



République Algérienne Démocratique et Populaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

UNIVERSITE SAAD DAHLAB-BLIDA

Faculté des Sciences Agrovétérinaires et Biologiques

Département de Biologie

Mémoire de projet de Fin d'études en vue de l'obtention du
diplôme de Master en Science de la vie

Option : Entomologie Médicale

THÈME

**Optimisation de la PCR pour l'identification
moléculaire du complexe *Culex pipiens*,
vecteur potentiel du virus du West-Nile**

Présenté par : M^{elle} Benbetka Sihem

Soutenu le 16/12/2013

Membres du jury :

Présidente :	M ^{me} Inal D.	Maître Assistante A, USDB
Examinatrices :	M ^{me} Rouaki F.	Maître Assistante A, USDB
	M ^{me} Kara Toumi F.Z.	Maître de Conférences A, USDB
Promoteur :	M ^f Harrat Z	Directeur de Recherche, IPA
Co-Promoteur:	M ^{me} Tail G.	Maître de Conférences A, USDB
Invité :	M ^r Benallal K.E.	Attaché d'Etudes, IPA

Promotion: 2012-2013

Remerciement

Mes premiers remerciements vont au tout puissant qui m'a donné la foi et la force de reprendre l'aventure des études.

Je remercie Mr HARRAT Z. promoteur et chef de service d'Eco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations de l'Institut Pasteur d'Algérie, de m'avoir fait confiance et proposer ce sujet de Master.

Je remercie Mm TAIL G. co- promotrice, d'avoir cru en moi et proposer cette seconde chance pour finir les études.

Je remercie Mme INAL D. Maitre assistante A d'avoir accepté de présider ce jury et de critiquer ce travail.

Je remercie Mme KARA F/Z. Maitre de conférences B d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie, Mme ROUAKI A. Maitre assistance A d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Ce petit travaille ne serait achever sans l'aide précieuse de Mr BENALLAL Kamel Eddine collègue et frère qui m'a beaucoup appris en entomologie.

A toute ma famille qui m'a toujours soutenu dans tous mes projets pour leur patiente, leurs conseils et leur amour.

Je remercie aussi le Directeur général du centre cynégétique de la réserve naturelle du lac de Reghaia d'avoir mis à notre disposition toute les conditions favorables de travaille, à tous le personnel actif en particulier Amina.

A tous mes amis et collègues de travaille pour leur encouragement et soutien.

A tout les membres actifs de l'association "le Bonheur" que j'ai un peu négligé ces derniers temps mais je serais bientôt de retour incha Allah.

A tous mes amis de loin ou de pré pour leur soutien, leurs encouragements et leur fidélité.

A tout ce beau monde, merci pour tout et que dieu tout puissant vous garde.

Quelqu'un a dit " On apprend quand on est jeune et on comprend avec l'âge "

Liste des abréviations

ADN: Acide Desoxyribo Nucleique

ARN: Acide Ribo Nucleique

CTAB: Cetyl Trymethyl Ammonium Bromide

Cx: Culex

EDTA : Ethylène Diamine Tetra Acétique

Pb : Paire de base

PCR : Polymerase Chain Reaction

PM : Poids Moléculaire

PVA : Poly Venyl Alcool

TA : Température Ambiante

UV: Ultra Violet

Glossaire

Anautogène : Les femelles de diptères hématophages sont dites anautogènes lorsqu'il est nécessaire qu'elles prennent un repas sanguin pour effectuer chacune de leur ponte, y compris la première.

Autogène : Les femelles autogènes n'ont pas besoin d'un repas sanguin pour effectuer leur première ponte d'œufs.

Bromure d'éthidium : agent intercalant utilisé pour la détection des bandes d'ADN dans les gels de biologie moléculaire. Agit également comme mutagène.

Gîte épigé : gîte à ciel ouvert

Gîte hypogé : gîte fermé sous terrain

Microsatellite : un microsatellite est la répétition en tandem d'un certain nombre (variable) de fois d'un motif court (de 1 à 4 nucléotides, le plus souvent). Pour que ce marqueur puisse être un repère non ambigu, il doit être entouré à droite et à gauche de séquences uniques

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Taxonomie des <i>Culicinea</i>	3
Figure 2 : Radeau d'œufs de <i>Culex</i>	6
Figure 3 : La forme générale d'une larve de <i>Culex</i>	7
Figure 4 : Epine préclypéale 1-C	8
Figure 5 : Soies prothoracique du thorax d'une larve	8
Figure 6 : Soie d'identification de l'abdomen de larve	9
Figure 7 : Structure de la nymphe	10
Figure 8 : Adultes de <i>Culex pipiens</i> , mâle (à gauche) et femelle (à droite)	10
Figure 9 : La composition de la tête d'un moustique	11
Figure 10 : le thorax d'une femelle adulte et critères d'identification	12
Figure 11: Abdomen d'un adulte de <i>Culex</i>	13
Figure 12 : Cycle biologique du moustique <i>Culex pipiens</i>	14
Figure 13 : Structure du flaviviridae	14
Figure 14 : Schéma de l'ultra structure et du génome d'un Flavivirus	15
Figure 15 : Arbre phylogénétique du virus West Nile, établi à partir du séquençage du génome complet des souches virales	17
Figure 16 : Cycle de transmission du virus du West Nile	20
Figure 17 : Distribution géographique des cas de méningo-encéphalite à virus du West Nile dans le monde	21
Figure 18 : Fuligule nyroca	23
Figure 19 : Canard souchet	23
Figure 20 : Ibis falcinelle	23
Figure 21 : Flamant rose	23
Figure 22 : Echasse blanche	23

Figure 23 : Position des points de capture	25
Figure 24 : Récolte des larves (Dipping) et gîtes de récolte	26
Figure 25 : Larves de moustique en élevage	26
Figure 26 : Mise en couple d'adultes de moustiques	27
Figure 27: Nacelle d'œufs de <i>Culex pipiens</i>	28
Figure 28 : Reproduction des femelles selon le type de gîtes	33
Figure 29: Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% de PCR <i>Culex</i>	34
Figure 30 : Résultat PCR en fonction de la patte du moustique ou de son ADN	34
Figure 31 : Distribution des formes du complexe <i>Culex pipiens</i> selon la nature du gîte étudié.	35
Figure 32 : Résultats de l'identification moléculaire des hybrides selon le type de gîte étudié.	35

Liste des tableaux

Tableau I: Les espèces du genre <i>Culex</i> rapportées en Algérie (Brunhes et al, 2000)	4
Tableau II: Estimation de la densité larvaire	26
Tableau III: Protocole expérimental et programme de la PCR Multiplexe	30
Tableau IV : Distribution des différentes espèces de Culicidea dans les gîtes prospectés au Lac de Reghaïa	32

Résumé

Culex pipiens est le moustique le plus répandue en Algérie. Il est ubiquiste, capable de s'adapter à différents biotopes de l'urbain au rural, pollués ou propres. En plus des nuisances qu'il cause, il représente le vecteur potentiel de l'arbovirose du West Nile (WN) dans le monde. Il existe sous deux formes, *pipiens* et *molestus*, qui sont morphologiquement identiques mais qui diffèrent par leurs comportements et leur biologie qui pourraient influencer la transmission du virus WN. Afin de déterminer le profil moléculaire des populations du complexe *Culex pipiens* présentes dans le lac de Reghaïa, des larves de Culicidea ont été récoltées dans différents gîtes (épigé et hypogé). L'identification morphologique a révélé la présence de trois espèces sympatriques: *Culiseta longiareolata* (15%), *Culex theileri* (16%) et *Culex pipiens* (69%). Le typage moléculaire; par PCR multiplex en se basant sur le microsatellite CQ11 et en utilisant soit l'ADN total du moustique ou juste sa patte; a démontré la présence des deux formes *pipiens* (26%) et *molestus* (37%) ainsi que pour la première fois la forme hybride (31%) au niveau des deux sites étudiés de cette région. D'autre part l'utilisation de la patte du moustique comme matrice pour l'identification moléculaire permet également de réaliser d'autres tests sur le même spécimen. L'existence de ces formes au niveau du lac, associée à la faune aviaire porteuse ou réservoir potentiels (oiseaux migrateurs et sédentaires sauvages) risqueraient d'introduire l'arbovirose du WN aux alentours du lac de Reghaïa.

Mots-Clés : *Culex pipiens*, *Culex molestus*, hybrides, WNV, PCR, Lac de Reghaïa, Algérie

Summary

Culex pipiens is the most common mosquito in Algeria. It is widely distributed and colonizes different habitats in urban or rural areas, polluted or cleaned breeding larvae. In addition to the nuisance which it causes, it also the potential vector of West Nile Virus disease (WNV) worldwide. Two forms of the species were described: *pipiens* and *molestus* that are morphologically similar and different in their behavior and biology that may influence the transmission of WN virus. To determine the molecular profile of the *Culex pipiens* complex populations in the lake of Reghaïa, *Culicidea* larvae were collected in different habitats (aboveground and underground). Morphological identification revealed the presence of three sympatric species *Culiseta longiareolata* (15%), *Culex theileri* (16%) and *Culex pipiens* (69%). Molecular typing; multiplex PCR based on microsatellite CQ11 by the use of total DNA from mosquito or just its leg; showed the presence of two forms *pipiens* (26%) and *molestus* (37%) and for the first time the hybrid form (31%) at both of the breeding larvae studied. Furthermore, the use of the leg as matrix for the molecular mosquito identification allows further analyzes on the same specimen. The existence of these forms at the lake associated with the avian wildlife carrier or potential reservoir (migratory and sedentary wild birds) might introduce the arbovirus WN surrounding the lake of Reghaïa.

Key-words: *Culex pipiens*, *Culex molestus*, hybrids, WNV, PCR, Lake of de Reghaïa, Algeria.

الملخص

البعوض كولكس بيبينس هو النوع الأكثر انتشارا في الجزائر. نجده في كل مكان، قادر على التكيف مع بيئات مختلفة من المناطق الحضرية إلى المناطق الريفية، الملوثة منها أو النظيفة. بالإضافة الى ما يسببه من ازعاج، فهو يمثل الناقل المحتمل لأمراض المتنقلة عبر البعوض في العالم. يوجد على نوعين "بيبينس" و "مولستوس" متطابقان من ناحية الشكل ولكنهما يختلفان من حيث السلوك و المناطق التي يعيشان فيها، هذا ما قد يؤثر على انتقال فيروس حمى غرب النيل. التشخيص الجزئي لأفراد المركب " كولكس بيبينس" الموجودة في بحيرة الرغاية ، ثم جمع يرقات "الكوليسديا" من عدة مناطق في البحيرة مكشوفة فوق الارض و اخرى تحت الارض

التشخيص المورفولوجي لهذه اليرقات بين أن ١٥% تنتمي لكليست لوجيولوتة، ١٦% الى كولكس تليغية و ٦٩% لكولكس بيبينس. إن التحليل الجزئي باستعمال نوع من التقنية البيولوجية (ب س آر) المتعددة الأهداف والتي تستهدف منطقة الميكروسيتليت (س ك ١١) باستعمال إما الحمض الريبي النووي للبعوض أو ساقه فقط كأداة للتقنية، قد أظهر وجود الشكلين "بيبينس" بنسبة ٢٦% و " مولستوس" بنسبة ٣٧% ولأول مرة الشكل الهجين بنسبة ٣١% "بيبينس\مولستوس" وهذا في النقاط التي تمت فيها الدراسة. ومن جهة أخرى، فإن استخدام ساق البعوض كنموذج للتشخيص الجزئي، يسمح بإجراء تحاليل و إختبارات أخرى على نفس العينة من البعوض. إن وجود هذه الأشكال من البعوض في بحيرة الرغاية جنبا إلى جنب مع مختلف أنواع الطيور البرية و المهاجرة والتي تمثل الخزان المحتمل لفيروس حمى غرب النيل، يمكن أن يكون سببا في بداية إنتقال هذا المرض في ضواحي بحيرة الرغاية

كلمات البحث: كولكس بيبينس، مولستوس، الهجين، حمى غرب النيل، ب س آر، بحيرة الرغاية، الجزائر

Sommaire	Page
I. Introduction	1
II. Objectif	2
III. Généralités	3
1. Taxonomie	3
2. Les espèces des Culicinea connues en Algérie	4
3. Le complexe <i>Culex pipiens</i>	4
4. Morphologie des Culicinea	6
4.1. Œuf	6
4.2. Larve	7
4.3. Nymphe	9
4.4. Adulte	10
5. Cycle biologique du Moustique <i>Culex pipiens</i>	13
6. Le virus du West Nile	14
6.1. Structure et génome	15
6.2. Le West Nile dans le monde	17
6.3. Le West Nile en Algérie	18
6.4. Conditions écologiques nécessaires à la circulation du virus du West Nile	18
6.5. Cycle de transmission du West Nile	19
6.6. Pathogénèse et manifestations cliniques	20
6.7. Réservoirs du virus West Nile	22
VI. Matériel et méthodes	24
1. Zones d'étude : Lac de Reghaia	24
2. Situation géographique	24
3. Echantillonnage des populations de <i>Culex pipiens</i>	25
4. Mise en couple	27
5. Comptage des pontes	28
6. Identification morphologique	28
7. Typage moléculaire des moustiques	29
7.1. Extraction d'ADN de <i>Culex pipiens</i>	29
7.2. PCR multiplexe	29
7.3. Révélation des produits PCR	31
8. Analyse statistique	31

V.	Résultats et discussion	32
1.	Résultats	32
1.1.	Identification morphologique	32
1.2.	Autogénie et anautogénie	33
	- Reproduction des femelles selon le type de gîte	33
1.3.	Résultats du typage moléculaire	33
	- PCR en fonction du matériel biologique utilisé	34
	- Distribution des formes du complexe <i>Culex pipiens</i> selon la nature du gîte étudié	35
	- L'identification moléculaire des hybrides selon la nature du gîte	
2.	Discussion	36
VI.	Conclusion et perspectives	39
VII.	Références bibliographiques	41
	Annexe 1: Tampons et solutions	
	Annexe 2: Appareillages.	
	Annexe 3: Liste des espèces d'oiseaux observées dans la zone humide de Reghaïa	

INTRODUCTION

I. Introduction

Les Culicinea causent de graves préjudices tant à l'homme qu'aux animaux. Les moustiques du complexe *Culex pipiens* sont connus comme vecteurs d'agents pathogènes dont les principaux sont la filaire de Bancroft *Wuchereria bancrofti* (Brunhes, 1969; Farid et al, 2001), le virus de l'encéphalite japonaise (Rodhain 2010), le virus de la fièvre de la valet du Rift (Kdira et al, 2011; Amraoui, 2012a) et le virus de la fièvre du Nil occidental ou West Nile (Murgue, et al 2001)

En plus d'une compétence vectorielle démontrée dans la transmission du virus West Nile (VWN), de préférences trophiques variées, d'une abondance et d'une longue période d'activité, le virus peut être transmis aux œufs des femelles infectées par voie trans-ovarienne (Murgue et al, 2001, Farajollah et al, 2005), ce qui fait de ce moustique le premier suspect dans le maintien et de la transmission de l'enzootie du VWN (Fechter-Leggett et al, 2012).

