



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie
Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV
Filière : Sciences Biologiques
Option : Génétique

Thème

Caractérisation moléculaire du genre *Wolbachia* circulante chez les vecteurs en Algérie

Présenté par : M^{elle} Nasri Loubna

Soutenu le : 30 /06/2024

Devant le jury :

Nom	Grade/Lieu	Qualité
M ^{me} GUESSAIBIA N.	MCA /USDB1	Présidente
M ^{me} BENMANSOUR	MCB/USDB1	Examinatrice
M ^{me} BENIKHLEF R.	Maître de recherche/IPA	Promotrice
M ^{me} EDDAIKRA A.	MCB/USDB1	Co-promotrice

Année universitaire : 2023/2024

Remerciements

Nous exprimons notre profonde gratitude envers Dieu le Tout-Puissant pour sa grâce et sa providence qui nous ont donné la force et la patience nécessaires pour accomplir ce modeste travail. Chaque étape de ce projet a été marquée par sa guidance et sa facilitation, illuminant notre chemin et renforçant notre détermination. Nous rendons grâce à Dieu pour sa bienveillance constante et son soutien qui ont éclairé notre chemin vers le succès, enrichissant notre expérience avec des bénédictions et des leçons précieuses. Chaque défi surmonté et chaque victoire remportée témoigne de sa présence et de son amour infini, nous rappelant humblement que rien n'est impossible avec sa bénédiction

*En second lieu, nous exprimons notre profonde gratitude envers notre encadrante, **Mme Razika Benikhlef**, pour sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements et son soutien moral tout au long de notre projet. C'est un honneur pour nous d'avoir eu **Mme Benikhlef** comme encadrante, elle qui a été présente avec moi du début à la fin de mon parcours professionnel, m'apportant tout le soutien nécessaire. Je la remercie pour ses précieux conseils, ses encouragements et pour avoir été toujours à mes côtés. J'ai été ravi d'avoir eu l'opportunité de travailler avec elle.*

*Nous adressons également nos remerciements à notre co-encadrante, **Mme Atika Eddaikra**, pour ses précieux conseils, sa bienveillance et son assistance.*

Nos sincères remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et en l'enrichissant par leurs suggestions.

*Nous tenons également à exprimer notre reconnaissance à toute l'équipe du Laboratoire d'Éco-Épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations de l'Institut Pasteur d'Alger, en particulier à **Mme Naouel Eddaikra**, pour leur accueil chaleureux, le temps précieux qu'ils nous ont consacré afin de mener à bien ce mémoire, ainsi qu'à toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation.*

Enfin, nous remercions tous nos professeurs à la faculté, en particulier ceux de la spécialité Génétique, ainsi que toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

*Je dédie ce travail à **mes parents** qui m'ont soutenu et encouragé durant ces années d'études. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.*

*Ce travail est dédié à **mon père**, qui a travaillé dur pour mon confort, et aux cheveux blancs sur sa tête, chacun racontant l'histoire de ses sacrifices pour mon bonheur.*

*Je le dédie également à **ma mère** bien-aimée, dont les prières et les conseils ont été essentiels pour mener à bien cette œuvre.*

*Je dédie ce travail à **mes frères** (Zoubir ,Abdelhak , fawas, Louanas) et **mes sœurs**(Lila, fairouz, Nawel, Asma) .*

*Je tiens particulièrement à dédier ce travail à **mon grand frère**Zoubir, dont le soutien a été constant tout au long de mes études*

*Je dédie ce travail à mes sœurs, qui ont été mon soutien moral, et spécialement à **ma sœur Asmaa**, qui a vécu avec moi pendant toutes mes épreuves.*

*Je dédie ce travail à **mes amis** (Abir, Chaima, Fatima, Imane, Oumaima, Naima, Linda)*

Résumé

Français

Les *Wolbachia* sont des bactéries intracellulaires qui infectent différents groupes d'arthropodes, dont les Phlébotomes et les moustiques. Certaines espèces de phlébotomes sont vectrices du parasite *Leishmania* agents des leishmanioses cutanées (LC), et viscérale (LV) au monde et plus particulièrement en Algérie. Par ailleurs, les espèces de *Culex* et *Aedes* transmettent des virus provoquant diverses formes de maladies virales. Ces maladies représentent un vrai problème de santé publique. Notre étude a permis d'évaluer la fréquence de *Wolbachia* dans les populations d'insectes capturés en Algérie à l'aide de l'amplification par PCR du gène *WSP*. Au total 483 insectes ont été sélectionnés, identifiés et diagnostiqués. Vu le grand nombre des insectes étudiés, les extraits d'ADN ont été groupés en pools (101 pools). Notre étude moléculaire préliminaire de la PCR-*WSP* révèle un potentiel de ce gène dans le diagnostic de *Wolbachia* chez les insectes. L'ADN de *Wolbachia* a été trouvé chez 31 des 101 pools d'ADN étudiés. Les taux d'infection les plus élevés ont été trouvés chez *Culex pipiens* (44,44%) et les phlébotomes (37,14%), tandis que ce taux été très faible (6,66%) chez *Aedes albopictus*. Des études complémentaires et plus approfondies sont indispensables pour confirmer ces résultats.

Mots clés : *Wolbachia*, gène *WSP*, *Culex*, *Aedes*, phlébotome, Algérie

Abstract

En anglais

Wolbachia are intracellular bacteria that infect various groups of arthropods, including sandflies and mosquitoes. Certain species of sandflies are vectors of the Leishmania parasite, which causes cutaneous (CL) and visceral (VL) leishmaniasis worldwide, particularly in Algeria. Additionally, Culex and Aedes species transmit viruses causing various viral diseases, posing significant public health challenges. Our study aimed to assess the frequency of Wolbachia in insect populations captured in Algeria using PCR amplification of the WSP gene. A total of 483 insects were selected, identified, and diagnosed. Due to the large number of insects studied, DNA extracts were grouped into pools (101 pools). Our preliminary molecular study using PCR-WSP revealed the potential of this gene for Wolbachia diagnosis in insects. Wolbachia DNA was detected in 31 out of 101 DNA pools analyzed. The highest infection rates were found in Culex pipiens (44.44%) and sandflies (37.14%), while it was much lower (6.66%) in Aedes albopictus. Further comprehensive studies are essential to confirm these findings.

Keywords: Wolbachia, WSP gene, Culex, Aedes, sandfly, Algeria

ملخص

En arabe

وولباكيا هي بكتيريا داخل الخلية تصيب مجموعات مختلفة من اللاقاريات، بما في ذلك الذباب والبعوض. بعض أنواع الذباب تعمل كناقلات لطفيلي ليشمانيا، المسببة لمرض ليشمانيا الجلدية (LC) والحشوية (LV) على نطاق عالمي، وبشكل خاص في الجزائر. بالإضافة إلى ذلك، تنقل أنواع البعوض والعقارب الفيروسات التي تسبب أمراض فيروسية متنوعة، مما يشكل تحديات كبيرة للصحة العامة. هدفت دراستنا إلى تقييم تواتر وولباكيا في مجموعات الحشرات المأسورة في الجزائر باستخدام تكرار البوليميراز المتسلسل (PCR) لجين WSP. تم اختيار وتحديد وتشخيص ما مجموعه 483 حشرة. نظرًا للعدد الكبير من الحشرات المدروسة، تم تجميع استخرجات الحمض النووي في مجاميع (101 مجموعة). كشفت دراستنا الجزيئية الأولية باستخدام PCR-WSP عن إمكانية هذا الجين في تشخيص وولباكيا في الحشرات. تم العثور على حمض النووي لولباكيا في 31 من أصل 101 مجموعة من الحمض النووي التي تم دراستها. تم العثور على أعلى معدلات الإصابة في *Culex pipiens* (44.44%) والذباب (37.14%)، في حين كان هذا المعدل أقل بكثير (6.66%) في *Aedes albopictus*. الضروري إجراء دراسات إضافية شاملة لتأكيد هذه النتائج.

الكلمات المفتاحية: وولباكيا، جين WSP ، *Culex* ، *Aedes* ، الذباب، الجزائر

Liste des figures

Figure 1 :Microphotographie électronique de Wolbachia dans une cellule d'insecte	05
Figure 2 : Distribution de Wolbachia (en couleur verte) dans les tissus somatiques de divers hôtes.	05
Figure 3 : Le génome de Wolbachia assemblé en un seul contig.	07
Figure 4 : Les deux Modes la transmission de Wolbachia	08
Figure 5 :Incorporation du génome de Wolbachia dans le génome de l'hôte	09
Figure 6 :L'Incompatibilité cytoplasmique chez <i>Drosophila melanogaster</i>	10
Figure 7 :le phénomène de la destruction des mâles..	10
Figure 8 : Dans la guêpe parasitaire <i>Leptopilina clavipes</i> , l'infection par Wolbachia est associée à la duplication des gamètes, ce qui permet la parthénogenèse	11
Figure 9 :la parthénogenèse chez le cloporte <i>Armadillidium vulgare</i>	12
Figure 10 :Situation géographique des quatre wilayas de l'étude.....	20
Figure 11 :Schéma récapitulatif des différentes étapes de traitement et identification des insectes de l'étude (original).....	22
Figure 12 :Extraction de l'ADN sous hotte chimique (photo original).....	22
Figure 13 :Dosage des extraits d'ADN par le Nanodrop (photo original).....	24
Figure 14 :les différentes étapes de PCR	25
Figure 15 : Les conditions d'amplification (photo originale).....	26
Figure 16 :Les étapes de l'électrophorèse sur gel d'agarose (photo original)	27
Figure 17 : Distribution des insectes étudiés selon les régions.....	31
Figure 18 :Distinction des insectes selon le sexe.	32
Figure 19 :(a) distribution du total des insectes étudiés selon le sexe, (b) distribution des différents insectes selon le sexe.	33
Figure 20 :Distribution des espèces de phlébotomes mâles identifiés dans les trois zones de l'étude	34
Figure 21 : Histogramme représentatif de la distribution de la concentration des ADNs extraits des différents insectes.....	36
Figure 22 :Distribution du rapport 260/280 des ADNs extraits des différents insectes.....	37
Figure 23 :Distribution du rapport 260/230 des ADNs extraits des différents insectes.....	38
Figure 24 :Visualisation des résultats de la PCR par électrophorèse du gène Wsp.	39
Figure 25 :Visualisation des résultats de la PCR par électrophorèse du gène Wsp. (Photo. Sous UV).....	39
Figure 26 :Visualisation des résultats de la PCR par électrophorèse du gène Wsp. (Photo. Sous UV).....	40

Figure 27: Infection des insectes de l'étude par Wolbachia	41
Figure 28:: Résultats de l'alignement de séquences quelques espèces de phlébotomes, de Culex et d'Aedes par MEGA	42
Figure 29: Arbre phylogénétique des séquences WSP chez quelques espèces de phlébotomes, de Culex et d'Aedes récupérées de NCBI construit sur MEGA	43

Liste des Abréviations

OMS : l'organisation mondiale de la santé

IC : incompatibilité cytoplasmique

WSP : protéine de surface de *Wolbachia*

ONT: Oxford Nanopore Technologies

MK: male killing

WO: virus bactériophages de *Wolbachia*

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ARNr : Acide Ribonucléique Ribosomique

ARNt : Acide Ribonucléique de Transfert

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne

MLST : système de typage multilocus

qPCR : PCR quantitative

FISH: Hybridation in situ fluorescente

CTAB: Cetyl trimethyl ammonium bromide

TBE: Tris Borate EDTA

BET: bromure d'éthidium

UV: ultra-violet

ddNTPs: didésoxynucléotides

NCBI: National Center for Biotechnology information

LC : leishmaniose cutanée

LV : leishmaniose viscérale

Liste des tableaux

Tableau I : Association de Wolbachia et les différentes maladies à transmission vectorielle (LC : leishmaniose cutanée, LV : leishmaniose viscérale)	14
Tableau II : Certains amorces utilisées pour la détection de Wolbachia par PCR	16
Tableau III : Caractéristique du Gène Wsp pour la détection de Wolbachia.....	25
Tableau IV :Code des séquences Wsp de quelques phlébotomes et moustiques récupérées de NCBI.....	28
Tableau V :: Distribution de la concentration des ADNs extraits des différents insectes	35
Tableau VI :Analyse statistique de la distribution des DO 260/280 et des DO 260/230 des ADNs extraits des différents insectes.....	37
Tableau VII :Prévalence de Wolbachia selon les espèces de vecteurs	41

Sommaire

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I.1 La bactérie du genre <i>Wolbachia</i>	04
I.1.1 Historique.....	04
I.1.2 Description morphologique et localisation	05
I.1.3 Taxonomie et Classification de <i>Wolbachia</i>	06
I.1.4 Le génome de <i>Wolbachia</i>	06
I.1.5 Modes de transmission des <i>Wolbachia</i>	07
I.1.6 Mode de vie de <i>Wolbachia</i>	08
I.1.7 Effets de <i>Wolbachia</i> sur les arthropodes	09
I.1.8 Effet des facteurs environnementaux sur <i>Wolbachia</i>	12
I.1.9 Impact de <i>Wolbachia</i> sur les maladies vectorielles.....	13
I.2 Apport de la biologie moléculaire dans l'étude de la bactérie <i>Wolbachia</i> et la biologie moléculaire.....	15
I.2.1 La PCR Réaction de Polymérisation en Chaîne.....	15
I.2.2 La PCR quantitative (qPCR).....	16
I.2.3 Séquençage de génome entier	16
I.2.4 Hybridation in situ fluorescente (FISH)	16
Chapitre II : Matériel et méthodes	18
II .1 Matériel non biologique (annexes)	19
II .2 Matériel biologique	19
II.3 <i>Méthode</i>	19
II.3.1 Les zones de l'étude	19
II.3.2 Etude morphologique	20
II.4 Etude moléculaire.....	22
II.4.1 Extraction d'ADN	22
II.4.2 Dosage de l'AND	23
II.4.3 Amplification par PCR « polymerase chain reaction »	24
II.4.4 Électrophorèse sur gel d'agarose	26
II.4.5 Séquençage	27

II.5	Analyse statistique.....	29
Chapitre III : Résultats		30
III.1	Distribution des insectes de l'étude.....	31
III.1.1	Répartition des insectes de l'étude selon la zone	31
III.1.2	Répartition des insectes de l'étude selon le sexe	31
III.2	Identification morphologique des insectes	33
III.2.1	Identification morphologique des phlébotomes	33
III.2.2	Identification morphologique des moustiques	34
III.3	Détection moléculaire de la bactérie <i>Wolbachia</i> chez les insectes d'études	35
III.3.1	Dosage des extraits de l'ADN par le Nanodrop.....	35
III.3.3	Prévalence de <i>Wolbachia</i> selon les espèces de vecteurs	40
III.3.4	Analyse phylogénétique du séquençage in silico.....	42
Chapitre IV : Discussion		44
Conclusion		47
Reférence		49
Anexe		54

INTRODUCTION

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), les maladies à transmission vectorielle représentent plus de 17% des maladies infectieuses qui affectent l'homme et provoquent encore plus de 700000 décès par an dans le monde (<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>). Leur impact sur la santé publique et l'économie mondiale est considérable. Les maladies à transmission vectorielle regroupent l'ensemble des maladies infectieuses dont l'agent causal, qui peut être un virus, une bactérie ou un parasite, est transmis à l'homme par un vecteur, généralement un arthropode hématophage, au cours de la piqûre (Robert et al., 2008). Ces vecteurs incluent de nombreux insectes tels que les moustiques, les puces, de nombreuses mouches et moucheron (phlébotomes, culicoïdes...), (Duvall et al., 2017). Ainsi, la lutte contre ces vecteurs est primordiale, et a comme objectif la réduction de l'intensité de la transmission des agents pathogènes.

Dans les années 1990, les entomologistes et les microbiologistes ont révélé qu'au moins 40% des espèces d'arthropodes hébergent la bactérie *Wolbachia*. Ces chercheurs ont découvert que ces bactéries possèdent un rôle potentiel dans la régulation de certaines maladies parasitaires et virales (Shaikevich, Bogacheva, et Ganushkina 2019). En effet, ces bactéries endosymbiotiques modifient la biologie de l'hôte et peuvent induire une féminisation, une parthénogenèse, la mort des mâles et une incompatibilité cytoplasmique (IC). Les études récentes ont significativement enrichi notre compréhension de la distribution de *Wolbachia* parmi les arthropodes. Alipour et ses collègues (2021), ainsi que Karatepe, Aksoy, et Karatepe (2018), ont identifié la présence de *Wolbachia* chez les phlébotomes (Alipour et al. 2021)(Karatepe, Aksoy, et Karatepe 2018), des vecteurs critiques de la leishmaniose. De même, les travaux de Sinha et al. (2019) et de Shaikevich, Bogacheva, et Ganushkina (2019) ont confirmé la présence de cette bactérie chez les moustiques.

L'Algérie est un pays endémique des leishmanioses cutanées (OMS, 2021) et d'autres maladies virales. Certaines espèces de phlébotomes femelles sont vectrices des parasites du genre *Leishmania*. De plus la présence des moustiques comme les *Culex* et les *Aedes* est une autre menace pour la prolifération et l'émergence des maladies virales. Afin de développer des stratégies efficaces de lutte contre ces maladies, tout en réduisant les risques pour la santé publique et animale, il est crucial de bien étudier les populations d'insectes dans leur vrai habitat, comme par exemple connaître leurs microbiotes. Dans cette optique, et afin d'étudier

le rôle de *Wolbachia* dans la régulation de ces maladies parasitaires et virales, nous avons réalisé une étude préliminaire pour évaluer le taux d'infection de certains insectes vectrices par la bactérie *Wolbachia*. Pour cela, nous avons ciblé un marqueur génétique codant pour une protéine de surface de *Wolbachia* « WSP » chez trois (03) insectes capturés à l'est et le nord de l'Algérie. Il s'agit des phlébotomes, les culex et les Aedes.

