

**UNIVERSITE BLIDA 1**

**Institut des sciences vétérinaires**

**THESE DOCTORAT ES-SCIENCES**

En sciences vétérinaires

Spécialité : Epidémiologie animale

ETUDE DES AGENTS INFECTIEUX TRANSMIS PAR LES PHLEBOTOMES  
(PSYCHODIDAE) DANS LA KABYLIE

Par

**Hemza MANSEUR**

Devant le jury composé de :

R. Kaidi	Professeur, ISV de Blida1	Président
F. Ghalmi	Professeur, ENSV Alger	Examineur
A. Laatamna	Professeur, U de Djelfa	Examineur
K. Saidani	Maitre de conférences A, ISV de Blida	Examineur
I. Lafri	Professeur, ISV de Blida	Directeur
I. Bitam	Professeur, ESSAIA d'Alger	Co-directeur
A. Hachid	Maître de conférences, HU, IPA	Invité

Blida, Janvier 2023

## RESUME

Au cours de la dernière décennie, plusieurs phlébovirus transmis par les phlébotomes ont été détectés dans les pays méditerranéens, et l'impact sanitaire de certains d'entre eux restent inconnu. Dans le but de surveiller la circulation des phlébovirus, et leurs éventuels vecteurs dans deux régions endémiques de leishmanioses canine et humaine (Kherrata et Tiaret). Nous avons réalisé une enquête entomologique de Septembre à Octobre 2020. Un total de 4541 phlébotomes a été capturé, un nombre de 4141 phlébotomes ont été identifiés par sexe, regroupés en 100 pools, pour la recherche de l'ARN des phlébovirus par la PCR conventionnelle R-T-Nested PCR suivie par séquençage. Dix pools étaient positifs, représentant un taux d'infection global dans les deux régions de 0,24%. L'infection a été observée chez les deux sexes dans les deux régions. Le séquençage a permis la détection de huit séquences qui ressemble au virus Toscana (TOSV) à Tiaret et deux séquences qui ressemblent au virus Punique (PUNV) à Kherrata. L'ensemencement des pools positifs sur les cellules Vero a permis l'isolement de deux souches de PUNV qui sont génétiquement liées, mais elles sont distinctes l'une de l'autre. La première souche ressemble à PUNV détectée à Blida, tandis que la deuxième est génétiquement très proche du PUNV détectée en Tunisie. L'identification morphologique de 400 phlébotomes choisis au hasard a montré une nette dominance de *Phlebotomus perniciosus* (98%). La dominance de cette espèce dans les deux zones d'études a été confirmée par la technique PCR ciblant le gène mitochondrial codant pour le cytochrome-oxydase I (COI). Notre résultat représente le premier isolement du PUNV et la deuxième détection en Algérie dans deux régions distinctes, ce qui confirme sa grande circulation dans le pays et plus largement en Afrique du Nord. Nos résultats ont permis également la détection de TOSV pour la deuxième fois en Algérie. D'autres études sont nécessaires pour mesurer l'impact du PUNV sur la santé publique par des études de séroprévalence chez l'homme et l'animal et pour étudier son implication potentielle dans les maladies virales neurologiques.

**Mot clés :** Algérie, *Phlebotomus*, Phlébotomes, Séquençage, virus Punique, R-T-Nested PCR, virus Toscana.

## ABSTRACT

During the last decade, several phleboviruses transmitted by sandflies have been detected in Mediterranean countries, and the sanitary impact of some of them is still unknown. In order to control the circulation of phleboviruses and their possible vectors in two regions endemic to canine and human leishmaniasis (Kherrata and Tiaret). We conducted an entomological survey from September to October 2020, a total of 4541 sandflies were caught, among 4141 were identified by sex, grouped into 100 pools, for the search of phlebovirus RNA by conventional R-T-Nested PCR followed by sequencing. Ten pools were positive, representing an overall infection rate in both regions of 0.24%. Infection was observed in males and females in both regions. Sequencing allowed the detection of eight sequences closely related Toscana virus (TOSV) in Tiaret and two sequences related to Punique virus (PUNV) in Kherrata. The seeding of the positive pools on Vero cells allowed the isolation of two strains of PUNV that are genetically related but distinct from each other. The first one is closely related to the PUNV detected in Blida and the second one is genetically very close to the PUNV detected in Tunisia. Morphological identification of 400 randomly selected sandflies showed a clear dominance of *Phlebotomus perniciosus* (98%). The dominance of this species in the two study areas was confirmed by the PCR technique targeting the mitochondrial gene coding for cytochrome oxidase I (COI). Our result represents the first isolation of PUNV and the second report in Algeria in two distinct areas, confirming its wide circulation in the country and more widely in North Africa. Our results also allowed the detection of TOSV for the second time in Algeria. Further studies are needed to measure the impact of PUNV on public health through seroprevalence studies in humans and animals and to study its potential involvement in neurological viral diseases.

**Keywords:** Algeria, *Phlebotomus*, sand fly, Sequencing, Punique virus, R-T-Nested PCR, Toscana virus.

## الملخص

خلال العقد الماضي، تم اكتشاف العديد من الفلييوفيروسات المنقولة عن طريق ذبابة الرمل في دول البحر الأبيض المتوسط، ويبقى التأثير الصحي لبعضها غير معروف. من أجل مراقبة الفلييوفيروسات المنقولة عن طريق ذبابة الرمل وناقلاتها المحتملة في منطقتين موبوءتين بداء ليشمانيات الكلاب والبشر (خراطة وتيارت). أجرينا بحثًا حشريًا من سبتمبر إلى أكتوبر 2020، تم القبض على ما مجموعه 4541 ذبابة رمل، من بينها 4141 تم تحديدها حسب الجنس، مجمعة في 100 زمرة، للبحث عن الحمض النووي الريبي للفلييوفيروسات بواسطة R-T-Nested PCR التقليدي متبوعًا بالتسلسل الجيني. كانت عشرة زمر موجبة، مما يمثل معدل إصابة إجمالي في كلا المنطقتين بنسبة 0.24%. لوحظت العدوى لدى الجنسين في كلا المنطقتين. سمحت تقنية التسلسل الجيني باكتشاف ثماني متواليات مرتبطة ارتباطًا وثيقًا بفيروس توسكانا (TOSV) في تيارت وتسلسلان متعلقان بالفيروس اليوناني (PUNV) سمحت زراعة الزمر الموجبة على خلايا Vero بعزل سلالتين من PUNV مرتبطتين وراثيًا ولكنهما مختلفان عن بعضهما البعض. الأولي وثيق الصلة بـ PUNV المكتشف في البلدية والثانية قريبة جدًا وراثيًا من PUNV المكتشف في تونس. أظهر التصنيف المورفولوجي لـ 400 عينة من ذبابة الرمل المختارة عشوائيًا هيمنة واضحة للنوع *Phlebotomus perniciosus* (98%). تم تأكيد هيمنة هذا النوع في منطقتي الدراسة من خلال تقنية PCR التي تستهدف الترميز الجيني للميتوكوندريا من أجل السيتوكروم أوكسيداز (COI) I تمثل نتيجتنا العزل الأول لـ PUNV والاكتشاف للمرة الثانية في الجزائر في منطقتين مختلفتين، مما يؤكد انتشاره على نطاق واسع في البلاد وعلى نطاق أوسع في شمال إفريقيا. كما سمحت نتائجنا باكتشاف TOSV للمرة الثانية في الجزائر. هناك حاجة ماسة إلى مزيد من الدراسات لقياس تأثير PUNV على الصحة العامة من خلال دراسات الانتشار المصلي في البشر والحيوانات ودراسة مشاركته المحتملة في الأمراض الفيروسية العصبية.

**كلمات المفتاح:** الجزائر، *Phlebotomus* ، ذبابة الرمل، التسلسل الجيني، الفيروس اليوناني، R-T-Nested ، فيروس توسكانا

## 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, Pr. Lafri Ismail, professeur 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 Pr. Bitam Idir, Professeur à l'Ecole Supérieure des Sciences de l'Aliment et Industries Agroalimentaires, El Harrach, Alger, qui a également encadré ce travail de recherche. Merci de m'avoir ouvert les portes de la recherche en me proposant ce thème. Soyez assuré de ma plus grande gratitude et de mon respect

J'exprime toute ma gratitude aux membres du jury : Pr Kaidi Rachid d'avoir bien voulu présider ce jury. Pr. Ghalmi Farida d'avoir bien voulu examiner ce travail, Pr. Laatamna Abdelkarim 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.

J'adresse, mes vifs remerciements à Dr Hachid Aissam chef de laboratoire des arboviroses et virus émergents de l'Institut Pasteur d'Algérie de nous avoir ouvert les portes de toutes les unités de virologie que dispose l'IPA. Je remercie également Mr Fayez Khardine, ingénieur de laboratoire à l'IPA pour sa disponibilité, le partage de son savoir-faire et sa patience.

Je remercie également Dr.Vazquez Ana et Dr. Sanchez-Seco María Paz, et toute l'équipe du Laboratorio de Arbovirus en el Centro Nacional de Microbiología Espagne, de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire.

Mes sincères remerciements s'adressent également à Mr. Benallal Kamel Eddine, entomologiste à l'Institut Pasteur d'Alger, de m'avoir aidé pour la réalisation de ce travail.

A toute l'équipe du laboratoire des arbovirus et virus émergents de l'IPA, Benmazouz Rachid, Bournissa Amirat, Temani Merbouha, Bouradjoul Nesrine.

A mon très chère ami, BIA Taha, vétérinaire praticien et doctorant à L'institut des Sciences Vétérinaires de Tiaret, merci pour tes encouragements et ton aide tout au long de mon cursus académique.

A mon cher ami, Tazart Fatah, Maitre de Conférences "B", je veux te remercier pour ton aide précieuse et ton encouragement.

A tous les vétérinaires et professionnels de santé publique de Kherrata et Tiaret qui ont participé à la réalisation de ce travail, Hadadi Rabah, Hadidi Kada, Elhadi Abdelkader, Hafhouf Abdelhafid, Barkat Halim, Guechiche Tayeb.

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

## DEDICACES

*A la mémoire de mon père Said et mon frère Omar que Dieu  
les l'accueille dans son vaste paradis.*

*A ma mère pour son soutien, amour et patience durant ces  
longues années d'étude, qu'elle trouve ici un modeste  
témoignage de tout l'amour que j'ai pour elle.*

*A mes chers frères*

*Rachid, Ahmed, Samir, Moumen, Yacine, Hichem et Khaled*

*A mes soeurs*

*Arjouna, Taoues, Souad, Hakima Habiba, Souhila*

*Mes beaux-frères et belles sœurs*

*A mes nièces et neveux*

*A toute la famille son exception*

*A tous mes ami(e)s*

# TABLE DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

DEDICACES

TABLE DES MATIERES

LISTES DES ILLUSTRATIONS, GHRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION .....	15
CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LE VECTEUR (PHLEBOTOMES) .....	18
2.1. Définition d'un vecteur .....	18
2.2. Mécanismes de transmission vectorielle .....	18
2.3. Les phlébotomes .....	19
2.3.1. Répartition géographique des phlébotomes .....	19
1.3.2. Taxonomie des phlébotomes .....	20
1.3.3. Morphologie des phlébotomes .....	23
1.3.4. Cycle de vie des phlébotomes .....	25
1.3.5. Activité des phlébotomes .....	26
1.3.5. Longévité des phlébotomes .....	27
1.3.6. Régime alimentaire des phlébotomes .....	27
1.4. Lutte anti-phlébotomes .....	28
1.4.1. Prévention environnementale .....	28
1.4.2. Prévention mécanique .....	28

1.4.3. Prévention chimique .....	28
1.5. Répartition géographique des phlébotomes en Algérie .....	30
1.5.1. Genre <i>Phlebotomus</i> .....	30
1.5.2. Genre <i>Sergentomyia</i> .....	32
<b>CHAPITRE 2 : GENERALITES SUR LES PHLEBOVIRUS ET LES AGENTS INFECTIEUX TRANSMIS PAR LES PHLEBOTOME .....</b>	<b>34</b>
2.1. Définition des phlebovirus .....	34
2.2. Classification et taxonomie .....	35
2.3. Répartition géographique des phlébovirus transmis par les phlébotomes ...	36
2.4. Les phlébovirus transmis par les phlébotomes .....	37
2.4.1. Les phlébovirus de l'ancien monde .....	37
2.4.1.1. Le virus de Napel .....	37
2.4.1.2. Le virus Toscana (TOSV).....	38
2.4.1.3. Le virus Sicilien (SFSV).....	38
2.4.1.4. Le virus Adria .....	39
2.4.1.5. Autres Phlébovirus .....	39
2.4.1.5.1. Les autres phlébovirus de l'ancien monde .....	39
2.4.2. Les phlébovirus du nouveau monde .....	40
2.4.2.1. Le virus Punta Toro .....	40
2.4.2.2. Les autres phlébovirus du nouveau monde .....	41
2.4.3. Les phlébovirus au Maghreb .....	41
2.5. Sources de contamination et modes de transmission .....	44

2.5.1. Modes de transmissions .....	44
2.5.2. Réservoirs .....	44
2.6. Techniques de diagnostic des phlébovirus appliquées aux phlébotomes ....	46
2.6.1. Diagnostic virologique .....	46
2.6.1.1. Diagnostic moléculaire .....	46
2.6.1.1.1. Polymerase chain reaction (PCR) .....	46
2.6.1.1.2. Le séquençage .....	49
2.6.1.2. Culture virale et isolement .....	51
2.7. Autres agents infectieux transmis par les phlébotomes .....	53
2.7.1. Les leishmanioses .....	53
2.7.2. Bartonella bacilliformis .....	54
2.7.3. Les virus .....	54
<b>CHAPITRE 3 : DETECTION ET ISOLEMENT DES PHLEBOVIRUS ET IDENTIFICATION DES PHLEBOTOMES .....</b>	<b>56</b>
3.1. Objectifs .....	56
3.2. Matériel et Méthodes .....	57
3.2.1. Présentation des zones d'étude .....	57
3.2.2. Capture des phlébotomes .....	60
3.2.2.1. Déclaration éthique .....	60
3.2.2.2. Méthodes de capture des phlébotomes .....	60
3.2.2.3. Sites de capture des phlébotomes .....	63
3.2.3. Recherche des phlébovirus .....	63

3.2.3.1. Traitement des phlébotomes et extraction de l'ARN viral .....	63
3.2.3.2. Détection des phlébovirus .....	64
3.2.3.3. Isolement des phlébovirus .....	66
3.2.3.4. Séquençage et analyse phylogénétique .....	67
3.2.4. Identification des phlébotomes .....	68
3.2.4.1. Identification morphologique des phlébotomes .....	68
3.2.4.2. Identification moléculaire des phlébotomes dans les pools positifs .....	68
3.2.4.2.1. Extraction d'ADN .....	68
3.2.4.2.2. Amplification et séquençage .....	69
3.2.5. Analyse des données .....	70
3.2.6. Analyses statistiques .....	71
3.3. Résultats .....	72
3.3.1. Résultats des captures des phlébotomes .....	72
3.3.1.1. Résultats globaux des captures des phlébotomes .....	72
3.3.1.2. Résultats des captures des phlébotomes par région .....	72
3.3.2. Résultats de la détection et d'isolement des phlebovirus .....	75
3.3.2.1. Résultats de la détection des phlébovirus .....	75
3.3.2.1.1. Résultats globaux de la détection des phlébovirus .....	75
3.3.2.1.2. Résultats de la détection des phlébovirus par région .....	75
3.3.2.2. Résultats du séquençage des phlébovirus .....	78
3.3.2.2.1. Résultats globaux du séquençage des phlébovirus .....	78
3.3.2.2.2. Résultat du séquençage des phlébovirus par Région .....	78
3.3.2.3. Résultats de l'isolement viral .....	79
3.3.2.3.1. Résultats de l'isolement viral globaux .....	79

3.3.2.3.2. Résultats de l'isolement viral par région .....	80
3.3.2.4. Résultats phylogénétiques des deux souches isolées à Kherrata .....	82
3.3.3. Résultats d'identification des phlébotomes .....	84
3.3.3.1. Résultats d'identification morphologique des phlébotomes .....	84
3.3.3.1.1. Résultats globaux d'identification morphologique .....	84
3.3.3.1.2. Résultats d'identification morphologique par région .....	85
3.3.3.2. Résultats d'identification moléculaire des phlébotomes .....	86
3.3.3.2.1. Résultats globaux d'identification moléculaire .....	86
DISCUSSION .....	87
CONCLUSION .....	97
RECOMANDATIONS ET PERSPECTIVES .....	98
APPENDICES .....	99
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	108

## **LISTE DES ILLUSTRATIONS, GHRAPHIQUES ET TABLEAUX**

Figure 1.1 Distribution mondial des genres et sous genres de phlébotomes .....	20
Figure 1.2 Classification des phlébotomes dans l'ancien et le nouveau monde ...	21
Figure 1.3 Morphologies des phlébotomes A. Schéma d'un phlébotome mâle, B. Vue ventrale de la tête d'un phlébotome C. Génitalia femelle, D. Génitalia mâle	24
Figure 1.4 Cycle de vie des phlébotomes .....	26
Figure 2.1 Schéma représentatif des phlébovirus .....	34
Figure 2.2 Stratégies de codage des segments du génome des phlébovirus .....	35
Figure 2.3 Classification des phlébovirus .....	36
Figure 2.4 Distribution géographique des phlébovirus transmis par les phlébotomes .....	37
Figure 2.5 Différents modes de transmission des Phlébovirus .....	45
Figure 2.6 Principe de la Transcriptase Inverse RT-PCR .....	48
Figure 2.7 Principe de la technique du séquençage Sanger .....	50
Figure 2.8 Les différentes méthodes de diagnostic des phlébovirus applicables sur les phlébotomes .....	52
Figure 3.1 Localisation géographique des sites de capture des phlébotomes à Kherrata .....	58
Figure 3.2 Localisation géographique des sites de capture des phlébotomes à Tiaret .....	60
Figure 3.3 Représentation schématique d'un piège de type CDC .....	61
Figure 3.4 Pièges lumineux CDC installés dans un étable de bovin photo personnelle (2020) .....	62
Figure 3.5 Résultats des captures des phlébotomes dans la région de Kherrata	73
Figure 3.6 Résultats des captures des phlébotomes dans la région de Tiaret .....	75

Figure 3.7 Pourcentage des pools infectés par l'ARN des phlébovirus dans la région de Kherrata .....	76
Figure 3.8 Pourcentage des pools infectés par l'ARN des phlébovirus dans la région de Tiaret .....	77
Figure 3.9 Analyse phylogénétique des deux souches isolées. Les distances et les regroupements ont été déterminés par l'algorithme de distance par paires et la méthode du Maximum Likelihood de MEGAX, et la robustesse des groupes a été testée en utilisant 500 pseudo-réplicats bootstrap .....	83
Figure 3.10 Espèces de phlébotomes inventoriées dans la région de Kherrata	85
Figure 3.11 Espèces de phlébotomes inventoriées dans la région de Tiaret .....	85
Tableau 1.1 Taxonomie des phlébotomes d'Algérie .....	22
Tableau 3.1 Séquences d'amorces de la R-T-Nested PCR phébovirus .....	66
Tableau 3.2 Séquences d'amorces de la PRC du gène mitochondrial .....	69
Tableau 3.3 Résultats des captures des phlébotomes dans la région de Kherrata .....	73
Tableau 3.4 Résultats des captures des phlébotomes dans la région de Tiaret	74
Tableau 3.5 Résultats du pourcentage d'infection des pools et taux d'infection dans la région de Kherrata .....	76
Tableau 3.6 Résultats du pourcentage d'infection des pools et taux d'infection dans la région de Tiaret .....	77
Tableau 3.7 Les espèces virales détectés après séquençage, dans les deux région Kherrata et Tiaret .....	79
Tableau 3.8 Résultats de l'isolement des phlebovirus dans les deux régions Kherrata et Tiaret .....	81
Tableau 3.9 Les distances par paires des nucléotides et des acides aminés, entre les séquences du virus Punique .....	82

Tableau 3.10 Répartition des espèces de phlébotomes inventoriées dans les deux régions d'étude .....	84
Tableau 3.11 Résultats de l'identification moléculaire des phlébotomes dans les deux régions d'étude .....	86

## INTRODUCTION

Les phlébotomes sont de petits insectes, Diptères classés dans la famille des *Psychodidae*, sous-famille des *Phlebotominae*. On les trouve dans les régions tropicales et subtropicales, arides et semi-arides et les zones tempérées, en particulier le sud de l'Europe, l'Asie, l'Afrique, l'Australie, l'Amérique centrale et l'Amérique du Sud. À ce jour, on estime que plus de 950 espèces ont été découvertes dans quatre coins du monde. Au moins 100 espèces sont des vecteurs connus ou suspectés de micro-organismes pouvant provoquer des maladies parasitaires (leishmanioses), virales (phléboviroses) ou bactériennes (bartonellose) chez les vertébrés [1,2].

En Algérie, 24 espèces de phlébotomes appartenant aux deux genres, *Phlebotomus* et *Sergentomyia* ont été inventoriées et certaines espèces sont impliquées principalement dans la transmission des leishmanioses et des arboviroses [1,3].

Le genre *Phlebovirus* contient environ 70 virus, qui sont largement distribués en Europe, Afrique, Asie centrale et dans les Amériques. Ces virus sont actuellement classés en 10 espèces par le comité international de taxonomie des virus (ICTV) : le virus Bujaru (BUJV), le virus Candiru (CDUV), le virus Chilibre (CHIV), le virus Frijoles (FRIV), virus Punta Toro (PTV), le virus de la fièvre de la Vallée du Rift (RVFV), le virus Salehabad (SALV), le virus de la fièvre à phlébotome de Naples (SFNV), le virus Mukawa (MKWV), et le virus Uukuniemi (UUKV). En outre, au moins 32 souches non classées sont associées à ce genre. Les phlébovirus sont principalement transmis par les phlébotomes, les espèces du genre *Phlebotomus* dans l'ancien Monde ou les espèces du genre *Lutzomyia* dans le nouveau Monde. Cependant, certains virus de ce genre sont transmis par les moustiques, les culicoïdes et les tiques [4].

De nombreux phlébovirus ont été associés à des maladies humaines et animales, tels que les virus, RVFV, TOSV, CDUV, SFNV, de la fièvre à phlébotomes de Sicile (SFSV) et du syndrome de fièvre sévère avec thrombocytopénie (SFTS). Les récentes découvertes des virus de la fièvre à phlébotomes de Turquie, du

Heartland, du Hunter Island Group, du Fermo, et du Malsoor montrent à quel point la diversité et l'impact des phlébovirus sur la santé publique ou animale sont inconnus et probablement sous-estimés [4].

Dans la région méditerranéenne, les phlébovirus transmis par les phlébotomes (SBPs) appartiennent à l'un des groupes suivants : (i) 2 espèces reconnues par le ICTV, SFNV et SALV, (ii) 2 espèces provisoires, SFSV et le virus Corfu (CFUV). Ils affectent des populations humaines dont 250 millions sont à risque [5]. Certains SBPs provoquent des maladies humaines avec des syndromes cliniques variés, allant d'une légère fièvre à une maladie neuro-invasive. Parmi ceux qui circulent dans la région méditerranéenne, le TOSV est médicalement le plus important SBP, l'infection par le TOSV peut se présenter sous la forme d'une grande variété de symptômes allant d'une maladie fébrile très légère à des infections neuro-invasives graves, telles que la méningite, l'encéphalite et des manifestations neurologiques périphériques [6].

En Afrique du Nord, de nombreux SBPs ont été signalés, le TOSV le plus pathogène parmi les SBPs a été détecté et isolé dans la région du Maghreb, à l'exception de la Mauritanie et la Libye [7,8,9,10,11,12]. Le PUNV, une espèce de SBPs nouvellement décrite, a été isolée pour la première fois en 2008 chez *P. perniciosus* et détectée chez *P. longicuspis* dans les environs de la région Utique, Tunisie [13].

Cependant, en Algérie, il y a peu de données disponibles sur les SBPs. SFSV a été le premier rapporté et détecté chez *P. ariasi* et *P. papatasi* à Larbaa Nath Iraten (Tizi-Ouzou) [14,15]. Suivi par SFNV détecté chez *P. longicuspis* à Tipaza [15].

En 2013, le TOSV a été également détecté et isolé à Draa El Mizan (Tizi-Ouzou) à partir d'un pool de phlébotomes [12]. Dernièrement le PUNV a été détecté à partir de phlébotomes capturés à Blida [16]. En ce qui concerne la circulation des phlébovirus chez les humains, seules trois études de séroprévalence ont été menées à Larbaa Nath Iraten, Bousmail (Tipaza), et Draa El Mizan, dans le nord de l'Algérie, pour détecter la circulation du SFNV, SFSV, et TOSV, les deux premières études ont révélé que 10,6-21,6% et 5% de population été en contact avec SFNV et SFSV, respectivement [14,15]. Récemment, Alkan et al, ont montré que 50% des sérums humains testés étaient positifs pour le TOSV [12]. En ce qui concerne les animaux, une enquête sérologique sur les chiens en Kabylie, a révélé que 4,5% des

animaux testés étaient positifs pour le TOSV [17]. Récemment, une autre étude sérologique réalisée dans plusieurs régions en Algérie sur des chiens a signalé une séroprévalence de 4,56% pour le TOSV et 20% pour les phlébovirus [18].

Les deux agents pathogènes (*Leishmania* et phlébovirus), sont transmis par les phlébotomes. En outre, *Leishmania infantum* et le TOSV partagent le même vecteur à savoir *P. perniciosus* [19]. De plus, une Co-circulation des phlébovirus et du parasite *Leishmania* a été récemment démontrée chez les phlébotomes en Tunisie et en Italie [20,21]. Dans ce contexte, le but de cette étude est de surveiller la circulation des phlébovirus chez les phlébotomes dans deux régions (Kherrata et Tiaret), endémiques de leishmaniose humaine (LH) et canine (LCan) [22,23], afin de mieux comprendre la circulation du SBPs en Algérie. La région de Tiaret ne fait pas partie de la Kabylie, le choix de l'intégrer dans notre étude était due aux résultats préliminaires de Taha et al, qui ont signalé une infestation importante de la population canine par la leishmaniose dans la région de Tiaret.

## CHAPITRE 1

### GENERALITES SUR LE VECTEUR (PHLEBOTOMES)

#### 1.1. Définition d'un vecteur :

Un vecteur est un arthropode qui, à l'occasion de relations écologiques acquiert un agent pathogène sur un hôte et le transmet ensuite à un autre hôte ; il s'agit essentiellement des arthropodes hématophages, c'est-à-dire des espèces d'invertébrés appartenant soit au groupe des insectes soit au groupe des acariens en particulier les femelles [24].

#### 1.2. Mécanismes de transmission vectorielle :

Elle peut se faire par :

##### A. Transmission passive :

Dans ce cas, l'agent pathogène ne se multiplie pas dans l'arthropode. Lors du repas sanguin sur un hôte infecté, l'arthropode souille ses pièces buccales et l'agent pathogène va subir une inactivation progressive, en quelques heures ou en plusieurs jours, en fonction de sa résistance. L'arthropode peut transmettre, en cas de pique ultérieure d'un organisme sain l'agent pathogène pendant un temps plus au moins long [24].

**B. La transmission active** : dans ce mode de transmission L'agent pathogène se multiplie dans l'arthropode soit :

- Sans modification de ses propriétés (transmission biologique : les arboviroses, peste humaine).

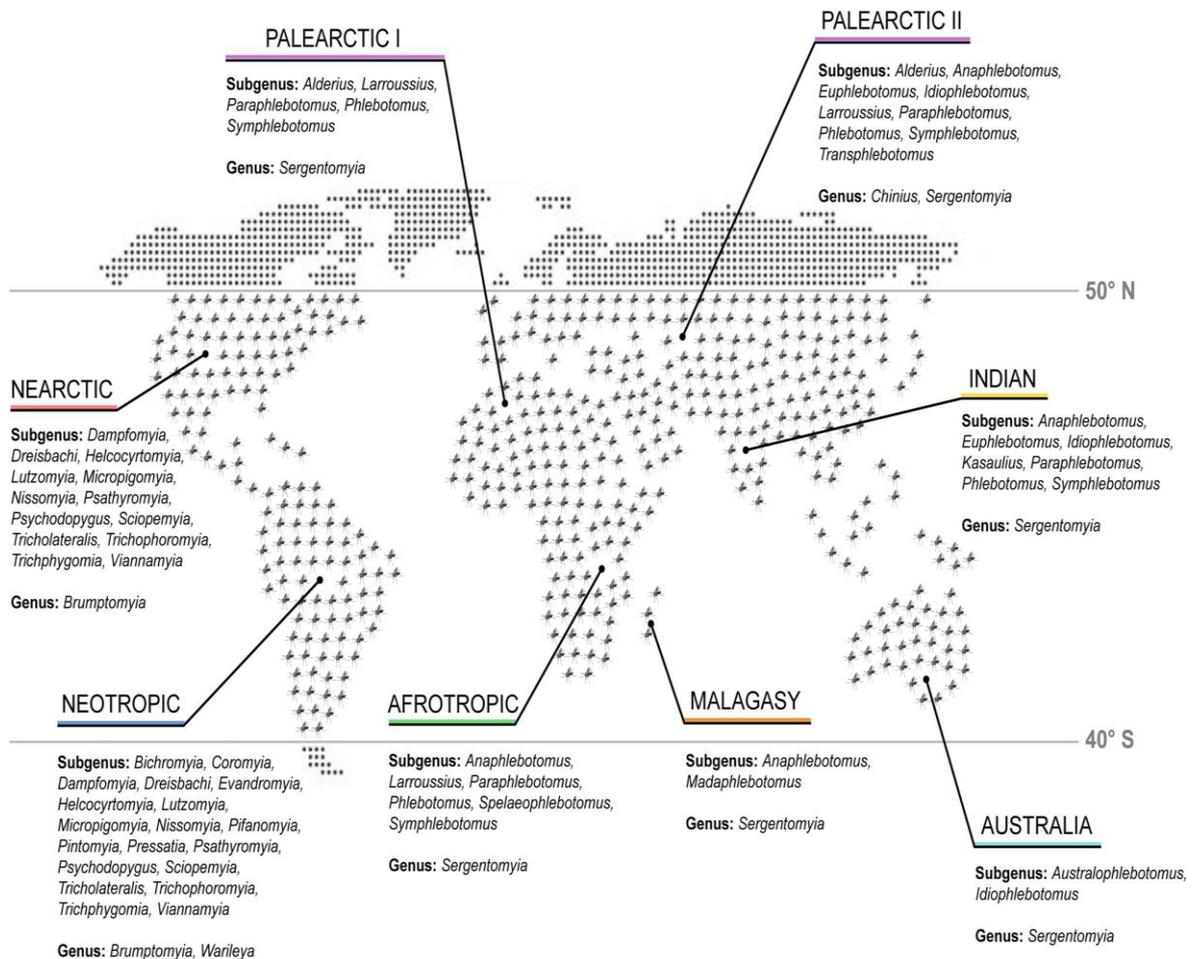
-Avec modification qualitative correspondant à un changement de phase au sein d'un cycle parasitaire (hôte intermédiaire : leishmaniose, trypanosomose) [24].

### **1.3. Les phlébotomes :**

Les phlébotomes sont des petits insectes connus pour leur rôle vecteur de plusieurs agents pathogènes (leishmanioses, des bactéries et des virus) qui affectent les humains et les animaux dans de nombreux pays du monde. Certains de ces virus sont associés à des épidémies ou à des cas humains sporadiques dans la région méditerranéenne [25].

#### **1.3.1. Répartition géographique des phlébotomes :**

Les phlébotomes ont une distribution mondiale entre (50° N et la latitude 40° S) à l'exclusion de la Nouvelle-Zélande et des îles du Pacifique. Dans l'ancien monde, leur répartition s'étend des régions méditerranéennes, afrotropicales, du Moyen-Orient et Orientales jusqu'à l'Asie centrale, et on les trouve dans le nouveau monde dans les régions néarctiques et néotropicales. Ils sont observés à différentes altitudes, de Jéricho, en Palestine (environ 300 mètres au-dessus du niveau de la mer) à Mashhad, en Iran (3 600 mètres au-dessus du niveau de la mer [26, 27,28]).

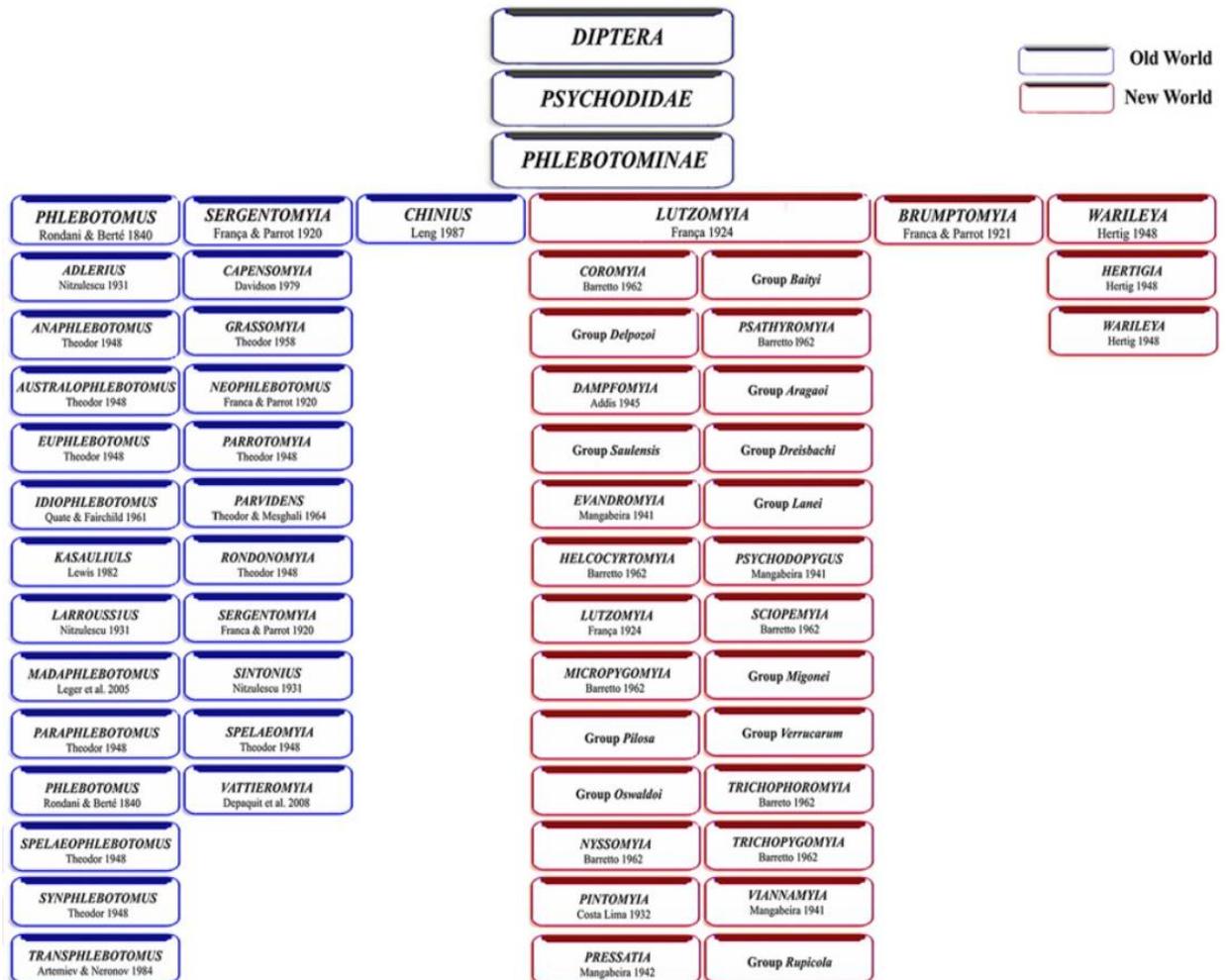


**Figure 1.1** : Distribution mondiale des genres et sous-genres des phlébotomes [28].

### 1.3.2 Taxonomie des phlébotomes :

Les phlébotomes appartiennent à l'embranchement des arthropodes, classe des Insectes ordres des Diptères, sous ordres des Nématocères, Famille des *Psychodidae*. La taxonomie des phlébotomes a connu deux périodes distinctes. Au cours de la première période, les taxons ont été distingués en fonction de l'analyse de certaines structures externes (par exemple, la structure des organes génitaux mâles, les indices de nervation des ailes et d'autres mesures externes, connues sous le nom de phlébotométrie). La deuxième période est caractérisée par l'utilisation des structures internes telles que les spermathèques, le cibarium et le pharynx [29].

La classification utilisée mondialement permet de diviser la sous-famille des *Phlebotominae* en six genres : trois genres de l'ancien Monde (*Phlebotomus* [13 sous-genres], *Sergentomyia* [dix sous-genres], et *Chinius* [quatre espèces]) et trois du nouveau Monde (*Lutzomyia* [26 sous-genres et groupes], *Brumptomyia* [24 espèces], et *Warileya* [six espèces]) [30,31].



**Figure 1.2** Classification des phlébotomes dans l'ancien et le nouveau monde [27]

A ce jour, 24 espèces de phlébotomes appartenant aux genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia* ont été recensées en Algérie [2,1].

Tableau .1 : Taxonomie des phlébotomes d'Algérie.

Genres	Sous-genres			
<i>Phlebotomus</i>	<b><i>Phlebotomus</i></b>	<b><i>Paraphlebotomus</i></b>	<b><i>Larrousius</i></b>	<b><i>Transphlebotomus</i></b>
	<p><b><i>P. papatasi</i></b> (Scopoli,1786).</p> <p><b><i>P. bergeroti</i></b> (Parrot, 1934)</p>	<p><b><i>P. sergenti</i></b> (Parrot, 1917)</p> <p><b><i>P. alexandri</i></b> (Sinton, 1928).</p> <p><b><i>P. chabaudi</i></b> (Croset,Abonnenc et Rioux, 1970).</p> <p><b><i>P. kazeruni</i></b> (Theodor et Mesghali, 1964)</p> <p><b><i>P. riouxi</i></b> (Depaquit, Léger et Killick-Kendrick, 1998)</p>	<p><b><i>P. ariasi</i></b> (Tonnoir,1921)</p> <p><b><i>P. chadlii</i></b> (Rioux, Juminer et Gibily 1966)</p> <p><b><i>P. perniciosus</i></b> (Newstead, 1911)</p> <p><b><i>P. longicuspis</i></b> (Nitzulescu,19)</p> <p><b><i>P. langeroni</i></b> (Nitzulescu, 1930)</p> <p><b><i>P. perfiliewi</i></b> (Parrot, 1930)</p>	<p><b><i>P. mascittii</i></b> (Grassi, 1908)</p>
<i>Sergentomyia</i>	<b><i>Sergentomyia</i></b>	<b><i>Parrotomyia</i></b>	<b><i>Grassomyia</i></b>	<b><i>Sintonius</i></b>
	<p><b><i>S. minuta</i></b> (Adler et Theodor,1927)</p> <p><b><i>S. fallax</i></b> (Parrot,1921)</p> <p><b><i>S. antennata</i></b> (Newstead,1912)</p> <p><b><i>S. schwetzi</i></b> (Adler, Theodor et Parrot, 1929)</p>	<p><b><i>S. eremitis</i></b> (Parrot et de Jolinière, 1945)</p> <p><b><i>S. lewisi</i></b> (Parrot, 1948)</p>	<p><b><i>S. dreyfussi</i></b> (Parrot,1933)</p>	<p><b><i>S. clydei</i></b> (Sinton, 1928)</p> <p><b><i>S. christophersi</i></b> (Sinton, 1927)</p> <p><b><i>S. tiberiadis</i></b> (Adler, Theodor et Louric, 1930)</p>

### 1.3.3. Morphologie des phlébotomes :

Les phlébotomes adultes sont de petite taille, mesurent de 2 à 3mm, de couleur claire, qui va du jaune pâle à brune à peine visible à l'œil nu [32]. Leurs corps est grêle, divisé en 3 parties, tête, thorax et abdomen : le thorax et l'abdomen sont plus minces et plus allongés La tête, petite et hypognathe, a des yeux sombres et bien visibles, sans ocelles.

