



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physiologie Cellulaire

Projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme

De Master en science de la nature et de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Génétique et physiologie

Thème :

**Etude du rôle des phlébotomes dans la circulation des
Phlebovirus dans la région de Blida ; M'sila et Jijel.**

Réalisé par : M^{lle} Belabiod Dalila

Soutenu le : 18/09/2018

Devant le jury composé de:

Nom	Prénom	Qualité	Lieu	Grade
M ^{me}	Chabane	Présidente	USDB	MAA
M ^{me}	AbduHusein	Examinatrice	USDB	MCB
M ^{me}	Khalidi Aldjia	Promotrice	IPA	Maitre-assistant
M ^f	Benallal Kamel	Co-promoteur	IPA	BEM

Promotion 2017-2018

**Etude du rôle des phlébotomes dans la
circulation des *phlebovirus* dans la région de
Blida ; M'sila et Jijel.**

Résumé

Les phlébotomes sont largement répartis dans le bassin méditerranéen. Par conséquent, les populations humaines dans cette zone sont potentiellement exposées aux maladies transmises par les phlébotomes, y compris celles causées par les *Phlebovirus*.

Alors qu'il existe des données substantielles dans les pays situés dans la partie nord du Bassin méditerranéen, peu de données sont disponibles pour l'Algérie concernant le rôle des phlébotomes dans la transmission des *Phlebovirus*.

Dans cette étude, un total de 28 pools des phlébotomes ont été collectés dans trois régions différentes d'Algérie ; à savoir Blida, M'sila et Jijel, après identification morphologique l'espèce la plus dominante est le *Phlebotomus perniciosus*.

L'analyse moléculaire a révélé qu'un pool contenait l'ARN viral correspondant à un virus du complexe Sandy Fly Naples virus, le punique virus jamais décrit auparavant en Algérie. Plus d'investigations sont nécessaires pour mieux caractériser cette souche virale sur le plan phylogénique.

Mots clés : Phlébotome, Phlebovirus, Sandy Fly Naples virus, Punique virus

Summary

Sandflies are widely distributed in the Mediterranean basin. As a result, human populations in this area are potentially exposed to sandfly-transmitted diseases, including those caused by *Phlebovirus*.

While there is substantial data in the countries located in the northern part of the Mediterranean Basin, few data are available for Algeria on the role of sandfly in Phlebovirus transmission.

In this study, a total of 28 sandfly pools were collected in three different regions of Algeria; namely Blida, M'sila and Jijel, after morphological identification the most dominant species is *Phlebotomus perniciosus*.

Molecular analysis revealed that a pool contained viral RNA corresponding to a virus of the Sandy Fly Naples virus complex, the Punique virus never described before in Algeria. More investigations are needed to better characterize this viral strain phylogenetically.

Keyword: Sandfly, Phlebovirus, Sandy Fly Naples virus, Punique virus

المخلص

يتم توزيع ذبابة الرمل على نطاق واسع في حوض البحر الأبيض المتوسط. ونتيجة لذلك ، فإن البشر في هذه المنطقة معرضون لخطر الإصابة بالأمراض المنقولة عن ذبابة الرمل ، بما في ذلك الأمراض التي تسببها الفليبيوفيروس.

فيحين أن هناك بيانات كبيرة في البلدان الواقعة في الجزء الشمالي من حوض البحر المتوسط ، لا تتوفر سوى بيانات قليلة عن الجرائر حول دور ذباب الرمل في انتقال الفيروس في هذه الدراسة ، تم جمع 28 مجعاً في ثلاث مناطق مختلفة من الجزائر ؛ وهي: البلدية ، المسيلة وجيجل ، بعد التعرف المورفولوجي على الأنواع الأكثر انتشاراً هي فصيلة (الفليبيوتوموس بارنيسوس).

متطابق مع فيروس من مركب فيروس ساندي فلاي نابل ، و الفيروس وكشف التحليل الجزيئي أن تجمعا يحتوي على فيروس البونيك الذي لم يصفه من قبل في الجزائر. هناك حاجة إلى مزيد من التحقيقات لتحسين توصيف هذه السلالة الفيروسيّة.

الكلمات المفتاحية

ذبابة الرمل، الفليبيوفيروس، فيروس ساندي فلاي نابل، فيروس البونيك.

Remerciements

Au terme de ce travail, je souhaite adresser mes sincères remerciements à mes encadreurs: Madame Khaldi Aldjia et Monsieur Benallal Kamel qui ont contribué à sa réalisation et ont permis, par leur soutien et leurs conseils, de le mener à bien.

Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury Madame Chabane et Madame Abdu Husein pour l'intérêt qu'elles ont porté à notre recherche et d'enrichir par leurs propositions.

Mes sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Je désire remercier toutes les personnes du laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire et laboratoire d'Arbovirus et virus émergents qui ont partagé avec moi leurs connaissances, leurs passions et qui ont investi leur temps et leur énergie pour que ce travail abouti.

Un grand remerciement à mes très chers parents, qui ont toujours été là pour moi, a ma sœur Soraya, Nabil et Wassim.

Je tiens également à remercier toutes personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Abréviations

TOSV: TOSCANA Virus.

SFSV: Sandfly Fever Sicilian Virus.

SFNV: Sandfly Fever Napal Virus.

THEV : Virus de Tehran.

MASV : virus de la mouche de Massilia.

SALV: Virus Salehabad.

ARBV: Virus Arbia.

Gn et Gc : Glycoprotéines.

RT –PCR : Réal Time PCR.

TBE: Tris, Borate, EDTA.

CDC: Center for Disease Control.

Phlébo: Phlébotome.

PM: Poids Moléculaire.

UV : ultraviolets.

NC : Négatif contrôle.

PC : Positif contrôle.

Liste des Figures

Figure 1: Structure des Œufs de phlébotome.

Figure 2 : Photo de **(A)** : Larve et **(B)** : Nymphe de phlébotome.

Figure 3 : Morphologie du phlébotome femelle adulte (repas sanguin).

Figure 4: Photo de la tête d'un phlébotome **(A)**: vue générale de la tête sous microscope optique ; **(B)**: agrandissement du pharynx et du cibarium sous microscope optique **(C)**: schéma générale.

Figure 5: vue latérale du thorax sous microscope optique.

Figure 6 : l'Abdomen d'un phlébotome ; **(A)**: l'abdomen sous microscope optique, **(B)**:schématisation de l'abdomen.

Figure 7 : L'extrémité postérieure de l'abdomen femelle sous microscope.

Figure 8 : Structure de l'appareil génital mâle sous microscope optique, Vue latérale.

Figure 9 : Cycle biologique du phlébotome.

Figure 10 : Répartition géographique des phlébotomes dans le monde.

Figure 11 : Les étages bioclimatiques en Algérie.

Figure12: Structure du *Phlebovirus*.

Figure 13 : Répartition géographique des *phlebovirus* dans le monde.

Figure 14 : Les régions d'étude des captures des phlébotomes.

Figure 15 : Capture des phlébotomes par piège huilée dans la région de Meftah.

Figure 16: Piège lumineux, type CDC installé dans un abri des animaux.

Figure 17: Les différentes étapes de broyage des phlébotomes.

Figure 18 : Les étapes de la PCR.

Figure 19 : Vue microscopique du *Phlebotomussergenti*.

Figure 20 : Migration des produits PCR *phlebovirus* sur gel d'agarose.

Figure 21 : Migration des produits PCR phlebovirus sur gel d'agarose.

Liste des tableaux

Tableau I : Clés d'identifications des phlébotomes.

Tableau II: Liste des phlébotomes d'Algérie.

Tableau III: Répartition des phlébotomes en Algérie en fonction des étages bioclimatiques.

Tableau IV: Répartition des phlébotomes capturés par pool.

Tableau V : Tableau récapitulatif des amorces utilisées pour la PCR *Phlebovirus*.

Tableau VI : Les tailles des fragments obtenus après PCR *Phlebovirus*.

Tableau VII : les espèces de phlébotomes capturés par pièges huilés à Meftah

Tableau VIII : Récapitulatif des résultats de la recherche des *Phlebovirus* par PCR et séquençage chez les phlébotomes capturés dans les régions de Blida, M'sila et Jijel.

Table des matières

Résumé

Remerciement

Abréviations

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Introduction

Synthèse bibliographiques

Chapitre I : Les Phlébotomes

I.1. Position systématique des phlébotomes

I.2. Morphologie 1

I.3. Biologie et Comportement des phlébotomes 6

I.4. Cycle de vie 7

I.5. Répartition géographique et écologique dans le monde 8

I.6. les phlébotomes d'Algérie.....9

Chapitre II : Les *Phlebovirus*

II.1. Taxonomie 12

II.2. Structure et Cycle de multiplication de virus 12

II.3. Epidémiologie des *Phlebovirus*..... 15

II.3.1 Réservoir 15

II.3.2 Transmission..... 15

II.3.3 Répartition géographiques 15

II.3.4 Données épidémiologiques 16

II.4.- Pathologie des *Phlebovirus*

II.4.1. Infection a virus Toscana

II.4.2 Infection par le virus de la fièvre de la Vallée du Rift

II.4.3 Fièvres à Phlébotomes

Partie pratique

I. Objectif 18

II. Matériel 18

II.2. Méthode	19
II.1.2. Zone d'étude	19
II.1. 3. Facteurs climatiques	20
II.2.1. Méthode d'échantillonnage des phlébotomes	21
II. 2.2. Identification des phlébotomes	22
II. 2. 3. Traitement des phlébotomes	22
II. 2. 4. Recherche des <i>Phlebovirus</i> par PCR	23
➤ Extraction de l'acide nucléique	24
➤ PCR nichée <i>Phlebovirus</i>	25
➤ PCR Toscana virus.....	26
II.2.5. Séquençage.....	26
III. Résultats et discussions	
III.1. Résultats de l'étude entomologique	28
III.2. Résultats de l'étude virologique	29
IV. Conclusion / perspectives	34
V. Références bibliographiques	35
VI. Annexes	40

Introduction

Reportés pour la première fois en Algérie en 1912 par Foley et Leduc (1912), les phlébotomes ont été largement étudiés en Algérie principalement les vecteurs de leishmanioses. Les phlébotomes sont des insectes hématophages de la famille des Psychodidae, l'ordre des Diptères. Ils vivent dans les zones urbains et suburbaine souvent proche des humains et animaux domestiques (**Laurence et al., 2015**). Ce sont des vecteurs connus de parasites du genre *Leishmania* et de nombreux autres pathogènes tels que *Bartonellabacilliformis* et les virus appartenant à trois genres *Orbivirus* (reoviridae), *Vesiculovirus* (Rhabdoviridae) et en particulier ceux du genre *Phlebovirus* (Bunyaviridae) qui causent des maladies chez les humains caractérisées par des méningites et céphalées suivant l'espèce virale (**Maureau et al., 2010; Es-Sette_fet al., 2013, Depaquit et Léger., 2017 livre entomologie medicale et vétérinaire**).

Jusqu'à aujourd'hui, 24 espèces de phlébotomes appartenant à deux genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia* ont été reportées en Algérie (**Benallal et al., 2013**). Parmi elles, seulement cinq espèces *Phlebotomus papatasi*, *Ph. perniciosus*, *Ph. perfiliewi*, *Ph. longicuspis* and *Ph. sergenti* (**Izri et al., 1990 ; Izri and Belazzoug, 1993 ; Boubidi et al., 2010; Berdjane-Brouk et al. 2012**) sont connues à transmettre le parasite *Leishmania* sp, ces mêmes espèces ont été reportées à transmettre les arbovirus tels que Toscana virus (TOSV), Sicilian virus (SFSV), Salehabad virus et Corfu virus et ils définissent ce qui s'appelle groupe fièvre à phlébotome ou fièvre à papataci ou aussi la fièvre de trois jours (**Izri et al., 2006; Alwasouf, 2015**).