Dans la région du Maghreb, le VWN a été responsable de plusieurs épidémies, en Algérie (1994) et en Tunisie (1997) et d'épizooties au Maroc (1996) (Le Guenno et al, 1996; El Harrak et al, 1997; Triki et al, 2001). Dès lors, des cas humains et équin ont été recensés.

L'espèce *Cx. pipiens* existe dans la région du Maghreb (Roubaud, 1945). Au Maroc, le complexe *Culex pipiens* a été caractérisé par biologie moléculaire et identifié la présence des deux formes morphologiquement identiques: la forme *pipiens* et la forme *molestus* ayant des caractères éco-biologiques et des préférences trophiques différents pouvant influencer leurs rôles dans la transmission de certains agents pathogènes (Amraoui et al, 2012b).

L'existence des formes hybrides *pipiens/molestus* a été largement étudiée et prouvé par l'utilisation des techniques moléculaires permettant leur distinction et qui ont la particularité d'avoir un comportement trophique mixte (humain/oiseau).

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail sur l'identification moléculaire des deux formes du moustique *Cx. pipiens*, dans le marais de Reghaia.

II. Objectif

L'objectif de ce travail est, d'une part, d'identifier les deux formes du complexe *Culex pipiens* au niveau du lac de Reghaia, en comparant l'efficacité d'utiliser la patte du moustique et de son l'ADN comme matrice pour la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et d'autre part de conclure sur la probabilité ou la possibilité d'apparition de la maladie du West Nile dans le lac de Réghaïa suivant la faune aviaire présente.

GENERALITES

III. Généralités

1. Taxonomie

Culex pipiens est le moustique le plus fréquemment rencontré en Algérie. Les *Culex* sont des insectes diptères (deux ailes), nématocère (antennes longues) appartenant à la famille de Culicinae (Figure 1).

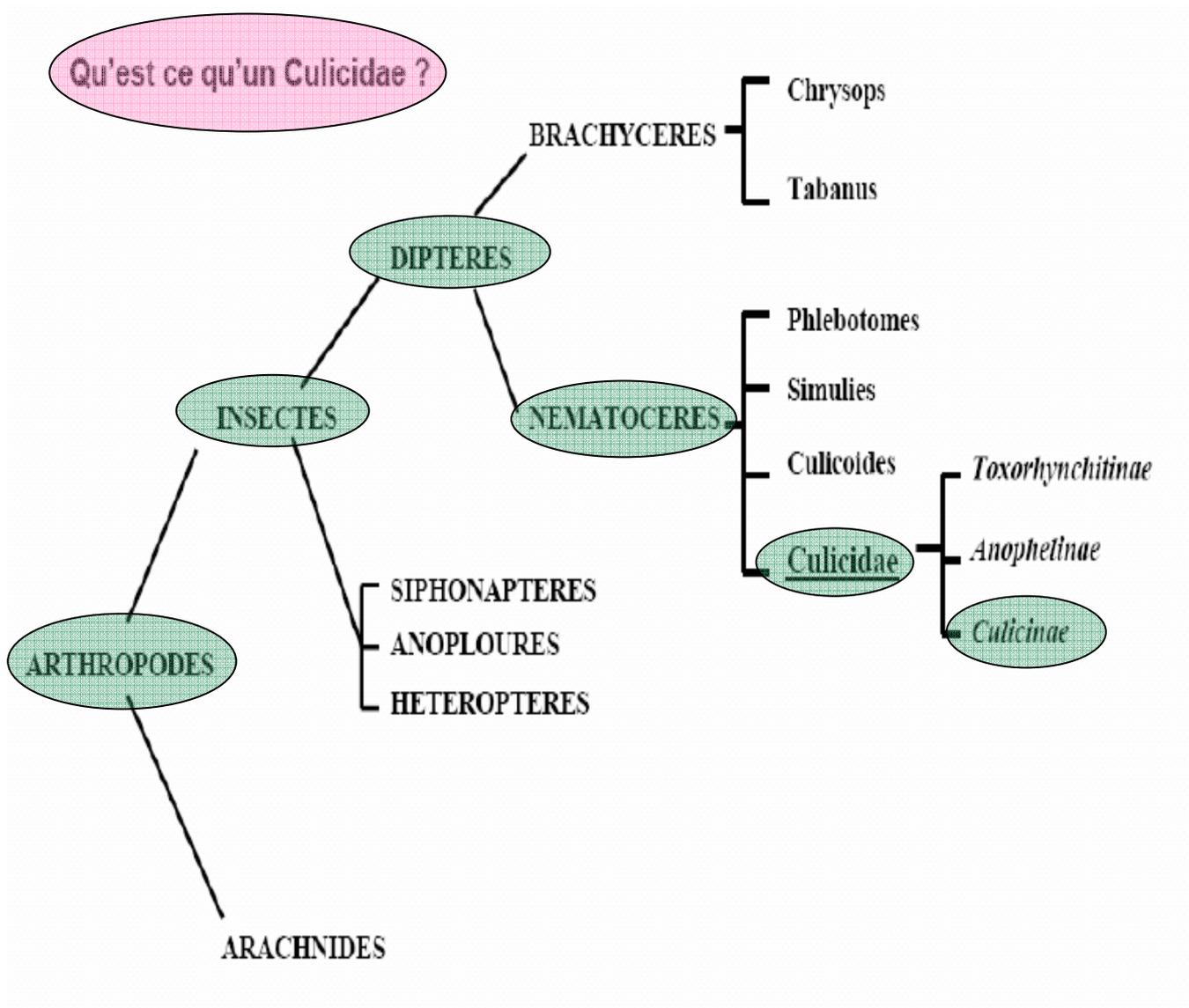


Figure 1 : Taxonomie des *Culicinae* (Rodhan, 1985)

2. Les espèce des Culicinaes en Algérie

Plusieurs espèces du genre *Culex* ont été étudiées et répertoriées depuis très longtemps. Parmi elles, 12 espèces sont connues jusqu'à présent (Senevet et al, 1954).

Tableau I : Les espèces du genre *Culex* rapportées en Algérie (Brunhes et al, 2000)

Espèces
<i>Culex (Culex) pipiens</i> (Linné, 1758)
<i>Culex (Barrodius) pussillus</i> (Macquart, 1850)
<i>Culex (Neoculex) territans</i> (Walker, 1856)
<i>Culex (Neoculex) impudicus</i> (Ficalbi, 1889)
<i>Culex (Barrodius) modestus</i> (Ficalbi, 1890)
<i>Culex (Culex) mimeticus</i> (Neo, 1899)
<i>Culex (Culex) theileri</i> (Theobald, 1903)
<i>Culex (Culex) perexiguus</i> (Theobald, 1903)
<i>Culex (Culex) laticinctus</i> (Edwards, 1913)
<i>Culex (Maillotia) arbieeni</i> (Salem, 1938)
<i>Culex (Neoculex) hortensis</i> (Ficalbi, 1924)
<i>Culex (Neoculex) deserticola</i> (Kirkpatrick, 1924)

3. Le complexe *Culex pipiens*

Le complexe *Culex pipiens* regroupe plusieurs espèces dont: *Cx. pipiens* (Linnaeus, 1758) avec ses deux formes; la forme *pipiens* et la forme *molestus* (Forskal, 1775), *Cx. quinquefasciatus* (Say, 1823), *Cx. pallens* (Coquillett 1898), *Cx. globocoxitus* (Dobrotworsky, 1953) et *Cx. australicus* (Dobrotworsky et Drummond, 1953). D'autres espèces sont étroitement liées ou suggérées appartenir à ce complexe telles que, *Cx. vagans* (Wiedemann 1828), *Cx. fatigans* (Wiedemann, 1828), *Cx. pervigilans* (Von Bergroth, 1889) et *Cx. torrentium* (Martini, 1925) (Vinogradova, 2003, Smith et Fonseca, 2004).

La distinction morphologique de la plupart des espèces appartenant au complexe *Cx. pipiens* est difficile en l'absence de caractères taxonomiques discriminants. Ces difficultés taxonomiques existent même pour des populations de la même espèce.

En effet, l'espèce *Cx. pipiens* comprend deux formes distinctes, *pipiens* et *molestus*, qui sont morphologiquement identiques, mais éco physiologiquement différentes (Harbach et al, 1984, 1985).

La forme *pipiens* est largement distribuée dans toutes les régions tempérées (Mattingly, 1951; Farajollahi et al, 2011) et elle est responsable des épidémies du West Nile aux Etats Unis depuis 1999 (LaDeau et al, 2011; 2013). Elle se développe dans les gîtes épigés c'est-à-dire à ciel ouvert et entre en diapause en hiver, elle est essentiellement ornithophile, anautogène et exige toujours un repas de sang pour déposer sa première ponte.

La forme *molestus*, quant à elle, a une répartition plus limitée : elle prolifère au nord de l'Europe, aux États-Unis, en Australie, au Japon et dans les îles voisines (Harbach et al, 1984; Vinogradova, 2003; Vinogradova et al, 2007, Higgs et al, 2004; Andreadis, 2012). Elle affectionne les gîtes hypogés (fermés) naturels et/ou artificiels comme les stations souterraines du métro (Byrne et al, 1999; Vinogradova, 2000).

Sa présence a été confirmée dans le sud de la France (Gabinaud et al, 1985) et récemment au sud de l'Europe, dans des gîtes à ciel ouvert (Gomes et al, 2009, 2012a).

Elle reste, par conséquent, en activité durant toute l'année, bénéficiant des conditions de températures plus douces qui règnent au sous-sol (Laven, 1951; Harbach, 1984). Cette forme se nourrit principalement sur des mammifères et l'homme y compris (repas de sang obligatoire).

Par ailleurs, la forme *molestus* est autogène, capable d'effectuer une première ponte sans avoir recours à un repas sanguin.

Les deux formes diffèrent également par leur mode d'accouplement. La forme *molestus* est sténogame et peut s'accoupler sur un support, dans des espaces confinés alors que la forme *pipiens* est eurygame et

s'accouple en vol dans des essaims à ciel ouvert (Harbach et al, 1984 ; Berchi et al, 2012).

Les deux formes sont génétiquement isolées au nord de l'Europe, alors qu'il existe des formes hybrides aux États Unis présentant des préférences trophiques mixtes pour les oiseaux et les mammifères (Fonseca et al, 2004; Kilpatrick, 2007). Depuis, l'étude des hybrides s'est étalée sur toute les régions qui abritent les deux formes (Smith et al 2004; Amraoui et al, 2012b; Gomes et al, 2013; Osório, 2013).

Des hybrides ont aussi été identifiés pour d'autres espèces du complexe *Culex pipiens* tel que (*molestus/quinquifasciatus* et *pipiens/quinquifasciatus*) en utilisant des différences génétiques basés sur plusieurs marqueurs moléculaires, ribosomale et nucléaire Ace2, COI et CQ11 (Crabtree et al, 1997 ; Bahnk et al, 2006; Shaikevich, 2007; Gomes et al, 2012b; Rudolf et al, 2013).

4. Morphologie des Culicinae

4.1 Œuf

L'œuf comprend de l'intérieur vers l'extérieur; l'embryon, la membrane vitelline pellucide, un endo-chorion épais et un exo-chorion plus ou moins pigmenté et ornementé, il est de 0.5 mm de taille (Rodhan, 1985).

Au moment de la ponte, les œufs sont blanchâtres et prennent rapidement, par oxydation de certains composants chimiques de la thèque, une couleur marron ou noire. Les œufs sont pondus sur la surface de l'eau réunis par 200 a 400 en nacelle dont l'arrangement leur permet d'être insubmersibles (figure 2) (Berchi, 2000).



Figure 2 : Radeau d'œufs de *Culex* (IPA 2013).

4.2 Larve

Les larves sont aquatiques et leur évolution comporte quatre stades de taille variant du millimètre au centimètre. Les larves sont de type eucéphale. Leurs téguments sont formés d'un certain nombre de strates dont la plus externe forme le revêtement chitineux (Rodhan, 1985).

Elles sont composées d'une tête très dure, d'un thorax et d'un abdomen plus ou moins, mous (figure 3).

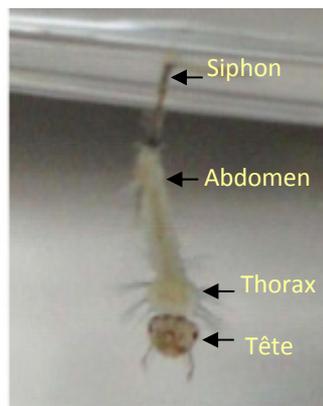


Figure 3 : La forme générale d'une larve de *Culex* (Rodhan, 1985).

