l'hôte était possible même dans les échantillons où la méthode conventionnelle basée sur l'ADN avait échoué (en raison d'une amplification PCR infructueuse ou d'une séquence de mauvaise qualité).

Le rôle épidémiologique des chiens en tant que réservoirs majeurs de *L. infantum* a été prouvé de manière concluante (Ait-Oudhia *et al.*, 2009; Adel *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*,

2018). Fait intéressant, nous rapportons ici la première identification de sang de chiens chez des phlébotomes gorgés provenant d'Algérie, cependant, le nombre de femelles qui ont pris leur repas sur cet animal était extrêmement faible, cela comprenait un seul spécimen (0,71%). La rareté des repas de sang provenant de chiens chez les femelles *P. perniciosus* gorgées, tant dans nos foyers prospectés que dans ceux étudiés dans d'autres pays (Branco *et al.*, 2013; Maia *et al.*, 2015; Bravo-Barriga *et al.*, 2016; Bennai *et al.*, 2018; Jaouadi *et al.*, 2018; Muñoz *et al.*, 2019; Remadi *et al.*, 2020; González *et al.*, 2021), indique qu'il n'y a pas de préférence spécifique de tels insectes pour un hôte particulier sensible au parasite *Leishmania*.

Plusieurs études effectuées dans différents pays, notamment en Italie (Bongiorno *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2008; Calzolari *et al.*, 2022), en Espagne (De Colmenares *et al.*, 1995; Jiménez *et al.*, 2013; Bravo-Barriga *et al.*, 2016; González *et al.*, 2017; Muñoz *et al.*, 2019), en Tunisie (Jaouadi *et al.*, 2018; Remadi *et al.*, 2020), et au Portugal (Branco *et al.*, 2013; Maia *et al.*, 2015), ont rapporté la détection dans les repas de sang de *P. perniciosus* d'une grande diversité d'hôtes vertébrés, y compris le chien qui représente le principal réservoir de *L. infantum*, traduisant un comportement opportuniste de ces populations de phlébotomes, plus qu'une préférence trophique pour un hôte donné. Ce constat reflète la capacité de cette espèce à s'adapter aux conditions qui lui sont imposées et à se nourrir des sources qui lui sont offertes.

En Algérie, l'étude conduite à Tipaza (centre-nord), par Bennai *et al.* (2018), rapporte des taux de gorgement élevés de *P. perniciosus* sur petits ruminants et humains, ce qui contraste fortement avec les résultats observés dans cette étude. Cependant, diverses enquêtes effectuées dans différents pays rapportent que le bovin semble faire partie des hôtes préférentiels de certaines espèces de phlébotomes, y compris *P. perniciosus* (De Colmenares *et al.*, 1995; Talbi *et al.*, 2016; Jaouadi *et al.*, 2018; Abbate *et al.*, 2020; Remadi *et al.*, 2020). Une étude menée en Espagne par De Colmenares *et al.* (1995) sur les préférences trophiques de *P. perniciosus*, a indiqué que dans les endroits où il y avait des animaux de grande taille et relativement immobiles (ex., les chevaux et les vaches), une forte proportion de femelles ont été trouvés s'en nourrissant. Dans notre étude, nous avons confirmé que les bovins servent de principale source de sang pour *P. perniciosus* mais leur sensibilité à *L. infantum* n'a pas encore été démontrée. Dans une récente étude menée en Kabylie, l'infection naturelle des équidés (un âne et un cheval) par *L. infantum* a été rapportée (Medkour *et al.*, 2019b), cependant, dans notre étude, aucun repas de sang provenant des équidés n'a été détecté chez les femelles capturées. Ceci peut être attribué principalement à la très faible abondance de ces animaux dans les biotopes prospectés.

La recherche sur l'infection à *Leishmania* chez les phlébotomes naturellement infectés revêt une grande importance, surtout pour prédire le risque de propagation de leishmanioses dans les régions endémiques et pour planifier des mesures de contrôle appropriées (Kato *et al.*, 2005; Quiroga *et al.*, 2017). De plus, les études de prévalence d'infection par *Leishmania* chez ces insectes hématophages constituent à leur tour un indicateur précieux pour mesurer l'intensité de la transmission du parasite dans une zone donnée (Rossi *et al.*, 2008).

Toutes les espèces de phlébotomes inventoriées dans cette étude sont connues pour avoir un rôle avéré (*P. perniciosus*, *P. perfiliewi*) ou suspecté (*P. longicuspis*) dans la transmission de *L. infantum* en Algérie (Izri *et al.*, 1990; Izri et Belazzoug, 1993; Berdjane-Brouk *et al.*, 2012; Lafri et Bitam, 2021; Benallal *et al.*, 2022). Néanmoins, malgré l'application de deux types de marqueurs génétiques (ADNk et ITS1), aucun ADN de *Leishmania* spp. n'a été détecté dans les 106 pools analysés, reflétant les très faibles taux d'infection habituellement signalés chez les populations de phlébotomes, même en zone d'endémie, allant de 0,01 à 1% (Kato *et al.*, 2010).

Étonnamment, quelques études ont rapporté des taux d'infection élevés à *Leishmania* chez les phlébotomes comme celle réalisée dans la province de Rome en Italie dans un foyer de forte endémicité de LCan, où le taux d'infection était de 47,2% (Rossi *et al.*, 2008). De même, en Algérie, un taux d'infection élevé par *Leishmania* (32%) a été observé chez des phlébotomes du sous-genre *Larroussius* capturés en Kabylie, comme l'ont montré Mouloua *et al.* (2017). Dans ce foyer, toutes les femelles infestées (52 *P. perniciosus*, 9 *P. perfiliewi*) provenaient de la commune de Boghni, située dans la dépression de Draa El Mizan, où la plus forte séroprévalence de LCan y a également été rapportée (16,3%) (Mouloua *et al.*, 2017). Cependant, contrairement aux exemples susmentionnés, de nombreuses études menées, tant au niveau national qu'international, ont montré que le taux d'infestation par *Leishmania* est généralement faible chez les phlébotomes, incluant également ceux du sous-genre *Larroussius* (Svobodová *et al.*, 2009; Boubidi *et al.*, 2011; Berdjane-Brouk *et al.*, 2012; Benallal *et al.*, 2013; Branco *et al.*, 2013; Chargui *et al.*, 2013; Maia *et al.*, 2015; Barhoumi *et al.*, 2016; Bravo-Barriga *et al.*, 2016; Bennai *et al.*, 2018; Hadj-Slimane, 2018; Mhaidi *et al.*, 2018; Gherbi *et al.*, 2020; Weslati *et al.*, 2022).

Les résultats négatifs de l'infection par *Leishmania* chez les phlébotomes que nous avons récoltés peuvent également être attribués à la présence, en grand nombre, dans les biotopes échantillonnés de différentes espèces hôtes «non compétentes». Ceci pourrait favoriser un effet de dilution censé réduire l'alimentation des vecteurs sur des hôtes «capables de transmettre la maladie», réduisant de ce fait le nombre de phlébotomes infectés et donc le

risque de maladie (Keesing *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2019). L'apparente préférence trophique des *P. perniciosus* et *P. perfiliewi* analysées, pour le sang des bovins domestiques, qui sont les animaux les plus nombreux dans les sites échantillonnés et qui ne sont pas considérés comme des hôtes réservoirs compétents de la leishmaniose, appuient cette hypothèse. Néanmoins, compte tenu de récentes découvertes concernant l'infection expérimentale réussie de neutrophiles et de macrophages dérivés de monocytes issus de bovins, *in vitro*, par des promastigotes de *L. donovani* (Tasew *et al.*, 2016), la détection de *Leishmania* spp. chez des phlébotomes du sous-genre *Larroussi* gorgés de sang de bovidés en Tunisie (Remadi *et al.*, 2020) et l'identification moléculaire de l'ADN de *L. infantum* chez les bovins dans certains foyers de LV en Chine (Gao *et al.*, 2015) et au Brésil (Paixão-Marques *et al.*, 2019), une étude approfondie sur le rôle éventuel de ces animaux dans l'épidémiologie de la leishmaniose devrait être réalisée.

Dans certains pays du sous-continent indien et d'Afrique subsaharienne où la LV due à *L. donovani* est endémique, l'étude du rôle des bovins dans le cycle de transmission des leishmanioses a révélée certaines incohérences. En fait, la propriété ou la proximité des bovins a été signalée comme étant associée à une diminution significative du risque de kala-azar chez l'homme, comme l'ont montré ces études (Bern *et al.*, 2000, 2005), à l'opposé, selon d'autres travaux, le risque d'infection par le kala-azar semble augmenter pour ceux qui vivent à proximité des bovins (Bucheton *et al.*, 2002; Barnett *et al.*, 2005). La complexité du rôle que jouent les bovins dans le risque de LV peut résulter de multiples façons dont leur présence peut modifier la densité des phlébotomes, les taux d'infection par *Leishmania* et l'exposition de l'homme aux phlébotomes, ainsi que de la dynamique et du comportement complexes des populations de *P. argentipes*, qui n'ont pas encore été complètement élucidés (Bern *et al.*, 2010).

### III.6. Conclusion et limites de l'étude

L'étude des phlébotomes dans les foyers où sévit la LCan est d'une grande importance épidémiologique. Cela tient au rôle déterminant que jouent certaines espèces dans la propagation de *L. infantum*, au cours d'un repas sanguin, chez les individus canins, mais aussi de leur implication dans la transmission de ce pathogène du réservoir canin à l'être humain, ce qui pourrait conduire à un grave problème de santé publique.

L'identification précise de ces insectes dans les enquêtes entomologiques et l'analyse de leur statut infectieux par *Leishmania* spp. est une étape essentielle dans la mise en place d'un programme de lutte contre les leishmanioses, car elles fournissent des données précieuses sur les espèces de phlébotomes vectrices, et donc sur le risque de ces maladies infectieuses

dans la zone concernée. De plus, la détermination de l'origine du repas de sang ingéré par ces petits moucheron hémaphages, en particulier celui des espèces vectrices, est indispensable dans la compréhension de leurs préférences en matière d'hôtes, et par conséquent leur capacité à transmettre des agents pathogènes. Ces études de préférences trophiques sont également importantes pour identifier les réservoirs potentiels de la maladie et même pour développer des stratégies de contrôle efficaces.

Notre étude menée à Bougaa et Kherrata, deux foyers endémiques de leishmanioses humaines et canines, nous a permis, dans un premier temps, de dresser un tableau de la faune de phlébotomes spécifique à ces régions. Dans un deuxième temps, le statut infectieux de ces insectes par *Leishmania* spp. a été également déterminé. De plus, nous avons pu fournir des données protéomiques sur l'origine de repas sanguin chez les phlébotomes femelles gorgées en utilisant, pour la première fois en Algérie, la nouvelle et récente approche de spectrométrie de masse MALDI-TOF, dite de «cartographie de masses peptidiques», ciblant des peptides d'hémoglobine spécifiques à l'hôte. La sensibilité de cette technique a ensuite été comparée à une approche moléculaire basée sur l'amplification de l'ADN de l'hôte vertébré.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude montrent la présence de trois espèces de phlébotomes dans chacune des deux régions prospectées. Ces espèces appartenaient toutes au sous-genre *Larrousius*; il s'agit de *P. perniciosus*, *P. perfiliewi* et *P. longicuspis*, vecteurs avérés et suspectés de *L. infantum* en Algérie. Bien que toutes les femelles capturées, quelles que soient leur état physiologique, aient été testées par deux marqueurs moléculaires (ITS1 et ADNk) pour la détection de l'ADN de *Leishmania* spp., aucune d'entre elles ne s'est révélée positif. Cependant, la présence des trois espèces susmentionnées dans les deux zones étudiées avec une abondance relativement élevée de *P. perniciosus* et la détection antérieure de *L. infantum* chez des chiens locaux (Tahir, 2014; Adel *et al.*, 2015; Medkour, 2017; Medkour *et al.*, 2019a), suggère un risque potentiel de propagation de ce parasite au sein des populations canines et humaines. Le risque d'introduction d'autres espèces de *Leishmania* provenant d'autres régions endémiques, telles que *L. tropica*, ne peut être écarté; en fait, un rôle potentiel de *P. perniciosus* dans la transmission de ce parasite a été récemment prouvé (Vaselek et Volf, 2019).

La récente approche de la spectrométrie de masse MALDI-TOF, dite de «cartographie de masses peptidiques», a été appliquée avec succès à l'étude des préférences trophiques des phlébotomes collectés sur le terrain «*P. perniciosus* et *P. perfiliewi*», et s'est avérée plus efficace que le séquençage conventionnel de l'ADN. Nos résultats ont démontré que, dans les deux régions étudiées, le bovin domestique (*Bos taurus*) est une source prédominante de sang

pour les phlébotomes femelles. Les repas d'origine canine ont été estimés à 0,71% des repas identifiés, reflétant que les préférences trophiques de tels insectes sont davantage axées sur des hôtes plus disponibles que sur des hôtes réservoirs spécifiques. Ces deux observations expliquent probablement l'absence de parasites *Leishmania* chez les phlébotomes capturés. Nos résultats constituent la première identification de sang de bovins et de chiens chez des phlébotomes gorgés dans le pays.

La limite principale de la présente étude était la difficulté rencontrée sur le terrain pour mener de larges prospections entomologiques, ce qui a quelque peu affecté le type de biotopes sélectionnés pour cette étude ainsi que le nombre de récoltes effectuées.

---

# **Conclusion générale et perspectives**

---

## Conclusion générale et perspectives

La leishmaniose est une infection parasitaire extrêmement répandue dans le monde, notamment, le pourtour méditerranéen. En Algérie, elle représente un problème majeur de santé humaine et animale. Certaines régions présentent des taux parmi les plus élevés au monde.

Dans l'Est algérien, comme dans d'autres régions d'Algérie, les leishmanioses sont des maladies endémiques et plusieurs foyers d'infection y sont retrouvés. La surveillance de ces maladies à transmission vectorielle demeure primordiale, tant pour la santé animale que pour la santé publique. Les études portant sur l'épidémiologie des leishmanioses constituent un élément clé dans la réussite des programmes de lutte, en fournissant des données nécessaires à leur planification et à leur mise en œuvre. C'est dans cette optique que nous avons mené de pair des recherches épidémiologique et entomologique sur les leishmanioses dans les régions de l'Est de l'Algérie; la première étude portait sur une analyse de la situation épidémiologique de la LC chez l'homme dans la wilaya de Batna, tandis que la seconde étude, menée à Bougaa et Kherrata, deux foyers endémiques de LCan et LHs, portait sur un inventaire de la faune de phlébotomes ainsi que l'analyse de leur statut d'infection par *Leishmania* et leurs préférences trophiques.

Notre étude rétrospective sur la LC dans la wilaya de Batna nous a permis de mettre en évidence la situation épidémiologique préoccupante et alarmante de la maladie dans cette région. En fait, 9259 cas ont été rapportés entre 2010 et 2020. Par ailleurs, bien qu'une diminution du nombre de cas ait été enregistrée au cours de la première décennie de ce siècle, qui a atteint 116 cas en 2007 selon l'INSP (2007), nos résultats ont montré une nette recrudescence de la maladie au cours de la dernière décennie avec deux pics épidémiques très importants, celui de l'année 2010 avec 1924 cas et celui de l'année 2017 avec 1518 cas, indiquant la persistance de la maladie dans cette région et son état alarmant. Les résultats obtenus ont révélé une incidence élevée de la LC dans les régions situées à l'ouest de Batna, à savoir Barika (2979 cas; 32,17%), Bitam (1141; 12,32%), M'doukal (404; 4,36%), Djezzar (803; 8,67%), Azil Abdelkader (1238; 13,37%) et Ouled Ammar (655; 7,07%). La commune de Barika constitue le foyer principal de la maladie dans la wilaya. Fait intéressant, l'infection affecte généralement les patients de sexe masculin (5422; 58,6%) et les enfants âgés de moins de 9 ans (5033 cas; 54,4%), avec un schéma épidémique saisonnier (un pic épidémique en novembre avec 1957 cas). L'efficacité des campagnes d'aspersion d'insecticides pratiquées par les autorités sanitaires locales pour lutter contre le vecteur reste déconcertante, notamment si l'on tient compte les différentes contraintes qui entravent leur application. Pour cela, des

mesures appropriées de prévention et de lutte contre les vecteurs et les réservoirs potentiels de la maladie doivent être scientifiquement et rigoureusement mises en place afin de l'éradiquer.

D'autres études devront être menées afin de lever le voile sur les caractéristiques du cycle de transmission de la maladie dans cette région, d'autant plus que l'épidémiologie de la leishmaniose a subi, en Algérie, ces dernières années plusieurs bouleversements avec l'émergence de nouvelles espèces de *Leishmania* (Harrat *et al.*, 2009), de phlébotomes vecteurs (Boubidi *et al.*, 2011) et de réservoirs suspects (Tomás-Pérez *et al.*, 2014), ainsi qu'avec l'extension de la maladie des foyers classiques vers de nouvelles zones à travers le pays (Boudrissa *et al.*, 2012; Mansouri *et al.*, 2012). Des recherches supplémentaires devraient également être menées pour connaître les différents facteurs liés à l'endémicité de la maladie. Nos résultats méritent d'être renforcés par d'autres études plus larges prenant en compte l'ensemble du pays afin de préciser l'incidence de la leishmaniose et sa cartographie dans chaque wilaya.

Quant à la deuxième étude, notre inventaire de la faune de phlébotomes, établi dans deux régions de piégeages (Bougaa et Kherrata), nous a permis de recenser trois espèces appartenant à un seul sous-genre *Larrousius*. Ce dernier est représenté essentiellement par l'espèce *P. perniciosus* qui domine très largement dans l'ensemble des captures (94,64%), suggérant un risque potentiel de propagation de *L. infantum* au sein des populations canines et humaines. L'étude moléculaire par PCR quant à elle a montré que les phlébotomes femelles capturés n'étaient pas porteurs d'ADN leishmanien. Ceci est probablement dû en grande partie à leurs préférences trophiques qui reposent principalement sur les bovins (animaux non réservoirs de *Leishmania*) et non sur les chiens, principaux réservoirs du parasite, comme l'ont montré les résultats de l'analyse par MALDI-TOF MS ciblant les peptides d'hémoglobine spécifiques à l'hôte. Ce dernier s'est avéré plus efficace que le séquençage conventionnel de l'ADN pour déterminer l'origine du repas de sang.

Les résultats obtenus dans cette étude soulignent la nécessité de mettre principalement l'accent sur le rôle potentiel des bovins dans l'épidémiologie des leishmanioses et l'écologie des phlébotomes en Algérie, à travers des investigations approfondies impliquant différentes méthodes moléculaires. Des études axées sur l'écologie des phlébotomes et la dynamique saisonnière de leurs populations, en utilisant différentes techniques d'échantillonnage, seraient très utiles pour planifier un programme de lutte antivectorielle approprié et efficace. Des travaux approfondis portant sur les préférences trophiques des phlébotomes femelles, en élargissant les types de biotopes choisis, doivent être effectués, afin de mieux comprendre leur comportement alimentaire et de mettre en place des programmes de contrôle efficaces. Enfin,

la mise en place des projets de surveillance vectorielle à grande échelle couvrant toutes les zones de dissémination de la LCan serait indispensable pour cartographier les zones à haut risque de transmission de *L. infantum*.

---

# **Références bibliographiques**

---

## Références bibliographiques

### « A »

- Abbasi, I., Cunio, R., Warburg, A., 2009. Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting. *Vector- Borne Zoonotic Dis.* 9, 79–86.
- Abbate, J.M, Maia, C., Pereira, A., Arfuso, F., Gaglio, G., Rizzo, M., Caracappa, G., Marino, G., Pollmeier, M., Giannetto, S., Brianti, E., 2020. Identification of trypanosomatids and blood feeding preferences of phlebotomine sand fly species common in Sicily, Southern Italy. *PLoS ONE* 15, e0229536.
- Abdellatif, M.Z.M., El-Mabrouk, K., Ewis, A.A., 2013. An epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Al-Jabal-Al-Gharbi Libya. *Korean J. Parasitol.* 51, 75–84.
- Abonnenc, E., 1972. Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera, Psychodidae). *Mém. O.R.S.T.O.M.* 55, 1–289.
- Abou-Elaaz, F., Outourakht, A., Bouhout, S., Himmi, O., Guernaoui, S., 2019. Thirty years of cutaneous leishmaniasis in Tadmra-Azilal focus, Morocco. *Parasite Epidemiol. Control* 4, e00091.
- Adel, A., Abatih, E., Speybroeck, N., Soukehal, A., Bouguedour, R., Boughalem, K., Bouhbal, A., Djerbal, M., Saegerman, C., Berkvens, D., 2015. Estimation of canine *Leishmania* infection prevalence in six cities of the Algerian littoral zone using a Bayesian approach. *PLoS One* 10, e0117313.
- Adel, A., Boughoufalah, A., Saegerman, C., De Deken, R., Bouchene, Z., Soukehal, A., Berkvens, D., Boelaert, M., 2014. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Algeria: an update. *PLoS One* 9, e99207.
- Adel, A., Saegerman, C., Speybroeck, N., Praet, N., Victor, B., De Deken, R., Soukehal, A., Berkvens, D., 2010. Canine leishmaniasis in Algeria: true prevalence and diagnostic test characteristics in groups of dogs of different functional type. *Vet. Parasitol.* 172, 204–213.
- Afonso, M.M.S., Miranda Chaves, S.A., Rangel, E.F., 2012. Evaluation of feeding habits of haematophagous insects, with emphasis on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae), vectors of Leishmaniasis-review. *Trends Entomol.* 8, 125–136.
- Agence Nationale de Développement de l'Investissement (ANDI), 2013. Disponible sur: <http://www.andi.dz/index.php/fr/monographie-des-wilayas?id101>.
- Aït-Oudhia, K., Harrat, Z., Benikhlef, R., Dedet, J.P., Pratlong, F., 2011. Canine *Leishmania infantum* enzymatic polymorphism: a review including 1023 strains of the Mediterranean area, with special reference to Algeria. *Acta Trop.* 118, 80-86.
- Ait-Oudhia, K., Lami, P., Lesceu, S., Harrat, Z., Hamrioui, B., Dedet, J.P., Pratlong, F., 2009. Increase in prevalence of canine leishmaniasis in Algiers urban area (Algeria) following 2003 earthquake. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 103, 679–692.
- Ajaoud, M., Es-Sette, N., Charrel, R.N., Laamrani-Idrissi, A., Nhammi, H., Riyad, M., Lemrani, M., 2015. *Phlebotomus sergenti* in a Cutaneous Leishmaniasis Focus in Azilal Province (High Atlas, Morocco): Molecular Detection and Genotyping of *Leishmania tropica*, and Feeding Behavior. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003687.
- Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., Gradoni, L., Sereno, D., 2017. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol. Aspects Med.* 57, 1-29.

- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., Sereno, D., 2016. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. PLoS Negl. Trop. Dis. 10, e0004349.
- Aklilu, E., Gebresilassie, A., Yared, S., Kindu, M., Tekie, H., Balkew, M., Warburg, A., Hailu, A., Gebre-Michael, T., 2017. Comparative study on the nocturnal activity of phlebotomine sand flies in a highland and lowland foci of visceral leishmaniasis in north-western Ethiopia with special reference to *Phlebotomus orientalis*. Parasit. Vectors 10, 1-10.
- Alborzi, A., Rasouli, M., Shamsizadeh, A., 2006. *Leishmania tropica*-isolated patient with visceral leishmaniasis in southern Iran. Am. J. Trop. Med. Hyg. 74, 306-307.
- Alcover, M.M., Ballart, C., Martín-Sánchez, J., Serra, T., Castillejo, S., Portús, M., Gállego, M., 2014. Factors influencing the presence of sand flies in Majorca (Balearic Islands, Spain) with special reference to *Phlebotomus perniciosus*, vector of *Leishmania infantum*. Parasit. Vectors 7, 421.
- Alexander, B., 2000. Sampling methods for phlebotomine sandflies. Med. Vet. Entomol. 14, 109-122.
- Alexander, B., Maroli, M., 2003. Control of phlebotomine sandflies. Med. Vet. Entomol. 17, 1-18.
- Alexander, B., de Carvalho, R.L., McCallum, H., Pereira, M.H., 2002. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. Em. Infect. Dis. 8, 1480-1485.
- Ali, A., Ur Rehman, T., Qureshi, N.A., Ur Rahman, H., 2016. New endemic focus of cutaneous leishmaniasis in Pakistan and future epidemics threats. Asian Pac. J. Trop. Dis. 6, 155-159.
- Alkan, C., Bichaud, L., de Lamballerie, X., Alten, B., Gould, E.A., Charrel, R.N., 2013. Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. Antiviral Res. 100, 54-74.
- Allal-Ikhlef, A.B., 2018. Contribution à l'étude du rôle vecteur des phlébotomes dans un foyer à leishmanioses à Draa El Mizan (Kabylie, Algérie). Thèse de Doctorat. Université Ahmed Ben Bella-Oran, 1-159.
- Allal-Ikhlef, A.B., Senouci, K., Benallal, K., Triki-Yamani, R., Harrat, Z., Houti, L., 2017. Inventaire des phlébotomes dans le foyer leishmanien de Draa El Mizan, Kabylie. J. Fac. Med. Or. 1, 37-43.
- Alten, B., Ozbel, Y., Ergunay, K., Kasap, O.E., Cull, B., Antoniou, M., Velo, E., Prudhomme, J., Molina, R., Bañuls, A.L., Schaffner, F., Hendrickx, G., Van Bortel, W., Medlock, J.M., 2015. Sampling strategies for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Europe. Bull. Entomol. Res. 105, 664-678.
- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., WHO Leishmaniasis Control Team., 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PloS one, 7, e35671.
- Al-Warid, H.S., Al-Saqur, I.M., Al-Tuwaijari, S.B., Al Zadawi, K.A.M., 2017. The distribution of cutaneous leishmaniasis in Iraq: demographic and climate aspects. Asian Biomed. 11, 255-260.
- Amira, A., Bounamous, A., Kouba, Y., Kadjoudj, N., Zeroual, S., Boubendir, A., Boularouk, Y., 2022. Sand Flies (Diptera: Psychodidae): Fauna and Ecology in the Northeast of Algeria. J. Med. Entomol. 59, 855-864.
- Antinori, S., Cascio, A., Parravicini, C., Bianchi, R., Corbellino, M., 2008. Leishmaniasis among organ transplant recipients. Lancet Infect. Dis. 8, 191-199.
- Aoun, K., Bouratbine, A., 2014. Cutaneous leishmaniasis in North Africa: a review. Parasite 21, 14.
- Aronson, N.E., Magill, A.J., 2020. Leishmaniasis. In: Ryan, E.T., Hill, D.R., Solomon, T., Aronson, N.E., Endy, T.P. (Eds.), Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases. Elsevier, London, pp. 776-98.

- Aransay, A.M., Scoulica, E., Tselentis, Y., 2000. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1933-1938.
- Ashford, R.W., 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.* 14, 523-32.
- Ashford, R.W., 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30, 1269-1281.
- Ayele, A., Seyoum, Z., 2016. Review on canine leishmaniasis, etiology, clinical sign, pathogenesis, treatment and control methods. *Glob. Vet.* 17, 343-352.
- Azmi, K., Schönian, G., Abdeen, Z. 2020. Specification of blood meals ingested by female sand flies caught in Palestinian foci and identification of their concomitant leishmanial infections. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008748.

« B »

- Bachi, F., 2006. Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. *La Lettre de l'infectiologue* 21, 9-15.
- Bachi, F., Icheboudene, K., Benzitouni, A., Taharboucht, Z., Zemmouri, M., 2019. Epidemiology of cutaneous Leishmaniasis in Algeria through molecular characterization. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 112, 147-152.
- Baldelli, R., Piva, S., Salvatore, D., Parigi, M., Melloni, O., Tamba, M., Bellini, R., Poglayen, G., 2011. Canine leishmaniasis surveillance in a northern Italy kennel. *Vet. Parasitol.* 179, 57-61.
- Bañuls, A.L., Hide, M., Prugnonne, F., 2007. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv. Parasitol.* 64, 1-458.
- Barhoumi, W., Fares, W., Cherni, S., Derbali, M., Dachraoui, K., Chelbi, I., Ramalho- Ortigao, M., Beier, J.C., Zhioua, E., 2016. Changes of sand fly populations and *Leishmania infantum* infection rates in an irrigated village located in arid Central Tunisia. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 329.
- Barón, S.D., Morillas-Márquez, F., Morales-Yuste, M., Díaz-Sáez, V., Irigaray, C., Martín-Sánchez, J., 2011. Risk maps for the presence and absence of *Phlebotomus perniciosus* in an endemic area of leishmaniasis in southern Spain: implications for the control of the disease. *Parasitology* 138, 1234-1244.
- Bates, P.A., Depaquit, J., Galati, E., Kamhawi, S., Maroli, M., McDowell, M.A., Picado, A., Ready, P.D., Salomón, O.D., Shaw, J.J., Traub-Csekö, Y.M., Warburg, A., 2015. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. *Parasit. Vectors* 8, 131.
- Bastien, P., Lachaud, L., 2016. Leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique. *EMC – Maladies infectieuses*, 1-12.
- Baum, M., de Castro, E.A., Pinto, M.C., Goulart, T.M., Baura, W., Klisiowicz, D.D.R., da Costa-Ribeiro, M.C.V., 2015. Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil. *Acta Trop.* 143, 8-12.
- Belal, U.S., Abdel-Hafeez, E.H., Naoi, K., Norose, K., 2012. Cutaneous leishmaniasis in the Nalut District, Libyan Arab Jamahiriya: a clinico-epidemiologic study and *Leishmania* species identification. *J. Parasitol.* 98, 1251-1256.
- Belazzoug, S., 1982. Une épidémie de leishmaniose cutanée dans la région de M'sila (Algérie). *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 75, 497-504.
- Belazzoug, S., 1983. Le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de M'sila (Algérie), infestation naturelle de "*Psammomys obesus*" (rongeur, gerbillide). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 76, 146-9.