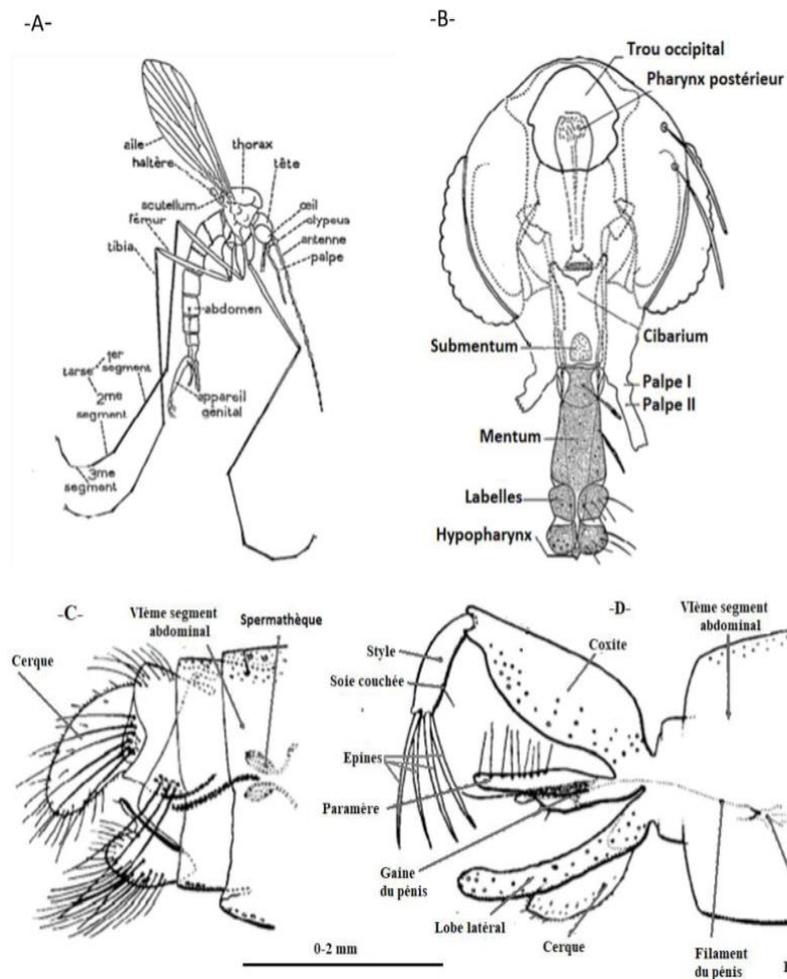
La tête est formée par une capsule chitineuse (épicrâne), un œil de chaque côté de la capsule chitineuse, et porte deux antennes, ces derniers sont au nombre de 16, pourvues de soies, les deux premiers segments ils ont une forme carrée alors que les autres 14 segments sont beaucoup plus longs et minces, constituant le flagellum. Les pièces buccales (probocis) formées chez la femelle par un labre, une paire de mandibules, une paire de maxilles, un hypopharynx et un labium. La trompe est attachée dorsalement au clypeus et centralement au cibarium, elle est encadrée par les palpes maxillaires et les antennes. Chez le mâle, la trompe a la même configuration que la femelle sauf qu'elle ne possède pas de mandibules, et les autres pièces buccales sont très fines et plus fragiles que chez la femelle [33,34,35,36]

-Le thorax forme avec la tête un angle de 45° ce qui donne à l'insecte un aspect bossu. Il se divise en prothorax, mésothorax et métathorax. Chaque segment porte une paire de pattes, le mésothorax est très volumineux, il porte les ailes tandis que le métathorax porte les balanciers. Les ailes sont lancéolées soutenues par des nervures longitudinales et transversales, ces nervures sont garnies d'écailles plumeuses ou squameuses, leur disposition permet de distinguer les différents genres de phlébotomes. Les ailes, au repos, sont élevées sur le thorax formant un angle de 45° environ. Les 3 paires de pattes sont articulées, longues et grêles, couvertes de soies [37,35, 38, 39].

- L'abdomen est cylindrique composé de dix segments, le premier est attaché au thorax, les sept premiers segments portent les stigmates respiratoires, tandis que, les trois derniers segments forment l'appareil génital qui est très développé chez le mâle, composée de trois prolongements : une paire de coxites sur lequel s'articulent les styles, une paire de pièces médianes, les paramères naissant à la base des coxites, une paire de prolongements ventraux appelés lobes latéraux et enfin,

soudés à la partie interne de ces derniers, deux lames membraneuses, les lamelles sous médianes entre lesquelles s'ouvre l'anus. Les gaines du pénis se situent entre les paramères et protègent deux filaments génitaux [35, 40].

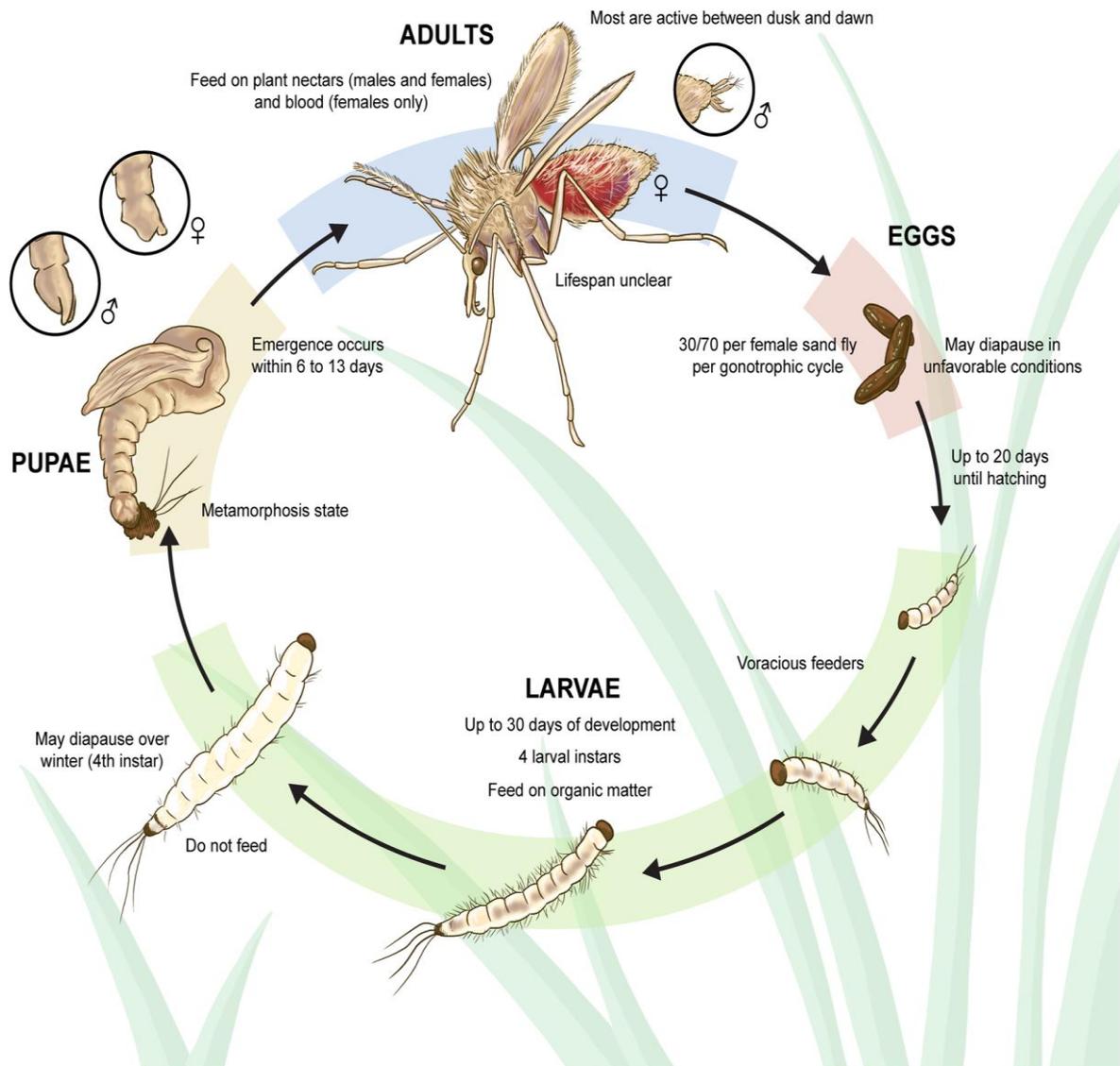
- L'appareil génital femelle est composé de trois organes pairs : deux ovaires, deux glandes annexes et deux spermathèques de morphologie variable, suivie d'un conduit plus au moins long, qui débouche dans l'atrium génital [41].



**Figure 1. 3** Morphologie des phlébotomes A. Schéma d'un phlébotome mâle, B. Vue ventrale de la tête d'un phlébotome C. Génitalia femelle, D. Génitalia mâle [42].

#### 1.3.4. Cycle de vie des phlébotomes :

Les phlébotomes subissent une métamorphose complète à travers quatre stades de développement : œufs, larves (4 stades), nymphes et adultes. Contrairement aux moustiques, les stades immatures nécessitent des habitats relativement humides et chauds, mais n'ont pas besoin d'eau stagnante pour achever leur croissance. En fonction des espèces, l'accouplement se produit, juste avant ou aussitôt après le repas sanguin. L'accouplement dure environ 30 secondes à 5 minutes, les œufs sont ensuite déposés dans un endroit sombre et relativement humide ce qu'on appelle les gîtes de repos, le nombre des œufs pondus varie de 30 à 70 en fonction de l'espèce. Pour *P. papatasi* maintenu à différentes températures, le nombre maximum d'œufs pondus par une seule femelle était de 115. L'éclosion se fait après 10 jours au moyen, (la température influence sur la durée de l'embryogenèse), mais certains peuvent avoir une période d'incubation prolongée jusqu'à de jours ou plus, surtout s'ils sont exposés à des conditions défavorables. L'éclosion donne naissance à des larves qui se transforment en nymphes qui restent fixées au substrat par l'exuvie larvaire. Les phlébotomes adultes émergent après sept à dix jours et le développement total de l'œuf à l'adulte nécessite de 35 à 60 jours en absence de diapause [43, 44,39, 45].



**Figure 1. 4 :** Cycle de vie des phlébotomes [28].

### 1.3.5. Activité des phlébotomes :

Les phlébotomes sont actifs toute l'année dans les régions tropicales, seulement pendant la belle saison dans les régions tempérées, l'activité pour la majorité des phlébotomes est nocturne au crépuscule exigeant des températures suffisamment élevées (19°C à 25°C°), en absence du vent 1 km /h, ils se déplacent par des vols silencieux courts par des petits bonds aériens interrompus par de brèves périodes de repos, ce qui a donné lieu à l'hypothèse qui dit que les phlébotomes ne se dispersent pas loin des sites de reproduction (les phlébotomes ne s'éloignent que de 100 mètres de leur habitat larvaire). Les phlébotomes sont très sensibles au vent

qui a une grande influence sur leurs déplacements. Certaines espèces de phlébotomes sont souvent attirées par la lumière de faible intensité, certaines sont volontiers endophiles et ils entrent dans les habitations et les abris d'animaux. Pendant la journée, les phlébotomes se cachent dans des zones retirées, sombres et relativement humides [26, 46, 44, 45].

#### **1.3.6. Longévité des phlébotomes :**

La longévité moyenne est estimée de 15 à 21 jours, et parfois peut atteindre 90 jours, elle est en fonction de la température (plus qu'elle est basse et douce, plus la durée de vie est élevée) et de l'humidité (plus qu'elle est élevée, plus la durée de vie est élevée). Les femelles vivent en moyenne deux semaines à deux mois et prennent généralement plusieurs repas sanguins. Les mâles ont une durée de vie plus courte que les femelles. Les causes de La mortalité des phlébotomes sont diverses ; les femelles meurent le plus souvent par épuisement lors de la ponte des œufs [40,45].

#### **1.3.7. Régime alimentaire des phlébotomes :**

Les phlébotomes adultes mâles et femelles se nourrissent de la sève, le nectar et le miellat de plantes, stockant des liquides riches en sucres et protéines, ils peuvent également aspirer la sève en perçant le parenchyme des feuilles. Selon les espèces, les femelles prennent généralement un à plusieurs repas sanguins, en plus des jus sucrés. Les éléments nutritifs du sang sont nécessaires à la maturation des œufs. Chaque espèce de phlébotome a ses propres préférences en matière d'hôtes, et la disponibilité des hôtes est un facteur important dans ces préférences. Les femelles, sont capables de se nourrir à partir d'humains, de chiens, de chevaux, de bovins, d'ovins, de porcs, de rongeurs et même d'oiseaux et les reptiles. Les femelles piquent les régions cutanées les plus sensibles et exposées telles que les oreilles, le nez, le cou le dessous des pieds et la queue [47,48, 2].

## **1.4. Lutte anti-phlébotomes :**

Différents types de méthodes de prévention peuvent être utilisés pour essayer de réduire et de maintenir les populations des phlébotomes à des densités faibles :

### **1.4.1. Prévention environnementale :**

Elle vise à modifier les habitats locaux pour les rendre moins favorables à la reproduction ou à la survie d'un vecteur particulier. Cette méthode s'est avérée particulièrement efficace pour limiter les populations de moustiques grâce aux interventions simples limitant l'accessibilité aux zones de reproduction aquatiques potentielles telles que les bassins de captation, les fûts, les réservoirs d'eau ouverts, les vieux pneus, et autres récipients [49]. Certaines réussites locales dans le contrôle de la population adulte d'un des phlébotomes, *P. argentipes*, ont été obtenues par des mesures simples telles que le plâtrage des trous dans les maisons et les étables où des sites de reproduction ont été identifiés [50].

### **1.4.2. Prévention mécanique :**

Le principe est basé sur l'utilisation de divers pièges conçus pour attirer et tuer les vecteurs, ou l'application de moustiquaires et des mailles (infusées ou non d'insecticides) pour limiter les chances de réussite de l'alimentation et de la transmission de pathogènes. Pour les phlébotomes, la perfusion d'insecticides semble être particulièrement importante, car ces vecteurs sont suffisamment petits pour passer à travers les mailles et les filets, de sorte qu'une barrière purement mécanique pourrait être inefficace [51].

### **1.4.3. Prévention chimique :**

Les produits chimiques ont été largement utilisés pour la lutte antivectorielle depuis le développement du DDT dans les années 1940. Cet insecticide a été utilisé à grande échelle dans les années 1950 et 1960, lors du programme sud-américain d'éradication du moustique *Aedes aegypti*, ce qui a permis de lutter efficacement contre la fièvre jaune et la dengue dans la région. Actuellement, deux grandes catégories d'insecticides chimiques sont disponibles pour la lutte antivectorielle : les larvicides (qui ciblent les stades immatures), notamment les régulateurs de croissance des insectes (RCI), par exemple, le pyriproxifène, le méthoprène, le

diflubenzuron) et les adulticides. Les RCI présentent des propriétés ovicides et larvicides et leur toxicité est relativement faible pour les humains, car ils affectent des processus de développement spécifiques aux insectes. Pour qu'ils soient efficaces, les RCI sont utilisés pour traiter les sites de reproduction des arthropodes vecteurs. Les adulticides sont dirigés contre les formes adultes et sont distribués soit par pulvérisation au sol, soit par pulvérisation résiduelle Intérieure (IRS) des murs des habitations humaines, soit par l'utilisation de matériaux traités aux insecticides (ITM) (tels que les moustiquaires), soit par des appâts toxiques en sucre attractifs (ATSB) [52].

## 1.5. Répartition géographique des phlébotomes en Algérie :

### 1.5.1. Genre *Phlebotomus* :

#### A. Sous-genre *Phlebotomus* Rondani, 1843 :

##### -*Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi*, Scopoli, 1786 :

Elle a une vaste distribution du nord au sud de l'Algérie avec une grande abondance dans les hauts plateaux et au nord du Sahara entre 27°/35° N et -4°/58° E. Elle est rencontrée des zones bioclimatiques humides à ultra-hyperarides [53,1].

##### -*Phlebotomus bergeroti* Parrot, 1934

Cette espèce est présente dans la partie sud de l'Algérie. Elle est rencontrée dans la zone bioclimatique hyperaride au Sahara central de l'Algérie (Tamanrasset et Illizi), *P. bergeroti* et *P. papatasi* sont souvent confondus dans les zones d'occurrence qui se chevauchent [1].

#### B. Sous-genre *Paraphlebotomus* Theodor, 1948 :

##### -*Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 :

Cette espèce a été signalée dans plusieurs régions de l'Algérie, du nord, jusqu'au Sahara central, dans les zones bioclimatiques humides et arides. [1].

##### -*Phlebotomus alexandri* Sinton, 1928 :

Elle a une vaste répartition géographique intéressant les régions paléarctiques et orientales et Sahara central (Tamanrasset et Illizi), sa répartition s'étend des zones subhumides jusqu'aux zones arides [38,1].

##### -*Phlebotomus kazeruni* Theodor and Masghali, 1964:

Cette espèce est rare en Algérie, jusqu'à présent, quelques femelles ont été capturées au nord à Constantine et Jijel, ainsi qu'au sud à Tamanrasset. Elle se rencontre dans les zones bioclimatiques subhumides et arides. [38,1].

**-*Phlebotomus chabaudi* Croset, Abonnenc and Rioux, 1970 :**

Elle a été signalée dans les régions des steppes présahariennes, vallées basses et arides des Aurès et dans les régions telliennes. On la trouve dans les zones bioclimatiques subhumides à arides [38,1].

**-*Phlebotomus riouxi* Depaquit, Leger and Killick-Kendrick, 1998:**

Cette espèce a été capturée en Algérie dans la zone bioclimatique aride [54].

**C- Sous-genre *Larroussius* Nitzulescu 1931 :**

**-*Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 :**

Cette espèce a été observée sur tout le territoire Algérien, dans le Tell, Constantinois, Kabylie, Aurès, hauts plateaux, steppe présaharienne et Sahara central. Cette espèce se rencontre principalement de la zone bioclimatique humide à aride mais peut également être rencontrée dans les zones bioclimatiques sahariennes, mais avec une faible densité par rapport aux régions du nord [38,1].

**-*Phlebotomus longicuspis* Nitzulescu, 1930 :**

Cette espèce est généralement signalée en sympatrie avec *P. perniciosus* dans les zones bioclimatiques subhumides à Sahariennes [1].

**-*Phlebotomus perfiliewi* Parrot, 1930 :**

Cette espèce a une distribution Tellienne, est fréquente dans le Constantinois et l'Oranie et elle est signalée avec des densités moins importantes en Kabylie. On la rencontre dans les régions subhumides, arides et semi-arides à des latitudes allant jusqu'à 1 200 mètres au-dessus de la mer [38,1].

**-*Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 :**

L'aire de répartition de cette espèce est essentiellement Tellienne, elle est rencontrée dans les zones bioclimatiques humides à arides, principalement dans les zones riches en végétation composée d'olivier, chênes. En Algérie (Grande Kabylie), elle a été signalée à 1 400 mètres d'altitude [38].

**-*Phlebotomus chadlii*, Rioux, Juminer et Gibily, 1966 :**

Cette espèce a été rapportée dans le Tell : Grande Kabylie, Algérois, Oranie, la localisation la plus méridionale de l'espèce est représentée par les Aurès. Elle se rencontre entre les zones bioclimatiques humides et hyperarides [38,1].

**-*Phlebotomus langeroni*, Nitzulescu, 1930 :**

Elle est considérée comme espèce endémique d'Afrique du nord rare en Algérie. Elle a été signalée dans quatre stations sur 201 stations lors de l'étude réalisée par Dedet et al, 1984 en Algérie. Elle est répandue dans les étages bioclimatiques humides à arides [38,1].

**D-Sous-genre *Transphlebotomus* Artemiev 1984 :**

**-*Phlebotomus mascittii*, Grassi, 1908 :**

La présence de cette espèce a été enregistrée par la capture d'un seul spécimen femelle dans une zone bioclimatique humide à Tizi Ouzou en Algérie [55].

**1.5.2. Genre *Sergentomyia* :**

**A. Sous-genre *Sergentomyia* :**

**-*Sergentomyia minuta parroti*, Adler et Theodor, 1927 :**

Cette espèce est connue d'être l'espèce la plus fréquente en Algérie. Elle a été rencontrée dans la totalité du territoire nationale du nord au Sud et d'est en ouest dans tous les étages bioclimatiques et à des altitudes arrivant à 1200 mètres [38].

**-*Sergentomyia fallax*, Parrot, 1921 :**

Elle se rencontre préférentiellement dans les zones sud, steppiques, présaharienne et dans les contreforts de l'Atlas saharien, elle est exceptionnelle au Tell [38].

**-*Sergentomyia antennata*, Newstead, 1912 :**

Cette espèce est localisée dans les steppes arides présahariennes et au Sahara central, mais on peut la rencontrer dans tous les étages bioclimatiques de l'Algérie [38,1].

**-*Sergentomyia schwetzi*, Adler, Theodor et Parrot, 1929 :**

Elle a été rapportée au sud Algérien, elle peut être rencontrée dans les zones bioclimatiques semiarides à hyperarides [56, 57].

**B. Sous genre *Parrotomyia*:**

**-*Sergentomyia eremitis*, Parrot et De Jolinière, 1945 :**

Elle a été signalée en Algérie dans une zone bioclimatique hyperaride à In Amgel à Tamanrasset [38].

**-*Sergentomyia lewisi* Parrot, 1948 :**

Cette espèce a été rapportée en Algérie dans deux zones bioclimatiques, semi arides et hyperarides elle a été signalée à Biskra, Djanet, Ihrir et à Tamanrasset [38].

**C. Sous-genre *Grassomyia* :**

**- *Sergentomyia dreyfussi* Parrot, 1933 :**

Elle a été signalée en Algérie dans plusieurs régions, elle peut être rencontrée de l'étage aride à l'étage hyperaride [1].

**D. Sous-genre *Sintonius* :**

***Sergentomyia clydei* Sinton, 1928 :**

Cette espèce a été rapportée en Algérie dans les régions arides à hyperarides [1]. Elle a été récoltée dans la steppe nord saharienne dans l'étage bioclimatique saharien et au Sahara central au Tassili, son aire de répartition s'étend de la région aride à hyperaride [38,1].

***Sergentomyia tiberiadis* Adler, Theodor, and Lourie, 1930:**

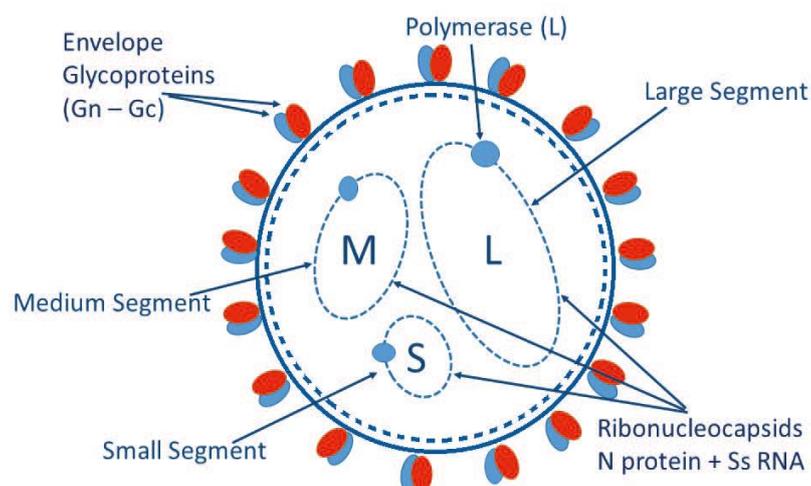
Cette espèce a été signalée dans le Sahara central algérien où se situe la zone bioclimatique hyper aride [38,1].

## CHAPITRE 2

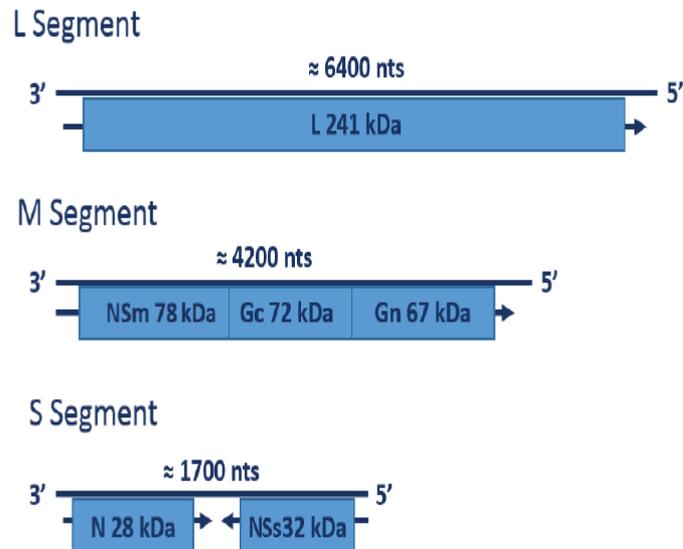
### GENERALITES SUR LES PHLEBOVIRUS ET LES MALADIES TRANSMISES PAR LES PHLEBOTOMES

#### 2.1. Définition des phlébovirus :

Les phlébovirus sont des virus sphériques enveloppés. Le génome est formé d'un ARN monocaténaire de sens négatif. L'ARN est composé de 3 segments, grand (L), moyen (M) et petit (S) qui codent respectivement l'ARN polymérase ARN-dépendante, les glycoprotéines d'enveloppe et la nucléoprotéine. Les segments d'ARN simple brin ont des taux de mutation élevés en raison du manque d'activité de relecture de la polymérase virale, ce qui peut entraîner une dérive génétique à la suite d'accumulation des mutations ponctuelles. L'organisation du génome sous forme de trois segments favorise le réassortiment du génome (déplacement génétique), un événement évolutif important caractérisé par l'échange de matériel génétique entre deux souches virales distinctes lors de la co-infection d'une seule cellule eucaryote, ce qui aboutit à la création d'un virus chimérique présentant potentiellement des caractéristiques uniques, notamment une virulence plus importante [5].



**Figure 2.1** schéma représentatif des phlebovirus [58].

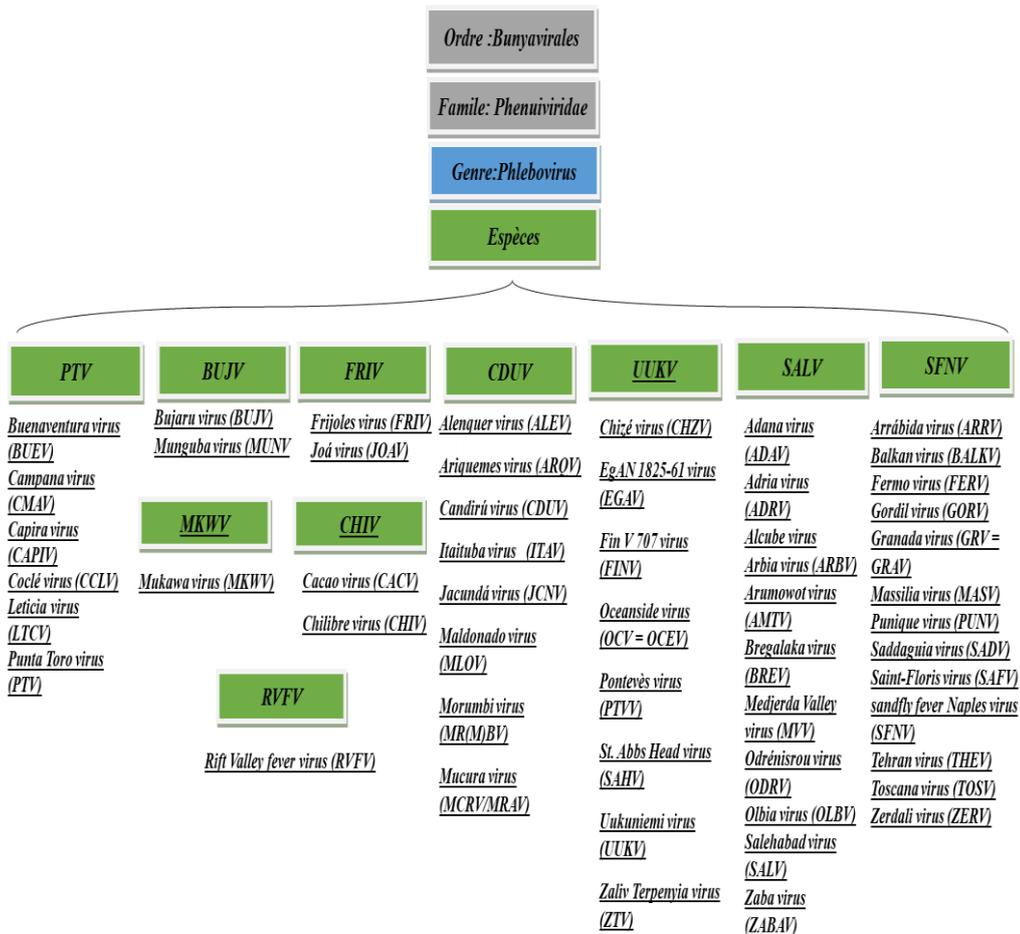


**Figure 2.2** Stratégies de codage des segments du génome des phlébovirus. Les ARN génomiques sont représentés par des lignes fines (le nombre de nucléotides est indiqué au-dessus de la ligne) et les ARNm par des flèches [58].

## 2.2. Classification et taxonomie :

Les phlébovirus, appartiennent à l'ordre des *Bunyavirales* la famille des *Phenuiviridae* qui regroupe 8 genres : *Beidivirus*, *Goukovirus*, *Horwuvirus*, *Hudivirus*, *Hudovirus*, *Mobuviru*, *Phasivirus*, *Phlebovirus*, ce dernier comprend 70 virus répartis sur les 10 espèces suivantes : BUJV, CDUV, CHIV, FRIV, MKWV, RVFV, SALV, PTV, SFNV, UUKV [59].

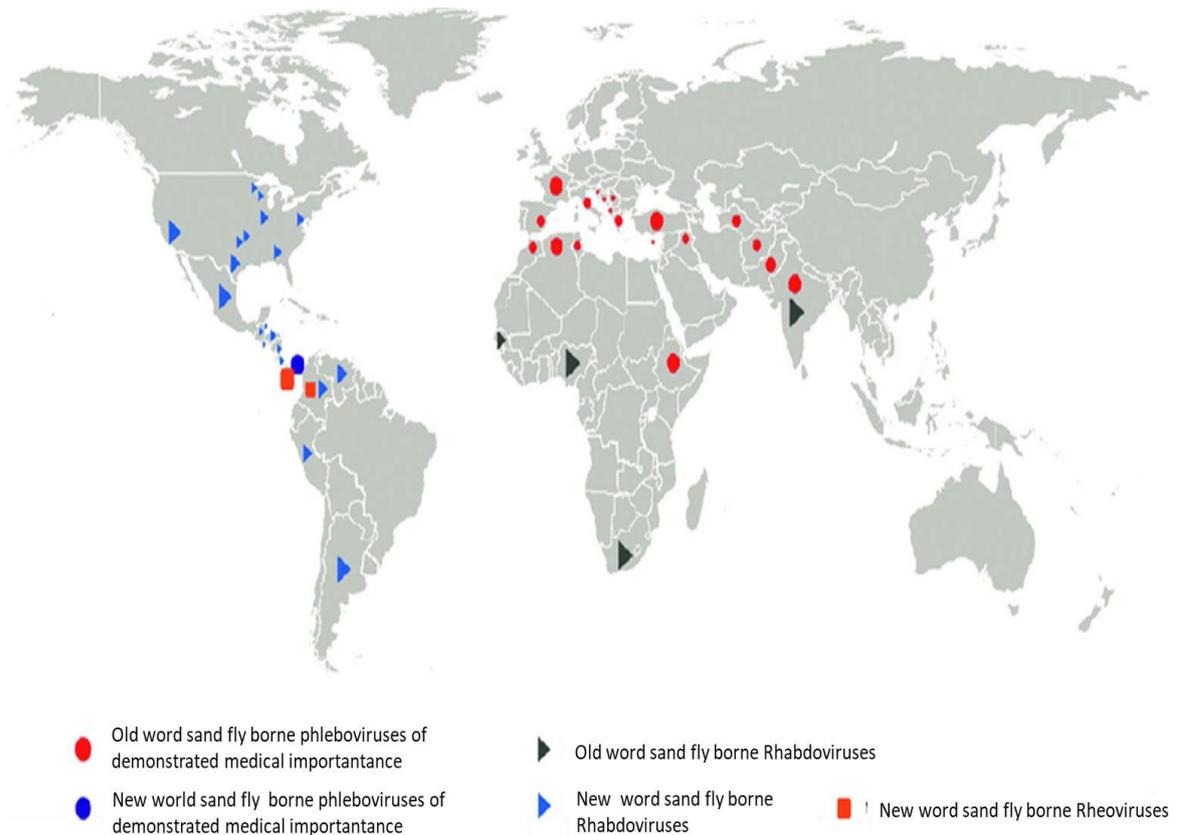
Les phlébovirus de l'ancien monde, transmis par les phlébotomes peuvent être classés, grâce à leurs propriétés antigéniques, en deux complexes sérologiques : le complexe regroupant des virus provisoires SFSV et CFUV, le complexe des virus SFNV et SALV [60].



**Figure 2.3** : Classification des phlebovirus [59].

### 2.3. Répartition géographique des phlébovirus transmis par les phlébotomes :

Les phlébovirus transmis par les phlébotomes sont très répandus dans l'ancien et le nouveau monde, notamment dans les régions tropicales et subtropicales, ainsi que dans les zones tempérées comme l'Europe du Sud, l'Asie, l'Afrique, l'Australie et l'Amérique centrale et du Sud. Leur répartition suit la répartition des espèces des phlébotomes vecteurs. Les maladies virales transmises par les phlébotomes augmentent pendant l'été en raison de l'activité des espèces de phlébotomes vecteurs, touchant à la fois les populations urbaines, périurbaines et rurales [61].



**Figure 2.4** : Distribution géographique des infections virales transmises par les phlébotomes [61].

## 2.4. Les phlébovirus transmis par les phlébotomes :

### 2.4.1. Les phlébovirus de l'ancien monde :

#### 2.4.1.1. Le virus Naples :

En 1944, pendant la Seconde Guerre mondiale, le virus de Naples fut isolé pour la première fois à partir du sang d'un soldat malade à Naples. L'absence de relations immunologiques entre SFNV et SFSV a été démontrée pour la première fois lors de tests d'immunité croisée chez l'homme, puis confirmée par un test de neutralisation et de fixation du complément [62]. Comme les deux virus étaient différents en matière de propriétés antigéniques, aucune protection croisée n'a été observée et les patients ont donc pu être infectés par les deux virus successivement.

Le virus Naples était endémique dans le bassin méditerranéen, le Moyen-Orient, l'Asie centrale et l'Europe. Toutefois, la détection la plus récente du virus de Naples

a été signalée à Chypre [63], et en Afghanistan [64], mais pas dans les régions endémiques, ce qui montre que la circulation a considérablement diminué dans les régions auparavant endémiques. Autres que *P. papatasi* (Egypte), le virus a été isolé à partir de *P. perniciosus* en Italie [65], et de *P. perfilliewi* en Serbie [66].

#### **2.4.1.2. Le virus Toscana (TOSV) :**

En 1971, fut isolé pour la première fois au centre de l'Italie à partir de *P. perniciosus* [65], puis à partir du liquide cébrospinal de citoyens suédois et américains rentrant chez eux après avoir visité le Portugal et l'Italie, respectivement, ce qui a permis de donner les premières preuves de la pathogénicité humaine du TOSV [67, 68].

Le TOSV est le phlébovirus le plus important sur le plan médical, puisqu'il est classé dans le top 3 des agents étiologiques qui causent des méningites aseptiques (après les entérovirus et les herpès virus (virus de l'herpès simplex 1 et 2 et virus de la varicelle et du zona) [69]. C'est le seul SBP qui cause des infections neurologiques, après une brève période d'incubation, le début est brutal, avec des symptômes non spécifiques de maladie fébrile virale, qui peuvent ou non être associés à des manifestations du système nerveux central (SNC) (méningite aseptique ou encéphalite). Malgré que la grande majorité des cas aient sont bénins, certains cas graves d'infections par le TOSV ont été décrits [71].

A ce jour, Trois lignées génétiques ont été identifiées, connues sous les noms de A, B et C [71]. La lignée (A) a été rapportée jusqu'à présent en Italie, France, Turquie, Tunisie et Algérie à partir de cas humains et de phlébotomes [69, 12, 7, 72]. Des souches de la lignée (B) ont été décrites au Portugal, Espagne, France, Maroc, Croatie et en Turquie [69, 73, 8, 10, 72]. Des souches de TOSV appartenant à la lignée (C) ont été signalées en Croatie et en Grèce [74, 73,75].

#### **2.4.1.3. Le virus Sicilien (SFSV) :**

Le virus est endémique dans le bassin méditerranéen, le Moyen-Orient, l'Asie centrale et l'Europe. Il fut isolé pour la première fois à partir du sérum de soldats malades en Égypte en 1943, pendant la Seconde Guerre mondiale, par Albert Sabin. Plus tard, il l'a isolé à nouveau en Sicile lors d'une épidémie d'une maladie fébrile chez les troupes de l'armée américaine et il a été démontré que les deux

agents étiologiques étaient identiques sur la base de tests d'immunité croisée chez des volontaires, *P. papatasi* a été identifié comme vecteur [76].

L'infection par ces deux virus (Sicilien et Naples) se caractérise par un tableau clinique quasiment identique. Après une période d'incubation de 3 à 5 jours, les patients présentent généralement des symptômes pseudo-grippaux tels que fièvre, céphalées, anorexie, douleurs rétro-orbitaires, myalgies et malaise. Les personnes infectées développent une leucopénie marquée caractérisée par une lymphopénie initiale suivie d'une neutropénie. La durée de la fièvre est de 2-3 jours. Le virus ne se trouve pas dans la région céphalo-rachidienne et aucune mortalité n'a été signalée dans des milliers de cas cliniquement observés, bien que la période de convalescence puisse être prolongée de plusieurs semaines [77].

#### **2.4.1.4. Le virus Adria :**

Le virus a été détecté pour la première fois en Albanie en 2005 [78]. Le séquençage du gène polymérase a montré que le virus était génétiquement lié au virus SALV. Ce virus est le premier et le seul virus du groupe SALV, qui est associé à une maladie humaine après la détection d'ARN viral étroitement lié au virus Adria dans le sang d'un bébé fiévreux en Grèce [79].

#### **2.4.1.5. Autres Phlébovirus :**

Plusieurs phlébovirus transmis par les phlébotomes de l'ancien monde ont été découverts, quoique la plupart ne sont pas encore classés par ICTV, mais ils appartiennent tous à l'une des trois espèces connues : SFNV, SFSV ou SALV.

##### **2.4.1.5.1. Les autres phlébovirus de l'ancien monde :**

###### **A. Phlébovirus de l'espèce (SFNV) :**

La grande diversité génétique observée dans les espèces (SFNV) a conduit à proposer une subdivision en quatre groupes. Dans le sous-groupe I, on trouve le virus Tehran (Iran), le virus Zerdali (Turquie) et la souche YU 8-76 du SFNV (Serbie) ; le sous-groupe II qui regroupe les trois génotypes de TOSV, le sous-groupe III contient le SFNV. Le virus Massilia (France), le virus Arrabia (Portugal),

le virus Granada (Spain) et le virus Punique (Tunisie), sont regroupées dans le sous-groupe IV, [13, 80, 81, 82, 83, 76, 84].

### **B. Phlébovirus de l'espèce (SFSV) :**

D'après les analyses génétiques et phylogénétiques, les virus du groupe des virus SFSV /Corfou ou espèces provisoires, peuvent être divisés en deux lignées : (i) La lignée I comprend les virus SFSV ainsi que le virus Dashli nouvellement isolé [85]. (ii) La lignée II comprenant le virus Corfou et le virus Toros, qui ont été isolés respectivement en Grèce et en Turquie [82, 86].

### **C. Phlébovirus de l'espèce Salhabed :**

L'espèce Salhabed, initialement regroupait uniquement le virus Salhabed et le virus Arbia, a connu une augmentation considérable du nombre de virus appartenant à cette espèce, suite à la découverte d'un nombre important de virus lié à cette espèce comme les virus, Adana, Alcube et Medjerda Valley qui sont isolés en Turquie, Portugal et Tunisie respectivement [81,87, 88]. En plus de plusieurs virus qui ne sont pas isolés, mais détectés suite au séquençage d'une partie de leurs génomes comme les virus, Adria en Albanie et Grèce, Edirna en Turquie et Olbia en France [78,79, 89, 90].