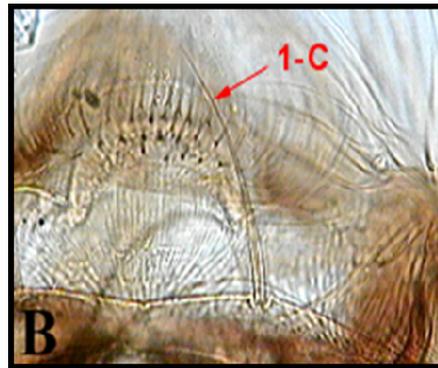
La Tête

La tête est bien dégagée du thorax. Elle est formée de 3 plaques chitineuses unies par des sutures :

- Une plaque dorso-médiane unique : le fronto-clypeus
- deux plaques latérales symétriques : les épicroâniennes

Elle porte dorsalement une paire d'antennes, deux paires d'yeux (yeux larvaires et yeux du futur imago) et ventralement deux palpes maxillaires et les pièces buccales. Les plaques sont ornées de soies de morphologies variables qui servent à l'identification (figure 4). Par ailleurs la tête est capable d'effectuer une rotation de 180° autour de son axe qui lui permet de se nourrir à la surface de l'eau (Berchi, 2000).

Figure 4: Epine préclypéale 1-C
(Brunhes et al, 2000)



Le thorax

Il fait suite au cou et sa forme est grossièrement quadrangulaire. Il est formé de 3 segments soudés: le prothorax, le mésothorax, le métathorax.

La face dorsale est ornementée de soies dont les plus utilisées pour l'identification sont la soie 3P, 4P et 8P prothoraciques (figure 5), (Brunhes et al, 2000).

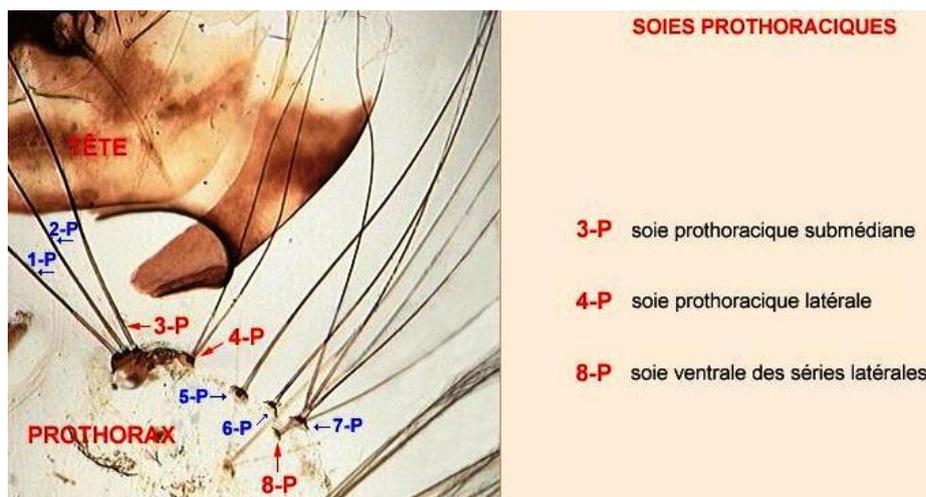


Figure 5 : Soies prothoracique du thorax d'une larve
(Brunhes et al, 2000).

L'abdomen

Il est formé de 09 segments distincts, les 7 premiers sont morphologiquement similaires.

Sur la partie dorsale du 8^{ème} segment se situe le siphon (organe de respiration). Il porte également le peigne constitué d'un nombre variable d'épines utilisé dans l'identification morphologique.

Sur le IXème segment s'insèrent les soies anales et les papilles anales, translucides (figure 6), (Brunhes et al, 2000).

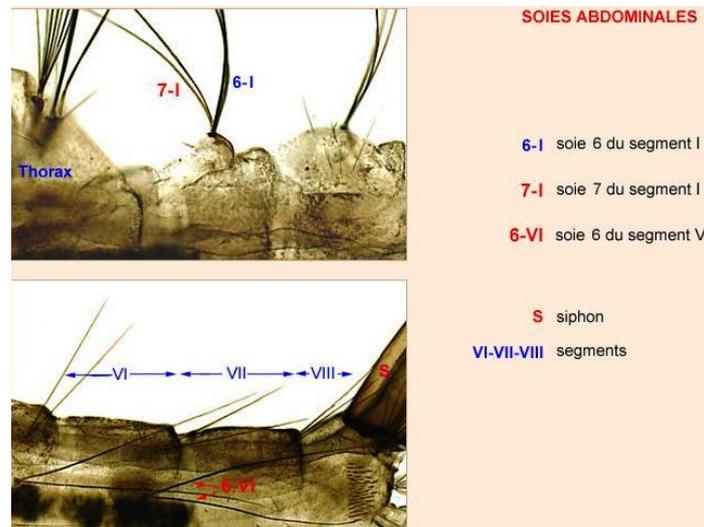


Figure 6: Soie d'identification de l'abdomen de larve (Brunhes et al, 2000)

4.3 Nympe

C'est une puppe mobile en forme de virgule vivant dans l'eau qui ne se nourrit pas. Elle est formée d'un céphalothorax globuleux sur lequel s'insèrent 2 trompettes respiratoires, d'un abdomen dont le 8^{ème} segment porte 2 palettes natatoires (Rodhan, 1985).

Au fur et à mesure qu'approche la fin du stade nymphal, la morphologie de l'adulte contenu dans l'exuvie devient de plus en plus visible par transparence ; l'augmentation de la pression interne entraîne un déchirement de la cuticule du céphalothorax, émettant l'émergence de l'imago. La dépouille nymphale va servir de radeau jusqu' au durcissement complet de l'adulte (Figure 7), (Berchi, 2000).

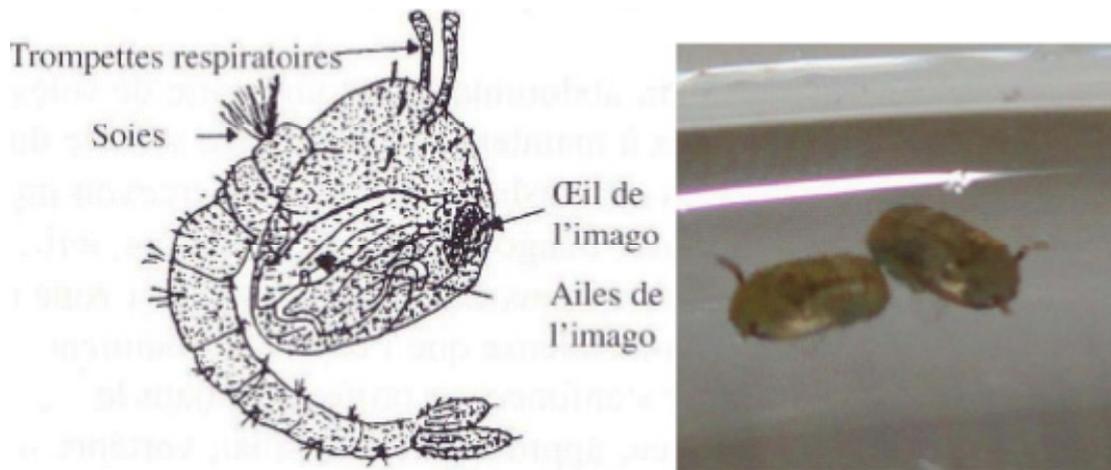


Figure 7 : Structure de la nymphe (Rodhan 1985)

4.4 L'adulte

Le corps est composé de 3 parties la tête, thorax et l'abdomen.

L'exosquelette est composé de plaques rigides (sclérites) reliées entre elles par des membranes chitineuses minces. Chaque segment du corps (métamère) est formé par un tergite appelé sclérite (dorsal), sternite (ventral) et pleurite (latéraux), (Rodhan, 1985).

Les téguments portent des ornements (soies ou écailles) qui jouent un rôle protecteur. La disposition, la couleur des écailles servent dans la taxonomie (Figure 8).



Figure 8: Adulte *Culex pipiens*, mâle (à gauche) et femelle (à droite) (IPA 2013)..

La tête

La tête globuleuse et bien dégagée du thorax est portée par un cou étroit. Les yeux, très grands, réniformes sont composés d'yeux élémentaires (ommatidies) juxtaposés et occupent la majeure partie de la tête. Les antennes, implantées dans la région faciale sont formées de plusieurs segments et d'un bourrelet d'insertion globuleux, le scape. Une autre partie, le flagellum ou flagelle est composé d'articles en nombre variable selon le sexe. Entre chaque article s'insèrent des soies courtes chez les femelles (antennes glabres) et très longues chez les mâles (antennes plumeuses) (Figure 8), (Brunhes et al, 2000).

La trompe ou proboscis est un organe impair situé dans la partie inféro-médiane. Sa structure est différente selon le sexe :

Chez la femelle hémaphysogène le proboscis est composé de:

- ✓ Trois pièces impaires qui sont de haut en bas : l'épipharynx, l'hypopharynx et le labium.
- ✓ Quatre pièces paires et symétriques représentées par deux mandibules en haut et deux maxilles en bas.

Toutes ces pièces pénètrent dans la peau lors de la piqûre sauf le labium qui se coude. Ce dernier, forme la gaine de la trompe et enveloppe donc toutes les autres pièces (Rodhan, 1985).

Chez le mâle, qui ne se nourrit pas de sang mais de sucres végétaux, seuls persistent l'épipharynx et le labium. Les autres pièces buccales foreuses sont atrophiées (Brunhes et al, 2000).

Figure 9: La composition de la tête d'un moustique (Brunhes et al, 2000).



Le thorax

Il est formé, de 3 segments fusionnés : le prothorax, le mésothorax et le métathorax. Chaque segment porte une paire de pattes. Le mésothorax est très volumineux et porte les ailes (figure 10) (Brunhes et al, 2000).

Le métathorax porte les balanciers (équilibre), une paire de patte articulée et les ailes. Ces dernières, longues et étroites, sont formées par deux membranes accolées soutenues par des nervures longitudinales et transverses. Ces nervures sont garnies d'écailles squameuses dont la disposition sert en taxonomie.

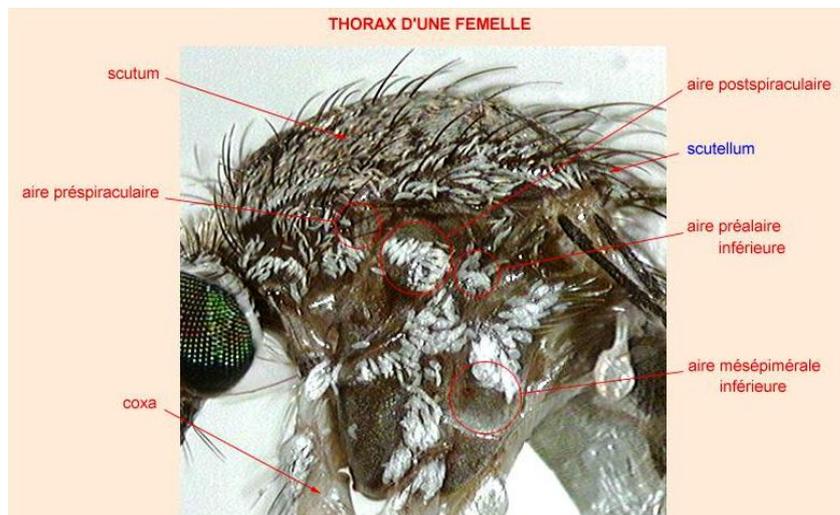


Figure 10: le thorax d'une femelle adulte et critères d'identification (Brunhes et al, 2000).

L'abdomen

Généralement pourvu d'écaille (Figure 11), l'abdomen est composé de dix segments dont huit seulement sont visibles extérieurement. Les sept premiers sont identiques. Les pleurites sont souples et à leurs niveaux s'ouvrent les stigmates respiratoires (Brunhes et al, 2000).

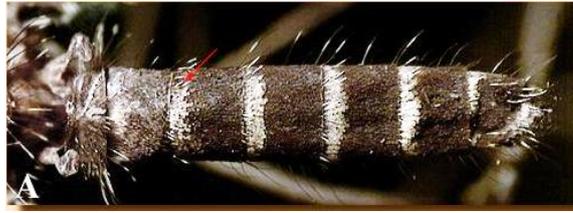


Figure 11 : Abdomen d'un adulte de *Culex* (Brunhes et al, 2000).

Chez la femelle, le dernier segment porte le cerque. L'orifice anal est dorsal par rapport à l'orifice vaginal.

Chez le mâle, il existe une rotation de 180° des segments 8, 9 et 10. Ce phénomène apparaît entre la 12^{ème} et la 24^{ème} heures, après l'émergence. Ainsi l'orifice anal devient ventral, tandis que l'orifice génital devient dorsal (Rioux, 1958).

5. Cycle biologique du moustique *Culex pipiens*

Le cycle vital du moustique *Culex* est holométaboles ou à métamorphose complète. Les stades : œuf, larve et la nymphe sont aquatiques, alors que le stade adulte est aérien.

L'accouplement se fait en vol dans les essaims. La femelle une fois fécondée, part en quête d'un repas de sang et se pose dans un endroit abrité pour digérer son repas. Quelques jours plus tard, elle pond dans différents milieux aquatiques. Après sa sortie de l'œuf, la minuscule larve grandit en passant par quatre stades larvaires puis se transforme en nymphe qui reste active et ne se nourrit pas.

Les mâles ne vivent généralement que quelques jours, puisant dans le nectar des fleurs, les sucres qui leur fournissent de l'énergie et dont le rôle se résume à la fécondation des femelles.

L'émergence de l'insecte adulte a lieu à la surface de l'eau. La nymphe s'étire, son tégument se fend dorsalement et, très lentement, le moustique s'extirpe de l'exuvie (Figure 12) (Anonyme 1).