Malgré que ces arbovirus sont classés parmi les plus important pathologies infectieuses émergentes transmis par les phlébotomes (**Gulber, 2001**) le virus du West Nile transmis par les moustiques *Culex* s'est aussi important en Algérie puisque plusieurs cas humains sont signalés depuis 1995 (**Boughermouh et al., 1995**). Beaucoup d'efforts ont été conduits seulement sur la leishmaniose et à notre connaissance peu de données sont disponibles sur les fièvres à phlébotomes. Toutes les précédentes études ont mis la lumière sur la circulation d'arbovirus transmis par les phlébotomes tels que la fièvre à phlébotome Naples (SFNV) et la fièvre à phlébotome Sicile (SFSV) (**Izri et al., 2008; Moureau et al., 2010**). Suite à cela, (**Alkan et al; 2015**) a reporté une nouvelle souche de virus transmise par les phlébotomes dans la région de Tizi-Ouzou. D'autre part, une étude sérologique réalisée sur les humains et les chiens dans la même région a montré la présence d'IgG contre TOSV prouvant une grande circulation de ce virus en Algérie et suggérant le chien pourrait être un réservoir potentiel de ce virus (**Tahir et al., 2015**).

Important à signaler, les virus transmis par les phlébotomes ne sont rencontrés qu'au niveau du Nord d'Algérie puisque (Tesh et al ; 1976) n'a trouvé aucun virus ni à Tamanrasset ni à Djanet deux régions de l'extrême sud Algérien.

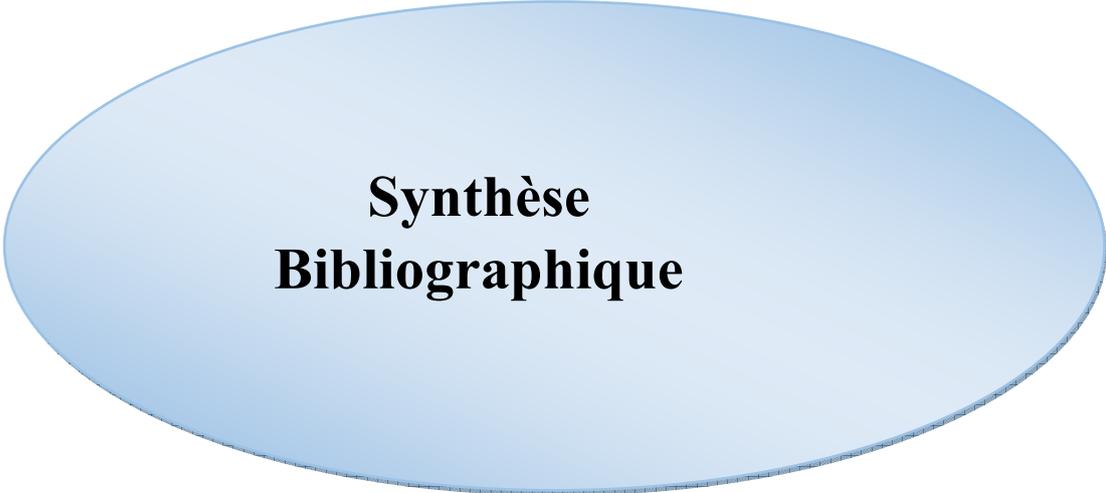
Dans cette optique, une enquête entomologique a été réalisée dans trois wilayas Blida, Jijel et M'sila où il y a la présence de cas de leishmaniose traduisant la forte présence des phlébotomes afin de connaître l'extension du périmètre de circulation de ces virus en Algérie et compléter la base de donnée.

Ce mémoire est organisé :

- Le chapitre I est une synthèse bibliographique consacrée aux phlébotomes ; morphologie ; Biologie et comportement des phlébotomes leur cycle de vie et la répartition géographique dans le monde et en Algérie.
- Le chapitre II *phlebovirus* leur taxonomie ; structure et cycle de multiplication ; épidémiologies et pathologie des *phlebovirus*.
- La partie pratique consacré à la présentation de la zone d'étude, les méthodes d'échantillonnage des phlébotomes ; identification ; traitements des phlébotomes et

La recherche des *phlebovirus* par PCR et séquençage par la suite résultats et discussions

- Enfin une conclusion et perspectives.



**Synthèse
Bibliographique**

Chapitre I : Les phlébotomes

Les phlébotomes appartiennent à :

Embranchement des Arthropodes

Classe des Insectes

Ordre des Diptères

Sous-ordre des Nématocères (antennes filiformes)

Famille des Psychodidae

Sous familles des Phlebotominae

Cette famille est divisée en 6 genres dont trois comportent des espèces hématophages : *Phlebotomus* ; *Lutzomyia* et *Sergentomyia* (Killick-Kendrick, 1999). *Phlebotomus* et *Lutzomyia* sont vectrices de leishmanies et regroupent les espèces qui ont une préférence trophique orientée vers les mammifères. *Sergentomyia* dont les espèces très nombreuses dans l'ancien monde se nourrissent sur les reptiles, les amphibiens et les oiseaux, piquent très rarement l'homme et ne sont jamais vecteurs (Moulinier, 2002).

I.2. Morphologie :

Le développement des phlébotomes comporte une métamorphose complète (holométabole) comprenant les stades : œuf, larve, nymphe et imago (Ba, 1999).

a) **Œuf** : La femelle pond de 50 à 200 œufs de forme ellipsoïde, mesurant 0,3 mm à 0,4 mm de long et 0,09 à 0,15 mm de large, de couleur blanc-jaunâtre au moment de leur émission, pigmentent rapidement en brun au contact de l'air (Ba, 1999).



Figure 1: Structure des Œufs de phlébotome (Ba, 1999).

b) Larves : La larve est de type éruciforme (**Ba, 1999**). Mesurant de 2 à 8 mm de longueur, sont vermiformes, eucéphales. Elles sont dotées de pièces buccales broyeuses sur la capsule céphalique et d'un tégument orné de petits tubercules portant chacun une soie épineuse. Les segments abdominaux (de 1 à 7) sont munis de fausses pattes locomotrices et le segment abdominal 9 est doté de deux paires de soies fortes, très longues et foncées (Fig. 2A). (**Baldet, 2004**)

c) Nymphe : Se caractérise par un céphalothorax distinct de l'abdomen ; elle mesure 3 mm de longueur. (**Baldet, 2004**) (Fig. 2B).

La nymphe est inerte ou peu mobile, fixée par son extrémité postérieure au sol (**Segyu 1951**). Elle ne s'alimente pas durant toute la durée de ce stade qui est de 6 à 15 jours (**Baldet, 2004**).

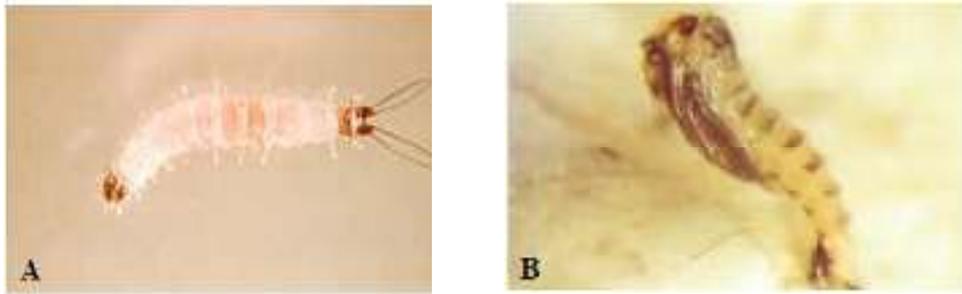


Figure 2 : Photo de (A) : Larve et (B) : Nymphe de phlébotome.

d) l'imago : Les phlébotomes possèdent un corps grêle et allongé, recouvert, ainsi que les ailes, d'une fine pilosité (Fig.3).



Figure 3 : Morphologie du phlébotome femelle adulte (repas sanguin) (**Niang et al, 2000**).

sont dressées, formant entre elles un angle de 45°. Les pattes, qui possèdent un tarse à cinq articles, sont longues et grêles. Elles sont garnies de soies et d'écailles (Dedet, 1999) (Fig. 5)

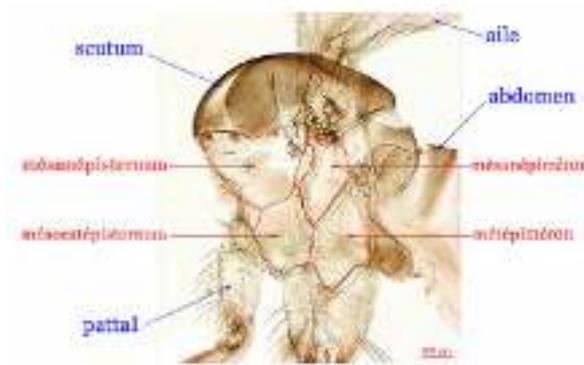


Figure 5: vue latérale du thorax sous microscope optique (Niang et al, 2000).

➤ **L'Abdomen :**

Il comporte dix segments dont sept non modifiés (portant chacun une paire de stigmates) et trois transformés en segments génitaux.

Sternites et tergites sont séparés par des pleures membraneuses susceptibles de se dilater au moment des repas (Dedet, 1999) (Fig. 6).

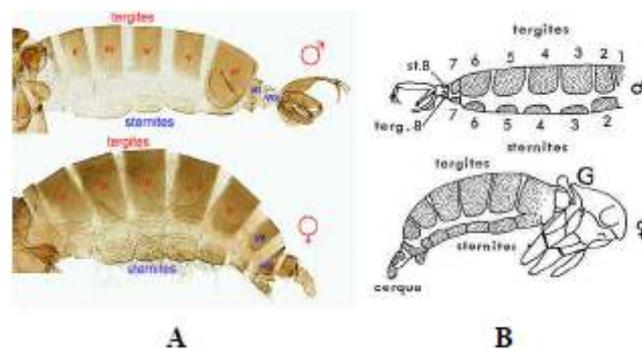


Figure 6 : l'Abdomen d'un phlébotome (A) l'abdomen sous microscope optique (Niang et al, 2000); (B) schématisation de l'abdomen (Dedet, 1999).

a) Femelle : Le huitième segment est rétracté sous le septième, lui-même plus petit que les précédents, ne laissant dépasser sur la face ventrale que le sternite bilobé : valves hypogyniales ou gonapophyses ventrales (Fig.7).

Le dixième segment porte l'anus et de part et d'autre les cerques, ou gonapophyses dorsales, bien développés.

L'appareil génital interne comporte:

- Deux ovaires constitués d'ovarioles, chaque ovaire se termine par un court oviducte, les deux oviductes se réunissant pour former un oviducte commun qui se jette dans le vagin.
- Deux spermathèques, formant une capsules chitineuses de morphologie variable prolongées par des conduits individuels plus ou moins longs, et parfois d'un conduit commun, qui eux aussi s'ouvrent sur le vagin (**Dedet, 1999**).

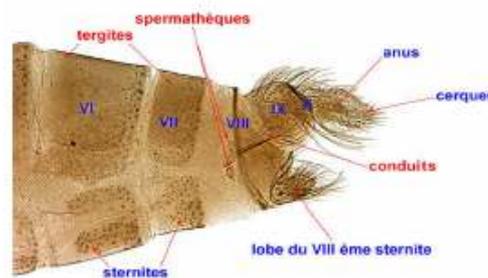


Figure 7 : L'extrémité postérieure de l'abdomen femelle sous microscope Optique (**Niang et al, 2000**).

b) Mâle : Chez le mâle, les septième et huitième segments sont réduits et les neuvième et dixième sont totalement modifiés pour former l'appareil copulateur ou genitalia (**Dedet, 1999**). La morphologie et l'ornementation de l'armature génitale externe du mâle sont très utilisées par les systématiciens.

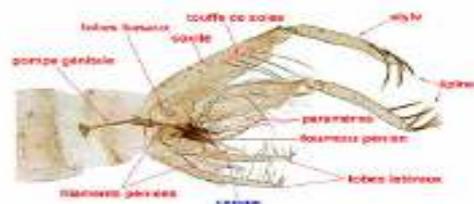


Figure 8 : Structure de l'appareil génital mâle sous microscope optique, Vue latérale (**Niang et al, 2000**).