Ce manuscrit est divisé en trois grandes parties :

1. Dans la première partie, nous avons réalisé une synthèse bibliographique sur la bactérie *Wolbachia*, son génome et les différents insectes infectés.
2. Dans la seconde partie, nous avons traité notre étude expérimentale basée sur l'identification morphologique de 3 différents insectes capturés dans quatre wilayas de l'Algérie (trois de l'est et une du nord), ainsi que l'étude du gène WSP dans le diagnostic et la diversité moléculaire.
3. Enfin, nous avons rapporté dans la troisième partie une interprétation des résultats obtenues suivi d'une discussion.

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I.1 La bactérie du genre *Wolbachia*

I.1.1 Historique

L'entomologiste Marshall Hertig et le rickettsiologiste de Harvard, Simeon Burt Wolbach ont découvert *Wolbachia* en 1924, une bactérie endosymbiotique intracellulaire, dans les ovaires du moustique *Culex pipiens* (Minwuyelet et al. 2023). Leurs études se basaient uniquement sur des frottis et n'incluaient aucun détail histologique des cellules ou des organes infectés (Hertig 1936). En 1936, Hertig lui a donné le nom de *Wolbachia pipientis* en l'honneur de Burt Wolbach (Minwuyelet et al. 2023). Par la suite, ces bactéries ont suscité un intérêt croissant dans le contrôle de la propagation des populations de moustiques. En effet Robert McLeod (1967), a découvert que les œufs de moustiques sont non viables, lorsque les femelles non infectées par *Wolbachia* sont fécondées par des mâles infectés. De plus l'infection et ses conséquences ne se restreignaient pas aux moustiques, mais pouvaient également toucher de nombreuses autres espèces d'insectes (Thomas 2016). Ce phénomène est appelé l'incompatibilité cytoplasmique (IC), (Minwuyelet et al. 2023). Les études ultérieures ont mis en évidence la présence de la bactérie chez les arthropodes, notamment dans divers tissus reproducteurs, ainsi que chez les nématodes filariens (Fallon 2024a), (figure 1).

En 1981, il a été suggéré que *Wolbachia* pourrait induire la parthénogenèse chez les guêpes *Tichogramma*. En 1990, le potentiel d'utilisation de *Wolbachia* pour la gestion des populations d'insectes ravageurs a été exploré par les chercheurs (Minwuyelet et al. 2023). L'utilisation de *Wolbachia* pour la prévention du virus de la dengue a été étudiée en 2000 (Minwuyelet et al. 2023). Des études ont montré le potentiel de cette bactérie dans la lutte contre le virus Zika et le virus Chikungunya, agents de la fièvre Zika et de la fièvre Chikungunya (Berube 2023a). Beaucoup d'expériences sur le terrain dans des pays tels que l'Australie, l'Indonésie, le Brésil, la Colombie, les Fidji, Kiribati, l'Inde, la Chine et le Mexique (Kaur et al. 2021a) sont en cours d'études ayant pour objectif d'élargir l'utilisation des moustiques infectés par *Wolbachia* pour prévenir les maladies à transmission vectorielle et d'explorer leur potentiel dans la lutte contre d'autres ravageurs (Minwuyelet et al. 2023).

I.1.2 Description morphologique et localisation

Morphologiquement, *Wolbachia* est une bactérie intracellulaire en forme de bacilles, Gram négatif (figure 1).

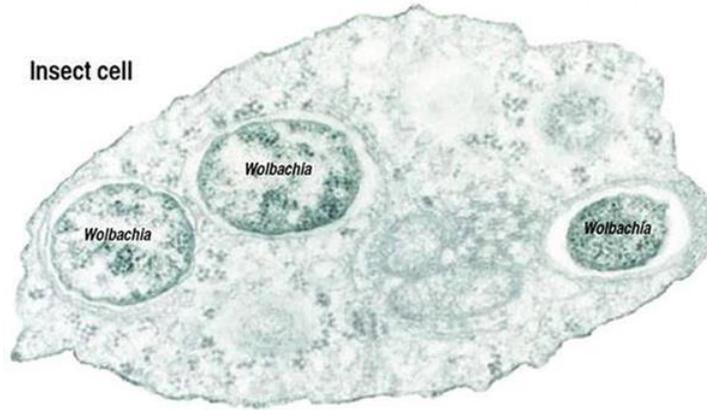


Figure 1 : Microphotographie électronique de *Wolbachia* dans une cellule d'insecte (Ayoade, F., & S. Ogunbiyi, T. 2023)

Wolbachia est présente dans le cytoplasme des cellules hôtes, tout comme les mitochondries (figure 2). Dans les tissus reproducteurs, *Wolbachia* est souvent présente, mais elle peut également se retrouver dans les cellules somatiques. Dans certaines situations, comme chez certains insectes, *Wolbachia* a été trouvé dans une seule patte (Fallon 2024a).

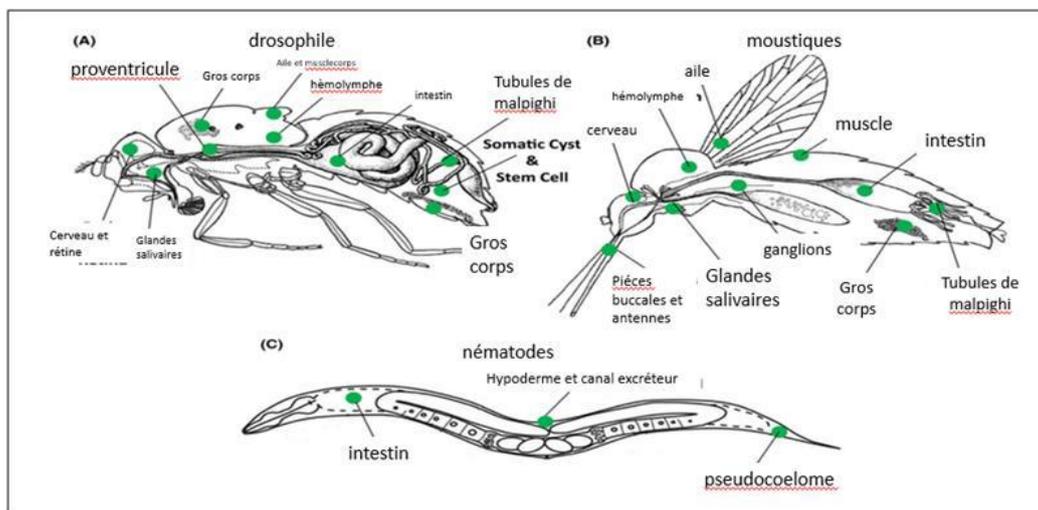


Figure 2 : Distribution de *Wolbachia* (en couleur verte) dans les tissus somatiques de divers hôtes. (Ogunbiyi, T. 2023)

I.1.3 Taxonomie et Classification de *Wolbachia*

Wolbachia appartient à (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=953>):

Règne : Bactéries

Phylum : Protéobactéries

Classe : Alphaprotéobactéries

Ordre: Rickettsiales

Famille: Anaplasmataceae

Genre: *Wolbachia*

Espèces: *Wolbachia pipientis*, *Wolbachia endosymbiont*, *Wolbachia massiliensis*, *Wolbachia ivorensio*

I.1.4 Le génome de *Wolbachia*

Le premier génome séquencé de *Wolbachia* souche wMel du supergroupe A est celui de la drosophile du genre *Drosophila melanogaster*. Ce petit génome d'environ 1,3 megabase (Mb) est riche en éléments génétiques mobiles tels que des insertions et des prophages (Kaur et al., 2021). Depuis la publication du premier génome de *Wolbachia* (souche wMel du supergroupe A) en 2004, le volume total de données génomiques disponibles pour ce symbiote a explosé parallèlement à l'avènement du séquençage de nouvelle génération, bien que le nombre de chromosomes complets (c'est-à-dire circulaires) pour différentes souches de *Wolbachia* reste très modeste, à environ 10 souches (Thomas 2016). Depuis lors, plus de 26 génomes complets de *Wolbachia* ont été séquencés et assemblés (Fauver et al. 2019). Il semble que le génome de *Wolbachia* soit plus petit chez les *Wolbachia* mutualistes des nématodes que chez les *Wolbachia* parasites des arthropodes, selon la souche (Thomas 2016). Le nombre de chromosomes circulaires assemblés atteint 1,48 mégabases. Grâce à l'analyse génétique, il a été possible de repérer 1205 gènes qui codent des protéines, 34 ARNt, 3 ARNr et 3 autres loci d'ARN non codant (Sinha et al. 2019).

Alignment of Wolbachia Assemblies

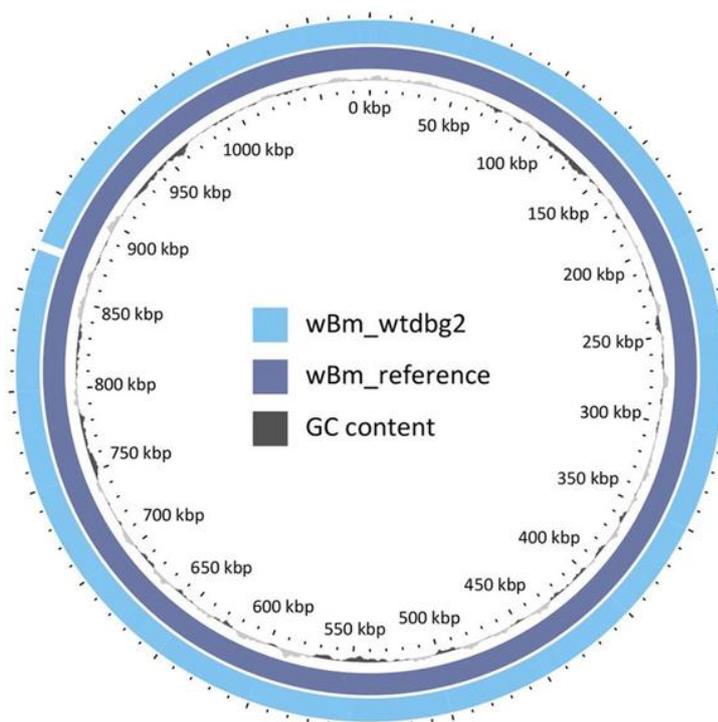


Figure 3 : Le génome de *Wolbachia* assemblé en un seul contig. La piste extérieure bleu clair représente l'assemblage de *Wolbachia* en utilisant uniquement les données ONT (Oxford Nanopore Technologies). La piste intérieure violet foncé représente le génome de référence de *Wolbachia*. Les pistes gris clair et gris foncé représentent respectivement le contenu AT et GC (Fauver et al. 2019).

I.1.5 Modes de transmission des *Wolbachia*

I.1.5.1 Transmission verticale

Le succès de *Wolbachia* repose sur la transmission verticale de la mère à la descendance (figure 4) par la lignée germinale femelle (Kaur et al., 2021 ; Thomas 2016). Toutefois, cette transmission n'est pas toujours impeccable et peut être influencée par divers éléments tels que La densité de *Wolbachia* (Kaur et al. 2021) ; la capacité de migration vers l'ovocyte et l'interaction avec d'autres symbiontes présents chez l'hôte.

I.1.5.2 Transmission horizontale

De nombreux transferts horizontaux de *Wolbachia* entre arthropodes et même entre arthropodes et nématodes sont suggérés par des analyses phylogéniques (Kaur et al., 2021 ; Thomas 2016). La transmission horizontale peut avoir lieu en laboratoire ou en milieu naturel grâce au cannibalisme et prédation d'individus infectés ; le parasitisme ; l'hybridation entre espèces et le partage de niches écologiques communes (figure 4).

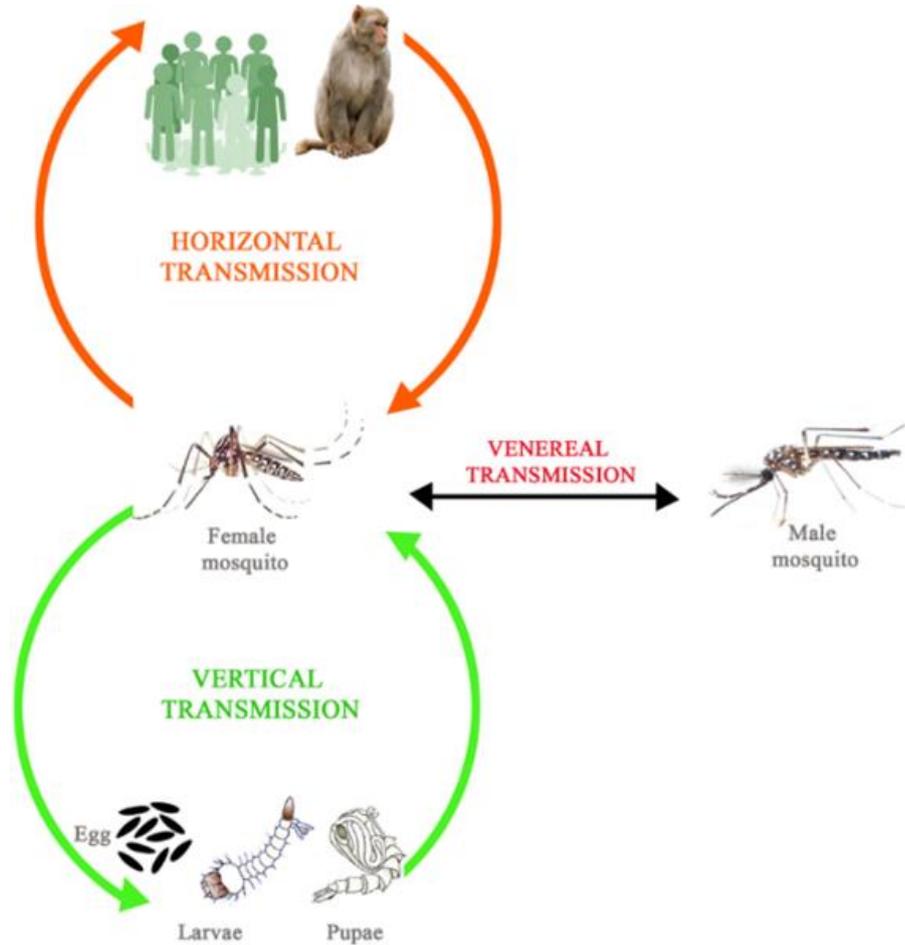


Figure 4: Les deux Modes la transmission de Wolbachia (Khadka S et al., 2020)

I.1.6 Mode de vie de Wolbachia

I.1.6.1 Le parasitisme chez les Arthropodes

Les *Wolbachia* sont fréquemment présentes dans les tissus reproducteurs des arthropodes, notamment chez les insectes, et peuvent causer différentes perturbations de la reproduction de leur hôte. Il peut s'agir de parthénogenèse (reproduction sans fécondation), de modification du ratio des sexes pour favoriser les femelles (thélygène), ou encore de stérilisation des mâles infectés, ce qui permet la propagation des *Wolbachia* dans la population d'hôtes. Ces processus illustrent le parasitisme reproducteur, où les *Wolbachia* altèrent la reproduction de l'hôte à leur profit afin d'accroître leur propre transmission (Fallon 2024 ; Kaur et al., 2021).

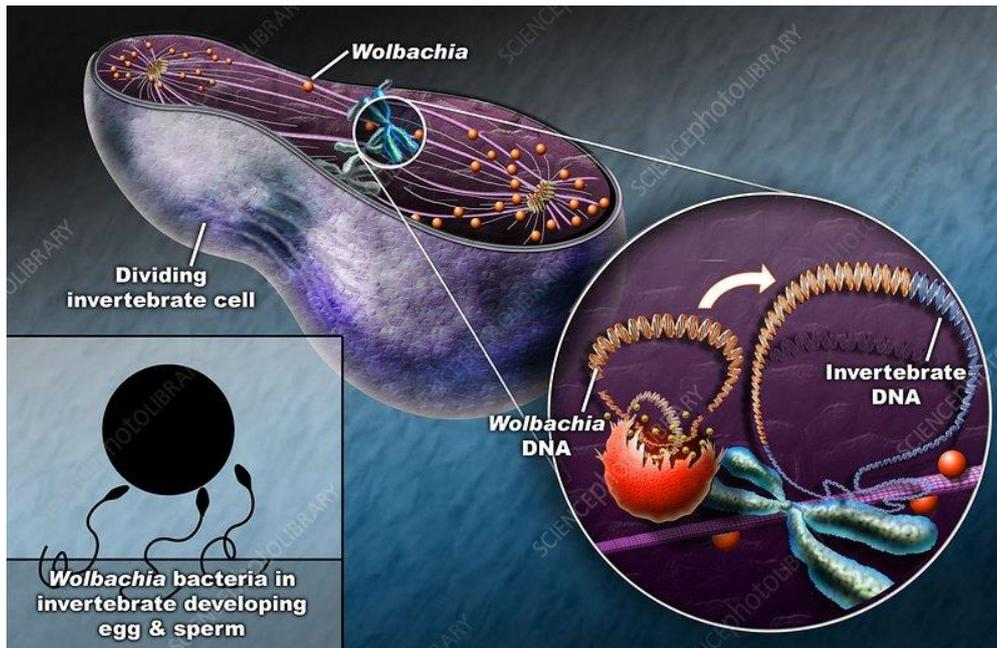


Figure 5: Incorporation du génome de Wolbachia dans le génome de l'hôte (Wolbachia bacterial parasite, artwork - Stock Image - C011/9353 - Science Photo Library) <https://www.sciencephoto.com/media/442704/view/wolbachia-bacterial-parasite-artwork>

I.1.6.2 Le mutualisme chez les Nématodes

Les *Wolbachia* apportent des nutriments ou des composés indispensables à la reproduction et au développement des nématodes. Les *Wolbachia* bénéficient en retour d'un environnement stable et de nutriments fournis par les nématodes, ce qui garantit la survie et la reproduction des bactéries. Les nématodes filariens dépendent des *Wolbachia* pour leur développement embryonnaire et leur survie à l'âge adulte (Kaur et al. 2021).