- Belazzoug, S., 1986. Découverte d'un *Meriones shawi* (Rongeur, gerbillide) naturellement infesté par *Leishmania* dans le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de Ksar chellala (Algérie). Bull. Soc. Pathol. Exot. 79, 630-3.
- Belazzoug, S., Addadi, K., Mokrani, T., Hafirassou, N., Hamrioui, B., Belkaid, M., 1985. La leishmaniose viscérale en Algérie : étude des cas hospitalisés entre 1975 et 1984. Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 65, 329-35.
- Belazzoug, S., Lanotte, G., Maazoun, R., Pralong, F., Rioux, J.A., 1985. Un nouveau variant enzymatique de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, Agent de la leishmaniose cutanée du nord de l'Algérie. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 60, 1-3.
- Belazzoug, S., Mahzoul, D., Addadi, K., Dedet, J.P., Touami, M., 1982. *Sergentomyia minuta* parroti (Adler et Théodor, 1927) en Algérie (Diptera, Psychodidae)-Systématique infraspécifique et répartition géographique. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 57, 621-630.
- Beldi, N., Mansouri, R., Bettaieb, J., Yaacoub, A., Souguir Omrani, H., Ben Aoun, S.Y., Saadni, F., Guizani, I., Guerbouj, S., 2017. Molecular characterization of *Leishmania* parasites in Giemsa-stained slides from cases of human cutaneous and visceral leishmaniasis, Eastern Algeria. Vector Borne Zoonotic Dis. 17, 416-424.
- Bellali, H., Ben Alaya, N., Ahmadi, Z., Ennigrou, S., Chahed, M.K., 2015. Eco- environmental, living conditions and farming issues linked to zoonotic cutaneous leishmaniasis transmission in Central Tunisia: a population based survey. Int. J. Trop. Med. Public Health 5, 1-7.
- Ben Slimane, T., Chouih, E., Ahmed, S.B.H., Chelbi, I., Barhoumi, W., Cherni, S., Zoghliami, Z., Gharbi, M., Zhioua, E., 2014. An investigation on vertical transmission of *Leishmania infantum* in experimentally infected dogs and assessment of offspring's infectiousness potential by xenodiagnosis. Vet. Parasitol. 206, 282-286.
- Bellatreche, A.Y., Medkour, H., Blaga, R., Le Roux, D., Miroud, K., Ait-Oudhia, K., 2021. Evaluation of commercial ELISA, indirect immunofluorescence test and qPCR for the diagnosis of *Leishmania infantum* in asymptomatic dogs from Bouira, northeast Algeria. VETERINARIA 70, 15-25.
- Benabid, M., Ghrab, J., Rhim, A., Ben-romdhane, R., Aoun, K., Bouratbine, A., 2017. Temporal dynamics and *Leishmania infantum* infection prevalence of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Phlebotominae) in highly endemic areas of visceral leishmaniasis in Tunisia. PLoS One 12, e0184700.
- Benallal, K.E., Benikhlef, R., Garni, R., Gassen, B., Dedet, J.P., Harrat, Z., 2017. Presence of *Phlebotomus perniciosus* atypical form in Algeria. J. Arthropod. Borne Dis. 11, 139-146.
- Benallal, K.E., Garni, R., Harrat, Z., Volf, P., Dvorak, V., 2022. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Maghreb region: a systematic review of distribution, morphology, and role in the transmission of the pathogens. PLoS Negl. Trop. Dis. 16, e0009952.
- Benallal, K., Gassen, B., Bouiba, L., Depaquit, J., Harrat, Z., 2013. Entomological investigation following the resurgence of human visceral leishmaniasis in southern Algeria. Acta Trop. 128, 518-521.
- Benelmouffok, A.B., Sellami, M., Boughoufalah, A., 2017. Cutaneous leishmaniasis in Algeria: quadrennial assessment (2008-2011). Med. Santé Trop. 27, 310-314.
- Benikhlef, R., Aoun, K., Boudrissa, A., Benabid, M., Cherif, K., Aissi, W., Benrekta, S., Boubidi, S.C., Späth, G.F., Bouratbine, A., Sereno, D., Harrat, Z., 2021. Cutaneous Leishmaniasis in Algeria; highlight on the focus of M'Sila. Microorganisms 9, 962.
- Benikhlef, R., Harrat, Z., Toudjine, M., Djerbouh, A., Bendali-Braham, S., Belkaid, M., 2004. Présence de *Leishmania infantum* MON-24 chez le chien. Med. Trop. 64, 42-46.

- Benito-De Martín, M.I., Gracia-Salinas, M.J., Molina-Moreno, R., Ferrer-Dufol, M., Lucientes-Curdi, J., 1994. Influence de la nature du sang ingéré sur les paramètres gonotrophiques de *Phlebotomus perniciosus* sous conditions de laboratoire. *Parasite* 1, 409-411.
- Bennai, K., Tahir, D., Lafri, I., Bendjaballah-Laliam, A., Bitam, I., Parola, P., 2018. Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA and host blood meal identification in *Phlebotomus* in a hypoendemic focus of human leishmaniasis in northern Algeria. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006513.
- Berchi, S., Bounamous, A., Louadi, K., Pesson, B., 2007. Différenciation morphologique de deux espèces sympatriques: *Phlebotomus perniciosus* Newstead 1911 et *Phlebotomus longicuspis* Nitzulescu 1930 (Diptera: Psychodidae). *Ann. Soc. Entomol. Franc.* 43, 201-203.
- Berchi, S., Rioux, J.A., Belmonte, A., Russo, J., 1986. Un phlébotome nouveau pour l'Algérie. *Phlebotomus (Paraphlebotomus) kazeruni*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 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 (Larrousius) chadlii* Rioux, Juminer & Gibily, 1966 female in Algeria. *Parasite* 18, 337-339.
- Berdjane-Brouk, Z., Charrel, R.N., Hamrioui, B., Izri, A., 2012. First detection of *Leishmania infantum* DNA in *Phlebotomus longicuspis* Nitzulescu, 1930 from visceral leishmaniasis endemic focus in Algeria. *Parasitol. Res.* 111, 419-422.
- Bern, C., Hightower, A.W., Chowdhury, R., Ali, M., Amann, J., Wagatsuma, Y., Haque, R., Kurkjian, K., Vaz, L.E., Begum, M., Akter, T., Cetre-Sossah, C.B., Ahluwalia, I.B., Doston, E., Secor, W.E., Breiman, R.F., Maguire, J.H., 2005. Risk factors for kala-azar in Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 655-662.
- Bern, C., Joshi, A.B., Jha, S.N., Das, M.L., Hightower, A., Thakur, G.D., Bista, M.B., 2000. Factors associated with visceral leishmaniasis in Nepal: bed-net use is strongly protective. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63, 184-188.
- Bernier, R., Barbeau, B., Tremblay, M.J., Olivier, M., 1998. The lipophosphoglycan of *Leishmania donovani* up-regulates HIV-1 transcription in T cells through the nuclear factor-kappaB elements. *J. Immunol.* 160, 2881-2888.
- Bessad, A., Mouloua, K., Kherrachi, I., Benbetka, S., Benikhlef, R., Mezai, G., Harrat, Z., 2012. *Leishmania infantum* MON-1 isolé d'un chacal doré (*Canis aureus*) en Grande Kabylie (Algérie). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 105, 5-7.
- Bley, D., 2010. Les maladies à transmission vectorielle, pourquoi s'y intéresser ?. *Nat. Sci. Soc.* 2, 101-102.
- Boakye, D.A., Tang, J., Truc, P., Merriweather, A., Unnasch, T.R., 1999. Identification of bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis. *Med. Vet. Entomol.* 13, 282-287.
- Boehme, C.C., Hain, U., Novosel, A., Eichenlaub, S., Fleischmann, E., Löscher, T., 2006. Congenital visceral leishmaniasis. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 359.
- Bongiorno, G., Habluetzel, A., Houry, C., Maroli, M., 2003. Host preferences of phlebotomine sandflies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in Central Italy. *Acta Trop.* 88, 109-116.
- Borland, E.M., Kading, R.C., 2021. Modernizing the Toolkit for Arthropod Bloodmeal Identification. *Insects* 12, 37.
- Boubidi, S.C., Benallal, K., Boudrissa, A., Bouiba, L., Bouchareb, B., Garni, R., Bouratbine, A., Ravel, C., Dvorak, V., Votypka, J., Volf, P., Harrat, Z., 2011. *Phlebotomus sergenti* (parrot, 1917) identified as *Leishmania killicki* host in Ghardaïa, South Algeria. *Microbes Infect.* 13, 691-696.

- Boudrissa, A., Cherif, K., Kherrachi, I., Benbetka, S., Bouiba, L., Boubidi, S.C., Benikhlef, R., Arrar, L., Hamrioui, B., Harrat, Z., 2012. Extension de *Leishmania major* au Nord de l'Algérie. Bull. Soc. Pathol. Exot. 105, 30-35.
- Boukhtache, N., 2019. Contribution à l'étude de la bio-écologie de quelques cochenilles inféodées aux arbres fruitiers de la région montagneuse des Aurès (Batna, Algérie). Thèse de Doctorat. Université Mohamed Kheider-Biskra. 1-204.
- Bounamous, A., 2010. Biosystématique et caractérisation par la biologie moléculaire des phlébotomes de l'Est algérien. Thèse de Doctorat. Université des Frères Mentouri-Constantine 1. 1-304.
- Bounar, R., 2014. Etude des potentialités biologiques, cartographie et aménagement de la chaîne des Babors dans la démarche du développement durable. Thèse de Doctorat. Université Ferhat Abbas-Sétif 1. 1-141.
- Bounoua, L., Kahime, K., Houti, L., Blakey, T., Ebi, K.L., Zhang, P., Imhoff, M.L., Thome, K.J., Dudek, C., Sahabi, S.A., Messouli, M., Makhlof, B., El Laamrani, A., Boumezzough, A., 2013. Linking climate to incidence of zoonotic cutaneous Leishmaniasis (*L. major*) in Pre-Saharan North Africa. Int. J. Environ. Res. Public Health 10, 3172-3191.
- Bourdoiseau, G., 2013. Canine leishmaniosis. In: Beugnet, F. (Eds.), Guide to vector-borne diseases of pets. Merial, Lyon, pp. 253-265.
- Bourdoiseau, G., 2015. Le vétérinaire acteur de santé publique: exemple de la leishmaniose canine, zoonose vectorielle. Bull. Acad. Natl. Med. 199, 909-920.
- Bourdoiseau, G., Chermette, R., 2015. La leishmaniose canine à *Leishmania infantum*: données actuelles sur une zoonose négligée. Rev. Francoph. des Lab., 2015, 25-34.
- Bowles, D.E., Britch, S., Linthicum, K., Johnson, R.N., Linton, Y.M., White, G.B., 2015. Sand Flies: Significance, Surveillance, and Control in Contingency Operations. Silver Spring: United States Department of Defense Armed Forces Pest Management Board, 1-65.
- Branco, S., Alves-Pires, C., Maia, C., Cortes, S., Cristóvão, J.M.S., Gonçalves, L., Gonçalves, L., Campino, L., Afonso, M.O., 2013. Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, central region, Portugal. Acta Trop. 125, 339-348.
- Bravo-Barriga, D., Parreira, R., Maia, C., Afonso, M.O., Blanco-Ciudad, J., Serrano, F.J., Pérez-Martín, J.E., Gómez-Gordo, L., Campino, L., Reina, D., Frontera, E., 2016. Detection of *Leishmania* DNA and blood meal sources in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in western of Spain: update on distribution and risk factors associated. Acta Trop. 164, 414-424.
- Brazil, R.P., Brazil, B.G., 2018. Bionomy: Biology of Neotropical Phlebotomine Sand Flies. In: Rangel, E., Shaw, J. (Eds.), Brazilian Sand Flies. Springer, Cham, pp. 299-318.
- Buck, G., Courdurier, J., Dorel, R., Quesnel, J.J., 1951. The first case of canine leishmaniasis in Madagascar. Bull. Soc. Pathol. Exot. 44, 428-30.

## « C »

- Cabrera, O.L., Munsterman, L.E., Cardenas, R., Gutierrez, R., Ferro, C., 2002. Definition of appropriate temperature and storage conditions in the detection of *Leishmania* DNA with PCR in phlebotomine flies. Biomedica. 22, 296-302.
- Calzolari, M., Carra, E., Rugna, G., Bonilauri, P., Bergamini, F., Bellini, R., Varani, S., Dottori, M., 2019. Isolation and molecular typing of *Leishmania infantum* from *Phlebotomus perfiliewi* in a reemerging focus of leishmaniasis, northeastern Italy. Microorganisms 7, 644.

- Calzolari, M., Romeo, G., Bergamini, F., Dottori, M., Rugna, G., Carra, E., 2022. Host preference and *Leishmania infantum* natural infection of the sand fly *Phlebotomus perfiliewi* in northern Italy. *Acta Tropica*, 226, 106246.
- Campino, L., Maia, C., 2018. The role of reservoirs: Canine leishmaniasis. In: Ponte-Sucre, L., Padrón-Nieves, M. (Eds.), *Drug Resistance in Leishmania Parasites*. Springer Verlag, Viena, pp. 59-83.
- Cardoso, L., Schallig, H., Persichetti, M.F., Pennisi, M.G. 2021. New epidemiological aspects of animal leishmaniosis in Europe: The role of vertebrate hosts other than dogs. *Pathogens* 10, 307.
- Chaara, D., Haouas, N., Dedet, J.P., Babba, H., Pratlong, F., 2014. Leishmaniasis in Maghreb: an endemic neglected disease. *Acta Trop.* 132, 80-93.
- Chappuis, F., Sundar, F., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J., Boelaert, M., 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 873-82.
- Chargui, N., Haouas, N., Slama, D., Gorcii, M., Jaouadi, K., Essabbah-Aguir, N., Mezhoud, H., Babba, H., 2013. Transmission of visceral leishmaniasis in a previously non-endemic region of Tunisia: detection of *Leishmania* DNA in *Phlebotomus perniciosus*. *J. Vector Ecol.* 38, 1-5.
- Chaskopoulou, A., Giantsis, I., Demir, S., Bon, M., 2016. Species composition, activity patterns and blood meal analysis of sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the metropolitan region of Thessaloniki, an endemic focus of canine leishmaniasis. *Acta Trop.* 158, 170-6.
- Chavy, A., 2019. Influence de l'environnement sur le cycle de transmission de la leishmaniose cutanée en Guyane, à multi-échelle spatiale. Thèse de Doctorat. Université de Guyane. 1-284.
- Chauvet, G., 1984. Investigations entomologiques dans les foyers de leishmaniose cutanée de la wilaya de M'Sila. Rapport d'une mission en Algérie. 36p.
- Cherif, K., 2014. Etude éco-épidémiologique de la leishmaniose cutanée dans le bassin du Hodna (M'sila). Thèse de Doctorat. Université Ferhat Abbas-Sétif 1. 1-204.
- Cherif, A.M., Bellatreche, A.Y., Ait-Oudhia, K., 2022. A cross-sectional study of *Leishmania infantum* infection in stray cats in Algiers' suburbs, Algeria, and evaluation of serological and molecular tests for its diagnosis. *VETERINARIA*, 71, 73-83.
- Cherif, K., Boudrissa, A., Cherif, M.H., Harrat, Z., 2012. Un programme social pour la lutte physique contre la leishmaniose cutanée zoonotique dans la wilaya de M'Sila en Algérie. *Santé Publique* 24, 511-522.
- Cobo, F., 2014. Leishmaniasis. In: Cobo, F. (Eds.), *Imported Infectious Diseases*. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 227-242.
- Contreras Gutiérrez, M.A., Vivero, R.J., Vélez, I.D., Porter, C.H., Uribe, S., 2014. DNA barcoding for the identification of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. *PloS one*, 9, e85496.

« D »

- Dahmani, A., Ouchene-Khelifi, N.A., Ouchene, N., 2022. Human and Canine Leishmaniasis: Diagnosis and Risk Factors. *World Vet. J.* 12, 51-59.
- Daneshbod, K., 1972. Visceral Leishmaniasis (Kala-azar) in Iran: A Pathologic and Electron Microscopic Study. *Am. J. Clin. Pathol.* 57, 156-166.
- Dantas-Torres, F., 2009. Canine leishmaniosis in South America. *Parasit. Vectors* 2, 1-8.
- Dantas-Torres, F., de Brito, M.E.F., Brandão-Filho, S.P., 2006. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet. Parasitol.* 140, 54-60.

- Dantas-Torres, F., Solano-Gallego, L., Baneth, G., Ribeiro, V.M., de Paiva-Cavalcanti, M., Ortanto, D., 2012. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol.* 28, 531-538.
- Da Rocha Nery, L.C., Lorosa, E.S., Ramos Franco, A.M., 2004. Feeding preference of the sand flies *Lutzomyia umbratilis* and *L. spathotrichia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in an urban forest patch in the City of Manaus, Amazonas, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99, 571-574.
- da Silva Sales, K.G., Costa, P.L., de Moraes, R.C.S., Otranto, D., Brandão-Filho, S.P., de Paiva Cavalcanti, M., Dantas-Torres, F., 2015. Identification of phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR. *Parasit. Vectors* 8, 1-6.
- Davidson, R.N., 2017. Leishmaniasis. In: Cohen, J., Powderly, W.G., Opal, S.M. (Eds.), *Infectious Diseases*. Elsevier, 1059-1064.e1
- Davies, C.R., Lane, R.R., Villaseca, P., Pyke, S., Campos, P., Llanos-Cuentas, A., 1995. The relationship between CDC light-trap and human-bait catches of endophagic sandflies (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. *Med. Vet. Entomol.* 9, 241-8.
- De Colmenares, M., Portús, M., Botet, J., Dobaño, C., Gállego, M., Wolff, M., Seguí, G., 1995. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. *J. Med. Entomol.* 32, 229-233.
- Dedet, J.P., 2009. Leishmanies, leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique. *EMC - Maladies Infectieuses* 6, 1-14.
- Dedet, J.P., Addadi, K., Belazzoug, S., 1984. Les Phlébotomes (Diptera: Psychodidae) d'Algérie. *Cah.O.R.S.T.O.M.Sér.Ent. Med. Parasitol.* 22, 99-127.
- de Freitas, E., Melo, M.N., da Costa-Val, A.P., Michalick, M.S.M., 2006. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet. Parasitol.* 137, 159-167.
- de Monbrison, F., Mihoubi, I., Picot, S., 2007. Real-time PCR assay for the identification of cutaneous *Leishmania* parasite species in Constantine region of Algeria. *Acta Trop.* 102, 79-83.
- Depaquit, J., 2014. Molecular systematics applied to Phlebotomine sandflies: Review and perspectives. *Infect. Genet. Evol.* 2014, 744-756.
- Depaquit, J., Léger, N., 2017. Les phlébotomes (Diptera : Psychodidae : Phlebotominae). In : Duvallat, G., Fontenille, D., Robert, V. (Ed.), *Entomologie Médicale et Vétérinaire*. IRD Éditions, Marseille, pp. 295-320.
- Desjeux, P., 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95, 239-243.
- Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305-318.
- Díaz, E., Ponte-Sucre, A., 2018. Leishmaniasis: The Biology of a Parasite. In: Ponte-Sucre, A., Padrón-Nieves, M. (Eds), *Drug Resistance in Leishmania Parasites*. Springer, Cham, pp. 1-16.
- Di Muccio, T., Scalone, A., Bruno, A., Marangi, M., Grande, R., Armignacco, O., Gradoni, L., Gramiccia, M., 2015. Epidemiology of imported leishmaniasis in Italy: Implications for a European endemic country. *PloS one* 10, e0129418.
- Dokianakis, E., Tsirigotakis, N., Christodoulou, V., Poulakakis, N., Antoniou, M., 2018. Identification of wild-caught phlebotomine sand flies from Crete and Cyprus using DNA barcoding. *Parasit. Vectors* 11, 94.

- Dostálová, A., Volf, P., 2012. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. Parasit. Vectors 5, 1-12.
- Dujardin, J.C., 2006. Risk factors in the spread of leishmaniases: towards integrated monitoring?. Trends Parasitol. 22, 4-6.
- Duprey, Z.H., Steurer, F.J., Rooney, J.A., Kirchhoff, L.V., Jackson, J.E., Rowton, E.D., Schantz, P.M., 2006. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. Emerg. Infect. Dis. 12, 440.
- Dvorák, V., Halada, P., Hlavackova, K., Dokianakis, E., Antoniou, M., Volf, P., 2014. Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. Parasit. Vectors 7, 21.
- Dvorak, V., Shaw, J., Volf, P., 2018. Parasite biology: the vectors. In: Bruschi, F., Gradoni, L. (Eds), The leishmaniases: old neglected tropical diseases. Springer International Publishing, Cham, pp. 31-77.

## « E »

- Eddaikra, N., Ait-Oudhia, K., Kherrachi, I., Oury, B., Moulti-Mati, F., Benikhlef, R., Harrat, Z., Sereno, D., 2018. Antimony susceptibility of *Leishmania* isolates collected over a 30-year period in Algeria. PLoS Negl. Trop. Dis. 12, e0006310.
- Eddaikra, N., Ait-Oudhia, K., Oury, B., Farida, M. M., Harrat, Z., Sereno, D., 2017. *Leishmania* antimony resistance/susceptibility in Algerian foci. Open J. Trop. Med. 1, 024-032.
- Elaagip, A., Ahmed, A., Wilson, M.D., Boakye, D.A., Abdel Hamid, M.M., 2020. Studies of host preferences of wild-caught *Phlebotomus orientalis* and *Ph. papatasi* vectors of leishmaniasis in Sudan. PLoS ONE 15, e0236253.
- El Sawaf, B.M., Kassem, H.A., Mogalli, N., El Hossary, S.S., Ramadan, N.F., 2016. Current knowledge of sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) of northwestern Yemen and how it relates to leishmaniasis transmission. Acta Trop. 162, 11-19.
- Esch, K.J., Petersen, C.A., 2013. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. Clin. Microbiol. Rev. 26, 58-85.

## « F »

- Faucher, B., Pomares, C., Fourcade, S., Benyamine, A., Marty, P., Pratlong, L., Pratlong, F., 2011. Mucosal *Leishmania infantum* leishmaniasis: specific pattern in a multicentre survey and historical cases. J. Infect. 63, 76-82.
- Fellahi, A., Djirar, N., Cherif, A., Boudrissa, A., Eddaikra, N., 2021. Zoonotic cutaneous leishmaniasis and *Leishmania* infection among *Meriones shawi* population in Setif Province, Algeria. BIODIVERSITAS 22, 2547-2554.
- Feliciangeli, M.D., 2004. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. Med. Vet. Entomol. 18, 71-80.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3, 294-299.
- Fontenille, D., Lagneau, C., Lecollinet, S., Lefait-Robin, R., Setbon, M., Tirel, B., Yébakima, A., 2009. La lutte antivectorielle en France. IRD Editions, Marseille, pp. 533.

- Frahtia-Benotmane, K., 2015. Détection moléculaire des Leishmanies à partir du genre *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae): Tendance vers la régression de la leishmaniose à Constantine?. Thèse de Doctorat. Université des Frères Mentouri - Constantine. 1-141.
- Freeman, K.S., Miller, M.D., Breitschwerdt, E.B., Lappin, M.R., 2010. Leishmaniasis in a dog native to Colorado. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 237, 1288-1291.

## « G »

- Galati, E.A., Galvis-Ovallos, F., Lawyer, P., Léger, N., Depaquit, J., 2017. An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). *Parasite* 24.
- Gálvez, R., Descalzo, M.A., Miró, G., Jiménez, M.I., Martín, O., Dos Santos- Brandao, F., Guerrero, I., Cubero, E., Molina, R., 2010. Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Trop.* 115, 95-102.
- Gálvez, R., Montoya, A., Fontal, F., De Murguía, L.M., Miró, G., 2018. Controlling phlebotomine sand flies to prevent canine *Leishmania infantum* infection: A case of knowing your enemy. *Res. Vet. Sci.* 121, 94-103.
- Gao, C.H., Wang, J.Y., Zhang, S., Yang, Y.T., Wang, Y., 2015. Survey of wild and domestic mammals for infection with *Leishmania infantum* following an outbreak of desert zoonotic visceral leishmaniasis in Jiashi, People's Republic of China. *PLoS One* 10, e0132493.
- Gaouaoui, R., Zeroual, S., Boudjelida, H., 2017. Association between climatic changes and leishmaniasis incidence in Biskra district, Algeria. *J. Entomol. Zool. Stud.* 5, 43-49.
- Garlapati, R.B., Abbasi, I., Warburg, A., Poché, D., Poché, R., 2012. Identification of bloodmeals in wild caught blood fed *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) using cytochrome b PCR and reverse line blotting in Bihar, India. *J. Med. Entomol.* 49, 515-521.
- Garros, C., Gardes, L., Allene, X., Rakotoarivony, I., Viennet, E., Rossi, S., Balenghien, T., 2011. Adaptation of a species-specific multiplex PCR assay for the identification of blood meal source in Culicoides (Ceratopogonidae: Diptera): applications on Palaearctic biting midge species, vectors of Orbiviruses. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1103-1110.
- Gebre-Michael, T., Balkew, M., Berhe, N., Hailu, A., Mekonnen, Y., 2010. Further studies on the phlebotomine sandflies of the kala-azar endemic lowlands of Humera-Metema (north-west Ethiopia) with observations on their natural blood meal sources. *Parasit. Vectors* 3, 1-7.
- Gherbi, R., 2020. Inventaire, Biologie et Ecologie des Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) dans la région semi-aride (cas de la région de Sétif) avec détection et identification des espèces de Leishmanies. Thèse de Doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif 1, 1-203.
- Gherbi, R., Bounechada, M., Latrofa, M.S., Annoscia, G., Tarallo, V.D., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2020. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* species in a focus of cutaneous leishmaniasis in Algeria. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008024.
- Gilot, B., Gillet, J.F., Quilici, M., Dunan, S., Lachet, B., Ranque, J., 1983. Le foyer Marseillais de leishmaniose viscérale : cartographie épidémiologique à 1/50 000. Essai méthodologique. *Documents de Cartographie Écologique* 26, 3-27.
- González, E., Jiménez, M., Hernández, S., Martín-Martín, I., Molina, R., 2017. Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012-2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. *Parasit. Vectors* 10, 368.

- González, E., Molina, R., Iriso, A., Ruiz, S., Aldea, I., Tello, A., Fernández, D., Jiménez, M., 2021. Opportunistic feeding behaviour and *Leishmania infantum* detection in *Phlebotomus perniciosus* females collected in the human leishmaniasis focus of Madrid, Spain (2012–2018). PLoS Negl. Trop. Dis. 15, e0009240.
- Gradoni, L., 2018. A Brief Introduction to Leishmaniasis Epidemiology. In: Bruschi, F., Gradoni, L. (Eds.), The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases. Springer Verlag, Berlin, Germany, pp. 1-13.
- Grevelink, S.A., Lemer, E.A., 1996. Leishmaniasis. J. Am. Acad. Dermatol. 34, 257- 72.
- Guedes, D.L., van Henten, S., Cnops, L., Adriaensen, W., van Griensven, J., 2020. Sexual Transmission of Visceral Leishmaniasis: A Neglected Story. Trends Parasitol. 36, 950-952.
- Guernaoui, S., Boumezzough, A., 2009. Habitat preferences of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in southwestern Morocco. J. Med. Entomol. 46, 1187-1194.
- Guernaoui, S., Boumezzough, A., Laamrani, A., 2006. Altitudinal structuring of sand flies (Diptera: Psychodidae) in the high-atlas mountains (Morocco) and its relation to the risk of leishmaniasis transmission. Acta Trop. 97, 346-351.
- Guy, M.W., Killick-Kendrick, R., Gill, G.S., Rioux, J.A., Bray, R.S., 1984. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 19. Determination of the hosts of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 in the Cévennes by bloodmeal analyses. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 59, 449-458.

« H »

- Hadj-Slimane, T., 2018. La leishmaniose viscérale infantile dans l'Ouest algérien : Diagnostic biologique et Epidémiologie. Thèse de Doctorat. Université Ahmed Ben Bella-Oran 1. 1-198.
- Hamiroune, M., Selt, F., Senni, Z., Saidani, K., Djemal, M., 2019. Epidemiological situation of human cutaneous leishmaniasis in the steppe region of Djelfa in Algeria: incidence and factors of variation. Int. J. Innov. Appl. Stud. 26, 253-261.
- Haouas, N., Pesson, B., Boudabous, R., Dedet, J., Badda, H., Ravel, C., 2007. Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir by bloodmeal analysis in the insect vectors. Am. J. Trop. Med. Hyg. 77, 1054-1059.
- Harrat, Z., Belkaid, M., 2003. Les leishmanioses dans l'algérois. Données épidémiologiques. Bull. Soc. Pathol. Exot. 96, 212-214.
- Harrat, Z., Boubidi, S.C., Pratlong, F., Benikhlef, R., Selt, B., Dedet, J.P., Ravel, C., Belkaid, M., 2009. Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte & Pratlong 1986) in Algeria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 103, 716-720.
- Harrat, Z., Hamrioui, B., Belkaid, M., Tabet-Derraz, O., 1995. Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie. Bull. Soc. Path. Exot. 88, 180-184.
- Harrat, Z., Pratlong, F., Belazzoug, S., Dereure, J., Deniau, M., Rioux, J.A., Belkaid, M., Dedet, J.P., 1996. *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 90, 625–629.
- Herwaldt, B.L., 2001. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. Clin. Microbiol. Rev. 14, 659-688.
- Hlavackova, K., Dvorak, V., Chaskopoulou, A., Volf, P., Halada, P., 2019. A novel MALDI- TOF MS-based method for blood meal identification in insect vectors: a proof of concept study on phlebotomine sand flies. PLoS Negl. Trop. Dis. 13, e0007669.