I.3. Biologie et comportements des phlébotomes :

La durée de vie adulte est fonction de la température et de l'humidité. En effet plus les températures sont basses, plus la durée de vie est élevée. De même pour l'hygrométrie, plus celle-ci est élevée, plus la durée de vie est élevée. En moyenne les femelles vivent de deux semaines à deux mois. Les mâles ont une durée de vie plus brève. Le nombre annuel de générations dépend de la durée de la saison chaude ; plus celle-ci est longue, plus le cycle de développement est court plus le nombre de génération est important.

Certaines espèces sont attirées par la lumière, le plus souvent de faible intensité. D'autres ne manifestent que peu ou pas de phototropisme : c'est le cas notamment des *Sergentomyia*.

Certaines espèces sont nettement endophiles. D'autres préfèrent l'extérieur. Durant la journée les phlébotomes se cachent dans des endroits retirés, sombres et relativement humides.

Les espèces qui piquent l'homme sont généralement également zoophiles, ce qui explique le rôle des phlébotomes dans la transmission de ces zoonoses que sont les Leishmanioses **(Dedet, 1999)**.

Le repas sanguin est indispensable à la maturation des œufs qui se développent au fur et à mesure de la digestion. La copulation a lieu peu de temps après l'éclosion des adultes ou, pour certaines espèces, après le premier repas sanguin. Mais d'autres copulations peuvent intervenir au cours de la vie des femelles. La copulation dure une quinzaine de minutes et se produit le matin ou le soir. La maturation des œufs s'effectue en même temps que la digestion du sang et le nombre maximum est de 100 à 110. La ponte intervient 5 à 10 jours après le repas sanguin. foncé en 5-6 heures (Izri et al., 2006).

A 26-30°C, l'incubation de l'œuf; La durée du développement embryonnaire dans des conditions d'humidité appropriées dépend de la température. A la ponte les œufs sont de couleur blanchâtre ou jaune clair qui vire au brun. La larve se nourrit de débris végétaux, subit 4 mues avant de donner une nymphe d'où émerge le phlébotome adulte. Pendant la saison estivale, les émergences d'insectes adultes ont lieu massivement et la densité des populations de phlébotomes atteint son maximum. En saison froide, les phlébotomes hibernent à l'état d'œuf ou de larve. La larve de premier stade qui sort de l'œuf mesure environ 1mm. Au quatrième stade, elle atteint 3 à 4 mm. Le stimulus qui provoque l'oviposition est le contact avec une surface humide (Izri et al., 2006). Depuis l'œuf jusqu'au stade imaginal, le développement dure 20 à 90 jours en fonction des conditions climatiques. Pendant la saison estivale, les émergences d'insectes adultes ont lieu massivement et la densité des populations de phlébotomes atteint son maximum. En saison froide, les phlébotomes hibernent à l'état

d'œuf ou de larve. Leur cycle de développement comprend quatre formes larvaires et une forme nymphale avec une métamorphose. Le développement est influencé par la température et durant les saisons hivernales, les formes larvaires peuvent être en phase de diapause (Dolmatova et Demina, 1971).

I.4. Cycle de vie :

Dans les zones modérément chaudes, il existe chez le phlébotome, une phase de repos appelé diapause, lorsque les conditions climatiques et écologiques deviennent défavorable et qui coïncide à la période hivernale (Fig. 9).

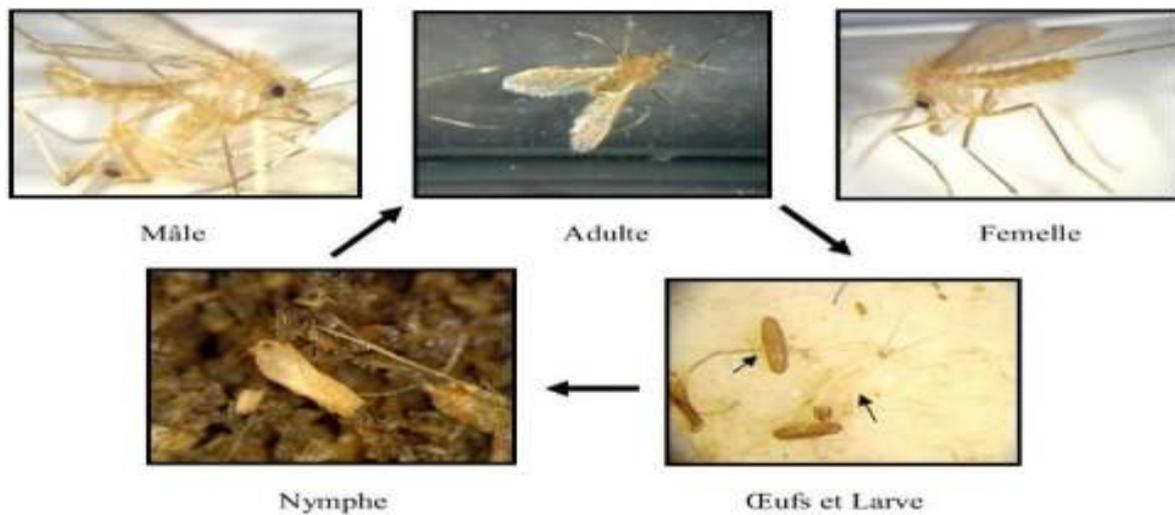


Figure 9 : Cycle biologique du phlébotome (Niang et al, 2000).

Tableau I : Clés d'identifications des phlébotomes.(Jérom ;1999).

Male	Femelle
<ul style="list-style-type: none"> - Style portant 3ou4 épines - Coxite portant un lobe bazal garnie de soies Paramère simples. - Coxite portant un lobe bazal garni de soies - Petit lobe bazal. - Paramère avec processus accessoire - Paramère complexe. - Paramère portant un crochet accessoire. - Pénis porteur d'une proéminence subapicale. 	<ul style="list-style-type: none"> - Spermathèque annelées. Spermathèque non annelées. - Tête de la spermathèque portée par un long cou. - Spermathèque asymétrique. - Spermathèque lisse - Spermathèque plissé - Spermathèque longue et étroite.

I.5. Répartition géographique et écologique dans le monde :

Les phlébotomes sont largement répandus dans le monde partout où règne une température assez élevée pour leur permettre d'entrer en activité, au moins pendant une partie de l'année.

Dans l'ancien monde (Asie Centrale, Afrique du Nord, de l'Ouest et de l'Est, Proche et Moyen Orient), on les trouve entre le 45° degré de latitude nord et le 40° degré de latitude sud. A l'intérieur de ces limites, l'abondance des espèces et des populations varie avec l'altitude. Leurs terres d'élection sont les zones tropicales et subtropicales (**Dedet, 1999**).

Les diverses espèces ont des aires de répartition plus ou moins étendues et chaque région a sa faune constituée d'un nombre plus ou moins grand d'espèces (**Dedet et al, 1984**).

A la répartition géographique des espèces vient se superposer une répartition écologique, chaque type de paysage ayant ses phlébotomes. C'est ainsi qu'il y a des phlébotomes du désert (souvent inféodés aux terriers des rongeurs), des phlébotomes de savane, des phlébotomes de forêt.

Et à l'intérieur de cette stratification écologique, il existe souvent une stratification micro écologique.

Dans la forêt amazonienne, les espèces de la canopée ne sont pas les même que celles que l'on trouve près du sol ; certains phlébotomes sont purement cavernicoles, etc. (Dedet, 1999).

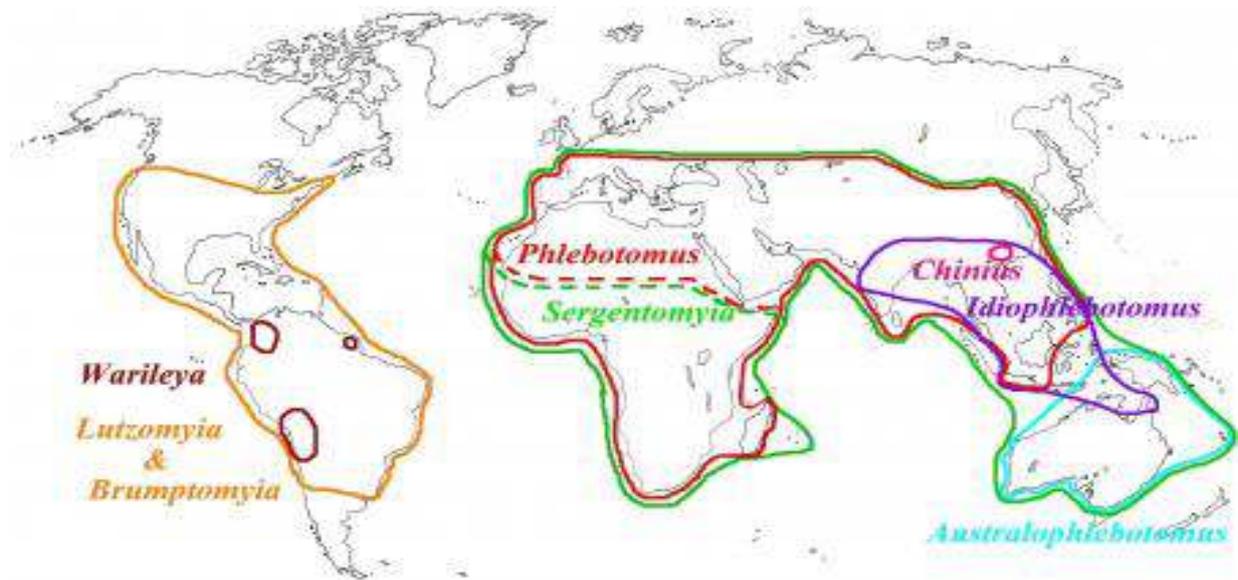


Figure 10 : Répartition géographique des phlébotomes dans le monde.

I.6. Les phlébotomes d'Algérie :

Signalés pour la première fois en Algérie en **1912 (Foley et Leduc)**. 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 découvertes capitales concernant tant leur systématique que leur pouvoir pathogène y ont été réalisées (Dedet et al, 1984).

En Algérie, la leishmaniose constitue un problème de santé public. **Bellazoug (1991)** in **Boudrissa et al (2006)** a donné la classification des 24 espèces décrites en Algérie (Tableau I), 5 espèces potentiellement vectrices existent : *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomussergenti*, *Phlebotomus perfiliewi*, *Phlebotomus longicuspis*, *Phlebotomus papatasi* (tableau III) (**Bitam, 2005**).

Tableau II : Liste des Phlébotomes d'Algérie (D'après Bounamous, 2010).
Bellazoug (1991) in Boudrissa et al (2006)

Sous-famille des <i>Phlebotominae</i>	
Genre <i>Phlebotomus</i>	Genre <i>Sergentomyia</i>
<i>Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi</i> (Scopoli , 1786)	<i>Sergentomyia (Sergentomyia) minuta</i> (Alder et Theodor, 1927)
<i>Phlebotomus (Phlebotomus) bergeroti</i> (Parrot, 1934)(*)	<i>Sergentomyia (Sergentomyia) fallax</i> (Parrot, 1921)
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) alexandri</i> (Sinton, 1928)	<i>Sergentomyia (Sergentomyia) antennata</i> (Newstead, 1912)
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) chabaudi</i> (Croset, Abonnenc et Rioux, 1970)	<i>Sergentomyia (Sergentomyia) schwetzi</i> (Alder, Theodor et Parrot, 1929) (*)
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) kazeruni</i> (Theodor et Mesghali, 1964) (**)	<i>Sergentomyia (Parrotomyia) africana</i> (Newstead, 1912)
<i>Phlebotomus (Larroussius) ariasi</i> (Tonnoir, 1921)	<i>Sergentomyia (Parrotomyia) eremitis</i> (Parrot et De Jolinière, 1945) (*)
<i>Phlebotomus (Larroussius) chadlii</i> (Rioux, Juminer et Gibily ,1966)	<i>Sergentomyia (Grassomyia) dreyfussi</i> (Parrot, 1933)
<i>Phlebotomus (Larroussius) perniciosus</i> (Newstead, 1911)	<i>Sergentomyia (Sintonius) clydei</i> (Sinton, 1928)
<i>Phlebotomus (Larroussius) longicuspis</i> (Nitzulescu, 1911)	<i>Sergentomyia (Sintonius) christophersi</i> (Sinton, 1927)
<i>Phlebotomus (Larroussius) langeroni</i> (Nitzulescu, 1930)	
<i>Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi</i> (Parrot , 1930)	

(*) Espèces exclusivement localisées au Sahara Central.