## **2.4.2. Les phlébovirus du nouveau monde :**

### **2.4.2.1. Le virus Punta Toro :**

En 1966, le virus de Punta Toro a été découvert dans le sang d'un soldat participant à un entraînement militaire dans la jungle de la zone du canal du Panama [91]. Du point de vue clinique, les symptômes du PTV sont similaires à ceux des fièvres tropicales aiguës courantes en Amérique tropicale, caractérisées par la fièvre, les céphalées, les douleurs rétro-orbitaires, les myalgies, la leucopénie et les lombalgies, à l'exception de l'éruption cutanée, qui était plus fréquente chez les patients atteints de dengue que chez les patients atteints de PTV lors une étude panaméenne [92].

#### **2.4.2.2. Les autres phlébovirus du nouveau monde :**

En 2009, le virus Cocle (espèce Punta Toro) a été isolé du sérum d'un patient fébrile à Cocle, au Panama [91].

Au Brésil, Panama et Pérou, un grand nombre de phlébovirus ont été isolés à partir des phlébotomes, une partie de ces virus a été classée dans l'un des cinq groupes ou espèces : Punta Toro, Candiru, Bujaru, Tapara et Frijoles. Cependant, ceux qui n'ont pas été classés, ont été regroupés dans la catégorie des espèces provisoires. Les virus de l'espèce Candiru (Oriximina, Turuna et Ariquemes), ont été isolés à partir de *Lutzomyia* sp. au Brésil, et le virus Nique a été isolé à partir de l'espèce *Lu. panamensis* à Madre de Dios, au Pérou [93,94].

#### **2.4.3. Les phlébovirus au Maghreb :**

Dans les pays du Maghreb, des phlébovirus transmis par les phlébotomes ont été détectés et isolés au :

##### **A. Maroc :**

Le TOSV a été le premier et le seul phlébovirus transmis par les phlébotomes détectés au Maroc à partir de phlébotomes infectés du genre *Phlebotomus* puis à partir de *P. sergenti* [8,9]. Plus tard, le TOSV a été isolé deux fois par le même auteur à partir de phlébotomes non identifiés [10,11].

##### **B. Tunisie :**

Un nouveau phlébovirus transmis par les phlébotomes, nommé Punique virus, a été découvert et isolé chez les phlébotomes du sous-genre *Larroussius*. Par ailleurs, le virus SFN-like et le virus SFSV (provisoirement nommé virus Utique) ont également été détectés dans la même étude [13]. Par la suite, 2 souches de TOSV ont été isolées à partir de *P. perniciosus* [7]. Plus tard, le TOSV et le SFSV ont été détectés dans le liquide céphalorachidien (LCR) de deux patients, tandis que, le punique a été détecté chez les phlébotomes [95]. Après cela, trois autres nouveaux phlébovirus transmis par les phlébotomes ont été découverts en Tunisie : (i) le virus

Saddaguia apparenté aux virus Massilia et Granada, (iii) le virus de la vallée de Medjerda membre du complexe viral SALV [88,96].

Récemment, une étude entomologique a montré une Co-circulation du TOSV et de *L. infantum* dans un même village en Tunisie [20].

Des études de séroprévalence ont montré la présence d'anticorps contre le virus SFSV dans 1,3% des sérums humains testés en Tunisie, tandis qu'au Maroc des anticorps anti SFSV et SFNV ont été détectés à des taux de 5,7% et 2,9%, respectivement [97]. Des anticorps anti-SFSV ont été détectés dans 31% des sérums de rongeurs et d'insectivores collectés en Tunisie [98] et dans 9,4% des sérums de rongeurs et d'insectivores collectés au Maroc [99]. Une étude réalisée en Tunisie de 2003 à 2009 a montré que 10% des patients atteints d'infections du SNC étaient causés par le TOSV [100].

### **C. Algérie :**

En Algérie, quelques études sur les phlébovirus transmis par les phlébotomes ont été réalisées et publiées, le premier virus transmis par les phlébotomes détecté était un virus génétiquement lié au virus sicilien à partir d'un pool de femelles *P. ariasi*, à Tizi-Ouzou [14]. Par la suite, une autre étude menée dans deux régions (Tizi-Ouzou et Tipaza) a décrit deux pools positifs, l'un pour l'ARN du virus de Naples chez *P. longicuspis* et l'autre pour l'ARN du virus de type Sicilien chez *P. papatasi*, respectivement [15]. Récemment, le TOSV a été détecté et isolé à Draa El Mizan à partir d'un pool de phlébotomes infectés [12].

Trois études de séroprévalence humaine ont été menées dans le nord de l'Algérie, la première à Larbaa Nath Iraten, qui a rapporté une prévalence de 5% d'anticorps contre le SFSV [14]. Les anticorps contre le SFNV ont été détectés à des taux de 10,6% et 21,6% dans la deuxième étude, qui a été menée à Larbaa Nath Iraten et Bousmail respectivement [15]. L'étude la plus récente à Draa El Mizan a indiqué que 50% des sérums humains testés étaient positifs pour le TOSV [12].

Pour les animaux, en Kabylie, 93 sérums ont été testés, 4,5% se sont avérés avoir des anticorps contre le TOSV [17].

Récemment une étude sérologique sur des chiens, réalisé dans plusieurs régions d'Algérie elle a montré que 4.56% des chiens testés étaient positifs pour le TOSV et 20% pour les phlébovirus [18].

## **2.5. Sources de contamination et modes de transmission :**

### **2.5.1. Modes de transmission :**

Les phlébovirus sont des agents infectieux repartis mondialement, transmis par les tiques, les moustiques et les phlébotomes. La plupart du temps, les phlébovirus sont transmis par les phlébotomes lors du repas sanguin [101]. Les femelles adultes de phlébotomes ont besoin d'au moins un repas sanguin pour le développement de leurs œufs [44]. Des études ont permis la détection des phlébovirus chez les mâles et les femelles, ce qui est expliqué par une transmission trans-ovarienne (verticale) ou par une transmission vénérienne (horizontale), ces deux modes de transmission jouent un rôle essentiel dans le cycle naturel des phlébovirus. Ces deux modes ont été prouvés expérimentalement au laboratoire, pour le virus TOSV chez l'espèce *P. perniciosus* [102,103].

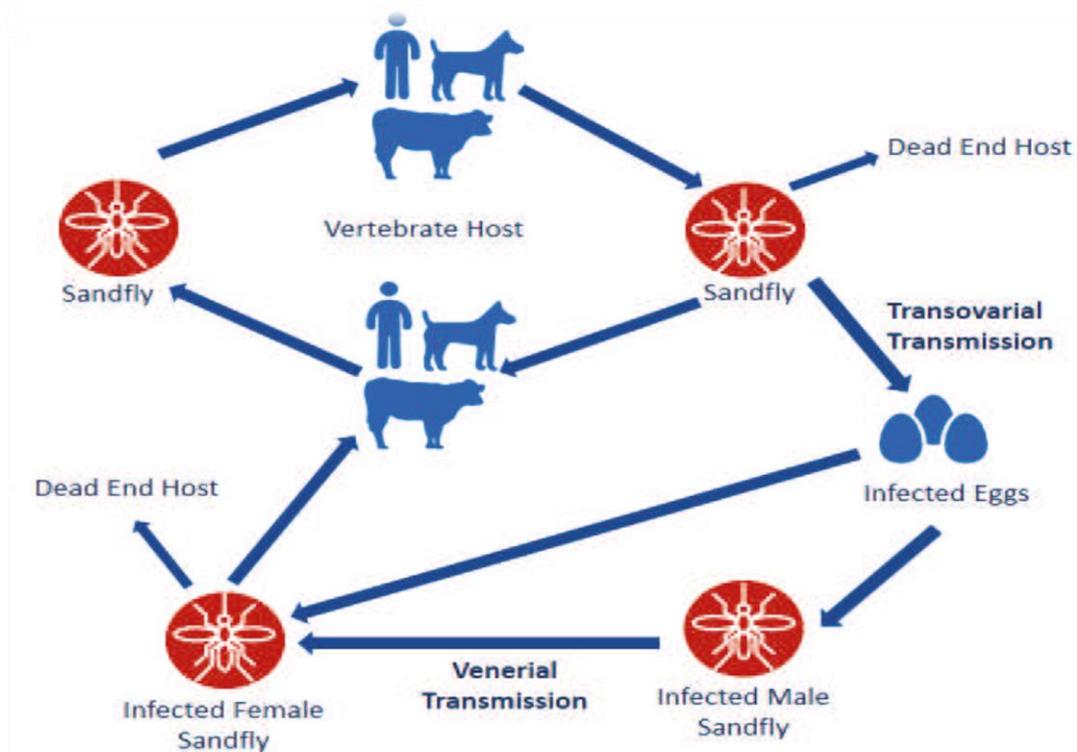
Il semble que le maintien et la transmission SBPs, dépendent de la présence d'espèces vectrices appropriées et de leur abondance, puisqu'il n'existe pas de réservoir établi. Cependant l'infection expérimentale par le TOSV a montré une diminution progressive des taux d'infection virale observée de génération en génération dans les colonies de phlébotomes, ce qui suggère que le maintien indéfini de l'infection par transmission verticale ou vénérienne ne peut pas être obtenu. Par conséquent, l'existence de réservoirs supplémentaires doit être envisagée [44].

### **2.5.2. Réservoirs :**

Malgré les études qui ont permis la détection sporadique des phlébovirus chez les moutons, souris de bois, renard et chauvesouris, il n'y a pas de réservoirs définis par certitude pour les phlébovirus, il a été démontré que lors d'infections par TOSV, l'homme ne peut jouer le rôle réservoir à cause de la virémie transitoire qui caractérise l'infection [25]. Les phlébovirus ont été identifiés et isolés chez les humains et les phlébotomes, les autres données rapportées pour les vertébrés non humains consistent en des résultats de séroprévalence sans preuve d'un rôle dans le cycle du virus dans la nature [25]. En raison des taux élevés de détection d'anticorps anti TOSV et de son ARN, chez la population canine en Turquie et Tunisie, les chiens peuvent jouer le rôle d'un éventuel réservoir de TOSV [104]. Des

anticorps anti-TOSV ont également été révélés chez des chevaux, des chats, des chiens, des moutons, des porcs, des vaches et des chèvres en Espagne [105]. Chez des chiens vivant en Corse [106], et en Algérie [17,18]. Bien qu'il n'y ait pas de preuves directes de l'infection des vertébrés par des phlébovirus transmis par les phlébotomes autres que le TOSV, des taux élevés d'anticorps neutralisants chez divers mammifères démontrent une forte exposition aux phlébovirus en Tunisie et en Turquie [107, 104].

En conclusion, à ce jour, il n'existe aucune preuve probante qu'une espèce de vertébrés soit un réservoir naturel des phlébovirus. Le cycle naturel des phlébovirus est mal connu [108], et les espèces de phlébotomes compétentes pourraient jouer le rôle de réservoirs des phlébovirus dans le cycle viral [44]. La théorie dominante pour le réservoir et le fait que l'Homme et les espèces de vertébrés sont des hôtes sans avenir (culs de sac épidémiologique).



**Figure 2.5** : Différents modes de transmission des phlébovirus [24].

## **2.6. Technique de diagnostic des phlébovirus appliquées aux phlébotomes :**

### **2.6.1. Diagnostic virologique :**

Consiste sur la recherche du virus par isolement sur culture cellulaire, et la recherche des composants du virus par biologie moléculaire, basée sur la détection des acides nucléiques avec leurs grandes sensibilités et spécificités, et comme ces techniques détectent des séquences d'acides nucléiques spécifiques, les tests de diagnostic basés sur les acides nucléiques peuvent être appliqués à la détection de toute infection virale [109].

#### **2.6.1.1. Diagnostic moléculaire :**

##### **2.6.1.1.1. Polymerase chain reaction (PCR) :**

Le diagnostic moléculaire (PCR) est devenu un outil indispensable au laboratoire au point où elle est maintenant acceptée comme l'étalon-or pour la détection d'acides nucléiques d'origines diverses et elle est devenue un outil essentiel dans les laboratoires de recherche [110].

La détection des acides nucléiques du virus est un outil de diagnostic plus sensible, évitant l'utilisation d'équipements spécialisés pour l'isolement du virus et fournissant des résultats plus rapides et plus précis. Cependant, plusieurs aspects doivent être pris en compte afin d'obtenir des résultats fiables, comme le temps de prélèvement des échantillons, car les phlebovirus sont très fragiles à la chaleur [111].

#### **A. PCR en Temps Real :**

Elle se base sur l'amplification de l'ADN complémentaire (ADNc) obtenu à partir de l'ARN viral en temps réel. La mixture contient la transcriptase inverse, la polymérase, et les amorces (spécifiques à la classe/souche virale ou hexamères aléatoires) pour l'amplification de l'ADNc, et les réactifs nécessaires. L'action de l'enzyme transcriptase inverse implique la formation d'ADNc double brin, suivie de son amplification par une PCR. Il existe actuellement plusieurs enzymes transcriptase inverse et polymérase efficaces, plus robustes et présentant une haute-fidélité. Le colorant Sybr-Green et la sonde TaqMan sont les plus couramment utilisés pour la détection des produits d'amplification. Le colorant Syber-Green se lie aux molécules d'ADN double brin qui se forment dans la réaction

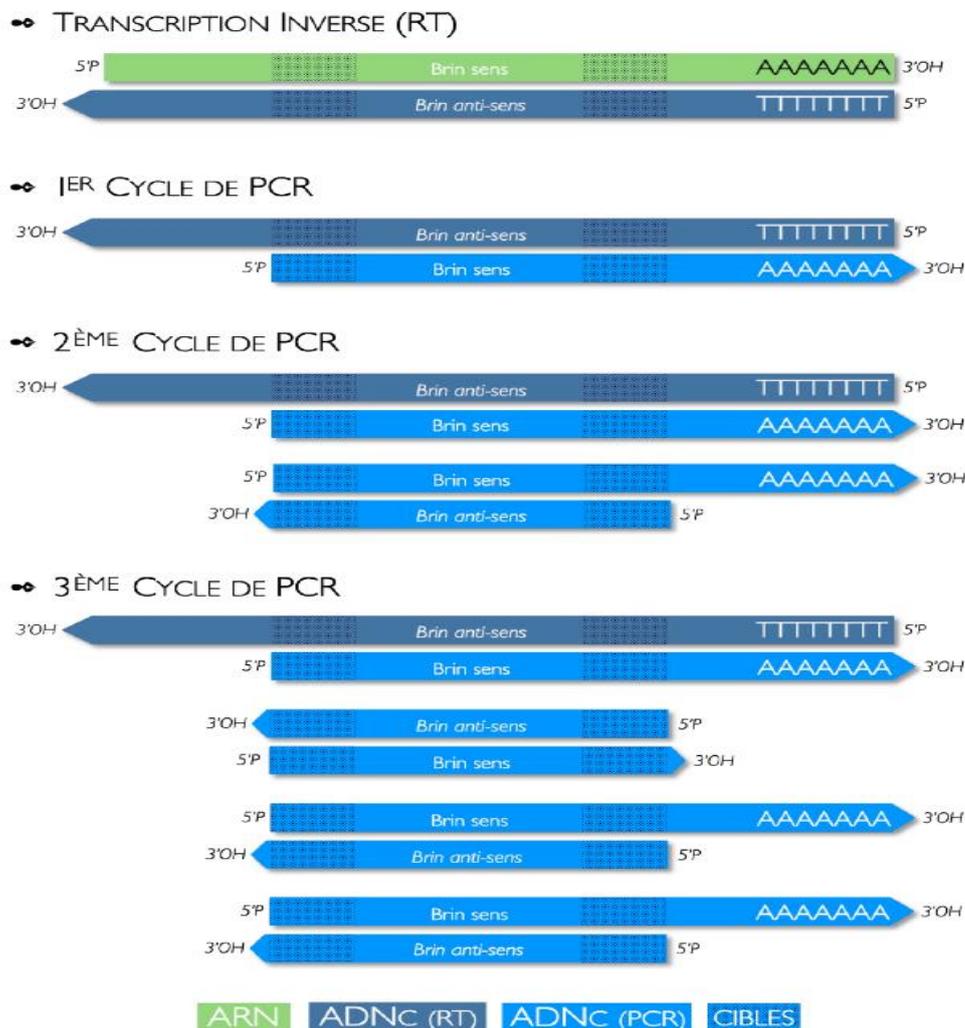
et présente une fluorescence accrue qui peut être enregistrée et qui est directement proportionnelle au produit formé. L'utilisation de la sonde TaqMan permet l'amplification spécifique d'un virus et l'identification multiplexée de différents virus. La sonde TaqMan est une petite molécule d'ADN avec un colorant fluorescent fixé à une extrémité et un quencher à l'autre. La séquence de la sonde est complémentaire de l'ADNc provenant de l'ARN viral et s'y lie pendant l'hybridation de l'amorce. L'extension de l'amorce par la polymérase entraîne le déplacement de la sonde TaqMan et son hydrolyse, ce qui conduit à la libération du colorant fluorescent, dont la fluorescence peut être enregistrée et elle est proportionnelle à l'amplification. En raison de la spécificité de la séquence, de la disponibilité d'une variété de colorants fluorescents et de machines capables d'enregistrer plusieurs longueurs d'onde de fluorescence, un mélange de différents virus peut être détecté dans la même réaction [112].

La PCR en temps réel est la dernière version de diagnostic moléculaire du TOSV et elle a progressivement remplacé les techniques de PCR classiques, fournissant des résultats en quelques heures et améliorant la sensibilité (710 copies d'ADNc) et la spécificité du test. Elle est également spécifique à d'autres phlébovirus importants, tels que SFSV, SFNV et RVFV [113]. Ce test moléculaire permet de diminuer le risque de contamination, puisqu'il y a moins de manipulation des échantillons contenant de l'ARN viral ou des amplicons. De plus, la PCR en temps réel peut être utilisée pour une analyse qualitative et quantitative. Cependant, l'utilisation d'une instrumentation coûteuse, le coût des amorces et des sondes dégénérées peuvent encore représenter une limite à ce test pour certains laboratoires [111].

### **B. RT-Nested-PCR :**

La PCR de transcriptase inverse (RT-PCR) a été développée pour l'amplification, l'isolement ou le séquençage de l'ARN. Le principe est de convertir l'ARN en son brin d'ADN complémentaire par la transcriptase inverse, de synthétiser le deuxième brin avec l'ADN polymérase, et enfin de produire une molécule d'ADN qui pourra être amplifiée par PCR de la manière habituelle. La RT-PCR est à la fois spécifique et sensible et elle permet particulièrement la détection d'un faible nombre de copies d'ARN cible [114]. La RT-PCR conventionnelle a démontré une sensibilité globale

allant de 73 % à 100 et une spécificité allant de 99 % à 100 % pour la détection d'une infection virale [109].



**Figure 2. 6 :** Principe de la Transcriptase Inverse RT-PCR [115].

Plusieurs tests basés sur la RT-PCR ont été développés pour tenter de détecter les phlébovirus de manière sensible et spécifique pour le TOSV, le segment S étant la molécule génomique la plus abondante dans l'infection par le TOSV et le gène le plus conservé parmi les souches virales en circulation, il représente une bonne cible pour la réaction RT-PCR. Les amorces sélectionnées sur le gène de la nucléoprotéine (N) ont donné les meilleurs résultats [111]. Trois tests RT-PCR sont largement utilisés pour diagnostiquer le TOSV ayant comme cible le segment S [116, 117]. Cependant, la réaction RT-PCR standard n'est parfois pas suffisante pour détecter le virus en raison du faible quantité présente dans l'échantillon. Par

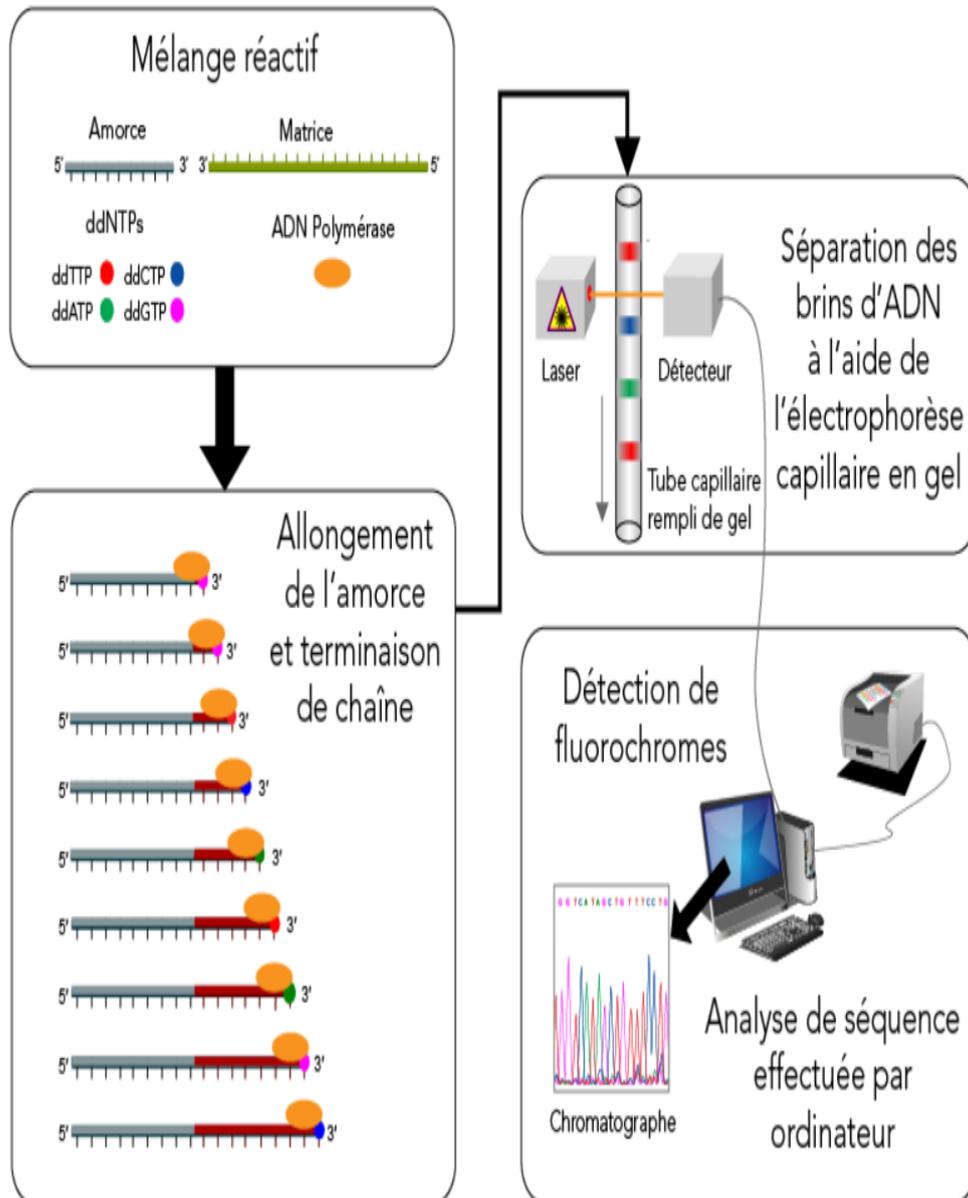
conséquent, une autre PCR nichée est absolument nécessaire pour améliorer la sensibilité du test. Après Sánchez-Seco et al., ont introduit une RT-Nested PCR en utilisant des amorces qui ciblent le gène polymérase (L), ces amorces reconnaissent plusieurs phlébovirus, dont le TOSV, les virus des groupes, SFNV et SFSV, ainsi que les virus RVFV, UUKV, PTV. Cette technique nécessite un séquençage des produits de la PCR pour déterminer le phlebovirus en cause de l'infection, les auteurs ont modifié la méthode décrite ci-dessus, en introduisant une nouvelle amorce inverse dégénérée, spécifique pour le TOSV, à utiliser dans la PCR nichée [118]. La PCR nichée se caractérise par une sensibilité et une spécificité relativement élevée. Cette technique utilise deux paires d'amorces d'amplification et deux cycles de PCR. Au premier tour, elle utilise une paire d'amorces pendant 15 à 30 cycles. L'amplification du produit du premier tour est soumise au deuxième tour d'amplification couplé à la deuxième paire d'amorces. Le principal inconvénient de la PCR nichée est son taux de contamination élevé [109].

#### **2.6.1.1.2. Le séquençage :**

##### **A. Méthode Sanger :**

Le principe de cette méthode est l'utilisation d'une polymérase ADN-dépendante est pour générer une copie complémentaire d'une matrice d'ADN simple brin, également connu sous le nom de séquençage par synthèse (SBS). En commençant par l'extrémité 3', une nouvelle chaîne d'une amorce d'ADN complémentaire à la matrice d'ADN simple brin est synthétisée [119] Les 2',3'-didéoxynucléotides sont utilisés pour la synthèse de l'ADN. En l'absence de groupe 3'-hydroxyle dans les 2',3'-didéoxynucléotides, l'ADN ne peut plus être synthétisé car aucune liaison phosphodiester ne peut être formée avec le dNTP suivant, et la chaîne se termine. Les quatre DDNTP (dideoxynucléotides phosphates tels que ddATP, ddTTP, ddCTP et ddGTP) sont marqués par des colorants fluorochromes différents afin d'être reconnus par le faisceau laser. Chaque fragment d'ADN marqué par fluorescence et terminé est enregistré et, à partir de ces données, la séquence d'ADN est évaluée. L'interprétation de la séquence obtenue se fait par comparaison à des bases de données publiques ou personnelles [120]

Classiquement, les séquences à analyser sont téléchargées à partir du Genbank via l'interface web de l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) qui repose sur la base de données du NCBI.



**Figure 2.7 :** Principe de la technique du séquençage Sanger [121].

## **B. Séquençage de nouvelle génération (NGS) :**

Le séquençage de prochaine génération (NGS) est la nouvelle technologie de séquençage génétique qui effectue rapidement le séquençage à partir d'abondants petits fragments d'ADN, cette technique est appelée également séquençage à haut débit, il y a plusieurs catégories de NGS : Pyroséquençage, Méthodes micro-électrophorétiques, Séquençage par hybridation et l'observation en temps réel de molécules uniques.

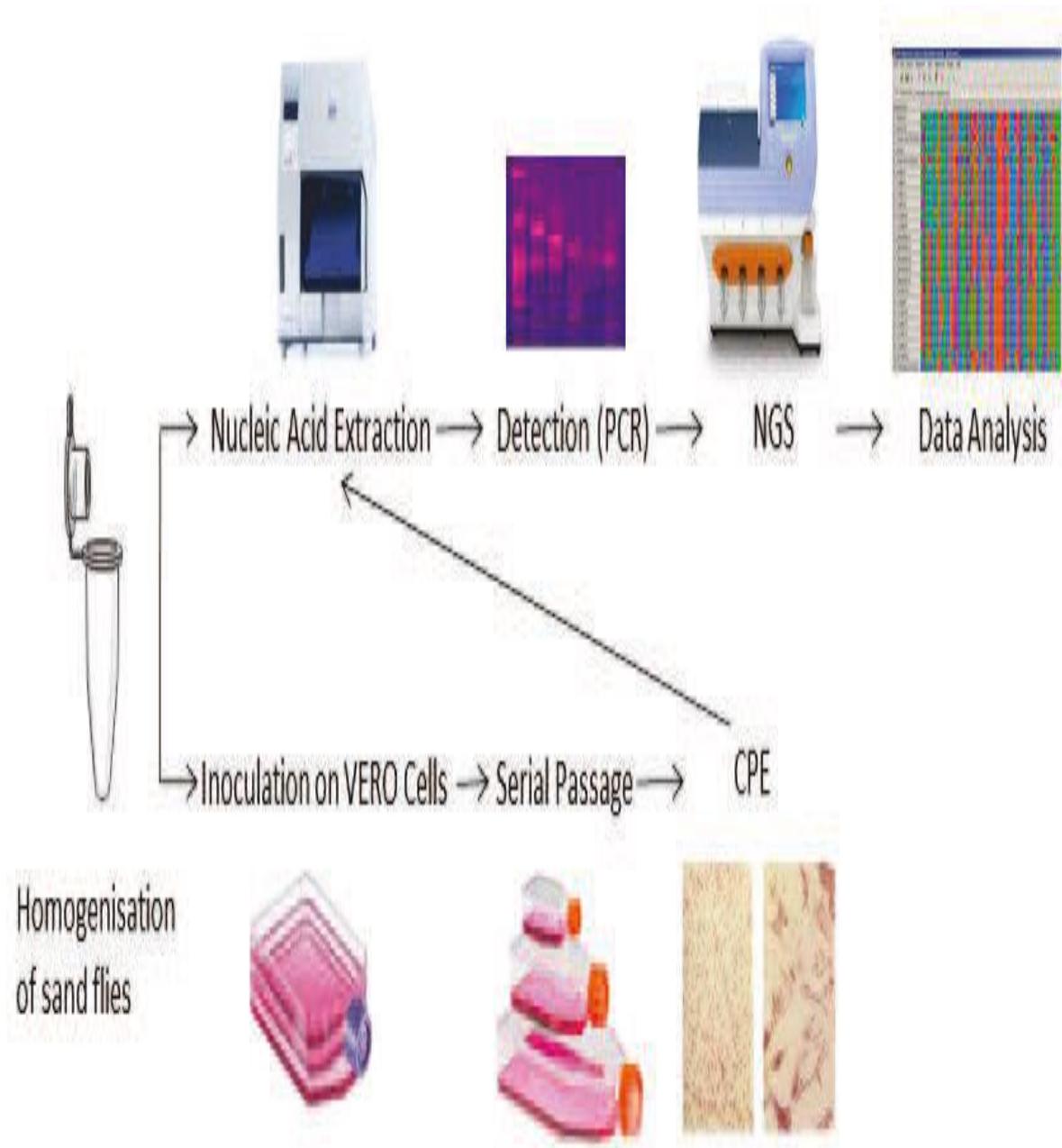
### **2.6.1.2. Culture virale et isolement :**

Le principe de la culture virale est de mettre le virus en contact avec des cellules sensibles dans un milieu de culture Eagle's minimum essential medium (EMEM) à 37°C, dans le but de suivre l'évolution et l'effet du virus sur les cellules (Effet cytopathique (ECP)), dans les jours qui suivent l'ensemencement. Les cellules eucaryotes cultivées dans des milieux contrôlés pour la propagation et l'isolement du virus sont largement utilisées et est toujours considérées comme l'étalon-or. La plupart des techniques émergentes de détection virale sont validées par comparaison avec la technique de culture cellulaire [112]. L'isolement des phlébovirus peut se réaliser in vitro ou in vivo dans des laboratoires capables de manipuler couramment des cultures cellulaires et des animaux.

La lignée cellulaire la plus couramment utilisée est la cellule Vero car les phlébovirus transmis par les phlébotomes ne se répliquent pas dans les cellules d'insectes C6/36. SFNV et le SFSV se répliquent également dans les cellules LLC-MK2 et BHK21, mais ces lignées cellulaires ont rarement été utilisées dans des études récentes [122]. Les premières tentatives d'isolement du virus TOSV à partir d'échantillons biologiques ont été réalisées in vivo, par injection intracrânienne de spécimens chez la souris [123]. Successivement, le TOSV a été cultivé en culture cellulaire où le virus peut se répliquer efficacement. De nombreuses lignées cellulaires de mammifères, telles que VeroE6, CV-1, BHK-21 et SW13, sont de bons substrats pour la réplication du TOSV, provoquant des ECP sur les cellules en quelques jours [111].

L'isolement des virus a été la méthode de choix pour le diagnostic direct pendant près d'un siècle. Cependant, elle commence à être remplacée après la découverte

de la PCR et le développement de méthodes de détection moléculaire rapide et facile à utiliser [122].



**Figure 2.8** : Les différentes méthodes de diagnostic des phlébovirus applicables sur les phlébotomes [24].

## 2.7. Autres agents infectieux transmis par les phlébotomes :

### 2.7.1. Les leishmanioses :

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires causées par des protozoaires appartenant à la famille des *Trypanosomatidae*, genre *Leishmania*, se transmettent par la piqûre des phlébotomes des espèces du genre *Phlebotomus* dans l'ancien Monde et des espèces appartenant à plusieurs genres (*Lutzomyia*, *Psychodopygus* et *Nyssomyia*) dans le nouveau Monde. Elles infectent plusieurs espèces de mammifères, ainsi que l'homme [124].

Les leishmanioses sont des maladies très importantes pour la santé vétérinaire et la santé publique. Elles constituent un problème de santé majeur, menaçant plus de 350 millions de personnes dans de nombreux pays et environ 2 millions de nouveaux cas signalés chaque année [125].

Les leishmanioses en Algérie se présentent sous trois formes : deux formes dans le nord du pays ; la leishmaniose cutanée sporadique du nord due à la *L. infantum* MON 24, transmise par *P. perfiliewi* Parrot 1930 [126], et la leishmaniose viscérale due à la *L. infantum* MON 1 avec *P. perniciosus* comme vecteur prouvé [127]. Les canidés sont considérés comme le réservoir des deux formes de leishmanioses. Dans le sud du pays et les régions steppiques, la leishmaniose cutanée zoonotique causée par la *L. major* MON 25, et transmise par *P. papatasi* [127, 128]. Les deux rongeurs sauvages, *Psammomys obesus* et *Meriones shawi* sont les réservoirs de cette forme de leishmaniose [129]. Des cas de leishmaniose cutanée à *L. killiki* appartenant au complexe *L. tropica*, transmise par *P. sergenti* ont été signalés au nord de l'Algérie à Constantine et au sud à Ghardaia [130,131]. Après avoir été trouvé infecter naturellement par *L. killiki* en Tunisie, le rongeur sauvage *Ctenodactylus gundi* est suspecté d'être le réservoir de cette espèce de leishmaniose [132].

### **2.7.2. *Bartonella bacilliformis* :**

La maladie de Carrion est une maladie biphasique transmise par les phlébotomes, plus particulièrement *Lu. Verrucarum*, et causée par *Bartonella bacilliformis* en Amérique centrale et Sud. Elle est endémique dans les vallées de hautes altitudes des Andes sud-américaines, et le premier foyer signalé en 1871. Elle se caractérise soit par des fièvres intermittentes (appelés fièvre d'Oroya), avec parfois une atteinte hépatique pouvant conduire au décès en l'absence de traitement ou en cas de traitement tardif, lorsque les individus infectés sont naïfs, soit par des lésions cutanées appelées verrues péruviennes lorsque les individus infectés ont été préalablement exposés à la bactérie [133].

### **2.7.3. Les virus :**

#### **A. Le Virus de la maladie de la stomatite vésiculaire :**

La stomatite vésiculaire est une maladie virale du bétail à transmission vectorielle causée par des virus appartenant au genre des *vesiculovirus*, famille des *Rhabdoviridae*, le virus de la stomatite vésiculaire du New Jersey ou le virus de la stomatite vésiculaire de l'Indiana. La maladie est confinée aux Amériques où elle se manifeste annuellement par des cycles endémiques au Mexique, en Amérique centrale et dans les régions septentrionales de l'Amérique du Sud, et seulement par des épizooties sporadiques tous les 2 à 10 ans aux États-Unis. Les équidés, tels que les chevaux, les mulets et les ânes, sont les espèces les plus fréquemment touchées aux États-Unis. La maladie est également zoonotique, elle est transmise à l'homme par contact direct avec des lésions infectieuses du bétail et provoque généralement de la fièvre, des maux de tête, de la fatigue et des myalgies durant 3 à 5 jours [134]. Deux espèces de phlébotomes sont des vecteurs avérés du virus de la stomatite vésiculaire dans la nature, *Lu. shannoni* transmet le sérotype New Jersey chez les porcs sauvages de l'île d'Ossabaw, en Géorgie (États-Unis) et *Lu. trapedoi* transmet le sérotype Indiana en Amérique latine [2].

#### **B. Le virus de la maladie de Chandipura :**

Le virus Chandipura fait partie du genre *Vesiculovirus*, famille *Rhabdoviridae*. Il a été découvert lors d'une épidémie de fièvre aiguë à Nagpur, dans l'État du Maharashtra, en Inde, à partir de deux cas fébriles en 1965. Actuellement, la présence de ce virus est signalée dans le sous-continent indien [Inde, Bhoutan et

Népal], au Sri Lanka et en Afrique (Nigeria, Sénégal). La maladie se présente chez les humains par fièvre, convulsions, altération du sensorium, céphalées, vomissements et diarrhée. Les données disponibles suggèrent que les phlébotomes sont les vecteurs de ce virus, tandis que des anticorps anti Chandipura ont été détectés chez un large éventail d'animaux vertébrés [135]. Le virus Chandipura a été isolé à partir d'espèces non identifiées, des genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia* en Inde et au Sénégal [2].

### **C. Le virus de la maladie de Changuinola :**

Le virus, membre du genre *Orbivirus*, famille des *Reoviridae*, il a été isolé pour la première fois au Panama en 1959 et est répandu au Panama, Colombie et au Brésil. Chez l'homme, un cas de fièvre aiguë symptomatique qui a disparu sans traitement a été signalé au Panama. Le virus a été détecté chez des phlébotomes mais aussi occasionnellement chez des moustiques. De nombreuses isolations ont été faites à partir de *Lu. trapidoi* et *Lu. ylephiletor* au Panama et de *Lu. dasipodogeton*, *Lu. davisii*, *Lu. ubiquilatis*, *Lu. umbratilis*, au Brésil [2]. Récemment les espèces de phlébotomes, *Idiophlebotomus spp*, *P. papatasi*, *S. khawi* ont été détectés infectées en Thaïlande [136]

## CHAPITRE 3

### DETECTION ET ISOLEMENT DES PHLEBOVIRUS ET IDENTIFICATION DES PHLEBOTOMES

Une partie des résultats présentés dans ce chapitre ont été publiés dans : Manseur, H., et al., *Viruses*, 14(8), 1796.

#### **3.1. Objectifs :**

Notre étude a été menée dans deux régions du nord de l'Algérie ; Bejaia dans la daïra de Kherrata, Nord-est et Tiaret dans les communes de Aïn El Hadid, Aïn Bouchekif, Guertoufa, Nord-ouest ayant comme objectif l'identification de la faune phlébotomienne et la recherche, détection et isolement des phlebovirus transmis par les phlébotomes , ainsi que l'identification moléculaire des éventuelles espèces vectrices de phlébovirus, afin d'obtenir des données sur la circulation des phlébovirus et de leurs éventuels vecteurs en Algérie.

### **3.2. Matériel et Méthodes :**

#### **3.2.1. Présentation des zones d'étude :**

##### **A. Kherrata :**

La région de Kherrata est située dans la partie centrale du domaine tellien externe, est située à 65 Km au sud-Est de la wilaya de Bejaia (longitude 5° 16' 39" Est, latitude 36° 29' 34" Nord) elle regroupe deux communes, la commune de Kherrata et celle de Draa-El-Kaid. Elle s'étend sur une superficie de 221 km<sup>2</sup>, limitée au sud, à l'Est et à l'Ouest par la wilaya de Sétif au nord par la daïra de Darguina. La population était estimée à 64298 habitants selon le recensement de 2008 [137].

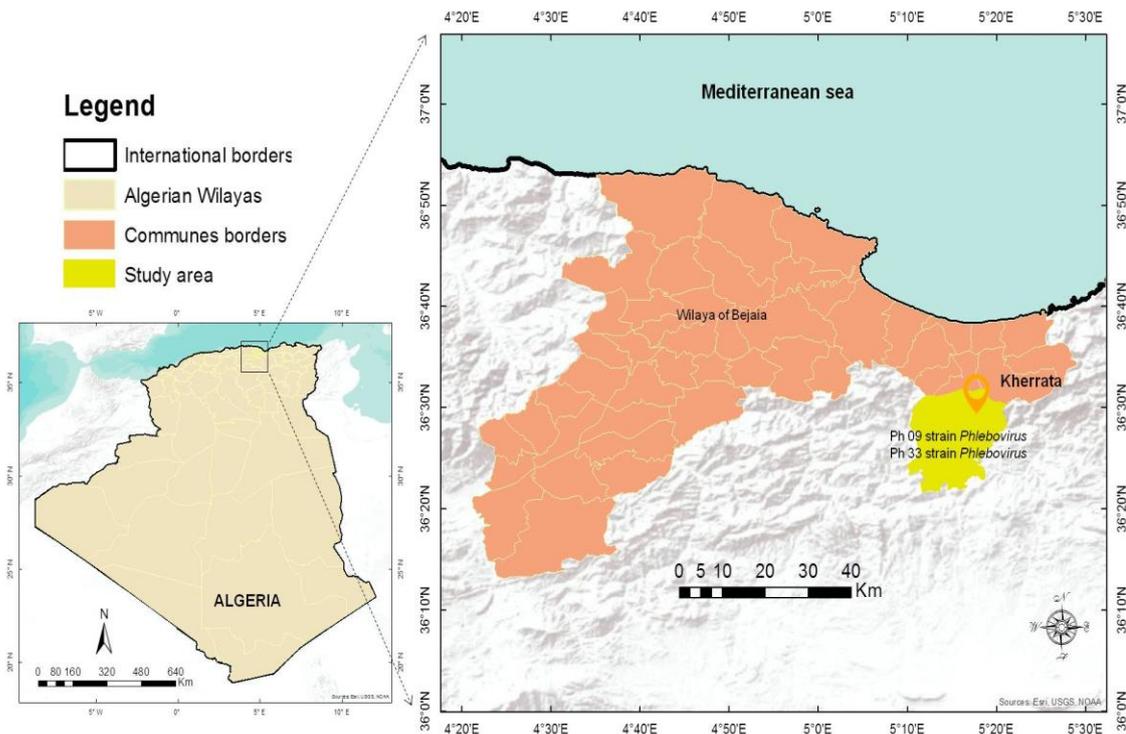
La région d'étude appartient dans sa totalité au domaine des Babors à la limite orientale de la chaîne kabyle, c'est un domaine très accidenté où les reliefs Culminent à plus de 1900 m d'altitude. Les principaux éléments de la topographie du secteur étudié, sont le domaine montagneux, domaine des reliefs de liaison, et domaine des vallées Intramontagnardes [138].