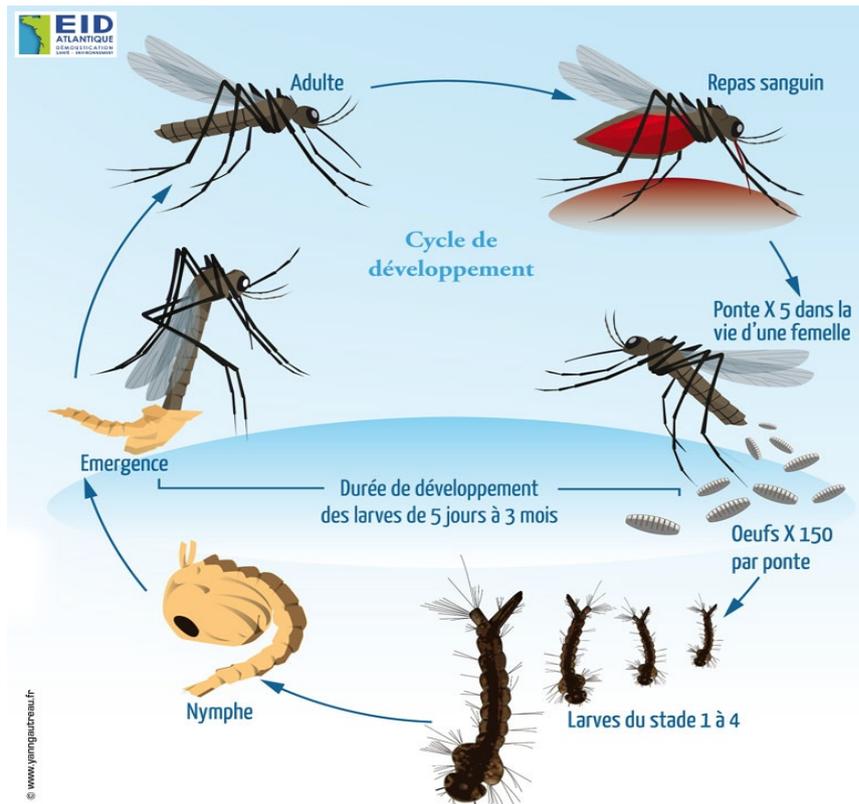


Figure 12: Cycle biologique du moustique *Culex pipiens* (Anonyme 1)

6. Le virus du West Nile

Le VWN est un arbovirus (**AR**thropod **BO**rne **VIRUS**) isolé pour la première fois en 1937 en Ouganda dans la province du Nil occidental dans le sérum d'une femme souffrant d'un syndrome fébrile (Haye, 2001, Campbell et al, 2002).

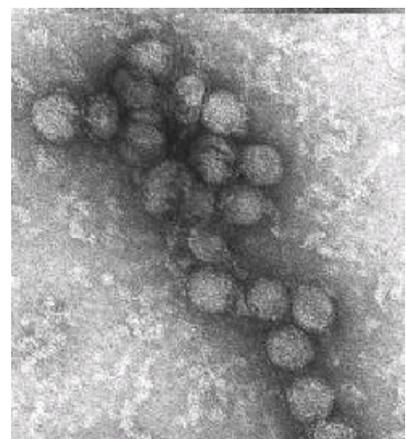


Figure 13 : Structure du flaviviridae (Anonyme 2)

Longtemps resté confiné en Afrique subsaharienne, en Asie et au Moyen-Orient où il sévissait de façon endémique, le VWN est actuellement présent sur tous les continents avec des flambées épidémiques de gravité, de fréquence et d'ampleurs variables (Calistri et al, 2010).

Le virus a été isolé à partir de *Culex pipiens* à plusieurs reprises (Esteves et al, 2005; Faradj et al, 2006). Dans une étude réalisée à Madagascar, plus de 70 souches de virus ont été isolées de vertébrés et de Culicidae, ce qui en fait l'arbovirose la plus répandue dans cette région (Fontenille et al, 1989).

La compétence vectorielle de ce vecteur pour le virus du West Nile a été prouvée expérimentalement dans plusieurs régions du monde (Turell et al, 2001; Tiawsirisup et al, 2005).

6.1 Structure et génome

Le VWN est un Flavivirus de la famille des Flaviviridae (Figure 14). C'est un virus enveloppé, sphérique de 50 nm de diamètre. Le génome viral est un ARN simple brin de polarité positive qui code une poly protéine d'environ 3400 acides aminés. Le clivage de cette protéine génère trois protéines structurales (protéines C de la capsid, prM/M de la membrane et E de l'enveloppe) et sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) nécessaires à la réplication virale (Petersen et Roehrig, 2001; Zeller et al, 2004).

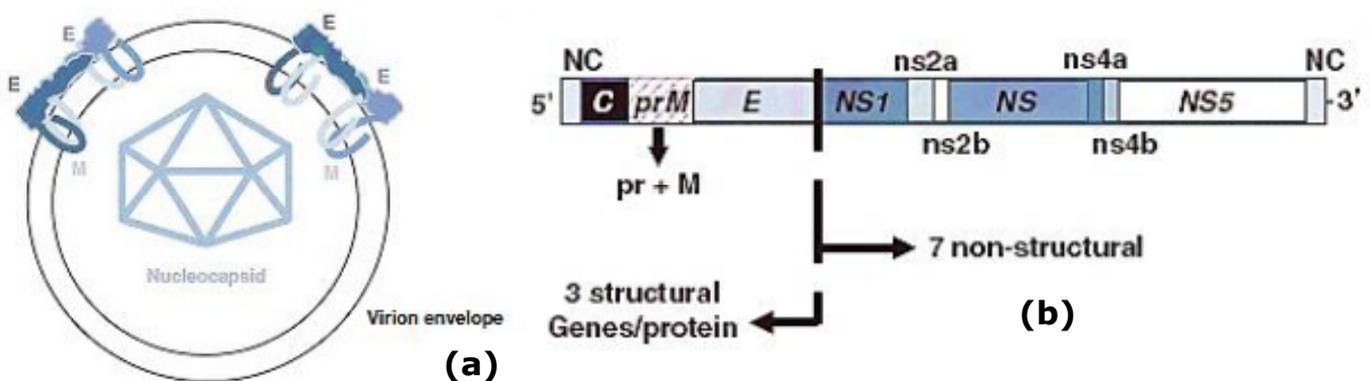


Figure 14 : Schéma de l'ultra structure (a) et du génome (b) d'un Flavivirus (Petersen et Roehrig, 2001).

Des études phylogénétiques basées sur l'analyse des séquences nucléotidiques d'un fragment de 255 pb du gène codant pour la glycoprotéine E, ont montré que les isolats du VWN de différentes régions géographiques sont classés en deux lignages majeurs (1 et 2), présentant 25 à 30% de différences nucléotidiques (Lanciotti, 2002) (figure 15).

- ✓ Le lignage 1 : Souches qui circulent en Afrique de l'Ouest, Moyen Orient, Europe de l'Est, Amérique du Nord et Australie (Lecollinet et al, 2012).
- ✓ Lignage 2 : Répartition géographique restreinte, il circule en Afrique sub-saharienne et Madagascar, Hongrie, en Grèce et en Italie (Bakonyi et al, 2006; Papa et al, 2011).

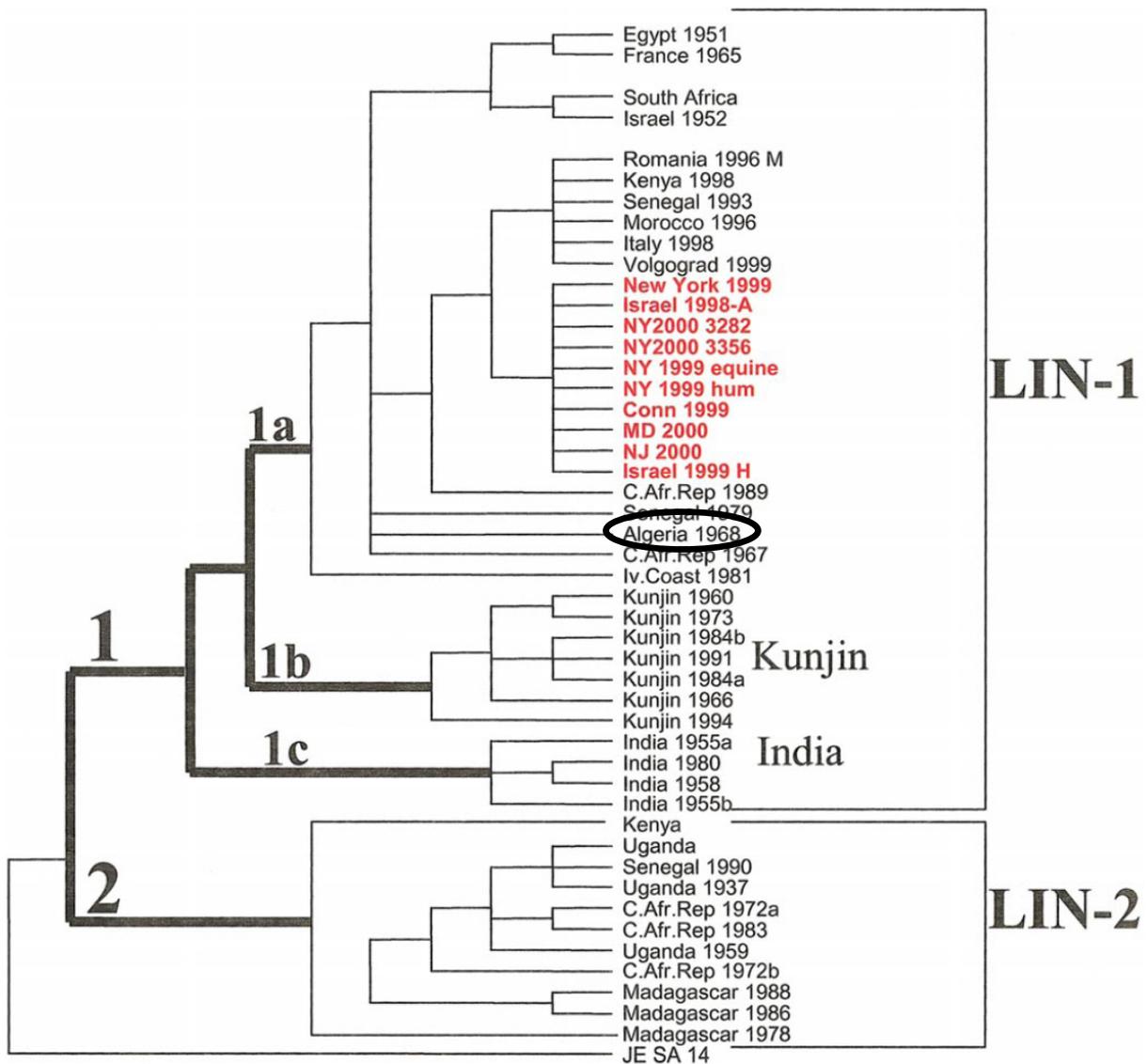


Figure 15 : Arbre phylogénétique du virus West Nile, établi à partir du séquençage du génome complet des souches virales (Lecollinet et al, 2012).

6.2 Le West Nile dans le monde

Plusieurs épidémies ont éclaté à travers le monde depuis la réémergence de la maladie. Parmi elles, celle de Roumanie en 1996 et 2010 avec plus de 500 cas d'encéphalite et 17 morts (Tsai et al, 1998), Tunisie 1997 (Triki et al, 2001), Russie en 1999 et 40 décès rapportés (Platonov, 2001) et celle des Etats Unis durant la même année où 62 cas d'encéphalite humaine ont été enregistrées avec 7 morts et plusieurs cas équins et aviaires.

Depuis le VWN a élargi son aire de distribution en atteignant l'ensemble des Etats Unis, le Canada (Pepperell et al, 2003), l'Amérique latine (Adrianet et al, 2008) et l'Asie (Dehghan et al, 2010a et 2013b).

L'extension de l'infection du VWN à l'échelle mondiale est favorisée par la multiplicité du réservoir, constitué par plusieurs espèces aviaires, notamment les oiseaux migrateurs, et par l'abondance, dans le monde entier, du principal vecteur, le moustique ornithophile du genre *Culex*.

L'infection par le VWN constitue l'exemple type de maladie émergente et ré émergente avec une intensification de la circulation ces dernières années particulièrement sur le pourtour du bassin méditerranéen (Balenghien, 2006).

6.3 Le West Nile en Algérie

Le virus a été isolé la première fois en Algérie en 1968 à partir d'un pool de 215 moustiques du genre *Culex* prélevé dans la région de Djanet, dans le cadre d'une enquête sur la peste équine (Pilo-moron et al, 1970).

La fièvre West Nile a fait son apparition dans le sud ouest algérien en 1994 (Tinerkouk, wilaya d'Adrar) et était responsable de 20 cas dont 8 décès (Le Guenno et al, 1996; Murgue al, 2001; Mesbah, 2009). Les malades ont présenté une forte fièvre associée à des symptômes neurologiques, quelques fois avec un état comateux

Le dernier cas a été reporté en Octobre 2012. Il s'agit d'un vacancier de 74 ans qui a séjourné en Algérie pendant l'été 2012 et est rentré en France en Septembre où il décède après être hospitalisé à cause d'une forte fièvre et des troubles cognitifs (Anonyme3, 2012).