## « I »

- Institut National de Santé Publique (INSP), 2002. Situation épidémiologique de l'année 2002. REM: Relevé Epidémiologique Mensuel de l'année 2002. Vol. XIII.
- Institut National de Santé Publique (INSP), 2007. Situation épidémiologique de l'année 2007. REM: Relevé Epidémiologique Mensuel de l'année 2007. Vol. X V III.
- Institut National de Santé Publique (INSP), 2013. Situation épidémiologique de l'année 2013. REM: Relevé Epidémiologique Mensuel de l'année 2013. Vol. XXIV.
- Institut National de Santé Publique (INSP), 2017. Situation épidémiologique de l'année 2017. REM: Relevé Epidémiologique Mensuel de l'année 2017. Vol. XXVIII
- Institut national de la santé publique (INSP). REM: Relevé Epidémiologique Mensuel 2000-2017. Disponible sur : <https://www.insp.dz/index.php/Non-categorise/rem.html>
- Izri, A., Belazzoug, S., 1993. *Phlebotomus (Larrousius) perfiliewi* naturally infected with dermatropic *Leishmania infantum* at Tenes, Algeria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 87, 399.
- Izri, A., Belazzoug, S., 2007. Diagnostic de laboratoire des leishmanioses rencontrées en Algérie. Rev. Francoph. des Lab. 396, 3-10.
- Izri, A., Belazzoug, S., Boudjebla, Y., Dereure, J., Pralong, S., Delalbre-Belmonte, A., Rioux, J.A., 1990. *Leishmania infantum* MON-1 isolé de *Phlebotomus perniciosus*, En Kabylie (Algérie). Ann. Parasitol. Hum. Comp. 65, 151-152.
- Izri, M.A., Belazzoug, S., Pralong, F., Rioux, J.A., 1992. Isolement de *L. major* chez *Phlebotomus papatasi* à Biskra (Algérie) : fin d'une épopée écoépidémiologique. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 67, 31-2.
- Izri, A., Bendjaballah, A., Andriantsoanirina, V., Durand, R., 2014. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania killicki*, Algeria. Emerg. Infect. Dis. 20, 502-504.
- Izri, A., Bendjaballah-Laliam, A., Sereno, D., Akhoundi, M., 2021. Updates on geographical dispersion of *Leishmania* parasites causing cutaneous affections in Algeria. Pathogens 10, 267.
- Izri, A., Depaquit, J., Parola, P., 2006. Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes autour du bassin méditerranéen. Med. Trop. 66, 429-435.

## « J »

- Jaouadi, K., Bettaieb, J., Bennour, A., Salem, S., Ghawar, W., Rjeibi, M.R., Khabouchi, N., Gonzalez, J.P., Diouani, M.F., Ben Salah, A., 2018. Blood meal analysis of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) for *Leishmania* spp. identification and vertebrate blood origin, central Tunisia, 2015-2016. Am. J. Trop. Med. Hyg. 98, 146.
- Jiménez, M., González, E., Iriso, A., Marco, E., Alegret, A., Fúster, F., Molina, R., 2013. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. Parasitol. Res. 112, 2453-2459.
- Jorjani, O., Mirkarimi, K., Charkazi, A., Dadban Shahamat, Y., Mehrbakhsh, Z., Bagheri, A., 2019. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Golestan province, Iran: a cross-sectional study of 8-years. Parasite Epidemiol. Control 5, e00099.

## « K »

- Kabbout, N., Merzoug, D., Chenchouni, H., 2016. Ecological status of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in rural communities of northeastern Algeria. J. Arthropod Borne Dis. 10, 24.

- Kalla, M.I., Guettouche, M.S., 2017. Using geomatics for assessing vulnerability to cutaneous leishmaniasis. Application to the Wilaya of Batna (Algeria). *Int. J. GEOMATE* 13, 9-15.
- Kamhawi, S., Arbagi, A., Adwan, S., Rida, M., 1993. Environmental manipulation in the control of a zoonotic cutaneous leishmaniasis focus. *Arch. Inst. Pasteur Tunis* 70, 383-90.
- Karamian, M., Motazedian, M.H., Mehrabani, D., Gholami, K., 2007. *Leishmania major* infection in a patient with visceral leishmaniasis: treatment with Amphotericin B. *Parasitol. Res.* 101, 1431-1434.
- Kato, H., Gomez, E.A., Cáceres, A.G., Uezato, H., Mimori, T., Hashiguchi, Y., 2010. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 814-826.
- Kato, H., Uezato, H., Katakura, K., Calvopina, M., Marco, J.D., Barroso, P.A., Gomez, E.A., Mimori, T., Korenaga, M., Iwata, H., Nonaka, S., Hashiguchi, Y., 2005. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 87-93.
- Keesing, F., Holt, R.D., Ostfeld, R.S., 2006. Effects of species diversity on disease risk. *Ecol. Lett.* 9, 485-498.
- Kent, R.J., 2009. Molecular methods for arthropod blood meal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 4-18.
- Khezzani, B., Bouchemal, S. 2017. Demographic and spatio-temporal distribution of cutaneous leishmaniasis in the Souf oasis (Eastern South of Algeria): Results of 13 years. *Acta Trop.* 166, 74-80.
- Killick-Kendrick, R., 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.* 4, 1-24.
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17, 279-289.
- Kimutai, A., Ngure, P., Tonui, W., Gicheru, M., Nyamwamu, L., 2009. Leishmaniasis in Northern and Western Africa: a review. *Afr. J. Infect. Dis.* 3, 14-25.
- Kniha, E., Milchram, M., Dvořák, V., Halada, P., Obwaller, A.G., Poepl, W., Moeseder, G., Volf, P., Walochnik, J., 2021. Ecology, seasonality and host preferences of Austrian *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908, populations. *Parasit. Vectors* 14, 1-12.
- Kobets, T., Grekov, I., Lipoldova, M., 2012. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. *Curr. Med. Chem.* 19, 1443-74.
- Kouadra, R., Demdoun, A., 2020. Hydrogeochemical characteristics of groundwater and quality assessment for the purposes of drinking and irrigation in Bougaa area, Northeastern Algeria. *Acta Geochim.* 39, 642-654.
- Kuhls, K., Alam, M.Z., Cupolillo, E., Ferreira, G.E.M., Mauricio, I.L., Oddone, R., Feliciangeli, M.D., Wirth, T., Miles, M.A., Schönian, G., 2011. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1155.
- Kuhls, K., Chicharro, C., Canavate, C., Cortes, S., Campino, L., Haralambous, C., Soteriadou, K., Pratlong, F., Dedet, J.P., Mauricio, I., Miles, M., Schaar, M., Ochsenreither, S., Radtke, O.A., Schönian, G., 2008. Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e261.
- Kumar, A., 2013. Introduction. In: Kumar, A. (Eds.), *Leishmania and Leishmaniasis*. Springer, New York, pp. 1-11.
- Kykalová, B., 2019. Bloodmeal sources of European sand flies (Diptera: Phlebotominae) and methods of their identification. Diploma thesis. Charles University. 1-94.

## « L »

- Lafri, I., Almeras, L., Bitam, I., Caputo, A., Yssouf, A., Forestier, C., Izri, A., Raoult, D., Parola, P., 2016. Identification of Algerian field-caught phlebotomine sand fly vectors by MALDI-TOF MS. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 10, e0004351.
- Lafri, I., Bitam, I., 2021. Phlebotomine sandflies and associated pathogens in Algeria: update and comprehensive overview. *Vet. Ital.* 57, 175-180.
- Lane, R.P., 1993. Sand flies (Phlebotominae). In: Lane, R.P., Crosskey, R.W. (eds), *Medical Insects and Arachnids*. Chapman and Hall, London, pp. 78-119.
- Lawyer, P., Killick-Kendrick, M., Rowland, T., Rowton, E., Volf, P., 2017. Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae). *Parasite* 24.
- Lewis, D.J., 1978. The phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Oriental region. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Entomol.* 37, 217-343.
- Lewis, D.J., Young, D.G., Fairchild, G.B., Minter, D.M., 1977. Proposals for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Syst. Entomol.* 2, 319-332.
- Lindoso, J.A.L., Cunha, M.A., Queiroz, I.T., Moreira, C.H.V. 2016. Leishmaniasis-HIV coinfection: current challenges. *HIV/AIDS (Auckl)*. 8, 147.
- Lisi, O., D'Urso, V., Vaccalluzzo, V., Bongiorno, G., Khoury, C., Severini, F., Di Muccio, T., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, M., 2014. Persistence of phlebotomine *Leishmania* vectors in urban sites of Catania (Sicily, Italy). *Parasit. Vectors* 7, 560.

## « M »

- Maia, C., Cardoso, L., 2015. Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. *Vet. Parasitol.* 213, 2-11.
- Maia, C., Dantas-Torres, F., Campino, L., 2018. Parasite Biology: The Reservoir Hosts. In: Bruschi, F., Gradoni, L. (Eds.), *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*. Springer, Berlin, pp. 79-106.
- Maia, C., Depaquit, J., 2016. Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? *Parasite*, 23.
- Maia, C., Parreira, R., Cristóvão, J.M., Freitas, F.B., Afonso, M.O., Campino, L., 2015. Molecular detection of *Leishmania* DNA and identification of blood meals in wild caught phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Portugal. *Parasit. Vectors* 8, 173.
- Magill, A.J., 2015. *Leishmania* Species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous, and Mucosal Leishmaniasis. In: Bennett, J.E., Dolin, R., Blaser, M.J. (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Elsevier, Philadelphia, pp. 3091-3107.e4
- Maleki-Ravasan, N., Oshaghi, M.A., Javadian, E., Rassi, Y., Sadraei, J., Mohtarami, F., 2009. Blood meal identification in field-captured sand flies: comparison of PCR-RFLP and ELISA assays. *Iran. J. Arthropod-Borne Dis.* 3, 8-18.
- Manseur, H., 2015. Etude entomologique des phlébotomes dans une région endémique de leishmaniose viscérale wilaya de Bejaïa daïra de Kherrata. Mémoire de Magister. Université Saad Dahlab-Blida 1. 1- 139.
- Mansouri, R., Pralong, F., Bachi, F., Hamrioui, B., Dedet, J.P., 2012. The first isoenzymatic characterization of the *Leishmania* strains responsible for cutaneous Leishmaniasis in the area of Annaba (Eastern Algeria). *Open Conf. Proc. J.* 3, 6-11.

- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N., Gradoni, L., 2012. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med. Vet. Entomol.* 27, 123-147.
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglio, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., Gradoni, L., 2008. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop. Med. Int. Health* 13, 256-264.
- Mauricio, I., 2018. *Leishmania* taxonomy. In: Bruschi, F., Gradoni, L. (Eds.), *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*. Springer Verlag, Berlin, Germany, pp. 15-30.
- Medkour, H., 2017. La leishmaniose canine à Bouira et Sétif : étude séro-épidémiologique et mise en évidence de la relation vecteur phlébotome-réservoir canin. Mémoire de Magister. Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire D'Alger. 1-173.
- Medkour, H., Laidoudi, Y., Lafri, I., Davoust, B., Mekroud, A., Bitam, I., Mediannikov, O., 2019a. Canine vector-borne protozoa: molecular and serological investigation for *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., *Babesia* spp., and *Hepatozoon* spp. in dogs from Northern Algeria. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 19, 100353.
- Medkour, H., Laidoudi, Y., Lafri, I., Bitam, I., Mediannikov, O., Davoust, B., 2019b. Canine leishmaniosis and first report of *Leishmania infantum* in the blood of equids in Kabylia (Algeria). *Int. J. Infect. Dis.* 79, 117-118.
- Menn, B., Lorentz, S., Naucke T.J., 2010. Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasit. Vectors* 3, 34.
- Mhaidi, I., Ait Kbaich, M., El Kacem, S., Daoui, O., Akarid, K., Spitzova, T., Halada, P., Dvorak, V., Lemrani, M., 2021. Entomological study in an anthroponotic cutaneous leishmaniasis focus in Morocco: Fauna survey, *Leishmania* infection screening, molecular characterization and MALDI-TOF MS protein profiling of relevant *Phlebotomus* species. *Transbound. Emerg. Dis.* 69, 1073-1083.
- Mhaidi, I., El Kacem, S., Ait Kbaich, M., El Hamouchi, A., Sarih, M., Akarid, K., Lemrani, M., 2018. Molecular identification of *Leishmania* infection in the most relevant sand fly species and in patient skin samples from a cutaneous leishmaniasis focus, in Morocco. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006315.
- Michalsky, E.M., Fortes-Dias, C.L., Pimenta, P.F.P., Secundino, N.F.C., Dias, E.S., 2002. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 44, 255-9.
- Mihoubi, I., De Monbrison, F., Frahtia, K., Picot, S., Gasse, N., 2012. Utility of real-time PCR for the diagnosis of infantile visceral leishmaniasis in Algeria. *Med. Sante Trop.* 22, 61-64.
- Mihoubi, I., Picot, S., Hafirassou, N., de Monbrison, F., 2008. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Algeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 1157-1159.
- Mokni, M., 2019. Leishmanioses cutanées. *Ann. Dermatol. Venereol.* 146, 232-46.
- Monge-Maillo, B., Norman, F.F., Cruz, I., Alvar, J., Lopez-Velez, R., 2014. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3021.
- Moreira, W., 2011. Stress oxydatif, différenciation et mort cellulaire chez le parasite *Leishmania*. Thèse de Doctorat. Université Laval-Québec. 1-214.
- Mouloua, A., Boubidi, S.C., Bouiba, L., Mezai, G., Madiou, M., Harrat, Z., 2017. Impact environnemental sur la répartition des leishmanioses dans le foyer de Tizi-Ouzou (Algérie). *Rev. Med. Vet.* 168, 252-261.
- Mozafari, O., Sofizadeh, A., Shoraka, H.R., 2020. Distribution of *Leishmania* Infection in Humans, Animal Reservoir Hosts and Sandflies in Golestan Province, Northeastern Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Iran. J. Public Health* 49, 2308.

- Muñoz, C., 2020. Distribution, dispersion and blood-feeding preferences of *Phlebotomus* spp. (Diptera, Psychodidae) in microenvironments in southeast Spain: implications for transmission of *Leishmania infantum*. Thèse de Doctorat. Université de Murcie. 1-210.
- Muñoz, C., Martínez-de la Puente, J., Figuerola, J., Pérez-Cutillas, P., Navarro, R., Ortuño, M., Bernal, L.J., Ortiz, J., Soriguer, R., Berriatua, E., 2019. Molecular xenomonitoring and host identification of *Leishmania* sand fly vectors in a Mediterranean periurban wildlife park. *Transbound. Emerg. Dis.* 66, 2546-2561.
- Munstermann, L.E., 2019. Phlebotomine sand flies and moth flies (Psychodidae). In: Mullen, G.R., Durden, L.A. (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology*. Elsevier Inc., United States, pp. 191-211.

## « N »

- Nadim, A.J., Javadian, E., Mohebbali, M., 1997. The experience of leishmanization in the Islamic Republic of Iran. *East. Mediterr. Health J.* 3, 284-289.
- Natarajan, G., Oghumu, S., Varikuti, S., Thomas, A., Satoskar, A., 2014. Mechanisms of Immunopathology of Leishmaniasis. In: Satoskar, A., Durvasula, R. (Eds.), *Pathogenesis of Leishmaniasis*. Springer, New York, pp. 1-13.
- Naucke, T.J., Lorentz, S., 2012. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit. Vectors*, 5, 1-5.
- Nazari, M., Nazari, S., Hanafi-Bojd, A.A., Najafi, A., Nazari, S., 2017. Situation analysis of cutaneous leishmaniasis in an endemic area, South of Iran. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 10, 92-97.
- Nouiri, I., Chemak, F., Mansour, D., Bellali, H., Ghrab, J., Baaboub, J., Chahed, M.K., 2015. Impacts of irrigation water management on consumption indicators and exposure to the vector of zoonotic cutaneous Leishmaniasis (ZCL) in Sidi Bouzid, Tunisia. *Int. J. Agric. Pol. Res.* 3, 93-103.
- Nzelu, C.O., Cáceres, A.G., Arrunátegui-Jiménez, M.J., Lañas-Rosas, M.F., Yañez-Trujillano, H.H., Luna-Caipó, D.V., Holguín-Mauricci, C.E., Katakura, K., Hashiguchi, Y., Kato, H., 2015. DNA barcoding for identification of sand fly species (Diptera: Psychodidae) from leishmaniasis-endemic areas of Peru. *Acta Trop.* 145, 45-51.

## « O »

- Office National des Statistiques (ONS), 2008. Disponible sur : <https://www.ons.dz/>.
- Office National des Statistiques (ONS), 2016. Disponible sur : <https://www.ons.dz/>.
- Okwor, I., Uzonna, J., 2016. Social and economic burden of human leishmaniasis. *Social and economic burden of human leishmaniasis*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94, 489-93.
- Organisation Mondiale de la Santé, 2011. La lutte contre les leishmanioses: rapport de la réunion du comité OMS d'experts de la lutte contre les leishmanioses, Genève, 22-26 mars 2010.
- Organisation Mondiale de la Santé, 2015. Cutaneous Leishmaniasis: Control in Selected Countries of the WHO Eastern Mediterranean and African Regions: Report of an Interregional Network Meeting, Casablanca, Morocco, 23-24 June 2014. World Health Organization.
- Organisation Mondiale de la Santé, 2020. Disponible sur : [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases#:~:text=Parmi%20les%20autres%20maladies%20virales,\(transmise%20par%20les%20tiques\).](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases#:~:text=Parmi%20les%20autres%20maladies%20virales,(transmise%20par%20les%20tiques).)
- Organisation Mondiale de la Santé, 2021. Surveillance mondiale de la leishmaniose: 2019-2020, une période de référence pour la feuille de route à l'horizon 2030. *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 96(35), 401-419.

- Organisation Mondiale de la Santé, 2022. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Oryan, A., Akbari, M., 2016. Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 9, 925-932.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., 2013. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol.* 29, 339-345.

## « P »

- Pace, D., 2014. Leishmaniasis. *J. Infect.* 69, 10-18.
- Paiva, B.R., Secundino, N.F.C., Nascimento, J.C., Pimenta, P.F.P., Galati, E.A.B., Andrade Junior, H.F., Malafronte, R.S., 2006. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop.* 99, 252-259.
- Paiva, B.R., Secundino, N.F., Pimenta, P.F., Galati, E.A., Andrade Junior, H.F., Malafronte, R.S., 2007. Standardization of conditions for PCR detection of *Leishmania* spp. DNA in sand flies (Diptera, Psychodidae). *Cad. Saude Publica.* 23, 87-94.
- Paixão-Marques, M., Alves-Martin, M., Guiraldi, L., Dos Santos, W., De Lemos, F., Sánchez, G.P., Richini-Pereira, V.B., Lucheis, S.B., 2019. First isolation of *Leishmania infantum* by blood culture in bovines from endemic area for canine visceral leishmaniasis. *Parasitology* 146, 911-913.
- Palma, D., Mercuriali, L., Figuerola, J., Montalvo, T., Bueno-Marí, R., Millet, J.P., Simón, P., Masdeu, E., Rius, C., 2021. Trends in the Epidemiology of Leishmaniasis in the City of Barcelona (1996–2019). *Front. Vet. Sci.* 8, 389.
- Pavli, A., Maltezou, H.C., 2010. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *Int. J. Infect. Dis.* 14, e1032–9.
- Perez, J.E., Ogosuku, E., Inga, R., Lopez, M., Monje, J., Paz, L., Nieto, E., Arevalo, J., Guerra, H., 1994. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 161-164.
- Pratlong, F., Dereure, J., Ravel, C., Lami, P., Balard, Y., Serres, G., Lanotte, G., Rioux, J-A., Dedet, J-P., 2009. Geographical distribution and epidemiological features of Old World cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzyme analysis of 1048 strains. *Trop. Med. Int. Health* 14, 1071-1085.

## « Q »

- Quinnell, R.J., Courtenay, O., 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136, 1915-34.
- Quiroga, C., Cevallos, V., Morales, D., Baldeón, M. E., Cárdenas, P., Rojas-Silva, P., Ponce, P., 2017. Molecular identification of *Leishmania* spp. in sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) from Ecuador. *J. Med. Entomol.* 54, 1704-1711.

## « R »

- Ramalho-Ortigao, M., Gubler, D.J., 2020. Human Diseases Associated With Vectors (Arthropods in Disease Transmission). In: Ryan, E.T., Hill, D.R., Solomon, T., Aronson, N.E., Endy, T.P. (Eds.), *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. Elsevier, pp. 1063-1069.
- Ramdane, E., Berchi, S., Louad, K., 2018. Les phlébotomes (Diptera, Psychodidae), vecteurs d'agents pathogènes responsables de la leishmaniose humaine dans la région de Constantine (Algérie). *Entomofauna* 39, 537-555.

- Ready, P.D., 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 227-250.
- Redjem, A., Tacherift, A., 2010. Urbanisation Au Hodna Et émergence D'un Système De Villes Sur L'axe M'sila-Barika: Une Approche Spatio-temporelle. *Sci. Technol.* 31, 55-62.
- Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S., 2007. Cutaneous Leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* 7, 581-596.
- Remadi, L., Chargui, N., Jiménez, M., Molina, R., Haouas, N., Gonzàlez, E., Chaabane- Banaouas, R., Ben Salah, E., Haddaji, M., Chaabouni, Y., Babba, H., 2020. Molecular detection and identification of *Leishmania* DNA and blood meal analysis in *Phlebotomus (Larrousius)* species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008077.
- Reguera, R.M., Moran, M., Perez-Pertejo, Y., Garcia-Estrada, C., Balana-Fouce, R., 2016. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 227, 98-114.
- Resadore, F., Pereira Júnior, A.M., Paulo, P.F.M., Gil, L.H.S., Rodrigues, M.M.D.S., Araújo, M.D.S., Julião, G.R., Medeiros, J.F., 2019. Composition and vertical stratification of phlebotomine sand fly fauna and the molecular detection of *Leishmania* in forested areas in Rondônia State municipalities, Western Amazon, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 19, 347-357.
- Ribeiro, R. R., Michalick, M.S.M., da Silva, M.E., Dos Santos, C.C.P., Frézard, F.J.G., da Silva, S.M., 2018. Canine leishmaniasis: an overview of the current status and strategies for control. *Biomed Res. Int.* 2018.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Pratlong, F., 1986. *Leishmania killicki* n.sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques (Coll. Int. CNRS/INSERM, 1984). Montpellier: IMEEE; 139-42.
- Risueño, J., Muñoz, C., Pérez-Cutillas, P., Goyena, E., Gonzàlvez, M., Ortuño, M., Bernal, L.J., Ortiz, J., Alten, B., Berriatua, E., 2017. Understanding *Phlebotomus perniciosus* abundance in south-east Spain: assessing the role of environmental and anthropic factors. *Parasit. Vectors* 10, 189.
- Roberts, T., Barratt, J., Sandaradura, I., Lee, R., Harkness, J., Marriott, D., Ellis, J., Stark, D., 2015. Molecular epidemiology of imported cases of leishmaniasis in Australia from 2008 to 2014. *PLoS One* 10, e0119212.
- Rodgers, M.R., Popper, S.J., Wirth, D.F., 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasitol.* 71, 267-275.
- Rombolà, P., Barlozzari, G., Carvelli, A., Scarpulla, M., Iacoponi, F., Macrì, G., 2021. Seroprevalence and risk factors associated with exposure to *Leishmania infantum* in dogs, in an endemic Mediterranean region. *PLoS One* 16, e0244923.
- Rossi, E., Bongiorno, G., Ciolli, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, L., 2008. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Trop.* 105, 158-165.

« S »

- Salah, I., Abbasi, I., Warburg, A., Davidovitch, N., Kotler, B., 2020. Ecology of Leishmaniasis in an urbanized landscape: Relationship of sand fly densities, and *Leishmania tropica* infection rates with reservoir host colonies. *Acta Trop.* 204, 105332.
- Salomón, O.D., Quintana, M.G., Mastrángelo, A.V., Fernández, M.S. 2012. Leishmaniasis and climate change-case study: Argentina. *J. Trop. Med.* 2012.

- Sant'Anna, M.R., Nascimento, A., Alexander, B., Dilger, E., Cavalcante, R.R., Diaz-Albiter, H.M., Bates, P.A., Dillon, R.J., 2010. Chicken blood provides a suitable meal for the sand fly *Lutzomyia longipalpis* and does not inhibit *Leishmania* development in the gut. *Parasit. Vectors* 3, 1-11.
- Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H.D., Presber, W., Jaffe, C.L., 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 47, 349-358.
- Sebti, F., Hmamouch, A., Amarir, F., Fahmi, A., Delouane, B., Abbasi, I., Abderrahim, S., Khalid, H., Mohamed, R., Hajiba, F., 2015. Molecular epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Beni Mellal and Fquih ben saleh provinces in Morocco. *Acta Trop.* 149, 106-112.
- Seccombe, A.K., Ready, P.D., Huddleston, L.M., 1993. A catalogue of old world phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) occasional papers on systematic entomology No.8 London: Natural History Museum.
- Serafim, T.D., Coutinho-Abreu, I.V., Oliveira, F., Meneses, C., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., 2018. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nat. Microbiol.* 3, 548-555.
- Service, M., 2008. Phlebotomine sand-flies (Phlebotominae). In: Service, M. (Eds.), *Medical Entomology for Students*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 93-102.
- Service, M., 2012. Phlebotomine sand-flies (Phlebotominae). In: Service, M. (Eds.), *Medical Entomology for Students*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 98-106.
- Shirian, S., Oryan, A., Hatam, G.R., Daneshbod, K., Daneshbod, Y., 2012. Molecular diagnosis and species identification of mucosal leishmaniasis in Iran and correlation with cytological findings. *Acta cytol.* 56, 304-309.
- Shoraka, H.R., Taheri Soodejani, M., Allah Kalteh, E., Chegeni, M., Mahmudimanesh, M., Sofizadeh, A., 2021. Prevalence of *Leishmania major* Yakimoff and Schokhor (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in sandflies in Iran: a systematic review and meta-analysis. *J. Med. Entomol.* 58, 26-36.
- Shymanovich, T., Faw, L., Hajhashemi, N., Teague, J., Schal, C., Ponnusamy, L., Apperson, C.S., Hatano, E., Wasserberg, G., 2019. Diel periodicity and visual cues guide oviposition behavior in *Phlebotomus papatasi*, vector of old-world cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007165.
- Silva, F.L., Oliveira, R.G., Silva, T.M., Xavier, M.N., Nascimento, E.F., Santos, R.L., 2009. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 160, 55-59.
- Simpson, L., Kretzer, F., 1997. The mitochondrion in dividing *Leishmania tarentolae* cells is symmetric and circular and becomes a single asymmetric tubule in non-dividing cells due to division of the kinetoplast portion. *Mol. Biochem. Parasitol.* 87, 71-78.
- Singh, B., Sundar, S., 2012. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine* 30, 3834-42.
- Söbirk, S.K., Inghammar, M., Collin, M., Davidsson, L., 2018. Imported leishmaniasis in Sweden 1993-2016. *Epidemiol. Infect.* 146, 1267-1274.
- Song, Y., Laskay, Ü.A., Vilcins, I.M., Barbour, A.G., Wysocki, V.H., 2015. Top-down-assisted bottom-up method for homologous protein sequencing: hemoglobin from 33 bird species. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26, 1875-1884.
- Soong, L., 2009. Leishmaniasis. In: Alan D.T., Stanberry, L.R. (Eds.), *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases*. Academic Press, United Kingdom, pp. 1275-1289.

- Souza, C.F., Borges, M.Z., Andrade, A.J., 2009. Contribution to the knowledge of the phlebotomine sand flies fauna (Diptera: psychodidae) of Timóteo municipality, Minas Gerais, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 38, 267-271.
- Steen, H., Mann, M., 2004. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 699-711.
- Şuleşco, T., Erisoz Kasap, O., Halada, P., Oğuz, G., Rusnac, D., Gresova, M., Alten, B., Volf, P., Dvorak, V., 2021. Phlebotomine sand fly survey in the Republic of Moldova: species composition, distribution and host preferences. *Parasit. Vectors*, 14, 1-17.
- Svobodová, M., Alten, B., Zídková, L., Dvorač, V., Hlavacková, J., Mysková, J., Seblová, V., Kasap, O.E., Belen, A., Votýpka, J., Volf, P., 2009. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *Int. J. Parasitol.* 39, 251-256.

## « T »

- Tahir, D., 2014. Epidémiologie de la leishmaniose chez le chien et l'homme à Béjaïa. Mémoire de Magister. Université Saad Dahlab-Blida 1. 1-254.
- Talbi, F.Z., Aarab, L., Faraj, C., Janati Idrissi, A., El Ouali Lalami, A., 2016. Monitoring of vector-borne diseases: investigation of feeding preferences of the sand fly, *Phlebotomus perniciosus* (diptera: psychodidae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in aichoun, north center of Morocco. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 41, 48-52.
- Tateng, A.N., Kirstein, O.D., Ngouateu, O.B., Krüger, A., von Stebut, E., Maurer, M., Payne, V.K., Warburg, A., Dondji, B., 2018. First detection of *Leishmania donovani* in sand flies from Cameroon and its epidemiological implications. *Trop. Med. Int. Health* 23, 1014-1021.
- Tasew, G., Gadisa, E., Abera, A., Zewude, A., Chanyalew, M., Aseffa, A., Abebe, M., Ritter, U., van Zandbergen, G., Laskay, T., Tafess, K., 2016. *In vitro* permissiveness of bovine neutrophils and monocyte derived macrophages to *Leishmania donovani* of Ethiopian isolate. *Parasit. Vectors* 9, 1-9.
- Tesh, R.B., Chaniotis, B.N., Aronson, M.D., Johnson, K.M., 1971. Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 150-156.
- Tomás-Pérez, M., Khaldi, M., Riera, C., Mozo-León, D., Ribas, A., Hide, M., Barech, G., Benyettou, M., Seghiri, K., Doudou, S., Fisa, R., 2014. First report of natural infection in hedgehogs with *Leishmania major*, a possible reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Algeria. *Acta Trop.* 135, 44-49.
- Torina, A., Sole, M., Reale, S., Vitale, F., Caracappa, S., 2008. Use of Phlebotomine Sand Flies as indicator of *Leishmania* prevalence in an endemic area. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 355-357.
- Tran, A., Biteau-Coroller, F., Guis, H., Roger, F., 2005. Modélisation des maladies vectorielles. *Epidémiol et Santé Anim.* 47, 35-51.

## « V »

- Vahabi, A., Rassi, Y., Oshaghi, M.A., Sayyadi, M., Rafizadeh, S., 2016. Detection of *Leishmania major* DNA within wild caught *Phlebotomus papatasi* and species composition of sand flies in endemic focus of cutaneous leishmaniasis, in western Iran. *J. Parasit. Dis.* 40, 69-74.
- Valinsky, L., Ettinger, G., Bar-Gal, G.K., Orshan, L., 2014. Molecular identification of bloodmeals from sand flies and mosquitoes collected in Israel. *J. Med. Entomol.* 51, 678-685.
- Vaselek, S., Volf, P., 2019. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus tobbi* with different *Leishmania tropica* strains. *Int. J. Parasitol.* 49, 831-835.
- Vélez, R., Ballart, C., Domenech, E., Abras, A., Fernández-Arévalo, A., Gomez, S.A., Tebar, S., Muñoz, C., Cairó, J., Gállego, M., 2018. Seroprevalence of canine *Leishmania infantum* infection in the Mediterranean

region and identification of risk factors: the example of North-Eastern and Pyrenean areas of Spain. *Prev. Vet. Med.* 62, 67-75.