I.1.7 Effets de *Wolbachia* sur les arthropodes

I.1.7.1 Incompatibilité cytoplasmique (IC)

L'IC se produit lorsque les embryons nés de croisements entre un mâle infecté par *Wolbachia* et une femelle non infectée. Ces embryons ne se développent pas normalement et meurent. Chez les mâles de *Drosophila melanogaster* l'IC est due à deux gènes de *Wolbachia*, cifA et cifB, (Figure 6). Les anomalies chromosomiques sont causées par l'expression de ces gènes chez les embryons, mais l'expression de cifA par les femelles dans les œufs infectés peut neutraliser cet effet, ce qui permet au développement normal des embryons (Kaur et al., 2021).

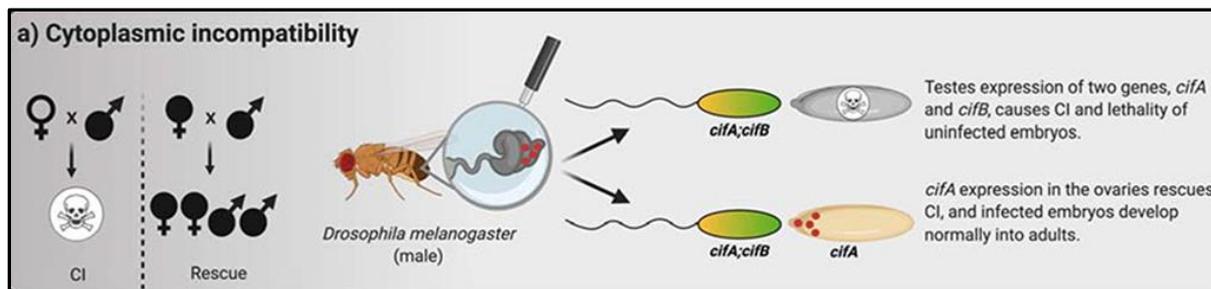


Figure 6 :L’Incompatibilité cytoplasmique chez *Drosophila melanogaster* (Kaur et al. 2021a)

I.1.7.2 La destruction des mâles

Le phénomène intéressant du "male killing" (MK) par *Wolbachia* consiste à tuer sélectivement les mâles infectés (Figure 7), ce qui entraîne des ratios sexuels déséquilibrés en faveur des femelles (Kaur et al., 2021 ; Thomas 2016). Ce parasite exploite le mécanisme de compensation des doses de l'hôte afin de s'attaquer aux embryons mâles en pleine croissance. À titre d'exemple, *Wolbachia* diminue l'expression du gène masculinisateur chez la pyrale *Ostrinia furnacalis*, ce qui entraîne une mortalité spécifique aux mâles. Le gène impliqué, *wmk*, est présent dans le prophage WO (virus bactériophages de *Wolbachia*) de *Wolbachia* et provoque des anomalies cytologiques typiques du MK. Les femelles profitent de cette stratégie en diminuant la concurrence entre les fratries et en leur offrant de la nourriture sous forme d'œufs contenant des embryons mâles morts (Kaur et al., 2021 ; Thomas 2016).

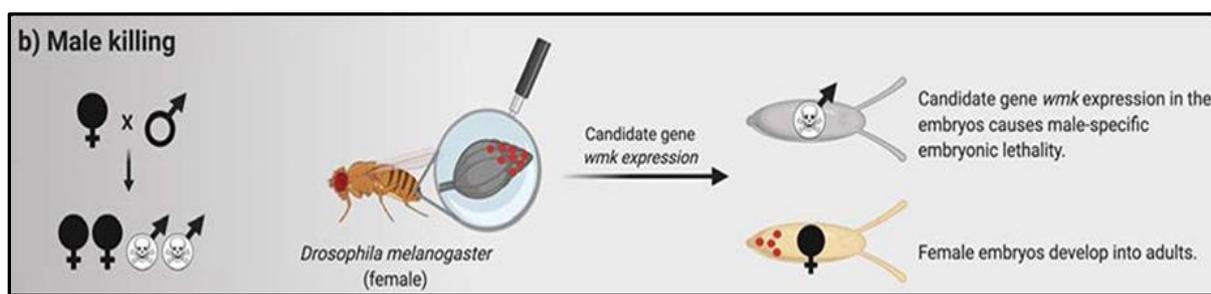


Figure 7 :le phénomène de la destruction des mâles. L'infection par *Wolbachia* chez *Hypolimnasbolina* provoque la mort des embryons mâles, ce qui donne des portées entièrement femelles (Kaur et al., 2021).

I.1.7.3 La parthénogenèse

Wolbachia peut provoquer la parthénogenèse femelle chez certains insectes comme les hyménoptères, les thysanoptères, les collemboles et les trombidiformes. La parthénogenèse, permet aux femelles de se développer à partir d'œufs non fécondés qui, normalement, donneraient naissance à des mâles (figure8). À travers ce processus, connu sous le nom de thélytokie, les femelles peuvent se reproduire sans avoir besoin de mâles, ce qui entraîne une descendance entièrement féminine (Thomas 2016).

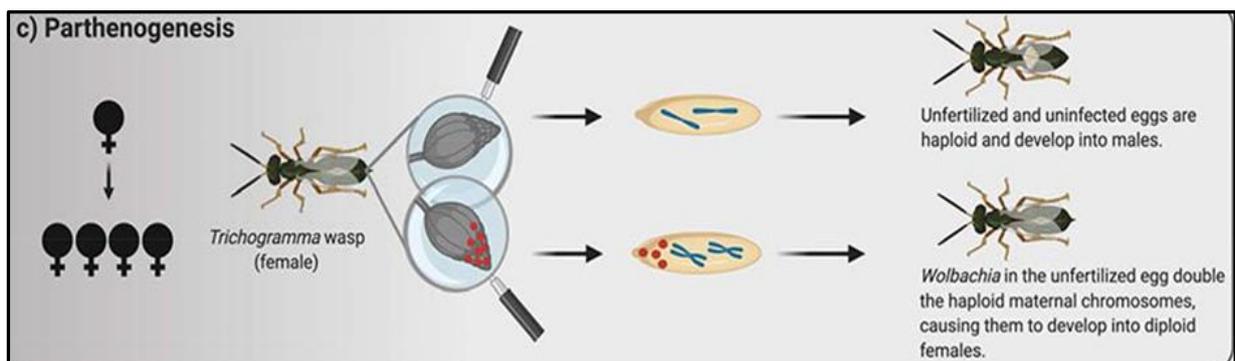


Figure 8: Dans la guêpe parasitaire *Leptopilina clavipes*, l'infection par *Wolbachia* est associée à la duplication des gamètes, ce qui permet la parthénogenèse (Kaur et al., 2021)

I.1.7.4 La féminisation

L'inhibition de la sécrétion de l'hormone androgène nécessaire à la différenciation sexuelle mâle est responsable de la féminisation des mâles génétiques par *Wolbachia* chez le cloporte *Armadillidium vulgare* (Figure 9). L'utilisation de cette manipulation génétique entraîne des ratios sexuels défavorables aux femelles, ce qui a un impact sur la structure démographique de la population. Ce processus pourrait être influencé par des gènes présents dans la région prophage de *Wolbachia*, mais le mécanisme moléculaire précis reste largement inconnu. Cependant, à l'échelle évolutive, *Wolbachia* a inséré un fragment de leur ADN appelé « élément f » dans le génome de l'hôte cloporte, ce qui a effectivement conduit à l'évolution d'un nouveau chromosome déterminant le sexe féminin (Kaur et al., 2021).

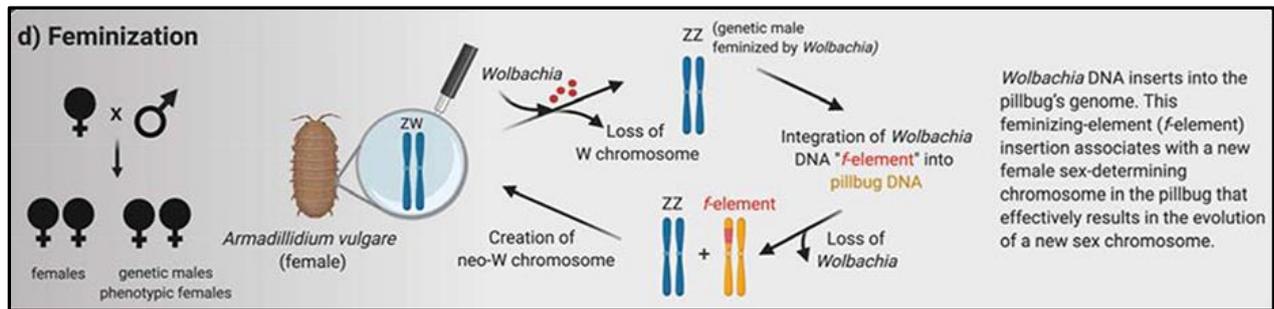


Figure 9: la parthénogenèse chez le cloporte *Armadillidium vulgare* : l'infection par *Wolbachia* convertit les mâles génétiques en femelles fonctionnelles, ce qui entraîne des ratios sexuels biaisés en faveur des femelles (Kaur et al. 2021).

I.1.8 Effet des facteurs environnementaux sur *Wolbachia*

Plusieurs facteurs environnementaux influencent l'interaction entre les moustiques et *Wolbachia*. Parmi ces facteurs, on peut citer:

I.1.8.1 La température

L'augmentation de la densité de *Wolbachia* est généralement favorisée par des températures plus élevées, ce qui accélère leur taux de réplication. Cependant, des températures extrêmes, qu'elles soient trop élevées ou trop basses, peuvent entraîner une diminution de la densité de *Wolbachia*. La variation de la densité de *Wolbachia* chez les moustiques peut avoir un impact sur la force de l'incompatibilité cytoplasmique, un mécanisme essentiel par lequel *Wolbachia* empêche la propagation des pathogènes (Padde et al. 2023).

I.1.8.2 Les facteurs liés à l'hôte

I.1.8.2.1 Impact du génotype du moustique

Les moustiques sont susceptibles de contracter l'infection par *Wolbachia* en fonction de leur génotype. Certains gènes particuliers, comme *wds* et *grk*, ainsi que des micro-ARN tels que *Aae-miR-12*, peuvent avoir un impact sur la croissance et la multiplication de *Wolbachia* chez les moustiques (Padde et al. 2023).

I.1.8.2.2 Rôle des voies de signalisation

La régulation de la densité de *Wolbachia* est essentiellement influencée par les voies de signalisation de l'insuline et aussi par les peptides de type insuline produits par les moustiques, qui régulent la production de monoxyde d'azote, ce qui restreint la prolifération des agents pathogènes (Padde et al., 2023). La densité de *Wolbachia* est influencée aussi par l'autophagie qui est un processus de dégradation cellulaire qui varie en fonction du sexe du moustique. En effet, chez les mâles, l'autophagie restreint la prolifération de *Wolbachia*, alors que chez les femelles, l'autophagie encourage l'augmentation des titres de *Wolbachia*.

I.1.9 Impact de *Wolbachia* sur les maladies vectorielles

L'utilisation de *Wolbachia* pour le contrôle des vecteurs de maladies représente une stratégie prometteuse et innovante, notamment dans la lutte contre les leishmanioses, le paludisme, la dengue, le Chikungunya, le Zika et Fièvre jaune (tableau 1). Des recherches ont démontré que la transmission du virus de la dengue entre les moustiques *Aedes aegypti* est diminuée de 66 à 75 % lorsqu'ils sont infectés par *Wolbachia* (Berube 2023). En Australie, en Colombie, au Brésil, au Vietnam et en Indonésie, des études ont démontré une diminution notable de la propagation de la dengue (Berube 2023). L'introduction de souches de *Wolbachia* incompatibles chez *Aedes polynesiensis* a permis de supprimer efficacement les populations de moustiques en Polynésie française, montrant ainsi son potentiel dans des environnements insulaires difficiles à contrôler. Chez *Aedes aegypti*, vecteur principal de la dengue, l'usage initial de la souche wMelPop a été efficace pour bloquer la transmission virale, bien que sa viabilité ait posé des défis (Thomas 2016). Des études ont aussi révélé que *Wolbachia* protège certains moustiques, comme *Culex* et *Aedes*, contre les nématodes et limite la transmission virale. Malgré ces succès, l'adoption à grande échelle pose des défis éthiques et écologiques nécessitant une évaluation minutieuse avant tout déploiement étendu (Berube 2023) ; (Yokomi N. Lozano-Sardanet 2023).

Tableau I : Association de Wolbachia et les différentes maladies à transmission vectorielle (LC : leishmaniose cutanée, LV : leishmaniose viscérale)

Genre/Souche	Maladie vectoriel	Agent pathogène	Vecteur	Symptômes clinique	Référence
<i>Wolbachia wWhi</i>	Leishmaniose	Parasite <i>Leishmania</i>	Phlébotomes	LC : La peau présente des lésions, des papules rouges. LV : une fatigue intense, une perte de poids, une augmentation de la taille de la rate et du foie, de la fièvre ainsi que des ganglions lymphatiques enflés.	(Yokomi N. Lozano-Sardanet 2023)
<i>Wolbachia wAlbB</i>	Paludisme	Parasite Plasmodium	Les moustiques Anophèles	La fièvre, les maux de tête, les frissons, les douleurs musculaires et les vomissements.	(Ross et Hoffmann 2021b) (Julien 2020)
<i>Wolbachia wMelPop</i> <i>Wolbachia wStri</i> <i>Wolbachia wAlbB</i>	Chikungunya	Virus Chikungunya	Les Moustiques <i>Ae. aegypti</i> et <i>Ae. albopictus</i>	Crampes aux articulations, douleurs musculaires, fièvre élevée, tête lourde, fatigue, nausées, éruptions cutanées.	(Caragata et al. 2021) (Julien 2020) (Schultz et al.2018)
<i>Wolbachia wMelPop</i> <i>Wolbachia wStri</i> <i>Wolbachia wAlbB</i>	Dengue	Virus Dengue	Les Moustiques <i>Ae. aegypti</i> et <i>Ae. albopictus</i>	Fièvre élevée (40°), une forte douleur à la tête accompagnée de douleur rétro orbitaire (derrière les yeux), des vomissements, douleurs dans les muscles et les articulations, éruptions cutanées.	(Huang et al. 2020) (Julien 2020) (Schultz et al.2018)
<i>Wolbachia wMel</i> <i>Wolbachia wStri</i>	ZIKA	Virus ZIKA	Les Moustiques <i>Ae. aegypti</i>	Fièvre, courbatures, maux de tête, conjonctivites et douleur oculaire, douleur musculaire et articulaire.	(Berube 2023) (Julien 2020) (Schultz et al.2018)
<i>Wolbachia wMelPop</i> <i>Wolbachia wStri</i>	Fièvre jaune	Virus Fièvre jaune	Les Moustiques <i>Ae. Aegypti</i>	Fièvre, frissons, douleurs dans les muscles, maux de tête, perte d'appétit et nausées.	(Caragata et al. 2021) (Julien 2020) (Schultz et al.2018)

I.2 Apport de la biologie moléculaire dans l'étude de la bactérie *Wolbachia* et la biologie moléculaire

La détection de *Wolbachia* dans les insectes, repose sur diverses techniques moléculaires avancées qui permettent non seulement d'identifier la présence de cette bactérie endosymbiotique mais aussi d'analyser sa diversité génétique (Fallon 2024b). Parmi ces techniques :

I.2.1 La PCR Réaction de Polymérisation en Chaîne

Cette technique permet d'amplifier rapidement et efficacement des fragments spécifiques d'ADN à partir de quantités minimales de matériel génétique initial. Initialement développée pour la recherche et des applications diagnostiques restreintes, la PCR pourrait être adaptée pour des utilisations diagnostiques à grande échelle en raison de sa haute sensibilité et spécificité (Paskewitz et Collins 1990). Pour *Wolbachia*, la diversité génétique a été initialement étudiée en utilisant les gènes de l'ARNr 16S et de la protéine de surface Wsp (tableau 2). Cependant, en raison de la lente évolution de l'ARNr 16S et de la recombinaison fréquente de Wsp, la résolution précise des phylogénies et des souches de *Wolbachia* a été difficile. Pour surmonter ces défis, un système de typage multilocus (MLST) (tableaux 02) a été établi, utilisant plusieurs gènes conservés pour classer *Wolbachia* en 17 supergroupes phylogénétiques, principalement représentés par les supergroupes A et B. Les avancées récentes dans les techniques d'enrichissement ciblé et de typage du génome entier avec des loci MLST améliorés ont permis une exploration approfondie et une classification phylogénétique précise de la diversité génomique de *Wolbachia* à travers diverses espèces d'arthropodes (Kaur et al. 2021b).

Le MLST est une méthode de typage moléculaire qui utilise la séquence de plusieurs gènes conservés (typiquement cinq pour *Wolbachia*) pour identifier et comparer les souches bactériennes (Fallon 2024b).