(**)Spécimen rapporté de Mila (Nord-Est algérien) par **Berchietal., (1986)** et à l'extrême sud (**Benallal et al, 2013**).

En Algérie, les phlébotomes sont répartis sur tout le territoire national, de l'étage humide jusqu'à l'étage saharien (**Dedetetal., 1984 ; Bellazoug, 1991 ; Berchi, 1990 ; Izri, et al, 1994**) tableau (III)

Tableau III: Répartition des phlébotomes en Algérie en fonction des étages bioclimatiques (D'après Dedet et al., 1984 ; Bellazoug, 1991).

Etage Humide	Etage sub-humide	Etage semi-aride	Etage aride	Etage Saharien
<i>Sergentomyia minuta</i> (*)	<i>Sergentomyia minuta</i> (*)	<i>Sergentomyia minuta</i>	<i>Sergentomyia minuta</i>	<i>Sergentomyia minuta</i>
<i>Phlebotomus perniciosus</i>	<i>Phlebotomus Perniciosus</i>	<i>Segentomyia fallax</i>	<i>Segentomyia fallax</i> (*)	<i>Segentomyia Fallax</i>
<i>Phlebotomus ariasi</i>	<i>Phlebotomus Longeroni</i>	<i>Phlebotomus chabaudi</i>	<i>Sergentomyia antennata</i>	<i>Sergentomyia Christophersi</i>
<i>Phlebotomus perfiliewi</i>	<i>Phlebotomus Perfiliewi</i>	<i>Phlebotomus perniciosus</i> (*)	<i>Sergentomyia dreyfussi</i>	<i>Sergentomyia Dreyfussi</i>
<i>Phlebotomus sergenti</i>	<i>Phlebotomus Sergenti</i>	<i>Phlebotomus longeroni</i>	<i>Paraphlebotomus alexandri</i>	<i>Phlebotomus Perfiliewi</i>
<i>Phlebotomus chadlii</i>	<i>Phlebotomus Chadlii</i>	<i>Phlebotomus perfiliewi</i>	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	<i>Phlebotomus Sergenti</i>
<i>Phlebotomus longicuspis</i>	<i>Phlebotomus Longicuspis</i>	<i>Phlebotomus sergenti</i>	<i>Phlebotomus longeroni</i>	<i>Phlebotomus Chadlii</i>
<i>Phlebotomus papatasi</i>	<i>Phlebotomus Papatasi</i>	<i>Phlebotomus chadlii</i>	<i>Phlebotomus perfiliewi</i>	<i>Phlebotomus Longicuspis</i>
		<i>Phlebotomus longicuspis</i>	<i>Phlebotomus sergenti</i>	<i>Phlebotomus Papatasi</i>
		<i>Phlebotomus papatasi</i>	<i>Phlebotomus chadlii</i>	
			<i>Phlebotomus longicuspis</i>	
			<i>Phlebotomus papatasi</i>	

(*) Espèce prédominante.

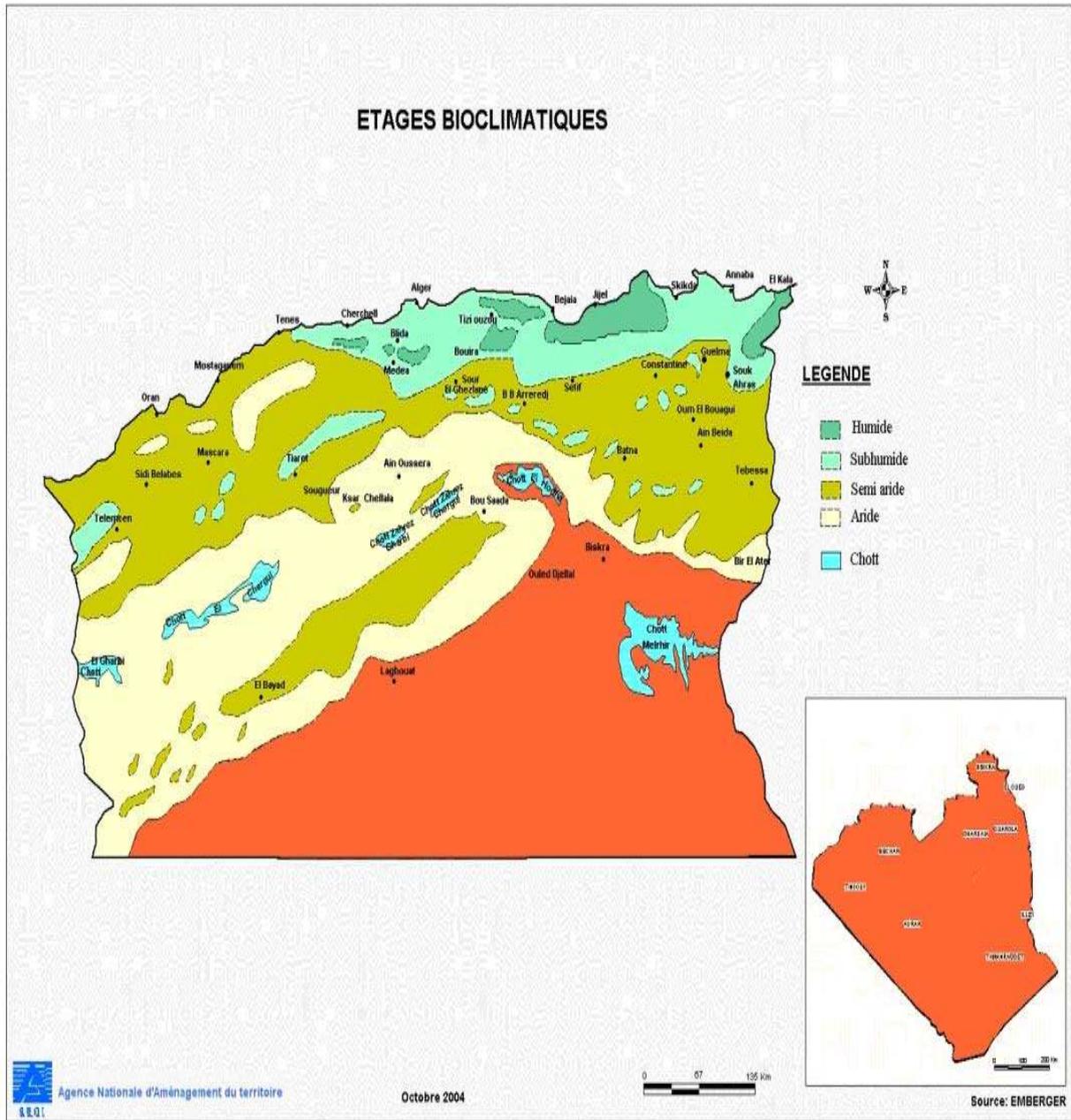
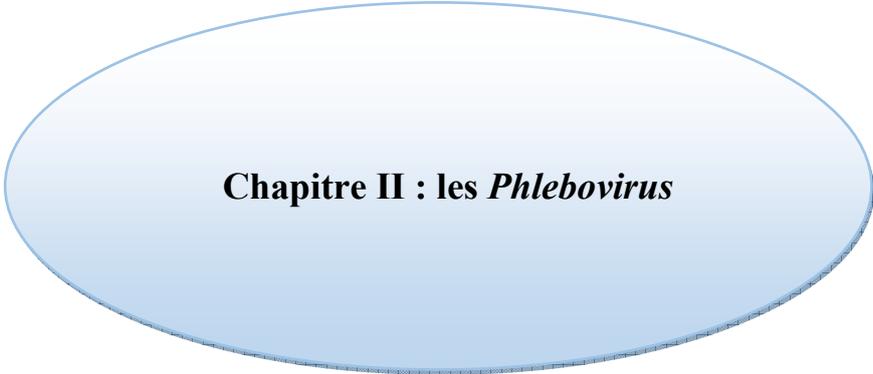


Figure 11 : Les étages bioclimatiques en Algérie.
<http://journals.openedition.org/vertigo/docammexe/img/5375/img.2.jpg>.



Chapitre II : les *Phlebovirus*

II.1. Taxonomie :

Les phlebovirus ont de petits génomes d'ARN tripartites qui codent un répertoire de 5-7 protéines. Ces quelques protéines accomplissent la tâche décourageante de reconnaître et de conditionner spécifiquement un complément tri-segment d'ARN génomique viral au milieu d'une abondance de composants hôtes.

La famille des Bunyaviridae comprend cinq genres, parmi lesquels l'Orthobunyavirus, le Phlebovirus, le Nairovirus, le Tospovirus et l'Hantavirus contiennent tous des espèces pathogènes pour les humains et les animaux.

Selon le huitième rapport du Comité international de taxonomie des virus, le genre Phlebovirus peut être subdivisé en neuf complexes antigéniques et comprend 37 virus classifiés, avec 16 sérotypes supplémentaires considérés comme des membres provisoires du genre. **(Palacios G, 2014)**

II.2. Structure :

Morphologiquement les virus appartenant au genre *Phlebovirus* se présentent sous forme de particules sphériques ou pléiomorphiques avec des projections d'une surface de 10 à 15 nm correspondant aux glycoprotéines. **(Chareel, 2014).**

Ce sont des virus enveloppés de 80 à 120 nm de diamètre, d'un génome d'ARN monocaténaire de sens négatif, composé de trois segments de différente taille. Le segment large (L) code l'ARN polymérase dépendante de l'ARN, le segment moyen (M) code les glycoprotéines de l'enveloppe virale GN et GC et le segment petit (S) code la protéine nucléocapside virale (N) et une protéine non structurale (Ns) **(Liu et al., 2003; Xu et al., 2007)**

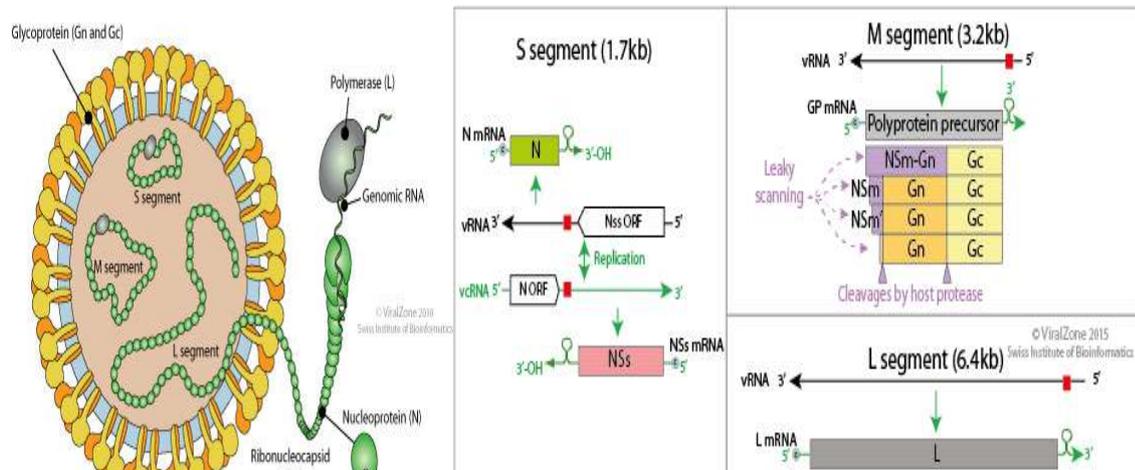


Figure 12: Structure du *Phlebovirus*.