Les montagnes développent une ceinture autour de la région d'étude avec des altitudes qui varient entre 1000 à 1800 mètres. Au sud de la région d'étude ils varient entre 800 à 1500 m autour du Djebel Meghris. A l'ouest, les reliefs sont généralement moins élevés où l'altitude varie entre 600 à 1000 m mais elle peut atteindre localement des valeurs supérieures ex : Djebel Takouchte, (1315 m). Pour les vallées on a la vallée d'Oued El Bared, Oued Atteba, oued Halaba, Oued Em'barek, et la dépression du barrage d'Ighil Emda [138]. Cette formation géologique donne une forme de cuve à la région d'étude ce qui la protège des vents, constituant des biotopes favorables aux phlébotomes.

Le couvert végétal est différent entre les deux communes qui forment la région de kherrata, la commune de Draa El Kaid est caractérisée par des activités agricoles (type familial) de fruits et légumes et ainsi culture de surface de blé et d'orge alors que la commune de Kherrata est riche en arbres forestiers qui forment des forêts. Les plantes les plus abondantes dans la région sont : le chêne peuplier, pistachier térébinthe, frêne, Oléastre, Tamarix, Pin d'Alep, Eucalyptus, l'azérolier, jujubier lotus, laurier, roncier, murier sauvage, la canne, le roseau genet, Retama. Les

plantes fruitières : oliviers, amandiers, figuiers, abricotiers, pêchers, pruniers, grenadiers, vignes, néfliers, noyer [137].

La région est caractérisée par un climat méditerranéen du type subhumide, avec des précipitations annuelles moyennes estimées à plus de 800 mm [139]. Avec une humidité relative qui varie de 77% à 58% en Janvier et Juillet, respectivement [140].



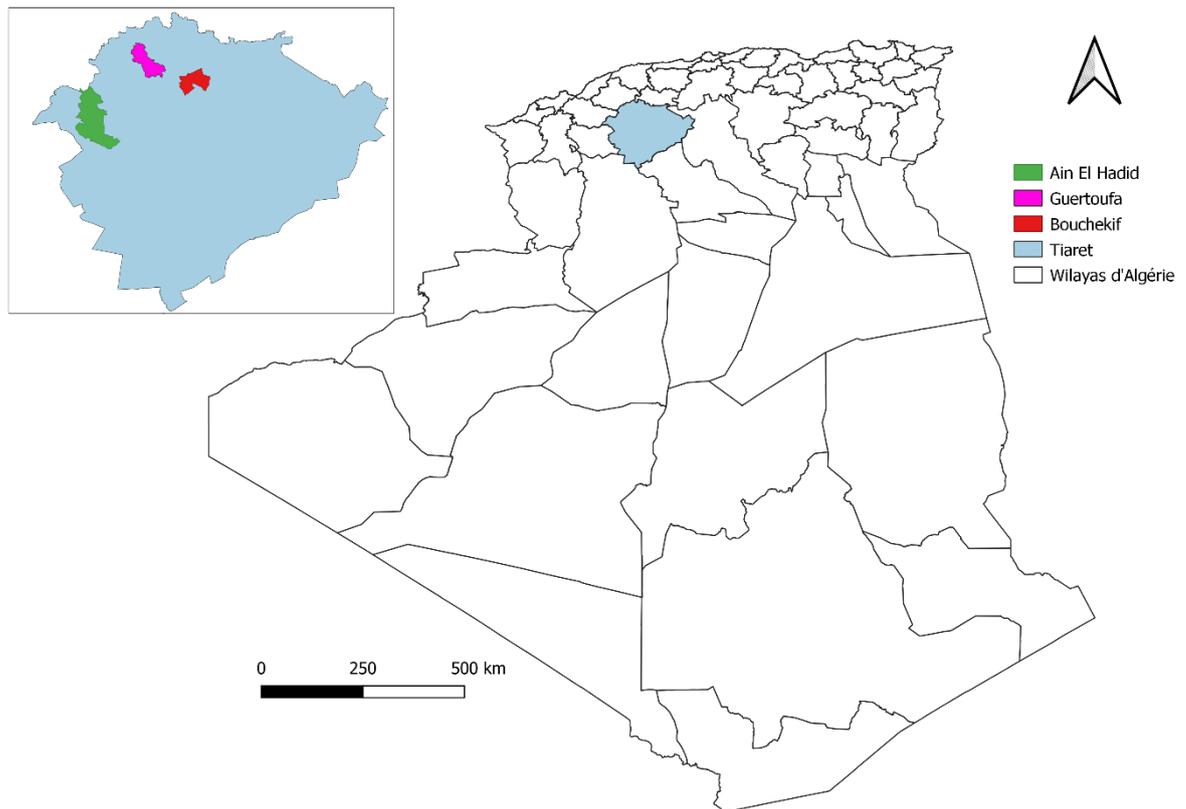
**Figure 3.1 :** Localisation géographique des sites de capture des phlébotomes à Kherrata.

## B. Tiaret :

La wilaya de Tiaret est située, à l'ouest du pays au ( $34^{\circ}55'0''$  E et  $1^{\circ}34'60''$  N). Elle couvre une superficie de 20399,10 km<sup>2</sup>, limitée au sud par les wilayas de Laghouat et El-Bayadh, les wilayas de Tissemsilet et Relizane au Nord, à l'Ouest par les wilayas de Mascara et Saida et à l'Est la wilaya de Djelfa. La population était estimée à 846 823 habitants selon le recensement de 2008. La région s'étend sur une partie de l'Atlas tellien au Nord et sur les hauts plateaux au centre et au Sud, elle se trouve à 1150 m d'altitude, ses reliefs sont caractérisés par relief qui est hétérogène, est matérialisé par : une zone de montage au Nord ; des hautes plaines au centre ; des espaces semiarides au Sud (68,44%). Les altitudes varient entre

800m à 1200 m au nord, on trouve Le massif de Guezoul situé à l'extrémité nord de la ville de Tiaret est recouvert principalement par des formations pré-forestières et des matorrals d'une série de chênes verts plus au moins dégradés. Ainsi, il représente un modèle type de la forêt méditerranéenne. Le massif est constitué par quatre cantons principaux : Djebel Azouania, Djebel Seffalou, Djebel Koumat et Djebel Guezoul. Au sud les altitudes atteignent en moyenne 1100 m, les plus hautes steppes atteignent 1300 m et les plus basses varient entre 1000 et 1100 m. L'espace steppique est caractérisé par l'aridité du climat et la faiblesse de précipitations. Il est très sensible à la désertification où la couverture végétale est fortement dégradée. La région s'étend sur 1.609.900 Ha de terres agricoles, 142.966 Ha de steppiques et les forêts occupent 142.422. La superficie agricole est dominée par le système « céréales- élevage » [141,142].

La wilaya de Tiaret reçoit 300 à 400 mm de pluies par an, avec une fluctuation saisonnière de la pluviométrie allant de 157 mm en hiver à 31 mm en été. Elle appartient à l'étage bioclimatique semiaride inférieur à hiver frais où le climat est du type méditerranéen [142]. L'humidité relative qui varie de 75% à 40% en Janvier et Juillet, respectivement [140].



**Figure 3. 2** : Localisation géographique des sites de capture des phlébotomes à Tiaret.

### 3.2.2. Capture des phlébotomes :

#### 3.2.2.1. Déclaration éthique :

Les propriétaires qui ont été sélectionnés pour la capture des phlébotomes dans leurs maisons et abris de leurs animaux ont donné leur consentement verbal.

#### 3.2.2.2. Méthodes de capture des phlébotomes :

Le choix de la méthode de capture des phlébotomes dépend essentiellement des objectifs de l'étude, par conséquent, la technique d'échantillonnage choisi dépend des questions à traiter [143].

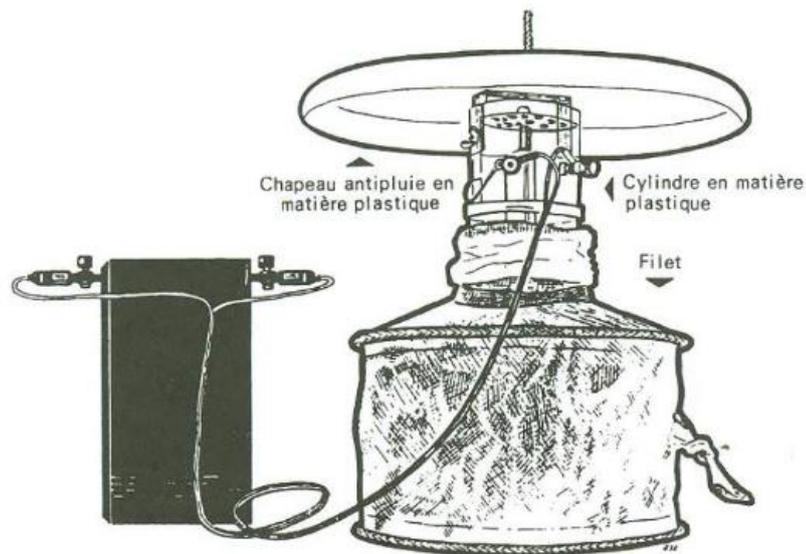
L'objectif de notre étude est la détection et l'isolement des phlébovirus qui sont très sensibles à la chaleur, pour cela nous avons utilisé des pièges lumineux de type CDC (Miniature light traps) (John W. Hock Company, Gainesville, FL, USA. Centers for Disease Control), afin de capturer des phlébotomes vivants, ce qui assure la

viabilité des phlébovirus (très sensibles à la chaleur) pour augmenter les chances de détection et d'isolement. De nombreux autres pièges et techniques sont disponibles et peuvent être utilisés sur le terrain tels que les pièges adhésifs, ou la collecte à l'aide d'un aspirateur pour les populations au repos [143].

### Pièges lumineux (CDC) :

Les pièges lumineux CDC sont utilisés à la fois dans la recherche scientifique et les activités de surveillance pour les programmes de contrôle. Cet outil standard est l'un des outils les plus couramment utilisés pour attraper les petits diptères. Les avantages de ce piège sont : son faible poids, sa facilité de transport sur le terrain et sa chambre de collecte pliable. De plus, la technique réduit le temps d'exposition des professionnels aux insectes présents dans l'environnement. En général, cette méthode est le premier choix pour les études des phlébotomes et moustiques vecteurs [144].

Le piège est composé d'un tube en acrylique avec une ouverture sur la partie supérieure, destinée à recevoir un support pour le couvercle de protection en aluminium. Cette caractéristique protège le piège du vent et de la pluie et facilite le processus d'aspiration des insectes.



**Figure 3.3** : Représentation schématique d'un piège de type CDC [145].

Un moteur qui assure le fonctionnement d'un petit ventilateur destiné à entretenir une aspiration continue de faible intensité et d'une source de lumière au-dessus.

L'appareil est alimenté par une pile de 6 volts (V) ou quatre piles du type D de 1,5 V à longue durée de vie. À l'extrémité inférieure du corps du piège, le tube acrylique est entouré d'une cage composée de deux segments attachés : un tube en tissu fin, en voile ou en nylon fin et une chambre de collecte (un récipient en plastique). La fonction de cette chambre est de stocker les insectes capturés, qui ont été attirés par la lumière et aspirés à l'intérieur, permettant ainsi leur transport vers le laboratoire [144].



**Figure 3.4** : Pièges lumineux CDC installés dans un étable de bovin photo personnelle (2020).

### **3.2.2.3. Sites de capture des phlébotomes :**

Les captures des phlébotomes de la présente étude ont été réalisées durant une période étalée sur deux mois, de septembre à octobre de l'année 2020, cette période correspond à l'activité maximale des phlébotomes dans le nord de l'Algérie, deux pics ont été signalés chaque année, en Algérie le premier en Juillet-Août et le second fin Septembre/début Octobre [146]. Manseur en 2014 a signalé un pic en fin septembre dans la région de Kherrata [137]. Huit sites ont été choisis pour la collecte des phlébotomes dans un milieu rural (5 à Kherrata et 3 à Tiaret), différents biotopes ont été ciblés : intérieur et extérieur des abris d'animaux, à l'intérieur des maisons dans les jardins de maisons.

Les pièges ont été suspendus à 1 ou 2 m du sol dans les habitations humaines et les abris pour animaux. Les pièges ont été posés du coucher du soleil jusqu'à l'aube le lendemain matin. Au total, 8 nuits de capture ont été réalisées au cours de la période d'étude. Tous les phlébotomes ont été triés selon leur sexe, la date de collecte et le lieu, puis regroupés pour obtenir 20 à 50 phlébotomes par tube de 1,5 ml. Tous les spécimens ont été conservés dans l'azote liquide pendant le transport jusqu'au laboratoire, où ils ont été maintenus à - 80 °C jusqu'à leur traitement. Afin de réduire les manipulations et de favoriser l'isolement du virus, aucune identification morphologique des phlébotomes capturés n'a été effectuée avant la recherche des phlébovirus. Une partie des phlébotomes a été utilisée pour la recherche des phlébovirus et l'autre partie pour l'identification morphologique des phlébotomes. Toutes les expérimentations ont été réalisées au laboratoire des arbovirus et virus émergents (Institut Pasteur d'Algérie).

### **3.2.3. Recherche des phlébovirus**

#### **3.2.3.1. Traitement des phlébotomes et extraction de l'ARN viral :**

Le broyage a été effectué dans le laboratoire à niveau de sécurité P3 (Institut Pasteur d'Algérie). Les phlébotomes sont transférés dans des tubes à 2 ml.

Pour chaque pool nous avons ajouté 1 ml de milieu L15 de Leibovitz (supplémenté avec 20% de FBS (sérum fœtal bovin), 10% de tryptose phosphate, 1% de pénicilline /streptomycine, et 0,005% de fungizone) et une bille stérile de broyage.

Les tubes sont ensuite placés dans des adaptateurs (PTFE - 10 tubes type Eppendorf 1.5 à 2 ml), qui permettent de garder les tubes à basse température pendant le broyage. Le broyage a été effectué dans un broyeur mélangeur MM200 (Retsch, Allemagne) (50 Hz pendant 3 minutes). Afin de clarifier le mélange résultant, il a été centrifugé à 7000 rpm pendant 10 min. Après clarification, le surnageant a été divisé en 3 aliquotes et stocké à -80°C.

Un volume de 200 µl du surnageant d'homogénats des phlébotomes a été utilisé pour extraire l'acide nucléique viral, en utilisant le Mini Kit d'extraction d'ADN-ARN (Da An Gene Co., Ltd. Of sun Yat University. P.R. China). L'extraction a été réalisée suivant le protocole du fabricant (Appendice B). Les acides nucléiques ont été immédiatement congelés à -80°C, jusqu'à leur utilisation.

### **3.2.3.2. Détection des phlébovirus :**

Pour la détection des phlébovirus nous avons utilisé une PCR à transcription inverse (RT), une technique développée par Sánchez-Seco et al, 2003, elle a été utilisée pour la recherche de RNA viral des phlébovirus dans les pools après extraction de l'ARN, avec quelques modifications concernant les réactifs et enzymes utilisés. Cette technique permet dans une première étape, par une transcriptase inverse de traduire l'ARN en ADN, puis l'ADN sera amplifié par une Taq polymérase.

La transcription inverse et les étapes ultérieures d'amplification ont été réalisées avec des amorces ciblant le gène de la polymérase du segment L :

La RT-PCR a été effectuée dans des micro-tubes de 200 µl, le mélange contient un volume total de 50 µl.

Dans la chambre de Mix nous avons préparé à chaque fois un Mix pour douze réactions, ensuite le Mix a été aliquoté sur les tubes, dix pour les échantillons et deux pour les contrôles positifs (TOSV) et négatifs (eau RNase free).

Pour chaque tube, nous avons ajouté 5 µl d'extrait avec 45 µl d'un Mix contenant 25 µl de 2X Mix Buffer, 2,4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,4 mM de chaque dNTP, et 2 µl de chaque amorce (Phlebo1+et Phlebo1-), diluées à 20 pmol (amorces spécifiques au genre Phlébovirus) et 1 µl de SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA) et 15 µl d'eau RNase free.

Les tubes préparés sont ensuite placés dans un thermocycleur réglé sur les conditions thermiques des cycles de RT-PCR suivant : 50°C pendant 15 min et 95°C pendant 2 min, suivis de 40 cycles à 94°C pendant 30 s, température d'hybridation à 45 °C pendant 1 min, et 68°C pendant 45 s, avec une étape d'élongation finale à 68°C pendant 5 min. Le produit de la PCR a été conservé à +4°C jusqu'à son amplification par la PCR nichée.

Après préparations d'un Mix pour douze tubes, la Nested-PCR a été réalisée avec 1 µl du produit de la RT-PCR ajouté à 49 µl d'un Mix contenant 5 µl de 10X Mix Buffer- Mg Cl<sub>2</sub>, 1,5 µl de Mg Cl<sub>2</sub> (0,2 mM), 1 µl de chaque dNTP (0,2 mM), 2 µl de chaque amorce (Phlebo2+et Phlebo2- ), diluées à 20 pmol (amorces spécifiques au genre Phlebotomus), et 0,2 µl de l'enzyme Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA) et 37,3 µl d'eau RNase free.

Les tubes sont ensuite, placés dans un thermocycleur, réglé sur les conditions thermiques suivantes : une température de dénaturation à 95 °C pendant 2 min, suivie de 40 cycles de 94°C pendant 30 s, une température de dénaturation à 45°C pendant 2 min, et 72 °C pendant 30 s, en terminant par une étape d'élongation à 72°C pendant 10 min.

Pour la migration nous avons préparé un gel à base d'agarose diluée à 2% dans du tampon TBE 0.5X avec 10 µl de SyberSafe. Les produits PCR de la première et de la seconde amplification a été détecté par électrophorèse sur gel en présence de deux contrôles négatif et positif (TOSV).

La migration a été faite en présence d'un marqueur de poids moléculaire, à 80 V pendant 50 minutes et la lecture et la révélation des fragments sous une plaque à lumière UV.

**Tableau 3.1:** Séquences d'amorces de la R-T-Nested PCR phlébovirus.

Gène ciblé	Nom d'amorce	Séquence d'amorces (5'- 3')	Taille des fragments	Référence
Segment L (Gène polymérase)	Phlebo+1	5'-ATGGARGGITTTG TIWSICIICC-3'	550	Sánchez-Seco et al, 2003
	Phlebo-1	5'-AARTTRCTIGWIG CYTTIARIGTIGC-3'		
	Phlebo+2	5'-WTICCIAAICCI YMSAARATG-3'	240	
	Phlebo-2	5'-TCYTCYTTRTT YTTRARRTARCC-3'		

### 3.2.3.3. Isolement des phlébovirus :

Afin de tenter d'isoler les virus détectés, nous avonsensemencé sur des cellules de reins de singe vert africain Vero (Vero ATCC CCL81), les homogénats de phlébotomes provenant de pools positifs à la PCR du phlébovirus. En résumé, nous avons utilisé 800 µl de milieu Eagle's minimum essential medium (EMEM sans FBS) pour diluer 200 µl de chaque homogénat, la dilution résultante a été ensuite filtrée avec un filtre de 0,22 µm. Ensuite nous avons inoculé 500 µl de la dilution dans des cellules Vero monocouches dans un flacon de culture cellulaire T-25. Puis nous avons incubé les cultures pendant 1 heure à 37°C. Après incubation un lavage des cultures, a été réalisé.

Un volume de 5 ml de milieu d'entretien (EMEM complété par 2% de FBS, 1% de pénicilline-streptomycine, 1% (200 mM) de L-glutamine, 1% de kanamycine et 3% d'amphotéricine B) a été ajouté aux cultures.

Les flacons de cultures cellulaires ont été incubés à nouveau à 37°C et examinés quotidiennement pour détecter des éventuels effets cytopathiques par microscope optique. Au jour 7 post-infection, les surnageants ont été récoltés et clarifiés après centrifugation. Deux passages successifs ont été effectués pour chaque pool positif. Les produits des cultures ont été conservés à -80°C.

Pour confirmer l'isolement des phlébovirus, un aliquot de 200 µl de chaque passage a été testé après extraction de l'ARN, par RT-Nested-PCR générique des phlébovirus comme il a été décrit précédemment par Sánchez-Seco et al., 2003.

#### **3.2.3.4. Séquençage et analyse phylogénétique :**

Les produits PCR positifs ont été purifiés en ajoutant 5 µl de l'ADN à 2 µl d'ExoSAP-IT™ Express PCR Product Clean-up (Applied Biosystem, CA, USA). Le mélange est ensuite placé dans un thermocycleur sous les conditions thermiques suivantes : 37 °C pendant 15 min puis 80°C pendant 15 min.

La réaction PCR séquençage a été effectuée à l'aide de la technologie Sanger. La PCR a été réalisée en ajoutant 1 µl du produit purifié à 9 µl d'un mix contenant, le kit Big Dye Terminator V3.1 (Applied Biosystems, CA, USA), et du Buffer Dey et 20 pmol des mêmes amorces utilisées pour la PCR.

Le mélange est placé ensuite, dans un thermocycleur sous les conditions thermiques suivantes : 96°C pendant 1 min puis 25 cycles de 96°C pendant 10 s puis 50 °C pendant 5 s enfin 60 °C pendant 4 mn.

Pour la purification, nous avons dilué 1 µl du produit de la PCR séquençage, dans 10 µl H<sub>2</sub>O RNase free, ensuite les produits dilués ont été purifiés selon le Protocole de purification du gel Sephadex® G-50 Superfine (SIGMA- ALDRICH, USA) (Appendice B).

Les produits purifiés ont été analysés sur l'analyseur génétique ABI 3130 (Applied Biosystems, CA, USA). Le séquençage a été réalisé dans les deux directions

Les séquences générées ont été alignées à l'aide du logiciel MAFFT [147], avec les séquences homologues récupérées dans la base de données GenBank. Les distances entre les acides aminés et les nucléotides ont été calculées par le logiciel

MEGA X. L'arbre phylogénétique a été construit par la méthode du maximum Likelihood dans le logiciel MEGA X. La robustesse des nœuds a été testée en utilisant 500 répliques Bootstrap [148].

### **3.2.4. Identification des phlébotomes :**

#### **3.2.4.1. Identification morphologique des phlébotomes :**

Afin de déterminer la composition faunistique des espèces de phlébotomes, nous avons identifié morphologiquement 10% des phlébotomes capturés. Les phlébotomes ont été traités par le NaOH 10% pendant deux heures, puis rincés deux fois pendant 20 min enfin, ils ont subi un passage dans une solution de Marc-André pendant deux heures pour les fixer selon le protocole d'Abonnenc [149].

Chaque spécimen a été monté sur lame, en position latérale dans une goutte de solution de Marc André. Les pattes sont étalées et orientées soigneusement vers le côté ventral et les ailes vers le côté dorsal.

Pour l'armature génitale du mâle, elle est déposée selon son orientation chez l'insecte en mettant en évidence les différents éléments d'identification. Les phlébotomes sont ensuite recouverts d'une lamelle, sans exercer de pression, puis nous avons passé à l'observation au microscope optique.

L'identification est basée sur la morphologie de l'appareil génital pour les mâles et sur les spermathèques et le cibaruim chez la femelle en utilisant la clé d'identification de [149,38, 41].

#### **3.2.4.2. Identification moléculaire des phlébotomes dans les pools positifs :**

##### **3.2.4.2.1. Extraction d'ADN :**

Le culot restant contenant les débris des phlébotomes des pools positifs au phlébovirus a été utilisé pour l'extraction d'ADN en utilisant Le MiniKit d'extraction d'ADN-ARN (Da An Gene Co., Ltd. Of sun Yat University. P.R. China), selon les recommandations du fabricant.

### 3.2.4.2.2. Amplification et séquençage :

Une portion d'ADN correspondant à la fin de la région 5' du gène mitochondrial codant pour le (COI) (700 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 il a été décrit par Folmer et al., 1994 [150].

La réaction PCR a été effectuée avec 5 µl d'ADN ajouté à 45 µl de mélange contenant 25 µl de Hot StarTaq Plus Master Mix (Qiagen, Allemagne), 2x concentré qui contient de l'ADN polymérase HotStarTaq Plus, du PCR Buffer (avec 1,5 mM de Mg Cl<sub>2</sub>, et 0,2 mM de chaque dNTP), et 2 µl de chaque amorce diluée à 10 pmol, et 16 µl d'eau.

Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur sous les conditions thermiques suivantes : une dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 minutes, puis 37 cycles de 94 °C pendant 30 s, 55 °C pendant 30 s et 72 °C pendant 90 s, suivis d'une extension de 10 minutes à 72°C. Les produits PCR ont été visualisés sur des gels d'agarose à 2%. Les produits positifs ont été purifiés et séquencés dans les deux directions en utilisant les mêmes amorces selon le protocole de séquençage précédemment décrit. Les séquences ont été éditées dans le logiciel BioEdit [151], et comparées aux séquences publiées dans la GenBank.

**Tableau 3.2** : Séquences d'amorces de la PRC du gène mitochondrial.

Gene ciblé	Nom d'amorce	Séquence d'amorces (5'- 3')	Taille du fragment	Référence
Cytochrome oxydase (COI)	LCO1490	5'- GGTCAACAAATCATAAA GATA TTGG-3'	700pb	Folmer et al. (1994).
	HCO2198	5'-TAAACTTCAGGGTGA CCAAA AAATCA-3'		

### **3.2.5. Analyse des données :**

#### **A. Fréquence d'abondance (Abondance relative) :**

Corresponds au pourcentage d'individus d'une espèce donnée ( $n_i$ ) par rapport au total des individus recensés dans un peuplement ( $N$ ) [152].

$$FA = n_i/N \times 100.$$

#### **B. Taux d'infection :**

C'est le pourcentage d'infection par rapport au nombre total des phlébotomes analysés, il est égal au nombre de pools positifs / nombre de phlébotomes total x100 [13].

#### **C. Le logiciel MEGAX :**

MEGA est un outil intégré permettant de réaliser des alignements de séquences, automatiques et manuels, de construire des arbres phylogénétiques, d'explorer des bases de données en ligne, d'estimer les taux d'évolution moléculaire et de tester des hypothèses d'évolution[148]. Nous avons utilisé ce logiciel pour la correction des séquences des phlébovirus obtenus, puis nous avons construit l'arbre phylogénétique et les distances entre les acides aminés et les nucléotides ont été calculées avec le même logiciel.

#### **D. Le logiciel Bioedit ;**

BioEdit est un éditeur d'alignement de séquences biologiques. Nous avons utilisé ce logiciel pour le traitement des séquences des espèces des phlébotomes [151].

#### **D. MAFFT :**

MAFFT (for multiple alignment using fast Fourier transform) est un programme utilisé pour créer des alignements multiples de séquences d'acides aminés ou de nucléotides. Nous avons utilisé ce programme, pour générer des alignements dans le but de faire, les analyses phylogénétiques [147].

### **3.2.6. Analyses statistiques :**

Les résultats obtenus ont été analysés par le test khi2 de Yates aussi appelé correction de continuité de Yates il est utilisé dans certaines situations pour tester l'indépendance de deux variables dans un tableau de contingence lorsque la taille d'échantillon est faible. Il tient son nom de son créateur, Frank Yates, un statisticien britannique, qui en 1934, afin de comparer les taux d'infections entre mâles et femelles et entre les deux régions d'étude par le Microsoft office Excel 2019.

$H_0$  : il n'y a pas de différence significative entre les taux d'infections observés les deux variables sont indépendantes.

$P < 0.05$  hypothèse est rejetée.

$P > 0,05$  hypothèse retenue.

### **3.3. Résultats :**

#### **3.3.1. Résultats des captures des phlébotomes :**

##### **3.3.1.1. Résultats globaux des captures des phlébotomes :**

Toute au long de notre étude qui s'est étalée sur deux mois, octobre et septembre 2020, 4541 phlébotomes ont été capturés dans les deux régions d'étude : Kherrata et Tiaret. Un nombre total de 4141 phlébotomes ont été identifiés selon le sexe et regroupés en 100 pools contenant de 20 à 50 phlébotomes par cryotube de 1.5 ml, utilisés ensuite pour la recherche de l'ARN des phlébovirus et 400 phlébotomes ont été utilisés pour l'identification morphologique des espèces.

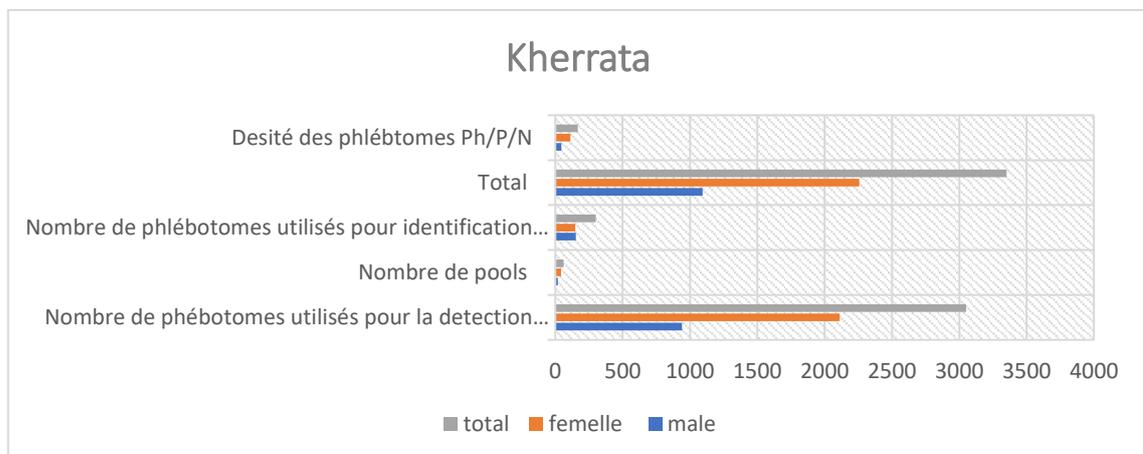
##### **3.3.1.2. Résultats des captures des phlébotomes par région :**

###### **A. Kherrata :**

Nous avons capturé un total de 3351 phlébotomes dans la région de Kherrata, 3051 phlébotomes ont été identifiés selon le sexe ce qui a donné 940 mâles regroupés en 19 pools, et 2111 femelles divisées en 43 pools, ces pools ont été testés par RT-Nested PCR à la recherche de l'ARN des phlébovirus, les 300 phlébotomes restants ont été utilisés pour l'identification morphologique des phlébotomes, les résultats obtenus ont été montrés dans le tableau suivant :

**Tableau 3.3** : Résultats des captures des phlébotomes dans la région de Kherrata.

Nombre de phlébotomes	Mâle	Femelle	Total
Nombre de phlébotomes utilisés pour la détection des phlébovirus	940	2111	3051
Nombre de pools	19	43	62
Nombre de phlébotomes utilisés pour l'identification morphologique	153	147	300
<b>Total</b>	<b>1093</b>	<b>2258</b>	<b>3351</b>
Nombre des pièges utilisés	4	4	4
Nombre des nuits de capture	5	5	5
<b>Densité des phlébotomes (Ph/P/N)</b>	<b>45,65</b>	<b>112,9</b>	<b>167,55</b>

**Figure.3.5** : Résultats des captures des phlébotomes dans la région de Kherrata.

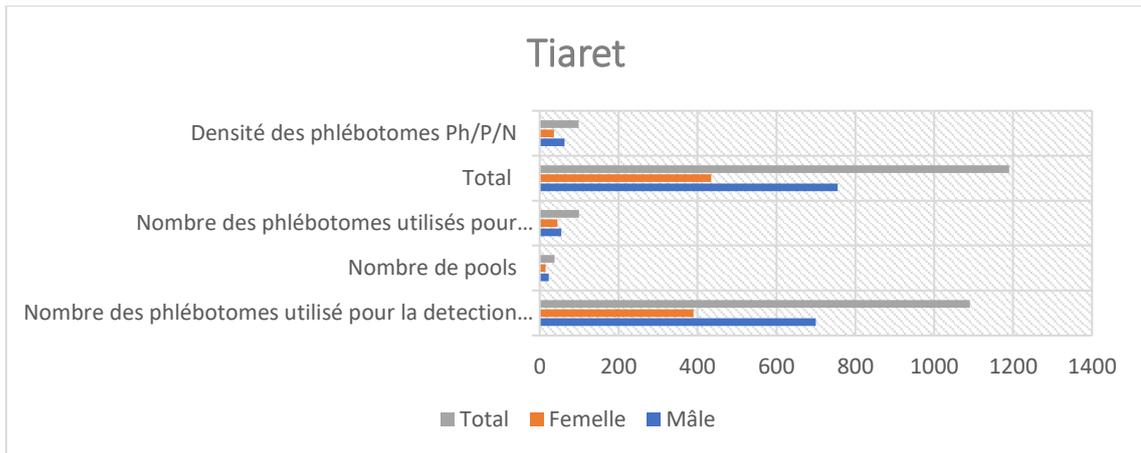
## B. Tiaret :

Nous avons collecté un total de 1190 phlébotomes dans la région de Tiaret, 1090 phlébotomes ont été identifiés par sexe ce qui a donné 700 mâles divisés en 23 pools et 390 femelles divisées en 15 pools, les pools ont été ensuite testés pour l'infection aux phlébovirus. Les 100 phlébotomes restants ont été utilisés pour l'identification morphologique des phlébotomes, les résultats obtenus ont été présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 3.4** : Résultats des captures des phlébotomes dans la région de Tiaret.

<b>Nombre de phlébotomes</b>	<b>Mâles</b>	<b>Femelles</b>	<b>Total</b>
<b>Nombre de phlébotomes utilisés pour la détection des phlébovirus</b>	700	390	1090
<b>Nombre de pools</b>	23	15	38
<b>Nombre de phlébotomes utilisés pour l'identification morphologique</b>	55	45	100
<b>Total</b>	755	435	1190
<b>Nombre des pièges utilisés</b>	4	4	4
<b>Nombre des nuits de captures</b>	3	3	3
<b>Densité des phlébotomes (Ph/P/N)</b>	62,91	36,25	99,16

Ph /P/N = phlébotomes par piège par nuit.



**Figure 3.6 :** Résultats des captures des phlébotomes dans la région de Tiaret

Les tableaux 3.3 et 3.4 et les figures 3.5 et 3.6 montrent que la densité des phlébotomes dans la région de Kherrata 167,55 Ph/P/N est plus importante que la densité des phlébotomes dans la région de Tiaret 99,16 Ph /P/N.

### 3.3.2. Résultats de la détection et d'isolement des phlébovirus :

#### 3.3.2.1. Résultats de la détection des phlébovirus :

##### 3.3.2.1.1. Résultats globaux de la détection des phlébovirus :

Dans les deux régions d'étude, un total 100 pools a été testé par R-T-Nested-PCR, nous avons détecté la présence de l'ARN des phlébovirus dans les deux régions, dans 10 pools soit un pourcentage de 10 %, avec un taux d'infection global de 10 /4141 (0,24%).

La circulation des phlébovirus a été démontrée dans les deux régions d'étude.

##### 3.3.2.1.2. Résultats de la détection des phlébovirus par région :

###### A. Kherrata :

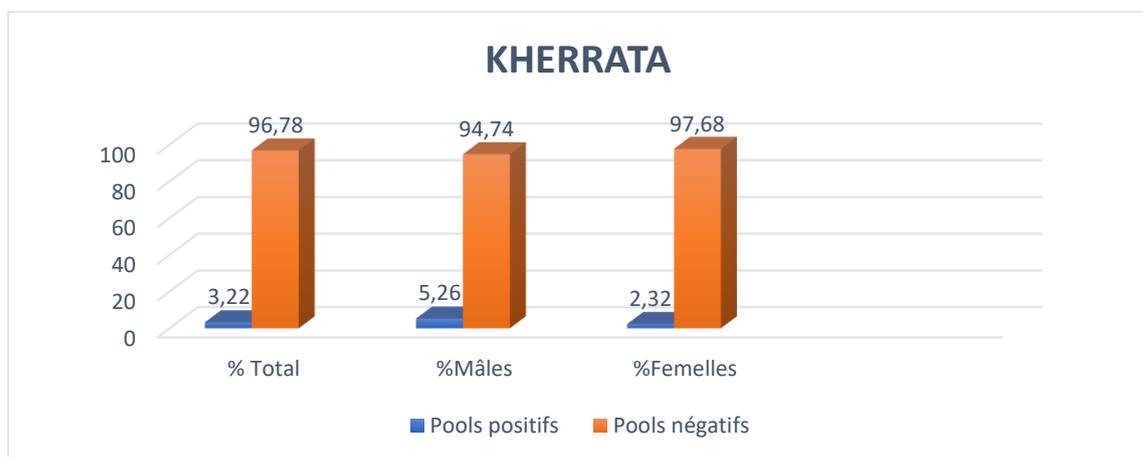
Dans la région de Kherrata, un total de 62 pools a été testé par R-T-Nested PCR, nous avons trouvé 2 pools infectés par l'ARN des phlébovirus soit un pourcentage de 3,22%, avec un taux d'infection égale à 0,06% (2/3051), les résultats ont été détaillés dans le tableau suivant :

**Tableau 3.5** : Résultats du pourcentage d'infection des pools et taux d'infection dans la région de Kherrata.

Sexe	Nombre de phlébotomes	Nombre de pools	Pools positifs	( % )	Taux d'infection
Mâles	940	19	1	5,26 %	0,1%
Femelles	2111	43	1	2,32 %	0,05%
<b>Total</b>	<b>3051</b>	<b>62</b>	<b>2</b>	<b>3,22 %</b>	<b>0,06%</b>

$\text{Kh}^2 = 0,032$

**P-value pour le taux d'infection= 0,858**



**Figure 3.7** : Pourcentage des pools infectés par l'ARN des phlébovirus dans la région de Kherrata.

Le tableau 3.5 et la figure 3.7 montrent que dans la région de Kherrata les mâles et les femelles sont infectés, avec un taux d'infection plus élevé chez les mâles (0,1%), mais statistiquement la différence entre les taux d'infection n'est pas significative, les P-value = 0,858 > 0,05.