Tableau II: Certains amorces utilisées pour la détection de *Wolbachia* par PCR

Amorce	Séquence	Taille	Référence
Wsp	691R – AAAAATTAACGCTACTCCA	610	(Zhou, Rousset, et O’Neill 1998)
	81F -TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAA		
gatB	R1 : TGGYAAAYTCRGGYAAAGATGA	471	(Baldo et al. 2006) ;
	F1 : GAKTTAAAYCGYGCAGGBGTT		
coxA	CoxA_F1 : TTGGRGCRATYAACTTTATAG	487	(Baldo et al. 2006)
	CoxA_R1 : CTAAAGACTTTKACRCCAGT		
hcpA	F1 : GAAATARCAGTTGCTGCAAA	515	(Baldo et al. 2006)
	R1 : GAAAGTYRAGCAAGYTCTG		
ftsZ	F1 : ATYATGGARCATATAAARGATAG	524	(Baldo et al. 2006)
	R1 : TCRAGYAATGGATTRGATAT		
fbpA	F1 : GCTGCTCCRCTTGGYWTGAT	509	(Baldo et al. 2006)
	R1 : CCRCCAGARAAAAYYACTATTC		

I.2.2 La PCR quantitative (qPCR)

La qPCR est une extension de la PCR qui permet une quantification précise de l'ADN de *Wolbachia* dans les échantillons. Elle utilise des sondes fluorescentes ou des colorants tels que le SYBR Green pour détecter et quantifier l'amplification de l'ADN spécifique de *Wolbachia* en temps réel. Cette méthode est particulièrement utile pour évaluer la prévalence et la densité des souches de *Wolbachia* dans des populations naturelles d'insectes (Fallon 2024b).

I.2.3 Séquençage de génome entier

Le séquençage de l'ADN est une méthode cruciale pour déterminer l'ordre précis des bases nucléotidiques (A, C, G, T) dans une séquence d'ADN, offrant ainsi une compréhension approfondie de la génétique et des applications médicales telles que le diagnostic, les études génétiques et la recherche pharmaceutique. Pour *Wolbachia*, le séquençage du génome entier à partir d'échantillons d'insectes utilise des kits de préparation de bibliothèques et des plateformes comme Illumina pour assembler et comparer les génomes, permettant ainsi de mieux comprendre sa diversité génomique (Fallon, 2024).

I.2.4 Hybridation in situ fluorescente (FISH)

La FISH est une technique d'imagerie utilisée pour visualiser la localisation et la distribution spatiale de *Wolbachia* dans les tissus d'insectes. Elle utilise des sondes fluorescentes spécifiques conçues pour se lier aux séquences d'ARN ou d'ADN de *Wolbachia*. Cette méthode est

particulièrement utile pour étudier l'interaction entre *Wolbachia* et son hôte, ainsi que pour confirmer sa présence dans des échantillons anatomiques complexes (Fallon 2024b).

Chapitre II : Matériel et méthodes

En raison du poids des maladies à transmission vectorielles bactériennes, virales et surtout parasitaires sur la santé humaine, nous nous sommes intéressés au cours de cette étude à la détection de l'infection à *Wolbachia* chez trois (03) insectes largement distribués en Algérie et impliqués dans des maladies qui présentent un vrai problème de santé publique.

Notre étude préliminaire s'est déroulée de mars à juin au Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et génétique des Populations (LEEPGP) de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA).

II .1 Matériel non biologique (annexes)

Tout le matériel non biologique utilisé pendant notre étude est présenté en Annexe 1.

II .2 Matériel biologique

Les spécimens étudiés ont été capturés par les entomologistes de l'équipe du laboratoire du les spécimens étaient conservés dans de l'alcool 70% à -20°C. Les captures ont été réalisées par les techniques de piégeage en utilisant les pièges huilés et les pièges lumineux CDC (Benikhlef et al. 2021) pendant des périodes d'activités des insectes. Cent cinquante-six (156) Phlébotomes dont 40 de Batna, 44 de M'sila et 72 spécimens de Tébessa ; et trois cent vingt-sept (327) de moustiques dont 179 *Culex* et 148 *Aedes* ont été sélectionnés.

II .3 Méthode

II.3.1 Les zones de l'étude

Les insectes traités dans cette étude, provenaient de quatre différentes régions de l'Algérie : Batna, M'sila, Tébessa et Alger (figure 10). Les spécimens de *Phlebotome. Sp* provenaient de Batna, M'sila et Tébessa, alors que les spécimens de *Culex Sp* et *Aedes Sp* provenaient du centre d'Alger.

- Batna, une ville située dans la région des Hauts Plateaux de l'Algérie, au nord-est du pays, se caractérise par un climat semi-aride. Les coordonnées approximatives de Batna sont 35.55° N, 6.17° E. Cette région connaît des hivers froids et des étés chauds, avec des précipitations annuelles totalisant environ 305 millimètres. Les températures varient significativement, atteignant jusqu'à 38°C pendant l'été et pouvant descendre jusqu'à -10°C en hiver (Relevés Météo En Temps Réel À Batna - Algérie | Real-time Weather Records In Batna - Infoclimat, s. d.).
- M'sila est située dans le centre-nord de l'Algérie, au sud-est du massif de l'Atlas tellien, avec des coordonnées approximatives de 35.7075° N, 4.5436° E. Le climat à M'sila se caractérise par des étés extrêmement chauds, où les températures peuvent atteindre jusqu'à 40°C. En revanche, les hivers sont plus doux, avec des températures variantes généralement entre 5°C et 10°C. L'humidité reste relativement faible tout au long de l'année. La pluviométrie

annuelle moyenne à M'sila est d'environ 148.1 mm. (Relevés Météo En Temps Réel À M'sila - Algérie - Infoclimat, s. d.).

- Tébéssa est située dans l'extrême est de l'Algérie, près des frontières avec la Tunisie, avec des coordonnées approximatives de 35.41° N, 8.12° E. Le climat de Tébéssa est de type semi-aride, caractérisé par des hivers froids et des étés chauds et secs. Les précipitations sont modérées mais souvent irrégulières, concentrées principalement en hiver. La température moyenne annuelle varie considérablement, atteignant jusqu'à 40°C en été et pouvant descendre jusqu'à -5°C en hiver. En moyenne, Tébéssa reçoit environ 371 mm de précipitations par an (Relevés Météo En Temps Réel À Tebessa - Algérie - Infoclimat, s. d.).
- Alger est située dans le Tell, au nord de l'Algérie, avec un climat méditerranéen tempéré composé d'été chaud et sec et d'hivers doux et pluvieux, parfois enneigés. Avec une superficie de 1 190 km², la wilaya d'Alger est située à 36,77° N et 3,10° E. Les températures annuelles moyennes s'élèvent à 16°C à 22°C et les précipitations annuelles sont d'environ 600 mm, principalement concentrées en automne et hiver. Les vents forts, tels que le sirocco en été, affectent également la région (Relevés Météo En Temps Réel À Alger - Algérie - Infoclimat, s. d.).

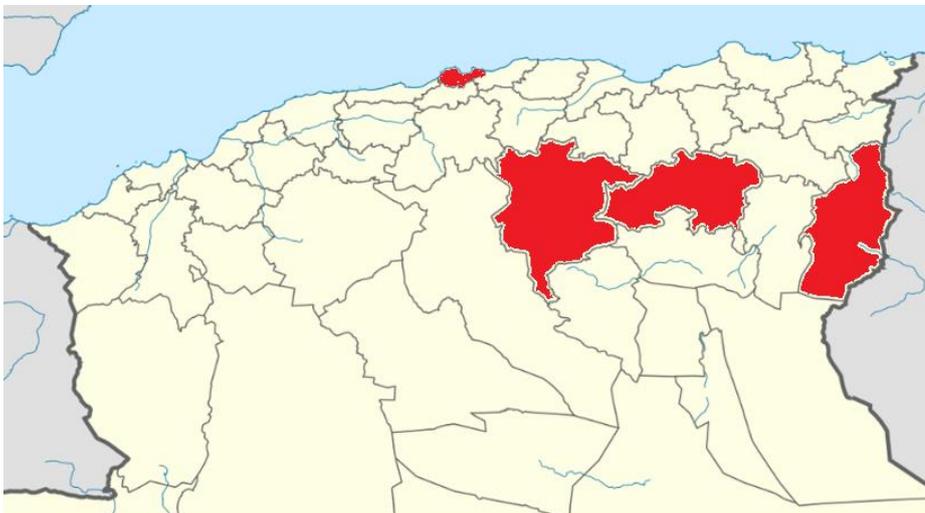


Figure 10: Situation géographique des quatre wilayas de l'étude

II.3.2 Etude morphologique

II.3.2.1 Traitement et identification des phlébotomes

II.3.2.1.1 Traitement des phlébotomes

Chaque spécimen a subi trois (03) bains successifs dans trois différentes coupelles. Un bain dans du phénol 70%, et 2 bains d'eau distillée stérile (figure 11). La tête et le génitalia des spécimens ont été coupés et montés sur une lame porte objet dans une goutte de polyvényl alcool (PVA), alors que le reste du corps du phlébotome a été conservés à -20°C pour la détection de l'infection à *Wolbachia*.

II.3.2.1.2 Identification des phlébotomes

L'identification morphologique du sexe des phlébotomes a été réalisé par observation de l'appareil génital qui est externe chez les mâles et les spermathèques internes chez les femelles. L'identification morphologique des espèces nécessite l'utilisation des clés dichotomiques d'Abonnenc (1972). Dans notre étude l'identification morphologique des phlébotomes femelles a été réalisée par les entomologistes du LEEPGP dans le cadre de leurs activités et donc cette partie n'est pas exploité dans ce mémoire.

II.3.2.2 Traitement et identification des Moustiques

II. 3.2.2.1 Traitement des Moustiques

Les moustiques ont été traités de la même manière que les phlébotomes. Cependant le corps entier de chaque spécimen a été utilisé pour l'identification morphologique, puis dans l'étude moléculaire (figure 11).

II.3.2.2.2 Identification des Moustiques

L'identification morphologique du sexe des moustiques a été effectuée sous une loupe binoculaire en se basant sur les antennes, qui présentent plusieurs flagellomères chez les mâles et moins de flagellomères chez les femelles. L'identification morphologique des espèces a été réalisées à l'aide d'un logiciel spécialisé pour les moustiques d'Europe (IRD édition). Il est à noter que les espèces de *Aedes albopictus* à vue d'œil sont caractérisés par des rayures blanches et noires sur leur corps et leurs pattes, alors que espèces de *Culex pipiens* possèdent une coloration brunâtre uniforme sans rayures distinctives.

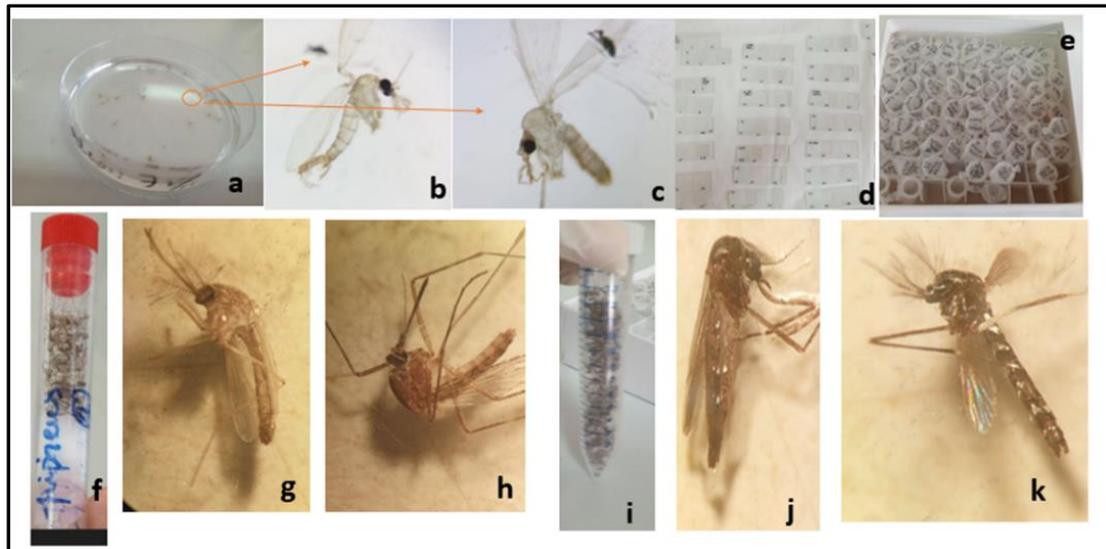


Figure 11: Schéma récapitulatif des différentes étapes de traitement et identification des insectes de l'étude (original): ((a) Phlébotomes conservés dans de l'alcool, (b) Phlébotome mâle, (c) Phlébotome femelle, (d) La tête et l'appareil génital sont montés sur d des lames pour l'identification morphologique, (e) Le thorax et l'abdomen sont conservés dans des tubes eppendorf pour l'étude moléculaire, (f) Culex pipiens conservés dans un tube, (g) Culex pipiens male, (h) Culex pipiens femelle, (i) Aedes albopictus conservés dans un tube, (j) Aedes albopictus femelle, (k) Aedes albopictus male.(photon original)

II.4 Etude moléculaire

II.4.1 Extraction d'ADN

Les spécimens d'insectes total (moustiques) ou partielles (phlébotomes) ont été utilisés pour extraire de l'acide désoxyribonucléique (ADN) à partir des cellules et des tissus (figure 12).



Figure 12:Extraction de l'ADN sous hotte chimique (photo original).

La méthode d'extraction d'ADN par la méthode de Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) a été utilisée selon le protocole établis par l'équipe du LEEPGP. Plusieurs étapes ont été effectuées :

II.4.1.1 La lyse

La lyse cellulaire est un processus qui consiste à rompre les membranes cellulaires pour libérer le contenu cellulaire, y compris l'ADN, les protéines et les lipides.

- Nous avons extrait l'ADN des spécimens de l'étude en réalisant les étapes suivantes :
- Broyer chaque échantillon dans 200 μ L de CTAB/Béta-mercaptoethanol 2%.
- Mettre au bain sec à 65° C pendant une nuit.
- Ajouter 200 μ L de chloroforme. Mélanger par inversion.
- Centrifuger 5 minutes à 12000 tours/minutes.
- Prélever la phase supérieure (le surnageant) et la mettre dans un nouveau tube stérile.

II.4.1.2 La purification

Une fois la lyse cellulaire terminée, il est essentiel de procéder à la purification de l'ADN, afin de séparer l'ADN des autres éléments cellulaires. Les étapes de la purification sont les suivantes :

- Ajouter 200 μ L d'Isopropanol (froid). Bien mélange par inversion.
- Centrifuger 15 minutes à 12000 tours/minutes.
- Vider l'Isopropanol, bien égoutter puis ajouter 200 μ L d'Ethanol absolue (froid).
- Centrifuger 5 minutes à 12000 tours/minutes.
- Vider l'Ethanol.
- Sécher le culot pendant une nuit.

II.4.1.3 L'éluion

- Ajouter 25 μ L du tampon Tris-EDTA.

II.4.2 Dosage de l'ADN

Après avoir extrait l'ADN, évaluer sa qualité et sa quantité est crucial. Dans notre étude, nous avons utilisé le Nanodrop pour mesurer ces paramètres.

II.4.2.1. Principe

La spectrophotométrie NanoDrop repose sur la capacité de mesurer l'absorbance de la lumière par des acides nucléiques, tels que l'ADN et l'ARN. Ce dispositif utilise une microcellule qui permet de mesurer des volumes d'échantillon extrêmement réduits, typiquement entre 0,5 et 2 μ L. L'échantillon est déposé sur une fenêtre optique très fine où la lumière UV est absorbée à une longueur d'onde principale de 260 nm, spécifique aux acides nucléiques. En fonction de

l'absorbance mesurée, le NanoDrop utilise une formule intégrée pour calculer la concentration d'ADN ou d'ARN dans l'échantillon, exprimée en ng/ μ L ou pmol/ μ L. Les ratios entre ces absorbances, comme le ratio 260/280 nm, sont utilisés pour déterminer la présence de contaminants tels que les protéines, et le ratio 260/230 nm, sont utilisés pour déterminer la présence de contaminant comme le phénol (García-Alegría et al. 2020).

II.4.2.2 Méthodologie

2 μ L d'ADN extrait sont déposés directement sur la surface optique du NanoDrop (figure 13). Le logiciel intégré calcule automatiquement la concentration d'ADN dans l'échantillon en fonction de l'absorbance mesurée. Cette concentration est exprimée en nanogramme par microlitre (ng/ μ L). Cet appareil, nous a permis aussi d'évaluer la qualité et la pureté de nos échantillons en mesurant également l'absorbance à d'autres longueurs d'onde, comme 280 nm et 230 nm.