- Vélez, R., Gállego, M., 2020. Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy. *Trop. Med. Int. Health* 25, 540-557.
- Veras, P.S.T., Fraga, D.B.M., Solcà, M.S., Guedes, C.E.S., 2014. New advances in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. In: *Leishmaniasis—trends in epidemiology, diagnosis and treatment*, InTech.
- Vilela, M.L., Zwetsch, A., Silva, J.d.S., 2018. Methods for capturing, processing and preserving Phlebotominae. In: Rangel, E., Shaw, J. (eds), *Brazilian Sand Flies*. Springer, Cham., pp. 443-466.
- Volf, P., Volfova, V., 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J. Vector Ecol.* 36, S1-S9.

#### « W »

- Weslati, M., Ghrab, J., Benabid, M., Souissi, O., Aoun, K., Bouratbine, A., 2022. Diversity, Abundance and *Leishmania infantum* Infection Rate of Phlebotomine Sandflies in an Area with Low Incidence of Visceral Leishmaniasis in Northern Tunisia. *Microorganisms* 10, 1012.
- Wilkins, M.R., Lindskog, I., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.C., Hochstrasser, D.F., Appel, R.D., 1997. Detailed peptide characterisation using PEPTIDEMASS—a World-Wide Web accessible tool. *Electrophoresis*. 18, 403-408.

#### « Y »

- Yared, S., Gebresilassie, A., Abbasi, I., Aklilu, E., Kirstein, O.D., Balkew, M., Brown, A.S., Clouse, R.M., Warburg, A., Hailu, A., Gebre-Michael, T., 2019. A molecular analysis of sand fly blood meals in a visceral leishmaniasis endemic region of northwestern Ethiopia reveals a complex host-vector system. *Heliyon* 5, e02132.
- Young, D.G., Duncan, M.A., 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem. Amer. Inst. Entomol.* 54, Associate Publishers, Gainesville, 881 pp.
- Yuval, B., Schlein, Y., 1986. Leishmaniasis in the Jordan Valley. III. Nocturnal activity of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in relation to nutrition and ovarian development. *J. Med. Entomol.* 4, 411-415.

#### « Z »

- Zait, H., Hamrioui, B., 2009. Leishmanioses cutanées en Algérie Bilan de 386 cas diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger de 1998 à 2007. *Rev. Fr. Lab.* 412, 33-39.
- Zeroual, S., Gaouaoui, R., Boudjelida, H., 2016. Diversity and occurrence of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the area of Biskra (Middle Eastern of Algeria). *J. Entomol. Zool. Stud.* 4, 890-895.
- Zoghlami, Z., Chouih, E., Barhoumi, W., Dachraoui, K., Massoudi, N., Helel, K.B., Habboul, Z., Hadhri, M.H., Limam, S., Mhadhbi, M., Gharbi, M., Zhioua, E., 2014. Interaction between canine and human visceral leishmaniasis in a holoendemic focus of Central Tunisia. *Acta Trop.* 139, 32-38

---

---

# **Annexes**

---

---

## Annexes

### Annexe 1 : Note ministérielle relative a la campagne annuelle d'aspersion contre la leishmaniose cutanée – Année 2022

(Source : Bureau d'hygiène communale de l'EPSP de Barika)

<p><i>Dr. Ghattas</i> <i>Dr. Lahlouche Saïda</i></p> <p>الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE وزارة الصحة MINISTRE DE LA SANTE</p> <p>المديرية العامة للوقاية وترقية الصحة Direction Générale de la Prévention et de la Promotion de la Santé</p> <p>NOTE N° 08 DU 6 MARS 2022 RELATIVE A LA CAMPAGNE ANNUELLE D'ASPERSION CONTRE LA LEISHMANIOSE CUTANÉE - ANNEE 2022</p> <p>DESTINATAIRES</p> <p><b>Mesdames et Messieurs les Directeurs de la Santé et de la Population</b> Des wilayas de : M'SILA, BATNA, BISKRA, TEBESSA, NAAMA, EL BAYADH, GHARDAÏA, BÉCHAR, OUARGLA, EL-OUED, DJELFA, SAÏDA, LAGHOUAT, SÉTIF, MÉDEA, KHENCHELA, BORDJ BOU ARRERIDJ, TIARET.</p> <p>Référence : Instruction interministérielle n° 15 du 18 novembre 2015 relative au renforcement de la lutte anti vectorielle.</p> <p>En référence à l'instruction suscitée et compte tenu de la nécessité de poursuivre la lutte contre la leishmaniose cutanée et ce d'autant que votre wilaya enregistre un taux d'incidence supérieur au taux national au cours des cinq dernières années, j'ai l'honneur de vous informer que <b>la campagne d'aspersion pour l'année 2021 se déroulera en deux phase :</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- La première phase devra être lancée <b>le 04 avril et se poursuivra jusqu'au 07 mai 2022.</b></li><li>- La deuxième phase sera lancée <b>le 12 septembre et se poursuivra jusqu'au 15 octobre 2022.</b></li></ul> <p>Conformément aux dispositions de ladite instruction, cette campagne devra :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- être menée sous l'autorité de Messieurs les walis en collaboration avec mesdames et messieurs les Présidents des APC et les Directeurs des Services Agricoles ;</li><li>- être associé à des actions environnementales renforçant l'hygiène du milieu par l'enlèvement des plantes chénopodiacées, des dépotoirs sauvages et le ramassage et l'élimination des déchets entreposés autour des habitations ;</li></ul> <p>1   Campagne d'aspersion contre la leishmaniose cutanée année 2022.</p>	<p>être appuyée par la mise en œuvre d'un programme d'information-éducation- communication en direction du grand public sur les moyens de prévention des maladies à transmission vectorielle et sur le respect de règles d'hygiène collective.</p> <p>Dans ce cadre, je vous demande de prendre toutes les mesures nécessaires pour un appui technique de ces opérations d'aspersion d'insecticides en coordination avec les services concernés, cet appui comprend :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- le choix des zones à traiter avec en priorité les nouvelles communes touchées et les communes qui enregistrent un nombre élevé de cas de leishmaniose (<b>annexe n°3</b>) ;</li><li>- le contrôle de la bonne exécution des opérations en veillant à la protection des agents d'aspersion et de la population locale concernée (<b>annexe n°2</b>) ;</li><li>- la surveillance de la survenue d'éventuels incidents et à leur prise en charge ;</li><li>- l'évaluation par commune et par wilaya hebdomadaire puis globale des opérations d'aspersion.</li></ul> <p>Pour une efficacité optimale, je vous demande de veiller à l'application des mesures édictees dans les fiches suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- la fiche technique relative aux modalités de mise en œuvre d'une opération d'aspersion (<b>annexe n°1</b>) ;</li><li>- la fiche technique relative aux mesures de protection durant une opération d'aspersion (<b>annexe n°2</b>).</li></ul> <p>Pour chaque phase d'aspersion, un bilan global et par commune devra être adressé à la Direction Générale de la Prévention et de la Promotion de la Santé à la fin de l'opération programmée et ce conformément à la fiche technique ci-jointe (<b>annexe n° 3</b>).</p> <p>Une importance particulière devra être accordée à la mise en œuvre et au suivi des mesures édictées dans la présente note.</p> <p>Le Directeur Général مدير عام الوقاية و ترقية الصحة <i>Joumay</i> فسورار جمال</p> <p>2   Campagne d'aspersion contre la leishmaniose cutanée année 2022.</p>
---	---

## ANNEXE N° 1

## MODALITÉS DE MISE EN ŒUVRE D'UNE CAMPAGNE D'ASPERSION

La lutte contre les vecteurs de la leishmaniose concerne :

- > **uniquement la lutte contre les phlébotomes adultes ;**
- > **toutes les habitations et dépendances des communes affectées par les leishmanioses.**

## 1/ Matériel d'aspersion :

- Pulvérisateur à pression préalable

## 2/ Lieux d'aspersion : Intra et péri domiciliaire .

- Intra domiciliaire (intérieur des maisons)
- Péri domiciliaire (alentours de maisons, cours, murs des clôtures, étables, caves, bergeries, latrines...)

**Ne pas faire les aspersion dans les cours d'eau (oueds, barrages...)**

## 3/ Période d'aspersion :

- Phase 1 : du **04 avril au 07 mai 2022.**
- Phase 2 : du **12 septembre au 15 octobre 2022.**

## 4/ Insecticides recommandés pour la lutte contre la leishmaniose :

Insecticide	Classe chimique	Dosage principe actif (g/ha)	Présentation	Toxicité
Deltaméthrine	Pyréthroïdes	0,5 - 1	- Concentré - Emulsion	Modérée
Perméthrine	Pyréthroïdes	10	- Concentré - Emulsion	Modérée
Lambda cyhalothrine	Pyréthroïdes	1	- Concentré - Emulsion	Modérée

3 | Campagne d'aspersion contre la leishmaniose cutanée année 2022.

## ANNEXE N° 2

## MESURES DE PROTECTION DURANT UNE OPERATION D'ASPERSION

Une unité opérationnelle d'aspersion comprend :

- 1 chef d'équipe
- 6 agents

Durant la campagne d'aspersion, les règles suivantes doivent être strictement respectées :

- Port d'une combinaison, des bottes en caoutchouc, casquette, un masque, des lunettes de protection, et des gants pour les manipulateurs.
- L'agent qui utilise un pulvérisateur sur l'épaule doit se couvrir le dos avec une pièce de tissu imperméable.
- Ne pas manger, boire ou fumer pendant l'opération d'aspersion.
- Prendre une douche à la fin de l'opération d'aspersion.
- Stocker les récipients ou container d'insecticides utilisés dans un endroit sûr.

La manipulation des produits concentrés (poudre, émulsion) impose des mesures strictes de protection :

- Les manipulateurs devront éviter tout contact cutané ou de muqueuses avec le produit ;
- Éviter notamment l'exposition au vent qui risque de provoquer une contamination des yeux ou des voies respiratoires ;
- Les sols seront bien nettoyés à la fin de l'opération ;
- En cas d'intoxication accidentelle, il faut contacter le Centre Anti-poisons de la région concernée ;
- Les maisons individuelles ou groupement d'habitations à traiter doivent être préalablement préparées :
  - > Avertir les chefs de famille du passage la veille ou quelques jours avant ;
  - > Mise à l'abri des ustensiles de cuisine et des produits alimentaires ;
  - > Une chambre occupée par un malade grabataire ne sera pas aspergée ;
  - > Durant les aspersion, les maisons doivent être inoccupées ;
  - > Le mobilier et les appareils lourds doivent être couverts ;
  - > Les abris d'animaux (bergeries, étables, poulaillers, clapiers à lapins, niches à chiens, etc...) doivent être soigneusement traités au même titre que les habitations.

**Pour assurer le bon déroulement des opérations, une équipe mobile de la protection civile devra être mise à disposition.**

4 | Campagne d'aspersion contre la leishmaniose cutanée année 2022.

## ANNEXE N°3

Wilaya de : .....

Direction de la santé et de la population de : .....

FICHE D'ÉVALUATION DE LA CAMPAGNE  
D'ASPERSION D'INSECTICIDE

A transmettre par : faxe au 021 27 91 62 / intranet : sd\_lompas / e-mail : prevention.mdo@gmail.com

Phase : .....	Commune de : .....	Commune de : .....	Commune de : .....	Commune de : .....	Commune de : .....	Commune de : .....	Total
Période du ..... au .....							
Nombre d'habitations recensées							
Nombre d'habitations traitées							
Surface traitée en mètre carré							
Nombre d'agents mobilisés							
Nombre de pompes portables utilisées							
Produit insecticide utilisé							
Quantité en Kg ou en litre							
Aspersion spatiale (fumigation)							
Aspersion intradomiciliaire							
Aspersion extradomiciliaire							
Nombre de cas d'intoxication observés							
Opérateur (BHC- Privé)							

Nombre de communes programmé / \_\_\_ /

Nombre de communes traité / \_\_\_ /

Observations : .....

Cachet et signature

5 | Campagne d'aspersion contre la leishmaniose cutanée année 2022.

**Annexe 2 : Quelques exemplaires de fiches d'évaluation des campagnes d'aspersion  
d'insecticides (Source : Bureau d'hygiène communale de l'EPSP de Barika)**

**FICHE D'EVALUATION DE LA CAMPAGNE D'ASPERSION**  
**Cocher ou remplir lisiblement la case cocrés pendante**  
**A faxer au 021 27 97 86 ou 021 27 98 16**

N° d'enregistrement  Date :23/05/2018  
 Fiche remplie par : DR GUETTAL Y  
 Fonction : MEDECIN

Code wlaya : 09000 DAIEA :BAEIFA COMMUNE :BAEIFA  
 LOTISSEMENT : CITE :  
 Identification de l'opérateur : Bureau d'hygiène Communale :  OUI  
 Entreprise privée :  NON

Nombre d'habitations recensées   
 Nombre d'habitations tralées   
 Surface traitée en mètre carré   
 Nombre d'agent mobilisés   
 Nombre de pompes portables utilisées   
 Produit insecticide utilisé   
 Quantité en KG ou en litre   
 Aspersion spatiale (fumigation)  NON  
 Aspersion intra domiciliaire  NON  
 Aspersion extra domiciliaire  OUI  
 Nombre de cas d'intoxication observée

Observation

- L'OPERATION N'A PAS COUVERT LE NOMBRE D'HABITATION  
 RECENSE PAR MANQUE D'AGENTS MOBILISEE ET  
 DELTAMETRINE .  
 - L'OPERATION D'ASPERSION EST ARRETER LE 28/04/2018 .  
 - LE TAUX DE COUVERTURE :7.53% .  
 - L'ASPERSION INTRADOMICILAIRE N'A PAS ETÉ FAITE

**FICHE D'EVALUATION DE LA CAMPAGNE D'ASPERSION**  
**Cocher ou remplir lisiblement la case cocrés pendante**  
**A faxer au 021 27 97 86 ou 021 27 98 16**

N° d'enregistrement  Date :29/10/2018  
 Fiche remplie par : DR GUETTAL Y  
 Fonction : MEDECIN

Code wlaya : 09000 DAIEA :BAEIFA COMMUNE :JEZZAR  
 LOTISSEMENT : CITE :  
 Identification de l'opérateur : Bureau d'hygiène Communale :  OUI  
 Entreprise privée :  NON

Nombre d'habitations recensées   
 Nombre d'habitations tralées   
 Surface traitée en mètre carré   
 Nombre d'agent mobilisés   
 Nombre de pompes portables utilisées   
 Produit insecticide utilisé   
 Quantité en KG ou en litre   
 Aspersion spatiale (fumigation)  NON  
 Aspersion intra domiciliaire  NON  
 Aspersion extra domiciliaire  OUI  
 Nombre de cas d'intoxication observée

Observation

- LE PRODUIT UTILISÉ PRIMÉ  
 - L'OPERATION N'A PAS COUVERT LE NOMBRE D'HABITATION  
 RECENSE  
 - LE TAUX DE COUVERTURE :36.20 % .

**Cocher ou remplir lisiblement la case cocrés pendante**  
**A faxer au 021 27 97 86 ou 021 27 98 16**

N° d'enregistrement  Date :12/06/2019  
 Fiche remplie par : DR GUETTAL Y  
 Fonction : MEDECIN

Code wlaya : 09000 DAIEA :BAEIFA COMMUNE :BAEIFA  
 LOTISSEMENT : CITE :  
 Identification de l'opérateur : Bureau d'hygiène Communale :  OUI  
 Entreprise privée :  NON

Nombre d'habitations recensées   
 Nombre d'habitations tralées   
 Surface traitée en mètre carré   
 Nombre d'agent mobilisés   
 Nombre de pompes portables utilisées   
 Produit insecticide utilisé   
 Quantité en KG ou en litre   
 Aspersion spatiale (fumigation)  NON  
 Aspersion intra domiciliaire  OUI  
 Aspersion extra domiciliaire  OUI  
 Nombre de cas d'intoxication observée

Observation

- L'OPERATION N'A PAS COUVERT LE NOMBRE D'HABITATION  
 RECENSE PAR MANQUE D'AGENTS MOBILISEE  
 - LE TAUX DE COUVERTURE :13.23% .

**FICHE D'EVALUATION DE LA CAMPAGNE D'ASPERSION**  
**Cocher ou remplir lisiblement la case cocrés pendante**  
**A faxer au 021 27 97 86 ou 021 27 98 16**

N° d'enregistrement  Date : 08/12/2013  
 Fiche remplie par : SAIDI LEHCENE  
 Fonction : Chef du SEMEP

Code wlaya : 09000 DAIEA :BAEIFA COMMUNE :BAEIFA  
 LOTISSEMENT : CITE :  
 Identification de l'opérateur : Bureau d'hygiène Communale :  X  
 Entreprise privée :

Nombre d'habitations recensées   
 Nombre d'habitations tralées   
 Surface traitée en mètre carré   
 Nombre d'agent mobilisés   
 Nombre de pompes portables utilisées   
 Produit insecticide utilisé   
 Quantité en KG ou en litre   
 Aspersion spatiale (fumigation)  NON  
 Aspersion intra domiciliaire  NON  
 Aspersion extra domiciliaire  OUI  
 Nombre de cas d'intoxication observée

Observation

\* L'opération n'a touchée que 33,45 /100 des habitations  
 recensées.  
 \* l'opération n'est pas supervisée par un agent de la santé.  
 \* multiplication des décharges sauvages.

**Annexe 3 : Nombre de cas de leishmaniose cutanée recensés pour chaque commune dans la wilaya de Batna (2010-2020). (Source : DSP de Batna)**

<b>Commune Année</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>	<b>2020</b>
<b>Barika</b>	789	392	113	87	120	261	390	351	193	83	200
<b>Bitam</b>	240	61	37	41	37	85	215	271	83	21	50
<b>M'doukal</b>	78	19	23	34	13	36	62	96	21	13	09
<b>Djezzar</b>	115	69	13	16	11	52	114	232	106	12	63
<b>Ouled Ammar</b>	140	46	08	03	15	50	125	147	83	09	29
<b>Azil Abdelkader</b>	129	37	07	18	66	153	351	251	150	24	52
<b>N'Gaous</b>	32	44	03	09	05	06	07	12	03	01	03
<b>Sefiane</b>	58	90	10	14	04	04	11	05	07	02	03
<b>Boumagueur</b>	41	77	11	07	/	07	08	22	03	03	01
<b>Ouled Si Slimane</b>	19	18	01	03	04	07	09	11	01	03	/
<b>Ras El Aioun</b>	14	36	05	13	03	06	06	03	05	/	01
<b>Guigba</b>	08	13	04	02	03	04	03	/	07	02	01
<b>Taxlent</b>	06	04	01	02	02	02	/	01	01	02	/
<b>Lemcen</b>	04	09	02	01	01	/	/	02	02	01	/
<b>Gosbat</b>	28	16	02	01	/	03	13	06	01	/	02
<b>Rahbat</b>	05	06	02	01	02	01	05	01	02	/	/
<b>Ain Touta</b>	65	61	24	23	08	10	23	18	20	04	11
<b>Seggana</b>	22	49	03	04	03	04	13	11	07	03	11
<b>Maafa</b>	10	07	/	01	/	01	01	01	01	/	05
<b>Tilatou</b>	04	14	01	03	/	01	02	01	01	/	/
<b>Béni Fedhala</b>	01	02	01	/	/	01	01	05	05	/	/
<b>Ouled Aouf</b>	02	01	03	04	02	/	/	/	/	01	/
<b>Arris</b>	35	45	26	15	05	02	03	04	01	/	/
<b>Ichmoul</b>	06	01	/	03	02	01	02	03	01	/	/
<b>Tigherghar</b>	06	03	02	/	01	01	03	04	12	11	28
<b>T'kout</b>	06	01	01	02	/	01	01	/	/	/	/
<b>Tighanimine</b>	03	04	01	01	01	/	/	05	/	/	/
<b>Theniet El Abed</b>	04	04	03	04	01	/	01	/	/	01	03
<b>Mena</b>	05	09	03	02	02	01	03	06	10	12	13
<b>Ghassira</b>	01	/	/	/	/	/	/	01	/	/	/
<b>Oued Taga</b>	02	03	01	01	/	01	/	/	/	/	/
<b>Bouzina</b>	05	/	01	04	04	/	01	/	03	01	02

Suite

<b>Larbaâ</b>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Kimmel</b>	03	02	01	/	/	01	/	/	/	/	/
<b>Inoughissen</b>	02	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Foum Toub</b>	06	05	03	05	/	01	01	/	/	/	/
<b>Chir</b>	03	/	01	/	/	/	/	/	09	01	01
<b>Batna</b>	15	28	19	03	/	/	15	29	20	16	31
<b>Tazoult</b>	/	03	01	01	/	/	/	01	02	/	/
<b>Fesdis</b>	01	/	/	/	/	/	/	01	01	/	/
<b>Oued Chaaba</b>	01	02	/	/	/	/	/	01	01	/	/
<b>El Madher</b>	01	02	/	/	/	01	/	/	/	/	02
<b>Aïn Yagout</b>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Ouled Fadel</b>	/	01	/	/	/	/	/	01	01	/	/
<b>Ouyoun El Assafir</b>	01	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Timgad</b>	/	/	/	/	/	/	01	01	/	/	/
<b>Boumia</b>	01	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Djerma</b>	01	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Chemora</b>	/	/	/	/	01	/	/	05	/	/	/
<b>Boulhilat</b>	/	01	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Merouana</b>	/	05	02	/	/	02	01	01	01	/	02
<b>Talkhamt</b>	07	02	02	03	03	/	01	01	01	/	/
<b>Ksar Bellezma</b>	/	/	01	/	01	/	01	02	02	/	/
<b>Oued El Ma</b>	/	04	03	01	/	/	/	/	01	03	/
<b>Aïn Djasser</b>	/	/	/	/	/	/	/	01	/	/	01
<b>El Hassi</b>	/	/	/	/	/	/	01	/	/	01	/
<b>Ouled Sellam</b>	/	/	01	01	/	/	/	/	/	/	/
<b>Seriana</b>	/	/	/	/	/	/	/	01	/	/	/
<b>Lazrou</b>	/	/	/	/	/	/	/	02	/	/	/
<b>Zana El Beida</b>	/	/	/	/	/	/	/	01	/	/	/
<b>Hidoussa</b>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Total wilaya</b>	<b>1924</b>	<b>1196</b>	<b>345</b>	<b>333</b>	<b>320</b>	<b>706</b>	<b>1394</b>	<b>1518</b>	<b>769</b>	<b>230</b>	<b>524</b>

#### Annexe 4

Identification de l'origine du repas de sang chez les femelles gorgées capturées à Bougaa (BO) et Kherrata (KA). Pour les spécimens marqués d'un astérisque, l'identification de l'espèce a été confirmée par le « DNA Barcoding »

<b>ID</b>	<b>Nom</b>	<b>Espèce de phlébotome</b>	<b>ID Hôte, MALDI-TOF MS</b>	<b>Nb. Peptides</b>	<b>Séquençage peptidique MS/MS</b>	<b>MH+</b>	<b>ID Hôte, Cyt b</b>
01	KA01	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	14			
02	KA02	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			
03	KA03	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	14			
04	KA04	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			
05	KA05*	<i>P. perfiliewi</i>	<i>Bos taurus</i>	13			<i>Bos taurus</i>
06	KA06	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	11			
07	KA07	<i>P. perniciosus</i>	Non identifié				Non amplifié
08	KA08	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	10			
09	KA09	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	9			
10	KA10*	<i>P. perfiliewi</i>	<i>Bos taurus</i>	13			<i>Bos taurus</i>
11	KA11	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	15			
12	KA12	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			
13	KA13	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			
14	KA14	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			
15	KA15	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	14			
16	KA16	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			
17	KA17	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	14			
18	KA18	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			
19	KA19	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	9			
20	KA20	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	6	VGGHAAEYGAEALER TYFPHFDLSHGSAQVK	1529.7 1833.9	<i>Bos taurus</i>
21	KA21	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	9			
22	KA22	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			

23	KA23	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	15			<i>Bos taurus</i>
24	KA24	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	7	VGGHAAEYGAELER TYFPHFDLSHGSAQVK AVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLR	1529.7 1833.9 2636.4	<i>Bos taurus</i>
25	KA25*	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	15			
26	KA26	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	11			
27	KA27*	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	10			
28	KA28	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	10			
29	KA29	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			
30	KA30	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	10			
31	KA31	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	14			
32	KA32	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	7	VGGHAAEYGAELER AVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLR	1529.7 2636.4	Non amplifié
33	KA33*	<i>P. perfiliewi</i>	<i>Bos taurus</i>	14			<i>Bos taurus</i>
34	KA34	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			
35	KA35	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			
36	KA36	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	14			
37	KA37	<i>P. perniciosus</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	14			<i>Canis lupus familiaris</i>
38	KA38	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	10			
39	KA39	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			
40	KA40	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			
41	KA41	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	8	VGGHAAEYGAELER TYFPHFDLSHGSAQVK	1529.7 1833.9	Non amplifié
42	KA42*	<i>P. perfiliewi</i>	<i>Bos taurus</i>	15			<i>Bos taurus</i>
43	KA43	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	14			
44	KA44	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	6	VGGHAAEYGAELER TYFPHFDLSHGSAQVK	1529.7 1833.9	Non amplifié
45	KA45	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			

46	KA46	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	14			
47	KA47	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	15			<i>Bos taurus</i>
48	KA48	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	15			<i>Bos taurus</i>
49	KA49	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	15			
50	KA50	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			
51	KA51	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	15			
52	KA52	<i>P. perniciosus</i>	Non identifié				Non amplifié
53	KA53	<i>P. perniciosus</i>	Non identifié				Non amplifié
54	KA54	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	6	VGGHAAEYGAELER AVEHLDDLPGALSESDLHAHK	1529.7 2367.2	<i>Bos taurus</i>
55	KA55*	<i>P. perfiliewi</i>	<i>Bos taurus</i>	13			<i>Bos taurus</i>
56	KA56	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	14			
57	KA57	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	15			
58	KA58	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	15			
59	KA59	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			
60	KA60	<i>P. perniciosus</i>	<i>Ovis aries</i>	16			<i>Ovis aries</i>
61	KA61	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	14			
62	KA62	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	15			
63	KA63	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	14			
64	KA64	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	15			
65	KA178	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			
66	KA179	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	14			
67	KA180	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	14			
68	KA181	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			
69	KA182	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	3	VKVDEVGGEALGR VGGHAAEYGAELER	1328.7 1529.7	Séquence de mauvaise qualité
70	KA183	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	8			
71	KA184	<i>P. perniciosus</i>	Non identifié				Non amplifié

72	KA185	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			
73	KA186	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	15			
74	KA187	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	9			
75	BO01	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			
76	BO02	<i>P. perniciosus</i>	Non identifié				Non amplifié
77	BO03	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	11			
78	BO04	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			
79	BO05	<i>P. perniciosus</i>	Non identifié				Non amplifié
80	BO06	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			
81	BO07	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	15			
82	BO08	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	11			
83	BO09	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	7	VGGHAAEYGAELER AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK	1529.7 2367.2	Non amplifié
84	BO10	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			<i>Bos taurus</i>
85	BO11	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	4	VGGHAAEYGAELER AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK	1529.7 2367.2	<i>Bos taurus</i>
86	BO12	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	6	VGGHAAEYGAELER TYFPHFDLSHGSAQVK	1529.7 1833.9	<i>Bos taurus</i>
87	BO13	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	15			<i>Bos taurus</i>
88	BO14	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			
89	BO15	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	9	VGGHAAEYGAELER AVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLR	1529.7 2636.4	<i>Bos taurus</i>
90	BO16	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	11			
91	BO17	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	6	VGGHAAEYGAELER TYFPHFDLSHGSAQVK	1529.7 1833.9	<i>Bos taurus</i>
92	BO18	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	9	VGGHAAEYGAELER AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK	1529.7 2367.2	<i>Bos taurus</i>
93	BO19	<i>P. perniciosus</i>	Non identifié				Non amplifié
94	BO20	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	11			

95	BO21	<i>P. perniciosus</i>	Non identifié				Non amplifié
96	BO22	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	11			
97	BO23	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	9			
98	BO24	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	14			<i>Bos taurus</i>
99	BO25	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	10			
100	BO26	<i>P. perniciosus</i>	Non identifié				Non amplifié
101	BO27	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	8	VGGHAAEYGAELER AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK	1529.7 2367.2	<i>Bos taurus</i>
102	BO28	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	8	VGGHAAEYGAELER AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK	1529.7 2367.2	<i>Bos taurus</i>
103	BO29	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	10			
104	BO30	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	15			
105	BO31	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	15			
106	BO32	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			
107	BO33	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	6	VGGHAAEYGAELER TYFPHFDLSHGSAQVK	1529.7 1833.9	<i>Bos taurus</i>
108	BO34	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	10			
109	BO35	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	10			
110	BO36	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	10			
111	BO37	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			
112	BO38*	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			
113	BO39	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	8			
114	BO40	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			
115	BO41*	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	9			
116	BO42	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	8	VGGHAAEYGAELER TYFPHFDLSHGSAQVK	1529.7 1833.9	Séquence de mauvaise qualité
117	BO43	<i>P. perniciosus</i>	Non identifié				Non amplifié
118	BO44	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	11			

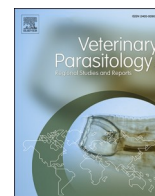
119	BO45	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			
120	BO46	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	10			
121	BO47	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	10			
122	BO48	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	9			
123	BO49	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			
124	BO50	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			<i>Bos taurus</i>
125	BO51*	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	11			
126	BO52	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			
127	BO53*	<i>P. perfiliewi</i>	<i>Bos taurus</i>	11			<i>Bos taurus</i>
128	BO54	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	11			
129	BO55	<i>P. perniciosus</i>	Non identifié				Non amplifié
130	BO56	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	11			
131	BO57	<i>P. perniciosus</i>	Non identifié				Non amplifié
132	BO58*	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	11			
133	BO59	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			
134	BO60	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	9			
135	BO61	<i>P. perniciosus</i>	Non identifié				Non amplifié
136	BO62	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	14			
137	BO63	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	10			
138	BO64	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			<i>Bos taurus</i>
139	BO65	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	12			
140	BO66	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	5	LLGNVLVVVLAR VGGHAAEYGAELER TYFPHFDLSHGSAQVK	1265.8 1529.7 1833.9	Séquence de mauvaise qualité
141	BO67	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	8			
142	BO68*	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			
143	BO69	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			

144	BO70	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	7	VKVDEVGGGEALGR VGGHAAEYGAEALER	1328.7 1529.7	Non amplifié
145	BO287	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	11			
146	BO288	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			<i>Bos taurus</i>
147	BO289	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			
148	BO290	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			
149	BO291	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	10			
150	BO292	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	10			
151	BO293	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	13			
152	BO294	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	9			
153	BO295	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	9			
154	BO296	<i>P. perniciosus</i>	<i>Bos taurus</i>	15			<i>Bos taurus</i>

---

# **Production scientifique**

---



## Original Article

## Epidemiological situation analysis of cutaneous leishmaniasis in Batna (northeast): An important focus in Algeria

Nacer Eddine Messahel<sup>a,b</sup>, Ismail Lafri<sup>c,d,\*</sup>, Idir Moualek<sup>a,b</sup>, Karim Houali<sup>a,b</sup>, Ahcène Hakem<sup>e,f,g</sup><sup>a</sup> Faculty of Biological and Agronomic Sciences, University of Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algeria<sup>b</sup> Laboratory of Analytical Biochemistry and Biotechnology (LABAB), Department of Biochemistry and Microbiology, University of Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algeria<sup>c</sup> Institute of Veterinary Sciences, University of Blida 1, Algeria<sup>d</sup> Laboratoire des Biotechnologies Liées à la Reproduction Animale (LBRA), Institute of Veterinary Sciences, University of Blida 1, Blida, Algeria<sup>e</sup> Faculty of Nature and Life Sciences, University of Djelfa, Djelfa, Algeria<sup>f</sup> Laboratory of Exploration and Valorization of Steppic Ecosystems, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Djelfa, Djelfa, Algeria<sup>g</sup> Centre Research in Agro-Pastoralism, Djelfa, Algeria

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Algeria  
Batna  
Cutaneous leishmaniasis  
Epidemiology  
Incidence

## ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a parasitic infection which poses a real public health problem in various countries, including Algeria. We aimed in this study to investigate the current epidemiological situation of CL in the wilaya of Batna (northeastern Algeria) during 2010–2020 and to discuss some control measures used to combat the disease in the most endemic foci. Data on CL cases and control measures were obtained from the “Direction de la Santé et de la Population (DSP) of Batna” and the “Etablissement Public de la Santé de Proximité (EPSP) of Barika”. Data were analyzed and mapped using Microsoft Office Excel 2007, SPSS.21, and ArcGIS 10.3. A total of 9259 cases were notified, with a peak incidence of 1924 cases in 2010. The annual evolution of the disease showed decreasing and increasing trends during the study period. Cases were detected year-round, with a peak notification in November (1957 cases) and January (1663 cases). CL affects both genders and all age groups with predominance for males (58.6%) and infants less than 9 years old (54.4%). Most cases have occurred in western areas of the wilaya especially in the commune of Barika with 2979 cases (32.17%), followed by Abdelkader Azil (13.37%), Bitam (12.32%), Djeddar (8.67%), Ouled Ammar (7.07%), and Amdoukal (4.36%) communes. Spatiotemporal analysis showed that the highest frequencies of CL were exclusively reported in the western regions. There was no evidence of a possible relationship between Deltamethrin house spraying and leishmaniasis incidence. This study revealed that CL is highly endemic in the western areas of Batna, especially in Barika, with children less than 9 years old as the most age group at risk. The development of control measures and the selection of appropriate strategies are necessary to prevent, control, and eradicate the disease.