II.3. Épidémiologie des infections à *Phlebovirus* :

II.3.1. Réservoir :

Aucun hôte réservoir n'a été défini avec certitude pour les *Phlebovirus*. Concernant l'infection à TOSV, il est peu probable que les humains jouent ce rôle en raison de la virémie transitoire survenant chez les patients infectés. (**Arthropod-borne Depaquit,2010**).

II.3.2. Transmission :

Les connaissances actuelles suggèrent que de nombreux *Phlebovirus* sont maintenus dans leurs vecteurs arthropodes par transmission verticale (transovarienne) et que les hôtes vertébrés jouent peu ou pas de rôle dans le cycle de maintenance de base de ces agents.

Ce mécanisme de maintenance a des implications écologiques importantes pour les *Phlebovirus*, car il leur permet de persister pendant les périodes où les vecteurs adultes sont absents ou lorsque les hôtes vertébrés sensibles ne sont pas disponibles.

La transmission chez l'homme résulte d'un contact direct suite à une piqûre d'un phlébotome.

(**S. Alwassouf,2014**)

II.3.3. Répartition géographique :

Les *Phlebovirus* occupent une vaste zone géographique du bassin méditerranéen à l'Afrique du Nord et le Moyen-Orient à l'Asie centrale, Dans plusieurs pays européens du bassin méditerranéen, y compris l'Italie, la France, l'Espagne, le Portugal et Chypre.

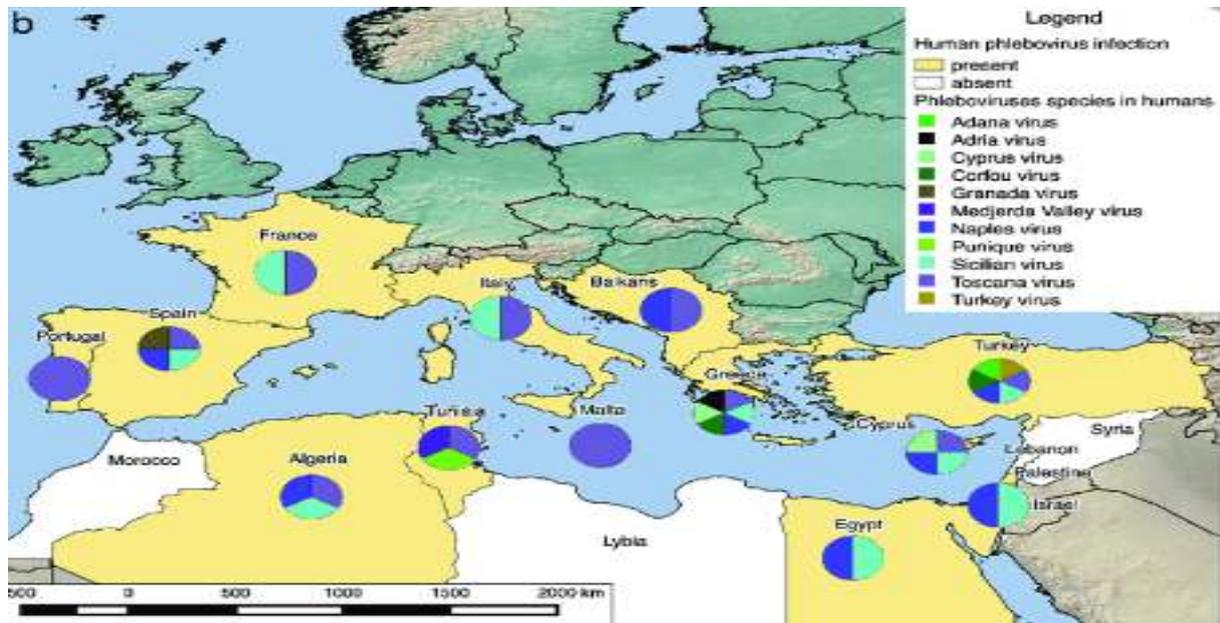


Figure 13 : Répartition géographique des *Phlebovirus* dans le monde (Alkan ;2013).

II.3.4. Données épidémiologiques :

Les *Phlebovirus* sont couramment détectés dans la région méditerranéenne. Les études actuelles ont révélé une séroprévalence élevée parmi les populations apparemment saines dans les îles ioniennes, atteignant 51,7% à Corfou et 39% à Céphalonie, respectivement.

La séroprévalence observée dans sept des quinze préfectures du nord de la Grèce pour la présence des IgG contre le TOSV est parmi les plus élevées de toute la Méditerranée, avec une prévalence respective de 26,2% en Espagne, de 20% à Chypre 17,8%,et en Ombrie, l'Italie était de 16%. (Charrel RN Dis 2005).(Papa A, Andriotis2010)

Récemment, une circulation de TOSV a été signalée en Afrique du Nord (Maroc, Tunisie). En Kabylie, en Algérie, une souche de TOSV a été isolée des phlébotomes. (S. Alwassouf ,2014)

Chez les animaux ; en Algérie deux études de séroprévalence basées sur la neutralisation du TOSV chez des chiens ont montré des résultats comparables à ceux de la Tunisie et des résultats plus élevés qu'en Turquie. À Kairouan, en Tunisie, 5,6% (11/147) des chiens ont été infectés dans une zone où les phlébotomes sont présents à haute densité et où la leishmaniose est endémique.(S. Alwassouf ,2014).

II.4. Pathologies des *Phlebovirus*

II.4.1. Infection a virus Toscana :

Le virus de Toscana présente un fort neurotropisme, il affecte le système nerveux central, c'est une cause majeure de méningite et d'encéphalite. Il est parmi les trois virus les plus répandus des atteintes neurologiques d'origine virale. (**Arthropod-borne Depaquit 2010**).

II.4.2. Infection par le virus de la fièvre de la vallée du Rift :

Chez l'homme, cette maladie est généralement asymptomatique, ou se traduit par un syndrome pseudo grippale sans gravité, cependant dans 1à3% des cas des formes plus sévères (Hépatite, fièvre hémorragique, encéphalite) peuvent conduire à des séquelles importantes chez les personnes atteintes et peuvent même être fatales. (**Alrajhi et al., 2004**).

II.4.3 La fièvre à phlébotome : « Fièvre des trois jours »

C'est une maladie aiguë, généralement bénigne qui dure quelques jours puis guérit spontanément sans séquelles. (**MolecularEpidemiology of phlebovirus· R.N. Charrel 2004**).



Partie pratique

Terrain de stage : La partie pratique de notre travail a été effectuée au niveau de l'institut Pasteur d'Algérie pendant 03 mois.

- Laboratoire d'Eco-Epidémiologie parasitaire : identification des phlébotomes.
- Laboratoire des Arbovirus et des virus émergents : recherche des virus dans les phlébotomes.
- La capture des phlébotomes à lieu dans les Wilaya de Blida ; M'sila et Jijel. Avec un nombre total de 460 de phlébotomes capturées.

I. Objectif

L'objectif de notre étude est de détecter la présence des *Phlebovirus* dans les phlébotomes capturés dans la région de Blida, Msila et Jijel.

II. Matériel

La liste des matériels utilisés pour cette étude est présente dans la partie annexe.

II.1. Méthodes

II.1.2. Zone d'étude

Plusieurs wilayas ont fait l'objet de notre étude, deux qui se trouvent au nord à savoir la **Djebabra** (36.581084°N, E003.263391°) une localité de la commune de Meftah wilaya de **Blida**, la commune **d'OuledMadi** (N 35.61281°, E004.49739°) wilaya de **M'Sila** et la commune de **Chakfa** (36.742210°N, E005.950590°) wilaya de **Jijel**.

Ces régions sont connues à abriter des cas de leishmaniose cutanée et viscérale, donc il y a une grande présence de phlébotomes dans ces régions. D'autre part, la différence du climat entre les régions est un facteur qui a favorisé ce choix pour voir un peu la diversité des virus transmis par les phlébotomes dans des étages bioclimatique différents, puisque les deux wilayas Blida et Jijel sont situées dans l'étage bioclimatique humide et M'sila dans l'étage bioclimatique semi-aride.

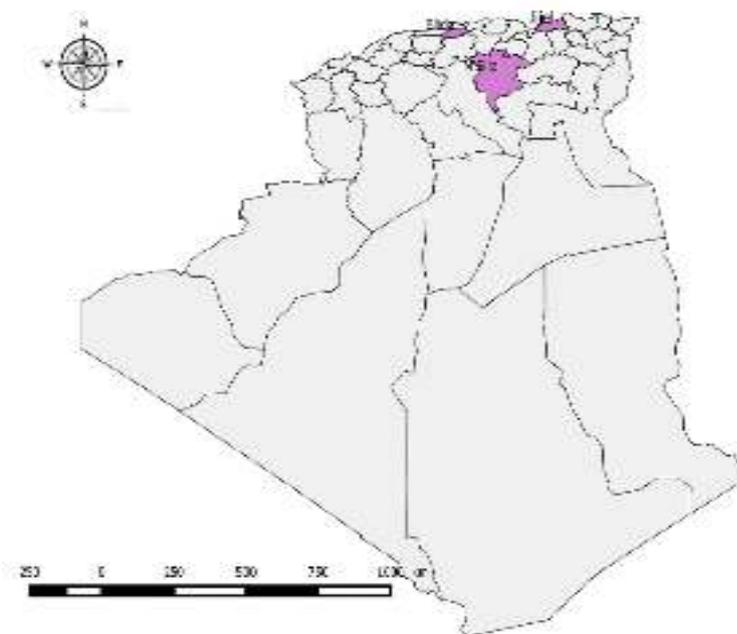


Figure 14 : Les régions d'étude des captures des phlébotomes.

II.1. 3. Facteurs climatiques

À M'Sila, l'été est court, caniculaire et sec ; l'hiver est long et frisquet ; et le climat est dégagé dans l'ensemble tout au long de l'année. Au cours de l'année, la température varie généralement de 3°C à 38 °C

Un climat tempéré chaud est présent à Jijel, Les précipitations sont plus importantes en hiver qu'en été. Sur l'année, la température moyenne à Jijel est de 18.2 °C. Sur l'année, la précipitation moyenne est de 814 mm.

Le climat y est chaud et tempéré, L'hiver à Meftah se caractérise par des précipitations bien plus importantes qu'en été. La température moyenne annuelle à Meftah est de 17.7 °C. Sur l'année, la précipitation moyenne est de 635 mm.

II.2.1. Echantillonnage des phlébotomes :

La capture des phlébotomes a lieu durant la période allant fin de Juin jusqu'à début Aout.

Cette période chaude où la densité des phlébotomes est importante.

L'estimation de la densité, l'identification de la faune présente dans les sites d'échantillonnage et la recherche de parasites et de virus nécessitent un échantillonnage des phlébotomes qui se fait par différentes méthodes suivant le résultat attendu.

➤ **Capture des phlébotomes par piège huilée :**

Ce mode de capture, basé sur les propriétés engluantes de l'huile de ricin, a été utilisé en U.R.S.S. par Valson (1932), Petrishcheva (1935), Latyshev et Kryukova (1941) et au Soudan. Les pièges sont des feuilles de papiers sulfurisés de 20*20 cm, bien imprégnés sur les deux faces par l'huile de ricin. Ces pièges sont déposés au niveau des écuries, les barbacanes, l'entrée des terriers de rongeurs, anfractuosités d'arbres toutes places susceptibles d'abriter des phlébotomes et le lieu de capture est bien géo-localisé. Dans notre étude, ces pièges ont servi comme sentinelle de début d'activité des phlébotomes afin de passer aux pièges lumineux CDC.



Figure 15 : Capture des phlébotomes par piège huilée.

Après au moins trois jours, les pièges sont récupérés et mis dans un sac en plastique bien identifiés. Les phlébotomes capturés sont prélevés délicatement avec un pinceau puis conservés dans l'alcool à 70° dans des petits flacons contenant un morceau de papier sur lequel sont précisés au crayon noir : le numéro du piège, la localité, et la date du piégeage.

➤ **Capture nocturne aux pièges lumineux de type CDC**

- D'un moteur assurant 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 A. Le tout est alimenté par quatre piles rondes de 1,5 Volt qui sont suffisantes pour assurer un fonctionnement efficace pendant la totalité de la nuit et prévenir ainsi la fuite des phlébotomes capturés en maintenant la ventilation (Fig16).