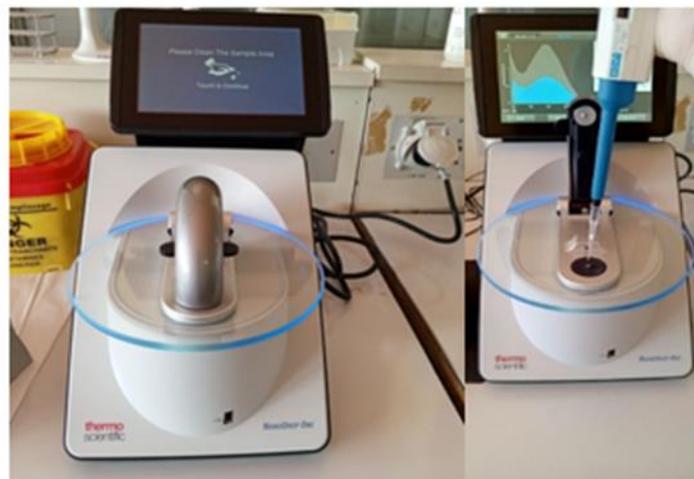


Figure 13: Dosage des extraits d'ADN par le Nanodrop (photo original)

II.4.3 Amplification par PCR « polymerase chain reaction »

II.4.3.1 Principe

La PCR (Polymerase Chain Reaction), mise au point par Mullis et Faloona en 1985 et publiée en 1987, est une technique d'amplification *in vitro* qui permet de générer une quantité significative d'une région spécifique d'acide nucléique. Elle utilise une série de réactions en boucle pour amplifier une matrice d'ADN double brin de manière répétée. Cette méthode est essentielle en biologie moléculaire car elle permet de détecter et d'étudier des séquences d'ADN ou d'ARN avec une grande précision, ouvrant la voie à une multitude d'applications dans la recherche fondamentale, le diagnostic médical, et d'autres domaines scientifiques et cliniques.

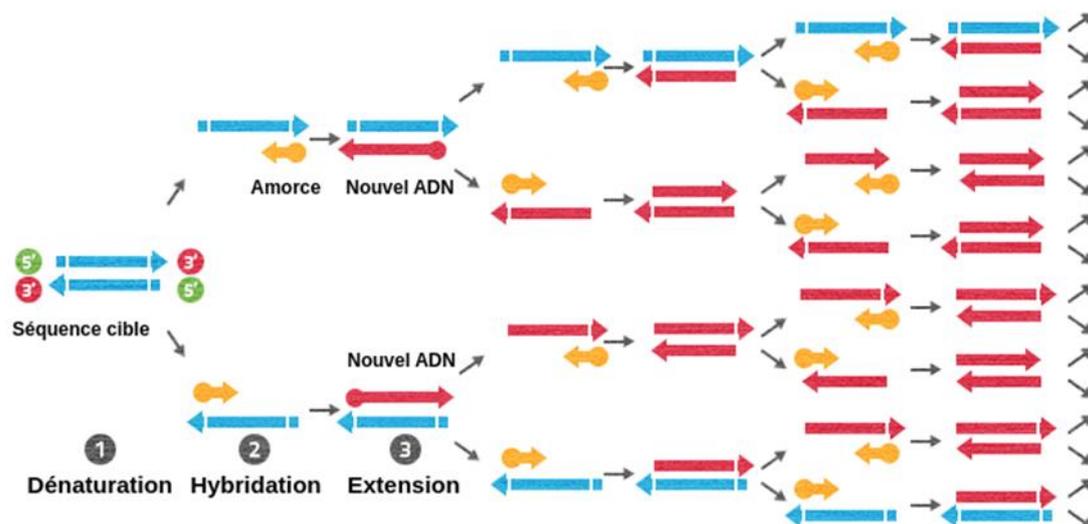


Figure 14: les différentes étapes de PCR (<https://theory.labster.com/fr/pcr-amplification>).

II.4.1.2 Méthodologie

L'amplification de la région Wsp (protéine de surface) a été réalisée en utilisant l'amorce du gène Wsp (Tableau 3).

Tableau III: Caractéristique du Gène Wsp pour la détection de *Wolbachia*

Amorce utilisée pour la technique PCR					
Organisme ciblé	Séquence ciblée	Nom de l'amorce	Séquence	Taille pb	Référence
<i>Wolbachia</i>	Wsp protéine de surface	81F	(5' TGG TCC AAT AAG TGATGA AGA AAC 3')	variant de 590 à 632 pb	(Yokomi N. Lozano-Sardanet, 2023)
		691R	(5' AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA3')		

Les PCR ont été effectuées selon le protocole de Yokomi et al (2023) avec quelques modifications (figure 15). Les réactions d'amplification ont été effectuées dans un volume de 20µl. Le mélange réactionnel a été composé de 2 µl d'ADN extrait, de 25mM de MgCl₂, 20µM de chaque amorce, 10mM de dNTP et 2U de Taq polymérase. Des témoins positif et négatif ont été utilisés dans chaque réaction de PCR-Wsp. Les conditions d'amplification étaient les suivantes : dénaturation à 95°C 5 minutes, 35 cycles de dénaturation à 94°C 1 minute,

hybridation à 55°C 1 minute, extension à 72°C 1 minute, suivies d'une extension finale à 72°C 8 minutes.



Figure 15: Les conditions d'amplification (photo originale)

II.4.4 Électrophorèse sur gel d'agarose

II.4.4.1 Principe de l'électrophorèse

L'électrophorèse sur gel d'agarose sépare les molécules en fonction de leur taille et de leur charge, grâce à la migration différentielle à travers le gel sous l'effet d'un champ électrique

III.4.4.1.1 Méthodologie

Les produits PCR-Wsp ont été séparés en fonction de leur taille sur un gel d'agarose 1% (figure 16), selon les étapes suivantes :

- **Préparation du gel d'agarose**
 - Peser 1g d'agarose et le mettre dans 100ml de TBE 1X (Tris Borate EDTA)
 - Chauffer le mélange au micro-onde jusqu'à l'obtention d'un liquide limpide.
 - Refroidir sous l'eau courante puis ajouter 6 µl de BET.
 - Couler le gel dans la cuve après avoir positionner le peigne.
 - Une fois que le gel a polymérisé, retirez soigneusement le peigne et placez le gel dans la cuve d'électrophorèse préalablement remplie avec du tampon TBE 1X.
- **Migration**

- Déposer 5 μL du produit PCR dans les puits du gel en mélangeant avec 3 μL de tampon de charge. Le dernier puit est destiné au marqueur de poids moléculaire.
- Mettre les produits PCR dans les puits du gel et faire migrer sous une tension appropriée (90V).
- Couper l'alimentation quand le colorant du bleu de migration (bleu de charge) arrive à proximité du bord du gel
- **Visualisation**
 - La lecture du gel se fait par l'utilisation d'un Trans-illuminateur sous ultra-violet (UV) dans une chambre noire.

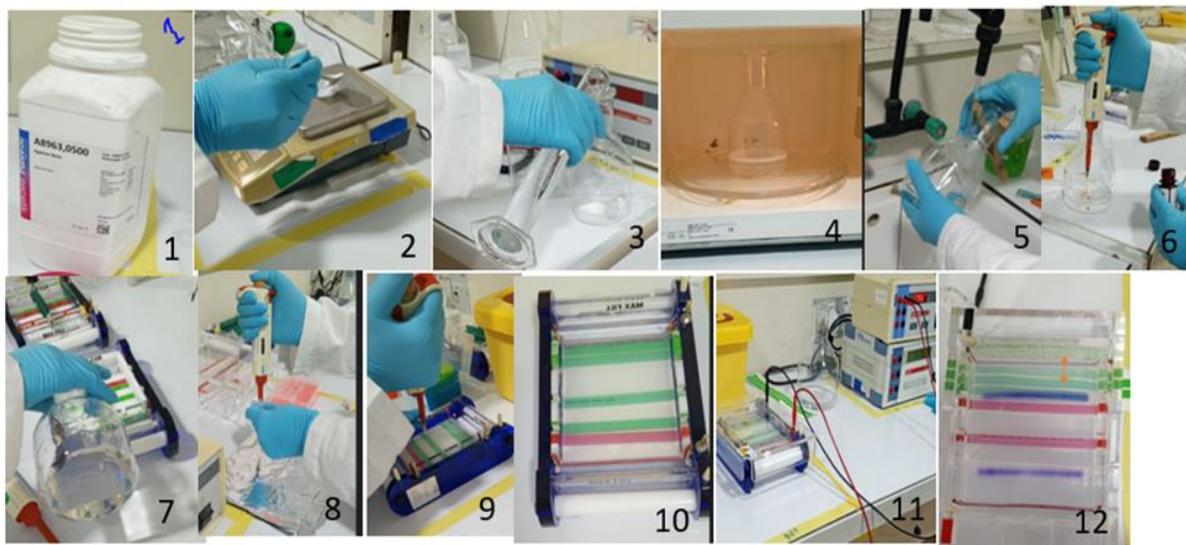


Figure 16: Les étapes de l'électrophorèse sur gel d'agarose (photon original)

II.4.5 Séquençage

II.4.5.1 Principe

Le séquençage de Sanger, développé par Frederick Sanger en 1977, est une méthode fondamentale de détermination de la séquence d'ADN, utilisant des didésoxynucléotides (ddNTPs) pour interrompre sélectivement la synthèse d'ADN in vitro. Chaque réaction de séquençage contient les quatre désoxynucléotides normaux (dNTPs) et une petite quantité de ddNTPs spécifiques à chaque base. L'incorporation aléatoire de ddNTPs par une ADN polymérase provoque l'arrêt de la réaction à des positions spécifiques, produisant une série de fragments d'ADN de différentes longueurs. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel et détectés par fluorescence ou radioactivité, permettant de déterminer la séquence exacte de l'ADN original. Le séquençage de Sanger a été crucial pour des avancées majeures en génétique et en biologie moléculaire, notamment dans le décryptage du génome humain et l'identification de mutations génétiques. Son importance continue dans la recherche

scientifique est attestée par son utilisation fréquente dans les laboratoires pour le séquençage de segments d'ADN spécifiques et l'analyse des variations génétiques.(Sanger, Nicklen, et Coulson 1977)

II.4.5.2 Méthodologie

Le séquençage que nous avons réalisé dans cette étude a été fait in Silico qui est une méthode de séquençage qui permet d'étudier des séquences publiées dans les bases de données comme le NCBI, sans aucune manipulation directe de l'ADN.

Dans la base de données NCBI, on a sélectionné quelques séquences de gène de notre étude de *Wolbachia* chez les trois (3) espèces d'insectes étudiés : *Phlebotomus papatasi*, *Culex pipiens* et *Aedes albopictus* (Tableau 4). Les séquences ont été téléchargées sous format FASTA, puis traitées et analysées en utilisant le logiciel MEGA (MEGA Software).

Tableau IV:Code des séquences Wsp de quelques phlébotomes et moustiques récupérées de NCBI.

Code	Origine géographique	Espèce d'insecte
KM401557.1	Mazandaran (Iran)	Culex pipiens .
MW718104.1	Chine	Culex. pipiens
MH777436.1	Singapour	Culex. pipiens
MW718066.1	Chine	Culex. pipiens
MW718065.1	Chine	Culex. pipiens
MW718070.1	Chine	Culex. pipiens
MW125595.1	Californie(États-Unis)	Culex. pipiens
KU738383.1	Chine	Aedes . albopictus
MW718098.1	Chine	Aedes . albopictus
KY523667.1	Sri Lanka	Aedes . albopictus
KX263915.1	Iran	Phlébotomus. papatasi
AY288297.1	Égypte	Phlébotomus. papatasi
JN315984.1	Maroc	Phlébotomus. papatasi
AF020082.1	Tunisie	Phlébotomus. papatasi
DQ402519.1	Marseille (France)	Phlébotomus. perniciosus
JN315985.1	Maroc	Phlébotomus. longicuspis
DQ402521.1	France	<i>Sergentmoyia.minuta</i> Marseille
MN968748.1	Acari : Ixodidae	Tiques.Rhipicephalus sanguineus

II.5 Analyse statistique

A la fin de notre stage pratique, nous avons enregistré et groupé les données des résultats sur une base de données Excel puis nous les avons traités par le logiciel Graph PAd Prism 8.

Les moyennes des différents groupes ont été représentées par la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne ($X \pm \text{ESM}$). Le test t appariés de Student pour comparer les groupes dont les distributions qui sont homogénéisées et le test de Tukey ANOVA one way est utilisé pour comparer les groupes de distributions homogènes.

Nos résultats sont exprimés par la moyenne X , affectée de l'erreur standard à la moyenne (SEM), le test du Khi deux est utilisé pour comparer les données qualitatives

Chapitre III : Résultats

III.1 Distribution des insectes de l'étude

III.1.1 Répartition des insectes de l'étude selon la zone

Au total 483 insectes ont été sélectionnés pour l'identification morphologique des spécimens et la détection moléculaire de *Wolbachia* chez ces insectes. Les spécimens appartenaient à la famille des *phlebotominae* (156) et la famille des *culicidae* (327). Les phlébotomes ont été capturés à l'est du pays (40 spécimens de Batna, 44 de M'sila et 72 de Tébessa), alors que les moustiques (179 *Culex* et 148 *Aedes*) étaient capturés au nord d'Alger. La répartition des insectes étudiés est illustrée dans la figure 17.

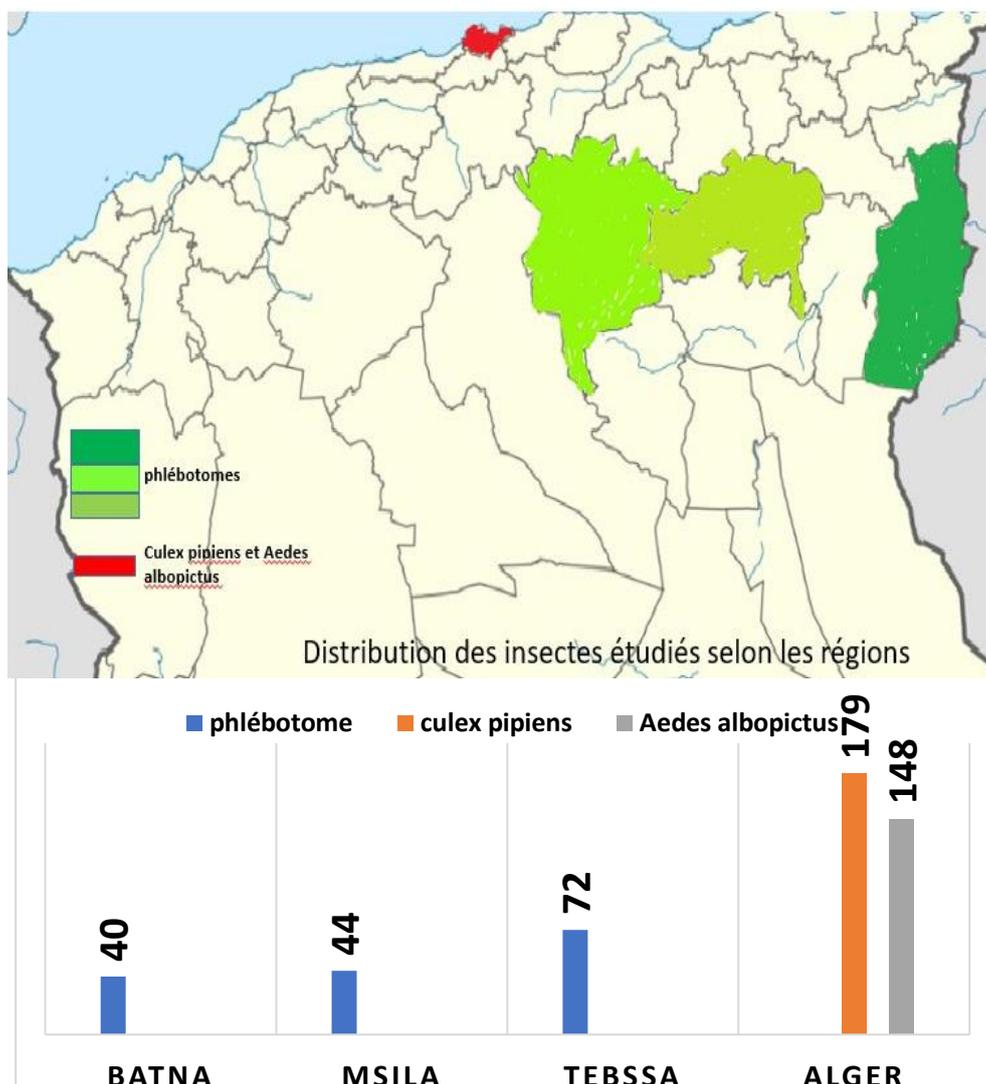


Figure 17: Distribution des insectes étudiés selon les régions

III.1.2 Répartition des insectes de l'étude selon le sexe

304 spécimens mâles et 179 spécimens femelles ont fait l'objet de cette étude (figure 18). Pour les phlébotomes, 60 spécimens mâles et 96 spécimens femelles ont été identifiés sur la base de

leurs appareil génital. Pour les Culex et Aedes, 138 mâles et 41 femelles, et 106 mâles et 42 femelles ont été sélectionnés respectivement sur la base de leurs antennes.