6.4 Conditions écologiques nécessaires à la circulation du virus du West Nile

L'amplification du virus mettant en jeu des oiseaux et des moustiques ornithophiles, elle implique d'une part la présence d'hôtes qui s'infectent à partir des moustiques et vis-versa. La réalisation de ces différentes étapes

dépend de la présence de plusieurs facteurs liés aux vecteurs et aux hôtes :

- Des moustiques compétents : Apte à être infecté par le virus, assuré son développement et à le retransmettre efficacement à un autre hôte sensible (Balenghien, 2006).
- Des oiseaux compétents ou réservoirs compétents : qui représente la capacité d'une espèce hôte à être infectée et à présenter l'agent infectieux à des vecteurs (Komar et al, 2003).
- Des interactions entre moustiques et hôtes compétents : Le contact vecteurs-hôtes dépend de plusieurs facteurs tels que, les préférences écologiques et le cycle d'activité des hôtes et des vecteurs ; les préférences trophiques des vecteurs ; le comportement de défense des hôtes ; la densité et la diversité des vecteurs et des hôtes (Balenghien et al, 2006).
- Une météorologie favorable : en particulier la température qui favorise non seulement l'abondance et l'activité des moustiques vecteurs, mais aussi la période d'incubation extrinsèque, qui correspond au temps nécessaire à l'amplification du virus chez les vecteurs (Jourdain. et al, 2007).

6.5 Cycle de transmission du virus du West Nile

Le cycle naturel du virus West Nile comprend les oiseaux, qui sont les principaux hôtes amplificateurs, et plusieurs espèces de moustiques qui jouent le rôle de vecteurs (figure 15). Les auteurs font le point sur les découvertes les plus récentes relatives à l'épidémiologie, à la dynamique de la transmission et aux aspects cliniques de l'infection par le virus West Nile, en mettant l'accent sur les facteurs spécifiques susceptibles de favoriser les changements de distribution de la maladie, tels que le changement climatique et ses effets sur les vecteurs potentiels du virus ou sur les routes migratoires des oiseaux. (Pradier. et al, 2012).

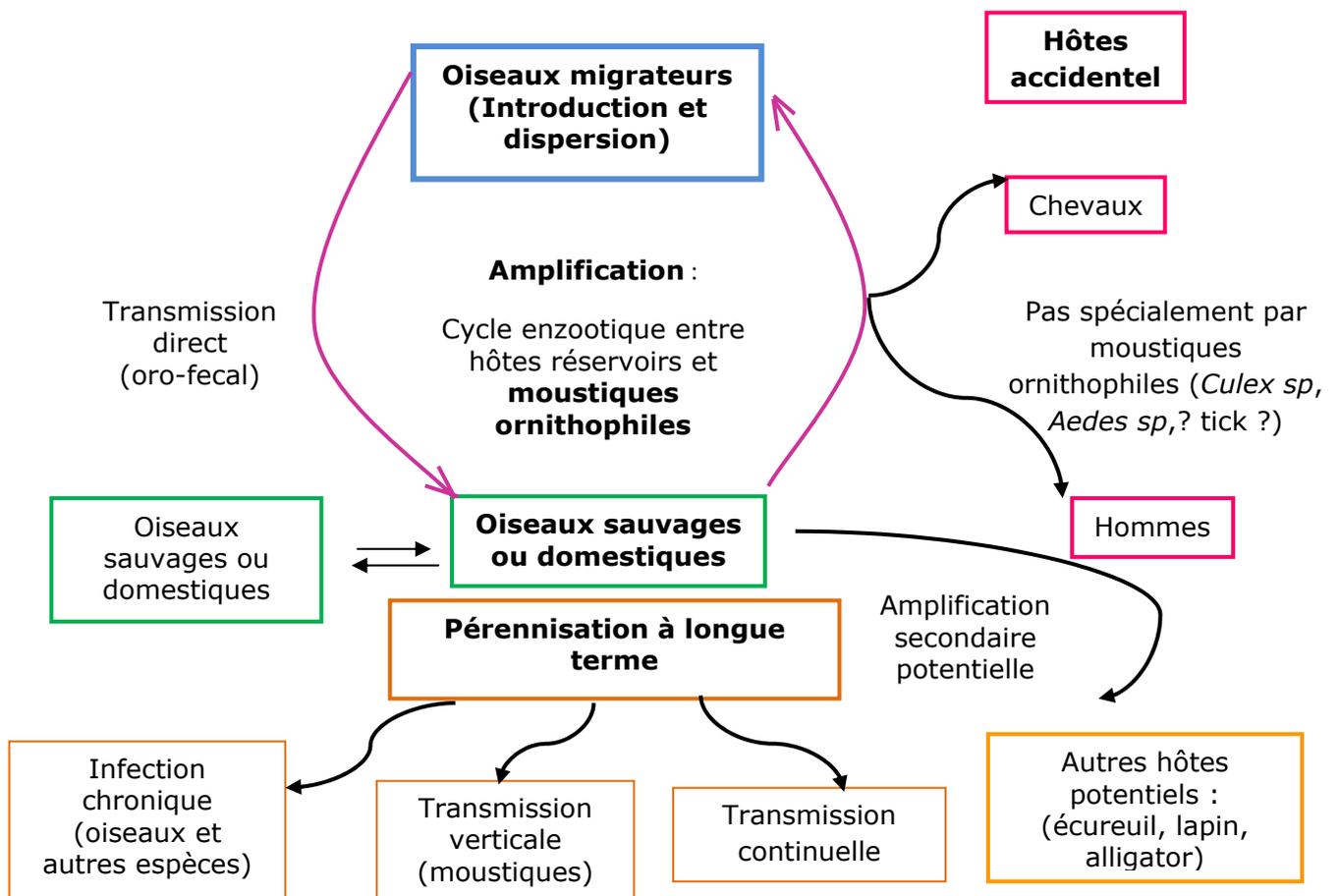


Figure 16 : Cycle de transmission du virus du West Nile (Pradier, 2012 modifié).

6.6 Pathogénèse et manifestations cliniques

Chez l'oiseau sensible, après une piqûre de moustique infecté, le virus provoque une petite nécrose au point d'inoculation et se propage dans les ganglions lymphatiques.

Le virus atteint le système nerveux central, infecte directement les neurones et induit leur destruction et conduit à une paralysie.

Chez l'homme la maladie se caractérise par une fièvre, maux de tête, fatigue, douleurs musculaire, symptômes gastro-intestinaux et quelques éruptions sur le tronc sont parfois signalées. Des complications sévères peuvent se présenter pouvant aller jusqu'à la méningo-encéphalite aigue (Hayes et al, 2005).

Le diagnostic repose sur la recherche des anticorps de type IgM et IgG spécifiques du virus dans le sérum et dans le liquide céphalorachidien (LCR Lecollinet et *al*, 2012) par la technique ELISA. Quand ces derniers s'avèrent positif, le résultat est confirmé en recherchant la molécule d'ARN du virus par RT-PCR (Zientara et *al*, 2001; Triki et *al*, 2001; Hachid et *al*, 2013). Le virus a aussi été retrouvé dans le sang des donneurs ce qui a amené à l'installation de système de surveillance des banques de sang (Sharifi et *al*, 2010).

La plus part des informations sur la pathogénèse des encéphalites à West Nile sont tirées des études expérimentales effectuées chez les mammifères notamment les rongeurs.

Les mécanismes d'infection chez les hôtes aviaire sont toujours mal connus. Une étude récente a montré que le virus se multiplie dans le site de pique puis atteint le système nerveux centrale (par le biais du sang) et/ou d'autres organes majeurs tel que le foie, la rate, les reins et le cœur (Gamino, 2013).



Figure 17 : Distribution géographique des cas de méningo-encéphalite à virus du West Nile dans le monde (Bougatef et *al*, 2012).

6.7 Réservoir du virus

L'étude du rôle des oiseaux sauvages migrateurs dans les cycles épidémiologiques, en tant qu'hôtes principaux ou secondaires, nécessite de comprendre les relations qu'ils entretiennent avec les autres organismes (hôtes et pathogènes) et leur environnement.

Plusieurs études de terrains ont suggéré que la dynamique de transmission du virus du West Nile est fortement influencée par la distribution de certaines espèces d'oiseaux considérés comme réservoirs du virus (Hamer et al, 2009). Les oiseaux peuvent avoir un rôle dans l'introduction, l'amplification, l'émergence et la dissémination du VWN. Ils jouent aussi un rôle de sentinelles pouvant ainsi signaler les périodes d'activité du VWN dans les zones à risque (Jourdain et al, 2007).

L'étude sur la richesse de l'avifaune dans la région d'Alger (Milla et al, 2012), a révélé la présence de 78 espèces d'oiseaux dont 54 au niveau du marais de Réghaïa. L'ordre des Passeriformes (exemple de passereau) occupe la première place suivit par celui des Colombiformes (exemple colombe et pigeon).

L'origine biogéographique de l'avifaune du sahel algérois est résolument paléarctique (Europe, Asie, Afrique du Nord et une partie de du moyen orient).

D'après les connaissances actuelles, les oiseaux constituent la composante la plus remarquable du site. 206 espèces y ont été répertoriées, soit 54,5 % du total présumé des espèces d'Algérie qui est de 378 espèces (Thibault, 2006). Parmi celles-ci, 55 sont protégées par la réglementation algérienne.

Les recensements réalisés jusqu'à 2004 montrent que le site est riche en période hivernale, avec 2000 à 3000 oiseaux d'eau recensés chaque hiver. Les espèces les plus abondantes durant cette période sont le Fuligule nyroca (*Aythya fuligula*), le Canard colvert (*Anas platyrhynchos*), canard

souchet (*Anas clypeata*), le Fuligule milouin (*Aythya ferina*) et la Foulque macroule (*Fulica atra*).

Les autres oiseaux d'eau hivernants le plus régulièrement sont le Grèbe à cou noir (*Podiceps nigricollis*), le Grèbe castagneux (*Tachybaptus ruficollis*), le Canard siffleur (*Anas penelope*) et le Tadorne de Belon (*Tadorna tadorna*), (Thibault, 2006).



Figure 18 : Fuligule nyroca



Figure 19 : Canard souchet,



Figure 20: Ibis falcinelle



Figure 21: Flamant rose



Figure 22: Echasse blanche

De très nombreuses espèces d'oiseaux migrateurs et hivernants inféodés aux milieux aquatiques font étape de façon plus ou moins prolongée sur le lac et en période de migration et d'hivernage (canards, marouettes, guifettes, petits échassiers de rivage, passereaux paludicoles). Plusieurs espèces emblématiques sont régulièrement présentes comme le Flamant rose (*Phoenicopterus ruber*). Des oiseaux bagués originaires de Camargue, France, qui sont régulièrement contrôlés ont aussi été retrouvés dans la région tel que l'Echasse blanche (*Himantopus himantopus*) et l'Ibis falcinelle (*Plegadis falcinellus*) (Thibault, 2006).

D'autres espèces sauvages telles que le Perdrix rouge, très abondant en Algérie, semble avoir un rôle important dans l'amplification et la diffusion du virus du West Nile (Sotelo et al, 2011).

MATERIELS & METHODES

VI. Matériels et méthodes

1. Zone d'étude

Le lac de Réghaïa est la seule zone humide de la région algéroise qui donne face directement à la mer méditerranéenne, permettant de jouer un rôle d'étape pour les oiseaux migrateurs après la traversée de la méditerranéenne. L'intérêt du marais est souligné par son isolement géographique et sa position face à la Camargue et à mi-chemin entre les voies migratoires classiques de Gibraltar et du détroit Sicilo-Tunisien. Cette réserve naturelle est un lieu de passage et de reproduction très important pour les oiseaux migrateurs.

Elle est d'une importance internationale puisqu'elle est répertoriée dans la liste Ramsar et abrite une grande diversité biologique, on y retrouve une richesse floristique de 243 espèces végétales, ainsi qu'une richesse faunistique remarquable avec 203 espèces d'oiseaux, 11 mammifères, 09 espèces entre reptiles et amphibiens ainsi qu'environ 40 espèces marines (Thibault, 2006).

2. Situation géographique

Le lac de Reghaïa est situé à 30 km d'Alger, à la limite Nord- Est de la plaine de la Mitidja (3°10'E ,36°25'N).

Ce périmètre est bordé au Nord par la mer Méditerranéenne, au Sud par la route nationale n°5 reliant Alger à Constantine ,à l'Est par la ville de Boudouaou et à l'Ouest par la ville de Ain-Taya.

La région d'étude appartient à l'étage bioclimatique allant de l'humide à sub humide à hiver tempéré selon les données de 2000 à 2009.

L'avifaune sauvage du lac de Réghaïa comprend 206 espèces d'oiseaux. Ce total représente 54,50% du total présumé des espèces d'Algérie qui est de 378 espèces (Thibault, 2006).



Figure 23: Plan général de la réserve naturelle du lac de Réghaia

3. Echantillonnage des populations de *Culex pipiens*

3.1 Récolte des larves :

L'étude de la faune et de la dynamique des espèces de moustiques se fait par la collecte des larves au niveau des gîtes (hypogés et épigés) chaque 15 jours du début du printemps jusqu'à la fin de l'été.

Durant ce travail, les prélèvements ont été réalisés entre le mois d'Avril et Juin 2013 après la saison des pluies. Nous avons choisi :

- ✓ Des sites ouverts tel que : rentrée de la réserve, chalet d'hébergement, stations de pompage et le quai flottant.
- ✓ Des sites fermés : représentés par les regards des eaux d'assainissements.

Nous avons utilisé la technique de "Dipping" ou de la louche (Service, 1993; Roy, 2001) (Figure 24). Elle consiste à récupérer 10 coups de louches (0.5 litres d'eau par louche environ) en bordure du gîte larvaire. L'estimation de la densité larvaire des gîtes se fait selon le tableau II.

Tableau II : Estimation de la densité larvaire

Classe	Nombre approximatif de Stade pré-imaginaux
1	0 et < 1
2	10 (1 - 10)
3	50 (11 - 50)
4	100 (51 - 100)
5	500 et > 100

Les larves sont placées dans un récipient en plastique non fermés hermétiques et placer à l'ombre lors de leurs acheminements au laboratoire.