## B. Tiaret :

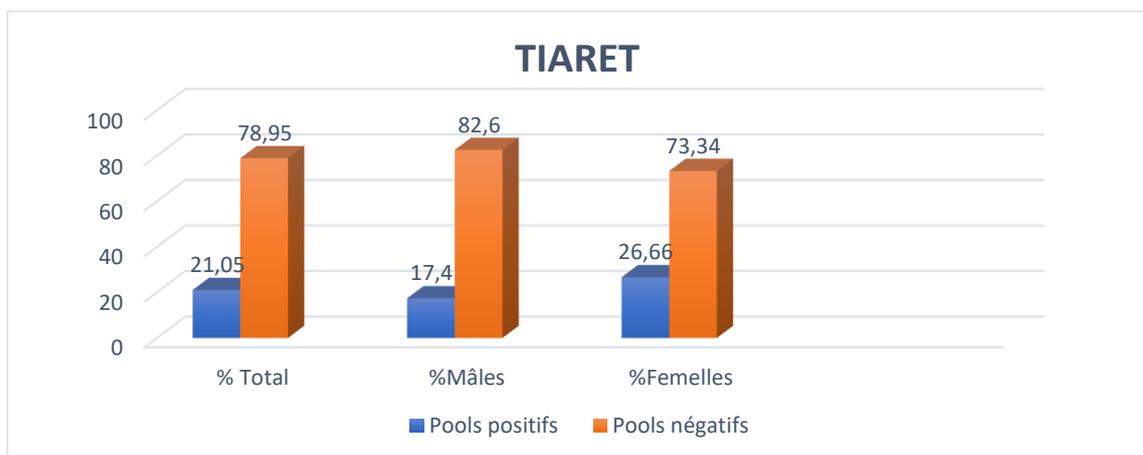
Dans la région de Tiaret, un total de 38 pools a été testé par R-T-Nested PCR, nous avons trouvé 8 pools infectés par l'ARN des phlébovirus soit un pourcentage de 21,05%, avec un taux d'infection égale à 0,73%. Les résultats obtenus ont été détaillés dans le tableau suivant :

**Tableau 3.6 :** Résultats du pourcentage d'infection des pools et taux d'infection dans la région de Tiaret.

Sexe	Nombre de phlébotomes	Nombre de pools	Pools positifs	( % )	Taux d'infection
Mâles	700	23	4	17,40 %	0,57 %
Femelles	390	15	4	26,66 %	1,02 %
<b>Total</b>	1090	38	8	21,05 %	0,73 %

**Khi2 = 0, 217**

**P-value pour le taux d'infection= 0,642**



**Figure 3.8 :** Pourcentage des pools infectés par l'ARN des phlébovirus dans la région de Tiaret

Le tableau 3.6 et la figure 3.8 montrent que les mâles et femelles sont infectés avec une infection plus importante chez les femelles (1,02 %). Statistiquement la différence n'est pas significative, P-value = 0,642 > 0,05.

D'après nos résultats, l'infection est présente dans les deux régions (Kherrata et Tiaret), mais, elle est plus importante à Tiaret (0,73%). La différence est statistiquement significative P-value= 0.0005 < 0,05.

### **3.3.2.2. Résultats du séquençage des phlébovirus :**

#### **3.3.2.2.1. Résultats globaux du séquençage des phlébovirus :**

Après séquençages et traitement des séquences des 10 pools positifs (Ph9, Ph 33, Ph101, Ph102, Ph103, Ph108, Ph110, Ph 118, Ph119, Ph133). Nous avons détecté deux virus différents ; TOSV et PUNV. Nous avons seulement publié les séquences du PUNV qui étaient de bonnes qualités contrairement aux séquences de TOSV.

#### **3.3.2.2.2. Résultat du séquençage des phlébovirus par Région :**

##### **Kherrata :**

Le séquençage des deux pools positifs détectés à Kherrata (Ph 9, Ph 33) a permis de révéler la circulation de PUNV dans la région de Kherrata.

##### **Tiaret :**

Le séquençage des huit pools positifs détectés à Tiaret (Ph 101, Ph 102, Ph 103, Ph 108, Ph 110, Ph 118, Ph 119, Ph 133) a permis de confirmer la circulation de TOSV dans la région de Tiaret.

Les résultats du séquençage des phlébovirus ont été détaillés dans le tableau suivant :

**Tableau 3.7 :** Les espèces virales détectées après séquençage, dans les deux régions Kherrata et Tiaret.

Régions	Pools positifs	Nombre de phlébotomes	La taille des fragments	Espèces virale
<b>Kherrata</b>	Ph 9	50	240 pb	Punique virus
	Ph 33	50	240 pb	Punique virus
<b>Tiaret</b>	Ph 101	30	240 pb	Toscana virus
	Ph 102	20	240 pb	Toscana virus
	Ph 103	20	240 pb	Toscana virus
	Ph 108	50	240 pb	Toscana virus
	Ph 110	20	240 pb	Toscana virus
	Ph 118	30	240 pb	Toscana virus
	Ph 119	30	240 pb	Toscana virus
	Ph 133	50	240 pb	Toscana virus

Le tableau 3.7 montre la circulation de deux phlébovirus, PUNV à Kherrata et TOSV à Tiaret.

### 3.3.2.3. Résultats de l'isolement viral :

#### 3.3.2.3.1. Résultats de l'isolement viral globaux :

Les pools positifs détectés par la R-T-Nested PCR, ont été ensemencés sur des cellules de reins de singe vert africain Vero (Vero ATCC CCL81), les effets cytopathiques ont été observés au microscope optique sur 4 pools (Ph 9, Ph 33, Ph 118, Ph 119).

### **3.3.2.3.2. Résultats de l'isolement viral par région :**

#### **A. Kherrata**

Pour la région de Kherrata, les pools Ph9 et Ph33 ont montré des effets cytopathiques clairs sur le passage 0 aux jours 4 et 5, respectivement. L'isolement du phlébovirus a été confirmé par RT-Nested-PCR comme décrite précédemment. Les séquences consensus des deux souches obtenues lors de la première étape de la RT-PCR ont une taille de 550pb et ont été soumises à GenBank en tant que souche PUNV Ph9 (numéro d'accès ON524174) et Ph33 (numéro d'accès ON524173).

#### **B. Tiaret :**

Pour les deux pools de la région de Tiaret ils étaient négatifs pour R-T-Nested PCR. Les résultats de l'isolement viral ont été détaillés dans le tableau 3.8.

**Tableau 3.8** : Résultats de l'isolement des phlébovirus dans les deux régions, Kherrata et Tiaret.

Régions	Pools positifs	Effets cytopathiques	R-T-Nested PCR	Pourcentage d'isolement
<b>Kherrata</b>	Ph 9	Positif	Positif (PUNV)	100%
	Ph 33	Positif	Positif (PUNV)	
<b>Tiaret</b>	Ph 101	Négatif	Négatif	0%
	Ph 102	Négatif	Négatif	
	Ph 103	Négatif	Négatif	
	Ph 108	Négatif	Négatif	
	Ph 110	Négatif	Négatif	
	Ph 118	Positif	Négatif	
	Ph 119	Positif	Négatif	
	Ph 133	Négatif	Négatif	

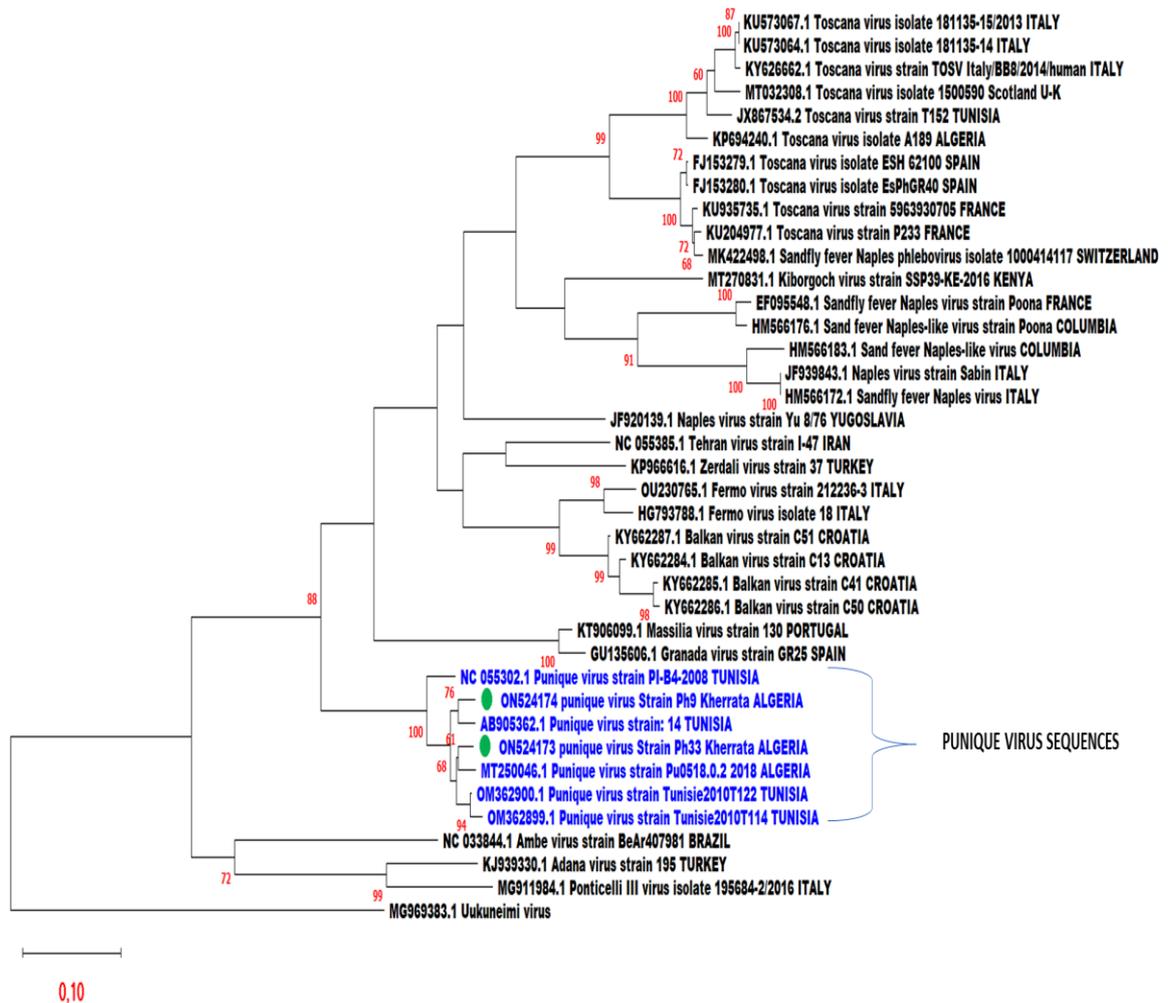
Le tableau 3.8 montre l'isolement de deux souches de PUNV dans la région de Kherrata. Nous avons isolé deux souches sur les deux pools de phlébotomesensemencés. Tandis qu'à Tiaret, malgré la présence d'effets cytopathiques dans les pools Ph118 et Ph 119, le résultat de la PCR était négatif.

### 3.3.2.4. Résultats phylogénétiques des deux souches isolées à Kherrata :

Les résultats des analyses phylogénétiques des deux souches isolées à Kherrata (ON524174 PUNV strain Ph 9 Kherrata Algeria, ON524173 PUNV strain Ph 33 Kherrata Algeria) ont été présentés dans le tableau 3.9 et la figure 3.9.

**Tableau 3.9** : Les distances par paires des nucléotides et des acides aminés entre les séquences du virus Punique.

N° sequences	1	2	3	4	5	6	7
	<b>Distances des acides aminés</b>						
1. ON524174 PUNV strain Ph9 Kherrata Algeria		0,000	0,0061	0,0061	0,0381	0,0121	0,0121
2. AB905362.1 PUNVstrain 14 Tunisia	0,0327		0,0061	0,0118	0,0381	0,0121	0,0236
3. ON524173 PUNV strain Ph33 Kherrata Algeria	0,0500	0,0412		0,000	0,0305	0,0061	0,0182
4. MT250046.1 PUNV strain Pu0518.0.2 2018 Algeria	0,0476	0,0515	0,0348		0,0305	0,0061	0,0287
5.OM362899.1 PUNV strain2010T114 Tunisia	0,0590	0,0561	0,0478	0,0505		0,0229	0,0229
6.OM362900.1 PUNV strain 2010T122	0,0412	0,0369	0,0328	0,0348	0,0128		0,0121
7.NC 055302.1 PUNVstraiPI- B4-2008 Tunisia	0,0632	0,0770	0,0676	0,0763	0,0705	0,0542	
	<b>Distances des nucleotides</b>						



**Figure 3.9 :** Analyse phylogénétique des deux souches isolées. Les distances et les regroupements ont été déterminés par l'algorithme de distance par paires et la méthode du Maximum Likelihood de MEGAX, et la robustesse des groupes a été testée en utilisant 500 pseudo-répliquats bootstrap.

Le tableau 3.9 et la figure 3.9 montrent la relation entre la souche ON524174 PUNV Ph9 strain Kherrata Algeria et la souche AB905362.1 PUNV strain 14 Tunisia, isolée en Tunisie est confirmée par 76% de Bootstrap et avec 3,3% et 0% de distances entre nucléotides et acides aminés respectivement, tandis que la souche ON524173 PUNV Ph33 strain Kherrata Algeria, est liée à la souche MT250046.1 PUNV strain Pu0518.0.2 2018 Algeria, détectée en Algérie et leur relation est confirmée par 61% de Bootstrap et avec 3,5% et 0% de distances entre nucléotides et acides aminés.

### 3.3.3. Résultats d'identification des phlébotomes :

#### 3.3.3.1. Résultats d'identification morphologique des phlébotomes :

##### 3.3.3.1.1. Résultats globaux d'identification morphologique :

Dans les deux régions d'étude, sur un total de 400 phlébotomes utilisés pour l'identification morphologique, nous avons identifié un seul genre (*Phlebotomus*) et deux sous-genres, *Phlebotomus* avec une seule espèce (*Phlebotomus papatasi* (0,75%), et le sous-genre (*Larroussius*) avec trois espèces (*Phlebotomus perniciosus* (98%), *Phlebotomus longicuspis* (0,5%), *Phlebotomus perfiliewi* (0,75%)). Les résultats sont détaillés dans les tableaux suivants :

**Tableau 3.10** : Répartition des espèces de phlébotomes inventoriées dans les deux régions d'étude.

Espèces	Régions d'étude								
	Kherrata			Tiaret			Total		
	M	F	(AR)	M	F	(AR)	M	F	(AR)
<i>P. perniciosus</i>	152	144	98,66%	50	46	96%	202	190	98%
<i>P. longicuspis</i>	0	2	0,67%	0	0	0%	0	2	0,5%
<i>P. perfiliewi</i>	1	1	0,67%	0	1	1%	1	2	0,75%
<i>P. papatasi</i>	0	0	0%	3	0	3%	3	0	0,75%
<b>Total</b>	153	147	100%	53	47	100%	206	194	100%

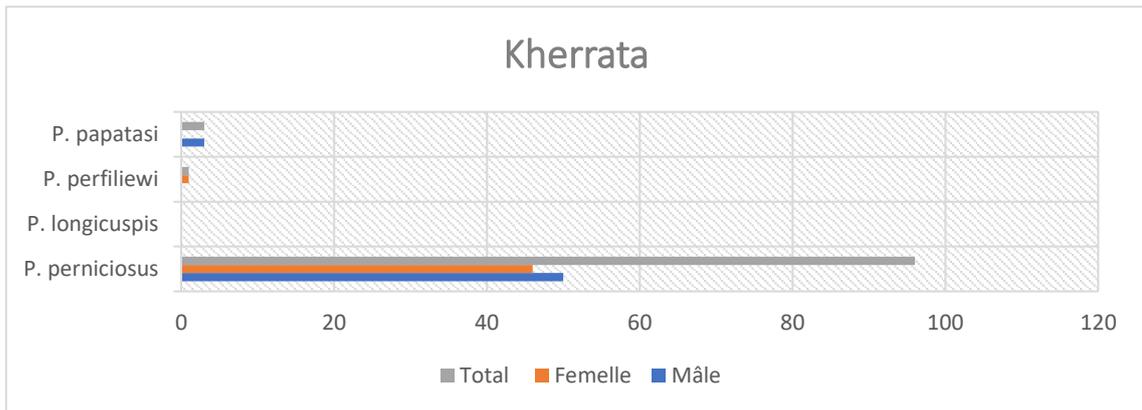
**M** : Mâles, **F** : Femelles, **AR** : Abondance Relative

Le tableau 3.10 montre que l'espèce dominante dans les deux régions d'étude était *P. perniciosus* avec un pourcentage de 98% dans les deux régions d'étude.

### 3.3.3.1.2. Résultats d'identification morphologique par région :

#### A. Kherrata :

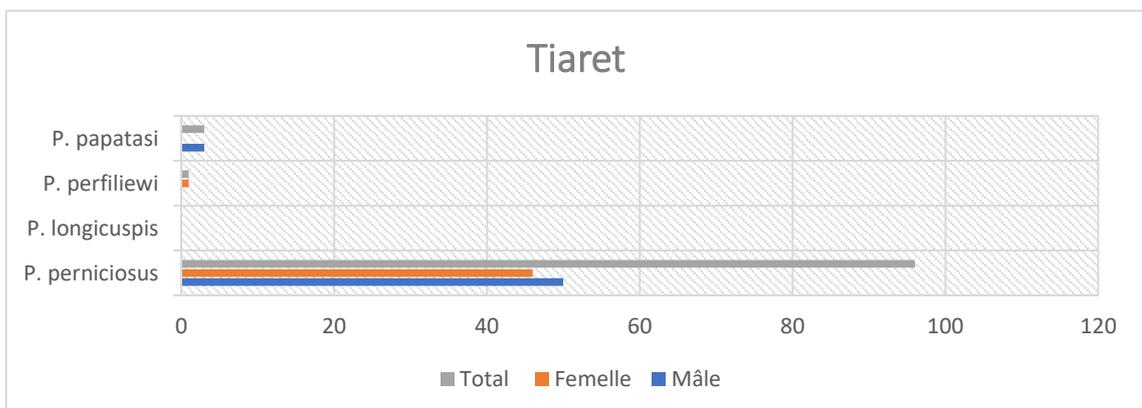
Dans la région de Kherrata, sur les 300 phlébotomes identifiés, un seul sous-genre a été identifié (*Larroussius*) avec trois espèces à savoir : *P. perniciosus* (98,66%), *P. longicuspis* (0,67%), *P. perfiliewi* (0,67%).



**Figure 3.10** : Espèces de phlébotomes inventoriées dans la région de Kherrata.

#### Tiaret :

Pour la région de Tiaret, sur un total de 100 phlébotomes identifiés, deux sous-genres ont été identifiés, (*Larroussius*) avec deux espèces : *P. perniciosus* (96%), *P. perfiliewi* (1%), et le sous-genre *Phlebotomus* avec une seule espèce *P. papatasi* (3%).



**Figure 3.11** : Espèces de phlébotomes inventoriées dans la région de Tiaret

### 3.3.3.2. Résultats d'identification moléculaire des phlébotomes :

#### 3.3.3.2.1. Résultats globaux d'identification moléculaire :

Dans les deux régions, après séquençage et BLAST des séquences obtenues, l'espèce dominante dans les pools positifs était *P. perniciosus*. Les résultats de l'identification moléculaire des dix pools positifs ont été présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 3.11:** Résultats de l'identification moléculaire des phlébotomes dans les deux régions d'étude.

Régions /Pools testés	Pools positifs	Espèce de phlébotome
<b>Kherrata</b>	Ph 9	<i>P. perniciosus</i>
	Ph 33	<i>P. perniciosus</i>
<b>Tiaret</b>	Ph 101	<i>P. perniciosus</i>
	Ph 102	<i>P. perniciosus</i>
	Ph 103	<i>P. perniciosus</i>
	Ph 108	<i>P. perniciosus</i>
	Ph 110	<i>P. perniciosus</i>
	Ph 119	<i>P. perniciosus</i>
	Ph 118	<i>P. perniciosus</i>
	Ph 133	<i>P. perniciosus</i>

Le tableau 3.11 montre que l'espèce dominante dans les pools positifs dans les deux régions d'étude, était *P. perniciosus*.

Les résultats de l'identification moléculaire confirment les résultats de l'identification morphologique des phlébotomes.

## DISCUSSION

La transmission d'agents pathogènes comme les phlébovirus et les leishmanies constitue un problème de santé publique depuis leur découverte, en particulier dans les pays où ces microorganismes sont endémiques et, comme ils sont tous les deux transmis par les phlébotomes, les co-infections humaines ne sont pas rares [153]. En particulier, de nouvelles recherches ont démontré que des nouveaux phlébovirus circulent dans la région méditerranéenne [154]. A ce jour, peu de recherches concernant les phlébovirus ont été menées en Afrique du Nord et notamment en Algérie, par rapport aux maladies parasitaires transmises par les phlébotomes tels que les leishmanioses, malgré que les phlébotomes puissent transmettre un large éventail de virus transmis par les arthropodes appartenant aux familles *Phenuiviridae*, *Reoviridae* et *Rhabdoviridae*, [61]. Pour ces raisons, les systèmes de surveillance active constituent une stratégie importante pour garder sous contrôle la propagation des phlébotomes et la transmission des phlébovirus [154]. Jusqu'à présent, seul le TOSV a été isolé des phlébotomes algériens [12].

Tous les phlébotomes utilisés dans notre étude ont été capturés à l'aide piéges lumineux type CDC, cette technique de piégeage est considérée comme une technique de référence pour la collecte des phlébotomes dans les surveillances entomologiques des leishmanioses et des phlébovirus. Elle est utilisée aussi, pour la capture d'autres insectes impliqués dans la transmission d'autres maladies vectorielles émergentes et ré-émergentes [12,13,14,15, 131,55, 155, 156, 157, 158, 159, 160]. Cette technique permet de capturer des phlébotomes vivants en bon état, chose qui est essentielle dans notre étude sur des phlébovirus à ARN très sensible à la chaleur après la mort des phlébotomes, elle permet également de réaliser 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 d'autres agents pathogènes transmis par ces insectes vecteurs tels que les leishmanies et les bactéries. Les chances d'isolement et de détection des phlébovirus dépendent de la viabilité des spécimens qui dépend à son tour de la technique de capture utilisée [122].

Dans les deux régions, sur un total de 4151 phlébotomes analysés, 10 pools étaient infectés par les phlébovirus, soit un taux global d'infection à phlébovirus égal à 0,24%. La taille des pools analysés varie de 20 à 50 phlébotomes, l'impact de cette variation sur le taux d'infection est faible. Une étude réalisée sur l'effet de la taille des pools sur la détection des virus par PCR chez les moustiques a montré que le virus West Nile (WNV) peut être détecté de manière fiable dans des pools de moustiques dépassant 50 spécimens, bien qu'il y ait une certaine perte de sensibilité avec des pools de très grandes tailles [161]. Le taux d'infection est 10 fois plus important à Tiaret (0,73%), qu'à Kherrata (0,06%), cette différence statistiquement significative (P-value = 0,0005), peut être expliquée par le fait qu'à Tiaret la majorité des phlébotomes étaient capturés dans une seule étable durant la même nuit de capture, une infection d'un très grand nombre de phlébotomes au même temps est possible. Le plus grand nombre des phlébotomes a été capturé dans le site dit Tamba de la commune de Guertoufa, tandis que pour les autres stations de piégeages, un faible nombre de phlébotomes a été capturé qui se sont tous révélés négatifs.

Des résultats similaires ont été observés en Algérie, Une étude réalisée en Kabylie, par Izri et al., a rapporté un taux d'infection estimé de 0,22%, dont le virus détecté était SFSV [14]. Une autre étude menée au centre de l'Algérie par Moureau et al., a montré que le taux d'infection par les phlébovirus était de 0,38 %. Dans cette étude deux virus ont été détectés en l'occurrence SFNV et SFSV [15].

Des taux similaires d'infection des phlébotomes par les phlébovirus ont été signalés au Maroc, 0,21% Chypre 0,25 % et en France 0,29% [11, 89, 162].

Des taux d'infection plus faibles ont été enregistrés en Algérie 0,005%, Turquie 0,01%, Tunisie 0,03%, Maroc 0,07% France 0,1%, Espagne 0,05% et en Albanie 0,03% [12, 107, 7, 10, 163, 164, 165]

Des taux d'infection plus élevés ont été enregistrés en Italie, France, Tunisie et au Maroc lors des enquêtes entomologiques, qui ont permis la détection de plusieurs phlébovirus avec des taux d'infection de 0,5%, 0,87%, 1,2 %, 0,67%, et 0,6% respectivement [166, 83, 90, 13, 8].

Les mâles et les femelles ont été retrouvés infectés dans les deux régions d'étude, l'infection a été plus importante chez les mâles que chez les femelles à Kherrata. Par contre à Tiaret les femelles étaient plus infectées que les mâles avec un taux d'infection M/F de 0,1%/0,05% à Kherrata et 0,57% /1,02% à Tiaret., les différences d'infection observées entre les deux sexes ne sont pas statistiquement significatives (Pvalue = 0,858 et 0.642) pour Kherrata et Tiaret respectivement. La détection et l'isolement des phlébovirus se fait non seulement chez les femelles hématophages mais aussi chez les mâles. Plusieurs études menées dans la région méditerranéenne ont permis la détection et l'isolement des phlébovirus à partir des deux sexes [90, 167, 107, 96]. Cela indique qu'il existe certainement d'autres modes de transmission des phlébovirus entre les phlébotomes loin des hôtes vertébrés. Actuellement, on ignore si la transmission (verticale) se produit dans les habitats naturels, de plus l'importance ou l'efficacité de ce mécanisme de transmission pour la persistance du virus est inconnue. Cependant, ce mode de transmission a été prouvé plusieurs fois expérimentalement [168, 102]. Étant donné que le taux d'infection de la progéniture est faible et diminue de la première génération à la suivante dans les expériences de laboratoire, il est probable que les phlébovirus ont évolué vers d'autres mécanismes de transmission dans la nature [101]. La transmission vénérienne (horizontale) des mâles infectés aux femelles non infectées par accouplement a été signalée lors d'expériences de laboratoires [168, 103]. Des études ont permis la détection sporadique des phlébovirus chez les moutons, souris de bois, renard et chauvesouris, mais il n'y a pas de réservoirs définis par certitude pour les phlébovirus. Il a été démontré que lors d'infections par TOSV, l'homme ne peut jouer le rôle réservoir à cause de la virémie transitoire qui caractérise l'infection. Les phlébovirus ont été identifiés et isolés chez les humains et les phlébotomes, les autres données rapportées pour les vertébrés non humains consistent en des résultats de séroprévalence sans preuve d'un rôle dans le cycle du virus dans la nature [25].

Ces données laissent penser que le maintien des phlébovirus dans la nature est principalement assuré par les phlébotomes. Les humains et les grands vertébrés pourraient amplifier le virus mais ils sont généralement considérés comme des hôtes sans avenir (culs de sac épidémiologique), jusqu'à présent il n'y a pas de

preuves de leur implication en tant que réservoirs pour ces virus, par conséquent, ils n'ont pas un rôle important dans le cycle de vie naturel du virus [5].

Une étude récente sur le virus Massila (MASV) a montré que le MASV n'est pas transmis efficacement entre les différents stades de développement de *P. perniciosus* ou par le repas sanguin chez les adultes de *P. perniciosus*, en montrant que la transmission par repas sanguin n'entraîne pas une proportion élevée de femelles infectées, qui soutient indirectement la théorie selon laquelle les vertébrés représentent des hôtes sans avenir (culs de sac épidémiologique), qui ne jouent pas un rôle important dans le cycle de vie du virus [6].

Le séquençage des dix pools positifs a fourni des séquences de très mauvaise qualité après traitement de ses séquences et Blast dans le Genbank nous avons pu identifier deux phlébovirus TOSV à Tiaret et PUNV virus à Kherrata. Les fragments étaient de petite taille 240 pb Ce qui nous a empêché de faire une étude phylogénétique sur la base de séquences de mauvaise qualité. En Algérie le TOSV a été déjà détecté et isolé à partir de phlébotomes non identifiés dont le peuplement était dominé par *P. perfleivi* à Draa El mizan à Tizi Ouzou , de plus, 50% des sérums testés étaient positifs pour les anticorps anti TOSV [12]. Pour le PUNV, il a été détecté à Blida à partir de phlébotomes non identifiés dont le peuplement était dominé par *P. perniciosus* [16]. Chaque virus des deux virus détectés, a été signalé dans deux régions qui sont géographiquement éloignées l'une de l'autre ce qui signifie une large circulation de ces deux virus en Algérie. Pour les animaux une grande circulation du TOSV a été observée chez les chiens en Algérie [17,18].

L'ensemencement des dix pools positifs à la PCR sur des cellules Vero a permis d'observer sous microscope optique des effets cytopathiques aux jours 4 et 5, sur quatre échantillons, pools Ph9 et Ph33 à Kherrata et Ph 118 et Ph 119 à Tiaret, parmi les quatre échantillons deux échantillons Ph9, Ph33 étaient positifs à la R-T-PCR (taille du fragment 550pb). Les produits de la PCR ont fourni de très bonnes séquences qui nous ont permis de réaliser l'étude phylogénétique pour ces deux séquences.

Les pools qui ont été négatifs lors de l'isolement viral qui n'ont pas donné d'effet cytopathique, ils ont été manipulés tardivement, ce qui a abouti à la mort du virus

sous l'effet de la chaleur, le non-respect de la chaîne de froid lors de la manipulation est une cause possible aussi. L'isolement du virus exige que les phlébotomes soient collectés vivants et maintenus soit vivants, soit à très basses températures, depuis le piégeage jusqu'au transport et au stockage au laboratoire. Pour réaliser uniquement une détection des phlébovirus, il est possible de détecter l'ARN viral à partir de phlébotomes conservés soit sous réfrigération, soit dans de l'éthanol à 70%, pour éviter la déshydratation totale [122].

Le résultat PCR négatif observé pour les deux échantillons Ph119 et Ph 118 peut être expliqué par la toxicité du milieu de culture ou par l'infection des phlébotomes par d'autres arbovirus, et pour confirmer l'implication d'un autre arbovirus, nous devons utiliser des amorces universelles d'arbovirus, ces derniers n'étaient pas disponibles au laboratoire. Nous avons essayé avec des amorces de WNV mais le résultat était négatif. Nous avons refait les cultures avec les mêmes échantillons et nous avons observé toujours des effets cytopathiques pour les deux échantillons Ph118 et Ph119.

Les séquences consensus des deux souches obtenues lors de la première étape de la RT-PCR ont une taille de 550pb et ont été soumises au GenBank en tant que souche PUNV Ph9 (numéro d'accès ON524174) et Ph33 (numéro d'accès ON524173).

L'analyse phylogénétique montre que les deux souches isolées dans notre étude (Ph09 et Ph33) forment un groupe solide (100% de support bootstrap) avec les souches PUNV de Tunisie et d'Algérie. La souche ON524174 PUNV Ph9 était étroitement liée à la souche AB905362.1 PUNV de Tunisie [13], avec des distances nucléotidiques et d'acides aminés de 3,3 et 0% respectivement. Alors que la souche ON524173 PUNV Ph33 était étroitement liée à la séquence MT250046.1 PUNV souche Pu0518.0.2\_2018 d'Algérie détectée à Blida [16], les distances nucléotidiques et d'acides aminés étaient respectivement de 3,5% et 0%. Par ailleurs, les souches ON524174 PUNV Ph9 et ON524173 PUNV Ph33 ont été détectées et isolées à partir du même abri pour animaux mais elles présentaient une différence génétique de 5 % et 0,6 % en matière des distances d'acides aminés, ce qui suggère une source différente du virus dans la zone d'étude ou bien des mutations lors du passage d'une génération à une autre par voie verticale trans-ovarienne.

Sur 24 espèces de phlébotomes appartenant aux genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia* ont recensées en Algérie [1,3], nous avons identifié uniquement 4 espèces appartenant à deux sous-genres, le sous-genre *Phlebotomsus* représenté par *P. Papatasi* et le sous genre *Larroussius*, représenté par trois espèces, *P. perniciosus*, *P. prfleiwi* et *P. longicuspus*. La richesse spécifique elle est de trois espèces pour chaque une des deux régions inspectées.

Le sous-genre *Larroussius* est dominant dans les deux régions d'étude. Des études menées au nord Algérien ont signalé une dominance de ce sous-genre [169, 126, 55, 137,170,158, 160]. Ce sous-genre était le plus abondant lors des enquêtes entomologiques de détection et d'isolement de phlébovirus, réalisées en Algérie [14,15,12]. Les espèces du sous-genre *Larroussius* sont des vecteurs prouvés des leishmanies. De plus les espèces de ce sous-genre sont trouvées infectées par des phlébovirus. La majorité des pools contenant des séquences de phlébovirus génétiquement apparentés au SFNV ou à des virus similaires au SFSV correspondaient à des phlébotomes appartenant au sous-genre *Larroussius* [13]. D'où l'importance épidémiologique de ce sous-genre dans la transmission d'agents pathogènes dans les deux régions d'étude.

La richesse spécifique est faible en la comparant avec des études faunistiques réalisées dans le nord Algérien, en Kabylie des études ont enregistré des richesses spécifiques qui varient entre six et dix [55,169,170]. Lors d'une étude réalisée dans la même région Kherrata en 2014, Manseur a signalé une richesse spécifique de neuf espèces, la différence peut être due au fait que pendant cette étude, des pièges adhésifs ont été utilisés et la durée de piégeage était de quatre mois, avec une fréquence de deux piégeages par mois, ce qui a augmenté les chances de récolter d'autres espèces qui sont présentes en très faible abondance [137]. Une richesse spécifique similaire de trois espèces a été observée dans la région de Kherrata lors d'une étude publiée en 2022 [160]. Les richesses spécifiques observées lors des enquêtes entomologiques de surveillance des phlébovirus menées au nord Algérien, varient entre cinq et sept phlébotomes [12,14,15].

Nos résultats ont montré que l'espèce la plus abondante dans les deux zones d'étude était *P. perniciosus* avec une abondance relative totale de 98% (98,66% à Kherrata et 96% à Tiaret). Nos résultats sont similaires à d'autres études

précédentes menées dans le nord de l'Algérie où des fortes prévalences de cette espèce de phlébotome ont été rapportées. Ces études ont signalé des abondances relatives qui varient entre 47% à 88% [169, 155,137, 158,160], cette espèce connue comme le vecteur prouvé de *L. infantum*, agent causal de la leishmaniose viscérale et de l'infection par le TOSV dans la région méditerranéenne [19]. Elle a été retrouvée également infectée par le PUNV en Tunisie [13]. Des études de surveillances entomologiques des phlébovirus réalisées au nord Algérien ont montré une abondance de cette espèce par rapport aux autres espèces [14 ,15].

L'abondance relative élevée de cette espèce dans les deux régions d'études augmente les risques de transmission des phlébovirus détectés (TOSV, PUNV) chez les êtres humains. Cette espèce se rencontre principalement de la zone bioclimatique humide à aride mais peut également être trouvée dans les zones bioclimatiques sahariennes dans le sud du Sahara central bien qu'avec une faible densité par rapport au nord du pays [1]. Les résultats de Bounamous ont montré une abondance de cette espèce dans les étages bioclimatiques subhumides et semiarides par rapport aux autres étages de l'Algérie [35]. La région du Tel, avec son climat méditerranéen subhumide et semiaride, reste la zone où l'incidence de cette espèce est la plus élevée. Nos résultats n'étaient pas surprenants, car les deux zones d'étude se situent dans l'aire de répartition principale de l'espèce. De plus les sites choisis dans notre étude sont constitués d'abris de ruminants et des maisons dans un milieu rural ce qui forme des biotopes idéaux pour cette espèce pour la reproduction. Une étude réalisée au Portugal a montré que , *P. perniciosus* préfère les biotopes péri domestiques, en particulier pour les bergeries, avec un risque accru de présence en densités plus élevées, dans ces biotopes, qui constituent des abris et des microclimats stables, il y a généralement une accumulation de grandes quantités de matières organiques, facteur important pour le développement des larves, ainsi que les sources de repas sanguin constituées par les animaux, indispensable pour la reproduction. Cette densité élevée peut être due également à d'autres facteurs tels que les conditions climatiques et environnementales, ainsi que le caractère très endophile et zoo-anthropophile de *P. perniciosus*. Ce qui lui donne une certaine polyvalence écologique qui lui permet de s'adapter à plusieurs biotopes domestiques [171,172,173].

Trois autres espèces ont été identifiées dans les deux régions d'études avec des pourcentages très faibles : *P. perfiliewi* (0,75%) rencontrée dans les deux régions, *P. paptasi* (0,75%) uniquement à Tiaret et *P. longicuspis* (0,5%) uniquement à Kherrata.

*Phlebotomus perfiliewi* est un vecteur avéré de *L. infantum* dans le bassin méditerranéen. En Algérie, cette espèce transmet *L. infantum* Mon-24, qui provoque la leishmaniose cutanée sporadique du nord [94]. Le résultat obtenu s'accorde avec les résultats rapportés par plusieurs études réalisées au nord algérien qui ont signalé des abondances relatives faibles qui varient de 0,97% à 5% [55, 137, 146, 160], et il contraste avec ceux obtenus par Moulahem et al. 1998 ; Allal-Ikhlef et al., 2017 qui ont signalé une prédominance de cette espèce par rapport à l'ensemble des phlébotomes capturés avec des abondances relatives de 75,7% et 51,5% respectivement [174, 170]. On peut la rencontrer dans les régions subhumides, arides et semiarides à des latitudes allant jusqu'à 1 200 mètres au-dessus du niveau de la mer [38].

Lors de l'étude qui a permis l'isolement de TOSV pour la première fois en Algérie, *P. perfiliewi* était dominante par rapport aux autres espèces [12]. Cette espèce est aussi impliquée dans la transmission de TOSV [175]. Ce qui implique un risque de transmission du virus TOSV en Algérie dans les zones de répartition de cette espèce lorsqu'elle est en forte densité.

*Phlebotomus papatasi* est l'une des espèces les plus étudiées en raison de sa vaste zone d'occurrence géographique et de son importance médicale, car il est le principal vecteur de la leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ), causée par *L. major* dans les hauts plateaux et au nord du Sahara, [128], des résultats semblables aux nôtres ont été rapportés lors d'études entomologiques réalisées au nord Algérien, avec des prévalences qui varient entre 0,04% à 2,2% [176, 35, 55, 137, 177, 158]. Bounamous a signalé une très faible abondance de cette espèce dans les étages bioclimatiques semiaride et subhumide [35]. Cette faible abondance vient pour confirmer que l'espèce est peu présente à l'étage semiaride et subhumide, elle se rencontre en forte abondance particulièrement dans les régions steppiques nord sahariennes [38]. Elle a été retrouvée infectée naturellement par SFSV au nord de l'Algérie [15]. Cette espèce est connue pour son implication depuis longtemps dans

la transmission SFSV en Egypte [178]. Elle a été retrouvée naturellement infectée par le TOSV au Maroc [11].

*Phlebotomus longicuspis* est suspectée d'être le vecteur de *L. infantum*, en Algérie, Maroc et Tunisie [44]. Elle a été retrouvée infectée par SFNV en Algérie [15], par PUNV en Tunisie [13], et par TOSV au Maroc [10]. Elle est principalement répartie dans les zones bioclimatiques semiarides et arides du Sahara [38], ce qui explique les faibles effectifs obtenus dans notre étude. Des études antérieures ont déjà fait état de basses fréquences dans le nord de l'Algérie. Des études réalisées au nord de l'Algérie ont signalé des prévalences similaires aux nôtres qui varient de 0,6% à 2,7% [160, 137,170]. Les résultats obtenus par Bounamous ont montré que cette espèce est plus abondante dans les étages bioclimatiques aride et semiaride par rapport à l'étage subhumide [35].

Les résultats obtenus lors de l'identification morphologique des phlébotomes ont été confirmés par l'identification moléculaire des pools positifs et l'ADN de *P. perniciosus* était dominant dans les dix pools positifs.

Deux virus ont été détectés dans les deux régions d'étude : TOSV à Tiaret et PUNV à Kherrata, le premier virus provoque des méningites et méningo-encéphalites graves, pour le deuxième virus son pouvoir pathogène n'est pas encore connu. Ces deux régions sont dominées par l'espèce vectrice de la *L. infantum* et TOSV ce qui augmente le risque de transmission de ces virus chez les humains. Une Co-circulation de *L. Infantum* et du TOSV a été précédemment observée chez les phlébotomes dans un foyer de leishmaniose viscérale dans le centre de la Tunisie [20]. Elle a été aussi, signalé chez les phlébotomes en Italie [21]. De plus des études sérologiques ont prouvé une grande circulation du TOSV chez les chiens en Algérie dans les zones endémiques de leishmanioses [17,18]. L'implication des chiens comme réservoir dans le cycle de transmission des TOSV est suspectée suite aux taux élevés d'anticorps anti- TOSV, signalés chez les chiens en Tunisie et en Turquie [72,104]. Toutes ces données augmentent les risques de transmission de TOSV dans les foyers à forte densité de *P. perniciosus* et endémiques à la leishmaniose canine et humaine et posent les questions sur les co-infections *L.infantum* et TOSV.