Figure 18: Distinction des insectes selon le sexe. (a) phlébotome mâle, (b) phlébotome femelle, (c) Culex mâle, (d) Culex femelle, (e) Aedes mâle, (f) Aedes femelle

La distribution des insectes selon le sexe dans chaque wilaya est illustrée dans les figures 19a, 19b

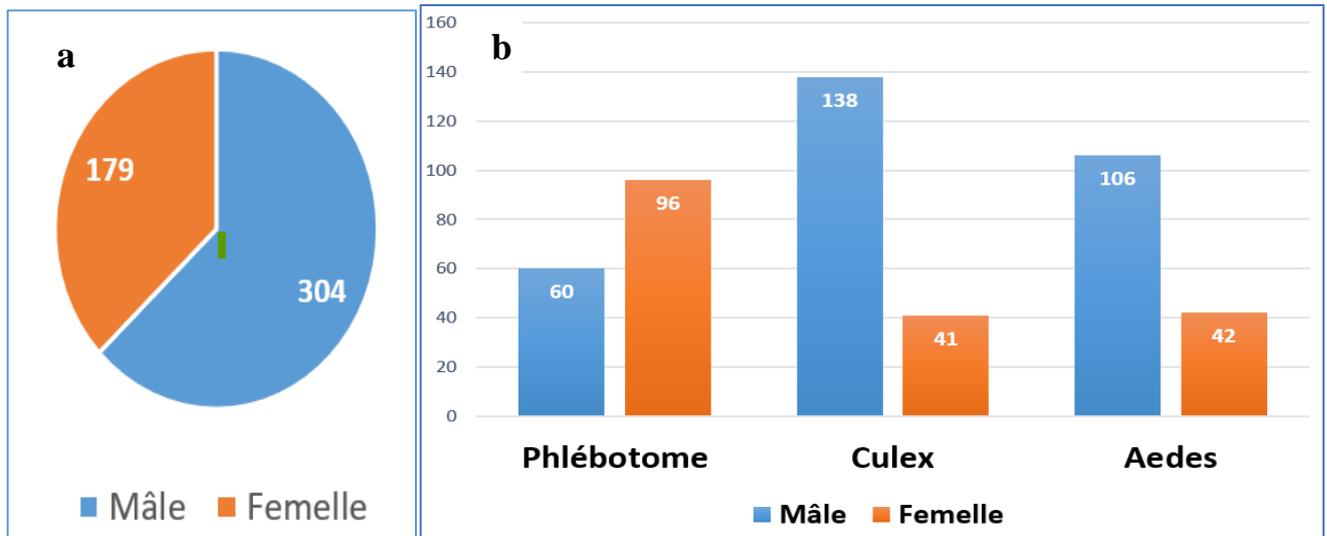


Figure 19:(a) distribution du total des insectes étudiés selon le sexe, (b) distribution des différents insectes selon le sexe.

III.2 Identification morphologique des insectes

III.2.1 Identification morphologique des phlébotomes

Seuls les spécimens mâles ont été identifiés morphologiquement (les femelles ont été conservé à -20°C pour l'étude moléculaire). Sur la base de l'armature cibariale et pharyngiennes 57 spécimens mâles ont été identifié par les entomologistes de l'IPA (3 spécimens mâles n'ont pas été identifiés à cause de l'absence de l'appareil génital). Quatre (04) espèces ont été identifiés : *Phlebotomus (Ph.) perniciosus* et *Ph. longicuspis* appartenant au sous genre *Larroussius*, *Ph. papatasi* du sous genre *Phlebotomus* et *S. minuta* du sous genre *Sergentmoyia* (figure 20).

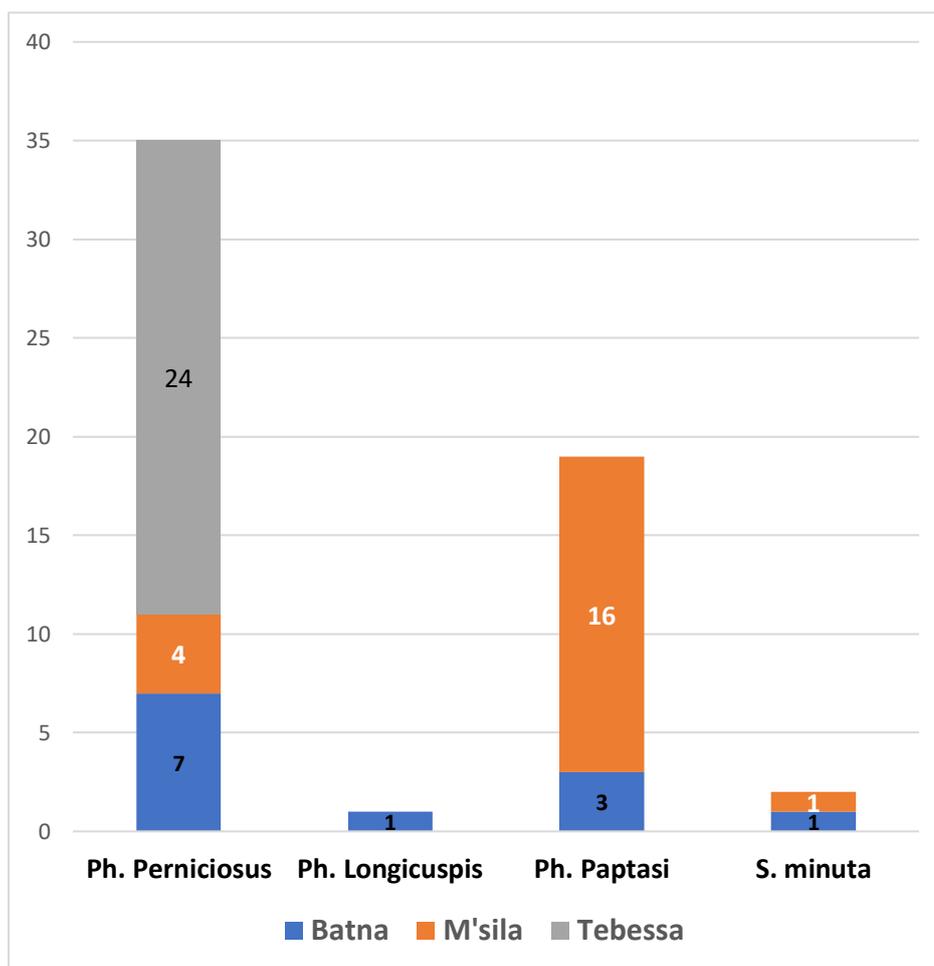


Figure 20: Distribution des espèces de phlébotomes mâles identifiés dans les trois zones de l'étude

III.2.2 Identification morphologique des moustiques

Sur la base de l'anatomie des insectes, 327 spécimens ont été identifiés. L'identification morphologique a révélé la présence de deux (02) espèces : 179 spécimens (soit 54,74%) appartenaient au genre *Culex*, et à l'espèce *pipiens* ; et 148 (soit 45,26%) appartenaient au genre *Aedes* et à l'espèce *albopictus* (figure 18).

III.3 Détection moléculaire de la bactérie *Wolbachia* chez les insectes d'études

III.3.1 Dosage des extraits de l'ADN par le Nanodrop

III.3.1.1 Concentration des extraits d'ADN

Les résultats du dosage des extraits d'ADN provenant des échantillons de phlébotome, de *Culex pipiens*, et d'*Aedes albopictus* sont représenté par la figure 21 et le tableau V.

Tableau V:: Distribution de la concentration des ADNs extraits des différents insectes

ANOVA	Phlébotome	Culex	Aedes	p valeur Phlébotome vs Culex	p valeur Phlébotome vs Aedes	p valeur Culex vs Aedes
Effectif (N)	156	178	148			
Moyenne ±ESM (ng/μL)	10,07±1.45	44,43±5.88	33.06±3.60	***	**	ns
Test de Tukey				P<0,0001		

Le tableau V montre que la concentration d'extraits d'ADN la plus élevée est celle des culex pipiens. Ce résultat semble être lié à la taille des culex avec une concentration moyenne de (44.43±5.88) ng/μL. Ce même constat est observé chez les Aedes avec une concentration moyenne de (33.06±3.60) ng/μl.

En revanche, la concentration d'ADN des phlébotomes est la plus faible. Ceci suggère que ce résultat est lié au fait que nous avons utilisé que l'extrait d'ADN provenant de l'abdomen et du thorax. En effet, pour ces derniers, nous avons éliminé la tête et les organes génitaux du phlébotome. Tandis que chez les moustiques, l'extraction a été réalisée à partir de spécimens complets (figure 21).

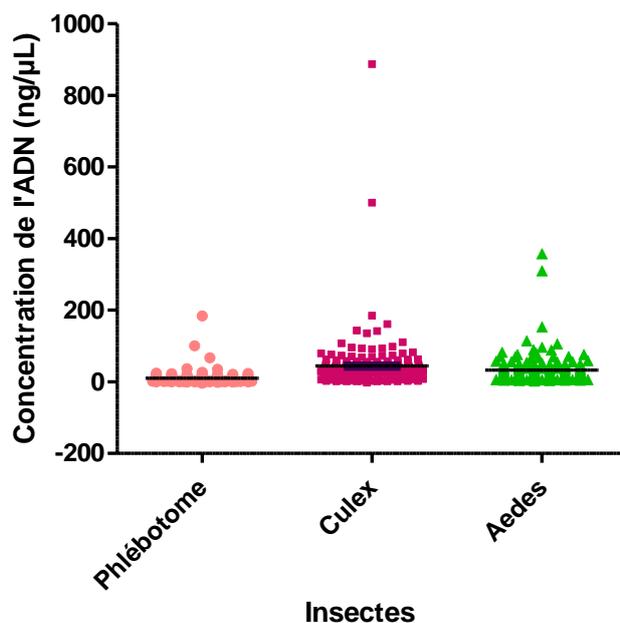


Figure 21: Histogramme représentatif de la distribution de la concentration des ADN extraits des différents insectes

L'analyse statistique par ANOVA one Way (Tukey) montre qu'il existe une différence hautement significative entre les phlébotomes versus culex ($p < 0.0001$, $\alpha = 0.05$). Cette différence est très significative entre phlébotomes versus Aedes ($p < 0.001$, $\alpha = 0.05$). Cependant, cette différence n'est pas significative entre Culex versus Aedes ($p > 0.05$, $\alpha = 0.05$). Ceci peut être due à la ressemblance morphologique et à la taille des Culex et Aedes.

III.3.1.2 Evaluation de la qualité des extraits d'ADN

III.3.1.2.1 Rapport 260/280

Ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2 pour des extraits purs. Par ailleurs, un rapport 260/280 $< 1,8$ indique une contamination par des protéines, et un rapport 260/280 > 2 indique une contamination par l'ARN.

Les analyses statistiques de la moyenne du rapport 260/280 chez les différents insectes étaient : $1,63 \pm 0,04$ [1,548 ; 1,713] chez les Phlébotomes ; $1,75 \pm 0,02$ [1,710 ; 1,796] chez les Culex et $1,78 \pm 0,03$ [1,711 ; 1,857] chez les Aèdes. Bien que ces valeurs moyennes reflètent une contamination des extraits ADN par des protéines, 75% des extraits avaient un rapport 260/280 variant entre 1,714 chez les phlébotomes, 1,85 chez Culex et 1,88 chez Aèdes. Ces valeurs traduisent une pureté de l'ADN chez 75% des extraits d'ADN des Culex et Aèdes (figure 22).

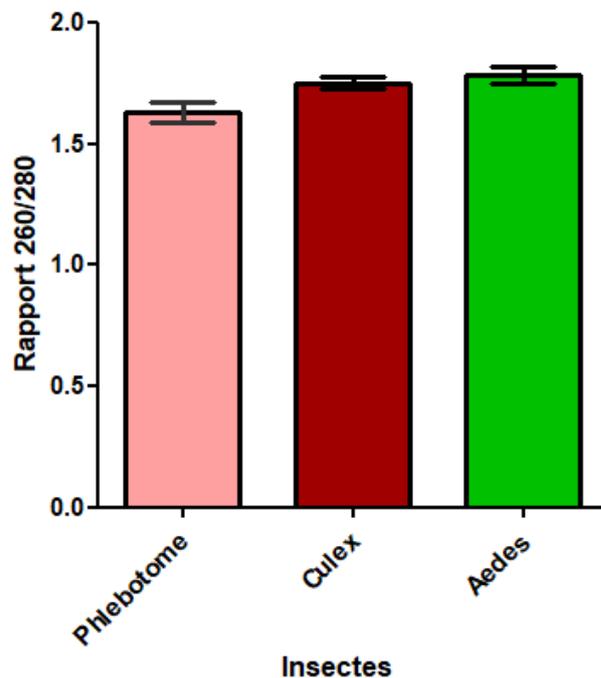


Figure 22: Distribution du rapport 260/280 des ADNs extraits des différents insectes

Le test de tukey de comparaison multiple, révèle que la différence moyenne entre les rapports des DO 260/280 de Phlébotome et Culex est significative (P value < 0,05 ; IC₉₅ [-0,23, -0,01]. Cette différence est également significative (P value < 0,05 ; IC₉₅ [-0,26, -0,03] entre les rapports des DO 260/280 de l'ADN de Phlébotome et Aedes. Cependant la différence moyenne de ce rapport entre *Culex et Aedes* n'est pas significative (P value > 0,05 ; IC₉₅ [-0,14, 0,08], (tableau VI).

Tableau VII: Analyse statistique de la distribution des DO 260/280 et des DO 260/230 des ADNs extraits des différents insectes

ANOVA	Phlébotome	Culex	Aedes	Pvaleur Phlébome vs Culex	Pvaleur Phlébome vs Aedes	Pvaleur Culex vs Aedes
Effectif (N)	156	179	148			
Moyenne du rapport 260/280	1,63 ± 0,04	1,75 ± 0,02	1,78 ± 0,03	***	**	ns
Moyenne du rapport 260/230	0,53 ± 0,05	1,65 ± 0,07	1,50 ± 0,05	***	***	ns
Test de Tukey				P<0,0001		

III.3.1.2.2 Le rapport 260/230

Le rapport 260/230 détermine la contamination par le phénol. Des valeurs >2 indiquent une contamination par le phénol.

Les analyses statistiques de la moyenne du rapport 260/280 chez les différents insectes étaient : $0,53 \pm 0,05$ [0,43 ; 0,63] chez les Phlébotomes ; $1,65 \pm 0,07$ [1,50 ; 1,79] chez les *Culex* et $1,50 \pm 0,05$ [1,38 ; 1,61] chez les Aèdes. Toutes ces valeurs sont inférieures à 2, ce qui montre que nos extraits n'étaient pas contaminés par le phénol (figure 23). Le test de tukey de comparaison multiple, révèle que la différence moyenne entre les rapports des DO 260/230 de Phlébotome et *Culex* est très significative (P value $< 0,05$; IC₉₅ [-1,32, -0,91]. Cette différence est également significative (P value $< 0,05$; IC₉₅ [-1,18, -0,74] entre les rapports des DO 260/230 de l'ADN de Phlébotome et *Aedes*. Cependant la différence moyenne de ce rapport entre *Culex* et *Aedes* n'est pas significative (P value $> 0,05$; IC₉₅ [-0,05, 0,36], (tableau VIII).

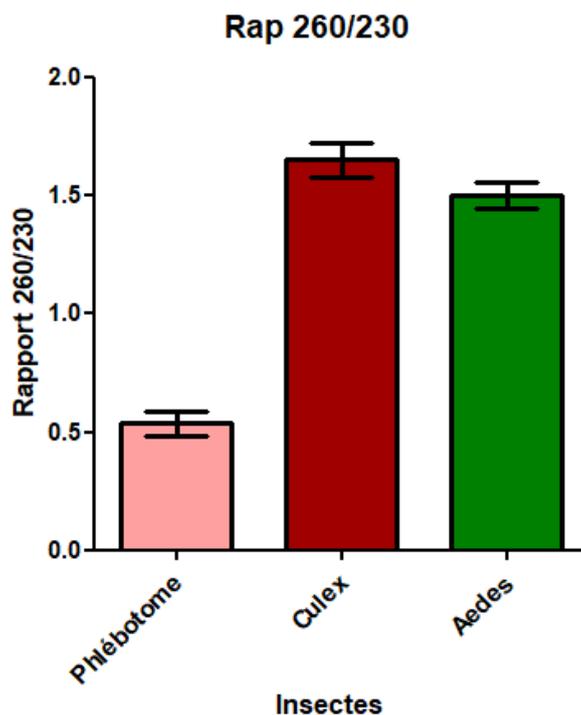


Figure 23: Distribution du rapport 260/230 des ADN extraits des différents insectes

III.3.2 Prévalence de *Wolbachia* selon les espèces de vecteurs

Vu le grand nombre des insectes sélectionnés pour le diagnostic moléculaire de *Wolbachia* (483), les extraits d'ADN ont été poolés, et chaque pool contenait 5 extraits d'ADN. Nous avons ainsi obtenu 35 pools d'ADN de phlébotomes, 47 pools de *Culex pipiens* et 30 pools d'*Aedes albopictus*.

III.3.2.1 Diagnostic moléculaire de *Wolbachia* chez les phlébotomes

Sur les 35 pools d'extraits d'ADN de phlébotomes amplifiés, 13 pools ont été trouvés positifs à *Wolbachia*, soit 37,41%. Les résultats de la visualisation de gène étudiés par pool d'ADN des phlébotomes sur gel d'agarose sont représentés dans figures 24.

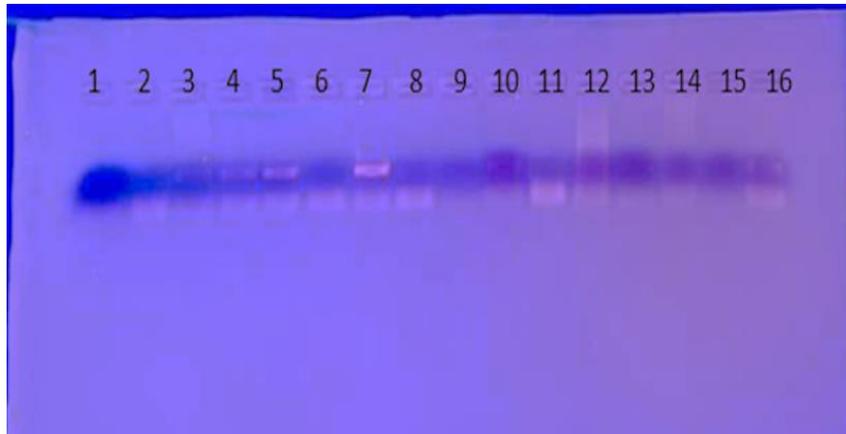


Figure 24: Visualisation des résultats de la PCR par électrophorèse du gène Wsp. Première ligne, les puits 1 à 15 reflètent les pools 11 à 24, puis 16 reflète témoin positif. (Photo. Sous UV)

III.3.2.2 Diagnostic moléculaire de *Wolbachia* chez *Culex pipiens*

Sur les 36 pools d'extraits d'ADN de *Culex* amplifiés, 16 pools ont été trouvés positifs à *Wolbachia*, soit 44,44 pour cent. Les résultats de la visualisation de gène étudiés par pool d'ADN de *Culex pipiens* sur gel d'agarose sont représentés dans figures 25.