Figure 24: Récolte des larves (Dipping) et gîtes de récolte

3.2 Elevage des larves :

Une fois au laboratoire, les larves sont placées dans des bacs en plastique (30cm x 20cm x 5cm) contenant l'eau du gîte et sont nourries avec des aliments pour poissons.

Figure 25 : Larves de moustique en élevage



4. Mise en couple

Après émergence des adultes, ces derniers sont mis en couple dans des gobelets en carton d'un volume de 50 cl dans lesquels on a préalablement introduit une petite boîte de Petrie contenant un peu d'eau distillée et sans couvercle qui servira de pondoir.

Les gobelets sont soigneusement couverts avec un tulle moustiquaire maintenue avec un élastique et sur laquelle est déposé un bout de coton imbibé d'une solution sucrée de 10%.

Ainsi, nous avons formé 40 couples pour chaque type de gîte. Pour le gîte épigé, nous avons choisi des adultes des différents points de récolte à savoir : Rentrée du lac, chalet d'hébergement, station de pompage et le quai flottant.

Durant la période d'élevage, une température de 27°C et un taux d'humidité de 60% à 70% sont maintenus dans l'insectarium, avec une photo période de 12h/12h (lumière/obscurité).

Après un mois de mise en couple, les femelles qui ont ou pas pondu ainsi que les mâles ont été retirés à l'aide d'un aspirateur à bouche. Ils ont été identifiés puis placés au congélateur (-20°C) pour l'étude moléculaire.



Figure 26 : Mise en couple d'adultes de moustiques

5. Comptage des pontes

Après la ponte, les œufs de chaque femelle sous forme de nacelle sont comptés sous loupe binoculaire.



Figure 27 : Nacelle d'œufs de *Culex pipiens* (IPA 2013)

6. Identification morphologique

Les larves du stade 4 et les adultes ont été identifiés après leurs montages en utilisant le logiciel d'identification des moustiques (Brunhes et al. 2000).

6.1 Montage des larves

Afin d'avoir une vue globale sur les espèces de Culicidea présentes dans les différents gîtes, nous avons procédé comme suit :

- Les larves sont tuées avec de l'éthanol 70% puis déposées sur une lame en position ventro-dorsale.
- Le siphon respiratoire est séparé du reste de la larve après le 7^{ème} segment à l'aide d'un bistouri.
- La larve est éclaircie avec une goutte de polyvinyle alcool (PVA) puis recouverte avec une lamelle et laissée toute la nuit pour une bonne diffusion du PVA.
- Observation sous microscope optique à différents grossissements.

6.2 Montage des adultes

- Après émergence, les adultes sont récupérés avec un aspirateur et mobilisés par le froid (- 20°C) pendant une demi heure.

- Les adultes sont montés sur un minucie et identifiés sous loupe binoculée.

7. Typage moléculaire des moustiques

Les moustiques du complexe *Cx. pipiens* ont été préalablement triés et retenus pour le typage moléculaire.

7.1 Extraction d'ADN de moustique

Nous avons adopté la méthode d'extraction au Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) sur un moustique entier suivant le protocole de Myriam et Cécile (2003), (Wagner et al, 1987).

Protocole expérimental

1. Broyer chaque moustique dans 200 µl de CTAB 2% (Annexe).
2. Mettre au Bain-marie 65° pendant 5 minutes.
3. Ajouter 200 µl de chloroforme et mélanger par inversion.
4. Centrifuger 5 minutes à 12000 rpm à Température Ambiante (TA).
5. Prélever la phase supérieure, la mettre dans un autre tube puis ajouter 200 µl d'Isopropanol froid et bien mélanger par inversion.
6. Centrifuger 15 minutes à 12000 rpm à TA.
7. Vider l'Isopropanol, bien égoutter et ajouter 200 µl d'éthanol 70%.
8. Centrifuger 5 minutes à 12000 à TA.
9. Vider l'éthanol 70%, sécher le culot à TA.
10. Reprendre le culot dans 20 µl de tampon d'élution, laisser suspendre sur la paillasse toute la nuit (ou une demi journée).
11. Conserver l'ADN à +4°C jusqu'au jour d'utilisation.

7.2. PCR multiplexe

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une méthode d'amplification génique qui permet de générer d'une manière exponentielle un nombre de copies 2^n de la région d'ADN cible par le biais d'amorces spécifique en passant par trois étapes essentielles : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation.

Afin de distinguer entre les deux sous espèces jumelles du complexe *Culex pipiens*, nous avons utilisé une PCR multiplexe qui repose sur l'amplification de la région flanquée du microsatellite CQ11, selon le protocole de (Bahnck et al, 2006).

Protocole expérimental

- Dans un volume final de 20µl de mélange réactionnel on rajoute à des concentrations finales 250µM de dNTP, 2mM de MgCl₂, 1X de tampon, 0,5U/µl de Taq polymérase, 0,15 µM des amorces PiPCQ11R et MolCQ11R et 0,25 µM de l'amorce CQ11F.
- Bien mélanger et répartir dans des barrettes à PCR.
- On ajoute dans le mélange réactionnel soit 2µl de l'ADN total du moustique, soit juste sa patte.

Le détail de la réaction d'amplification est résumé dans le tableau III.

Tableau III: Protocole expérimental et programme de la PCR multiplexe

Solutions	Concentration finale	Volume en µl pour 1 échantillon	Séquences des amorces	Programme pour chaque cycle
H ₂ O		8,2 µl		-Dénaturation initiale 94°C : 10 min. -Dénaturation : 94°C : 30 sec. -Hybridation 54°C : 30 sec. -Elongation 72°C : 40 sec. -Terminaison : 72°C : 5 min.
Solution Q		5 µl		
dNTP	250 µM	2 µL		
MgCl ₂	2 mM	1,6 µl		
Tampon	1 X	2 µl		
Taq polymérase	0,5 U/µl	0,1 µl		
PiPCQ11R	0,15 µM	0,3 µl	5'-CATGTTGAGCTTCGGTGAA-3'	
MolCQ11R	0,15 µM	0,3 µl	5'-CCCTCCAGTAAGGTATCAAC-3'	
CQ11F	0,25 µM	0,5 µl	5'-GATCCTAGCAAGCGAGAAC-3'	
ADN ou une patte		2 µl		
Total		20 µl		

7.3. Révélation des produits PCR

Les produits d'amplifications (amplicons) sont révélés par une électrophorèse horizontale sur gel d'agarose.

Principe : Cette méthode de séparation est basée sur la capacité de l'ADN chargé négativement à migrer dans un champ électromagnétique à l'intérieur d'une matrice de gel d'agarose à 1,5%. (Ameziane et al 2006). Cette migration s'effectue plus au moins vite selon la taille des d'ADN ce qui permet leur séparation. Après la migration, les bandes d'ADN sont visualisées sous transilluminateur à UV. (Annexe 1).

8. L'analyse statistique :

L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel STATA[®] version 11.0. par le calcul du KH2 et détermination des P value.

RESULTAS & DISCUSSION

V. Résultats et discussion

1. Résultats

Pendant la période de la récolte la température était basse (environ 18°C à 20°C) même pendant le mois de Mai et juin. Ceci a influencé la densité des larves récupérées au niveau des gîtes du marais de Reghaïa. Au niveau du gîte hypogé la densité des larves est de classe 1 alors que celle des gîtes épigés est de classe 3.

1.1 Identification morphologique

L'identification des larves montées entre lame et lamelle et des adultes sur des minuci, s'est soldée par la mise en évidence de trois espèces de Culicidae (Tableau IV).

Tableau IV: Distribution des différentes espèces de *Culicidea* dans les gîtes prospectés au Lac de Reghaïa

Espèce	Nombre	
	Hypogé	Epigé
<i>Culex pipiens</i>	23	40
<i>Culex theileri</i>	02	12
<i>Culiseta longiareolata</i>	00	15
Total	25	67

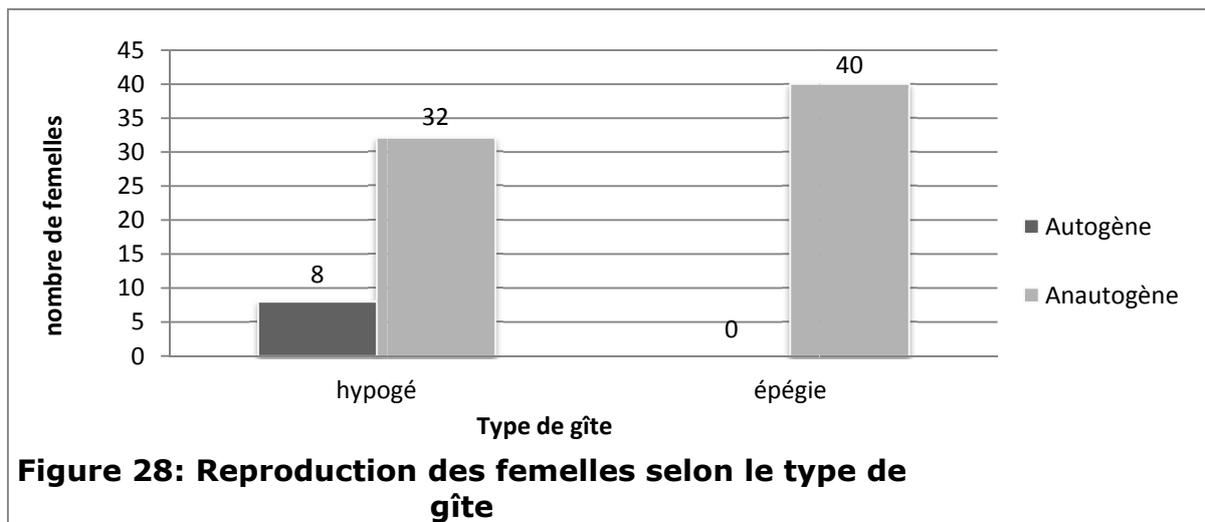
Au niveau du gîte hypogé, l'espèce *Cx. theileri* est associée faiblement au *Cx. pipiens*, contrairement aux autres gîtes épigés, où *Cx. theileri* et *Culiseta longiareolata* sont fortement associés au *Cx. pipiens*.

Cette distribution des espèces a été confirmée par l'identification des adultes après leurs émergences.

1.2 L'autogénie et l'anautogénie

L'autogénie est un caractère biologique spécifique à certains moustiques femelles primipares, qui ont la possibilité de développer des œufs sans recours à un repas de sang contrairement aux femelles anautogènes.

- Reproduction des femelles selon le type de gîte



Parmi les 40 couples, seules 8 femelles du gîte hypogé (20% des couples) ont pondu et le nombre d'œufs pondus varié entre 67 et 110 œufs.

1.3 Résultat du typage moléculaire

Après révélation des produits d'amplification sur gel d'agarose, les tailles des bandes d'ADN caractéristique au complexe *Culex pipiens* sont :

200 pb pour *Culex pipien pipiens*, 250 pb pour *Culex pipiens molestus* et 200/250 pb pour les formes hybrides.

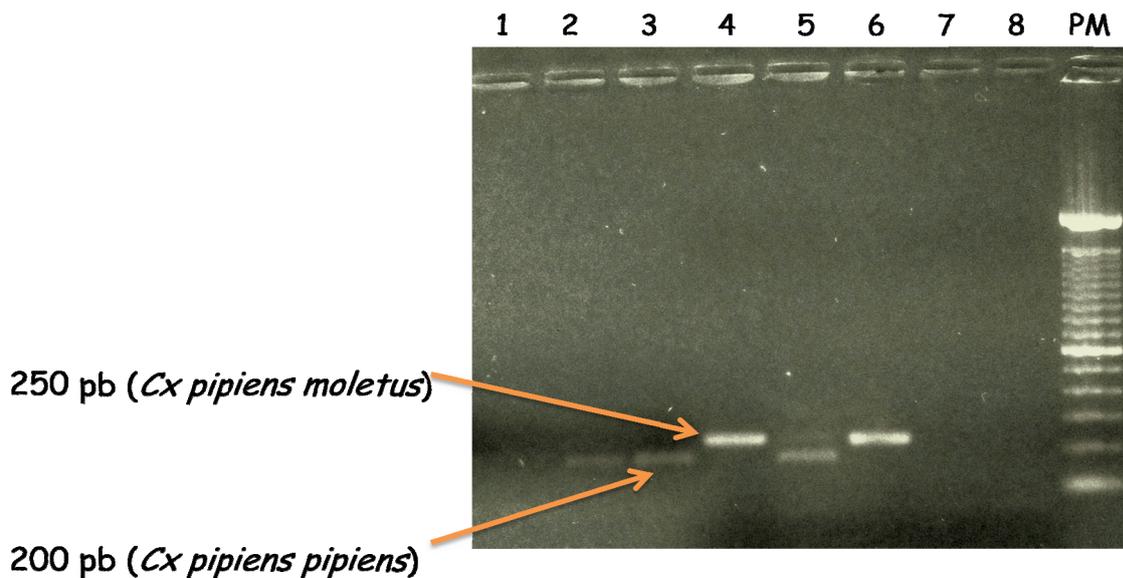
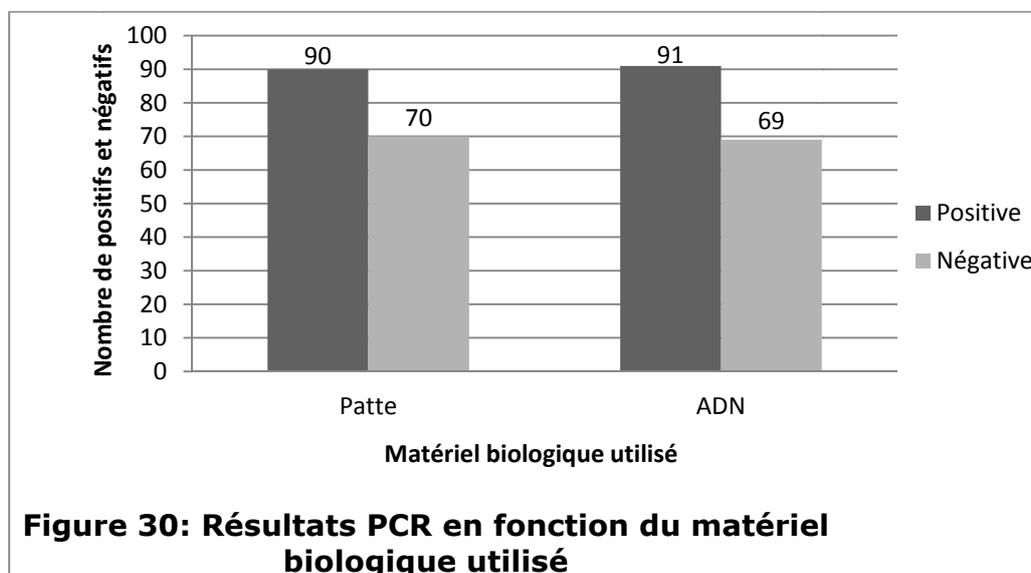