L'ensemble moteur-ventilateur-lampe se trouve à l'intérieur d'un cylindre transparent en matière plastique. La partie supérieure du cylindre est recouverte d'un grillage métallique empêchant la pénétration des insectes de grande taille. La partie inférieure est creusée d'une gorge destinée à l'ajustement de la cage de recueil.

- 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.

Un couvercle métallique très aplati couvre le tout et protège l'appareil de la pluie.



Figure 16: Piège lumineux, type CDC installé dans un abri des animaux

- Les pièges CDC sont installés avant le coucher de soleil, durant une nuitée, au crépuscule, dans les abris des animaux (vaches et moutons) jusqu'à le matin tôt.
- Le lendemain, la cage est détachée et soigneusement fermée, alors que le moteur fonctionne toujours, en prenant soin d'éviter la fuite des insectes piégés.

II.2.2. Identification des Phlébotomes :

Après la récupération des pièges huilés et le tri des phlébotomes du reste des insectes, ces derniers sont mis à éclaircir pendant deux heures dans la solution de potasse à 10%. Ensuite ils subissent deux rinçages à l'eau distillée pendant 1 heure. Les bains sont changés toutes les 30 minutes. Une incubation d'une heure minimale ou toute la nuit est nécessaire dans la solution de Marc André avant de procéder à l'identification morphologique.

Chaque phlébotome est monté entre lame et lamelle avec une goutte de la solution de Marc André et identifié suivant les clés d'identification d'Abonnenc (1972) et de Dedet (1984).

II.2.3. Traitement des Phlébotomes :

Après identification, les phlébotomes capturés ont été poolés dans des tubes de 1,5ml, avec une moyenne de 20 phlébotomes par tube, et par la suite broyés à l'aide d'un broyeur automatique « Retsch MM400 ».

Tableau IV: Répartition des phlébotomes capturés par pool.

Région	Identifiant du Tube	Nombre de phlébotomes
Blida	Ph01 Blida	20
	Ph02 Blida	20
	Ph03 Blida	20
	Ph04 Blida	20
	Ph05 Blida	20
	Ph06 Blida	02
	Ph07 Blida	07
M'sila	Ph08 M'sila	30
	Ph09 M'sila	38
	Ph10 M'sila	25
Jijel	Ph11 Jijel à Ph23 Jijel	20

Ph : Numéro attribué au phlébotome.

➤ **Broyage des phlébotomes :**

- Identifier un tube 1.5ml pour chaque échantillon et mettre de dans une bille stérile.
- Ajouter 600µl du milieu de broyage.
- Broyer les phlébotomes à une fréquence de 30cycles/ sec pendant 3min dans le broyeur automatique.
- Centrifuger les tubes à 7000 rpm pendant 10min.
- Récupérer le surnageant et l'aliquoter en 3 tubes.
- Conserver les aliquots à – 80°C.



Figure 17 : Les différentes étapes de broyage des phlébotomes.

II.2.4. Recherche des *Phlebovirus* par PCR :

La PCR ou réaction d'amplification en Chain polymérase in vitro, permet d'amplifier spécifiquement un fragment d'ADN de quelques centaines de paires de bases.

(Voir tableau V). Cette réaction enzymatique se déroule en plusieurs cycles successifs pour donner à la fin un grand nombre de copies d'ADN identiques à notre fragment d'intérêt, afin de pouvoir le caractérisé. Pendant les cycles thermique, la polymérase utilise des nucléotides libres disponibles dans le milieu réactionnel pour copier la séquence cible.(Mullis KB; 1987)

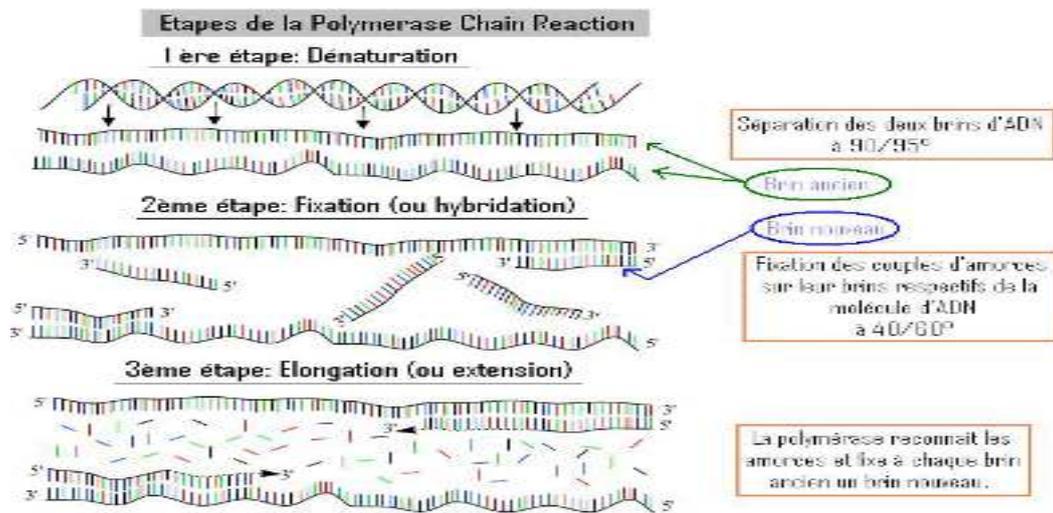


Figure 18 : les étapes de la PCR.

➤ **Extraction de l'acide nucléique :**

Extraction d'ARN par le Kit QIAamp viral RNA (QIAGEN).

- Identifier un tube 1.5ml pour chaque échantillon
- Mettre 560 µl le tampon de lyse (contenant 5.6µl d'ARNc) dans chaque tube.
- Rajouter 140µl d'échantillon à tester (surnageant de broyage).
- Vortexer et incuber les tubes pendant 10 min à température ambiante.
- Rajouter 560µl d'éthanol absolu dans chaque tube, puis Vortexer.
- Déposer 630µl du mélange dans chaque colonne.
- Centrifuger à 8000rpm pendant 1 min.
- Transférer les colonnes dans des nouveaux tubes collecteurs, déposer à nouveau le reste du mélange dans la colonne.
- Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 min.
- Transférer les colonnes dans des nouveaux tubes collecteurs, déposer 500µl de tampon de lavage « AW1 ».
- Centrifuger à 8000rpm pendant 1 min, Transférer les colonnes dans des nouveaux tubes collecteurs.
- Déposer 500µl de tampon de lavage« AW2», Centrifuger à 14000 rpm pendant 3 min.
- Transférer les colonnes dans des nouveaux tubes collecteurs, Centrifuger à 8000 tpm pendant 1 min.
- Transférer les colonnes dans des tubes à 1.5ml.
- Mettre 60µl de tampon d'éluion AVE, Incuber 1 min à une température ambiante.
- Centrifuger 1min à 8000 pm, Conserver l'extrait -80°C.

➤ **PCR nichée *Phlebovirus*:**

	Les amorces utilisées	
	Amorce sens	Amorce anti sens
PCR consensus	NPhlebo1+: 2047ATGGARGGITTGTIWSICHCC2069.	NPhlebo1-: 2600AARTTRCTIGWIGCYTTIARIGTIGC2575.
PCR nichée Phlébo 2+/2-	NPhlebo2+: 2074WTICCIAAICCIYMSAARATG2094.	NPhlebo2-: 2318TCYTCYTTRTTYTTTRARRTARCC2296.
PCR nichée Phlébo2+/Atos 2-	NPhlebo2+: 2074WTICCIAAICCIYMSAARATG2094.	ATos2-: 2209RTGRAGCTGGAAGGGIGWIG2190.

Detection and Identification of Toscana Mari'a, et al

Tableau V: Tableau récapitulatif des amorces utilisées PCR *Phlebovirus*.

○ **Préparation du mix :**

On prépare le mix pour la PCR consensus ; on met tout le mélange réactionnel de dans contenant l'enzyme les amorces et les tampons. On mélange le tout après on le répartit par plusieurs tubes pour chaque tube on rajoute 5µl d'échantillons à tester et on programme la PCR selon le profil Thermique (Protocole détaillé voir annexe).

Le produit de la première PCR va subir une deuxième PCR ; une PCR nichée avec l'utilisation d'amorces internes pour augmenter la sensibilité et la spécificité de la technique. Deux types d'amorces internes ont été utilisées, une paire qui cible les *phlebovirus* (amorces Phlébo2+/2-) et une autre qui cible spécifiquement le Toscana virus (amorce Phlébo2+/Atos2-) cette dernière n'a été utilisée que pour les échantillons positifs pour la première PCR (Phlébo 2+/2-).

La révélation des produits des différentes PCR a été faite par la suite par migration sur gel d'agarose.

○ **Migration électrophorétique et révélation :**

- Préparer un gel d'agarose à 2% (dissoudre 2g de poudre d'agarose dans 100ml de Tampon TBE 0.5X, avec 10µl de Syber Safe).
- Migrer les produits PCR en présence d'un marqueur de poids moléculaire, à 80Volt pendant 45m.
- La lecture et la révélation des fragments sous une plaque à lumière UV.

PCR	La taille des fragments
PCR consensus	600pb
PCR semi nichée Phlébo 2+/2-	244pb
PCR semi nichée Phlébo 2+/Atos 2-	124pb

Tableau VI : Les tailles des fragments obtenus après PCR *Phlebovirus*.

➤ **PCR Toscana virus :**

Une PCR en temps réel a été par la suite effectuée sur les deux pools positifs afin de confirmer les résultats de la PCR nichée Phlébo2+/Atos2-, vu que cette dernière manque de sensibilité par rapport à la PCR en temps réel.

II.2.5.Séquençage :

Un séquençage des deux pools « Ph5 Blida » et « Ph7 Blida » a été effectué pour identifier avec précision les résultats de *Phlebovirus* obtenus avec la PCR.



**III. Résultats et
discussions**

III.1. Résultat de l'étude entomologique :

Dès l'apparition des premiers phlébotomes le mois de Juillet (au total 10), les pièges huilés ont été remplacés par les pièges lumineux CDC. Un total de 109 phlébotomes a été capturé durant 3 nuitées au niveau de la commune de Meftah, ce qui fait un total de 7 pools, une nuitée à M'Sila et à Jijel (3 pools et 18 pools respectivement).

Le retard enregistré cette année concernant le début et la fin des saisons (fin de printemps et le début de l'été) et la persistance des pluies a considérablement affecté la capture des phlébotomes et surtout leurs densités traduit par le nombre très faible des phlébotomes capturé que ce soit par le piège huilé ou lumineux CDC.

Parmi les 24 espèces signalées en Algérie 07 ont été identifiées dans les sites d'étude (tableau 6). La dominance des mâles confirme le début d'émergence des phlébotomes puisque ces eux qui sortent les premiers ce qui permet la maturation de leurs organes sexuelles avant que les femelles émergent.

Tableau VII : les espèces de phlébotomes capturés par pièges huilés à Meftah

Genre	Sous genre	Espèce	♂	♀
<i>Phlebotomus</i>	<i>Larrousius</i>	<i>Perniciosus</i>	3	1
		<i>Longicuspis</i>	1	/
		<i>Ariasi</i>	1	/
		<i>Perfiliewi</i>	1	1
	<i>Paraphlebotomus</i>	<i>Sergenti</i>	1	/
<i>Sergentomyia</i>	<i>Sergentomyia</i>	<i>Minuta</i>	1	/
Total			8	2



Figure19 : Photo original *Phlebotomus sergenti*. Mâle sous microscope X 40G.

L'espèce la plus dominante lors de cette étude est le *Phlebotomus perniciosus*, elle occupe un très vaste territoire géographique dans les régions méditerranéennes jusqu'à la lisière saharienne (Rioux et al, 1967). En Algérie, cette espèce se retrouve dans tous l'étages

bioclimatique humide et subhumide particulièrement en grande Kabylie et dans le constantinois.(Harrat et al. ; 1996 ; Djerbouh et al. ; 2005).