## 1. Introduction

Leishmaniasis caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* is a worldwide vector-borne disease (Desjeux, 2004). It is considered a significant health problem in many regions of the world, where it affects nearly 98 countries in five continents (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis and World Health Organization, 2010). According to Alvar et al. (Alvar et al., 2012) among all clinical types of leishmaniasis, the cutaneous form is by far the more widely distributed with approximately 0.7 to 1.2 million cases occur each year. In most

cases, it is a zoonotic disease transmitted via a bite of blood-sucking sand flies of the genus *Phlebotomus* with wild or semi-domesticated animals as reservoirs (Mokni, 2019).

Algeria, like other Mediterranean countries, is strongly concerned by these zoonoses (Harrat et al., 1995). At the national level, they represent 35% of all compulsory-declared diseases and occupy the first rank among parasitic diseases (Mihoubi et al., 2012). The cutaneous form is thought to be present in Algeria before the last century since it was discovered firstly in 1860 by Henri Hamel in the Southern East of the country (Khezani and Bouchemal, 2016). With an incidence rate of

\* Corresponding author at: Institute of Veterinary Sciences, University of Blida 1, Algeria.

E-mail address: [lafrismail@gmail.com](mailto:lafrismail@gmail.com) (I. Lafri).<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100621>

Received 2 April 2021; Received in revised form 23 July 2021; Accepted 20 August 2021

Available online 24 August 2021

2405-9390/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

more than thousands of cases recorded each year, Algeria ranks second after Afghanistan in terms of CL incidence (Alvar et al., 2012). About 10 million populations are at risk of the infection with 40 out of 48 wilayas are endemic for the disease (World Health Organization, 2015).

Cutaneous leishmaniasis is often referred to as a group of diseases because of the varied spectrum of clinical manifestations, which range from small cutaneous nodules to large mucosal tissue destruction (Reithinger et al., 2007). In Algeria, three distinct noso-epidemiological CL entities coexist: the so-called sporadic form of the North (LCN), the zoonotic form (LCZ), and the chronic form (LCC). We distinguish for each clinical type different parasitic species of *Leishmania*, sand fly vectors, and host reservoirs. The former which is confined to the north is caused by *Leishmania infantum* that is transmitted from dogs to humans by the bite of *Phlebotomus perfiliewi* sand flies. The second type due to *L. major* is by far the most widespread, with 90% of registered cases, and occurs mainly in the arid and semi-arid zones, with a worrying progression towards the north. *Ph. papatasi* sand fly is the primary vector, while *P. obesus* and *Meriones shawii* act as reservoir hosts. The latter type caused by *L. killicki* (*L. tropica* complex) is transmitted by *Ph. sergenti* sand fly with the Mزاب Gundi (*M. mzabi*) as a suspected reservoir. This chronic leishmaniasis form is principally found in Ghardaia (Southern Algeria), with some new related cases being reported recently from different parts of the north of the country (Harrat et al., 2009; Boubidi et al., 2011; Mansouri et al., 2012; Izri et al., 2014; Beldi et al., 2017; Bachi et al., 2019).

Leishmaniasis is a re-emerging disease in Algeria (Benikhlef et al., 2021). Several factors, linked especially to environmental changes, have allowed the spread of the disease into new areas (Khezzi and Bouchemal, 2016; Harrat et al., 2009) and, as a result, many focus areas are currently found responsible for the CL epidemic (Benikhlef et al., 2021). Indeed, this is the case of Batna region, located in the northeastern part of the country, where this skin infection has been known for a long time and thought to be caused primarily by the zoonotic strain *L. major* (Harrat et al., 1995). In this interesting area, the ancient focus of Barika exists. This latter is considered one of the main and historic endemic foci of the disease in Algeria, with a relatively high incidence rate recorded each year, reaching 72% of all cases recorded in the whole wilaya in the year 2002 (Harrat et al., 1995; Institut national de la santé publique (INSP), 2002). According to Boudrissa et al. (Boudrissa et al., 2012), most of the CL notified cases in Algeria came from the neighboring areas of Batna, Biskra, and M'sila. Within the first decade of this century, an alarming peak of 5400 cases during the year 2003 was reported in Batna (Kalla and Guettouche, 2017). Thereafter, in 2005, Algeria has recorded the greatest number of cases ever when there were more than 25,000 cases (Eddaikra et al., 2018) of which 2476 cases belonged to our study region (Kalla and Guettouche, 2017). This situation led to the creation, in 2006, of a national control program based mainly on spraying chemical insecticides (Deltamethrin) (World Health Organization, 2015). Nevertheless, despite a significant decline in the incidence of CL, the disease still constitutes a constraint on the public budget and a real health problem (Kalla and Guettouche, 2017; Aoun and Bouratbine, 2014).

Regarding the importance of Batna region as one of the most important foci of CL in Algeria, and given the lack of comprehensive studies on the status of this disease as well as its epidemiological profile in this region, the present research is required. Thus, the present study aims to investigate the current epidemiological status of CL disease in the wilaya of Batna (northeast of Algeria) based on reported cases between 2010 and 2020 and to discuss some control measures used to combat the disease at the level of the most endemic foci.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study area

Batna, known as the capital of the Aures region, is one of the

northeastern wilayas of Algeria (Fig. 1). It is located between 4° and 7° E and 35° and 36° N latitude, with an area of 12,038 km<sup>2</sup> covering 0.51% of the total land of Algeria. This wilaya, which is divided administratively into 21 daïras and 61 communes, is bounded by six wilayas of which Biskra in the south and Msila in the west are considered among the highly endemic foci of CL in Algeria (Boudrissa et al., 2012). The words 'wilaya', 'daïra' and 'commune' refer to 'province', 'district' and 'municipality', respectively. The total population of the region was estimated at 1377000 inhabitants with a density of 114 inhabitants per square kilometer (census of 2019). The town of Batna, with 350,000 inhabitants, is by far the most populous city in the wilaya, followed by Barika with 125,000 inhabitants [Data from the Direction de la Santé et de la Population (DSP) of Batna].

The main physical feature of the area is the presence of two mountain entities, represented by the Tellian Atlas in the north and the Saharan Atlas in the south. The link between those two entities determines the climate characteristics, the conditions for human activity and organizes at the same time the distribution of the different physical environments. The climate of the study area is classified as semi-arid. The average temperature is highly varied throughout the year, ranging from 4 °C in January to 35 °C in July. The average mean rainfall is 210 mm per year. The relative humidity is low during July (35.78%) and high during December and January (exceeding 72%) (Agence Nationale de Développement de l'Investissement (ANDI), 2013).

The areas allocated for agriculture are very important as they represent 61.80% of the total area of the wilaya with a predominance of cereal cultivation. This latter represents 38.08% of the total useful agricultural area (35.11% of the overall area of the wilaya). The agricultural sector ranks third among all activity sectors, with an estimated population of 68,878 workers (Agence Nationale de Développement de l'Investissement (ANDI), 2013).

### 2.2. Data collection

Data presented in the current research were treated according to their availability.

#### 2.2.1. Epidemiological data

All statistical data of CL cases were provided to us by the Service de Prévention which is part of the DSP of Batna. The various health sectors that covering all daïras and communes of the wilaya are responsible for the diagnosis and treatment of patients with laboratory-confirmed leishmaniasis cases as well as for declaring compulsory each CL case to the DSP. In the current study, the official case notifications of CL those covering the 11-year period from 2010 to 2020 were compiled. The gathered data have some information related to the patient's name, gender and age, date of diagnosis as well as the area of residence. For the present study, we exploited the available data to treat the temporal (annual and monthly), demographic (age and gender), and spatial (origin of patients) distribution of cases. For the monthly distribution of CL cases in 2019, data were not included due to their unavailability.

#### 2.2.2. Control activities data

During the first years of this millennium, there has been a significant increase in the incidence of leishmaniasis in Algeria (Eddaikra et al., 2018). In this alarming situation, a national control program has been in place since 2006. This program includes vector control using large-scale insecticide spraying, but it does not include bednet distribution. There is also a leishmaniasis reservoir control program, but its application is still limited. The control strategy involves also passive case detection and free treatment of patients with Glucantime (Aoun and Bouratbine, 2014).

Vector population control is the primary approach for leishmaniasis control in endemic areas of Batna. This strategy mainly relies on residual house-spraying insecticide. Deltamethrin is the only chemical insecticide used to control adult sand flies, and is applied at the ground floor

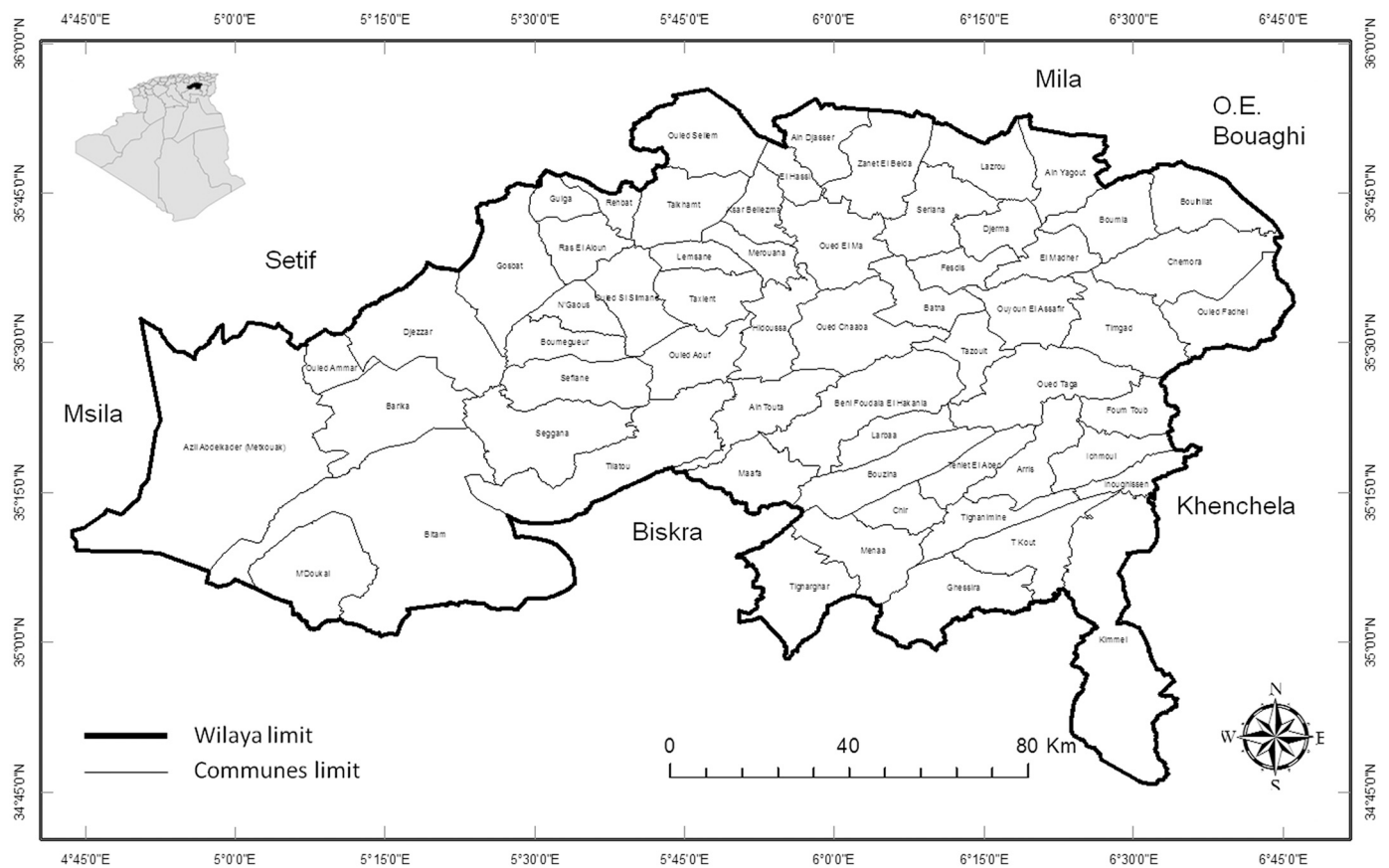


Fig. 1. Map of Batna wilaya showing its localization and their 61 communes. This map was created using ArcGIS v10.3 software.

level, mainly on the exterior walls of houses (outdoor residual spraying; ORS) and occasionally on the interior walls (indoor residual spraying; IRS), targeting the cracks and crevices. It's worthy to note that the insecticide spraying process covers also various habitats found near human dwellings, such as animal shelters, abandoned buildings, and tree holes, which are believed to be resting or breeding sites for sand flies. Vector control interventions are often carried out in two rounds per year at each endemic area, usually in April for the first round and in September for the second round. In this research, we exploited vector control data to try to explain the association between control measures and CL incidence. Data extracted include the total number of houses targeted for insecticide spraying and the total number of houses sprayed each year. In this current research, data over eight years (2013–2020) from the Service de Prevention in the Etablissement Public de la Santé de Proximité (EPSP) of Barika were gathered to investigate the link between the proportion of houses sprayed and the frequency of CL at the level of the four most affected communes. No trials have been performed by the local health authorities to assess the bio-efficacy of pyrethroid residual spray against *Leishmania* vectors; thus comprehensive data are not available. In the present work, we did not exploit reservoir control data to explain the fluctuant status of CL due to the lack of statistics on the number of active and treated rodent burrows.

2.3. Data mapping

In order to map the spatial distribution of CL infection in our study region, ArcGIS 10.3 software (<http://www.esri.com>) was employed. Shapefiles of the administrative boundaries at the municipal level were downloaded from the Global Administrative Areas Project website (<http://gadm.org/>). Data of CL incidence were entered into the program and distributed at the municipal level. The geographical maps obtained make it possible to know the general distribution of the disease as well as

the areas of highest and lowest endemicity.

2.4. Data analysis

The different statistical tests related to epidemiological data were realized using Microsoft Office Excel 2007 and IBM SPSS Statistics v 21 (IBM SPSS, Chicago, USA). P values of 0.05 or less were considered statistically significant. Histograms of this paper were prepared using Microsoft Office Excel 2007.

The following equation was used to calculate the percentage of houses sprayed with insecticides: Percentage (%) of houses sprayed with insecticides = (Number of houses sprayed successfully/Number of targeted houses for spraying) X 100.

3. Results

3.1. Temporal distribution of CL

3.1.1. Annual distribution of CL

This study was conducted from 2010 to 2020 in the wilaya of Batna, northeast of Algeria. Accordingly, during the aforementioned years, a total of 9259 confirmed cases of CL were recorded. The maximum rate of the disease was recorded in 2010 with 1924 cases, while the minimum rate was reported in 2019 with 230 cases. As the data show, the annual number of CL cases has gradually decreased over the period from 2010 to 2014 and then significantly increased until 2017. After that, the incidence of CL trended downward in 2018 and 2019, before increasing once again in 2020. Fig. 2 displays year-wise data on the frequency of CL cases in the study period.

3.1.2. Monthly distribution of CL

The monthly distribution of cases between 2010 and 2020 is shown

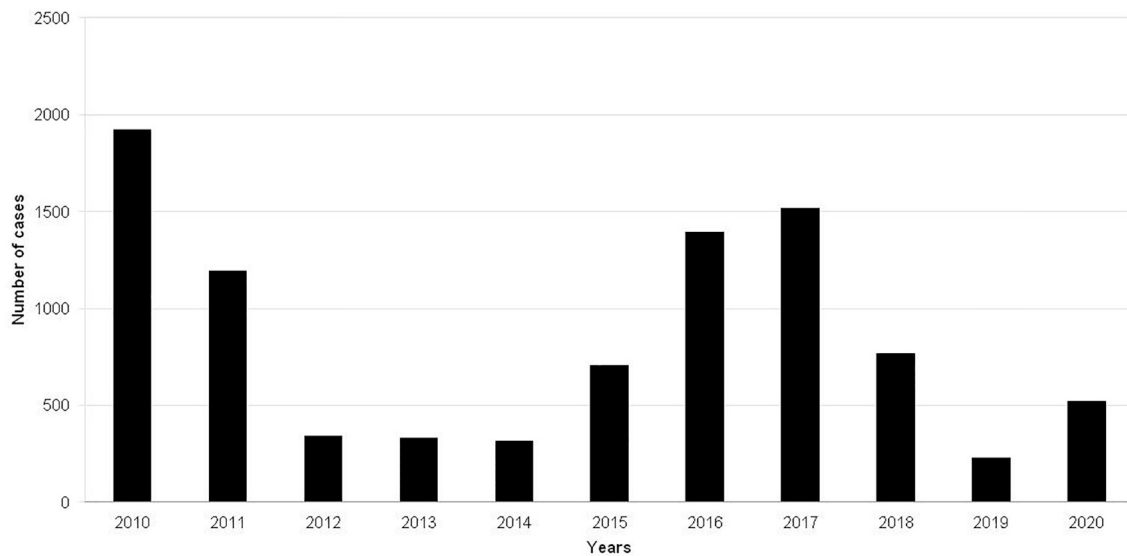


Fig. 2. Evolution of the annual incidence of CL in Batna wilaya (2010–2020) (N = 9259).

in Table 1. Cases were reported in all months of the year with a heterogeneous distribution. There were significant differences between months ( $P < 0.05$ ). The maximum frequency of CL was always confined to one of the four months: November, December, January, and February, while the minimum amounts were always documented in the summer months. Generally, we noted that the disease reaches its peak in November (1957 cases) and January (1663 cases) months and begins then to decline gradually to reach its lowest value in June (59 cases).

### 3.2. Demographic distribution

#### 3.2.1. According to the patient's age

The cases of the disease in the 11-year period sorted by age group are

summarized in Table 2. Through an analysis of our data, we noted that CL affects all age groups. Children whose age varies between 0 and 9 years old represent the most affected group with 5033 (54.4%) of total cases, whereas patients aged 65 years old and more represent the least affected group (1.9%). The difference between all age groups in different years of the study period is significant ( $P < 0.05$ ). Compared to the first four and last two years of this study, a significant increase in the incidence of CL among children under the age of 9 years was observed from 2014 to 2018.

#### 3.2.2. According to the patient's gender

Generally, as the statistics show in Table 2, males are more susceptible to CL infection than females with a total of 5422 cases (58.6%)

**Table 1**  
Frequency distribution of CL cases based on months in Batna wilaya during 2010–2020.

Months	Years											Total No. %	p-value
	2010 No. %	2011 No. %	2012 No. %	2013 No. %	2014 No. %	2015 No. %	2016 No. %	2017 No. %	2018 No. %	2019 No. %	2020 No. %		
January	331 (17.2)	254 (21.2)	101 (29.3)	60 (18.0)	29 (9.1)	93 (13.2)	185 (13.3)	283 (18.6)	229 (29.8)	N.A.	98 (18.7)	1663 (18.7)	P < 0.001
February	249 (12.9)	460 (38.5)	41 (11.9)	36 (10.8)	27 (8.4)	35 (5.0)	74 (5.3)	158 (10.4)	115 (15.0)	N.A.	75 (14.3)	1270 (14.3)	
March	123 (6.4)	171 (14.3)	23 (6.7)	14 (4.2)	10 (3.1)	47 (6.7)	36 (2.6)	69 (4.5)	45 (5.9)	N.A.	45 (8.6)	583 (6.5)	
April	61 (3.2)	54 (4.5)	17 (4.9)	11 (3.3)	06 (1.9)	13 (1.8)	16 (1.1)	28 (1.8)	25 (3.3)	N.A.	10 (1.9)	241 (2.7)	
May	22 (1.1)	11 (0.9)	43 (12.5)	07 (2.1)	04 (1.3)	08 (1.1)	05 (0.4)	22 (1.4)	19 (2.5)	N.A.	06 (1.1)	147 (1.6)	
June	07 (0.4)	09 (0.8)	03 (0.9)	05 (1.5)	03 (0.9)	05 (0.7)	04 (0.3)	05 (0.3)	9 (1.2)	N.A.	09 (1.7)	59 (0.7)	
July	13 (0.7)	11 (0.9)	08 (2.3)	02 (0.6)	04 (1.3)	03 (0.4)	00 (0.0)	10 (0.7)	9 (1.2)	N.A.	14 (2.7)	74 (0.8)	
August	26 (1.4)	10 (0.8)	05 (1.4)	07 (2.1)	00 (0.0)	05 (0.7)	07 (0.5)	13 (0.9)	13 (1.7)	N.A.	09 (1.7)	95 (1.1)	
September	85 (4.4)	39 (3.3)	05 (1.4)	17 (5.1)	15 (4.7)	09 (1.3)	31 (2.2)	59 (3.9)	23 (3.0)	N.A.	30 (5.7)	313 (3.5)	
October	300 (15.6)	38 (3.2)	20 (5.8)	39 (11.7)	25 (7.8)	51 (7.2)	154 (11.0)	197 (13.0)	67 (8.7)	N.A.	53 (10.1)	944 (10.6)	
November	621 (32.3)	41 (3.4)	40 (11.6)	79 (23.7)	72 (22.5)	124 (17.6)	498 (35.7)	331 (21.8)	84 (10.9)	N.A.	67 (12.8)	1957 (22)	
December	86 (4.5)	98 (8.2)	39 (11.3)	56 (16.8)	125 (39.1)	313 (44.3)	384 (27.5)	343 (22.6)	13 (17.0)	N.A.	108 (20.6)	1565 (17.6)	
Total	1924 (100)	1196 (100)	345 (100)	333 (100)	320 (100)	706 (100)	1394 (100)	1518 (100)	769 (100)	/	524 (100)	8911 (100)	

N.A.: Not available.

**Table 2**  
Frequency distribution of CL cases according to gender and age groups in Batna wilaya during 2010–2020.

Variables		Years											Total No. (%)	p-value
		2010 No. (%)	2011 No. (%)	2012 No. (%)	2013 No. (%)	2014 No. (%)	2015 No. (%)	2016 No. (%)	2017 No. (%)	2018 No. (%)	2019 No. (%)	2020 No. (%)		
Gender	Female	816 (42.4)	492 (41.1)	95 (27.5)	125 (37.5)	123 (38.4)	322 (45.6)	634 (45.5)	619 (40.8)	316 (41.1)	90 (39.1)	205 (39.1)	3837 (41.4)	P < 0.001
	Male	1108 (57.6)	704 (58.9)	250 (72.5)	208 (62.5)	197 (61.6)	384 (54.4)	760 (54.5)	899 (59.2)	453 (58.9)	140 (60.9)	319 (60.9)	5422 (58.6)	
Age groups (years)	[0–9]	934 (48.5)	507 (42.4)	109 (31.6)	128 (38.4)	192 (60.0)	500 (70.8)	999 (71.7)	896 (59.0)	435 (56.6)	92 (40)	241 (46.0)	5033 (54.4)	P < 0.001
	[10–19]	286 (14.9)	216 (18.1)	70 (20.3)	67 (20.1)	53 (16.6)	80 (11.3)	156 (11.2)	201 (13.2)	112 (14.6)	48 (20.9)	110 (21.0)	1399 (15.1)	
	[20–44]	503 (26.1)	336 (28.1)	131 (38.0)	118 (35.4)	62 (19.4)	87 (12.3)	172 (12.3)	317 (20.9)	162 (21.1)	65 (28.3)	105 (20.0)	2058 (22.2)	
	[45–64]	148 (7.7)	99 (8.3)	29 (8.4)	14 (4.2)	12 (3.8)	30 (4.2)	60 (4.3)	82 (5.4)	48 (6.2)	19 (8.3)	51 (9.7)	592 (6.4)	
	[>65]	53 (2.8)	38 (3.2)	6 (1.7)	6 (1.8)	1 (0.3)	9 (1.3)	7 (0.5)	22 (1.4)	12 (1.6)	6 (2.6)	17 (3.2)	177 (1.9)	

against 3837 cases (41.4%) for females. A significant difference was noted between males and females ( $P < 0.05$ ). This predominance of males for CL was observed in all years of the study period. The difference in infection rates between the two genders during the year 2012 was highly significant, with 72.5% for males and 27.5% for females, whereas it was slightly close in 2015 and 2016.