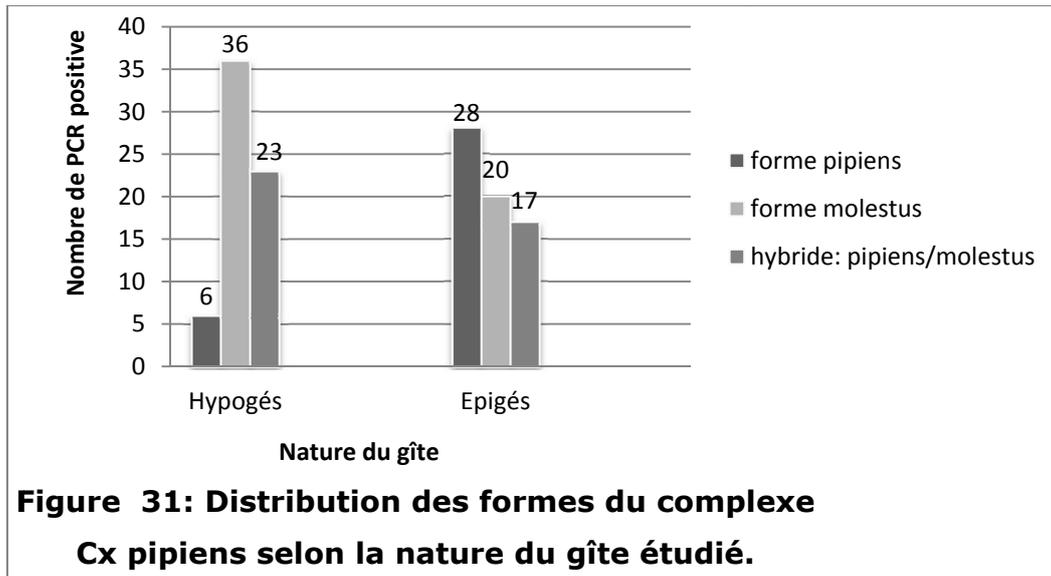
Figure 29 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% de PCR *Culex*. À partir de la patte. **PM**; marqueur de taille 100 pb. **1, 2, 3**; 200 pb (*Cx. pipiens pipiens*). **5**; 200/250 (hybride). **6**; 250 pb (*Cx. pipiens molestus*). **8**; Témoin négatif. **4**; Témoin positif

- **PCR en fonction du matériel biologique utilisé.**

Sur les 320 PCR réalisées (160 pattes/160 ADN) 181 se sont révélés positives (57%) (Figure 26) et l'analyse statistique réalisée par le test du Khi 2 n'a montré aucune différence significative entre l'utilisation de la patte du moustique ou de son ADN pour la différenciation ou le typage des formes du complexe *Cx pipiens* par PCR ($P= 0,326$).



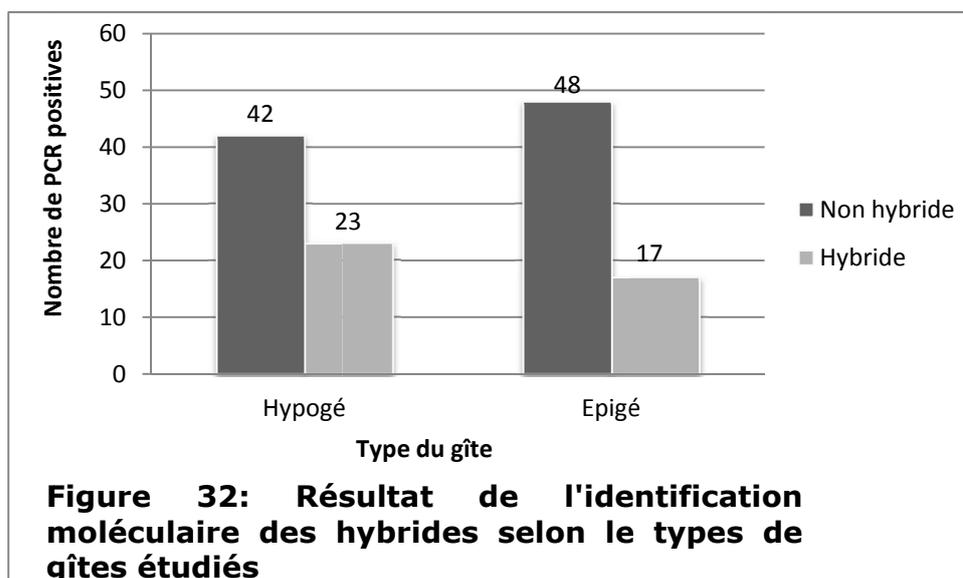
- **Distribution des formes du complexe *Culex pipiens* selon la nature du gîte étudié**



La population de *Cx pipiens molestus* a été retrouvée plus abondante (55,4 %) dans le gîte hypogé que ceux épigés, alors que *Cx pipiens pipiens* est plus abondant dans les gîtes épigés étudiés (43%). Pour les hybrides leur proportion est de (37,7 %) au niveau du gîte hypogé et de (26,1 %) dans les gîtes épigés.

Au niveau du gîte hypogé 9,2% des moustiques qui ont donné une PCR positive appartenaient à la forme *Cx pipiens pipiens* alors qu'ils provenaient de la même ponte qui a donnée les autres profils *Cx pipiens molestus* ainsi que les hybrides (Figure 28).

- **L'identification moléculaire des hybrides selon la nature du gîte.**



Au niveau des deux gîtes, la distribution des hybrides est moins importante 37% dans le gîte hypogé et 25% dans l'épigé. D'autre part le résultat de l'analyse statistique (test de khi 2) ne révèle pas de différence significative dans la distribution des hybrides entre les deux gîtes étudiés, $P=0,067$.

2. Discussion

Le marais de Reghaia est une région côtière, entourée d'habitations et de zone urbaine avec une grande variété de végétation présentant un environnement propice à la pullulation des moustiques du genre *Culex*. Cette région abrite plusieurs espèces d'oiseaux migrateurs (Mila et al, 2012) considérées comme réservoir potentiel du virus du West Nile. Les études sérologiques menées dans l'algérois a révélé la circulation du virus WN et précisément dans la région de Boudouaou et de Reghaïa (Hachid et al, 2013).

Le statut taxonomique du complexe *Culex pipiens* a été longtemps débattu, plusieurs hypothèses ont été émises à propos de l'origine des deux formes *pipiens* et *molestus* (Gomez et al, 2009).

L'identification moléculaire des espèces jumelles a un très grand intérêt épidémiologique, ce qui permet de connaitre leur distribution surtout dans les zones à risque où peut se rencontrer le moustique et le réservoir du virus.

La faune culicidienne de cette région présente une sympatrie entre l'espèce *Cx. pipiens*, *Cx. theileri* et *Culiseta longiareolata* dans les gîtes à ciel ouvert (gîtes épigés), déjà reporté par plusieurs études antérieur (Fonseca et al, 2004; Gomes et al, 2009; Reusken et al, 2010, Messai et al, 2011 ; Bouabida et al, 2012). Contrairement au gîte hypogé, qui est colonisé que par l'espèce *Cx. pipiens* en concordance avec les travaux de (Byrn et Nichols, 1999).

L'étude du comportement de reproduction par la mise en couple a permis dans un premier temps de confirmer le profil des larves collectées, où juste 20% des femelles ont pondu certifiant ainsi leur profil autogène caractéristique de la forme *molestus* en concordance avec les travaux de Byrne et Nichols (1999). Le faible taux de femelles qui ont pondu est probablement dû aux facteurs thermo-hygrométriques de l'insectarium au début de l'expérimentation où la température ne dépassée pas 21°C. Contrairement à l'étude de Vinogradova (2000) étalée sur sept années qui décrit qu'à Saint-Petersburg en Russie des populations de la forme *molestus* retrouvées dans les gîtes hypogés (caves des maisons) sont 80 à 100 % autogènes. Cette forme a aussi été retrouvée dans les gîtes ouverts du lac de Reghaia mais à faible pourcentage par rapport à la forme *pipiens pipiens*, ceci concorde avec le résultat de Vinogradova (2007) et de Amraoui et al, (2012b).

La forme *molestus* ainsi que la forme hybride *pipiens/molestus* ont aussi été retrouvées pour la première fois au nord de l'Europe. Ceci prouve que ces formes peuvent s'adapter à différents biotopes et par conséquent contribuer à la transmission du VWN (Reusken et al, 2010).

Le caractère anautogène des femelles, issues des gîtes épigés, a confirmé leur appartenance à la forme *pipiens* puisqu'aucune ponte n'a été enregistrée conformément aux travaux de (Gabinaud et al, 1985). Depuis la description des formes hybrides aux USA (Fonseca et al, 2004; Kent et al, 2007; Huang et al, 2008) au Sud de l'Europe (Gomes et al, 2009) et en Allemagne (Rudolf et al, 2013), l'étude physiologique est nécessairement accompagnée d'une étude moléculaire qui permettra une identification rapide et précise des sous espèces du complexe *Culex pipiens*.

La source d'ADN (patte ou ADN complet) pour les PCR réalisées n'a pas révélé de différence significative, ce qui permet de dire que l'utilisation de la patte du moustique comme matrice pour la PCR donne un grand

avantage, et permet de réaliser d'autres analyses sur le même spécimen d'ordre biochimique, morphométrique, confection de collection....etc.

Le typage moléculaire en utilisant les séquences flanquées de la région des microsatellites CQ11 a démontré la présence de *Culex pipiens* sous la forme *molestus* (décrite pour la première fois en Egypte (Byrne et Nichols, 1999) , la forme *pipiens* et pour la première fois la description des formes hybride en Algérie au niveau du lac de Réghaia, confirmant ainsi que les formes hybrides existent au niveau de l'Afrique du nord et qui ont une distribution plus large allant du Maroc (Amraoui et al, 2012b) et peut être jusqu'à la Tunisie où plus d'investigation pourrait bien mettre en évidence la présence de cette forme de *Culex* puisque des travaux récents à El KALA à la frontière algéro-tunisienne ont mis en évidence la présence de cette forme (données non publiées).

La compétence vectorielle des *Cx. pipiens* du Maghreb au virus du WN (Amraoui et al, 2012a) ainsi que la présence des oiseaux migrateurs réservoirs du virus pourrait dégager une zone de risque à la transmission du VWN à la population locale autour du lac. En effet, la présence des formes hybrides dans tous les gîtes échantillonnés a une importance épidémiologique de part leurs préférences trophiques intermédiaires, puisqu'ils piquent des hôtes aviaires et mammaliens, jouant ainsi le rôle de vecteurs des pathogènes comme le VWN des oiseaux à l'homme (Fonseca et al, 2004; Hamer et al, 2008).

CONCLUSION

VI. Conclusion et perspective

Le moustique du complexe *Culex pipiens* est largement répandu en Algérie, ses larves sont retrouvées dans les gîtes épigés et hypogés au niveau du lac de Reghaïa.

Les méthodes d'identifications morphologiques des diptères restent limitées dans la distinction des espèces jumelles et sont depuis les années 90 appuyées pas des méthodes biochimique et moléculaire.

L'amplification génique en utilisant la patte seule du moustique donne le même résultat que l'ADN extrait ce qui donne l'avantage de faire plus d'analyses sur les spécimens à savoir biochimique, génétique, morphométrique et confection de collection.

Dans notre zone d'étude, le complexe *Culex pipiens* existe sous trois formes *pipiens*, *molestus* et la pour la première fois en Algérie, la description de la forme hybride (*pipiens/molestus*). Par conséquent, ces formes pourraient jouer un rôle important dans la transmission de l'arbovirus du WN à l'ensemble de la population humaine et équine aux alentours du lac.

Ces deux formes *pipiens* et *molestus* diffèrent par leurs préférences trophiques qui est un caractère sous contrôle génétique par conséquence, la forme hybride (*pipiens/molestus*) pourrait acquérir les deux préférences trophiques (ornithophile et anthropophile) ce qui augmenterait le risque d'apparition de la maladie surtout avec la présence de nombreuses espèces d'oiseaux migrateurs suspectés d'être à l'origine de l'introduction du VWN dans de nouvelles zones

L'étude des préférences trophiques serait un axe de recherche à développer pour mieux définir les contacts trophiques et ainsi, mieux définir le rôle vecteur de chaque forme de *Cx. pipiens*.