Le PUNV a été isolé pour la première fois à partir de *P. perniciosus*, et détecté chez *P. longicuspis*, dans la région d'Utique, un foyer connu de leishmaniose viscérale humaine, qui est transmise en Tunisie principalement par *P. Perniciosus* [13]. De plus, dans notre étude, les deux souches de PUNV ont été isolées à partir de pools de *P. Perniciosus* dans une région où la leishmaniose viscérale est endémique [22], ce qui soulève la question d'une possible Co-circulation de *L. Infantum* et de PUNV dans la même région. Jusqu'à présent, l'impact du PUNV sur la santé publique est inconnu. Même si une Co-circulation du PUNV et du TOSV a été prouvée en Tunisie, il n'y a pas assez de données pour prouver sa pathogénicité pour les humains [179]. Cependant, le fait que le PUNV soit un membre du groupe SFNV (dont la majorité des membres sont pathogènes pour l'homme) et qu'il soit détecté chez *P. perniciosus*, un vecteur prouvé de *L. Infantum* en Algérie [95], implique la nécessité de mener des études sur l'impact de ce virus sur la santé publique. Il est important de souligner que 12 ans se sont écoulés entre la découverte du TOSV chez *P. Perniciosus* en 1971 [80], et la première preuve qu'il est un pathogène pour l'homme [68].

## CONCLUSION

Les phlébovirus transmis par les phlébotomes sont largement répandus dans la région méditerranéenne, Afrique, dans le sous-continent indien, au Moyen-Orient et en Asie centrale. À l'exception du TOSV, qui présente un tropisme marqué pour les systèmes neurologiques centraux et périphériques, les fièvres à phlébotomes se caractérisent par des symptômes moins graves, et sont souvent négligées par les médecins. Il y a aussi beaucoup moins d'intérêt scientifique pour les maladies virales transmises par les phlébotomes par rapport aux autres arbovirus.

En Algérie, la situation des phlébovirus est mal connue du fait que peu de données publiées sur la détection et la circulation du virus chez les humains et les animaux et les rôles de ces derniers dans la transmission et l'amplification du virus ne sont pas encore établis. La surveillance de ces virus reste primordiale aussi bien pour la santé animale que pour la santé publique.

Dans ce contexte, nous avons mené une étude entomologique sur Les phlébovirus dans l'Est et Ouest Algérien dont le but était la détection et isolement des phlébovirus à Kherrata, et Tiaret deux foyers endémiques de LCan et LH, de plus un inventaire de la faune des phlébotomes et une identification moléculaire du vecteur ont été réalisés.

Nos résultats ont permis la détection de deux phlébovirus TOSV à Tiaret et PUNV à Kherrata et d'isoler pour la première fois en Algérie, deux souches différentes apparentées au PUNV à partir de phlébotomes appartenant au sous-genre *Larroussius*. L'infection a été observée chez les phlébotomes mâles et femelles dans les deux régions. L'identification morphologique de 10% des phlébotomes a montré dans les deux zones d'étude, que l'espèce dominante était *P. perniciosus*, avec une abondance relative de 98%, cette espèce est un vecteur connu de *L. infantum* et du TOSV, elle peut participer également à la transmission d'autres phlébovirus tels que PUNV. Enfin l'identification moléculaire a confirmé nos résultats et L'ADN de *P. perniciosus*, était dominant dans tous les pools positifs. Cette espèce représente un risque épidémiologique lorsqu'elle se trouve en forte densité.

## RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

Actuellement, il n'existe pas de vaccin ou de traitement efficace contre les phlébovirus pathogènes pour l'homme tel que le TOSV, la seule solution qui puisse protéger contre les phlébovirus serait l'application de mesures de contrôle collectives et individuelles contre les phlébotomes.

Le manque de connaissances sur la transmission des phlébovirus et les mécanismes de maintien doivent clairement être étudiés à la fois dans les habitats naturels et dans des conditions expérimentales chez les phlébotomes.

Des investigations sérologiques et virologiques, ainsi que des études expérimentales chez les chiens et les autres mammifères vertèbres sont indispensables afin de définir les réservoirs dans le cycle de vie qui est mal connu.

Des investigations sérologiques et virologiques chez les patients présentant une fièvre d'origine inconnue, une méningite et/ou une encéphalite sont nécessaires pour déterminer l'impact du PUNV sur la santé publique,

Des études de Co-circulation et coinfections des SBPs et les parasites leishmanias sont intéressantes afin de savoir si ces interactions ont une signification biologique et la compréhension et la définition de la nature complexe de ces interrelations nécessiteront une série d'approches transdisciplinaires impliquant l'écologie, la virologie, la parasitologie, l'épidémiologie et l'immunologie, tant au niveau médical que vétérinaire.

Des investigations sérologiques et virologiques sur les Co-circulation TOSV / PUNV et les autres phlébovirus sont importantes afin de d'étudier les mutations des phlébovirus qui peuvent augmenter le pouvoir pathogène des phlébovirus.

Des études expérimentales sur la compétence et la capacité des éventuelles espèces vectrices à transmettre les phlébovirus sont important afin, d'établir les espèces vectrices qui restent toujours mal connues.

## APPENDICES

### APPENDICE A

#### LISTE DES ABREVIATIONS

ATSB : Appâts en sucre toxiques attractifs.

BUJV : Le virus Bujaru.

CDUV : Le virus Candiru.

CFUV : le virus Corfu.

CHIV : Le virus Chilibre

COI : cytochrome oxydase I.

ECP : Effet Cythopathique.

EMEM : Eagle's minimum essential medium

FRIV : Le virus Frijoles

ICTV : Le Comité International de Taxonomie des Virus.

IRS : Pulvérisation résiduelle à l'intérieur.

ITM : Matériaux traités aux insecticides.

ITM : Matériaux traités aux insecticides.

LCan: Leish,aniose Canine.

LCR : Liquide Céphalorachidien.

LH : Leishmaniose Humaine.

MKWV : Le virus Mukawa.

PTV: Le virus Punta Toro.

PUNV : Le virus punique.

RCI : Régulateurs de croissance des insectes.

RVFV : Le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift.

SALV : Le virus Salehabad.

SBPs : les phlebovirus transmis par les phlébotomes.

SFNV : Le virus de la Fièvre à Phlébotomes de Naples

SFSV : le virus de la Fievre a Phlébotomes de Sicile.

SFTS : le virus du Syndrome de Fèvre Sévère avec Thrombocytopénie

SNC : Système Nerveux Central

TOSV : Le virus Toscana.

UUKV: Le virus Uukuniemi.

CDC: Centers for Disease Control.

## APPENDICE B

### MINI KIT D'EXTRACTION D'ADN-ARN (DA AN GENE CO., LTD. OF SUN YAT UNIVERSITY. P.R. CHINA). PROTOCOL

#### PROTOCL EXTRACTION Da An Gene

##### 48 test /kit

Ajoutez **10mL** d'éthanol absolu, à l'inhibitor remover (conservez à température ambiante).

Ajoutez **44 mL** d'éthanol absolu à chaque bouteille de deionized solution (conservez à température ambiante).

Ajoutez **110 µL** d'éluant à Carrier RNA (poudre sèche lyophilisée) mixez et conservez à **-20 °C**.

##### Mélange de solution de lyse avec Carrier RNA :

	1TEST	20TESTS	48TESTS
Solution de lyse	<b>200 µl</b>	<b>4ml</b>	<b>9.6 ml</b>
Carrier RNA	<b>4 µl</b>	<b>80 µl</b>	<b>192 µl</b>

Avant d'effectuer le test, la solution de lyse doit être mélanger avec Carrier RNA.

##### Traitement Des Echantillons Et Extraction De L'Acide Nucléique :

-Ajoutez **50 µL** de la protéinase K dans un tube à centrifuger stérile de 1.5ml.

-Ajoutez **200 µL** du spécimen.

-Ajoutez **200µL** de la solution de lyse + **4µL** Carrier. Puis mixez à l'aide du vortex pour **15** seconds.

-Chauffez les tubes dans bain marie sec (**72°C**). 10 minutes, au même temps préchauffez l'éluant à **72°C**.

-Ajoutez **250 µL** d'éthanol absolu, puis mixez à l'aide d'un vortex pendant 15seconds.

-Centrifugeur à une vitesse élevé pendant 10 seconds.

-Transférez la totalité de la mixture dans un spin column, puis centrifugez à **12000 g**, pendant une minute (température de la chambre ambiante).

-Placez le spin column dans un nouveau tube collecteur.

-Ajoutez **500 µL** d'inhibitor remover , puis centrifugez à **12000 g**, pendant une minute (température de la chambre ambiante).

-Placez le spin column dans un nouveau tube collecteur.

-Ajoutez **500µL** de deionized solution, puis centrifugez à **12000 g**, pendant une minute (température de la chambre ambiante).

-Placez le spin column dans un nouveau tube collecteur.

-Ajoutez une autre fois, **500µL** de deionized solution, puis centrifugez à **12000 g**, pendant **une minute** (température de la chambre ambiante).

-Placez le spin column dans un nouveau tube collecteur.

-Placez le spin column et le tube collecteur à (température de la chambre ambiante). Puis centrifugez à **14000 g**, pendant **3 minutes**, pour éliminer l'éthanol résiduel.

-Placez le spin column dans un tube 1.5mL, puis chauffez le tube couvercle ouvert pendant **2 minutes** à **72 °C**, bain marie sec.

-Ajoutez **50 µL** d'eluent déjà préchauffé à **72°C**, fermer le couvercle du tube laissez pendant **1minute** à (température de la chambre ambiante). Puis centrifugez **14000** pendant une minute. Récupérez le tube collecteur qui contient l'Acide Nucléique et conservez à **-80°C**.

## APPENDICE C

## PROTOCOLE DE PURIFICATION D'AND PAR GEL-FILTRATION SUR RESINE SEPHADEX® G-50 SUOER FINE

Mode opératoire : Purification d'ADN par gel-filtration sur colonne de Sephadex® G50 Super Fine

 <p>UMR 1229 MGS Microbiologie et Géochimie des Sols 17 rue Sully – BP86510 21065 Dijon Cedex</p>	MODE OPERATOIRE	Code : <b>SSG / 002</b>
	<b>Purification d'ADN par gel- filtration sur résine Sephadex® G-50 Super fine.</b>	Date d'émission : <b>19/10/04</b> Version : <b>1</b> Date de révision : Date de retrait : Nombre de pages : <b>3</b>
Rédigé par : <b>S. Santoni / D. Bru</b>	Revu par : <b>F. Martin</b>	Approuvé par : <b>F. Martin</b>
Diffusion : Service de Séquençage et de Génotypage- Service Commun de Biologie		

**Mots clés :** Purification d'ADN, gel filtration, résine G50.

### 1- Remarques préliminaires

Cette étape a pour but de purifier par gel-filtration des produits d'amplification PCR ou les produits de réaction de séquence.

La résine Sephadex® G50 utilisée permet de dé-saler les échantillons et d'éliminer les nucléotides non incorporés et les amorces de PCR en excès. La limite d'exclusion de la résine G50 est d'environ 20 bases.

La plaque 96 puits MultiScreen HV est utilisée comme support inerte de la résine G50.

### 2- Objet et domaine d'application

Purifier des produits de PCR avant dosage.

Purifier des réactions de séquence avant injection sur séquenceur capillaire.

### 3- Préparation des colonnes

La purification se fait sur colonnes de résine Sephadex® G50 dans les plaques MultiScreen :

Charger la résine sèche Sephadex® G-50 Superfine dans les puits d'une plaque MultiScreen HV, format HTS en utilisant le chargeur de colonne de 45 µl comme suit :

- Déposer la résine Sephadex® G 50 dans chaque puits (45µl) du chargeur de colonne.
- Retirer l'excès de résine avec la raclette.
- Placer la plaque MultiScreen HV à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir et retourner l'ensemble.
- Taper sur le chargeur pour évacuer la résine vers la plaque.

Mode opératoire : Purification d'ADN par gel-filtration sur colonne de Sephadex® G50 Super Fine

Ajouter 300 µl d'eau ultra pure dans chaque puits contenant de la résine, fermer la plaque avec son couvercle et laisser incuber 3 heures à température ambiante.

Une fois que les mini-colonnes sont gonflées dans la plaque MultiScreen, elles peuvent être stockées à 4 °C. Pour plus de deux semaines, stocker les plaques entourées de paraffin ou dans une boîte en plastique étanche contenant un élément qui assurera une atmosphère humide et limitera ainsi le dessèchement des colonnes.

Placer la plaque MultiScreen HV sur une plaque de micro-titration au format standard 96 puits (ex : type plaque Beckman ref.# 609844, que l'on réutilisera) et centrifuger l'ensemble 5 minutes à 910 g pour éliminer l'eau et compacter les mini-colonnes. (Centrifugeuse Sigma 3K15, rotor Nr. 11222)

#### 4- Filtration des produits d'amplification ou des réactions de séquence

Le produit de PCR ou la réaction de séquence est si besoin dilué avec un volume d'eau ultra pure.

Déposer délicatement les échantillons à purifier au centre des mini-colonnes.

Placer la plaque MultiScreen HV sur une plaque de polypropylène au format standard 96 et centrifuger 5 minutes à 910 g.

Les filtrats contiennent les produits purifiés dans l'eau.

*Attention : Selon l'état de la résine, un certain pourcentage du volume déposé de la solution d'ADN peut être perdu. Dans le cas des réactions de séquence, toujours vérifier si le volume récupéré dans certains puits n'est pas trop faible. Pour éviter des problèmes lors de l'injection dans le séquenceur, ajouter 4 à 5 µl d'eau milliQ dans ces échantillons.*

#### 5- Pour les utilisateurs du séquenceur Beckman CEQ 2000 XL.

Les produits de séquence filtrés sont récupérés dans une plaque Beckman\* de polypropylène au format standard (ref.# 96 well plate, cone 25PKG, qui servira dans le séquenceur).

Après filtration, on récupère environ 15 µl de réaction (20 µl au départ).

25 µl de Sample Loading Solution (SLS, Beckman Quick Start Kit, à utiliser sous sorbonne) sont ajoutés à chaque échantillon.

Après homogénéisation recouvrir chaque échantillon d'une goutte d'huile minérale avant injection.

\* Pour plus de détail sur le chargement des plaques, se référer au mode opératoire SSG / 003 : Procédure d'utilisation du Beckman CEQ 2000 XL pour la réalisation de programmes de séquençage ou de génotypage.

Mode opératoire : Purification d'ADN par gel-filtration sur colonne de Sephadex® G50 Super Fine

#### 6- Récupération des plaques MultiScreen

Laisser sécher le gel G50, plaque ouverte à température ambiante puis jeter les cylindres secs de G50. Eventuellement, rincer la plaque avec de l'eau ultra pure. La plaque sèche est alors réutilisable sans risque (reposable) de pollution.

#### 7- Réactifs et matériels utilisés

##### Eau UP :

Eau ultra pure ou eau MilliQ ; eau de laboratoire purifiée par le système MilliQ de Millipore. Test de conductivité 18MΩ/cm.

##### Amersham Biosciences

Sephadex® G-50 DNA Grade Super Fine ref.# 17-0041-01

##### Matériel Millipore

MultiScreen-HV, format HTS Clear Plates ref.# MSHVN 45 10/50

MultiScreen column loader 45 µl ref.# MACL 09645

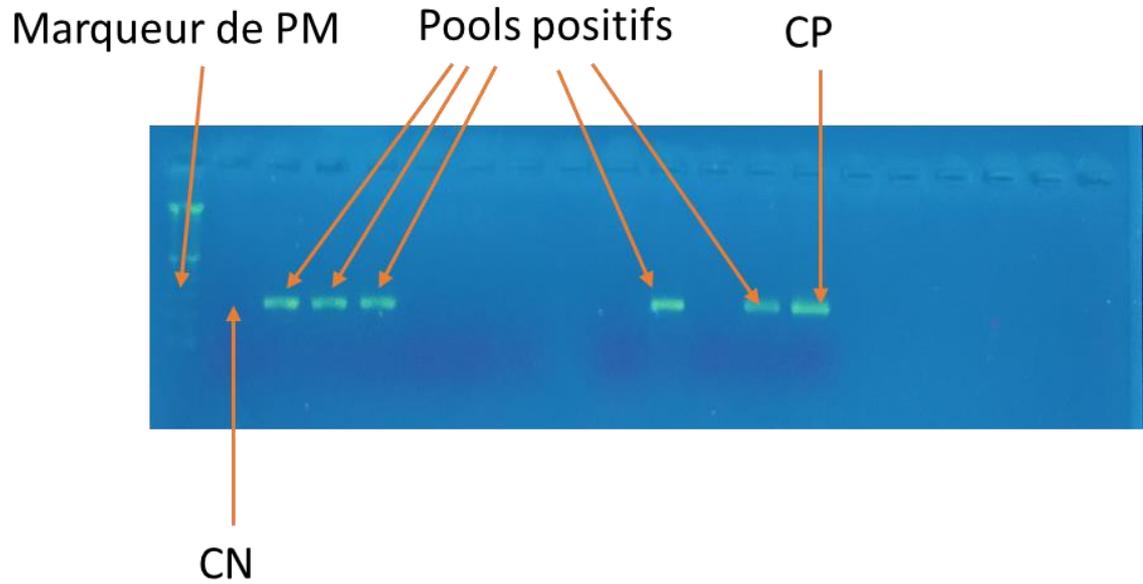
MultiScreen column loader scraper (racloir) ref.# MACL 05C03

MultiScreen centrifuge alignment frame\* (joint) ref.# MACF 09604

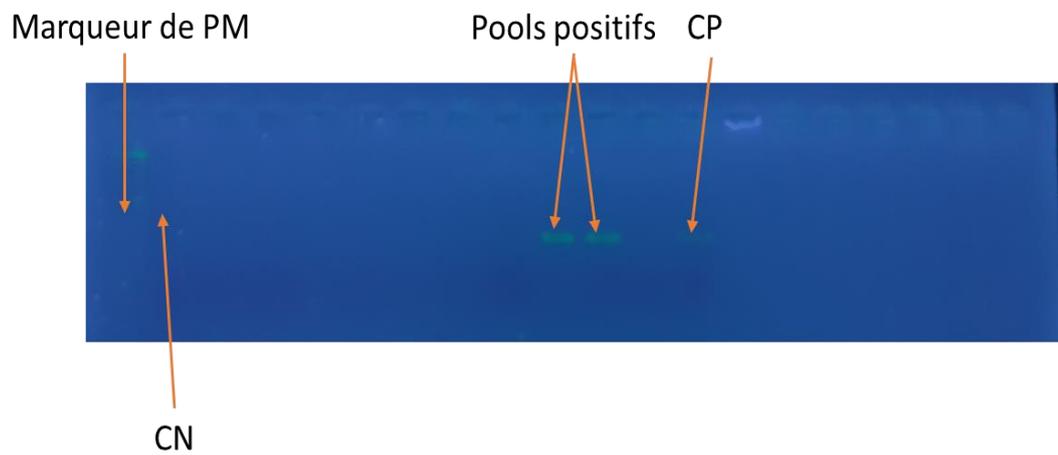
\*S'utilise avec les plaques MultiScreen-HV ref.# MAHTN 45 10/50.

## APPENDICE D

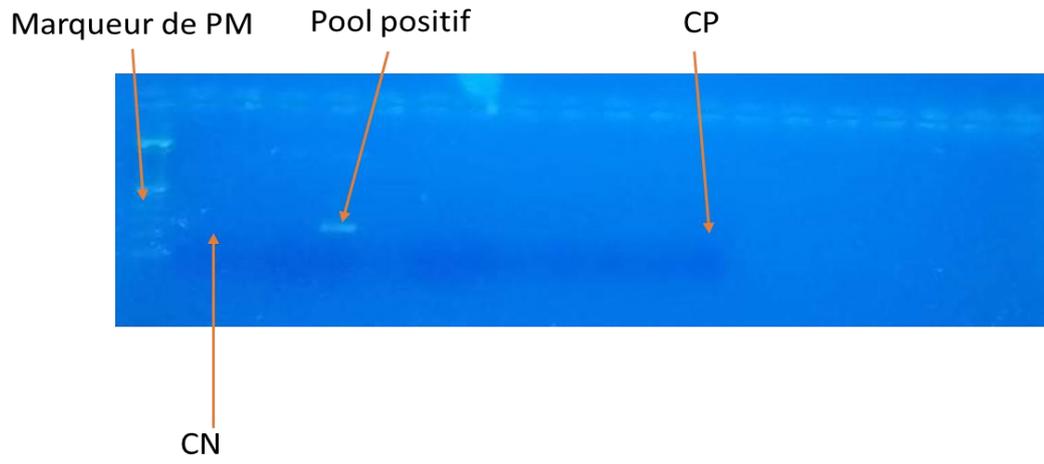
## PHOTOS DES RESULTATS DE LA RT.NESTED PCR



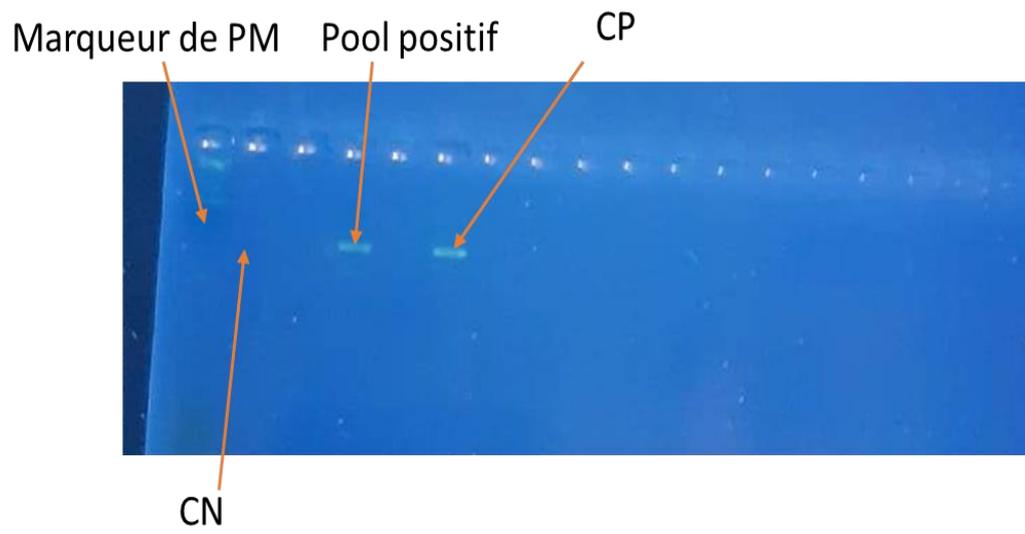
Pools positifs à la PCR nichée Ph101, Ph 102, Ph 103, Ph 108, Ph 110



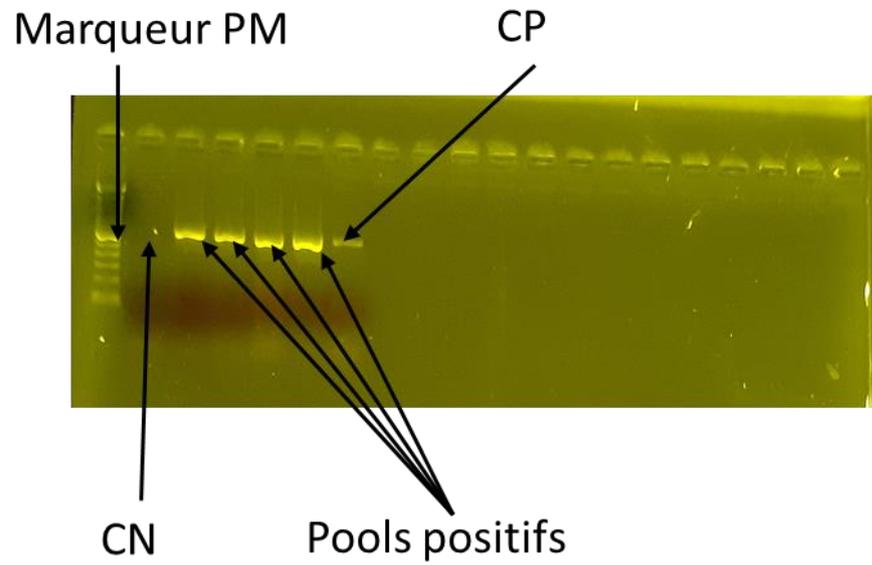
Pools positifs à la PCR nichée Ph 118, Ph 119.



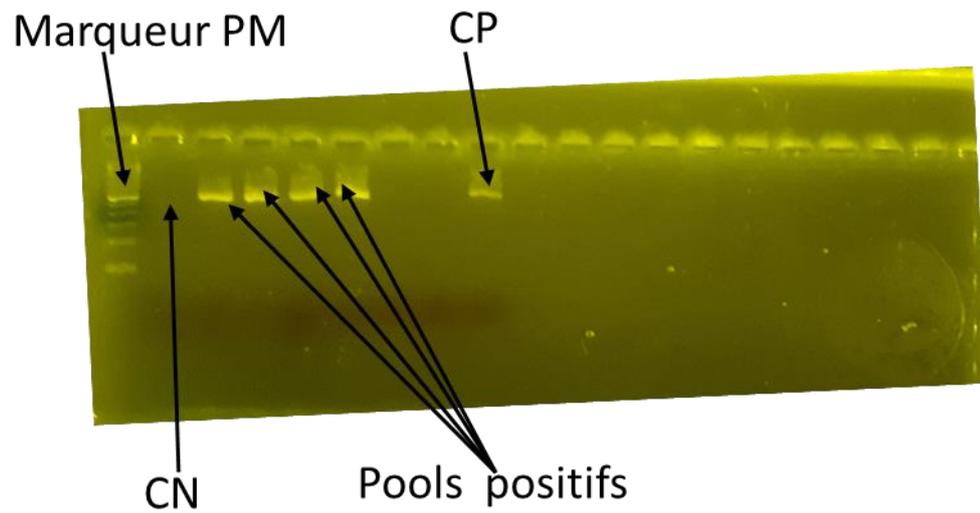
Pool positif à la PCR nichée Ph133



Pool positif à la PCR nichée Ph 9



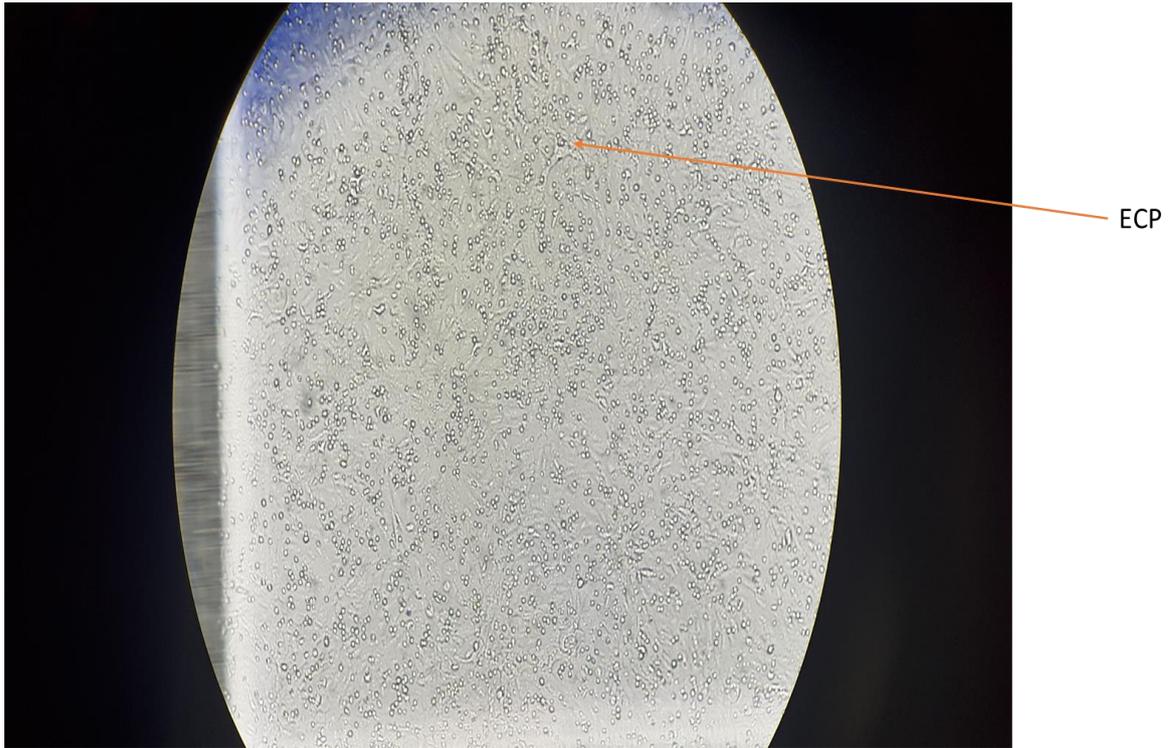
Pools positifs après premier passage( $P_0$ ) sur Vero Cell Ph9, Ph9', Ph33, Ph33'.



Pools positifs après premier passage( $P_{0+1}$ ) sur Vero Cell Ph9, Ph9', Ph33, Ph33'.

**APPENDICE F**

**PHOTO DES EFFETS CYTOPATHIQUE APRES ENSEMENCEMENT SUR  
VERO CELL**



Effets cytopathiques après ensemencement sur Vero Cell

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Benallal, K.E., Garni, R., Harrat, Z., Volf, P., Dvorak, V., “Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Maghreb region: A systematic review of distribution, morphology, and role in the transmission of the pathogens”, *PLoS neglected tropical diseases*, V. 16, n°1, (2022), e0009952p.
2. Munstermann, L.E., “Phlebotomine sand flies and moth flies (Psychodidae)”, *Medical and veterinary entomology*, (2019)191—211.
3. Lafri, I., Bitam, I., “Phlebotomine sandflies and associated pathogens in Algeria: update and comprehensive overview”. *Veterinaria Italiana*, V. 57, n° 3, (2021), 175-180.
4. Hughes, H.R., Russell, B.J., Lambert, A.J., “Genetic characterization of Frijoles and Chilibre species complex viruses (genus Phlebovirus; family Phenuiviridae) and three unclassified New World phleboviruses”, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, V.102, n°2, (2020), 359p.
5. Alkan, C., Bichaud, L., De Lamballerie, X., Alten, B., Gould, E.A., Charrel, R.N. “Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures”, *Antiviral research*, V. 100, n°1, (2013), 54-74.
6. Jancarova, M., Bichaud, L., Hlavacova, J., Priet, S., Ayhan, N., Spitzova, T., Volf, P., Charrel, R.N., “Experimental infection of sand flies by Massilia virus and viral transmission by co-feeding on sugar meal”, *Viruses*, V. 11 n°4, (2019), 332p.
7. Bichaud, L., Dachraoui, K., Piorkowski, G., Chelbi I., Moureau, G., Cherni S., De Lamballerie, X., Sakhria, S., Charrel, R.N., Zhioua, E., “Toscana virus isolated from sandflies, Tunisia. *Emerging infectious diseases*”, V. 19, n°2, (2013), 322p.

8. Es-Sette, N., Nourlil, J., Hamdi, S., Mellouki, F., Lemrani, M., "First detection of Toscana virus RNA from sand flies in the genus *Phlebotomus* (Diptera:Phlebotomidae) naturally infected" *Journal of medical entomology*, V. 49, n°6, (2014), 1507-1509.
9. Es-Sette, N., Ajaoud, M., Bichaud, L., Hamdi, S., Mellouki, F., Charrel, R. N., & Lemrani, M., "Phlebotomus sergenti a common vector of *Leishmania tropica* and Toscana virus in Morocco", *Journal of vector borne diseases*, V. 51, n° 2, (2014), 86p.
10. Es-sette, N., Ajaoud, M., Anga, L., Mellouki, F., Lemrani, M., "Toscana virus isolated from sandflies, Morocco", *Parasites and Vectors*, V. 8 n° 1, (2015), 1-3.
11. Es-Sette, N., Ajaoud, M., Charrel, R.N., Lemrani, M., "Molecular epidemiology of phlebovirus in four provinces in Morocco", *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, V. 109 n° 3, (2016), 143-150.
12. Alkan, C and Allal-Ikhlef, AB., Alwassouf, S., and Baklouti, A., Piorkowski, G., De Lamballerie, X., Izri, A., Charrel, RN., "Virus isolation, genetic characterization and seroprevalence of Toscana virus in Algeria". *Clinical Microbiology and Infection*, V. 21, n° 11, (2015), 1040. e1-1040. e9.
13. Zhioua, E., Moureau, G., Chelbi, I., Ninove, L., Bichaud, L., Derbali, M., Champs, M., Cherni, S., Salez, N., Cook, S., de Lamballerie, X., Charrel, R.N., "Punique virus, a novel phlebovirus, related to sandfly fever Naples virus, isolated from sandflies collected in Tunisia. *The Journal of general virology*, V. 91, n° Pt 5, (2010), 1275p.
14. Izri A, Temmam, S., Moureau, G., Hamrioui, B., de Lamballerie, X., Charrel R.N., "Sandfly fever Sicilian virus, Algeria", *Emerging Infectious Diseases*, V. 14, n° 5, 2008 795–797.
15. Moureau, G., Bichaud, L., Salez, N., Ninove, L., Hamrioui, B., Belazzoug, S., de Lamballerie, X., Izri, A., Charrel, R.N., "Molecular and serological evidence for the presence of novel phleboviruses in sand flies from northern Algeria". *The open virology journal*, V. 4, (2010), 15-21.

16. Belabiod, D “étude du rôle des phlébotomes dans la circulation des phlebovirus dans la région de Blida, Msila et Jijel”, Mémoire de master en sciences biologiques, Option génétique et physiologie, université de Blida1, (2017).46p.
17. Tahir, D., Alwassouf, S., Loudahi, A., Davoust, B., Charrel, R.N., “Seroprevalence of Toscana virus in dogs from Kabylia (Algeria)”, *Clinical Microbiology and Infection*, V. 22, n° 3, (2015), e16-e17.
18. Sellali, S., Lafri, I., Hachid, A., Ayhan, N., Benbetka, C., Medrouh, B., Messahel, N.E., Bekara, M.E., Lafri, M., Charrel, R.N et al., “Presence of the sandfly-borne phlebovirus (Toscana virus) in different bio-geographical regions of Algeria demonstrated by a microneutralisation-based seroprevalence study in owned dogs”, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, V. 88, (2022), 101861p.
19. Bichaud, L., Souris, M., Mary, C., Ninove, L., Thirion, L., Piarroux, R.P., Piarroux, R., De Lamballerie, X., Charrel, R.N., Epidemiologic relationship between Toscana virus infection and *Leishmania infantum* due to common exposure to *Phlebotomus perniciosus* sandfly vector. *PLoS neglected tropical diseases*, V. 5, n°9, (2011), e1328.
20. Fares, W., Dachraoui, K., Barhoumi, W., Cherni, S., Chelbi, I., Zhioua, E., “Co-circulation of Toscana virus and *Leishmania infantum* in a focus of zoonotic visceral leishmaniasis from Central Tunisia”, *Acta tropica*, V. 204, (2020), 105342p.
21. Calzolari, M., Romeo, G., Callegari, E., Bonilauri, P., Chiapponi, C., Carra, E., Rugna, G., Taddei, R., Lelli, D., Dottori, M., “Co-Circulation of Phleboviruses and *Leishmania* Parasites in Sand Flies from a Single Site in Italy Monitored between 2017 and 2020”, *Viruses*, V. 13, n° 8, (2021), 1660p.
22. Tahir D. “Epidémiologie de la leishmaniose chez le chien et l’homme à Bejaia”. Thèse de magistère en sciences vétérinaires option épidémiologie animale, Institut des sciences vétérinaires université Blida I. Algérie, 2014, 235p
23. Bia, T., Selles, S.M.A., Zait, H., Kouidri, M., Mammar, K., Bouaicha, F., Slimani K.M. and Benmouhoub, N.A., “retrospective of cutaneous leishmaniasis in Tiaret (NorthWest of Algeria)”, *AGRUCULTURA*, V.122, n° 1-2, 2022.

24. Toma, B., Duffour, B., Benet, J.J., Sanaa, M., Shaw, A., Moutou, F., "Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures" 3eme edition, Maisons-Alfort, France, 600p.
25. Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry PE, Peyrefitte C., "Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe" a review. *Eurosurveillance*, V. 15, n°10, 2010, 19507p.
26. Killick-Kendrick, R., "The biology and control of phlebotomine sand flies", *Clinics in dermatology*, V. 17, n°3, (1999), 279-289.
27. Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., Sereno, D., "A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies", *PLoS neglected tropical diseases*, V. 10, n° 3, (2016), e0004349 p.
28. Cecílio, P., Cordeiro-da-Silva, A., Oliveira, F., "Sand flies Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with Leishmania parasites". *Communications biology*, V. 5, n° 1, (2022), 1-12.
29. Perfil'ev, P.P., "Phlebotomidae. Translation of Perfil'ev, 1966 *Diptera: Family Phlebotomidae*", *Fauna SSSR*, V. 93, (1968)1-382.
30. Young, David G., "Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the west Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)", *Memoirs of The American Entomological Institute*, n°. 614.55 Y6. (1994), 887.p
31. Lane, R.P., "sandflies (Phlebotominae)", in: *Medical insects and arachnids*. Springer, Dordrecht, (1993), 78-119
32. Izri, A., Depaquit, J. and Parola, P., Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes autour du bassin méditerranéen. *Médecine tropicale*, V. 66, n° 5, (2006), 429-435.
33. Moulinier, C., "Parasitologie et mycologie médicale Eléments de morphologie et de biologie", [Paris]: Editions Médicales Internationales, (2003), 796p.

34. Kettle, D.S., "Medical and Veterinary Entomology", Second Edition CAB International, Wallingford, (1995), 177-191
35. Bounamous, A., "Bio-systématique et caractérisation par la biologie moléculaire des phlébotomes de l'Est Algérien", Thèse Doctorat en sciences en biologie animale option entomologie : Université de Mentouri Constantine, (2010), 302p.
36. Rutledge, L.C. et Gupta, R.K., "Moth flies and sand flies (Psychodidae)" In: Medical and veterinary entomology – Second Edition, Elsevier, Amsterdam, (2009), 153-168
37. Ba, Y., "Phlébotomes du Sénégal : Dynamique des populations de trois régions biogéographiques - Rôle dans la transmission des Arbovirus". Thèse docteur de troisième cycle de Biologie Animale", Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Faculté des Sciences et Techniques, (1999), 154p.
38. Dedet, J. P., Addadi, K., and Belazzoug, S., (1984). Les phlébotomes (Diptera, Psychodidae) d'Algérie. Cahiers-ORSTOM. Entomologie médicale et parasitologie, V. 22 n° 2, 99-127.
39. Lawyer, P., Killick-Kendrick, M., Rowland, T., Rowton, E. and Volf, P., "Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae)", Parasite, V. 24, (2017), 42p.
40. Dolmatova, A. V., Demina, N. A., & Kobylansky, A., "Les phlébotomes (Phlebotominae) et les maladies qu'ils transmettent", ORSTOM, Paris, France, V.18, (1971), 168p.
41. Léger, N., Pesson, B., Madulo-Leblond, G., and Abonnenc, E., "Sur la différenciation des femelles du sous-genre *larroussius nitzulescu*, 1931-(Diptera-Phlebotomidae) de la région méditerranéenne", Annales de Parasitologie humaine et comparée, V. 58 n° 6, (1983), 611-623.
42. Faraj, C., et Himmi, O., "Morphological Keys for Identification of Sandflies from Morocco (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)", Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique, V. 113 n° 3, (2020), 155-174.

- 43 Volf, P., et Volfova, V., "Establishment and maintenance of sand fly colonies". *Journal of Vector Ecology*, V. 36, (2011), S1-S9.
44. Marolie, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R. N., Gradoni, L., "Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and veterinary entomology*", V. 27 n°2, (2013), 123-147.
45. Depaquit, J., et Léger, N., Les phlébotomes (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in : *Entomologie médicale et vétérinaire* Duvallat G, Fontenille D & Robert V (Ed.), (2017), 295-320.
46. Rosenthal, E., et Marty, P., "Actualités sur la leishmaniose viscérale méditerranéenne", *La Revue de medecine interne*, V. 30, (2009), S24-S28.
47. Bongiorno, G., Habluetzel, A., Khoury, C. and Maroli, M., "Host preferences of phlebotomine sandflies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in Central Italy", *Acta Tropica*, V. 88, (2003),109-116.
48. Service, M., "Phlebotomine sand-flies (Phlebotominae)", in: Service, M. (Eds.), *Medical Entomology for Students*, Cambridge University Press, Cambridge, (2008), 93-102.
49. Sarwar, M., "Source reduction practices for mosquitoes (Diptera) management to prevent dengue, malaria and other arboborne diseases". *American Journal of Clinical Neurology and Neurosurgery*, V. 1, n° 2, (2015), 110-116.
50. Kumar, V., Kesari, S.K., Sinha, NK., Palit, A., Ranjan, A., Kishore, K., Saran, R. and Kar, SK., "Field trial of an ecological approach for the control of *Phlebotomus argentipes* using mud & lime plaster", *The Indian Journal of Medical Research*, V. 101, (1995), 154-156.
51. Alexander, B.; et Maroli, M., "Control of Phlebotomine Sandflies", *Medical and veterinary entomology*, V. 17, n° 1, (2003), 1–18
52. Socha, W.; Kwasnik, M.; Larska, M.; Rola, J. and Rozek, W., "Vector-Borne Viral Diseases as a Current Threat for Human and Animal Health—One Health Perspective", *Journal of Clinical Medicine*, V. 11, n°11, (2022), 3026p.