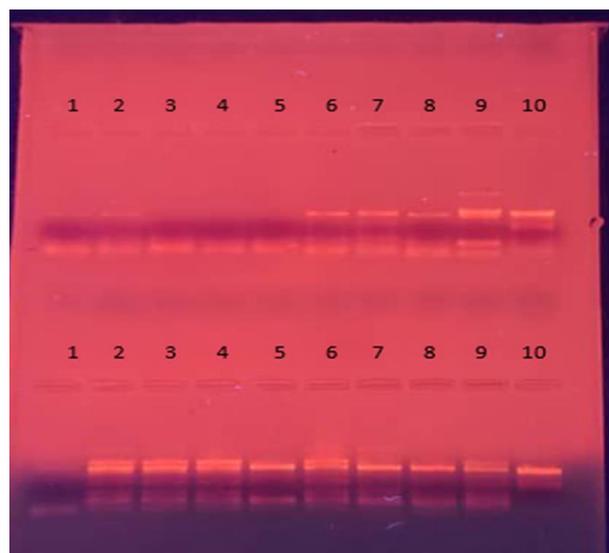


Figure 25: Visualisation des résultats de la PCR par électrophorèse du gène Wsp. Première ligne, les puits 1 à 9 reflètent les pools 7 à 15, puis 10 reflète le témoin positif. Ligne 2, les puits de 1 à 9 reflètent les pools 16 à 24, puis 10 reflète témoin positif (Photo. Sous UV)

III.3.2.3 Diagnostic moléculaire de *Wolbachia* chez *Aedes albopictus*

Sur les 30 pools d'extraits d'ADN d'*Aedes* amplifiés, seulement deux pools ont été trouvés positifs à *Wolbachia*, soit 6,67 pour cent. Les résultats de la visualisation de gène étudiés par pool d'ADN des phlébotomes sur gel d'agarose sont représentés dans figures 26.

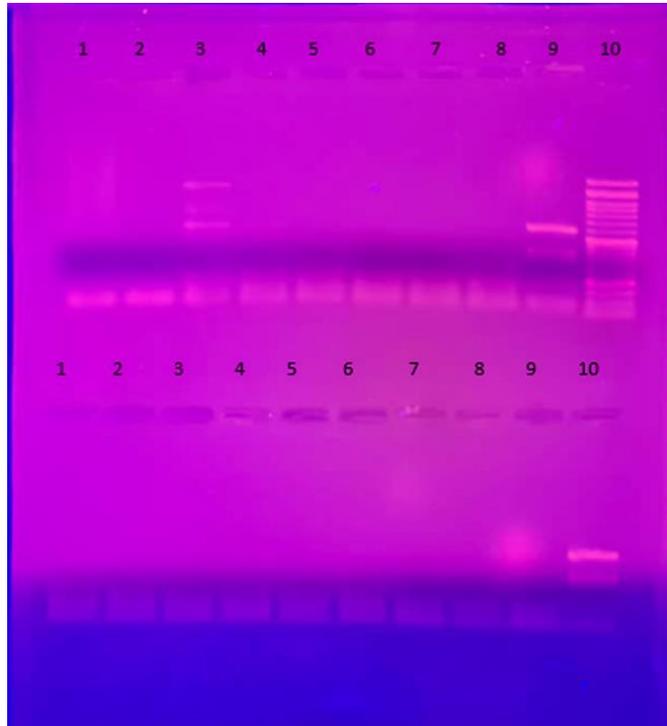


Figure 26: Visualisation des résultats de la PCR par électrophorèse du gène Wsp. Première ligne, les puits 1 à 8 reflètent les pools 1 à 8, puis 9 reflètent témoins positifs, puis 10 reflètent marqueur de taille. Ligne 2, les puits de 1 à 9 reflètent les pools 9 à 17, puis 10 reflètent témoin positif (Photo. Sous UV)

III.3.3 Prévalence de *Wolbachia* selon les espèces de vecteurs

La détection de *Wolbachia* chez les 3 insectes de notre étude, montre que cette bactérie est beaucoup plus présente chez le moustique *Culex pipiens* avec une prévalence de 44,44%, suivie des phlébotomes avec une prévalence de 37,14%. Par ailleurs, *Aedes albopictus* est légèrement infecté par *Wolbachia* avec une prévalence de 6,67% (figure 27).

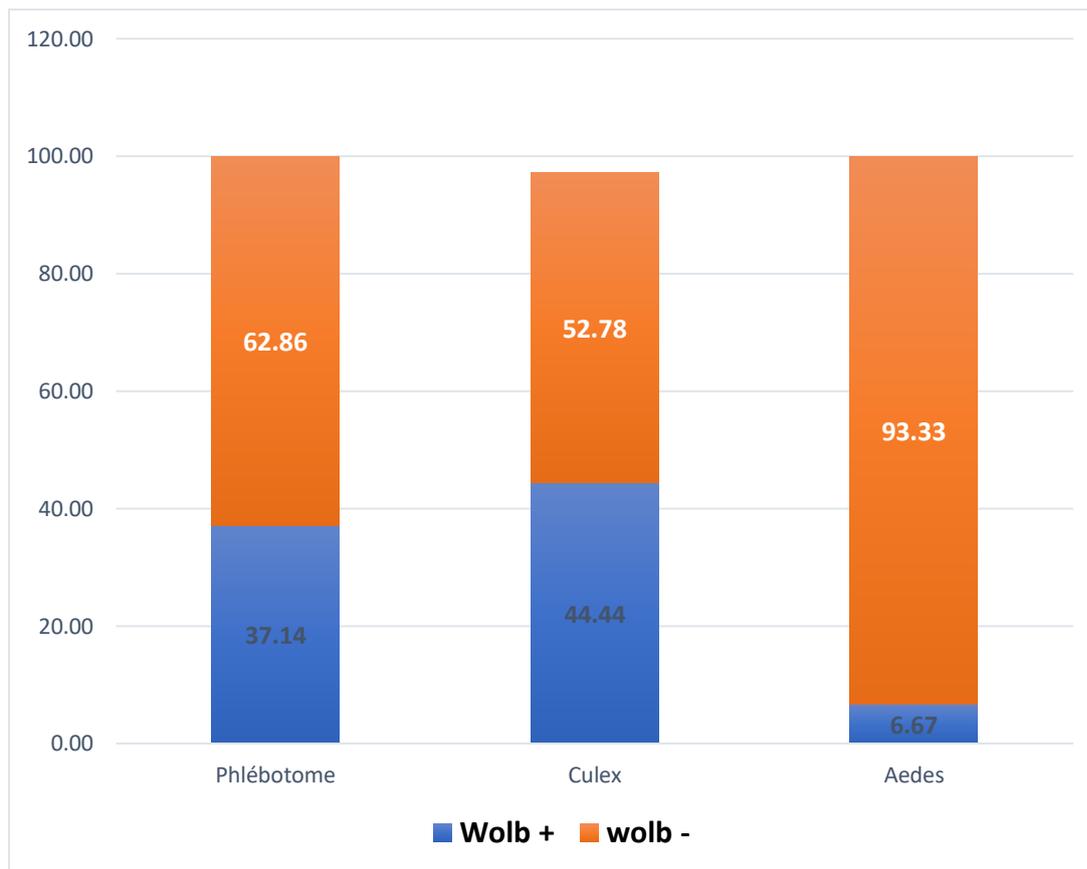


Figure 27: Infection des insectes de l'étude par Wolbachia

Tableau IX: Prévalence de Wolbachia selon les espèces de vecteurs

	Insectes			P valeur	
	Phlébotome	<i>Culex pipiens</i>	<i>Aedes albopictus</i>		
wolbachia (+)	13	16	2		
wolbachia (-)	22	20	28		
total	35	36	30		
<i>Phlebotome vs Culex pipiens</i>				0.349816	ns
<i>Culex pipiens vs Aedes albopictus</i>				0.0000001	Hautement significative
<i>Phlebotome vs Aedes albopictus</i>				0.0000001	Hautement significative

L'analyse statistique par le test du khi-deux montre bien qu'il n'existe pas de différence significative entre le *Phlebotome* vs *Culex pipiens* ($p > 0.05$). Cependant, la différence est

hautement significative entre *Culex pipiens* vs *Aedes albopictus* et *Phlebotome* vs *Aedes albopictus* ($p < 0.0000001$)

III.3.4 Analyse phylogénétique du séquençage in silico

Afin d'évaluer la performance du gène WSP comme marqueurs d'identification moléculaire chez les insectes (phlébotomes et moustiques), des analyses phylogénétiques in silico ont été effectuées pour quelques séquences publiées dans la base de données NCBI (National Center For Biotechnology Information, s. d.). L'analyse in Silico montre une subdivision claire en deux clades différents (figure 29). Un premier groupe regroupant 15 différentes séquences de différents insectes et de différents pays. Ce groupe est subdivisé en plusieurs sous-groupes très proches. Un deuxième clade constitué de 4 séquences avec 99% de similarités. 2 séquences WSP de *Culex pipiens* et 2 autres d'*Aedes albopictus*. Ces insectes provenaient de la chine des USA.



Figure 28: Résultats de l'alignement de séquences quelques espèces de phlébotomes, de Culex et d'Aedes par MEGA

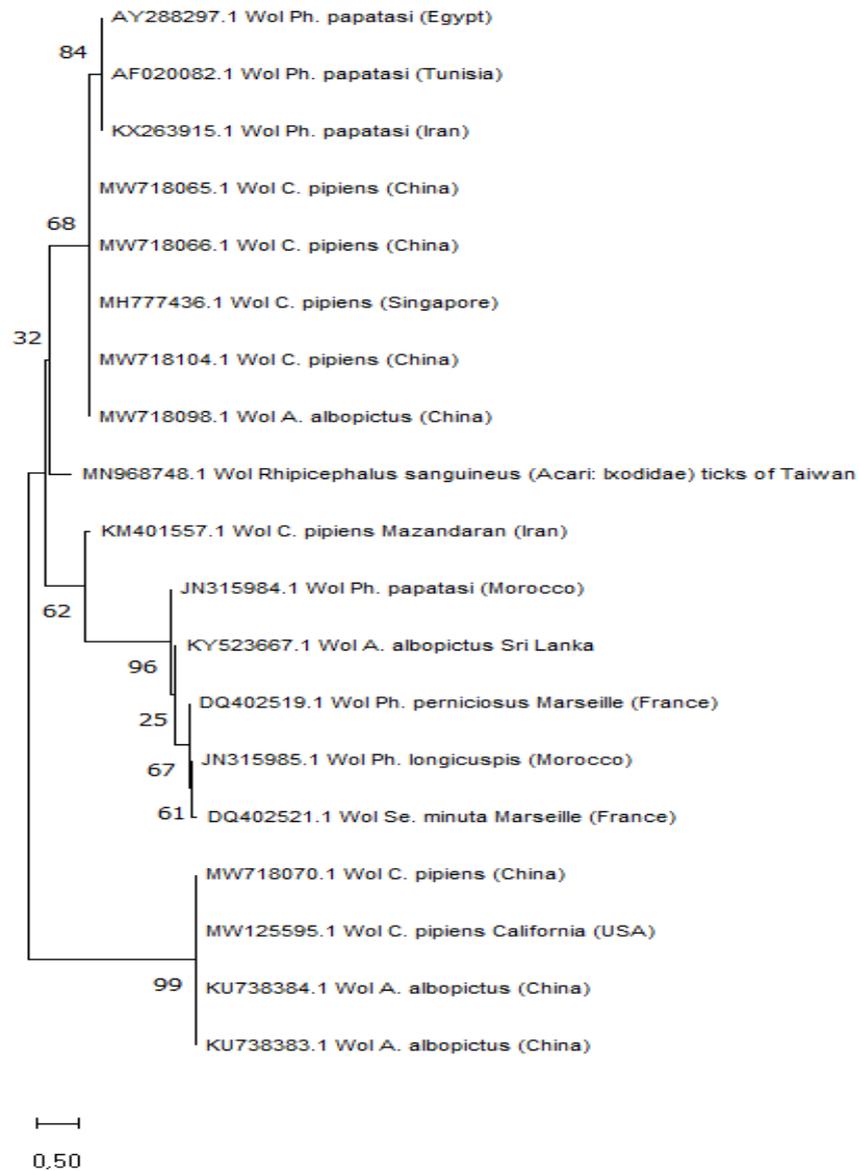


Figure 29 : Arbre phylogénétique des séquences WSP chez quelques espèces de phlébotomes, de *Culex* et d'*Aedes* récupérées de NCBI construit sur MEGA

Chapitre IV : Discussion

Les *Wolbachia* sont des a-protéobactéries intracellulaires très fréquentes chez les arthropodes (Zug et Hammerstein 2015). Le but de notre étude été d'évaluer des populations naturelles d'insectes vis-à-vis de la bactérie *Wolbachia*. Ainsi, nous avons étudié la prévalence de *Wolbachia* chez des phlébotomes naturels vecteurs de parasite *Leishmania*, et chez des espèces de *Culex* et *Aedes* connues pour leurs transmissions de virus. Les captures des insectes ont été faites dans des régions endémiques de l'est de l'Algérie en ce qui concerne les phlébotomes, et au nord pour les moustiques du genres *Culex* et *Aedes*.

L'identification morphologique des phlébotomes mâles de l'est a révélé la présence de quatre espèces. Il s'agit de *Phlebotomus (Ph.) perniciosus* et *Ph. longicuspis* appartenant au sous genre *Larroussius* et *Ph. papatasi* du sous genre *Phlebotomus* et *S. minuta* du sous genre *Sergentmoyia* (figure 20). Il est a signalé que *Phlebotomus perniciosus* est l'espèce vectrice de *Leishmania infantum* agent de la leishmaniose viscérale en Algérie et les pays du Maghreb comme la Tunisie et le Maghreb. Comme attendu, *Phlebotomus papatasi* a été prédominante dans la wilaya de M'sila. En effet, il s'agit de l'espèce la plus fréquente à M'sila et ses wilayas limitrophes (Benikhlef et al., 2021). *Ph. papatasi* étant le vecteur avéré de *L. major*, dont l'incidence zoonotique en leishmaniose cutanée est très élevée dans cette zone (Benikhlef et al., 2021). Il est intéressant de noter que certaines espèces de phlébotomes comme *Ph. longicuspis* et *Se. Minuta* ont été aussi identifiées avec de faibles proportions. Malgré la faible proportion de *Ph. longicuspis*, cette espèce est suspectée ou avérés vectrice de *Leishmania infantum* de la leishmaniose viscérale.

L'identification morphologique des moustiques a montré que *Culex pipiens* et *Aedes albopictus* sont très réponde au nord de l'Algérie. Il est a signalé que *culex pipiens* est un vecteur majeur de pathogènes comme le virus du Nil occidental et le virus de la fièvre de la vallée du Rift en Algérie (Amara et al. 2016), où il est largement répandu. Sa prédominance à Alger (54,74%) présente un risque potentiel de transmission de pathogènes comme le virus du Nil occidental et le virus de la fièvre. *Ae. albopictus* représente une menace pour la santé publique en tant que vecteur compétent de nombreux virus, y compris le chikungunya, la dengue, le Zika, le virus du Nil occidental, et les filarioses. En Algérie, il a été observé sporadiquement, et une enquête entomologique récente a confirmé sa présence à Alger, soulignant sa capacité à s'étendre dans de nouvelles zones (Benallal et al. 2020). Sa prédominance à Alger (45,26%) présente un risque potentiel de transmission de pathogènes comme le virus du chikungunya et la dengue, le Zika. Notre étude a révélé la présence de *Wolbachia* chez divers vecteurs en Algérie, avec des taux d'infection variables selon les espèces et les régions étudiées. Les résultats ont montré que

37,14% des phlébotomes dépistés (par pool) étaient infectés par *Wolbachia*, un taux relativement faible comparé aux études de Karatepe et al. (2018) et Karimian et al. (2018), qui ont rapportés des taux de 70 % et 80 % d'infection de phlébotomes de la Turquie. Cependant Yokomi et al. (2023), a rapportait une prévalence beaucoup plus faible d'infections en Amérique du Sud. Ces variations pourraient être dues à des différences dans les méthodes d'échantillonnage, les conditions environnementales, ou les dynamiques locales des populations de phlébotomes. Pour les moustiques, nos résultats ont révélé que *Wolbachia* était très répandue chez *Culex pipiens* (44,44%) que chez *Aedes albopictus* (6,66%). Ceci est conforme aux études précédentes portant sur de grands échantillons de *Culex pipiens*, avec une prévalence de *Wolbachia* plus importante de l'ordre de 91 % en Russie occidentale, 95 % en Russie centrale, 81 % en Biélorussie et 93 % en Allemagne. Raharimalala et al. a détecté *Wolbachia* dans neuf adultes testés sur neuf *Cx. pipiens* et 26 des 48 larves collectées en Belgique, ce qui conforte également la prévalence généralement élevée de *Wolbachia* chez cette espèce (Hesson, 2021). Le faible taux d'infection chez *Aedes albopictus* (6,66 %) a été constaté aussi par certains auteurs, comme les résultats d'Ahmad et al. (2017) et de Ding, Yeo, et Puniamoorthy (2020). De même, les taux d'infection chez *Aedes albopictus* varient selon les régions, avec des études en Asie rapportant des taux plus élevés.