Les femelles capturées par pièges lumineux ont été directement analysées pour les régions de Meftah et Jijel vu le nombre d'espèce présente et la fragilité du virus par contre celles de M'Sila toutes les femelles appartenaient à l'espèce *Phlebotomus papatasi* puisque une partie des femelles capturées ont été identifiées et intégrées dans une autre étude.

III.2. Résultat de l'étude virologie :

Dans la présente étude 28 pools de phlébotomes ont été analysés par différentes techniques de biologie moléculaire (PCR nichée en point final, PCR en temps réel et séquençage).

Pour la PCR *Phlebovirus* ; sur les 28 pools testés, un seul pool était positif « Ph5 Blida » aux stades consensus et nichée et un pool positif uniquement au stade consensus « Ph7 Blida » (voir figure 19), ce qui veut dire présence d'un *Phlebovirus* dans le premier pool« Ph5 Blida », tandis que le résultat est douteux pour l'autre pool « Ph7 Blida » qui peut s'agir d'un faible positif ou d'une modification génomique par mutation donc non amplifié par la PCR nichée.

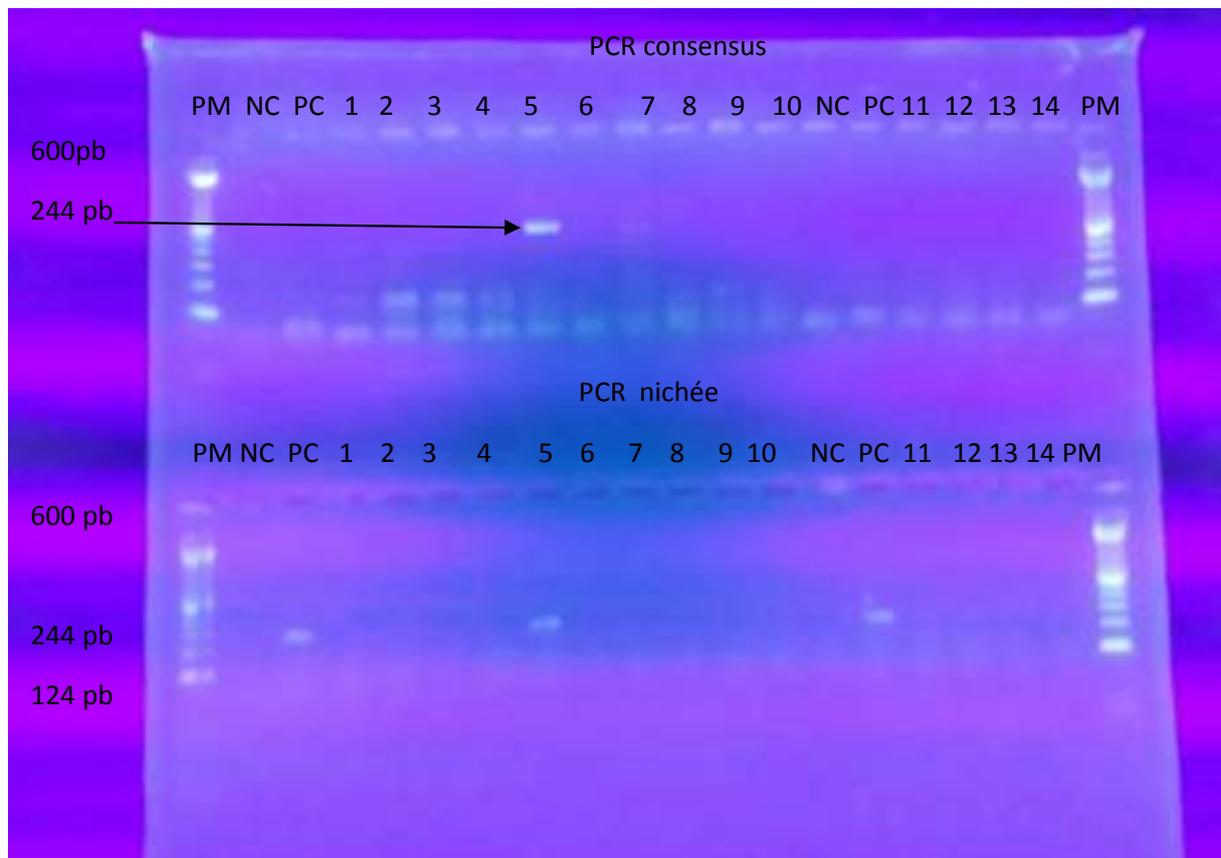


Figure 20 : Migration des produits PCR *phlebovirus* sur gel d'agarose.

Pour les deux PCR Toscana virus (PCR nichée Atos2- et RT-PCR Toscana virus) les deux pools « Ph5 Blida et Ph7 Blida » sont revenus négatifs tous les deux (Voir figure 21) éliminant ainsi la possibilité que le *Phlebovirus* détecté dans ces deux pools soit du Toscana virus.

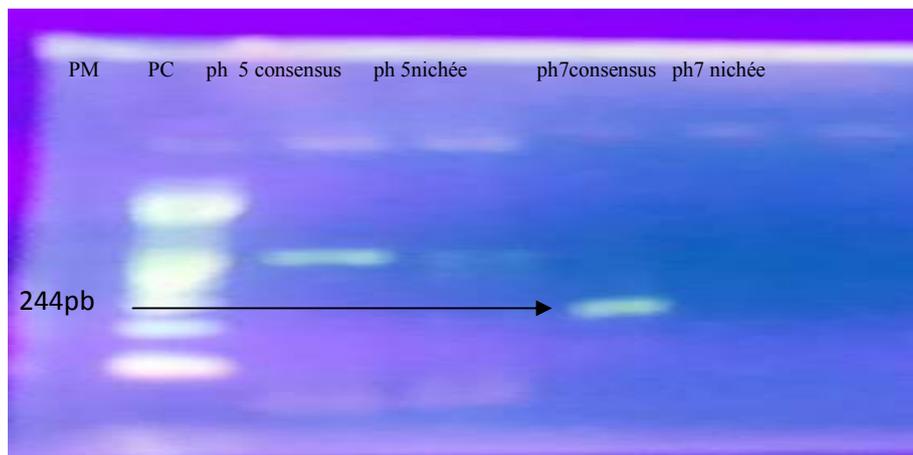


Figure 21 : Migration des produits PCR *phlebovirus* sur gel d'agarose.

Après séquençage le *Phlebovirus* identifié dans le pool « Ph5 Blida » correspond au Punique virus membre du groupe Naples, tandis qu'aucun résultat n'a été obtenu pour le « Ph7 Blida ».

Tableau VIII : Récapitulatif des résultats de la recherche des *Phlebovirus* par PCR et séquençage chez les phlébotomes capturés dans les régions de Blida, M'sila et Jijel.

Echantillon	PCR Phlebovirus			PCR Toscana (temps réel)	Séquençage
	PCR Consensus	PCR nichée Phlebovirus	PCR nichée Toscana		
Ph1 Blida	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph2 Blida	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph3 Blida	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph4 Blida	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph5 Blida	Positif	Positif	Négatif	Négatif	Punique virus
Ph6 Blida	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph7 Blida	Positif	Négatif	Négatif	Négatif	Aucun résultat
Ph8M'sila	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph9 M'sila	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph10 M'sila	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph11 Jijel	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph12 Jijel	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph13Jijel	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph14 Jijel	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph15 Jijel	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph16 Jijel	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph17 Jijel	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph18 Jijel	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph19 Jijel	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph20 Jijel	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph21 Jijel	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph22 Jijel	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph23 Jijel	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph24 Jijel	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph25 Jijel	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph26 Jijel	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph27Jijel	Négatif	Négatif	/	/	/
Ph28 Jijel	Négatif	Négatif	/	/	/

La recherche des *Phlebovirus* dans les phlébotomes se fait pendant la période propice pour la détection qui s'étale de mois de juillet 'jusqu'à la fin Aout en raison de la densité importante des phlébotomes durant cette période. De plus, les données du le Laboratoire des Arbovirus de l'IPA montrent que tous les cas humains enregistrés en Algérie ont été enregistrés durant cette période. Dans notre étude la période de collecte était limitée au mois de juillet pour des raisons techniques (temps nécessaire pour les manipulations et date limite du mémoire).

La présence des *Phlebovirus* dans la région d'Afrique du nord a été rapportée dans plusieurs études, dont le but c'est de répertorier les espèces circulantes, leurs vecteurs essentiels mais aussi de définir l'impact de ces virus sur la santé humaine et animale.

(Bahri O et al ;2011) ;(Es-Sette N,et al;2012) ;(Moureau G,et al ;2010).

Notre étude vient compléter les résultats déjà obtenu dans différentes régions d'Algérie (Kabylie, ouest...), dans la région du Kabylie (Tizi-Ouzou) le virus Toscana a été isolé à partir de phlébotomes (**Alkan et al., 2015**). D'autre phlebovirus ont été détecté tel que le *SFSV-like* détecté chez *Ph. ariasi* (Izri et al., 2008) et *SFNV-like* détecté *Ph. papatasi* mâle (Moureau et al., 2010), par contre aucun virus n'a été reporté des régions du grand sud comme la région de Tamanrasset et Djanet (Tesh et al ., 1976).

Pour la région de Blida, Un pool positif sur 7 (total de 109 phlébotomes capturés) est un très bon résultat, vu que les études ont montrées qu'il faut un grand nombre de pools pour pouvoir trouver un positif, c'est le cas du travail fait dans la région de Draa El Mizan il a fallut plus de 200 pools et 21998 phlébotomes pour trouver un seul pool positif (Alkan et al., 2015), et c'est ce qui explique la négativité des pools capturés dans les deux régions de Jijel et M'sila.

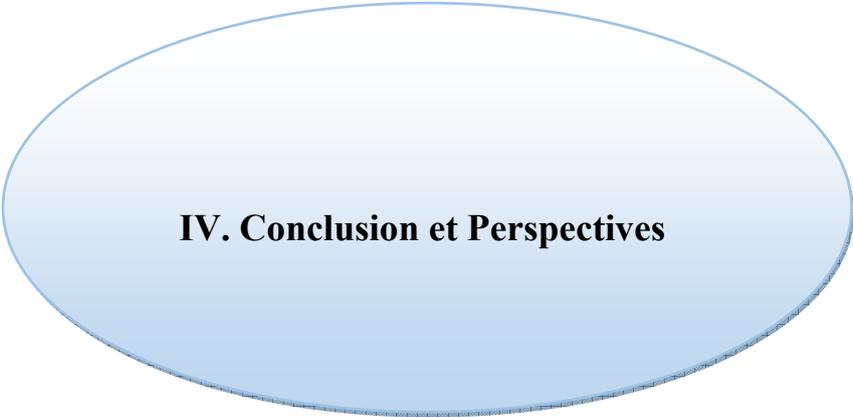
L'identification moléculaire du *Phlebovirus* dans le pool « Ph5 Blida » est le Punique virus membre du complexe SFNV (sandyfly Naples virus) un virus jamais décrit en Algérie, il s'agit donc d'une première découverte qui nécessite plus d'investigation sur le plan phylogénique.

Des résultats comparables ont été obtenus en Tunisie avec isolement de la souche Punique virus à partir de phlébotomes (**Punique virus, Elyes Zhioua1et al ;2010**)

ce qui suggère la possibilité de la circulation de cette souche via les phlébotomes dans cette région du bassin méditerranéen.

Pour le pool « Ph7 Blida » il peut s'agir d'un *Phlebovirus* faiblement titré qui devrait peut être testé par d'autres techniques ou autres moyens diagnostiques tel que la culture cellulaire pour pouvoir trancher.

Le Volet humain n'a pas été traité dans notre étude, par contre les études déjà faites ont montré une circulation importante du Toscana virus dans la région de Draa El Mizan où 45% de la population testée par la technique de séroneutralisation ont contracté le virus *TOSV* (Alkan et *al.*, 2015) , ce qui montre que ces sujets ont été en contact avec le virus au moins une fois dans leurs vie. D'où l'intérêt de compléter ce travail par une investigation dans cette région de Blida sur les deux volets humain et animal.