53. Karmaoui A., "Seasonal Distribution of *Phlebotomus papatasi*, Vector of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis", *Acta Parasitologica*, V. 65, (2020), 585-598.
54. Bounamous, A. , Boudabous, R., Jouet, D., Augot, D., Ferte, H., Babba H, Berchi, S., and Depaquit J., "Caractérisation moléculaire et morphologique de deux espèces affines de *Paraphlebotomus*: *Phlebotomus chabaudi* Croset, Abonnenc & Rioux, 1970 et *P. riouxi* Depaquit, Killick-Kendrick & Le´ger, 1998 (Diptera: Psychodidae)" *Parasite*, V.15, n°4, (2008), 565-571..
55. Berdjane-Brouk, Z., Charrel, R.N., Bitam, I., Hamrioui, B., and Izri, A., "Record of *Phlebotomus* (*Transphlebotomus*) *mascittii* Grassi, 1908 and *Phlebotomus* (*Larroussius*) *chadlii* Rioux, Juminer & Gibily, 1966 female in Algeria", *Parasite*, V. 18, n° 4, (2011),337p.
56. Benallal, K., Dib, Y., Boubidi, SC., and Harrat Z., "Nouvelles stations de *Sergentomyia schwetzi* (Adler, Theodor & Parrot; 1929) dans le Tassili N'Ajjer", *Arch Inst Pasteur d'Algérie*, V. 68, (2012), 131-7.
57. Benallal, K., Gassen, B., Bouiba, L., Depaquit, J., and Harrat, Z., "Entomological investigation following the resurgence of human visceral leishmaniasis in southern Algeria", *Acta Tropica*, V. 128, n° 3, (2013), 518-521.
58. Ayhan, N., "*Emerging sandfly-borne Phleboviruses in Balkan countries: virus isolation, characterization, evolution and neuroepidemiology*" (Doctoral dissertation, Aix-Marseille), (2017),138p.
59. Abudurexiti, A., Adkin, S., Alioto, D., Alkhovsky, S.V., Avšič-Županc, T., Ballinger, M.J., Bente, D.A., Beer, M., Bergeron, E., Blair C.D., et al., "Taxonomy of the order Bunyavirales: update 2019". *Archives of virology*, 2019, V. 164, n° 7, (2019), 1949-1965.
60. Ayhan, N., Charrel, R.N., "Of phlebotomines (sandflies) and viruses: a comprehensive perspective on a complex situation", *Current opinion in insect science*, (2017), V. 22, 117-124.

61. Ayhan, N., Charrel, R.N., "Sandfly-borne viruses of demonstrated/relevant medical importance", In *Vectors and vector-borne zoonotic diseases*" First Edition, S.S., Ed.; INTECHOPEN: London, United Kingdom, (2018),1-22
62. Sabin, A. B., "Recent advances in our knowledge of dengue and sandfly fever". *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, V. 4 n°2, (1955), 198-207.
63. Eitrem, R., Vene, S., Niklasson, B., "Incidence of sand fly fever among Swedish United Nations soldiers on Cyprus during 1985". *The American journal of tropical medicine and hygiene*, V. 43, n°2, (1990), 207-211.
64. Sla, G., Khutoretskaia, N. V., IuV, A., Tsiupa, V. I., & Mel'nikova, E. E., "Virological study of cases of sandfly fever in Afghanistan. *Voprosy Virusologii*", V. 35 n°1 (1990), 45-47.
65. Gligić, A., Mišćević, Z., Tech, R. B., Travassos da Rosa, A., & Živković, V. (1982). "First isolations of Naples sandfly fever virus in Yugoslavia", *Mikrobiologija*, V. 19 n°2, 167-175.
66. Verani, P., Lopes, M. C., Nicoletti, L., & Balducci, M., "Studies on Phlebotomus-transmitted viruses in Italy. I. Isolation and characterization of a sandfly fever Naples-like virus. *Arboviruses in the Mediterranean countries.*" Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, (1980),195-201.
67. Calisher, C.H., Weinberg, A.N., Muth, D.J., Lazuick, J.S., "Toscana virus infection in United States citizen returning from Italy". *Lancet* V.1, (1987),165–166.
68. Ehrnst, A., Peters, C.J., Niklasson, B., Svedmyr, A., Holmgren, B., 1985. "Neurovirulent Toscana virus (a sandfly fever virus) in Swedish man after visit to Portugal". *Lancet* 1, (1985), 1212–1213.
69. Charrel, R. N., Bichaud, L., de Lamballerie, X., "Emergence of Toscana virus in the mediterranean area". *World journal of virology*, V. 1 n° 5, (2012), 135p.
70. Dupouey, J., Bichaud, L., Ninove, L., Zandotti, C., Thirion-Perrier, L., De Lamballerie, X., Charrel, R. N., Toscana virus infections: a case series from France. *Journal of Infection*, V. 68 n°3, (2014), 290-295.

71. Ayhan, N., Charrel, R.N., "An update on Toscana virus distribution, genetics, medical and diagnostic aspects". *Clinical Microbiology and Infection*, V. 26 n°, (2020), 1017-1023.
72. Dincer, E., Gargari, S., Ozkul, A., Ergunay, K., Potential animal reservoirs of Toscana virus and coinfections with *Leishmania infantum* in Turkey. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, V. 92 n°4 (2015), 690p.
73. Ayhan, N., Alten, B., Ivovic, V., Martinkovic, F., Kasap, O.E., Ozbel, Y., De Lamballerie, X., Charrel, R.N., "Cocirculation of two lineages of Toscana virus in Croatia", *Frontiers in public health*, V. 5, (2017), 336p.
74. Punda-Polić, V., Jerončić, A., Mohar, B., Kraljević, K. Š., "Prevalence of Toscana virus antibodies in residents of Croatia", *Clinical Microbiology and Infection*, V. 18, n°6, (2012), E200-E203.
75. Papa, A., Paraforou, T., Papakonstantinou, I., Pagdatoglou, K., Kontana, A., Koukoubani, T., "Severe encephalitis caused by Toscana virus, Greece". *Emerging infectious diseases*, V. 20, n° 8, (2014), 1417p.
76. Sabin, A. B., "Experimental studies on *Phlebotomus (pappataci)* sandfly fever during World War II", *Archiv für die gesamte Virus forschung*, V. 4, n° 4 , (1951), 367-410.
77. Bartelloni, P.J., Tesh, R.B., "Clinical and serologic responses of volunteers infected with phlebotomus fever virus (Sicilian type)", *The American journal of tropical medicine and hygiene*, V. 25 n° 3, (1976), 456-462.
78. Papa, A., Velo, E., Bino, S.A "Novel phlebovirus in Albanian sandflies. *Clinical Microbiology and infection*, V. 17 n°4, (2011), 585-587.
- 79 Anagnostou, V., Pardalos, G., Athanasiou-Metaxa, M., Papa, A., "Novel phlebovirus in febrile child, Greece", *Emerging infectious diseases*, V. 17 n°5, (2011), 940p.

80. Verani, P., Ciufolini, M. G., Nicoletti, L., Balducci, M., Sabatinelli, G., Coluzzi, M., Amaducci, L., "Ecological and epidemiological studies of Toscana virus, an arbovirus isolated from *Phlebotomus*", *Annali dell' Istituto superiore di sanit *, V.18, n  3, (1982), 397-399.
81. Amaro, F., Hanke, D., Z -Z , L., Alves, M. J., Becker, S. C., H per, D., "Genetic characterization of Arrabida virus, a novel phlebovirus isolated in South Portugal". *Virus research*, V. 214, (2016), 19-25.
82. Alkan, C., ErisozKasap, O., Alten, B., de Lamballerie, X., & Charrel, R. N., "Sandfly-borne phlebovirus isolations from Turkey: new insight into the sandfly fever Sicilian and sandfly fever Naples species. *PLoS neglected tropical diseases*, V. 10n  3, e0004519p.
83. Charrel, R.N., Moureau, G., Temmam, S., Izri, A., Marty, P., Parola, P., Da Rosa, A.T., Tesh, R.B., De Lamballerie, X., "Massilia virus, a novel Phlebovirus (Bunyaviridae) isolated from sandflies in the Mediterranean". *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, V. 9 n  5, (2009), 519-530.
84. Collao, X., Palacios, G., de Ory, F., Sanbonmatsu, S., Perez-Ruiz, M., Navarro, José, M., Molina, R., Hutchison, S.K., Lipkin, I.W., Tenorio, A., et al., "Granada virus: a natural phlebovirus reassortant of the sandfly fever Naples serocomplex with low seroprevalence in humans". *The American journal of tropical medicine and hygiene*, V. 83 n  4, (2010), 760p.
85. Alkan, C., Moin Vaziri, V., Ayhan, N., Badakhshan, M., Bichaud, L., Rahbarian, N., Javadian, E.A., Alten, B., de Lamballerie, X., Charrel, R.N., "Isolation and sequencing of Dashli virus, a novel Sicilian-like virus in sandflies from Iran; genetic and phylogenetic evidence for the creation of one novel species within the Phlebovirus genus in the Phenuiviridae family". *PLoS neglected tropical diseases*, V. 11 n  12, e0005978 p.
86. Rodhain, F., Madulo-Leblond, G., Hannoun, C., & Tesh, R., "Le virus Corfou. The virus Corfou, a new Phlebovirus isolated from *Phlebotomus* in Greece". *Ann Inst Pasteur/Virol*, V. 126, (1985), 161-166.

87. Ayhan, N. Velo, E., de Lamballerie, X., Kota, M., Kadriaj, P., Ozbel, Y., Charrel, R.N, Bino, S., “Detection of *Leishmania infantum* and a novel phlebovirus (Balkan Virus) from sand flies in Albania”. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, V16 n° 12, (2016), 802-806.
88. Bichaud, L., Dachraoui, K., Alwassouf, S., Alkan, C., Mensi, M., Piorkowski, G., Sakhria, S., Seston, M., Fares, W., De Lamballerie, X., et al.,. “Isolation, full genomic characterization and neutralization-based human seroprevalence of Medjerda Valley virus, a novel sandfly-borne phlebovirus belonging to the Salehabad virus complex in northern Tunisia”, *Journal of General Virology*, V. 97, n° 3, (2016), 602-610.
89. Ergunay, K., Kasap, O.E., Orsten, S., Oter, K., Gunay, F., Yoldar, A.Z.A., Dincer, E., Alten, B., Ozkul, A., “Phlebovirus and *Leishmania* detection in sandflies from eastern Thrace and Northern Cyprus”, *Parasites & vectors*, V. 7 n° 1, (2014), 1-13.
90. Peyrefitte, C. N., Grandadam, M., Bessaud, M., Andry, P. E., Fouque, F., Caro, V., ... & Depaquit, J. (2013). Diversity of *Phlebotomus perniciosus* in Provence, southeastern France: Detection of two putative new phlebovirus sequences. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(9), 630-636.
91. Palacios, G., Wiley, M.R., da Rosa, A.T Guzman, H., Quiroz, E., Savji, N., Carrera, J.P., Bussetti, A.V., Ladner, J.T., Lipkin, W.I., “Characterization of the Punta Toro species complex (genus *Phlebovirus*, family *Bunyaviridae*)”, *The Journal of general virology*, V. 96 n° Pt 8 , (2015), 2079.
92. Mattar, V.S., González T.M., “The puzzle of new etiological agents in the Americas: Punta del Toro virus another piece?” *Revista MVZ Córdoba*, V. 22 n° 1, (2017), 5607-5609.
93. Palacios, G., Tesh, R., Travassos da Rosa, A., Savji, N., Sze, W., Jain, K., Serge, R., Guzman, H., Guevara, C., Nunes, M.R.T., et al., “Characterization of the Candiru antigenic complex (*Bunyaviridae*: *Phlebovirus*), a highly diverse and reassorting group of viruses affecting humans in tropical America”. *Journal of virology*, V. 85, n° 8, (2011), 3811-3820.

94. Nunes, M.R.T., Contreras-Gutierrez, M.A., Guzman, H., Martins, L.C., Barbirato, M.F., Savit, C., Balta, V., Uribe, S., Vivero, R., Suaza, J.D., et al., "Genetic characterization, molecular epidemiology, and phylogenetic relationships of insect-specific viruses in the taxon Nege virus". *Virology*, V. 504, (2017), 152-167.
95. Fezaa, O., M'ghirbi, Y., Savellini, G.G., Ammari, L., Hogga, N., Triki, H., Cusi, M.G., Bouattour, A., "Serological and molecular detection of Toscana and other Phleboviruses in patients and sandflies in Tunisia", *BMC infectious diseases*, V, 14, n° 1, (2014), 1-12.
96. Fares, W., Charrel, R.N., Dachraoui, K., Bichaud, L., Barhoumi, W., Derbali, M., Cherni, S., Chelbi, I., de Lamballerie, X., Zhioua, E., "Infection of sand flies collected from different bio-geographical areas of Tunisia with phleboviruses". *Acta tropica*, V. 141, (2015), 1-6.
97. Tesh, R. B., Saidi, S., Gajdamovič, S. J., Rodhain, F., Vesenjāk-Hirjan, J., "Serological studies of the epidemiology of sandfly fever in the Old World", *Bulletin of the World Health Organization*, V. 54 n° 6, (1976), 663p.
98. Chastel, C., Bach-Hamba, D., Launay, H., Le Lay, G., Hellal, H., Beaucornu, J. C., "Infections à arbovirus en Tunisie : nouvelle enquête sérologique chez les petits mammifères sauvages", *Bull Soc PatholExot*, V. 76, (1983), 21-33.
99. Chastel, C., Launay, H., & Bailly Choumara, H., "Infections a arbovirus au Maroc : sondage sérologique chez les petits mammiferes du nord du pays", *Bull Soc PatholExotFiliales*, V. 75, (1982), 466-475.
100. Sghaier, W., Bahri, O., Kedous, E., Fazaa, O., Rezig, D., Touzi, H., Yahia, AB., Meddeb, Z., Triki, H., "Retrospective study of viral causes of central nervous system infections in Tunisia (2003-2009)", *Medecine et sante tropicales*, V. 22 n° 4, (2012), 373-378.
101. Tesh, R. B., "The genus Phlebovirus and its vectors", *Annual review of entomology*, V. 33 n°1, (1988), 169-181.

102. Maroli, M., Ciufolini, M.G., Verani, P., “Vertical transmission of Toscana virus in the sandfly, *Phlebotomus perniciosus*, via the second gonotrophic cycle”, *Medical and veterinary entomology*, V. 7, (1993), 283–286.
103. Tesh, R.B., Lubroth, J., Guzman, H., “Simulation of arbovirus overwintering: survival of Toscana virus (Bunyaviridae:Phlebovirus) in its natural sand fly vector *Phlebotomus perniciosus*”, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, V. 47,(1992) 574–581.
104. Sakhria, S., Alwassouf, S., Fares, W., Bichaud, L., Dachraoui, K., Alkan, C., Zoghalmi, Z., de Lamballerie, X., Zhioua, E., Charrel, R.N., “Presence of sandfly-borne phleboviruses of two antigenic complexes (Sandfly fever Naples virus and Sandfly fever Sicilian virus) in two different bio-geographical regions of Tunisia demonstrated by a microneutralisation-based seroprevalence study in dogs”, *Parasites & vectors*, V. 7, n° 1, (2014), 1-5.
105. Navarro-Marí, J. M., Palop-Borrás, B., Pérez-Ruiz, M., Sanbonmatsu-Gámez, S., “Serosurvey study of Toscana virus in domestic animals, Granada, Spain”, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, V. 11 n° 5, (2011)583-587.
106. Dahmani, M., Alwassouf, S., Grech-Angelini, S., Marié, J. L., Davoust, B., Charrel, R.N. “Seroprevalence of Toscana virus in dogs from Corsica, France”. *Parasites & Vectors*, V. 9, n°1, (2016), 1-4.
107. Alkan, C., Alwassouf, S., Piorkowski, G., Bichaud, L., Tezcan, S., Dincer, E., Ergunay, K., Ozbel, Y., Alten, B., de Lamballerie, X., et al., “Isolation, genetic characterization, and seroprevalence of Adana virus, a novel phlebovirus belonging to the Salehabad virus complex, in Turkey”, *Journal of virology*, V. 89, n° 8, (2015), 4080-4091.
108. Oerther, S., Jost, H., Heitmann, A., Luhken, R., Kruger, A., Steinhausen, I., Brinker, C., Lorentz, S., Marx, M., Schmidt-Chanasit, J., et al., “Phlebotomine sand flies in Southwest Germany: an update with records in new locations”, *Parasites & vectors*, V. 13, n°1, (2020), 1-8.
109. Mustafa, M. A., AL-Samarraie, M. Q., Ahmed, M. T., “Molecular techniques of viral diagnosis”, *Science Archives*, V. 1, n°3, (2020), 89-92.

110. Mackay, I.M., Arden, K. E., Nitsche, A., "Real-time PCR in virology. Nucleic acids research, V. 30 n° 6, (2002),1292-1305.
111. Cusi, M. G., Savellini, G.G., "Diagnostic tools for Toscana virus infection". *Expert Review of Anti-infective Therapy*, V. 9, n° 7, (2011), 799-805.
112. Cella, L. N., Blackstock, D., Yates, M. A., Mulchandani, A., Chen, W., "Detection of RNA viruses: current technologies and future perspectives", *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, V. 23, n°2, (2013), 125-137.
113. Weidmann, M., Sanchez-Seco, M.P., Sall, A.A., Ly, P.O., Thiongane, Y., Lo, M.M., Schley, H., Hufert, F.T., "Rapid detection of important human pathogenic Phleboviruses", *Journal of Clinical Virology*, V. 41, n° 2, (2008), 138-142.
114. Rashtchian, A., "Amplification of RNA". *Genome Research*, V 4 n° 2, (1994), S83-S91.
115. Pugnière, P., "Contribution à l'amélioration de la quantification des acides nucléiques par qPCR et RT-qPCR", thèse de Doctorat, Spécialité : Biotechnologie, Instrumentation, Signal et Imagerie pour la Biologie, la Médecine et l'Environnement (BIS) Université de Grenoble, France, (2012), 298p.
116. Schwarz, T.F., Jäger, G., Gilch, S., Nitschko, H., "Nested RT-PCR for detection of sandfly fever virus, serotype Toscana, in clinical specimens, with confirmation by nucleotide sequence analysis", *Research in virology*, V. 146, n° 5, (1995), 355-362.
117. Valassina, M., Cusi, M. G., et Valensin, P.E., "Rapid identification of Toscana virus by nested PCR during an outbreak in the Siena area of Italy", *Journal of clinical microbiology*, V. 34, n° 10, (1996),2500-2502.
118. Sánchez-Seco, M. P., Echevarría, J.M., Hernández, L., Estévez, D., Navarro-Marí, J. M., Tenorio, A., "Detection and identification of Toscana and other phleboviruses by RT-nested-PCR assays with degenerated primers", *Journal of medical virology*, V. 71 n° 1, (2003),140-149.

119. Valencia, C.A., Pervaiz, M.A., Husami, A., Qian, Y., et Zhang, K., "Sanger sequencing principles, history, and landmarks", in: Next Generation Sequencing Technologies in Medical Genetics. Springer, New York, NY, (2013), 3-11.
120. Dey, P., "Sanger Sequencing and Next-Generation Gene Sequencing: Basic Principles and Applications in Pathology," in: Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology, Springer, Singapore, (2018), 227-231.
121. Anonyme2: <https://parlonssciences.ca/ressourcespedagogiques/documents-dinformation/sequencage-de-sanger> Documents d'information Séquençage de Sanger 17 Aout 2020.
122. Huemer, H., Prudhomme, J., Amaro, F., Baklouti, A., Walder, G., Alten, B., et Ayhan, N., "Practical guidelines for studies on sandfly-borne phleboviruses: Part II: important points to consider for fieldwork and subsequent virological screening". Vector-Borne and Zoonotic Diseases, V. 17, n°1, (2017), 81-90.
123. Gonzales-Scarano, F., Nathanson, N., "Bunyaviridae", in: Virology, Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Eds). Raven Press, New York, NY, USA, V. 1, (1990), 1195–1228.
124. Maia, C., & Depaquit, J., "Can Sergentomyia (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting Leishmania?", Parasite, V. 23, 55p.
125. OMS, "Control of the leishmaniases". World Health Organ Tech Rep Ser (2010), V, 949, 186p.
126. Izri, M. A., Belazzoug, S., Phlebotomus (Larrousius) perfilliewi naturally infected with dermatropic Leishmania infantum at Tenes, Algeria. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, V. 87, n° 4, (1993) 399-399.
127. Harrat, Z., Pratlong, F., Belazzoug, S., Dereure, J., Deniau, M., Rioux, J.A., Belkaid, M., Dedet, JP., "Leishmania infantum and L. major in Algeria". Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, V. 90 n° 6, (1996), 625-629.

128. Izri, M. A., Belazzoug, S., Pratlong, F., & Rioux, J. A., "Isolation of *Leishmania major* from *Phlebotomus papatasi* in Biskra. Completion of an epidemiological saga". *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, V. 67, n° 1, (1992), 31-32
129. Tomas-Perez, M., Khaldi, M., Riera, C., Mozo-Leon, D., Ribas, A., Hide, M., Barech, G., Benyettou, M., Seghiri, K., Doudou, S., "First report of natural infection in hedgehogs with *Leishmania major*, a possible reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Algeria." *Acta tropica*, V. 135, (2014), 44-49.
130. Mihoubi, I., Picot, S., Hafirassou, N., de Monbrison, F., Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, V. 102 n° 11, (2008), 1157-1159.
131. Boubidi, S.C., Benallal, K., Boudrissa, A., Bouiba, L., Bouchareb, B., Garni, R., Bouratbine, A., Ravel, C., Dvorak, V., Votypka, J., et al., "*Phlebotomus sergenti* (Parrot, 1917) identified as *Leishmania killicki* host in Ghardaïa, south Algeria". *Microbes and Infection*, V. 13 n° 7, (2011), 691-696.
132. Jaouadi, K., Haouas, N., Chacara, D., Gorcii, M., Chargui, N., Augot, D., Pratlong, F., Dedet, J.P., Ettlijani, S., Mezhoud, H., et al., "First detection of *Leishmania killicki* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in *Ctenodactylus gundi* (Rodentia, Ctenodactylidae), a possible reservoir of human cutaneous leishmaniasis in Tunisia". *Parasites & vectors*, V. 4 n° 1, (2011), 1-3.
- 133 Minnick, M.F., Anderson, B.E., Lima, A., Battisti, J.M., Lawyer, P.G., Birtles, R. J., "Oroya fever and verruga peruana: bartonellosis unique to South America", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, V. 8, n° 7, (2014), e2919p.
134. Pelzel-McCluskey, A., Christensen, B., Humphreys, J., Bertram, M., Keener, R., Ewing, R., Cohnstaedt, L.W., Tell, R., Peters, D.P.C., Rodriguez., "Review of Vesicular Stomatitis in the United States with Focus on 2019 and 2020 Outbreaks". *Pathogens*, V. 10, n° 8, (2021), 993p.
135. Sapkal, G.N., Sawant, P.M., Mourya, D.T., "Suppl-2, M2: Chandipura viral encephalitis: a brief review". *The Open Virology Journal*, V. 12, (2018), 44p.

136. Phumee, A., Wacharapluesadee, S., Petcharat, S., Tawatsin, A., Thavara, U., Siriyasatien, P., "Detection of Changuinola virus (Reoviridae: Orbivirus) in field-caught sand flies in southern Thailand". Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, V. 115, n° 9, (2021), 1039-1044.
137. Manseur, H., " Etude entomologique des phlébotomes dans une région endémique de leishmaniose Kherrta (Bejaia)". Mémoire de magister en sciences vétérinaires option épidémiologie animale. Institut des sciences vétérinaires Blida (2015), p 139.
138. Hamdani, A., "Évolution géomorphologique et morpho dynamique du bassin Versant de Oued Agrioun à l'amont du Barrage de Ighil Emda (Région de Kherrata)", Mémoire de magister Faculté des Sciences de la Terre, de la Géographie et de l'Aménagement du Territoire, Option : Géomorphologie, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, (2012), 121p.
- 139 Bounar, R., "'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. (2014), 141p.
140. Anonyme 3: <https://power.larc.nasa.gov/data-access-viewer/>.
141. Miara, M.D., Hammou, M.A. and Aoul, S.H., "Phytothérapie et taxonomie des plantes médicinales spontanées dans la région de Tiaret (Algérie)", Phytothérapie, V. 11, n° 4, (2013), 206-218.
142. Achir M., et Hellal B., " Réflexions sur les variations pluviométriques de la région de Tiaret (Algérie occidentale) durant la période 1984-2015", European Scientific Journal, V. 11, (2016), 498-508.
143. Alten, B. Ozbel, Y., Ergunay, K., Kasap, O.E Cull, B., Antoniou, M., Velo, E., Prudhomme, J., Molina, R. and Banuls, A.L Sampling strategies for phlebotomine sand flies (Diptera : Psychodidae) in Europe. Bulletin of entomological research, V. 105, n° 6, (2015), 664-678.
144. Vilela, M. L., Zwetsch, A. and Silva, J. D. S., "Methods for capturing, processing and preserving Phlebotomina", in: Brazilian Sand Flies, Springer, Cham, (2018), 443-466.

145. Fall, A. G., “Techniques de capture et d’identification des moustiques (Diptera: Culicidae) vecteurs de la fièvre de la vallée du Rift”, Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, Laboratoire National d’élevage et de recherches vétérinaires (2013), 32p
146. Ramdane, E., Berchi, S. and Louad, K., “Les phlébotomes (Diptera, Pshycodidae), vecteurs d’agents pathogènes responsables de la leishmaniose humaine dans la région de Constantine (Algérie)”, *Entomofauna*, V. 39 n° 4, (2018), 537-555.
147. Katoh, K., Rozewicki, J. and Yamada, K.D., “MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization”, *Briefings in bioinformatics*, V. 20, n° 4, (2019), 1160–1166
148. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C. and Tamura, K., “MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms” *Molecular Biology and Evolution*, V. 35, n° 6, (2018), 1547-1549.
149. Abonnenc, E., Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera, Psychodidae). *Cahiers de l'ORSTOM, série Entomologie médicale et Parasitologie*, 55, (1972), 1-239.
150. Folmer, O., Hoeh, W. R., Black, M.B. and Vrijenhoek, R.C., “Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla”, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, V. 3, n°5, (1994), 294-299.
151. Hall, T., “BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT”, *In Nucleic Acids Symp Ser*, V. 41, (1999), 95-98.
152. Dajoz R., “Précis d’écologie”, Éd. Dunod, Paris, (1985), 505p.
153. Remoli, M.E., Jimenez, M., Fortuna, C., Benedetti, E., Marchi, A., Genovese, D. Gramiccia, M., Molina, R. and Ciufolini, M.G., “Phleboviruses detection in *Phlebotomus perniciosus* from a human leishmaniasis focus in South-West Madrid region, Spain”, *Parasites & Vectors*, V. 9, n°1, (2016), 1-11.

154. Remoli, M.E., Bongiorno, G., Fortuna, C., Marchi, A., Bianchi, R., Khoury, C., Ciufolini, M.G. and Gramiccia, M., "Experimental evaluation of sand fly collection and storage methods for the isolation and molecular detection of Phlebotomus-borne viruses", *Parasites & Vectors*, V. 8, n° 1, (2015), 1-10.
155. Branco, S., Alves-Pires, C., Maia, C., Cortes, S., Cristovao, J.M.S., Goncalves, L., Campino, L. and Afonso, MO., "Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal", *Acta tropica*, V. 125, n°3, (2013), 339-348.
156. Bravo-Barriga, D., Parreira, R., Almeida, A.P.G., Calado, M., Blanco-Ciudad, J., Serrano-Aguilera, F.J., Perez-Martin, J.E., Sanchez-Peinado, J., Pinto, J. and Reina, D., "Culex pipiens as a potential vector for transmission of *Dirofilaria immitis* and other unclassified Filarioidea in Southwest Spain" *Veterinary Parasitology*, V. 223, (2016), 173-180.
157. Lafri, I., Almeras, L., Bitam, I., Caputo, A., Yssouf, A., Forestier, C., Izri, A., Raoult, D. and Parola, P., "Identification of Algerian field-caught phlebotomine sand fly vectors by MALDI-TOF MS", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, V.10, n° 1 e0004351p.
158. Bennai, K., Tahir, D., Lafri, I., Bendjaballah-Laliam, A., Bitam, I. and Parola, P., "Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA and host blood meal identification in *Phlebotomus* in a hypoendemic focus of human leishmaniasis in northern Algeria", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, V. 12, n° 6, (2018), e0006513p.
159. Gherbi, R., Bounechada, M., Latrofa, M.S., Annoscia, G., Tarallo, V.D., Dantas-Torres, F., and Otranto, D., "Phlebotomine sand flies and *Leishmania* species in a focus of cutaneous leishmaniasis in Algeria", *PLoS neglected tropical diseases*, V. 14 n° 2, e0008024p.
160. Messahel, N.E., Benallal, K.E., Halada, Petr., Lafri, I., Manseur, H., Hakem, A., Houali, K., Harrat, Z., Volf, P. and Dvorak, V., "Identification of blood source preferences and *Leishmania* infection in sand flies (Diptera: Psychodidae) in north-eastern Algeria", *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, V. 31, 100729p.

161. Sutherland, G.L., et Nasci, R.S., "Detection of West Nile virus in large pools of mosquitoes". *Journal of the American Mosquito Control Association*, V. 23, n° 4, (2007),389-395.
162. Charrel RN, Izri, A, Temmam S, Delaunay, P., Toga I., Dumon, H., Marty P., de Lamballerie X., and Parola P., "Cocirculation of 2 genotypes of Toscana virus, southeastern France", *Emerging Infectious Diseases*, V. 13, n° 3, (2007), 465p.
163. Bichaud, L., Izri, A., De Lamballerie, X., Moureau, G. and Charrel, R.N., "First detection of Toscana virus in Corsica, France", *Clinical Microbiology and Infection*, V. 20, n° 2, (2014), O101-O104.
164. Sanbonmatsu-Gámez, S., Pérez-Ruiz, M., Collao, X., Sánchez-Seco, M.P., Morillas-Márquez, F., De la Rosa-Fraile, M., Navarro-Marí J.M. and Tenorio, A., "Toscana virus in Spain", *Emerging infectious diseases*, V. 11, n° 11, 1701p.
165. Bino, S., Velo, E., Kadriaj, P., Kota, M., Moureau, G., De Lamballerie, X., Bagramian, A., Charrel, R.N., and Ayhan, N., Detection of a novel phlebovirus (Drin virus) from sand flies in Albania. *Viruses*, V. 11, n° 5, (2019), 469p.
166. Verani, P., Ciufolini, M.G., Caciolli, S., Renzi, A., Nicoletti, L., Sabatinelli, G., Bartolozzi, D., Volpi, G., Amaducci, L., Coluzzi, M., et al., "Ecology of viruses isolated from sand flies in Italy and characterization of a new Phlebovirus (Arbia virus)", *The American journal of tropical medicine and hygiene*, V. 38, n° 2, (1988),433-439.
167. Remoli, M.E., Fortuna, C., Marchi, A., Bucci, P., Argentini, C., Bongiorno, G., Maroli, M., Gradoni, L., Gramiccia, M. and Ciufolini, M.G., "Viral isolates of a novel putative phlebovirus in the Marche Region of Italy", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, V. 90 n° 4 , (2014), 760p.
168. Ciufolini, M. G., Maroli, M., Guandalini, E., Marchi, A., and Verani, P., "Experimental studies on the maintenance of Toscana and Arbia viruses (Bunyaviridae: Phlebovirus)", *The American journal of tropical medicine and hygiene*, V. 40, n° 6, (1989), 669-675.

169. Izri, M.A., Belazzoug, S., Boudjebba, Y., Dereure, J., Pralong, S., Delalbre-Belmonte, A., and Rioux, J.A., “Leishmania infantum MON-1 isolé de Phlebotomus perniciosus, en Kabylie (Algérie)”, *Annales de Parasitologie Humaine et comparée*, V. 65 n° 3, (1990),150-150.
170. Allal-Ikhlef, A.B., Senouci, K., Benallal, K., Triki-Yamani, R., Harrat, Z., and Houti, L., Sandflies’s inventory in a leishmaniasis home in Draa El Mizan, Kabylie. *Journal de la faculté de médecine d'Oran*, V. 1, n° 1, (2017), 37-43
171. Benabid, M., Ghrab, J., Rhim, A., Ben-Romdhane, R., Aoun, K. and Bouratbine, A., “Temporal dynamics and Leishmania infantum infection prevalence of Phlebotomus perniciosus (Diptera, Phlebotominae) in highly endemic areas of visceral leishmaniasis in Tunisia”, *PloS one*, V.12, n° 9, (2017), e0184700p.
172. Gilot, B., Gillet, J. F., Quilici, M., Dunan, S., Lachet, B., and Ranque, J. (1983). “Le foyer Marseillais de leishmaniose viscérale : cartographie épidémiologique à 1/50 000. Essai méthodologique”, *Documents de cartographie écologique*, V. 26, (1983), 3-27.
173. Rossi, E., Bongiorno, G., Ciolli, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Gramiccia, M., Gradoni, L. and Maroli, M., “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 tropica*, V. 105 n°2 (2008),158–165.
174. Moulahem, T., Fendri, A. H., Harrat, Z., Benmezdad, A., Aissaoui, K., Ahraou, S. and Addadi, K., Contribution à l’étude des phlébotomes de Constantine : espèces capturées dans un appartement urbain. *Bull Soc Pathol Exot*, V. 91 n°4, (1998),344-345.
175. Calzolari, M., Angelini, P., Finarelli, A.C., Cagarelli, R., Bellini, R., Albieri, A., Bonilauri, P., Cavrini, F., Tamba, M. and Dottori, M. Human and entomological surveillance of Toscana virus in the Emilia-Romagna region, Italy, 2010 to 2012. *Eurosurveillance*, V. 19, n° 48, (2014), 20978p.

176. Boulakenafet F., "Contribution à l'étude de la biodiversité des Phlébotomes (Diptera: Psychodidae) et appréciation de la faune Culicidienne (Diptera: Culicidae) dans la région de Skikda", Mémoire de Magister. Université de Constantine, Algérie, (2006), 191pp.
177. Frahtia-Benothmane, K., "Detection moleculaire des leishmanies à partir du genre phlebotomus (diptera : psychodidae) : tendance vers la regression de la leishmaniose à Constantine", Thèse de doctorat université des frères Mentouri Constantine, (2015),141pp.
178. Schmidt, J.R., Schmidt, M. L. and McWilliams, J.G., "Isolation of phlebotomus fever virus from *Phlebotomus papatasi*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene", V. 9, n° 4, (1960), 450-54.
179. Sakhria, S., Bichaud, L., Mensi, M., Salez, N., Dachraoui, K., Thirion, L., Cherni, S., Chelbi, I., De Lamballerie, X. and Zhioua, E., "Co-circulation of Toscana virus and Punique virus in northern Tunisia: a microneutralisation-based seroprevalence study", PLoS neglected tropical diseases, V. 7 n° 9, (2013). e2429p.

# Production scientifique

## Article

# First Isolation of Punique Virus from Sand Flies Collected in Northern Algeria

Hemza Manseur <sup>1,2,†</sup>, Aissam Hachid <sup>3,4,†</sup>, Ahmed Fayez Khardine <sup>3</sup>, Kamal Eddine BENALLAL <sup>5</sup> , Taha Bia <sup>6</sup>, Merbouha Temani <sup>3</sup>, Ahcene HAKEM <sup>7</sup>, Maria Paz Sánchez-Seco <sup>8,9</sup>, Idir Bitam <sup>10</sup>, Ana Vázquez <sup>8,11</sup> , and Ismail LAFRI <sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Institut des Sciences Vétérinaires, Université de Blida 1, Blida 09000, Algeria
  - <sup>2</sup> Laboratoire des Biotechnologies Liées à la Reproduction Animale (LBRA), Institut des Sciences Vétérinaires, Université de Blida 1, Blida 09000, Algeria
  - <sup>3</sup> Laboratoire des Arbovirus et Virus Emergents, Institut Pasteur d'Algérie, Alger 16000, Algeria
  - <sup>4</sup> Faculté de Pharmacie, Université d'Alger 1, Alger 16000, Algeria
  - <sup>5</sup> Laboratoire d'Éco-Épidémiologie Parasitaire et de Génétique des Populations, Institut Pasteur d'Algérie, Alger 16000, Algeria
  - <sup>6</sup> Institut des Sciences Vétérinaires, Université de Tiaret, Tiaret 14000, Algeria
  - <sup>7</sup> Centre de Recherche en Agropastoralisme (CRAPast) Djelfa, Djelfa 17000, Algeria
  - <sup>8</sup> Arbovirus and Imported Viral Diseases Laboratory, National Center of Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, 28001 Madrid, Spain
  - <sup>9</sup> CIBER Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), 28001 Madrid, Spain
  - <sup>10</sup> Ecole Supérieure des Sciences de l'Aliment et des Industries Agroalimentaires, Alger 16000, Algeria
  - <sup>11</sup> CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), 28001 Madrid, Spain
- \* Correspondence: lafrismail@gmail.com  
† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Manseur, H.; Hachid, A.; Khardine, A.F.; BENALLAL, K.E.; Bia, T.; Temani, M.; HAKEM, A.; Sánchez-Seco, M.P.; Bitam, I.; Vázquez, A.; et al. First Isolation of Punique Virus from Sand Flies Collected in Northern Algeria. *Viruses* **2022**, *14*, 1796. <https://doi.org/10.3390/v14081796>

Academic Editor: Eugene V. Ryabov

Received: 1 August 2022

Accepted: 12 August 2022

Published: 17 August 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** In the last decade, several phleboviruses transmitted by sand flies were detected in the Mediterranean countries, with the health impact of some of them being unknown. From September to October 2020, a total of 3351 sand flies were captured in Kherrata (Bejaia, northern Algeria) and identified by sex, grouped in 62 pools, which were tested for the presence of phlebovirus RNA using endpoint RT-PCR. Two pools (male and female, respectively) were positive. The genome sequencing and phylogenetic analysis showed that the two phleboviruses detected were closely related to the Punique virus (PUNV) isolated in Tunisia and detected in Algeria. Both PUNV strains were isolated on VERO cells from positive pools. Morphological identification of 300 sand flies randomly selected, showed a clear dominance of *Phlebotomus perniciosus* (98.67%). The dominance of this species in the study area was confirmed by PCR targeting the mitochondrial DNA. Our result represents the first isolation of PUNV and the second report in Algeria from two distinct regions which confirm its large circulation in the country and more broadly in North Africa. Further studies are needed to measure the impact on public health through seroprevalence studies in humans as well as animals and to investigate its potential involvement in neurological viral diseases.