**3.3. Geographical distribution of CL and impact of vector control measures**

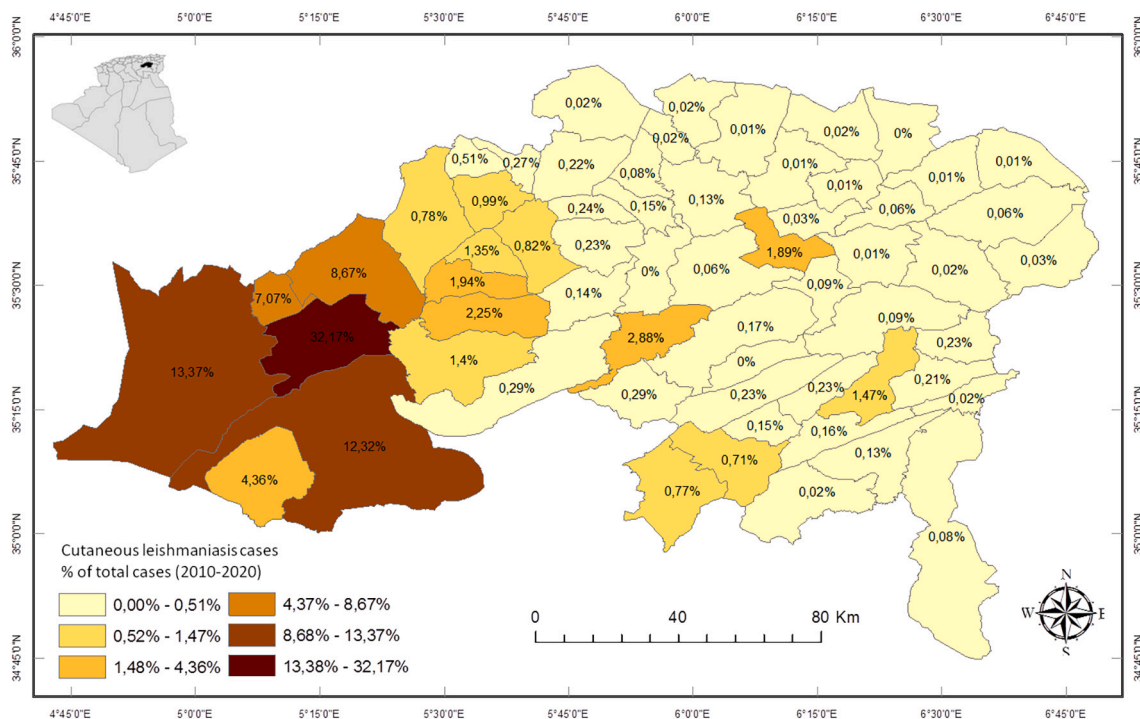
**3.3.1. Cumulative distribution of CL cases**

The cumulative distribution map of CL across the wilaya showed a total of 58 communes had CL cases, with a significant difference between the various communes ( $P < 0.05$ ). Three areas, namely Larbaa, Ain Yagout, and Hidoussa, have never recorded cases of CL during the study period (0 cases). Overall, the disease was more prevalent in the

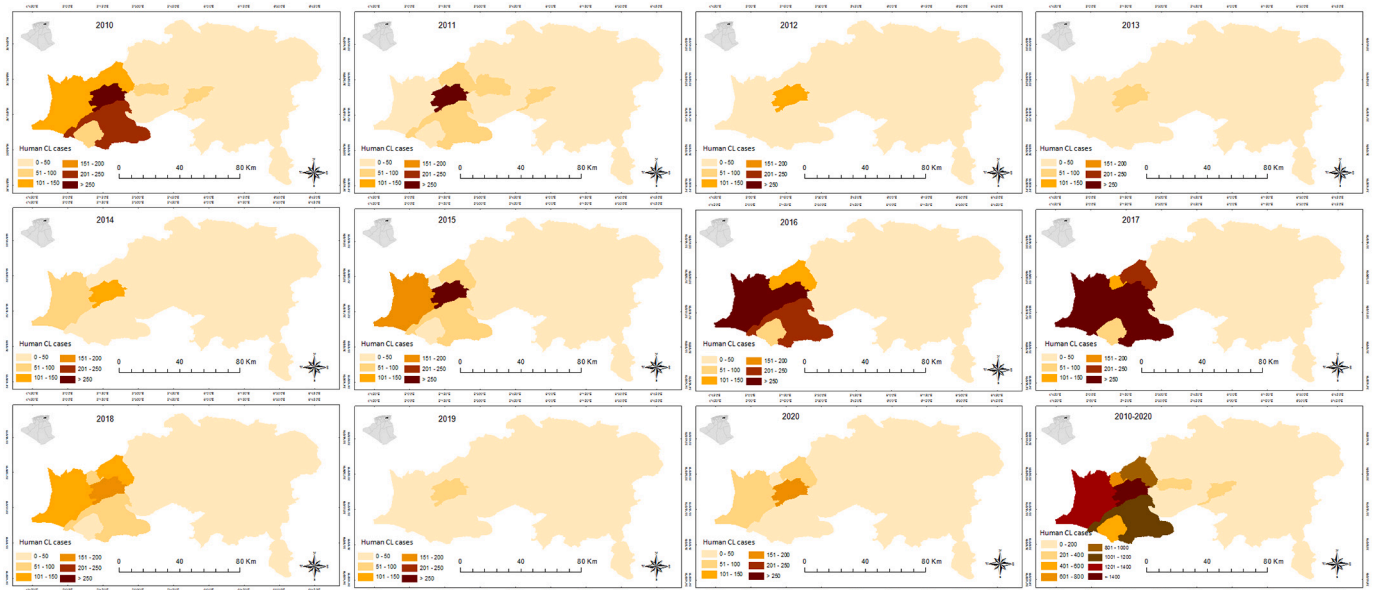
western part of Batna, where 32.17% of all identified cases in this period were attributed to the commune of Barika. The second highest frequency of CL was identified in the commune of Abdelkader Azil (13.37%), followed by Bitam (12.32%), Djeddar (8.67%), Ouled Ammar (7.07%), and Amdoukal (4.36%). The aforementioned six communes contributed around 77.98% (7220 cases) of all CL cases recorded in the entire study period. The remaining communes have recorded the lowest rate of infection (Fig. 3).

**3.3.2. Spatio-temporal distribution of CL cases**

Fig. 4 shows the spatiotemporal distribution of CL cases among the 61 communes of Batna. Most cases of CL were reported for all time periods in the western parts of the wilaya. Barika had the greatest rate of incidence, accounting for more than 23% of all CL cases recorded in each study year. Apart from Barika, other five communes in the west of Batna, named Bitam, Amdoukal, Abdelkader Azil, Djeddar, and Ouled Ammar,



**Fig. 3.** Spatial distribution of CL in Batna wilaya (percentage of total cases) (2010–2020; N = 9259). Cases recorded in each commune are represented in percentages (%). Areas of low and high endemicity are represented by different gradient colors; the light yellow color indicates the least affected areas and the dark brown color represents the most affected areas. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



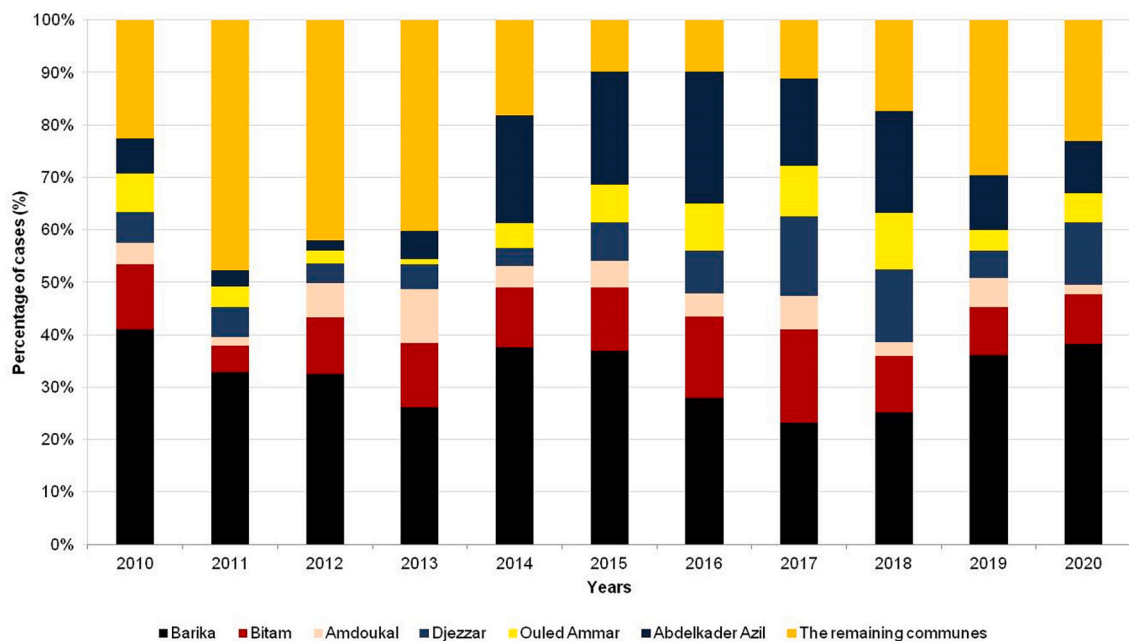
**Fig. 4.** Geographic distribution of CL cases in Batna wilaya at the commune level for each study year (2010–2020). Areas of low and high endemicity are represented by different gradient colors; the light brown color indicates the least affected areas and the dark brown color represents the most affected areas. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

have also recorded a greater number of cases. It was observed during the period of 2015 to 2017 that the six communes mentioned above had more than 88% of all identified cases compared to the other studied years. An increase in the frequency of CL was observed in the communes of Abdelkader Azil in 2016 and Djezzar in 2017. The situation of CL in the remaining communes, such as Oued El Ma, Arris, Tazoult, Timgad, and others, is the same as they recorded the lowest number of cases (Fig. 4, Fig. 5).

**3.3.3. Impact of vector control measures on CL incidence**

During the study period, the proportion of houses sprayed with Deltamethrin was estimated to be unequal, with variations between years. Analysis of data revealed that there was a gradual decline in

spraying coverage rates between 2013 and 2015 in the three communes of Barika, Abdelkader Azil, and Djezzar, which was clearly accompanied by an increase in the incidence of CL. However, in Bitam, despite the high proportion of houses sprayed in this commune (approximately 100%) during the same period, the disease experienced a marked increase in 2015. On the other hand, although the moderate and high rate of treated dwellings in 2016 and 2017 (except Barika in 2017), the incidence of CL was considerably higher in each of the four studied communes. In 2018 and 2019, the percentage coverage of houses was relatively low in some communes and moderate in others, ranging generally between 8.30% and 66.84%. In spite of that, there was a significant decline in the incidence of CL in all investigated communes. The decline in the rate of houses sprayed in the last study year, at the level of



**Fig. 5.** Changes in CL frequency counts for the six most affected communes (2010–2020). Each of the six most affected communes is represented by a different color, while the remaining communes combined, which have the lowest infection rates, are represented by a single color. Values are represented in percentages (%).

Barika, Bitam, and Djezzar communes, and the absence of vector control interventions in Abdelkader Azil, was associated with an increase in CL cases (Fig. 6).

#### 4. Discussion

Batna in the northeast of Algeria is considered as one of the high-risk regions for acquiring CL. During the 11 years of our study, the public health services of Batna recorded 9259 cases concerning CL, with an average of 841.73 cases per year. The highest number of cases was reported in 2010 with 1924 cases. Various epidemiological surveys conducted in Algeria have indicated similar results such that the greatest number of CL cases was observed in 2010 (Khezzani and Bouchemal, 2016; Kalla and Guettouche, 2017; Gaouaoui et al., 2017). This could be explained by the heavy rain rates recorded in the two preceding years, 2008 and 2009 (Khezzani and Bouchemal, 2016; Gaouaoui et al., 2017). In fact, an increase in rainfall levels would increase the density of vegetation and thus the number and quality of breeding sites for both the rodents and the sand flies, which therefore affects the transmission of leishmaniasis in the following years (Khezzani and Bouchemal, 2016; Gaouaoui et al., 2017; Bounoua et al., 2013).

We report that the number of reported cases was significantly decreased during the first five years, which is in agreement with (Khezzani and Bouchemal, 2016; Gaouaoui et al., 2017). The present results indicate a substantial increase in the CL incidence rate between 2015 and 2017, which is in contrast with the findings of a previous study in Biskra where a continuous decline was noted from 2010 to 2017 (Institut national de la santé publique (INSP), 2021). The incidence of the disease has decreased in 2018 and 2019, which is in line with the findings of Benikhlef et al. (Benikhlef et al., 2021) in M'sila wilaya.

Within the same study area, the authors declared a continuous decline in the CL incidence in 2020 (Benikhlef et al., 2021), which is inconsistent with our findings since we observed a slight increase in the frequency of the disease in that year. The intervention of multiple factors in CL epidemics, such as those related to control measures, environmental changes, or socio-economic status (Oryan and Akbari, 2016), is highly suggested. Unfortunately, our data do not allow us to disentangle those effects.

Significantly, the majority of CL cases were recorded during the cold months, with maximum rates of infection in November and January. Different studies from several regions around the world indicated similar results in which the most cases were noted to be in November or between November and February, such as those from Iran (Nazari et al., 2017; Jorjani et al., 2019) and Libya (Belal et al., 2012). Our results can be explained because of the seasonal activity of sand flies and the long incubation period of *Leishmania* infection. Different peaks in the activity of phlebotomine sand flies have been reported in Algeria depending on the study region (Ramdane et al., 2018; Gherbi et al., 2020). According to Zait and Hamrioui (Zait and Hamrioui, 2009), patients who became infected in Algeria did not come to the healthcare sector until after an average incubation period of 3 months (Zait and Hamrioui, 2009). When the sand fly bites a host in August or September, for example, cases would become apparent in November or December, which justifies our results.

We however know that CL was found to infect all age groups, from infants to the elderly, with most cases being reported in the age group of 0–9 years, which is in accordance to what has been reported in the survey of Gaouaoui et al. (Gaouaoui et al., 2017) in Biskra as well as in other investigations in other countries; Iran (Jorjani et al., 2019) and Morocco (Sebti et al., 2015). Nevertheless, the studies conducted in Souf

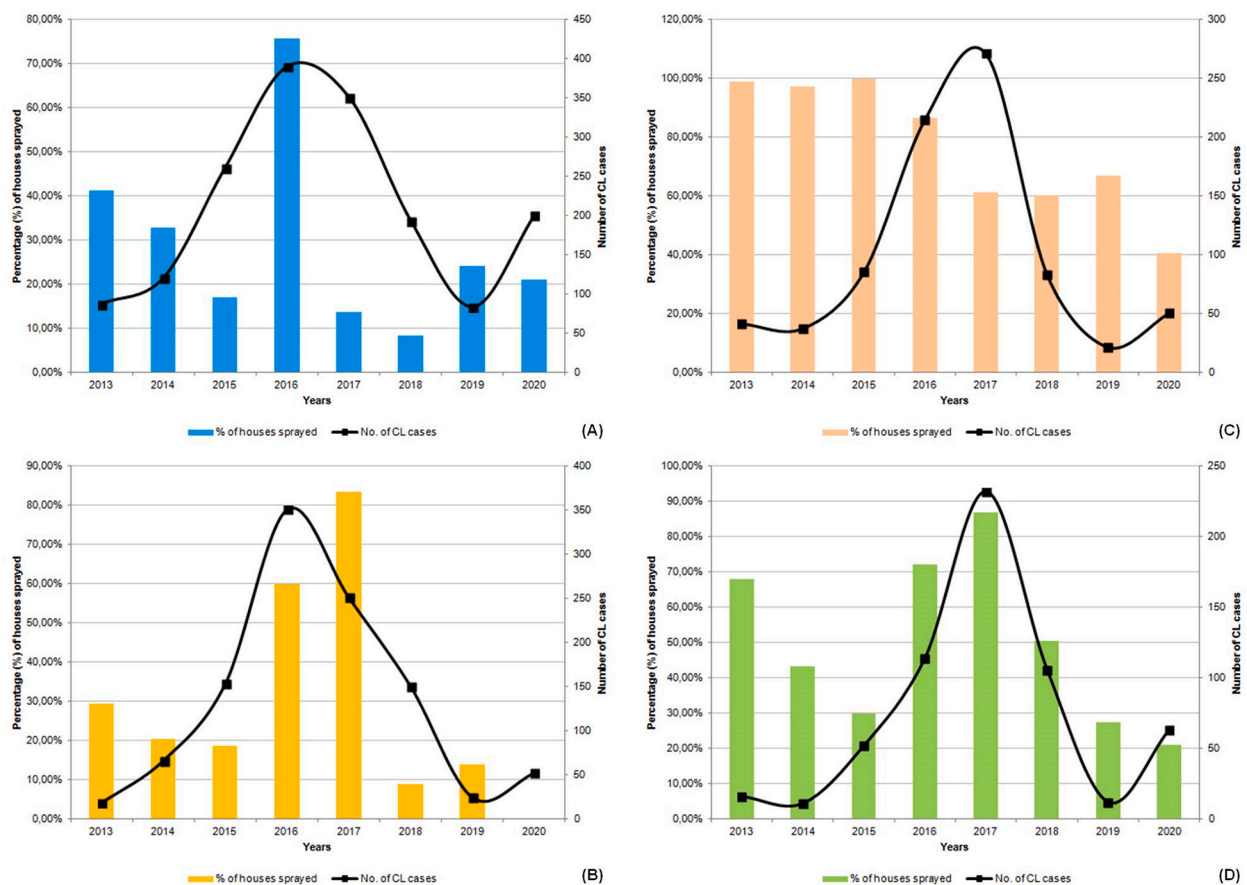


Fig. 6. Changes of CL frequency at the level of the four studied communes according to the proportion of houses sprayed with Deltamethrin: (A) Barika, (B) Abdelkader Azil, (C) Bitam, (D) Djezzar. The proportion of houses sprayed was represented by histograms, while the number of CL cases was represented by a curve.

Oasis and Djelfa have reported different results where the age groups of 10–19 and 20–50 years old are the most affected by this epidemic, respectively (Khezzani and Bouchemal, 2016; Hamiroune et al., 2019). Our results could be justified by the fact that children may have not acquired immunity against the disease because they have not had previous exposure to the parasite. Conversely, the infection rate in other age groups is low and this may be ascribed to the fact that adults have acquired lifelong immunity against the parasite after being infected during a specific period of their lives, considering that this disease is old in the Batna region. In a recent study conducted by Abou-Elaaz et al. (Abou-Elaaz et al., 2019) in Morocco, the range of ages at risk was found to be relatively the same in the focus of Azilal province, with children under 9 years old being the most affected group, while in Beni Mellal and Fquih Ben Salah provinces, the age ranges were larger and significantly fluctuated. According to the same authors, this could be due to the acquisition of the system immune since the disease is old in the focus of Azilal province compared to Beni Mellal and Fquih Ben Salah where the disease has newly emerged (Abou-Elaaz et al., 2019). We reported that males (58.6%) are more at risk than females (41.4%) which is in agreement with findings of earlier studies in Algeria (Khezzani and Bouchemal, 2016; Gaouaoui et al., 2017; Hamiroune et al., 2019) and other countries such as Iran (Jorjani et al., 2019), Libya (Abdellatif et al., 2013), Pakistan (Ali et al., 2016), and Iraq (Al-Warid et al., 2017). Gender differences can be explained by the fact that males are more exposed to sand fly bites due to many factors including working in open environments, especially in agriculture, taking care of livestock, and wearing short clothes during the summer period, unlike females, who spend most of the summer periods at home with clothes covering almost the entire body. Moreover, some human behaviors may ultimately increase or decrease sand fly exposure (Oryan and Akbari, 2016). Indeed, sleeping outside in the yards of homes for males during the summer period when it gets too hot indoors makes them more exposed to the risk of sand fly bites. Given our previous results which confirmed that children less than 9 years old are more vulnerable to infection, we can also conclude that boys are more likely than girls to be affected probably because they spend more time outdoors and are therefore more exposed to insect bites.

Epidemiological analysis demonstrated a more CL prevalence in the western areas, where the local geographical and climatic conditions are thought to facilitate the propagation of the disease. It has been indicated in a previous study performed in Batna using geomatics tools that areas with low-moderate altitude (336–975 m a.s.l) were the most strongly affected, giving a high thermal gradient for the cases of Barika, Bitam, Djeddar, Abdelkader Azil, and Amdoukal, while areas with low CL incidence rate were generally located at higher altitudes (> 975 m a.s.l) (Kalla and Guettouche, 2017). Within the same study, the analysis of land surface temperature (LST) revealed a high incidence rate in areas located in the Saharan latitudes (southwest) compared to the rest of the wilaya where the LST is generally lower than that of western Batna (Kalla and Guettouche, 2017). Several studies have confirmed that the low-moderate altitude and the increasing level of aridity are two suitable factors for the occurrence of higher densities of *Ph. papatasi* vectors, favoring therefore the transmission of the disease (Dedet et al., 1984; Rioux et al., 1984; Guernaoui et al., 2006). This sand fly species has been identified in different neighboring wilayas such as Setif, M'sila, and Biskra (Benikhlef et al., 2021; Gherbi et al., 2020; Zeroual et al., 2016). The low slopes that mainly characterize the southwest and northeast of the wilaya are another important risk factor for the occurrence of high CL infections (Kalla and Guettouche, 2017). In fact, low slopes are a source of water stagnation which leads to the appearance of wetlands, providing, as a result, an ideal ground for the development of numerous insects (Kalla and Guettouche, 2017). The most affected areas in our present work were located in and around the lake of Chott El Hodna that crosses the western Batna (with the communes of Abdelkader Azil, Amdoukal, Bitam, and Barika) as well as many areas in M'sila wilaya. In an early study conducted in M'sila, Belazzoug (Belazzoug, 1982) has

stated that most of the CL cases have occurred in rural areas of the Chott El Hodna region, where the usually dry watercourses had filled the previous winter and the humidity had allowed a significant increase in the density of sand flies and rodents. In addition, another study has shown that the largest number of active rodent burrows was identified in the areas that are located on the edge of Chott El Hodna (Cherif et al., 2012). Unlike the western areas where CL is highly endemic, the remaining parts of the wilaya have recorded few cases of the infection due to the fact that these cases were imported from other endemic areas and due probably to the absence of local spread of the disease.

The robustness of our results is supported by the use of the spatio-temporal distribution of CL in Batna. The epidemiological data that we report indicated a high incidence rate of CL in the western areas of Batna, with Barika as the most affected commune. However, the status of CL in high endemic areas is fluctuant. Data of residual spraying coverage from the four most affected communes revealed varying observations depending on the study year. In fact, the first three years (2013–2015) were characterized by a decline in insecticide spraying interventions in all communes, except Bitam, resulting in an apparent increase in CL incidence. However, the high proportion of houses sprayed in 2016 did not prevent the disease rate from being high. In 2018 and 2019, despite the low and moderate spray coverage rates, a decrease in the incidence of CL was noted. The two previous observations are presumably linked to the intervention of factors other than vector control, such as those related to climatic or environmental changes (Oryan and Akbari, 2016). In 2017, although the high rate of houses sprayed in Bitam, Abdelkader Azil, and Djeddar, a high incidence of CL was reported. This may be presumably due to the deficiency of vector control measures performed at the level of Barika, which is considered to be the most endemic focus in the wilaya and the largest urbanized city in the west of Batna. Even more, since western areas have shared borders with high-endemic foci in M'sila and Biskra, changes in the incidence rate of CL might be linked to the control measures performed in neighboring wilayas. An increase in the incidence of CL was recorded in 2020, mainly linked to the lack of vector control actions in the first phase of April and even more their absence in Abdelkader Azil during the two control phases given the general health situation caused by COVID-19 pandemic and the lockdown restrictions. In general, it can be said that there is no evidence whether vector control interventions using Deltamethrin have an impact on the recorded incidence of CL. Our results remain limited due to the lack of data on the bio-efficacy of Deltamethrin on sand flies' density and disease transmission rate at the level of sprayed and unsprayed houses. Future field studies should endeavor to assess the true impact of residual insecticide spraying on the incidence rate of CL.

The strategies for vector control using insecticide spraying are still facing numerous shortcomings in endemic areas of Batna. These include low coverage of insecticide spraying, restriction of the intervention process on outdoor structures which makes it difficult to control the endophilic sand fly species, lack of studies on sand fly breeding sites and behavior, and insufficient equipment and trained staffs for large-scale interventions. It has been indicated that the main challenges facing Algeria in implementing control activities are the lack of legislation on vector control and insufficient intersectoral collaboration. Moreover, the supervision of spraying operations is deficient and spraying techniques and equipment are also inadequate (World Health Organization, 2015). Control of reservoir hosts is only practiced in agricultural areas where the peridomestic *Meriones shawii* is found. This process usually takes place between October and April of each year. However, the main goal of this approach is to protect the crops and not necessarily to eradicate the disease. For this purpose, many rodenticides are used, such as Difenacoum at a concentration of 0.005%, which causes internal bleeding in the animal, leading as a result to its death after 3 or 4 days. It is also worth noting that the fat sand rat, *P. obesus*, is considered a protected species in Algeria (Benelmouffok et al., 2017). The recommended measures for controlling this species, using the manual pulling

of chenopods and the deep plowing of colonies, are demanding and expensive, so their application remains rare or virtually absent. As pointed out by an early study in Algeria, the fact that reservoir control is only applied in agricultural areas will make it difficult to eradicate this scourge definitively (Benelmouffok et al., 2017).

In addition to the impact of control measures, several other factors may play critical roles in the persistence of high CL infections in western areas of Batna. These factors are the presence of livestock farms in the urban neighborhoods, the increasing urbanization, particularly in Barika (Redjem and Tacherift, 2010), and the lack of awareness among local populations. The reckless attitude towards the disease and its prevention by throwing garbage in streets and near human habitations with the lack of regular environmental cleaning activities could also represent an important risk factor. Cherif et al. (Cherif et al., 2012) study implemented in M'sila, with the aim of controlling CL, has indicated that the control of the disease is more difficult in cities that are experiencing rapid urban growth. In these areas, the administrative services are unable to properly take charge of the household waste collection operations and, as a result, household waste is piling up on the outskirts of new urban extensions attracting vectors and reservoirs of the disease, in particular *M. shawi*, a rodent attracted by household waste and plant debris (Cherif et al., 2012). Another factor that increases the risk of CL is agriculture, and numerous studies have proved its important role in spreading the disease (Khezzani and Bouchemal, 2016; Nouiri et al., 2015). Our study region has experienced several projects to develop both agricultural (i.e. herbaceous crops) and irrigated areas (National Statistics Office (ONS), 2016). This condition will result in high humidity in the region, making it more conducive to vector and reservoir reproduction as well as disease transmission (Nouiri et al., 2015; Desjeux, 2001; Bellali et al., 2015). Finally, the possible spread of the disease into non-endemic areas cannot be ruled out if all the appropriate conditions are available.

## 5. Conclusion

The results of the present study indicate that CL is highly endemic in the western areas of Batna, especially in the commune of Barika. Interestingly, the disease usually affects males and children under 9 years old, with a seasonal epidemic pattern. Increasing public awareness, prevention, and appropriate vector and reservoir control measures should be scientifically and rigorously instituted to eradicate the disease. More in-depth studies are needed to find the details of the CL transmission cycle, especially given that the epidemiology of leishmaniasis in Algeria has undergone during recent years several changes with the emergence of new *Leishmania* species (Harrat et al., 2009), vectors (Boubidi et al., 2011), and suspected reservoirs (Tomás-Pérez et al., 2014), as well as with the extension of the disease from classical foci to new areas across the country (Boudrissa et al., 2012). Looking for more factors that are related to the endemicity of the disease should also be investigated.

## Declaration of Competing Interest

None.

## Acknowledgments

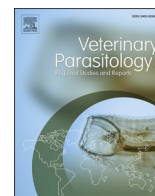
The authors wish to thank Mr. Benchadi Lazher in the Direction de la Santé et de la Population of Batna and Mr. Saidi Lehcene from Etablissement Public de la Santé de Proximité of Barika for providing data of the study.

## References

Abdellatif, M.Z.M., El-Mabrouk, K., Ewis, A.A., 2013. An epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Al-Jabal-Al-Gharbi Libya. *Korean J. Parasitol.* 51, 75–84.

- Abou-Elaaz, F., Outourakht, A., Bouhout, S., Himmi, O., Guernaoui, S., 2019. Thirty years of cutaneous leishmaniasis in Tadmra-Zalil focus, Morocco. *Parasite Epidemiol. Control* 4, e00091.
- Agence Nationale de Développement de l'Investissement (ANDI), 2013. Available from: <http://www.andi.dz/index.php/fr/monographie-des-wilayas?id=101>.
- Ali, A., Ur Rehman, T., Qureshi, N.A., Ur Rahman, H., 2016. New endemic focus of cutaneous leishmaniasis in Pakistan and future epidemics threats. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 6, 155–159.
- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., et al., 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7 (5), e35671.
- Al-Warid, H.S., Al-Saqur, I.M., Al-Tuwajari, S.B., Al Zadawi, K.A.M., 2017. The distribution of cutaneous leishmaniasis in Iraq: demographic and climate aspects. *Asian Biomed.* 11, 255–260.
- Aoun, K., Bouratbine, A., 2014. Cutaneous leishmaniasis in North Africa: a review. *Parasite* 21, 14.
- Bachi, F., Icheboudene, K., Benzitouni, A., Taharouch, Z., Zemmouri, M., 2019. Epidemiology of cutaneous Leishmaniasis in Algeria through molecular characterization. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 112, 147–152.
- Belal, U.S., Abdel-Hafeez, E.H., Naoi, K., Norose, K., 2012. Cutaneous leishmaniasis in the Nalut District, Libyan Arab Jamahiriya: a clinico-epidemiologic study and *Leishmania* species identification. *J. Parasitol.* 98, 1251–1256.
- Belazzoug, S., 1982. Une épidémie de leishmaniose cutanée dans la région de M'sila (Algérie). *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 75, 497–504.
- Beldi, N., Mansouri, R., Bettaieb, J., Yacoub, A., Souguir Omrani, H., Saadi Ben Aoun, Y., et al., 2017. Molecular characterization of *Leishmania* parasites in Giemsa-stained slides from cases of human cutaneous and visceral leishmaniasis, Eastern Algeria. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 17, 416–424.
- Bellali, H., Ben Alaya, N., Ahmadi, Z., Ennigrou, S., Chahed, M.K., 2015. Eco-environmental, living conditions and farming issues linked to zoonotic cutaneous leishmaniasis transmission in Central Tunisia: a population based survey. *Int. J. Trop. Med. Public Health* 5, 1–7.
- Benelmouffok, A.B., Sellami, M., Boughoufal, A., 2017. Cutaneous leishmaniasis in Algeria: quadrennial assessment (2008-2011). *Med. Sante Trop.* 27, 310–314.
- Benikhlef, R., Aoun, K., Boudrissa, A., Ben Abid, M., Cherif, K., Aissi, W., et al., 2021. Cutaneous Leishmaniasis in Algeria; highlight on the focus of M'Sila. *Microorganisms* 9, 962.
- Boubidi, S.C., Benallal, K., Boudrissa, A., Bouiba, B., Bouchareb, B., Garni, R., et al., 2011. *Phlebotomus sergenti* (Parrot, 1917) identified as *Leishmania killicki* host in Ghardaia, South Algeria. *Microbes Infect.* 13, 691–696.
- Boudrissa, A., Cherif, K., Kherrachi, I., Benbetka, S., Bouiba, L., Boubidi, S.C., et al., 2012. Extension de *Leishmania major* au Nord de l'Algérie. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 105, 30–35.
- Bounoua, L., Kahime, K., Houti, L., Blakey, T., Ebi, K.L., Zhang, P., et al., 2013. Linking climate to incidence of zoonotic cutaneous Leishmaniasis (*L. major*) in Pre-Saharan North Africa. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 3172–3191.
- Cherif, K., Boudrissa, A., Cherif, M.H., Harrat, Z., 2012. Un programme social pour la lutte physique contre la leishmaniose cutanée zoonotique dans la wilaya de M'Sila en Algérie. *Santé Publique* 24, 511–522.
- Dedet, J.P., Addadi, K., Belazzoug, S., 1984. Les Phlébotomes (Diptera: Psychodidae) d'Algérie. *Cah.O.R.S.T.O.M.Sér.Ent. Med. Parasitol.* 22, 99–127.
- Desjeux, P., 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95, 239–243.
- Desjeux, P., 2004. *Leishmaniasis* current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305–318.
- Eddaikra, N., Ait-Oudhia, K., Kherrachi, I., Oury, B., Moulti-Mati, F., Benikhlef, R., et al., 2018. Antimony susceptibility of *Leishmania* isolates collected over a 30-year period in Algeria. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006310.
- Gaouaoui, R., Zeroual, S., Boudjelida, H., 2017. Association between climatic changes and leishmaniasis incidence in Biskra district, Algeria. *J. Entomol. Zool. Stud.* 5, 43–49.
- Gherbi, R., Bounechada, M., Latrofa, M.S., Annoscia, G., Tarallo, V.D., Dantas-Torres, F., et al., 2020. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* species in a focus of cutaneous leishmaniasis in Algeria. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008024.
- Guernaoui, S., Boumezzough, A., Laamrani, A., 2006. Altitudinal structuring of sand flies (*Diptera: Psychodidae*) in the high-atlas mountains (Morocco) and its relation to the risk of leishmaniasis transmission. *Acta Trop.* 97, 346–351.
- Hamiroune, M., Selt, F., Senni, Z., Saidani, K., Djemal, M., 2019. Epidemiological situation of human cutaneous leishmaniasis in the steppe region of Djelfa in Algeria: incidence and factors of variation. *Int. J. Innov. Appl. Stud.* 26, 253–261.
- Harrat, Z., Hamrioui, B., Belkaïd, M., Tabet-Derraz, O., 1995. Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 88, 180–184.
- Harrat, Z., Boubidi, S.C., Pralong, F., Benikhlef, R., Selt, B., Dedet, J.P., et al., 2009. Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte & Pralong 1986) in Algeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 716–720.
- Institut national de la santé publique (INSP), 2002. REM: Relevé Épidémiologique Mensuel 2002. Available from: <http://insp.dz/images/PDF/Epidemio/rem2002.pdf>.
- Institut national de la santé publique (INSP), 2021. REM: Relevé Épidémiologique Mensuel 2000-2017. Available from: <http://insp.dz/index.php/Non-categorise/rem.html>.
- Izri, A., Bendjaballah, A., Andriantoanirina, V., 2014. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania killicki*, Algeria. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 502–504.
- Jorjani, O., Mirkarimi, K., Charkazi, A., Dadban Shahamat, Y., Mehrbakhsh, Z., Bagheri, A., 2019. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Golestan province, Iran: a cross-sectional study of 8-years. *Parasite Epidemiol. Control* 5, e00099.