Les taux d'infection élevés chez les *Culex* et les phlébotomes, méritent d'être étudiés plus profondément pour connaître les vrais taux d'infection, étant donné que nous avons traité les extraits d'ADN par pool. Notre étude mérite d'être complétée et approfondie par l'utilisation de plusieurs marqueurs de détections de *Wolbachia*. Une approche plus exhaustive, combinant différentes méthodes de détection et échantillonnant sur une plus grande échelle géographique et temporelle, pourrait fournir une image plus complète de la distribution de *Wolbachia* chez les vecteurs en Algérie.

Pour compléter nos résultats, des études futures pourraient explorer davantage la diversité génétique des souches de *Wolbachia* présentes chez les phlébotomes et les moustiques en Algérie. Des approches de séquençage plus avancées pourraient également être utilisées pour caractériser plus précisément les souches de *Wolbachia* et étudier leurs interactions avec les vecteurs et les pathogènes.

Conclusion

Cette étude a évalué la présence de *Wolbachia* chez les principaux vecteurs en Algérie, notamment les phlébotomes (*Phlebotomus perniciosus*, *Ph. longicuspis*, *Ph. papatasi* et *Sergentomyia minuta*), ainsi que chez les moustiques *Culex pipiens* et *Aedes albopictus*. Les résultats de notre étude ont montré des taux d'infection variables, avec une prévalence de 37,14% chez les phlébotomes, 44,44 % chez le *Culex pipiens* et 6,67 % chez *Aedes albopictus* cette détection a été effectuée en utilisant la technique de PCR, ciblant le gène Wsp. Ces données indiquent une distribution significative de *Wolbachia* parmi les populations de vecteurs étudiées, ce qui suggère un potentiel de la transmission de cette bactérie chez les insectes de l'étude.

Nos résultats enrichissent la compréhension globale de la dynamique de *Wolbachia* chez les vecteurs, mettant en lumière l'importance de considérer cette bactérie endosymbiotique dans les stratégies de contrôle des maladies. Ils soulignent également l'importance de futures études pour explorer plus en profondeur la diversité génétique de *Wolbachia* et ses interactions avec les pathogènes chez les vecteurs algériens. Ces recherches pourraient orienter le développement de nouvelles approches de lutte contre les maladies vectorielles adaptées aux spécificités locales. Enfin, cette étude soulève des questions importantes quant à l'impact potentiel de *Wolbachia* sur la compétence vectorielle des espèces étudiées et appelle à une surveillance continue pour évaluer son rôle dans la santé publique en Algérie. Des collaborations internationales et multidisciplinaires seront essentielles pour approfondir notre compréhension de *Wolbachia* et pour optimiser les stratégies de contrôle des maladies transmises par les vecteurs dans les différentes régions du pays.

Les Références

1. Berube, David M. 2023. *Pandemics and Resilience: Lessons We Should Have Learned from Zika*. Risk, Systems and Decisions. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-25370-6>.
2. Caragata, Eric P., Heverton L.C. Dutra, Pedro H.F. Sucupira, Alvaro G.A. Ferreira, et Luciano A. Moreira. 2021. « Wolbachia as Translational Science: Controlling Mosquito-Borne Pathogens ». *Trends in Parasitology* 37 (12): 1050-67. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.06.007>.
3. Hosokawa, Takahiro, Ryuichi Koga, Yoshitomo Kikuchi, Xian-Ying Meng, et Takema Fukatsu. 2010. « Wolbachia as a Bacteriocyte-Associated Nutritional Mutualist ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (2): 769-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911476107>.
4. Jeffries, Claire L., et Thomas Walker. 2016. « Wolbachia Biocontrol Strategies for Arboviral Diseases and the Potential Influence of Resident Wolbachia Strains in Mosquitoes ». *Current Tropical Medicine Reports* 3 (1): 20-25. <https://doi.org/10.1007/s40475-016->
5. Karatepe, Bilge, Serap Aksoy, et Mustafa Karatepe. 2018. « Investigation of Wolbachia Spp. and Spiroplasma Spp. in Phlebotomus Species by Molecular Methods ». *Scientific Reports* 8 (1): 10616. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29031-3>.
6. Papafotiou, George, Stefan Oehler, Charalambos Savakis, et Kostas Bourtzis. 2011. « Regulation of Wolbachia Ankyrin Domain Encoding Genes in Drosophila Gonads ». *Research in Microbiology* 162 (8): 764-72. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.06.012>.
7. Ross, Perran A., et Ary A. Hoffmann. 2021a. « Vector Control: Discovery of Wolbachia in Malaria Vectors ». *Current Biology* 31 (11): R738-40. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.04.038>.
8. ———. 2021b. « Vector Control: Discovery of Wolbachia in Malaria Vectors ». *Current Biology* 31 (11): R738-40. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.04.038>.
9. Alipour, Hamzeh, Leila Izadpanah, Kourosh Azizi, Marzieh Shahriari-Namadi, et Mohsen Kalantari. 2021. « Potential Co-Infection of Wolbachia with Leishmania among Sand Fly Vectors Caught from Endemic Leishmaniasis Foci in Fars Province, Southern Iran ». *Journal of Parasitic Diseases* 45 (3): 817-22. <https://doi.org/10.1007/s12639-021-01366-1>.
10. Amara Korba, Raouf, Moufida Saoucen Alayat, Ladhari Bouiba, Abdelkarim Boudrissa, Zihad Bouslama, Slimane Boukraa, Frederic Francis, Anna-Bella Failloux, et Saïd Chaouki Boubidi. 2016. « Ecological Differentiation of Members of the Culex pipiens Complex,

Potential Vectors of West Nile Virus and Rift Valley Fever Virus in Algeria ». *Parasites & Vectors* 9 (1): 455. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1725-9>.

11. Baldo, Laura, Julie C. Dunning Hotopp, Keith A. Jolley, Seth R. Bordenstein, Sarah A. Biber, Rhitoban Ray Choudhury, Cheryl Hayashi, Martin C. J. Maiden, Hervé Tettelin, et John H. Werren. 2006. « Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont *Wolbachia Pipientis* ». *Applied and Environmental Microbiology* 72 (11): 7098-7110. <https://doi.org/10.1128/AEM.00731-06>.

12. Benallal, Kamel Eddine, Rafik Garni, Lazhari Bouiba, et Zoubir Harrat. 2020. « First Detection of *Aedes (Stegomyia) Albopictus* (Diptera: Culicidae) in Algiers, the Capital City of Algeria ». *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, janvier. <https://doi.org/10.18502/jad.v13i4.2240>.

13. Benikhlef, Razika, Karim Aoun, Abdelkarim Boudrissa, Meriem Ben Abid, Kamel Cherif, Wafa Aissi, Souad Benrekta, et al. 2021. « Cutaneous Leishmaniasis in Algeria; Highlight on the Focus of M'Sila ». *Microorganisms* 9 (5): 962. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050962>.

14. Berube, David M. 2023a. *Pandemics and Resilience: Lessons We Should Have Learned from Zika*. Risk, Systems and Decisions. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-25370-6>.

15. ———. 2023b. *Pandemics and Resilience: Lessons We Should Have Learned from Zika*. Risk, Systems and Decisions. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-25370-6>.

16. Bessas, Amina, Hamza Leulmi, Idir Bitam, Sara Zaidi, Khatima Ait-Oudhia, Didier Raoult, et Philippe Parola. 2016. « Molecular Evidence of Vector-Borne Pathogens in Dogs and Cats and Their Ectoparasites in Algiers, Algeria ». *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 45 (avril):23-28. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.01.002>.

17. Fallon, Ann M., éd. 2024a. *Wolbachia: Methods and Protocols*. Vol. 2739. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3553-7>.

18. ———, éd. 2024b. *Wolbachia: Methods and Protocols*. Vol. 2739. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3553-7>.

19. Fauver, Joseph R., John Martin, Gary J. Weil, Makedonka Mitreva, et Peter U. Fischer. 2019. « De Novo Assembly of the *Brugia Malayi* Genome Using Long Reads from a Single MinION Flowcell ». *Scientific Reports* 9 (1): 19521. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55908-y>.

20. García-Alegría, Alejandro Monserrat, Iván Anduro-Corona, Cinthia Jhovanna Pérez-Martínez, María Alba Guadalupe Corella-Madueño, María Lucila Rascón-Durán, et Humberto Astiazaran-García. 2020. « Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: Methodological Validation Using Standard Reference Material and Sprague Dawley Rat and Human DNA ». Édité par Mohamed Abdel-Rehim. *International Journal of Analytical Chemistry* 2020 (novembre):1-9. <https://doi.org/10.1155/2020/8896738>.
21. Hertig, Marshall. 1936. « The Rickettsia, *Wolbachia Pipientis* (Gen. et Sp.n.) and Associated Inclusions of the Mosquito, *Culex Pipiens* ». *Parasitology* 28 (4): 453-86. <https://doi.org/10.1017/S0031182000022666>.
22. Karatepe, Bilge, Serap Aksoy, et Mustafa Karatepe. 2018. « Investigation of Wolbachia Spp. and Spiroplasma Spp. in Phlebotomus Species by Molecular Methods ». *Scientific Reports* 8 (1): 10616. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29031-3>.
23. Kaur, Rupinder, J. Dylan Shropshire, Karissa L. Cross, Brittany Leigh, Alexander J. Mansueto, Victoria Stewart, Sarah R. Bordenstein, et Seth R. Bordenstein. 2021a. « Living in the Endosymbiotic World of Wolbachia: A Centennial Review ». *Cell Host & Microbe* 29 (6): 879-93. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.03.006>.
24. ———. 2021b. « Living in the Endosymbiotic World of Wolbachia: A Centennial Review ». *Cell Host & Microbe* 29 (6): 879-93. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.03.006>.
25. Minwuyelet, Awoke, Giulio Petronio Petronio, Delenasaw Yewhalaw, Andrea Sciarretta, Irene Magnifico, Daria Nicolosi, Roberto Di Marco, et Getnet Atenafu. 2023. « Symbiotic Wolbachia in Mosquitoes and Its Role in Reducing the Transmission of Mosquito-Borne Diseases: Updates and Prospects ». *Frontiers in Microbiology* 14 (octobre):1267832. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1267832>.
26. Paskewitz, S. M., et F. H. Collins. 1990. « Use of the Polymerase Chain Reaction to Identify Mosquito Species of the Anopheles Gambiae Complex ». *Medical and Veterinary Entomology* 4 (4): 367-73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1990.tb00453.x>.
27. Sanger, F., S. Nicklen, et A. R. Coulson. 1977. « DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (12): 5463-67. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
28. Shaikovich, Elena, Anna Bogacheva, et Ludmila Ganushkina. 2019. « *Dirofilaria* and *Wolbachia* in Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Central European Russia and on the Black Sea Coast ». *Parasite* 26:2. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019002>.

29. Thomas, Sunil, éd. 2016. *Rickettsiales: Biology, Molecular Biology, Epidemiology, and Vaccine Development*. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46859-4>.
30. « Yokomi N. Lozano-Sardanet 2023.pdf ». s. d.-a.
31. « ——— ». s. d.-b.
32. Zhou, Weiguo, François Rousset, et Scott O'Neill. 1998. « Phylogeny and PCR-Based Classification of *Wolbachia* Strains Using *Wsp* Gene Sequences ». *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 265 (1395): 509-15. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0324>.
33. Serbus, Laura R., Catharina Casper-Lindley, Frédéric Landmann, et William Sullivan. 2008. « The Genetics and Cell Biology of *Wolbachia* -Host Interactions ». *Annual Review of Genetics* 42 (1): 683-707. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130354>.
34. « The impact of environmental and host factors on wolbachia density and.pdf ». s. d.
35. « *Wolbachia*Hertig, 1936 ». s. d. Consulté le 18 février 2024. <https://www.gbif.org/species/3221437>.
36. « Yokomi N. Lozano-Sardanet 2023.pdf ». s. d.
37. Tabbabi, A., Alkische, A. A., Samy, A. M., Rhim, A., & Peterson, A. T. (2020). Malaria in north Africa: a review of the status of vectors and parasites. *Journal of Entomological Science*, 55(1), 25-37.
38. Zug, Roman, et Peter Hammerstein. 2015. « Bad Guys Turned Nice? A Critical Assessment of *Wolbachia* Mutualisms in Arthropod Hosts ». *Biological Reviews* 90 (1): 89-111. <https://doi.org/10.1111/brv.12098>.
39. « Amara Korba et al. - 2016 - Ecological differentiation of members of the *Culex*.pdf ». s. d. <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1725-9>
40. « Benallal et al. - 2020 - First Detection of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (D.pdf ». s. d. <https://publish.kne-publishing.com/index.php/JAD/article/view/2240>
41. Karimian, Fateh, Hassan Vatandoost, Yavar Rassi, Naseh Maleki-Ravasan, Nayyereh Choubdar, Mona Koosha, Kourosh Arzamani, et al. 2018. « *Wsp*-Based Analysis of *Wolbachia* Strains Associated with *Phlebotomus Papatasi* and *P. Sergenti* (Diptera: Psychodidae) Main Cutaneous Leishmaniasis Vectors, Introduction of a New Subgroup *wSerg* ». *Pathogens and Global Health* 112 (3): 152-60. <https://doi.org/10.1080/20477724.2018.1471438>.
42. Hussain, Mazhar, Guangmei Zhang, Michael Leitner, Lauren M. Hedges, et Sassan Asgari. 2023. « *Wolbachia* RNase HI Contributes to Virus Blocking in the Mosquito *Aedes Aegypti* ». *iScience* 26 (1): 105836. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105836>.

43. Ahmad, Noor Afizah, Indra Vythilingam, Yvonne A. L. Lim, Nur Zatil Aqmar M. Zabari, et Han Lim Lee. 2017. « Detection of *Wolbachia* in *Aedes Albopictus* and Their Effects on Chikungunya Virus ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 96 (1): 148-56. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0516>.
44. Yang, Yi, Yifan He, Guoding Zhu, Jilei Zhang, Zaicheng Gong, Siyang Huang, Guangwu Lu, et al. 2021. « Prevalence and Molecular Characterization of *Wolbachia* in Field-Collected *Aedes Albopictus*, *Anopheles Sinensis*, *Armigeres Subalbatus*, *Culex Pipiens* and *Cx. Tritaeniorhynchus* in China ». Édité par Winka Le Clec'h. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 15 (10): e0009911. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009911>.
45. Matsumoto, Kotaro, Arezki Izri, Henri Dumon, Didier Raoult, et Philippe Parola. 2008. « First Detection of *Wolbachia* Spp., Including a New Genotype, in Sand Flies Collected in Marseille, France ».
46. Ding, Huicong, Huiqing Yeo, et Nalini Puniamoorthy. 2020. « *Wolbachia* Infection in Wild Mosquitoes (Diptera: Culicidae): Implications for Transmission Modes and Host-Endosymbiont Associations in Singapore ». *Parasites & Vectors* 13 (1): 612. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04466-8>.

Annexe

Matériel non biologique :

1. Petits matériels :

- Lames et lamelles
- Boîtes de Pétri
- Tubes Eppendorf (avec différentes capacités)
- Micropipettes (avec diverses capacités : 1 μ L, 10 μ L, 100 μ L, etc.)
- Pointes de micropipettes (compatibles avec les micropipettes utilisées)
- Filtres à micropipettes
- Éprouvettes graduées
- Pipettes Pasteur
- Boîtes de conservation pour micropipettes
- Pipettes serologiques
- Racks pour tubes Eppendorf
- Gants de laboratoire
- Marqueurs permanents pour l'étiquetage des tubes

2. Grands matériels :

- Thermocycleur pour PCR : Modèle [Applied Biosystems]
- Centrifugeuse : Modèle [5424R] avec différents rotors adaptés
- Spectrophotomètre : Modèle [Nanodrop One] ou autre modèle utilisé pour la quantification de l'ADN
- Microscope optique pour identification morphologique : Modèle [Motic] ou autre microscope adapté à l'identification des insectes
- Loupe binoculaire pour la dissection des échantillons : Modèle [Optica] ou équivalent
- Bain-marie pour la lyse cellulaire : Modèle [Memmert] ou autre modèle adapté
- Cuve électrophorèse horizontale et générateur électrique pour l'électrophorèse
- Peigne pour électrophorèse (adapté à l'agarose utilisé)
- Blocs chauffants pour maintenir la température des réactions

3. Réactifs et consommables

- Alcool à 70% pour la conservation des échantillons
- Eau distillée ou déionisée

- Baume de Canada ou PVA pour la fixation et l'éclaircissement des échantillons
- CTAB (Cetyltriméthylammonium bromide), β -mercaptoéthanol, tampon d'extraction d'ADN pour l'extraction d'ADN
- Chloroforme, isopropanol, éthanol absolu (avec Tris-EDTA) pour la purification d'ADN
- Mix de PCR contenant des amorces spécifiques pour la détection de Wolbachia
- Agarose et BET (Bromoéthane) pour la préparation de gels d'électrophorèse
- Colorant de charge pour gels d'électrophorèse
- Marqueurs de poids moléculaire pour gels d'électrophorèse
- Réactifs de coloration pour la visualisation des gels d'électrophorèse

4. Équipements de sécurité et autres :

- Équipements de sécurité biologique pour la manipulation sûre des échantillons (blouses de laboratoire, lunettes de sécurité, etc.)
- Conteneurs à déchets biologiques pour l'élimination des déchets dangereux
- Systèmes de purification d'air pour maintenir un environnement de travail propre et sûr