**Keywords:** Algeria; Kherrata; phlebovirus; *Phlebotomus perniciosus*; Punique virus; sand flies; molecular epidemiology

## 1. Introduction

To date, 24 sand flies species belonging to *Phlebotomus* and *Sergentomyia* genera were recorded in Algeria and some species are implicated mainly in the transmission of leishmaniasis and also arboviruses [1,2]. Sand fly-borne phleboviruses (SBPs) are wide world distributed with varying epidemiology and public health threat. They are enveloped, spherical viruses, belonging to the genus *Phlebovirus*, (family *Phenuiviridae*: order *Bunyavirales*). Their genome is a single-stranded negative-sense RNA composed of three segments designated as large (L), medium (M), and small (S), they encode for the RNA-dependent RNA

polymerase (L-segment), the envelope glycoproteins Gn and Gc, and the non-structural protein NSm (M-segment), and the nucleocapsid protein (N) and a smaller non-structural protein (NSs) (S-segment) [3–5]. The International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) currently recognizes 66 species within the genus *Phlebovirus* [6], among them, 42 are exclusively or partially transmitted by females sand flies during the blood meal [7,8]. These viruses are found in different geographic locations, in the new world (Bujaru virus, Candiru virus, Chilibre virus, Frijoles virus, and Punta Toro virus) and sand fly fever Naples virus (SFNV), sand fly fever Sicilian virus (SFSV), Salehabad virus and Punique virus (PUNV) are reported around the Mediterranean basin, central and western Asia [9]. In the Mediterranean area, SFNV and SFSV are recognized for their clinical importance. They are the causative agents of a mild three-day fever in humans, also known as *pappataci* fever [10]. Nevertheless, the Toscana virus (TOSV), classified in the SFNV species, is associated with more severe illnesses such as meningitis or meningoencephalitis during the summer season [11]. In addition, other SBPs were detected in humans; this suggests a large spectrum of SBPs capable to produce human infections [12]. In North Africa, many SBPs have been reported. TOSV was detected and isolated in the Maghreb region except for Mauritania and Libya [13–17]. PUNV, a newly described SBPs species, was isolated for the first time in 2008 from *Ph. Perniciosus* and detected in *Ph. Longicuspis* in the vicinity of Utique, Tunisia [18]. However, in Algeria, few data on SBPs are available, in 2006 Sicilian-like virus was detected for the first time in *Ph. Ariasi* and later in *Ph. Papatasi* [19,20]. Followed by Naples-like virus RNA detected in *Ph. Longicuspis* [20]. In 2013, TOSV was also detected and isolated in Draa El Mizan (Tizi-Ouzou) from one pool of sand flies [17]. Concerning the circulation of these viruses among the populations, only three seroprevalence studies were conducted in Larbaa Nath Iraten (Tizi-Ouzou) and Bousmail (Tipaza), northern Algeria, to detect the circulation of SFNV and SFSV, which revealed that 21.6% and 5% of the population were in contact with these viruses, respectively [19,20]. Recently, Alkan et al. showed that 50% of the tested human sera were positive for TOSV [17]. Regarding animals, the serological survey on dogs revealed that 4.5% of the tested animals were positive for TOSV [21]. Leishmaniasis and phleboviruses are both transmitted by sand flies. Furthermore, *Leishmania infantum* and TOSV share the same vector *Ph. Perniciosus* [22]. Moreover, a co-circulation of phleboviruses and *Leishmania* parasites has been recently demonstrated in humans and sand flies in Tunisia and Italy [23,24]. In this context, the aim of this study is to investigate the circulation of phleboviruses among sand flies in a well-known endemic area of human and canine leishmaniasis [25], to understand better the circulation of SBPs in Algeria.

## 2. Materiel and Methods

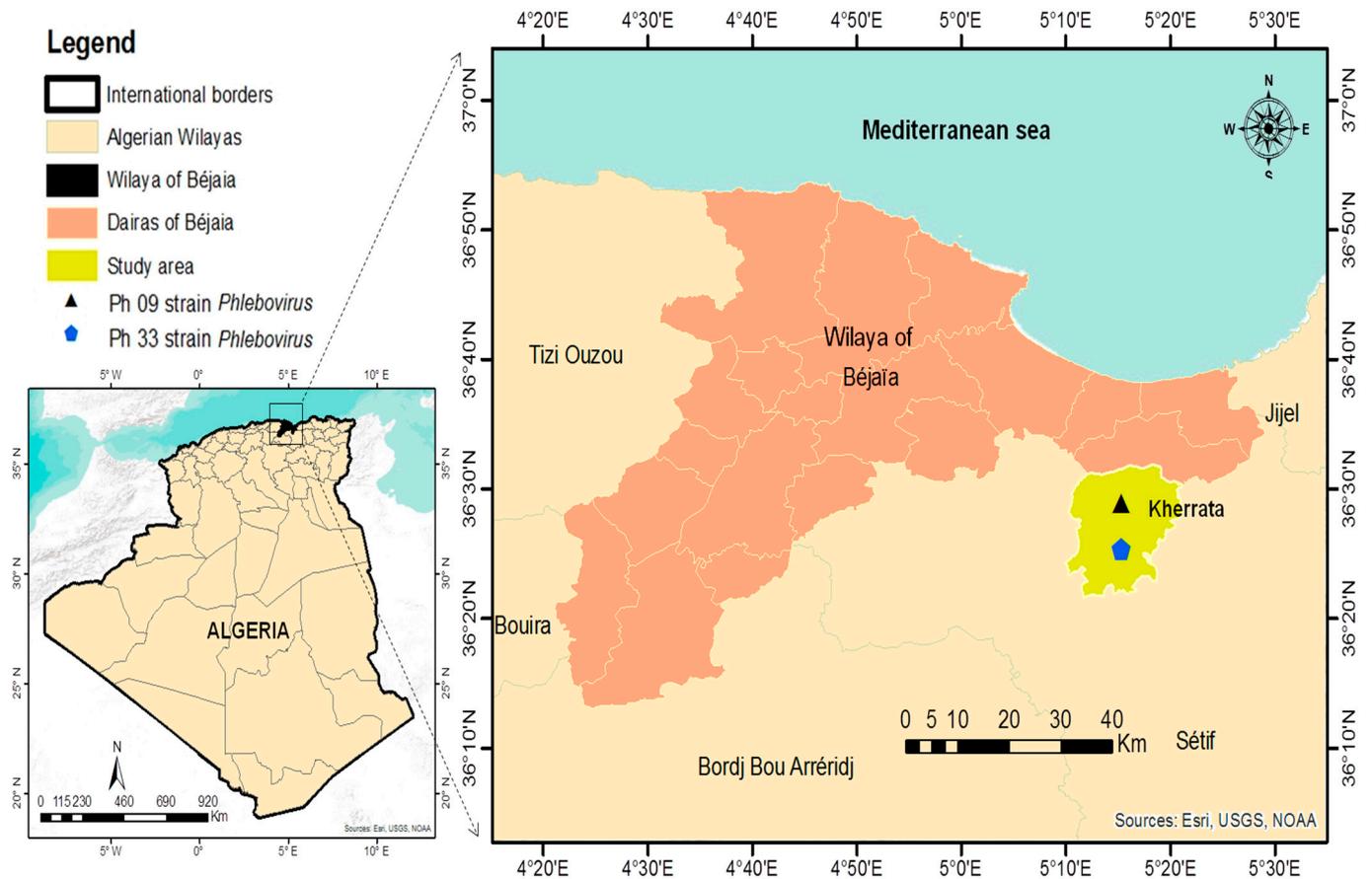
### 2.1. Ethical Considerations

Heads of households who were chosen for sampling sand flies from inside their homes and animal shelters provided verbal informed consent.

### 2.2. Sand Flies Sampling

The present study was conducted in Kherrata, (36°24'20" N, 5°16'37" E), in northern Algeria (Figure 1), between September and October 2020. Regarding sand flies activity, in northern Algeria, two peaks have been reported annually, the first in July–August and the second in late September/early October [26]. Sand flies were caught using CDC miniature light traps (Centres for Disease Control, John W. Hock Company, Gainesville, FL, USA, CDC), which have been modified with an ultra-fine mesh to make them ideal for sand fly capture [27]. The traps were hung 1 to 2 m above the ground in human habitations and animal shelters. The traps were set at sunset till sunrise the next morning. All sand flies were sorted according to their sex, date of collection, and location, and then, pooled to obtain 20 to 50 sand flies per 1.5 mL tube. All specimens were stored in liquid nitrogen during transport to the laboratory, where they were kept at –80 °C until processed. To reduce handling and to foster virus isolation, no morphological identification of the

captured sand flies was carried out before virus testing. All experimentations have been performed at Laboratoire des Arbovirus et Virus Emergents of Institut Pasteur d'Algérie.



**Figure 1.** Geographical location of the study area.

### 2.3. *Phlebovirus* Screening

#### 2.3.1. Sand Flies Processing and Viral RNA Extraction

Each pool was homogenized in 1 mL of Leibovitz's L15 medium (supplemented with 20% of FBS (fetal bovine serum), 10% of tryptose phosphate, 1% of penicillin/streptomycin, and 0.005% of fungizone) using an MM200 mixer mill (Retsch, Haan, Germany). After clarification, the supernatant was divided into 3 aliquots and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The DNA-RNA Extraction MiniKit (Da An Gene Co., Ltd. Of sun Yat University. Guangzhou, China) was used to extract viral nucleic acid from 200  $\mu\text{L}$  sand flies homogenates. The extraction was carried out following the manufacturer's protocol. The nucleic acids were immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.3.2. *Phlebovirus* Detection

A generic Reverse Transcription (RT)-Nested-PCR developed by Sánchez-Seco et al. [28] was used for phleboviruses screening in extracted pools, with some modifications. Reverse transcription and subsequent amplification steps were performed with primers targeting the polymerase gene of the segment L:

Nphlebo1+:5'-ATGGARGGITTGTIWSICIIC-3', Nphlebo1-:5'-AARTTRCTIGWIGCYTTIARIGTIGC-3', for the RT-PCR and (Nphlebo2+:5'-WTICCIAAICCI YMSAARATG-3'), (Nphlebo2-:5'-TCYTCYTTRTTYTTRARRTARCC-3') for the Nested-PCR.

First round RT-PCR was conducted by adding 5  $\mu\text{L}$  of the extracts to 45  $\mu\text{L}$  of a mix containing 2 $\times$  Mix Buffer, 2.4 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.4 mM of each dNTP, and 20 pmol of each primer (Phlebo1+ and Phlebo1-), and 2U of the SuperScript<sup>TM</sup> III One-Step RT-PCR System

with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The RT-PCR cycling program consisted of 50 °C for 15 min and 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles at 94 °C for 30 s, annealing temperature at 45 °C for 1 min, and 68 °C for 45 s, with the final elongation step at 68 °C for 5 min. Second-round Nested-PCR was performed with 1 µL of the RT-PCR product added to 49 µL of a Mix containing 10× Mix Buffer- Mg Cl<sub>2</sub>, 0.2 mM Mg Cl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 20 pmol of each primer (Phlebo2+ and Phlebo2-), and 2U of Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), under the following thermal conditions: denaturation temperature at 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles of 94 °C for 30 s annealing temperature at 45 °C for 2 min, and 72 °C for 30 s, finishing with an elongation step at 72 °C for 10 min. PCR products of first and second-round amplification were detected by gel-electrophoresis with a 2% agarose gel in TBE buffer.

#### 2.4. Virus Isolation

Sand flies homogenates from phlebovirus PCR-positive pools were seeded on Vero African green monkey kidney cells (Vero ATCC CCL81) to attempt virus isolation. To summarize, 800 µL of Eagle's minimal essential medium (EMEM without FBS) was used to dilute 200 µL of each homogenate, the resulting dilution was subsequently filtered with a 0.22 µm filter. Then, 500 µL of the dilution was inoculated into Vero cells monolayer in a T-25 cell culture flask. After 1 h of incubation at 37 °C, 5 mL of maintenance medium (EMEM supplemented with 2% FBS, 1% penicillin-streptomycin, 1% (200 mM) L-glutamine, 1% Kanamycin, and 3% Amphotericin B) was added. The flasks were incubated at 37 °C and examined daily for cytopathic effects. Two passages were performed successively on day 7 post-infection, and supernatants were harvested and clarified. Then, 200 µL aliquot of each passage was tested using phlebovirus generic RT-Nested-PCR as previously described [28].

#### 2.5. Sequencing and Phylogenetic Analysis

Positive PCR products were purified using ExoSAP-IT™ Express PCR Product Clean-up (Applied Biosystem, California, United States of America) and sequenced using the sanger technology. The sequencing reaction was performed with the Big Dye Terminator V3.1 Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) with the same primers and cleaned up with Sephadex® G-50 Superfine (SIGMA-ALDRICH, United States of America). The purified products of the cycle sequencing were analyzed on the ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Sequences generated were aligned using MAFFT software [29], with homologous sequences recovered from the GenBank database. The phylogenetic tree was built by the Maximum Likelihood method in MEGA X software [30]. The robustness of the nodes was tested using 500 bootstrap replicates.

#### 2.6. Sand Flies Identification

##### 2.6.1. Morphological Identification of Sand Flies

Sand fly species fauna was determined from 10% of the caught sand flies. Sand flies were treated in NaOH 10% and fixed in Marc-André solution according to the Abonnec protocol [31]. Each specimen was slide mounted in Marc-André solution and examined under a light microscope. Male genitalia and female spermathecae were used to identify specimens at the species level using morphological identification keys [31–33].

##### 2.6.2. Molecular Identification of Positive Pools

To confirm the sand fly species in the positive pools, the pellets of the positive pools were collected and used for DNA extraction with the DNA-RNA Extraction Mini Kit (Da An Gene Co., Ltd. of Sun Yat University, Guangzhou, China). PCR Reaction was conducted with 5µL of DNA added to 45 µL of Mix containing 1.25 U of Hot StarTaq Plus Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), 2× concentrated. Contains HotStarTaq Plus DNA Polymerase, PCR Buffer (with 1.5 mM Mg Cl<sub>2</sub>), and 0.2 mM each dNTP, and 10 pmol of each universal barcoding primers LCO:5'-GGTCAACAAATCATAAAGATA TTGG-3,

and HCO:5'-TAAACTTCAGGGTGA CCAAA AAATCA-3', to amplifying 700 bp mtDNA genome of the cytochrome oxidase I region as previously described by [34], using the following thermal conditions: initial denaturing at 95 °C for 5 min, then 37 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 90 s, followed by a 10 min extension at 72 °C. The PCR products were visualized on 2% agarose gels. The positive products were purified and sequenced in both directions using the same primers. The sequences were edited in BioEdit software [35], compared to those published sequences in GenBank.

### 3. Results

#### 3.1. Virus Detection and Sand Flies Identification

A total of 3351 sand flies were captured in Kherrata (Bejaia) of whom 3051 were grouped into 62 pools (19 males and 43 females) and used for virus detection and 300 for morphological identification (Table 1). Phlebovirus was detected in two pools Ph9 and Ph33 (female and male, respectively) using RT-Nested-PCR, hence the overall prevalence of phlebovirus infection among the collected sand flies was 0.06% (2/3051) (Table 1). The infection rate = number of positive pools/number of sand flies ×100 [18].

**Table 1.** Number of sand flies used for conventional PCR and infection rate.

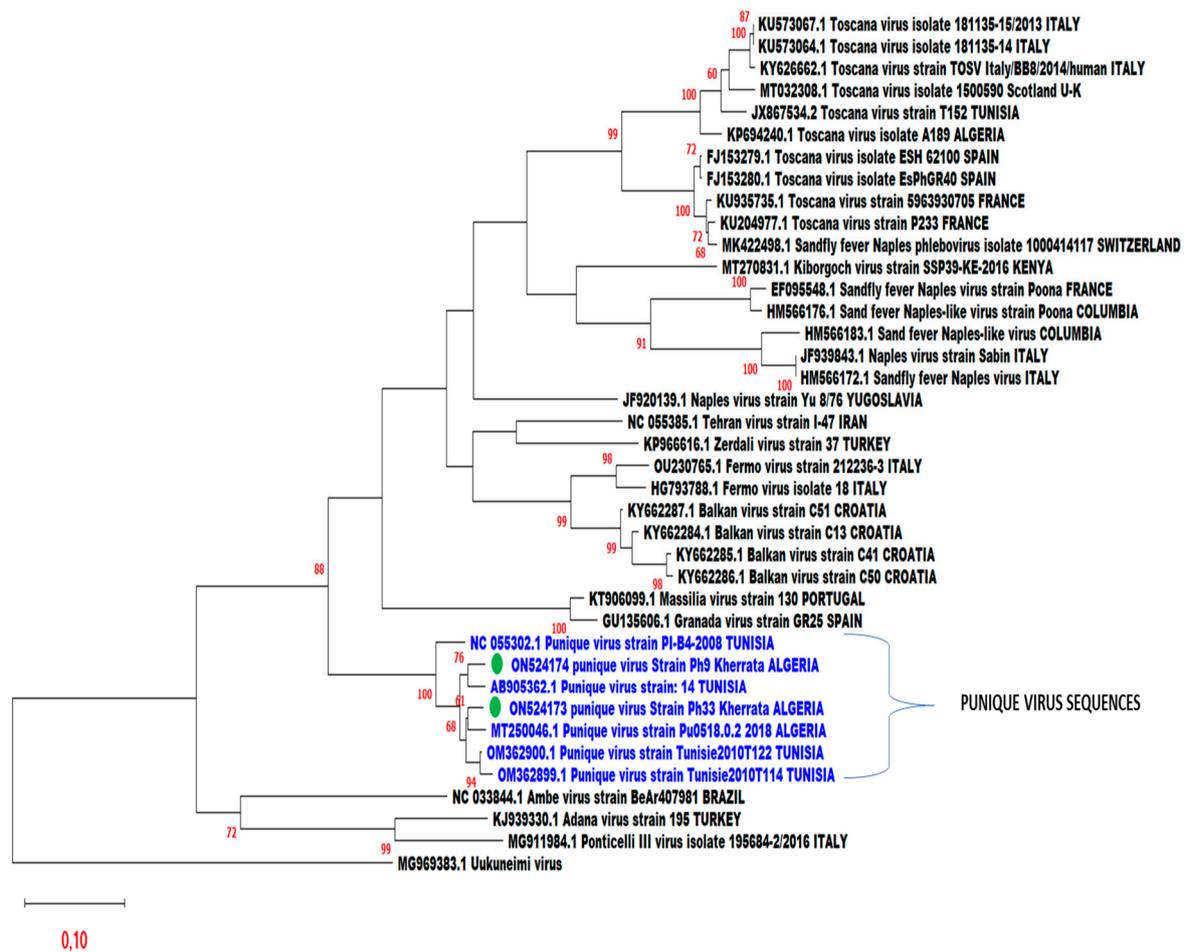
	Male	Female	Total
Number of sand flies	940	2111	3051
Number of pools	19	43	62
Number of positive pools	1(Ph33)	1(Ph9)	2
Infection rate (%)	0.1%	0.05%	0.06%

#### 3.2. Virus Isolation

Pools Ph9 and Ph33 showed clear cytopathic effects on passage 0 on days 4 and 5, respectively. Phlebovirus isolation was confirmed by RT-Nested-PCR as described before. The consensus sequences from both strains obtained from the first step of the RT-PCR have a size of 550 pb and both have been submitted to GenBank as PUNV strain Ph9 (access number ON524174) and Ph33 (access number ON524173).

#### 3.3. Phylogenetic Analysis

Two new strains of PUNV have been detected in the phylogenetic analysis carried out in a short L-fragment (550 pb) (Figure 2). The maximum likelihood tree showed the relationship between ON524174 PUNV strain Ph9 and the PUNV strain isolated in Tunisia, it was supported by 76% bootstraps and with 3.3% and 0% of nucleotide and amino acid distances, respectively, while ON524173 PUNV strain Ph33 is related to the PUNV strain detected in Algeria and their relationship was supported by 61% bootstraps and with 3.5% and 0% of nucleotide and amino acid distances, respectively as described in (Figure 2 and Table 2).



**Figure 2.** Phylogenetic analysis of the two strains isolated in the study area. Distances and groupings were determined by the pairwise-distance algorithm and Maximum Likelihood method within MEGAX, and the robustness of the groups was tested using 500 bootstrap pseudo-replicates.

**Table 2.** Nucleotides and amino acid pairwise distance between Punique virus sequences.

N° Sequences	Amino Acids Distances						
	1	2	3	4	5	6	7
1. ON524174 PUNV strain Ph9 Kherrata Algeria		0.000	0.0061	0.0061	0.0381	0.0121	0.0121
2. AB905362.1 PUNV strain 14 Tunisia	0.0327		0.0061	0.0118	0.0381	0.0121	0.0236
3. ON524173 PUNV strain Ph33 Kherrata Algeria	0.0500	0.0412		0.000	0.0305	0.0061	0.0182
4. MT250046.1 PUNV strain Pu0518.0.2 2018 Algeria	0.0476	0.0515	0.0348		0.0305	0.0061	0.0287
5. OM362899.1 PUNV strain2010T114 Tunisia	0.0590	0.0561	0.0478	0.0505		0.0229	0.0229
6. OM362900.1 PUNV strain 2010T122	0.0412	0.0369	0.0328	0.0348	0.0128		0.0121
7. NC 055302.1 PUNV straiPI-B4-2008 Tunisia	0.0632	0.0770	0.0676	0.0763	0.0705	0.0542	
	Nucleotides distances						

### 3.4. Sand Fly Identification

The morphological identification showed the presence of three species in the study area, belonging to the subgenus *Larrousius*. *Ph. perniciosus* (98.67%) was the most present species as expected followed by *Ph. perfiliewi* (0.67%) and *Ph. longicuspis* (0.67%). *Ph. perniciosus* was identified in both positive pools using LCO1490/HCO2950 (Tables 3 and 4).

**Table 3.** Species identified in the study area.

Species	Sex			Total
	Male	Female	(%)	
<i>Ph. perniciosus</i>	152	144	98.97%	296
<i>Ph. longicuspis</i>	0	2	0.67%	2
<i>Ph. perfiliewi</i>	1	1	0.67%	2
Total	153	147	100%	300

**Table 4.** Sand fly species in the positive pools after sequencing.

Positive Pools	Phlebovirus	Sand Flies Species
Ph 9	Punique virus	<i>Ph. perniciosus</i>
Ph 33	Punique virus	<i>Ph. perniciosus</i>

## 4. Discussion

To date, only a little research regarding phleboviruses were carried out in North Africa and particularly in Algeria, even though sand flies can transmit a wide range of arthropod-borne viruses belonging to *Phenuiviridae*, *Reoviridae*, and *Rhabdoviridae* families compared to the parasitic diseases such as leishmaniasis [9]. Until now, only TOSV was isolated from Algerian sand flies [17]. However, it has been suggested that around the Mediterranean basin new phleboviruses are commonly found [36]. In our investigation, male and female Algerian sand flies were found infected with Punique virus and this was previously reported with other phleboviruses by several studies [18,37–40], this could be explained either by transovarial (vertical) or venereal (horizontal) virus transmission [41–43], suggesting that phleboviruses maintenance in nature is mainly guaranteed by sand flies. Humans and large vertebrates could amplify the virus but they are generally considered dead-end hosts because until now there is no evidence of their implication as reservoirs for these viruses, subsequently, they do not have an important role in the natural life cycle of the virus [44]. Phylogenetic analysis shows that the two strains isolated in our study (Ph9 and Ph33) form a strong cluster (100% bootstrap support) with the PUNV strains from Tunisia and Algeria, respectively (Figure 1). The ON524174 PUNV strain Ph9 was closely related to the sequence AB905362.1 PUNV strain from Tunisia with nucleotide and amino acid distances of 3.3 and 0%, respectively. While ON524173 PUNV strain Ph33 was closely related to the sequence MT250046.1 PUNV strain Pu0518.0.2\_2018 from Algeria, detected in Blida, the nucleotides and amino acid distances were, respectively, 3.5% and 0%. In addition, ON524174 PUNV strain Ph9 and ON524173 PUNV strain Ph33 strains were detected and isolated from the same animal shelter they exhibited a genetic difference of 5% and 0.6% in amino acid distances suggesting a different source of the virus in the study area. The global infection rate of the sand flies by PUNV captured in our study area was 0.06% (2/3051 sand flies), less important compared with data reported in Tunisia at 0.13% [18] and remained quite similar to the infection rate with TOSV observed in Spain of 0.05% [45], Tunisia at 0.03% [13], and France at 0.1% [46]. Nevertheless, higher infection rates were reported for SFS-like virus and SFNV at 0.43%, and 0.25%, respectively [19,20], in Algeria. A lower infection rate with TOSV was noticed at 0.005% in Algeria [17]. All sand flies captured in our study belong to the subgenus *Larrousius*, *Ph. perniciosus* (98.67%), *Ph. perfiliewi* (0.67%), and *Ph. longicuspis* (0.67%). The dominant species was, as expected, *Ph. perniciosus* because it is the

main species identified in the humid and sub-humid bioclimate stages [2,33], this species was confirmed in the positive pools by molecular technique. PUNV was first isolated from *Ph. perniciosus*, and detected in *Ph. longicuspis*, from the Utique region, a well-known focus of human visceral leishmaniasis, which is transmitted in Tunisia principally by *Ph. perniciosus* [18,47]. In addition, in our study, the two strains of PUNV were isolated from sand flies pools of *Ph. perniciosus* in an area where visceral leishmaniasis is endemic [25], this raises the question of the possible co-circulation of *Leishmania infantum* and PUNV in the same area. A co-circulation of *Leishmania infantum* and TOSV were previously observed in a focus on visceral leishmaniasis in central Tunisia [23]. So far, the impact of the PUNV on public health is unknown. Even though a co-circulation of PUNV and TOSV has been proven in Tunisia, there is not enough data to prove its pathogenicity for humans [48]. However, the fact that PUNV is a member of the SFNV-group (the majority of whose members are pathogenic to humans) and that it is detected in *Ph. perniciosus*, a proven vector of *Leishmania infantum* in Algeria [49], implies the need to conduct studies on the impact of this virus on public health. It is important to highlight that 12 years have passed between the discovery of the TOSV in *Ph. perniciosus* in 1971 [50] and the first evidence that it is a pathogen for humans [51].

## 5. Conclusions

Our results allowed the isolation for the first time in Algeria, of two different strains related to PUNV from sand flies belonging to the subgenus *Larroussius*. The infection was observed in both male and female sand flies. In the study area, the dominant species was *Ph. perniciosus*, a known vector of *Leishmania infantum* and TOSV, also, the DNA of this species was the most dominant in the positive pools. Currently, there is no effective vaccine or treatment against human pathogenic phleboviruses such as TOSV, the only solution that can protect against phleboviruses would be the application of collective and individual control measures against sand flies. Serological investigation of patients with fever of unknown origin, meningitis, and/or encephalitis is needed to determine the impact of this virus on public health, as well as entomological and serological investigations in domestic animals.

**Author Contributions:** H.M., capture of sandflies, morphological identification, viral detection, sequencing, isolation, phylogenetic study, and article writing; A.H. (Ahcene Hakem) and I.B., co-supervision in Algeria and correction of the article; A.F.K., viral detection, isolation, sequencing, phylogenetic study; M.T., viral detection and isolation; K.E.B., molecular identification of sandflies; T.B., capture and morphological identification of sandflies; A.H., (Aissam Hachid) and I.L., capture and identification of sandflies, work supervisor, correction of the article; A.V., M.P.S.-S., cosupervisor, initiation of work in Spain and correction of the article; the others read and corrected the article. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was financed by a scholarship from the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (scholarship N° 210) of the national exceptional program 2019/2020 for 7 months in the laboratory (National Center of Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Spain).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** This research article describing a study involving only field caught sand flies insects.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors thank Laboratoire Mixte International (LMI) recherches méditerranéennes dans les infections émergentes et réémergentes (REMEDIER) project supervised by Idir Bitam for providing us materials used in the field. We thank the veterinarians who supported and helped us in the realization of this work, Hadadi Rabah, Hadidi Kada, and Guechiche Tayeb, the authors acknowledge their participation in the sandflies capture. We thank also, Nacer Eddine Messahel for the conception of the geographical carte of study sites.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Lafri, I.; Bitam, I. Phlebotomine sandflies and associated pathogens in Algeria: Update and comprehensive overview. *Vet. Ital.* **2021**, *57*. [[CrossRef](#)]
2. Benallal, K.E.; Garni, R.; Harrat, Z.; Volf, P.; Dvorak, V. 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.* **2022**, *16*, e0009952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Moriconi, M.; Rugna, G.; Calzolari, M.; Bellini, R.; Albieri, A.; Angelini, P.; Cagarelli, R.; Landini, M.P.; Charrel, R.N.; Varan, S. Phlebotomine sand fly-borne pathogens in the Mediterranean Basin: Human leishmaniasis and phlebovirus infections. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Abudurexiti, A.; Adkins, S.; Alioto, D.; Alkhovsky, S.V.; Avšič-Županc, T.; Ballinger, M.J.; Bente, D.A.; Beer, M.; Bergeron, É.; Blair, C.D.; et al. Taxonomy of the order Bunyavirales: Update 2019. *Arch. Virol.* **2019**, *164*, 1949–1965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Charrel, R.N.; Gallian, P.; Navarro-Mari, J.M.; Nicoletti, L.; Papa, A.; Sánchez-Seco, M.P.; Tenorio, A.; de Lamballerie, X. Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1657. [[CrossRef](#)]
6. Benkő, M.; Aoki, K.; Arnberg, N.; Davison, A.J.; Echavarría, M.; Hess, M.; Jones, M.S.; Kaján, G.L.; Kajon, A.E.; Mittal, S.K.; et al. ICTV virus taxonomy profile: Adenoviridae 2022. *J. Gen. Virol.* **2022**, *103*, 001721. [[CrossRef](#)]
7. Calisher, C.H.; Calzolari, M. Taxonomy of phleboviruses, emphasizing those that are sandfly-borne. *Viruses* **2021**, *13*, 918. [[CrossRef](#)]
8. Ayhan, N.; Charrel, R.N. Of phlebotomines (sandflies) and viruses: A comprehensive perspective on a complex situation. *Curr. Opin. Insect. Sci.* **2017**, *22*, 117–124. [[CrossRef](#)]
9. Ayhan, N.; Charrel, R.N. Sandfly-borne viruses of demonstrated/relevant medical importance. In *Vectors and Vector-Borne Zoonotic Diseases*; Intech Open: London, UK, 2018. [[CrossRef](#)]
10. Ashford, R.W. Phlebotomus fevers. In *The Encyclopedia of Arthropod-Transmitted Infections*; Service, M.W., Ed.; CABI: Wallingford, UK, 2001.
11. Amaro, F.; Zé-Zé, L.; Lourenço, J.; Giovanetti, M.; Becker, S.C.; Alves, M.J. Phylogenetic analysis of Massilia phlebovirus in Portugal. *Viruses* **2021**, *13*, 1412. [[CrossRef](#)]
12. Ergunay, K.; Tkachev, S.; Kozlova, I.; Růžek, D. A review of methods for detecting tick-borne encephalitis virus infection in tick, animal, and human specimens. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2016**, *16*, 4–12. [[CrossRef](#)]
13. Bichaud, L.; Dachraoui, K.; Piorkowski, G.; Chelbi, I.; Moureau, G.; Cherni, S.; de Lamballerie, X.; Sakhria, S.; Charrel, R.N.; Zhioua, E. Toscana virus isolated from sand flies, Tunisia. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Es-Sette, N.; Nourlil, J.; Hamdi, S.; Mellouki, F.; Lemrani, M. First detection of Toscana virus RNA from sand flies in the genus *Phlebotomus* (*Diptera: Phlebotomidae*) naturally infected in Morocco. *J. Med. Entomol.* **2014**, *49*, 1507–1509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Es-sette, N.; Ajaoud, M.; Anga, L.; Mellouki, F.; Lemrani, M. Toscana virus isolated from sand flies, Morocco. *Parasit. Vectors* **2015**, *8*, 205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Es-Sette, N.; Ajaoud, M.; Charrel, R.N.; Lemrani, M. Épidémiologie moléculaire des Phlebovirus dans quatre provinces du Maroc. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **2016**, *109*, 143–150. [[CrossRef](#)]
17. Alkan, C.; Allal-Ikhlef, A.B.; Alwassouf, S.; Baklouti, A.; Piorkowski, G.; de Lamballerie, X.; Izri, A.; Charrel, R.N. Virus isolation, genetic characterization and seroprevalence of Toscana virus in Algeria. *Clin. Microbiol. Infect.* **2015**, *21*, 1040–e1. [[CrossRef](#)]
18. Zhioua, E.; Moureau, G.; Chelbi, I.; Ninove, L.; Bichaud, L.; Derbali, M.; Champs, M.; Cherni, S.; Salez, N.; Cook, S.; et al. Punique virus, a novel phlebovirus, related to sand fly fever Naples virus, isolated from sand flies collected in Tunisia. *J. Gen. Virol.* **2010**, *91*, 1275. [[CrossRef](#)]
19. Izri, A.; Temmam, S.; Moureau, G.; Hamrioui, B.; De Lamballerie, X.; Charrel, R.N. Sand fly fever Sicilian virus, Algeria. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 795. [[CrossRef](#)]
20. Moureau, G.; Bichaud, L.; Salez, N.; Ninove, L.; Hamrioui, B.; Belazzoug, S.; de Lamballerie, X.; Izri, A.; Charrel, R.N. Molecular and serological evidence for the presence of novel phleboviruses in sand flies from northern Algeria. *Open Virol. J.* **2010**, *4*, 15.
21. Tahir, D.; Alwassouf, S.; Loudahi, A.; Davoust, B.; Charrel, R.N. Seroprevalence of Toscana virus in dogs from Kabylia (Algeria). *Clin. Microbiol. Infect.* **2016**, *22*, e16–e17. [[CrossRef](#)]
22. Dujardin, J.C.; Campino, L.; Cañavate, C.; Dedet, J.P.; Gradoni, L.; Soteriadou, K.; Mazeris, A.; Ozbek, Y.; Boelaer, M. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 1013. [[CrossRef](#)]
23. Fares, W.; Dachraoui, K.; Barhoumi, W.; Cherni, S.; Chelbi, I.; Zhioua, E. Co-circulation of Toscana virus and *Leishmania infantum* in a focus of zoonotic visceral leishmaniasis from Central Tunisia. *Acta Trop.* **2020**, *204*, 105342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Calzolari, M.; Romeo, G.; Callegari, E.; Bonilauri, P.; Chiapponi, C.; Carra, E.; Rugna, G.; Taddei, R.; Lelli, D.; Dottori, M. Co-Circulation of Phleboviruses and *Leishmania* Parasites in Sand Flies from a Single Site in Italy Monitored between 2017 and 2020. *Viruses* **2021**, *13*, 1660. [[CrossRef](#)]
25. Tahir, D. Épidémiologie de la leishmaniose chez le chien et l’homme à Bejaia. Ph.D. Thesis, Institut des Sciences Vétérinaires Université Blida I, Algérie, Africa, 2014.
26. Ramdane, E.; Berchi, S.; Louad, K. Les phlébotomes (*Diptera, Pshycodidae*), vecteurs d’agents pathogènes responsables de la leishmaniose humaine dans la région de Constantine (Algérie). *Entomofauna* **2018**, *39*, 537–555.
27. Lafri, I.; Almeras, L.; Bitam, I.; Caputo, A.; Yssouf, A.; Forestier, C.L.; Izri, A.; Raoult, D.; Parola, P. Identification of Algerian field-caught phlebotomine sand fly vectors by MALDI-TOF MS. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Sánchez-Seco, M.P.; Echevarría, J.M.; Hernández, L.; Estévez, D.; Navarro-Marí, J.M.; Tenorio, A. Detection and identification of Toscana and other phleboviruses by RT-nested-PCR assays with degenerated primers. *J. Med. Virol.* **2003**, *71*, 140–149. [[CrossRef](#)]
29. Katoh, K.; Rozewicki, J.; Yamada, K.D. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* **2019**, *20*, 1160–1166. [[CrossRef](#)]
30. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)]
31. Abonnenc, E. Les phlébotomes de la région éthiopienne (*Diptera, Psychodidae*). *Cah. ORSTOM Sér. Ent. Méd. Parasitol.* **1972**, *55*, 1–239.
32. Leger, N.; Pesson, B.; Madulo-Leblond, G.; Abonnenc, E. Differentiation of females of the subgenus Larrousius Nitzulescu 1931 (*Diptera-Phlebotomidae*) of the Mediterranean region. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **1983**, *58*, 611–623. [[CrossRef](#)]
33. Dedet, J.P.; Adaddi, K.Y.; Bellazoug, S. Les phlébotomes (*Diptera, Psychodidae*) d’Algerie. *Cah. ORSTOM Sér. Ent. Méd. Parasitol.* **1984**, *22*, 99–127.
34. Folmer, O.; Hoeh, W.R.; Black, M.B.; Vrijenhoek, R.C. Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **1994**, *3*, 294–299. [[PubMed](#)]
35. Hall, T. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95–98.
36. Remoli, M.E.; Bongiorno, G.; Fortuna, C.; Marchi, A.; Bianchi, R.; Khoury, C.; Ciufolini, M.G.; Gramiccia, M. Experimental evaluation of sand fly collection and storage methods for the isolation and molecular detection of Phlebotomus-borne viruses. *Parasit. Vectors* **2015**, *8*, 576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Peyrefitte, C.N.; Grandadam, M.; Bessaud, M.; Andry, P.E.; Fouque, F.; Caro, V.; Diancourt, L.; Schuffenecker, I.; Pagès, F.; Tolou, H.; et al. Diversity of Phlebotomus perniciosus in Provence, southeastern France: Detection of two putative new Phlebovirus sequences. *Vector Bor. Zoonotic Dis.* **2013**, *13*, 630–636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Remoli, M.E.; Fortuna, C.; Marchi, A.; Bucci, P.; Argentini, C.; Bongiorno, G.; Maroli, M.; Gradoni, L.; Gramiccia, M.; Ciufolini, M.G. Viral isolates of a novel putative Phlebovirus in the Marche Region of Italy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2014**, *90*, 760. [[CrossRef](#)]
39. Alkan, C.; Alwassouf, S.; Piorkowski, G.; Laurence, B.; Seda, T.; Dincer, E.; Ergunay, K.; Ozbel, Y.; Alten, B.; de Lamballerie, X.; et al. Isolation, genetic characterization, and seroprevalence of Adana virus, a novel Phlebovirus belonging to the Salehabad virus complex, in Turkey. *J. Virol.* **2015**, *89*, 4080–4091. [[CrossRef](#)]
40. Fares, W.; Charrel, R.N.; Dachraoui, K.; Bichaud, L.; Barhoumi, W.; Derbali, M.; Cherni, S.; Chelbi, I.; de Lamballerie, X.; Zhioua, E. Infection of sand flies collected from different bio-geographical areas of Tunisia with phleboviruses. *Acta Trop.* **2015**, *141*, 1–6. [[CrossRef](#)]
41. Ciufolini, M.G.; Maroli, M.; Verani, P. Growth of two phleboviruses after experimental infection of their suspected sand fly vector, Phlebotomus perniciosus (*Diptera: Psychodidae*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1985**, *34*, 174–179. [[CrossRef](#)]
42. Tesh, R.B. The genus Phlebovirus and its vectors. *Annu. Rev. Entomol.* **1988**, *33*, 169–181. [[CrossRef](#)]
43. Maroli, M.; Ciufolini, M.G.; Verani, P. Vertical transmission of Toscana virus in the sand fly, Phlebotomus perniciosus, via the second gonotrophic cycle. *Med. Vet. Entomol.* **1993**, *7*, 283–286. [[CrossRef](#)]
44. Alkan, C.; Bichaud, L.; de Lamballerie, X.; Alten, B.; Gould, E.A.; Charrel, R.N. Sand fly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: Epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral. Res.* **2013**, *100*, 54–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Sanbonmatsu-Gámez, S.; Pérez-Ruiz, M.; Collao, X.; Sánchez-Seco, M.P.; Morillas-Márquez, F.; De la Rosa-Fraile, M.; Navarro-Marí, J.M.; Tenorio, A. Toscana virus in Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bichaud, L.; Izri, A.; de Lamballerie, X.; Moureau, G.; Charrel, R.N. First detection of Toscana virus in Corsica, France. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, O101–O104. [[CrossRef](#)]
47. Zhioua, E.; Kaabi, B.; Chelbi, I. Entomological investigations following the spread of visceral leishmaniasis in Tunisia. *J. Vector Ecol.* **2007**, *32*, 371–374. [[CrossRef](#)]
48. Sakhria, S.; Bichaud, L.; Mensi, M.; Salez, N.; Dachraoui, K.; Thirion, L.; Cherni, S.; Chelbi, I.; De Lamballerie, X.; Zhioua, E.; et al. Co-circulation of Toscana virus and Punique virus in northern Tunisia: A microneutralization-based seroprevalence study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2429. [[CrossRef](#)]
49. Harrat, Z.; Pralong, F.; Belazzoug, S.; Dereure, J.; Deniau, M.; Rioux, J.A.; Belkaid, M.; Dedet, J.P. *Leishmania infantum* and L. major in Algeria. *Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.* **1996**, *90*, 625–629. [[CrossRef](#)]
50. Verani, P.; Ciufolini, M.G.; Caciolli, S.; Renzi, A.; Nicoletti, L.; Sabatinelli, G.; Bartolozzi, D.; Volpi, G.; Amaducci, L.; Coluzzi, M.; et al. Ecological and epidemiological studies of Toscana virus, an arbovirus isolated from Phlebotomus. *Ann. Ist. Super. Sanita.* **1982**, *18*, 397–399.
51. Ehrnst, A.; Peters, C.J.; Niklasson, B.; Svedmyr, A.; Holmgren, B. Neurovirulent Toscana virus (a sand fly fever virus) in Swedish man after visit to Portugal. *Lancet* **1985**, *325*, 1212–1213. [[CrossRef](#)]