- Kalla, M.I., Guettouche, M.S., 2017. Using geomatics for assessing vulnerability to cutaneous leishmaniasis. Application to the Wilaya of Batna (Algeria). *Int. J. GEOMATE* 13, 9–15.
- Khezzani, B., Bouchemal, S., 2016. Demographic and spatio-temporal distribution of cutaneous leishmaniasis in the Souf oasis (eastern south of Algeria): results of 13 years. *Acta Trop.* 166, 74–80.
- Mansouri, R., Pralong, F., Bachi, F., Hamrioui, B., Dedet, J.P., 2012. The first isoenzymatic characterization of the *Leishmania* strains responsible for cutaneous leishmaniasis in the area of Annaba (Eastern Algeria). *Open Conf. Proc. J.* 3, 6–11.
- Mihoubi, I., de Monbrison, F., Frahtia, K., Picot, S., Gasse, N., 2012. Contribution de la PCR en temps réel au diagnostic de la leishmaniose viscérale infantile en Algérie. *Med. Santé Trop.* 22, 61–64.
- Mokni, M., 2019. Cutaneous leishmaniasis. *Ann. Dermatol. Venereol.* 146, 232–246.
- National Statistics Office (ONS), 2016. Available from: <https://www.ons.dz/>.
- Nazari, M., Nazari, S., Hanafi-Bojd, A.A., Najafi, A., Nazari, S., 2017. Situation analysis of cutaneous leishmaniasis in an endemic area, South of Iran. *Asian Pac J Trop Med* 10, 92–97.
- Nouiri, I., Chemak, F., Mansour, D., Bellali, H., Ghrab, J., Baaboub, J., et al., 2015. Impacts of irrigation water management on consumption indicators and exposure to the vector of zoonotic cutaneous Leishmaniasis (ZCL) in Sidi Bouzid, Tunisia. *Int. J. Agric. Pol. Res.* 3, 93–103.
- Oryan, A., Akbari, M., 2016. Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pac J Trop Med* 9, 925–932.
- Ramdane, E., Berchi, S., Louad, K., 2018. Les phlébotomes (Diptera, Psychodidae), vecteurs d'agents pathogènes responsables de la leishmaniose humaine dans la région de Constantine (Algérie). *Entomofauna* 39, 537–555.
- Redjem, A., Tacherift, A., 2010. Urbanisation Au Hodna Et émergence D'un Système De Villes Sur L'axe M'sila-Barika: Une Approche Spatio-temporelle. *Sci. Technol.* 31, 55–62.
- Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S., 2007. Cutaneous Leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* 7, 581–596.
- Rioux, J.A., Rispaël, P., Lanotte, G., Lepart, J., 1984. Relations Phlébotomes-bioclimats en écologie des leishmanioses Corollaires épidémiologiques. L'exemple du Maroc. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 131, 549–557.
- Sebti, F., Hmamouch, A., Amarir, F., Fahmi, A., Delouane, B., Abbasi, I., et al., 2015. Molecular epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Beni Mellal and Fquih ben saleh provinces in Morocco. *Acta Trop.* 149, 106–112.
- Tomás-Pérez, M., Khaldi, M., Riera, C., Mozo-León, D., Ribas, A., Hide, M., et al., 2014. First report of natural infection in hedgehogs with *Leishmania major*, a possible reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Algeria. *Acta Trop.* 135, 44–49.
- WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases & World Health Organization, 2010. Control of the Leishmaniases: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010. World Health Organization. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>.
- World Health Organization, 2015. Cutaneous Leishmaniasis: Control in Selected Countries of the WHO Eastern Mediterranean and African Regions: Report of an Interregional Network Meeting, Casablanca, Morocco, 23–24 June 2014. World Health Organization. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/173804>.
- Zait, H., Hamrioui, B., 2009. Leishmanioses cutanées en Algérie Bilan de 386 cas diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger de 1998 à 2007. *Rev. Fr. Lab.* 412, 33–39.
- Zeroual, S., Gaouaoui, R., Boudjelida, H., 2016. Diversity and occurrence of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the area of Biskra (Middle Eastern of Algeria). *J. Entomol. Zool. Stud.* 4, 890–895.



## Original Article



# Identification of blood source preferences and *Leishmania* infection in sand flies (Diptera: Psychodidae) in north-eastern Algeria

Nacer Eddine Messahel<sup>a,1</sup>, Kamel Eddine Benallal<sup>b,c,1</sup>, Petr Halada<sup>d</sup>, Ismail Lafri<sup>e,f,\*</sup>, Hemza Manseur<sup>e,f</sup>, Ahcene Hakem<sup>g,h</sup>, Karim Houali<sup>a</sup>, Zoubir Harrat<sup>b</sup>, Petr Volf<sup>c</sup>, Vit Dvorak<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Analytical Biochemistry and Biotechnology (LABAB), Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Biological and Agronomic Sciences, University Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou 15000, Algeria

<sup>b</sup> Laboratory of Parasitic eco-epidemiology and population genetics, Institut Pasteur d'Algérie, Algeria

<sup>c</sup> Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 7, Prague 2 128 43, Czech Republic

<sup>d</sup> Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Průmyslová 595, Vestec, 252 50, Czech Republic

<sup>e</sup> Institute of Veterinary Sciences, University of Blida 1, Blida, Algeria

<sup>f</sup> Laboratory of Biotechnology related to Animal Reproduction (LBRA), Institute of Veterinary Sciences University of Blida 1, Blida, Algeria

<sup>g</sup> Laboratory of Exploration and Valorisation of Steppe Ecosystems, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Djelfa, Djelfa, Algeria

<sup>h</sup> Center of Research in Agropastoralism, Djelfa, Algeria

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Blood meal  
*Leishmania*  
 MALDI-TOF MS  
 Algeria  
 Sand flies  
*Phlebotomus perniciosus*

## ABSTRACT

Leishmaniasis are among the most neglected vector-borne diseases, infecting humans as well various animal hosts with clinical outcomes varying from cutaneous disorders to visceral and life-threatening disease. In Algeria, canine leishmaniasis (CanL) caused by *Leishmania infantum* is endemic mainly throughout the northern regions of the country with the Mediterranean climate that favours the occurrence of *Larrousius* sand flies, the vectors of the parasite. This study conducted in Bougaa and Kherrata, two regions located in north-eastern Algeria and endemic for CanL, focuses on: i) composition of sand fly fauna, ii) screening of *Leishmania* parasites and iii) the blood sources of engorged females. Entomological surveys were conducted between June and September 2019 using CDC light-traps in rural areas of both regions. Sand fly specimens were morphologically identified, females were screened for *Leishmania* DNA using kDNA and ITS1 primers, blood meals in engorged females were identified by peptide mass mapping (PMM)-based MALDI-TOF mass spectrometry and confirmed by DNA sequencing analysis. Overall, 1940 specimens (844 males, 1096 females) were collected, all belonging to the subgenus *Larrousius*: *Phlebotomus perniciosus*, (94.64%), *Ph. perfiliewi* (4.74%) and *Ph. longicuspis* (0.62%). No *Leishmania* DNA was detected in the evaluated pools ( $n = 106$ ) (1096 females). PMM-based MALDI-TOF MS successfully identified a source of blood in 92% (141/154) of engorged females (135 *Ph. perniciosus* and 6 *Ph. perfiliewi*). All blood meals were taken from domestic cattle (*Bos taurus*) except for one originating from a dog (*Canis lupus familiaris*) and one from sheep (*Ovis aries*). Sequencing of host cytochrome B gene confirmed these identifications but showed lower success rate of 58% (29/50), demonstrating the high effectivity of peptide mass mapping (PMM)-based MALDI-TOF mass spectrometry for routine identification of blood meals of varying degree of digestion. Our findings represent first record of cattle and dog blood in sand flies in Algeria and striking feeding preference of local sand fly population at domestic sites of studied regions for cattle which may play an important role in parasite transmission. Further studies are needed to better understand potential contribution of cattle to ecology of sand flies and epidemiology of leishmaniasis in north-eastern Algeria.

## 1. Introduction

Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) are small nocturnal

insects proven as vectors of various pathogens, including bacteria *Bartonella bacilliformis*, viruses of several genera and most importantly, parasitic protozoa of the genus *Leishmania* that cause diseases known as

\* Corresponding author at: Institute of Veterinary Sciences, University of Blida 1, Blida, Algeria.

E-mail address: [lafrismail@gmail.com](mailto:lafrismail@gmail.com) (I. Lafri).

<sup>1</sup> Both authors shared co-first authorship.

leishmaniasis in human and animal hosts (Maroli et al., 2012; Ready, 2013). So far, approximately 1000 species and subspecies of sand flies were described and grouped into several genera of which three are found exclusively in the Old World namely: *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840, *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 and *Chinius* Leng, 1987 (Bates et al., 2015; Munstermann, 2019). Among these genera, only species of the genus *Phlebotomus* are considered as the proven or suspected vectors of *Leishmania* spp. that infect humans and animals (Maroli et al., 2012).

Canine leishmaniasis (CanL) caused by *L. infantum* is a zoonotic parasitic disease widely distributed in the Mediterranean area where it represents a major veterinary problem and raises human health concerns (Velez et al., 2018). In Algeria, this zoonosis is believed to affect the entire national territory but with variable prevalence rate from one region to another, ranging generally between 11% and 37% (Harrat et al., 1996; Bessad et al., 2012). However, classic endemic foci of the disease are known mainly throughout the northern areas characterized by humid and sub-humid Mediterranean climates. In these bio-climate stages, high *Leishmania* infection rate was reported in dogs (Harrat and Belkaid, 2003; Ait-Oudhia et al., 2009; Adel et al., 2015; Medkour et al., 2019a). While the causative agent of CanL in northern Algeria is seldom responsible for the sporadic human cases of cutaneous leishmaniasis (CL), its ability to cause human visceral leishmaniasis (VL) which is a fatal disease if left untreated remains a high risk (Harrat et al., 1996). Data from the study of Adel et al. (2014) showed that 81.56% of all HVL cases recorded in Algeria during the period from 1998 to 2008 originated from regions located in the eastern and central North parts of the country. Unfortunately, HVL cases increased also in the extreme south of Algeria in Tamanrasset where the incidence reached 2.54 cases/100,000 inhabitants between 1997 and 2011 against 0.75 cases/100,000 inhabitants for the old focus of Grande Kabylie (Benallal et al., 2013).

In Algeria, twenty-four sand fly species were described so far, six of these within the subgenus *Larrousius*: *Ph. perniciosus* Newstead, 1911 in both typical and atypical morphological forms, *Ph. perfiliewi* Parrot, 1930, *Ph. ariasi* Tonnoir, 1921, *Ph. langeroni* Nitzulescu, 1930, *Ph. longicuspis* Nitzulescu, 1911 and *Ph. chadlii* Rioux, Juminer et Gibily, 1966 (Dedet et al., 1984; Berchi et al., 1986; Berdjane-brouk et al., 2011; Benallal et al., 2017; Benallal et al., 2022). Classical method for *Leishmania* detection which requires the dissection of freshly caught individual sand flies, isolation and culture of parasites from the sand fly gut has incriminated *Ph. perniciosus* and *Ph. perfiliewi* as the vector of *L. infantum* and *Ph. sergenti* as vector of *L. killicki* in Algeria (Izri et al., 1990; Izri and Belazzoug, 1993; Boubidi et al., 2011). However, this traditional approach is laborious, time-consuming and often not easy to perform as it requires equipment and expertise. Recent advances of PCR-based molecular techniques allowed them to complement conventional dissection methods which become scarce epidemiological studies performed in Algeria (Berdjane-brouk et al., 2012; Mouloua et al., 2017; Bennai et al., 2018; Gherbi et al., 2020).

The application of molecular methods, especially sequencing assays targeting various genetic markers of the hosts, has further been extended to study the blood-feeding patterns of phlebotomine sand flies as a convenient alternative to serological techniques (Kent, 2009). In a single study performed so far in Algeria using PCR-sequencing targeting mitochondrial *COI* gene, an opportunistic feeding behaviour was observed in field-caught blood-fed sand flies (Bennai et al., 2018). Beside apparent advantages, most molecular techniques still face certain complications and limitations, mostly related to the rapid process of blood degradation (Hlavackova et al., 2019). Recently, a novel method, peptide mass mapping (PMM) analysis of host-specific haemoglobin peptide using MALDI-TOF mass spectrometry, was introduced as a sensitive and cost-effective tool, allowing host blood meal identification in hematophagous insects such as sand flies or mosquitoes by a fast and simple preparation protocol that provides conclusive host determination within a prolonged period post blood meal intake (Hlavackova et al.,

2019).

This study aimed to assess the diversity and relative abundance of sand fly species in two localities within Kabylia region in north-eastern part of Algeria where *L. infantum* infection in dogs is endemic (Adel et al., 2015; Medkour et al., 2019a). DNA-based molecular tools were applied to detect *Leishmania* DNA among sand fly females and to confirm morphological identification of some specimens while PMM-based MALDI-TOF MS was used for the identification of blood meals in engorged sand fly females to understand their feeding behaviour and determine potential reservoir hosts. The results of this study will contribute to estimate the risk of disease transmission in the study areas.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sand fly collection and morphological identification

#### 2.1.1. Ethical considerations

Verbal informed consent was obtained from head of animal shelters which were selected for sampling of sand flies.

#### 2.1.2. Study area and sand flies trapping

This study was conducted in two villages, Bougaa (36° 19' 57" N, 5° 05' 19" E) located in the northwest of Setif wilaya (province) and Kherrata (36° 29' 34" N, 5° 16' 39" E) located in the southeast of Bejaïa wilaya (Fig. 1). Distance between the two study areas is 42.1 km. The elevation is between 650 and 1250 m above sea level (a.s.l.) for Bougaa, whereas it varies between 498 and 1896 m a.s.l in Kherrata. Both areas, with their specifically mountainous relief, support a Mediterranean sub-humid climate with an average annual rainfall exceeding 500 mm. The average annual temperature is between 14 and 15 °C, dropping to as low as 2 °C in winter and reaching up to 33 °C in summer. Relative humidity is about 77% and 47% in January and July, respectively. The main vegetation is composed by olive, fig and oaks trees as well as Aleppo pine and Cedar trees. Agriculture is dominant human activity, growing crops and raising livestock (i.e. sheep, goats, cows and poultry), thus providing suitable environment for the development of sand flies. Animal shelters are mostly found attached to or near human dwellings with an accumulation of animal waste in proximity.

Ten collection sites (five in each locality) represented by animal stables and located in rural environments were selected for this study. The fauna inside each selected animal shelter consisted mainly of 9 to 13 cows, 5 to 7 sheep and 2 to 3 goats. The presence of cats and farm dogs in or near to livestock shelters was also noted (< 3). Donkeys are found in almost all selected biotopes, although in low numbers (< 2). Sand flies were collected inside animal shelters using CDC light traps (John W. Hock Company, Gainesville, FL, USA, Centers for Disease Control) placed from the second half of June to mid-September, corresponding to the active season of sand flies. Once every 10 days, one of the 10 sites was sampled for one night using 4 CDC light traps. Traps were suspended from ceiling in animal shelters from sunset to sunrise, i.e. from 18:00 PM to 7:00 AM at height of about 1.5 m from the ground level. A total of 10 trapping nights were performed during the whole study period. All caught sand flies were pooled to obtain 30 specimens per tube and dry stored at -20 °C until further analyses.

#### 2.1.3. Morphological identification of sand flies

The species identification of caught sand flies was done by observing the decisive morphological characters on the head (pharynx and cibarium) and genitalia (male external appendices and female spermathecae). Each sand fly was transferred to a sterilized microscopic slide and dissected using sterile micro-needles. Subsequently, the head and terminal segment of the abdomen were slide mounted in CMCP-9 mounting medium (Polysciences) and the rest of the body was stored in ethanol for molecular analyses as described later. Morphological identification was carried out using the identification keys of Abonnenc (1972) and Dedet et al. (1984).

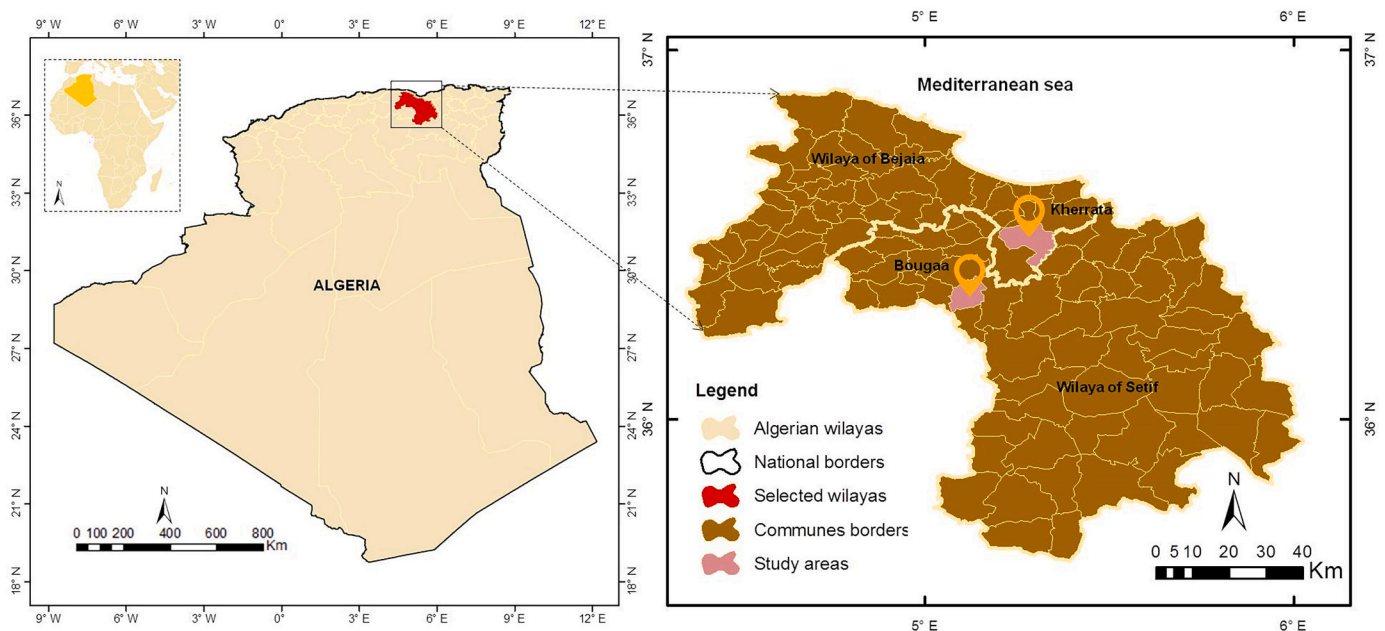


Fig. 1. Geographic locations of the phlebotomine sand fly collection sites in Setif and Bejaia. This map was created using ArcGIS 10.3.

## 2.2. Host blood meal identification

### 2.2.1. Sample preparation for PMM-based MALDI-TOF mass spectrometry

All 154 collected blood fed females (74 from Kherrata and 80 from Bougaa) were analysed individually using MALDI-TOF mass spectrometry to determine the origin of their blood meals. Before PMM analysis, engorged females were identified into species using decisive morphological characters as previously described. For specimens with inconclusive species assignment and those morphologically identified as *Phlebotomus perfiliewi*, DNA barcoding by universal LCO/HCO primers was performed according to standard protocol (Folmer et al., 1994) using DNA isolated as described below to confirm their species identity. The abdomens were air-dried and homogenized individually in 1.5 mL Eppendorf tubes utilizing a manual BioVortexer homogenizer (BioSpec) with sterile disposable pestles in 50  $\mu$ L of distilled water (Merck KGaA) for 15 s. The homogenates were then shortly centrifuged at 10000g for 15 s and 10  $\mu$ L of each supernatant were mixed in a new microtube with 10  $\mu$ L of 50 mM N-ethylmorpholine acetate buffer (pH 8.1; Sigma-Aldrich) and 100 ng of sequencing grade trypsin (Promega). The resulting mixture was subsequently incubated for 30 min at 37  $^{\circ}$ C. After the digestion, 0.5  $\mu$ L of the mixture was deposited on a MALDI plate in duplicate, subjected to air-drying at room temperature and later covered with 0.5  $\mu$ L of MALDI matrix prepared with  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (5 mg/mL) in a mixture solution of 50% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich) (Hlavackova et al., 2019). Simultaneously, the remaining 40  $\mu$ L of the abdomen homogenate were utilized as a template for DNA isolation by High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Germany) following the manufacturer's protocol. The isolated DNA was used for DNA barcoding to verify species identification achieved by morphological characters and to confirm blood meal determination in chosen samples.

### 2.2.2. Identification of blood meal sources by PMM-based MALDI-TOF mass spectrometry

The 154 samples were measured on an Ultraflex III MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) in the mass range of 700–4000 Da. To determine blood meal source, the obtained peptide mass maps were compared with in silico generated tryptic peptides from haemoglobins of all potential vertebrate hosts. For equivocally identified blood meals (19 females) with lower number of matched peptide fragments at least two

peptides per sample were selected for MS/MS sequencing using LIFT technology. The MS/MS spectra were searched against a vertebrate subset of a SwissProt database using an in-house MASCOT 2.4 search engine (Matrix Science) to confirm the tentative host assignment (Supplementary Table S1).

### 2.2.3. Confirmation of blood meal sources by DNA sequencing analysis

In total, 50 females were chosen for confirmation of blood meal identification by DNA-based methods. Within these, 13 specimens that yielded no identification by MALDI-TOF mass spectrometry were included together with both non-bovine blood meal samples (2). In addition, 19 females which provided lower quality of mass spectra that required additional verification by MS/MS sequencing were selected. Finally, 16 specimens (8 from each locality) with conclusive identification using PMM-based peptide mapping were randomly chosen for DNA sequencing as well (*Ph. perfiliewi* and *Ph. perniciosus* females).

DNA isolated from engorged females was utilized as a template to amplify a fragment of *Cyt b* gene by universal vertebrate primers *Cyto 1* and 2 (Abbasi et al., 2009) in 50  $\mu$ L reaction mixture with Emerald Amp GT PCR Master Mix (Takara). The amplicons were purified and subjected to Sanger sequencing in two directions with the primers used for DNA amplification, obtained sequences were queried in GenBank database using BLAST algorithm.

Moreover, multiplex PCR assay using species-specific primers to amplify size-specific fragments of *Cyt b* gene was done as previously published (Garros et al., 2011) to confirm identified canine and ovine blood meals. Multiplex PCR was done in 50  $\mu$ L reaction mixture with Emerald Amp GT PCR Master Mix (Takara) for samples KA37 (canine blood amplified by forward primer UNIV1 and reverse primer CANIS), KA60 (ovine blood amplified by forward primer UNIV2 and reverse primer OVIS), KA23 and KA24 (bovine blood amplified by forward primer UNIV2 and reverse primer BOS). Amplicons were visualized on a 2% agarose gel alongside GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder (Thermo Scientific) to determine their size difference.

## 2.3. Molecular screening for *Leishmania* infection in sand flies

A High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche<sup>®</sup> Mannheim, Germany) was used for extracting DNA from the abdomen of unfed and fed females following the manufacturer's instructions. After extractions,

4 µL DNA of each sand fly female were pooled by 2 to 12 sand flies' DNA per pool based on the same sand fly species, repletion status and sampling locality.

These DNA pools were screened for *Leishmania* infection by the amplification of a 300–350 bp fragment corresponding to the internal transcribed spacer of the *Leishmania* DNA (ITS1), using the primers L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') and LITSR (5'-CTGGATCATTTCGGATG-3') (Schönian et al., 2003). Moreover, presence of *Leishmania* DNA from the same sand fly DNA pools was also tested using PCR targeting the conserved sequences of the *Leishmania* kinetoplast minicircle DNA (kDNA) with the following primer pair F (5'-GTGGGGGAGGGGCGTTCTG-3') and R (5'-AAACTGGGGTGGTG-TAAAAT-3') (Rodgers et al., 1990). For the former assay, the amplification was performed in a 50 µL final volume of a reaction mixture containing 25 µL of Dream Taq Master Mix, 21 µL of deionized water, 2 µL of the reverse and forward primers and 4 µL of DNA template. The optimized thermocycling conditions were as follows: 94 °C for 2 to 3 min, followed by 39 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 53 °C for 30 s and extension at 72 °C for 1 min, with a final extension step at 72 °C for 6 min. For the second assay, the amplification reaction totalled 25 µL, containing 12.5 µL of Dream Taq Master Mix, 8.5 µL of deionized water, 1 µL of each primer and finally 2 µL of DNA template under the following cyclic conditions: an initial denaturation step at 94 °C for three minutes followed by 40 cycles of 94 °C for 20 s, 61 °C for 30 s, 72 °C for 7 s and terminated with an extension step at 72 °C for 5 min. Negative (DNA-free water) and positive (*L. major* DNA) controls were included for both PCR assays. The amplified PCR products were separated and visualized on 2% agarose gel under a UV illuminator.

### 3. Results

#### 3.1. Entomological data

##### 3.1.1. Sand fly identification

In total, 1940 sand fly specimens, belonging to three sand fly species were collected and identified based on their morphological characters. All collected sand flies belonged to subgenus *Larrousius*: *Phlebotomus perniciosus*, *Ph. perfliewi* and *Ph. longicuspis*. No atypical forms of *Ph. perniciosus* were identified. Further confirmation was obtained by using DNA barcoding for all engorged *Ph. perfliewi* females as well as for six engorged *Ph. perniciosus* specimens, which provided inconclusive morphological characters. The obtained sequences successfully aligned with GenBank entries using BLAST algorithm (all barcoded specimens marked by asterisk in Supplementary Table S1).

##### 3.1.2. Sand fly abundance and density

Out of 1940 caught specimens, 1188 (61.24%) were trapped in Bougaa and 752 (38.76%) in Kherrata. At both sites, the most abundant species was *Ph. perniciosus* representing 94.64% of the total individuals. *Ph. perfliewi* was represented by 92 specimens (56 in Bougaa; 36 in Kherrata) and *Ph. longicuspis* with only 12 specimens (0.62%) (Table 1). The global phlebotomine density was found to be 48.5 sand flies/ CDC trap/night. At the species level, the density of *Ph. perniciosus* is represented by 45.9 caught specimens /trap-night while it is 2.3 and 0.3 for *Ph. perfliewi* and *Ph. longicuspis*, respectively.

**Table 1**

Composition, abundance and relative frequency of sand fly species caught in Bougaa (Setif) and Kherrata (Bejaia) from June to September 2019.

Genus	Species	Study areas								
		Bougaa			Kherrata			Total		
		Male/Female	n	%	Male/Female	n	%	Male/Female	N	%
<i>Phlebotomus</i>	<i>Ph. perniciosus</i>	536/588	1124	94.61	276/436	712	94.68	812/1024	1836	94.64
	<i>Ph. perfliewi</i>	08/48	56	4.71	16/20	36	4.79	24/68	92	4.74
	<i>Ph. longicuspis</i>	08/00	08	0.67	00/04	04	0.53	8/4	12	0.62
Total		552/636	1188	100%	292/460	752	100%	844/1096	1940	100%

In total, 844 (43.51%) specimens were males and 1096 (56.49%) were females. The F/M sex ratio was 1.29. Among the 1836 specimens of *Ph. perniciosus* captured, 1024 were females of which 588 (57.42%) were collected from Bougaa and 436 (42.58%) from Kherrata. Of 92 *Ph. perfliewi* specimens, 68 (73.91%) were females; 48 from Bougaa and 20 from Kherrata (Table 1).

Out of 1096 female specimens, 154 (14.05%) were engorged, 74 of which (48.05%) were collected in Kherrata and 80 (51.95%) in Bougaa. *Ph. perniciosus* was the most dominant species with 148 (96%) specimens, followed by 6 (4%) specimens identified as *Ph. perfliewi*.