IV. Conclusion et Perspectives

Au terme de notre travail dans les trois régions à savoir Blida, M'sila et Jijel, les résultats ont montré la présence de 5 espèces. *Phlebotomus perniciosus* est classée au premier rang pour les deux régions suivi par *Ph. papatasi* dans la région de M'sila une espèce qui est connu a été inféodé au climat aride et semi aride. La détection moléculaire des *Phlebovirus* a révélé dans la région de Blida la présence d'un virus décrit pour la première fois en Algérie, le Punique virus. Tandis qu'elle s'est révélée négative pour les deux autres régions.

Une grande investigation devrait se faire sur cette souche avec tentative de l'amplifier sur lignée cellulaire et pouvoir faire les tests de neutralisations pour confirmer l'identification, mais aussi une étude de phylogénie pour mieux caractériser cette souche.

Notre travail n'est qu'un pas sur un long chemin à parcourir, des études complémentaires dans la région de Meftah avec un échantillonnage de phlébotomes plus important est nécessaire, une étude de séroprévalence chez l'homme incluant les différentes tranches d'âge pour mieux estimer la circulation des *Phlebovirus* dans cette région. Un intérêt particulier devrait être donné pour le réservoir animal qui une fois identifié permettra de mieux comprendre le cycle du virus.

Enfin, une fois identifier les différents réservoirs potentiels de ces virus, on pourra mieux adapter les mesures de luttés nécessaires.

Références bibliographiques

Abonnenc E., (1972). Les phlébotomes de la région Ethiopienne (Diptera : *Psychodidae*).

Mem; O.R .S. T. O. M, Ser .Ent. Med. Parasitol., 289p.

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

Alkan; Laurance, 2013. Bichaud Xavier de Lamballerie; Bulent Alten , Ernest Gould ; Rémi N.Charrel .Sandfly – borne phleboviruses of Eurasia and Africa: Epidemiology genetic diversity geographic range, control measures.

Alrajhi AA,2004, Al-Semari A, Al-Watban J (2004). Rift Valley fever encephalitis. *Emerg Infect Dis.*;10(3):554-5

Ba Y.1999, Trouillet J., Thonnon J., Fontenille D., 1999 -*Phlebotomus* of Senegal: survey of the fauna in the region of Kedougou. Isolation of farbovirus. *BullSocPatholExot.* 92, 131–135.

Bahri O. 2011, Fazaa O, Ben Alaya-Bouafif N, et al Rôle du virus Toscana dans les infections neuroméningées en Tunisie. *Pathol Biol (Paris)* 59(6):e125–7 .

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

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

Berchi S., (1993). Les phlébotomes (*Insecta, Diptera, Psychodidae*), vecteurs de leishmanioses dans l'Est algérien. *Bull. Soc. Zool. Fr*, 118, 3, 341-349.

Bitam I. (2005). Les phlébotomes de l'Afrique méditerranéenne. Séminaire de formation contre la Leishmaniose cutanée. PP 4.

Boudrissa A ;2006, Harrat Z., Cherif K., Benthamicienne et Belkaid M. Leishmaniose cutanée zoonotique et facteurs de risque (Cas du foyer Chott El Hodna), Séminaire de formation sur la leishmaniose. Ecole de Formation Paramédicale, Biskra. Institut Pasteur d'Algérie, Agence Satellitaire Algérienne, Université Mohamed Boudiaf M'sila.

Charrel RN, 2005; Gallian P, Navarro-Mari JM et al. Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1657–1663.

Dedet J-P.1984, Addadi K., Belazzoug S., Les Phlebotomes (Diptera:*Psychodidae*) d'Algerie. *Cah. ORSTOM. Ser. Ent. Med. Parasitol* .vol XXII, №22, 99-127.

Dedet J. P. (1999). Les Leishmanioses. Edition Ellipses. 253p.

Depaquit J, Grandadam M., Fouque F, Andry PE, Peyrefitte C

Es-Sette N, Nourlil J, Hamdi S, et al (2012) First Detection of Toscana Virus RNA from sand flies in the genus *Phlebotomus* (Diptera: Phlebotomidae) naturally infected in Morocco. *J Med Entomol* 49(6): 1507–9.

Es-Sette · M. Ajaoud · R.N. Charrel · M. Lemrani. Molecular Epidemiology of phlebovirus in four provinces in Morocco N.

Elyes Zhioua¹, 2012, Grégory Moureau², Ifhem Chelbi¹, Laetitia Ninove^{2,3}, Laurence Bichaud², Mohamed Derbali¹, Mylène Champs², Saifeddine Cherni¹, Nicolas Salez², Shelley Cook⁴, Xavier de Lamballerie^{2,3}, and Remi N. Charrel^{2,3} Punique virus, a novel phlebovirus, related to sandfly fever Naples virus, isolated from sandflies collected in Tunisia.

Foley .H. et Leduc .H, (1912) : Phlébotomes dans le Sud Oranais ; *Bull. Soc. Path. exot.*, 5, 511-514. accidents simplement locaux dûs à leurs piqûres.

Fulhorst CF,1997 ; Monroe MC, Salas RA, Duno G, Utrera A, Ksiazek TG, et al. Isolation, characterization and geographic distribution of Cano Delgadito virus, a newly discovered South American hantavirus (family Bunyaviridae). *Virus Res.* 1997;51:159–71.

J Depaquit 1.2014, M Grandadam^{2,3}, F Fouque⁴, PE Andry¹, C Peyrefitte⁵. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review

J Gen Virol 2014, Characterization of the Sandfly fever Naples species complex and description of a new Karimabad species complex (genus *Phlebovirus*, family Bunyaviridae).

Izri, M.A.1990, Belazzoug, S., Boudjebba, Y., Dereure, J., Pratlong, F., Delalbre-Belmonte A., Rioux J.A., 1990 -*Leishmaniainfantum* MON-1 isolé de *Phlebotomuspernicius*, en Kabylie (Algérie). *Annales de Parasitologie Humaine etComparee* 65,151–152.

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

Izri a, Depaquitj.,ParolaP, 2006 - Phlébotomes et transmission d'agentspathogènes autour du bassin méditerranéen. *Médecine Tropicale* 66(5) 429-435.

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

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

Killick-Kendrick R. (1999) - The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. *Clinics in Dermatology*;17:279–289pp.

Liu et al., 2003; Xu et al., 2007.Tesh RB, Travassos da Rosa AP, Peters CJ, Yang Z, Guzman H, Xiao SY., 2003 - Phylogenetic relationships among members of the genus *Phlebovirus* (Bunyaviridae) based on partial M segment sequence analyses. *J Gen Virol.*84:465–473.

Liu DY,2003; Tesh RB, Travassos da Rosa AP, Peters CJ, Yang Z, Guzman H, Xiao SY., 2003 - Phylogenetic relationships among members of the genus *Phlebovirus* (Bunyaviridae) based on partial M segment sequence analyses. *J GenVirol.* 84:465–473.

Moulinier C. (2002) - Parasitologie et mycologie médicale ; Eléments de morphologie et de biologie. [Paris]: Editions MédicalesInternationales, 796pp.

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

Mullis K.B., Faloona F.A., 1987 Specific synthesis of DNA in vitro via apolymerase catalysed chain reaction *Meth. Enzymol*, 155: 335-350. 244.

Papa A,2010; Andriotis V, Tzilianos M. Prevalence of Toscana virus antibodies in residents of two Ionian islands, Greece. *Travel Med Infect Dis*; 8: 302–304.

Palacios G, Tesh RB, Savji N, da Rosa APT, Guzman H, Bussetti AV, Desai A, Ladner J, Sanchez-Seco M, Lipkin.

S. AlwassoufA.2015, LoudahiB. DavoustRNCharrel, Séroprévalence du virus Toscana chez des chiens de Kabylie (Algérie)

Tahir,S.2015,AlwassoufA. LoudahiB. DavoustRNCharrel ,Seroprevalence of Toscana virus in dogs from Kabylie (Algeria).*Clin MicrobiolInfect*;22:e 16-e17.

Tesh RB. 1988; The genus Phlebovirus and its vectors. *Annu Rev Entomol*. 33:169–81.

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

Site consulté

[http : //journals.openedition.org/vertigo/docammexe/img/5375/img.2.jpg](http://journals.openedition.org/vertigo/docammexe/img/5375/img.2.jpg).

Annexes

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

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

(ts) sérocomplexe tentatif

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

Tableau matériels utilisés :

	Appareillage	Consommable et autre matériel
Partie Entomologique	<ul style="list-style-type: none"> - Piège lumineux CDC - Loupe binoculaire - Microscope photonique 	<ul style="list-style-type: none"> - Lames et lamelles - Huile de ricin - Papier sulfurisé - Piège lumineux CDC
Partie Virologie	<ul style="list-style-type: none"> - PSM (poste de sécurité microbiologique) - Centrifugeuse - Vortex - Balance de précise - Réfrigérateur +4°C - Congélateur -20°C et -80°C - Thermocycleur - Kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN) - Broyeur automatique - Cuve électrophorèse - Séquenceur - Bac à glace - Portoir - Micro-onde - Séquenceur automatique -Matériel Biologique : Positif contrôle 	

➤ **Technique d'éclaircissement des phlébotomes :**

- L'alcool éthylique à 70°
- La solution aqueuse de potasse à 10% (10g de KOH dans 50ml de l'eau distillé)
- Le liquide de Marc – André : L'eau distillé 90ml, L'hydrate de chloral 120g, L'acide acétique cristallisable 90ml

➤ **Composition du milieu de Broyage des phlébotomes :**

L-15+10% Sérum nouveau-né +10% Tryptose phosphate +1% Pénicilline streptomycine +0,25% Amphotéricine B (Fungizone)

➤ **PCR *Phlebovirus***

1- Tableau du mix PCR consensus :

Réactifs	Concentration Initiale	Concentration finale	Volume initiale
Phlébo1+	20µM	0.8µM	0.8µl
Phlébo1-	20µM	0.8µM	0.8µl
qScriptXlt one Step RT-qPCRToughMix*			10µl
H2O			3.4
Volume total			15µl

2- Tableau de programmethermique pour PCR consensus :

	Programme		Cycles
	Température °C	Temps (h.m.s)	
RT	45	00 :30 :00	
Dénaturation	94	00 :02 :00	
Amplification	94	00 :00 :30	40
	45	00 :01 :00	
	68	00 :00 :30	
Elongation	68	00 :05 :00	
Stockage	04	Infini	

3- Tableau du mix PCR nichée phlébo -2 /+2:

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume
Buffer 10x		1x	5µl
Mgcl2	50Mm	2.5Mm	2.5µl
dNTP	10Mm	0.2Mm	1µl
Phlébo2-	20µM	0.8µM	2µl
Phlébo2+	20µM	0.8µM	2µl

4- Tableau de programme Thermique pour PCR nichée phlébo -2/+2 :

	Programme		Cycles
	Température °C	Temps (h .m .s)	
Dénaturation	94	00 :02 :00	
Amplification	94	00 :00 :30	40
	45	00 :02 :00	
	72	00 :00 :30	
Elongation	72	00 :05 :00	
Stockage	04	Infini	

5- Tableau du mix PCR nichée Atos 2 :

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume
Buffer 10x		1x	5µl
Mgcl2	50Mm	1.5Mm	1.5µl
dNTP	10Mm	0.2Mm	1µl
Phlébo2+	20µM	0.8µM	2µl
Atos 2-	20µM	0.8µM	2µl
Aplitud Gold	5U/µl	2.5U	0.5µl
H2O			37µl
Total			49µl

6-Tableau de programme du Thermique pour PCR niché Atos 2.

	Programme		Cycles
	Température °C	Temps (h .m .s)	
Dénaturation	94	00 :02 :00	
Amplification	94	00 :00 :30	40
	45	00 :02 :00	
	72	00 :00 :30	
Elongation	72	00 :05 :00	
Stockage	04	Infini	