#### 3.2. Host blood meal analysis

##### 3.2.1. Blood meal analysis by PMM-based MALDI-TOF mass spectrometry

The PMM-based approach successfully determined blood meal origin in 92% (141/154) of the engorged females (Supplementary Table S1, Fig. 2). For thirteen samples, the analysis did not provide any identification, probably because of the small volume of blood taken or high degree of blood digestion. Majority of identified females (122 of 141) yielded spectra of high quality allowing conclusive blood meal source determination. For 19 specimens giving spectra with lower number of matched peptides, the host assignment was confirmed using additional MS/MS sequencing. In all successfully identified samples, cattle (*Bos taurus*) was detected as a source of the blood meal, except two females where blood of domestic dog (*Canis lupus familiaris*) and sheep (*Ovis aries*), respectively, was identified. No mixed blood meals were observed (Supplementary Table S1).

##### 3.2.2. Blood meal analysis by DNA sequencing and multiplex PCR

No amplification of the targeted gene fragment was obtained in 13 out of 50 females used for sequencing analysis of host *Cyt b* gene, for which MALDI-TOF MS did not provide any host identification. For 18 samples where peptide mass mapping yielded unambiguous host identification, the blood meal source was confirmed in all cases (16 bovine, 1 canine and 1 ovine) when sequences were queried in GenBank using BLAST algorithm. In remaining 19 samples where host blood meal origin was verified using MS/MS sequencing, amplification and sequencing of *Cyt b* gene was successful for 12 samples (bovine and canine). Overall success rate of cytochrome *b* sequencing assay was 58% (29/50).

For one canine, one ovine and two randomly chosen bovine samples, multiplex PCR assay using species-specific reverse primers successfully amplified PCR products of expected species-specific sizes that confirmed the host identification in these samples when separated and visualized on agarose gel.

#### 3.3. Molecular detection of *Leishmania* spp. in phlebotomine sand flies

A total of 106 pools, consisting of 2–12 sand flies' DNA per pool, were molecularly assessed for *Leishmania* spp. *Leishmania* DNA was not detected in any of *Ph. perniciosus* 92 monospecific pools (fed and unfed females) either by kDNA-PCR or ITS1-PCR. Similarly, the examined 12 *Ph. perfliewi* and 2 *Ph. longicuspis* female pools were found to be *Leishmania*-negative.

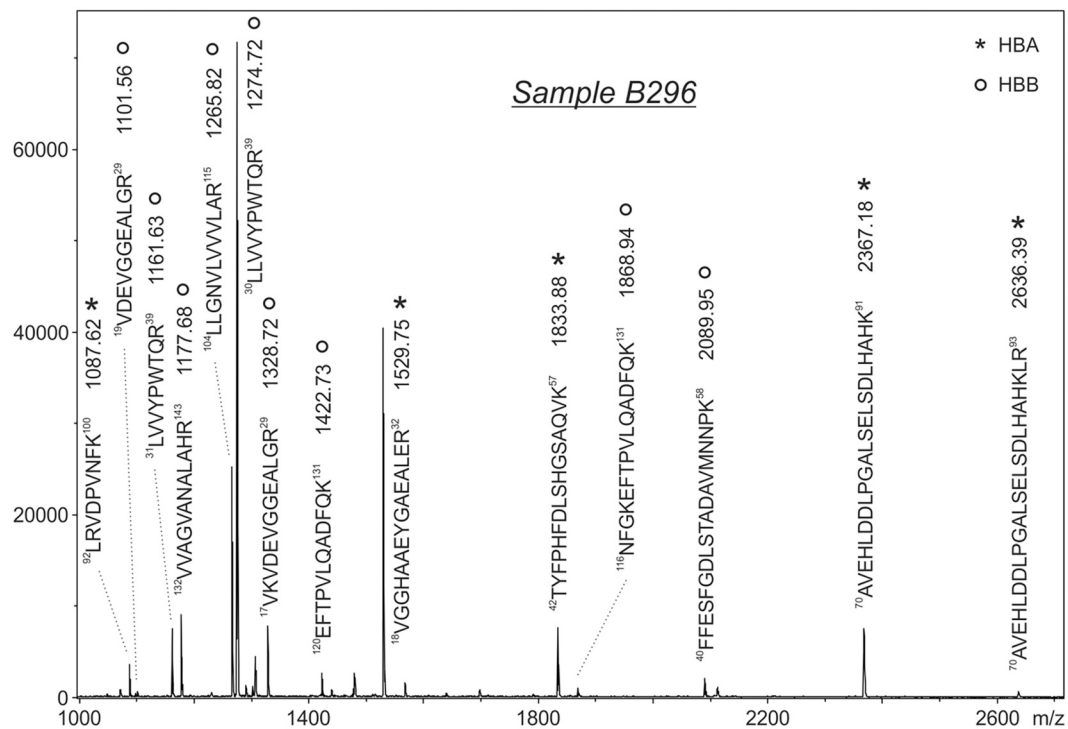


Fig. 2. Host blood meal identification by PMM-based MALDI-TOF mass spectrometry. Peptide mass map of trypsin-digested abdomen of the field-caught female B296. The assigned peaks are labelled by peptide sequences of cow haemoglobin subunit alpha (HBA; asterisks) and haemoglobin subunit beta (HBB; circles).

#### 4. Discussion

In this study, we reported sand fly fauna in the rural areas of Bougaa and Kherrata, northeastern Algeria, where high prevalence of *L. infantum* infection has been recently confirmed in dogs (Adel et al., 2014; Medkour et al., 2019a, 2019b). Three sand fly species of the subgenus *Larrousius* were found with *Ph. perniciosus* being a dominant species. Composition of sand fly fauna in the two study areas was similar which is not surprising as the surveyed regions share similar parameters of climate, topography and land use.

High abundance of *Larrousius* species was previously reported by most studies carried out in the northern regions of Algeria, suggesting that environmental and climatic conditions in this region provide favourable conditions for members of this subgenus, while populations of other *Phlebotomus* subgenera were represented by markedly lower densities (Izri et al., 1990; Izri and Belazzoug, 1993; Harrat and Belkaid, 2003; Berdjane-Brouk et al., 2011, 2012; Allal-Ikhlef et al., 2017; Mouloua et al., 2017; Bennai et al., 2018). Our results showed a relatively low species richness rate compared to other regions of northern Algeria which share similar Mediterranean bioclimatic pattern. Indeed, in the Kabylia region, the main focus of canine and human leishmaniasis due to *L. infantum*, the species richness varies between six and ten species according to the studied focus (Izri et al., 1990; Berdjane-Brouk et al., 2011; Allal-Ikhlef et al., 2017), while in Tipaza located in the north-centre, Bennai et al. (2018) have reported the presence of seven sand fly species.

*Phlebotomus perniciosus* was found to be the predominant species (94.64%). This finding is in accord with previous studies from northern Algeria (Izri et al., 1990; Berdjane-Brouk et al., 2011; Bennai et al., 2018). This species is widely present in the western part of the Mediterranean basin; in Algeria it occurs in all bioclimatic stages from the humid regions in the north to the Saharan edge of Tassili and Hoggar in the extreme south (Benallal et al., 2017). However, its distribution is predominantly in Tellian (northern Algeria) where the Mediterranean climate (sub-humid and semi-arid) prevails (Dedet et al., 1984). Given that our collecting sites are located within the main distribution area of

this species, its predominance was unsurprising.

While climatic characteristics have a profound impact at macro-environmental scale, anthropic factors may be determining at a micro-geographical scale (Risueño et al., 2017). Trapping sites of sand flies in this study were chosen in livestock farms which constitutes another relevant factor for the greater abundance of *Ph. perniciosus* species since the accumulation of large amounts of organic matter and the presence of stable microclimates in these biotopes provide ideal breeding and resting sites (Guernaoui and Boumezzough, 2009; Branco et al., 2013). This observation was previously emphasized by several studies which highlighted an increasing risk of encountering this vector in locations where domestic animals i.e. livestock are in close proximity (Guernaoui and Boumezzough, 2009; Gálvez et al., 2010; Barón et al., 2011; Branco et al., 2013; Alcover et al., 2014; Bravo-Barriga et al., 2016). Besides the climatic and environmental conditions, highly endophilic (Benabid et al., 2017) and anthrozoophilic behaviour of this sand fly species (Rioux et al., 1970; Bravo-Barriga et al., 2016; Gherbi et al., 2020) could reflect also its important frequencies.

Other two sand fly species found, *Ph. perfiliewi* and *Ph. longicuspis* were present in relatively low numbers (4.75% and 0.6%, respectively). These results are in agreement with those found in Larbaa Nath Irathen (north-centre) where *Ph. perfiliewi* is poorly represented (Berdjane-Brouk et al., 2012) but are in contrast with those reported from Draa El Mizan (north-centre) where this species is highly abundant (Allal-Ikhlef et al., 2017; Mouloua et al., 2017). Although the same sampling methods (CDC-light traps) were used, the apparent discrepancy in results may be ascribed to differences between the studied biotopes (exclusively rural vs. more diversified), altitude (around 1000 m vs. < 400 m), hosts diversity and other environmental factors (e.g. vegetation type), which might have influenced the distribution and abundance of sand flies (Barón et al., 2011; Alcover et al., 2014; Bravo-Barriga et al., 2016). Low numbers of *Ph. longicuspis* were expected since this species occurs mainly in the semi-arid and the arid bioclimatic zones (Dedet et al., 1984; Berdjane-Brouk et al., 2012) and it was previously reported in low abundance from northern Algeria (Berdjane-Brouk et al., 2012; Allal-Ikhlef et al., 2017).

A novel method of mass spectrometry, PMM-based MALDI-TOF MS analysis targeting host specific haemoglobin peptides was recently introduced as a sensitive and cost-effective alternative that offers a fast and simple preparation protocol and enables host blood identification in a longer interval post blood meal (Hlavackova et al., 2019). In our study, this novel approach successfully revealed the origin of blood meal in 92% of analysed engorged females, showing that almost all engorged *Ph. perniciosus* and *Ph. perfliewi* females fed exclusively on domestic cattle *B. taurus*, this being the first identification of cattle blood in engorged sand flies in Algeria. Only one *Ph. perniciosus* female was identified to feed on a dog and one on a sheep. Such rare detections of blood meals of origin other than bovine in a considerably large sample of engorged females suggest a strong preference of local sand fly populations at the studied sites for cattle as abundant and easily accessible blood source. The obtained high success rate of blood meal identification indicates a high degree of sensitivity of the method. In contrast, the success rate of identifications provided by sequencing analysis of host *Cyt b* was markedly lower, suggesting that PMM-based MALDI-TOF MS analysis of host specific haemoglobin peptides is a promising tool that may rival DNA-based techniques for blood meal identification in minuscule hematophagous insects like sand flies. When MS/MS sequencing was applied, conclusive host identification was possible even in samples where conventional DNA-based method failed due to unsuccessful PCR amplification or sequence of a low quality.

Numerous studies conducted in leishmaniasis foci in Italy (Bon-giorno et al., 2003; Rossi et al., 2008), Spain (De Colmenares et al., 1995; Jiménez et al., 2013; Bravo-Barriga et al., 2016; González et al., 2017), Portugal (Branco et al., 2013; Maia et al., 2015) and Tunisia (Remadi et al., 2020) demonstrated that *Ph. perniciosus* showed an opportunistic feeding behaviour, taking a variety of blood sources, including dogs which represent the main reservoir of *L. infantum* in Algeria (Ait-Oudhia et al., 2009; Adel et al., 2010; Medkour et al., 2019a). Cattle were previously demonstrated as a blood source of *Ph. perniciosus* in Spain (De Colmenares et al., 1995) and Tunisia (Remadi et al., 2020). In contrast, Bennai et al. (2018) showed that *Ph. perniciosus* feed mainly on small ruminants and humans in Tipaza (north-centre Algeria). Here we confirmed that cattle serve as a blood source to *Ph. perniciosus* but its susceptibility to *L. infantum* was not demonstrated yet. In a previous study in Kabylia, equids were found to be infected with *L. infantum* (Medkour et al., 2019b); however, in our study, no equid blood was found in the tested engorged females, mainly due to the very low abundance of these animals.

Prevalence studies of *Leishmania* infection in phlebotomine sand flies are valuable indicators of *Leishmania* transmission intensity (Rossi et al., 2008). All three sand fly species caught in the present work are regarded as either proven (*Ph. perniciosus*, *Ph. perfliewi*) or suspected (*Ph. longicuspis*) vectors of *L. infantum* in Algeria (Izri et al., 1990; Izri and Belazzoug, 1993; Berdjane-Brouk et al., 2012; Lafri and Bitam, 2021; Benallal et al., 2022). Nevertheless, no *Leishmania* spp. DNA was detected in any of the analysed pools despite two different markers deployed. This may reflect usually very low infection rates reported in sand fly populations even in the endemic areas, ranging from 0.4% to 0.6% in Bourkika (Tipaza) and in Larbaa Nath Irathen (Tizi-Ouzou) (Boubidi et al., 2011; Berdjane-Brouk et al., 2012; Benallal et al., 2013; Bennai et al., 2018; Gherbi et al., 2020). Moreover, infection rates of *Leishmania* spp. are usually low in *Larroussius* sand flies (Svobodová et al., 2009; Branco et al., 2013; Chargui et al., 2013; Maia et al., 2015; Barhoumi et al., 2016; Bravo-Barriga et al., 2016; Mhaidi et al., 2018). In the present work, the *Leishmania*-negative infections might also be ascribed to the presence of non-competent hosts in our sampled biotopes, which could promote a dilution effect supposed to reduce feeding of vectors on transmission-competent hosts, thereby reducing infection rates of the vectors (Keesing et al., 2006; Muñoz et al., 2019). Apparent feeding preferences of tested *Ph. perniciosus* for domestic cattle, which is not considered a proven reservoir host of *Leishmania*, support this assumption. Nonetheless, given the recent findings regarding the

detection of *Leishmania* spp. within *Larroussius* sand flies engorged with cattle blood in Tunisia (Remadi et al., 2020) and the molecular identification of *L. infantum* DNA in cattle in some VL foci in China (Gao et al., 2015) and Brazil (Paixão-Marques et al., 2019). An extensive survey into the possible role of these animals in the epidemiology of leishmaniasis should be planned.

## 5. Conclusion

Our study showed the occurrence of three proven or suspected *Larroussius* vectors of *L. infantum* in the endemic focus of canine leishmaniasis in north-eastern Algeria. Despite all tested sand flies being screened by two molecular markers for the presence of *Leishmania* parasites, all were found negative. High abundance of *Ph. perniciosus* suggests a potential risk of *L. infantum* spread within canine and human populations. MALDI-TOF MS mass spectrometry was successfully applied to study feeding preferences of *Ph. perniciosus* and *Ph. perfliewi* and proved more effective than conventional DNA-based sequencing analysis. It demonstrated that at studied localities, domestic cattle is a predominant source of blood for sand fly females, providing a first record of cattle blood in engorged sand flies in the country. These findings highlight the need to further study the potential role of cattle in the epidemiology of leishmaniasis and sand fly ecology in Algeria. The establishment of large-scale monitoring projects on sand fly vectors to cover all areas of CanL dissemination would help mapping the areas with the high-risk of *Leishmania* transmission.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100729>.

## Funding

This study was partially supported by the project H2020-MSCA-RAISE-2017 (Grant agreement n. 778298). Additional support from the European Regional Development Fund (projects BIOCEV CZ.1.05/1.1.00/02.0109) and CePaViP 16\_019/0000759 is gratefully acknowledged. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Ethical statement

The study was carried out in accordance with Algerian legislation guidelines. In addition, sand flies were collected after obtaining a verbal consent from owners of animal shelters where CDC light traps were deposit.

## Declaration of Competing Interest

None.

## References

- Abbasi, I., Cunio, R., Warburg, A., 2009. Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 9, 79–86.
- Abonnenc, E., 1972. Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera, Psychodidae). *Mém. O.R.S.T.O.M.* 55, 1–289.
- Adel, A., Saegerman, C., Speybroeck, N., Praet, N., Victor, B., De Deken, R., Soukhal, A., Berkvens, D., 2010. Canine leishmaniasis in Algeria: true prevalence and diagnostic test characteristics in groups of dogs of different functional type. *Vet. Parasitol.* 172, 204–213.
- Adel, A., Boughoufalah, A., Saegerman, C., De Deken, R., Bouchene, Z., Soukhal, A., Berkvens, D., Boelaert, M., 2014. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Algeria: an update. *PLoS One* 9, e99207.
- Adel, A., Abatih, E., Speybroeck, N., Soukhal, A., Bouguedour, R., Boughalem, K., Bouhbal, A., Djerbal, M., Saegerman, C., Berkvens, D., 2015. Estimation of canine *Leishmania* infection prevalence in six cities of the Algerian littoral zone using a Bayesian approach. *PLoS One* 10, e0117313.
- Ait-Oudhia, K., Lami, P., Lesceu, S., Harrat, Z., Hamrioui, B., Dedet, J.P., Pratlong, F., 2009. Increase in prevalence of canine leishmaniasis in Algiers urban area (Algeria) following 2003 earthquake. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 103, 679–692.

- Alcover, M.M., Ballart, C., Martín-Sánchez, J., Serra, T., Castillejo, S., Portús, M., Gállego, M., 2014. Factors influencing the presence of sand flies in Majorca (Balearic Islands, Spain) with special reference to *Phlebotomus perniciosus*, vector of *Leishmania infantum*. *Parasit. Vectors* 7, 421.
- Allal-Ikhlef, A.B., Senouci, K., Benallal, K., Triki-Yamani, R., Harrat, Z., Houti, L., 2017. Inventaire des phlébotomes dans le foyer leishmanien de Draa El Mizan, Kabylie. *J. Fac. Med. Or.* 1, 37–43.
- Barhoumi, W., Fares, W., Cherni, S., Derbali, M., Dachraoui, K., Chelbi, I., Ramalho-Ortigao, M., Beier, J.C., Zhioua, E., 2016. Changes of sand fly populations and *Leishmania infantum* infection rates in an irrigated village located in arid Central Tunisia. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 329.
- Barón, S.D., Morillas-Márquez, F., Morales-Yuste, M., Díaz-Sáez, V., Irigaray, C., Martín-Sánchez, J., 2011. Risk maps for the presence and absence of *Phlebotomus perniciosus* in an endemic area of leishmaniasis in southern Spain: implications for the control of the disease. *Parasitology* 138, 1234–1244.
- Bates, P.A., Depaquit, J., Galati, E., Kamhawi, S., Maroli, M., McDowell, M.A., Picado, A., Ready, P.D., Salomón, O.D., Shaw, J.J., Traub-Csekö, Y.M., Warburg, A., 2015. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. *Parasit. Vectors* 8, 131.
- Benabid, M., Ghrab, J., Rhim, A., Ben-romdhane, R., Aoun, K., Bouratbine, A., 2017. Temporal dynamics and *Leishmania infantum* infection prevalence of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Phlebotominae) in highly endemic areas of visceral leishmaniasis in Tunisia. *PLoS One* 12, e0184700.
- Benallal, K., Gassen, B., Bouiba, L., Depaquit, J., Harrat, Z., 2013. Entomological investigation following the resurgence of human visceral leishmaniasis in southern Algeria. *Acta Trop.* 128, 518–521.
- Benallal, K.E., Benikhlef, R., Garmi, R., Gassen, B., Dedet, J.P., Harrat, Z., 2017. Presence of *Phlebotomus perniciosus* atypical form in Algeria. *J. Arthropod. Borne Dis.* 11, 139–146.
- Benallal, K.E., Garmi, R., Harrat, Z., Volf, P., Dvorak, V., 2022. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Maghreb region: a systematic review of distribution, morphology, and role in the transmission of the pathogens. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 16, e0009952.
- Bennai, K., Tahir, D., Lafri, I., Bendjaballah-Laliam, A., Bitam, I., Parola, P., 2018. Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA and host blood meal identification in *Phlebotomus* in a hypoendemic focus of human leishmaniasis in northern Algeria. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006513.
- Berchi, S., Rioux, J.A., Belmonte, A., Russo, J., 1986. Un phlébotome nouveau pour l'Algérie. *Phlebotomus (Paraphlebotomus) kazeruni*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 61, 507–508.
- Berdjane-Brouk, Z., Charrel, R.N., Bitam, I., Hamrioui, B., Izri, A., 2011. Record of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascitiitii* Grassi, 1908 and *Phlebotomus (Larrousius) chadlii* Rioux, Juminer & Gibily, 1966 female in Algeria. *Parasite* 18, 337–339.
- Berdjane-Brouk, Z., Charrel, R.N., Hamrioui, B., Izri, A., 2012. First detection of *Leishmania infantum* DNA in *Phlebotomus longicuspis* Nitzulescu, 1930 from visceral leishmaniasis endemic focus in Algeria. *Parasitol. Res.* 111, 419–422.
- Bessad, A., Mouloua, K., Kherrachi, I., Benbetka, S., Benikhlef, R., Mezai, G., Harrat, Z., 2012. *Leishmania infantum* MON-1 isolé d'un chacal doré (*Canis aureus*) en Grande Kabylie (Algérie). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 105, 5–7.
- Bongiorno, G., Habluetzel, A., Khoury, C., Maroli, M., 2003. Host preferences of phlebotomine sandflies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in Central Italy. *Acta Trop.* 88, 109–116.
- Boubidi, S.C., Benallal, K., Boudrissa, A., Bouiba, L., Bouchareb, B., Garmi, R., Bouratbine, A., Ravel, C., Dvorak, V., Votpyka, J., Volf, P., Harrat, Z., 2011. *Phlebotomus sergenti* (parrot, 1917) identified as *Leishmania killicki* host in Ghardaïa, South Algeria. *Microbes Infect.* 13, 691–696.
- Branco, S., Alves-Pires, C., Maia, C., Cortes, S., Cristóvão, J.M.S., Gonçalves, L., Gonçalves, L., Campino, L., Afonso, M.O., 2013. Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, central region, Portugal. *Acta Trop.* 125, 339–348.
- Bravo-Barriga, D., Parreira, R., Maia, C., Afonso, M.O., Blanco-Ciudad, J., Serrano, F.J., Pérez-Martín, J.E., Gómez-Gordo, L., Campino, L., Reina, D., Frontera, E., 2016. Detection of *Leishmania* DNA and blood meal sources in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in western of Spain: update on distribution and risk factors associated. *Acta Trop.* 164, 414–424.
- Chargui, N., Haouas, N., Slama, D., Gormi, M., Jaouadi, K., Essabbah-Aguir, N., Mezhoud, H., Babba, H., 2013. Transmission of visceral leishmaniasis in a previously non-endemic region of Tunisia: detection of *Leishmania* DNA in *Phlebotomus perniciosus*. *J. Vector Ecol.* 38, 1–5.
- De Colmenares, M., Portús, M., Botet, J., Dobaño, C., Gállego, M., Wolff, M., Seguí, G., 1995. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. *J. Med. Entomol.* 32, 229–233.
- Dedet, J.P., Addadi, K., Belazzoug, S., 1984. Les phlébotomes (Diptera, Psychodidae) d'Algérie. *Cah. O.R.S.T.O.M. Sér. Ent. Méd. et Parasitol.* 22, 99–127.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.
- Gálvez, R., Descalzo, M.A., Miró, G., Jiménez, M.I., Martín, O., Dos Santos-Brandao, F., Guerrero, I., Cubero, E., Molina, R., 2010. Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniasis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Trop.* 115, 95–102.
- Gao, C.H., Wang, J.Y., Zhang, S., Yang, Y.T., Wang, Y., 2015. Survey of wild and domestic mammals for infection with *Leishmania infantum* following an outbreak of desert zoonotic visceral leishmaniasis in Jiashi, People's Republic of China. *PLoS One* 10, e0132493.
- Garros, C., Gardes, L., Allene, X., Rakotoarivony, I., Viennet, E., Rossi, S., Balenghien, T., 2011. Adaptation of a species-specific multiplex PCR assay for the identification of blood meal source in Culicoides (Ceratopogonidae: Diptera): applications on Palaearctic biting midge species, vectors of Orbiviruses. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1103–1110.
- Gherbi, R., Bounechada, M., Latrofa, M.S., Annoscia, G., Tarallo, V.D., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2020. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* species in a focus of cutaneous leishmaniasis in Algeria. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008024.
- González, E., Jiménez, M., Hernández, S., Martín-Martín, I., Molina, R., 2017. Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012–2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. *Parasit. Vectors* 10, 368.
- Guernaoui, S., Boumezzough, A., 2009. Habitat preferences of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in southwestern Morocco. *J. Med. Entomol.* 46, 1187–1194.
- Harrat, Z., Belkaid, M., 2003. Les leishmanioses dans l'algérie. *Données épidémiologiques. Bull. Soc. Pathol. Exot.* 96, 212–214.
- Harrat, Z., Pralong, F., Belazzoug, S., Dereure, J., Deniau, M., Rioux, J.A., Belkaid, M., Dedet, J.P., 1996. *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90, 625–629.
- Hlavackova, K., Dvorak, V., Chaskopoulou, A., Volf, P., Halada, P., 2019. A novel MALDI-TOF MS-based method for blood meal identification in insect vectors: a proof of concept study on phlebotomine sand flies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007669.
- Izri, M.A., Belazzoug, S., 1993. *Phlebotomus (Larrousius) perfliewi* naturally infected with dermatotropic *Leishmania infantum* at Tenes, Algeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87, 399.
- Izri, M.A., Belazzoug, S., Boudjebba, Y., Dereure, J., Pralong, S., Delalbre-Belmonte, A., Rioux, J.A., 1990. *Leishmania infantum* MON-1 isolé de *Phlebotomus perniciosus*, En Kabylie (Algérie). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 65, 151–152.
- Jiménez, M., González, E., Iriso, A., Marco, E., Alegret, A., Fúster, F., Molina, R., 2013. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol. Res.* 112, 2453–2459.
- Keesing, F., Holt, R.D., Ostfeld, R.S., 2006. Effects of species diversity on disease risk. *Ecol. Lett.* 9, 485–498.
- Kent, R.J., 2009. Molecular methods for arthropod blood meal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 4–18.
- Lafri, I., Bitam, I., 2021. Phlebotomine sandflies and associated pathogens in Algeria: update and comprehensive overview. *Vet. Ital.* 57, 175–180.
- Maia, C., Parreira, R., Cristóvão, J.M., Freitas, F.B., Afonso, M.O., Campino, L., 2015. Molecular detection of *Leishmania* DNA and identification of blood meals in wild caught phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Portugal. *Parasit. Vectors* 8, 173.
- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N., Gradoni, L., 2012. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med. Vet. Entomol.* 27, 123–147.
- Medkour, H., Laidoudi, Y., Lafri, I., Davoust, B., Mekroud, A., Bitam, I., Mediannikov, O., 2019a. Canine vector-borne protozoa: molecular and serological investigation for *Leishmania spp.*, *Trypanosoma spp.*, *Babesia spp.*, and *Hepatozoon spp.* in dogs from Northern Algeria. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 19, 100353.
- Medkour, H., Laidoudi, Y., Lafri, I., Bitam, I., Mediannikov, O., Davoust, B., 2019b. Canine leishmaniasis and first report of *Leishmania infantum* in the blood of equids in Kabylia (Algeria). *Int. J. Infect. Dis.* 79, 117–118.
- Mhaidi, I., El Kacem, S., Ait Kbaich, M., El Hamouchi, A., Sarih, M., Akarid, K., Lemrani, M., 2018. Molecular identification of *Leishmania* infection in the most relevant sand fly species and in patient skin samples from a cutaneous leishmaniasis focus, in Morocco. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006315.
- Mouloua, A., Boubidi, S.C., Bouiba, L., Mezai, G., Madiou, M., Harrat, Z., 2017. Impact environnemental sur la répartition des leishmanioses dans le foyer de Tizi-Ouzou (Algérie). *Rev. Méd. Vet.* 168, 252–261.
- Muñoz, C., Martínez-de la Puente, J., Figuerola, J., Pérez-Cutillas, P., Navarro, R., Ortuño, M., Bernal, L.J., Ortiz, J., Soriguer, R., Berriatua, E., 2019. Molecular xenomonitoring and host identification of *Leishmania* sand fly vectors in a Mediterranean periurban wildlife park. *Transbound. Emerg. Dis.* 66, 2546–2561.
- Munstermann, L.E., 2019. Phlebotomine sand flies and moth flies (Psychodidae). In: Mullen, G.R., Durden, L.A. (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology*. Elsevier Inc., United States, pp. 191–211.
- Paixão-Marques, M., Alves-Martin, M., Guiraldi, L., Dos Santos, W., De Lemos, F., Sánchez, G.P., Richini-Pereira, V.B., Lucchesi, S.B., 2019. First isolation of *Leishmania infantum* by blood culture in bovines from endemic area for canine visceral leishmaniasis. *Parasitology* 146, 911–913.
- Ready, P.D., 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 227–250.
- Remadi, L., Chargui, N., Jiménez, M., Molina, R., Haouas, N., González, E., Chaabane-Banaouas, R., Ben Salah, E., Haddaji, M., Chaabouni, Y., Babba, H., 2020. Molecular detection and identification of *Leishmania* DNA and blood meal analysis in *Phlebotomus (Larrousius)* species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008077.
- Rioux, J.A., Houin, R., Baudouy, J.P., Croset, H., Tour, S., Maistre, M., 1970. Presence of *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* parrot 1917 in Corsica. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 45, 343–356.
- Risueño, J., Muñoz, C., Pérez-Cutillas, P., Goyena, E., González, M., Ortuño, M., Bernal, L.J., Ortiz, J., Alten, B., Berriatua, E., 2017. Understanding *Phlebotomus perniciosus* abundance in south-east Spain: assessing the role of environmental and anthropic factors. *Parasit. Vectors* 10, 189.
- Rodgers, M.R., Popper, S.J., Wirth, D.F., 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasitol.* 71, 267–275.

- Rossi, E., Bongiorno, G., Ciolli, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, L., 2008. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Trop.* 105, 158–165.
- Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H.D., Presber, W., Jaffe, C.L., 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 47, 349–358.
- Svobodová, M., Alten, B., Zídková, L., Dvůrák, V., Hlaváčková, J., Mysková, J., Seblová, V., Kasap, O.E., Belen, A., Votýpka, J., Volf, P., 2009. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *Int. J. Parasitol.* 39, 251–256.
- Velez, R., Ballart, C., Domenech, E., Abras, A., Fernández-Arévalo, A., Gómez, S.A., Tebar, S., Muñoz, C., Cairó, J., Gállego, M., 2018. Seroprevalence of canine *Leishmania infantum* infection in the Mediterranean region and identification of risk factors: the example of North-Eastern and Pyrenean areas of Spain. *Prev. Vet. Med.* 62, 67–75.