En perspective, il serait judicieux d'installer des sentinelles de surveillance par l'utilisation de poules dans des cages pour suivre la trace du virus aux alentours du lac, réaliser une étude sérologique par un dépistage actif de

la population avoisinante, étudier la compétence génétique des différentes espèces du complexe au virus du WN. L'ensemble des actions permettraient d'établir des cartes de risques de transmission du WN par le système d'information génétique pour mieux diriger les méthodes de lutttes et de préventions.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUE

VII. Références bibliographique

1. Ameziane N., Bagard M., Lamoril J. 2006. Principe de biologie moléculaire en biologie clinique. Ed Elsevier/Masson, 705p.
2. Adrián D.L., Komar N., Visintin A., Dantur Juri M.J., Stein M., Lobo A. R, Spinsanti L., Konigheim B., Aguilar J. , Laurito M., Almirón W., Contigiani M. 2008. West Nile Virus in birds, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* **14(4)**: 689-691.
3. Anonyme 1. <http://www.eidatlantique.eu/page.php?P=144>
4. Anonyme 2. Structure du virus du West Nile au microscope électronique. http://phil.cdc.gov/phil_images/10302002/8/PHIL_2290_lor es.jpg
5. Anonyme 3. Bulletin hebdomadaire international. 2012 N° **369**.
6. Amraoui F., Krida G., Bouattour A., Rhim A., Daaboub J., Harrat Z., Boubidi SC., Tijane M., Sarih M., Failloux A.B. 2012a. *Culex pipiens*, an Experimental Efficient Vector of West Nile and Rift Valley Fever Viruses in the Maghreb Region. *PLoS ONE*, **7(5)**, 1-8
7. Amraoui, F., Tijane M., Sarih M., Failloux A.B. 2012b. Molecular Evidence of *Culex pipiens* form *molestus* and Hybrids *pipiens/molestus* in Morocco, North Africa. *Parasites & Vectors*, **5**, 83.
8. Andreadis T.G 2012. The contribution of *Culex pipiens* complex mosquitoes to transmission and persistence of West Nile virus in North America. *J. Am. Mosq. Contro.l Assoc.* **28 (4)**, 137-51.
9. Bahnk C.M., Fonseca D.M. (2006). Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex* (*Culex*) *pipiens* L. (Diptera: *Culicidae*) and hybrid populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**, 251-255.
10. Bakonyi T, Ivanics E, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, Nowotny N (2006). Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **12(4)**, 618-623.
11. Balenghien T. 2006. De l'identification des vecteurs du virus *West Nile* à la modélisation du risque d'infection dans le sud de la France. Thèse de doctorat, Université des sciences des technologies et de la santé de Grenoble, 223 pages.
12. Balenghien T., Fouque F., Sabatier P. and bicout D.J. 2006. Horse, Bird, and Human-Seeking Behavior and Seasonal Abundance of mosquitoes in a West Nile Virus Focus of Southern France. *J. Med. Entomol.* **43(5)**, 936-46.

- 13.** Berchi S., 2000 – Bioécologie de *Culex pipiens* L. (Diptera : *Culicidae*) dans la région de Constantine et perspectives de lutt. Thèse de doctorat science, Université de Constantine, Algérie, 133p.
- 14.** Berchi S., Aouati A., Louadi K. 2012. Typologie des gîtes propices au développement larvaire de *Culex pipiens* L. 1758 (Diptera- *Culicidae*), source de nuisance à Constantine (Algérie). *ecologia mediterranea*. **38(2)**, 5-16.
- 15.** Bouabida H., Djebbar F. et Soltani N. 2012. Etude systématique et écologique des Moustiques (Diptera: *Culicidae*) dans la région de Tébessa (Algérie). *Entomol. faun.* **65**, 99-103.
- 16.** Bougatef S., Ben Alaya Bouafif N., Achour N. 2012. Situation Epidémiologique des Méningites et Méningo-Encéphalites à Virus West Nile en Tunisie. *Bulletin de la surveillance des MME à VWN en Tunisie*, **1**, 1-11
- 17.** Brunhes J. 1969. Nouvelles données sur les vecteurs de *Wuchereria bancrofti* à Madagascar. *Bull. Org. mond. Santé*, **40**, 763-769.
- 18.** Brunhes J, Rhaim A, Geoffroy B, Angel G, Hervy J.P (2000). Les moustiques de l’Afrique méditerranéenne. Logiciel d’identification et d’enseignement. Montpellier, France, IRD & IPT, CD-Rom collection didactique, Éditions IRD.
- 19.** Byrne K., Nichols R.A. 1999. *Culex pipiens* in London Underground tunnels: differentiation between surface and subterranean populations. *Heredity* **82**, 7-15.
- 20.** Calistri P., Giovannini A., Hubalek Z., Ionescu A., Monaco F., Savini G. and Lelli. R. 2010. Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean Basin. *Open Virol. J.* **4**, 29-37.
- 21.** Campbell G.L., Marfin A.A., Lanciotti R.S., Duane J Gubler D.J. 2002. West Nile Virus. *The Lancet Infectious Diseases*. **2(9)**, 519-529.
- 22.** Crabtree M.B., Savage H.M., Miller B.R. 1997. Development of a polymerase chain reaction assay for differentiation between *Culex pipiens pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* (Diptera: *Culicidae*) in North America based on genomic differences identified by subtractive hybridization. *J. Med. Entomol.* **34(5)**, 532-537.
- 23.** Dehghan H., Sadraei J., Moosa-Kazemi S.H. 2010. The Morphological Variations of *Culex pipiens* Larvae (Diptera: *Culicidae*) in Yazd Province, Central Iran. *Iran J. Arthropod. Borne Dis.*, **4(2)**, 42–49.
- 24.** Dehghan H., Sadraei J., Moosa-Kazemi S.H., Akbari Baniani N. and Nowruzi F. 2013. The molecular and morphological variations of *Culex pipiens* complex (Diptera: *Culicidae*) in Iran. *Vect. Borne. Dis.* **50**, 111–120.
- 25.** El Harrack M., Le Guenno B., Gounon P. 1997. Isolement du virus West Nile au Maroc. *Virologie*, **1(3)**, 248-249.

26. Esteves A., Almeida A.P.G., Galão R.P., Parreira R., Piedade J., Rodrigues J.C., Sousa C.A. and Novo M.T. 2005. West Nile Virus in Southern Portugal, 2004. *Vect. Born. Dis.* **5(4)**, 410-413.
27. Faraj C, Elkohli M, Lyagoubi M (2006). Cycle gonotrophique de *Culex pipiens* (Diptera: *Culicidae*), vecteur potentiel du virus West Nile, au Maroc: Estimation de la durée en laboratoire. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **99(2)**, 119-121.
28. Farajollahi A., Crans W.J., Bryant P., Burkhalter K.L., Godsey M.S., Aspen S. E., Nasci R.S. 2005. Detection of West Nile viral RNA from an overwintering pool of *Culex pipiens* (Diptera: *Culicidae*) in New Jersey, 2003. *J. Med. Entomol.* **42**, 490-494.
29. Farajollahi A., Fonseca D.M., Kramer L.D., Kilpatrick A.M. 2011. "Bird biting" mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infect. Genet. Evol.* **11(7)**, 1577-1585
30. Farid H.A., Hammad R.E., Hassan M.M, Morsy Z.S., Kamal I.H., Weil G.J., Ramzy R.M. (2001). Detection of *Wuchereria bancrofti* in mosquitoes by the polymerase chain reaction: a potentially useful tool for large-scale control programmes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **95(1)**, 29-32.
31. Fechter-Leggett E., Nelms B. M. , Barker C. M. and Reisen W.K. 2012. West Nile virus cluster analysis and vertical transmission in *Culex pipiens* complex mosquitoes in Sacramento and Yolo Counties, California, 2011. *J. Vect. Ecol.* **37(2)**, 442-449.
32. Fonseca D.M., Keyghobadi N., Malcolm C.A., Mehmet C., Schaffner F., Mogi M., Fleischer R.C., Wilkerson R.C. 2004. Emerging Vectors in the *Culex pipiens* Complex. *Science*, **303 (5663)**, 1535-1538.
33. Fontenille D., Rodhain F., Digoutte J.P., Mathiot C., Morvan J. et Coulanges P. 1989. Les cycles de transmission du virus West-Nile à Madagascar, Océan indien. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* **69**, 233-243.
34. Gabinaud A.,Vigo G., Jean Cousserans J., Roux M., Pasteur N., Croset H. 1985. La mammophilie des populations de *Culex pipiens* L., 1758 dans le Sud de la France; variations de ce caractère en fonction de la nature des biotopes de développement larvaire, des caractéristiques physico-chimiques de leurs eaux et des saisons. Conséquences pratiques et théoriques. *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. et Parasitol.* **23(2)**,123-132.
35. Gamino V. and Höfle U. 2013. Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: a review. *Vet. Res.* **44**, 39.
36. Gomes B., Sousa C.A., Novo M.T., Freitas F.B., Alves R., Ana R Côte-Real A.R., Salgueiro P., Donnelly M.J., Almeida A.PG and Pinto J. (2009). Asymmetric introgression between sympatric *molestus* and

pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: *Culicidae*) in the Comporta region, Portugal. *BMC. Evol. Biol.* **9**, 262.

- 37.** Gomes B., Alves J., Sousa C.A., Santa-Ana M., Vieira I., Silva T.L., Almeida A.P.G., Donnelly M.J. and Pinto J. 2012a. Hybridization and population structure of the *Culex pipiens* complex in the islands of Macaronesia. *Ecol. Evol.* **2(8)**, 18891-1902.
- 38.** Gomes B., Parreira R., Sousa C.A., Novo M.T, Almeida A.P, Donnelly M.J., Pinto J. 2012b. The *Culex pipiens* complex in continental Portugal: distribution and genetic structure. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* **28(4)**, 75-80.
- 39.** Gomes B., Sousa C.A., Vicente J.L., Pinho L., Calderón I., Arez E., Almeida A.PG., Donnelly M.J. and Pinto J. 2013. Feeding patterns of *molestus* and *pipiens* forms of *Culex pipiens* (Diptera: *Culicidae*) in a region of high hybridization. *Paras. Vec.*, **6(93)**, 1-10.
- 40.** Hachid A., M.A. Beloufa M.A., Bahoura N., Dia M., Fall G., Sall A.A., Seghier M. 2013. First serological evidence of human circulation of West Nile Virus in Central-North of Algeria. Communication affichée, 23^{ème} ECCMID, Berlin, Germany.
- 41.** Hamer G.L., Kitron U.D., Brawn J.D., Loss S.R., Ruiz M.O., Goldberg T.L., Walker E.D. 2008. *Culex pipiens* (Diptera: *Culicidae*): a bridge vector of West Nile virus to humans. *J. Med. Entomol.* **45(1)**, 125-8.
- 42.** Hamer G.L., Kitron U.D., Goldberg U.D., Brawn J.D., Loss S.R., Ruiz M.O., Hayes D.B. and Walker E.D. 2009. Host Selection by *Culex pipiens* Mosquitoes and West Nile Virus Amplification. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80(2)**, 268–278.
- 43.** Harbach R.E., Harrison B.A., Gad A.M. 1984. *Culex molestus* Forskål (Diptera: *Culicidae*): neotype designation, description, variation and taxonomic status. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* **86**, 521–542
- 44.** Harbach R.E., Dahl C. and White G.B. 1985. *Culex* (*Culex pipiens* Linnaeus) (diptera: culicidae): Concepts, type designations, and description. *Proc. Eentomol. Soc. Wash.* **87(I)**, 1-24
- 45.** Hayes C.G. 2001. West Nile Virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999. *Ann. NY. Acad. Sci.* **951**, 25-37.
- 46.** Hayes E.B., Sejvar J.J., Zaki S.R., Lanciotti R.S., Bode A.V. and Campbell G.L. 2005. Virology, Pathology, and Clinical Manifestations of West Nile Virus Disease. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 1174-1179.
- 47.** Higgs, S., Snow, K., Gould, E.A. 2004. The potential for West Nile virus to establish outside of its natural range: a consideration of potential mosquito vectors in the United Kingdom. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **98**, 82–87
- 48.** Huang S., Molaei G., Andreadis T.G. 2008. Genetic insights into the population structure of *Culex pipiens* (Diptera: *Culicidae*) in the

Northeastern United States by using microsatellite analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **79**, 518-527.

49. Jourdain E., Toussain Y., Leblond, A., Bicout D.J., Sabatier, P. and Gauthier-Clerc M. 2007. Bird Species Potentially Involved in introduction, amplification, and spread of West Nile Virus in a Mediterranean Wetland, the Camargue (Southern France). *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **7(1)**, 15-33.
50. Kent R.J., Harrington L.C. and Norris D.E. 2007. Genetic Differences Between *Culex pipiens* f. *molestus* and *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) in New York. *J. Med. Entomol.* **44(1)**, 50-59.
51. Kilpatrick A.M, Kramer L.D, Jones M.J, Marra P.P., Daszak P. and Fonseca D.M. (2007). Genetic influences on mosquito feeding behavior and the emergence of zoonotic pathogens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77 (4)**, 667-71.
52. Komar N. 2003. West Nile Virus: Epidemiology and ecology in North America. *Adv. Vir. Res.*, **61**, 185-234.
53. Krida G., Diancourt L., Bouattour A., Rhim A., Chermiti B., Failloux A.B. 2011. Estimation du risque d'introduction du virus de la fièvre de la vallée du Rift en Tunisie par le moustique *Culex pipiens*. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **104**, 250-259.
54. LaDeau S.L., Calder C.A., Doran P.J. and Marra P.P. 2011. West Nile virus impacts in American crow populations are associated with human land use and climate. *Ecol Res.*, **26**, 909-916.
55. LaDeau S.L., Leisnham P.T., Biehler D. and Bodner D. 2013. Higher Mosquito Production in Low-Income Neighborhoods of Baltimore and Washington, DC: Understanding Ecological Drivers and Mosquito-Borne Disease Risk in Temperate Cities. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **10**, 1505-1526.
56. Lanciotti R.S., Ebel G.D., Deubel V., Kerst A.J., Murri S., Meyer R., Bowen M., Nancy McKinney N., Morrill W.E., Crabtree M.B., Kramer L.D., and Roehrig J.T. 2002. Complete Genome Sequences and Phylogenetic Analysis of West Nile Virus Strains Isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology* **298**, 96-105
57. Laven H. 1951. Crossing experiments with *Culex* strains. *Evolution* **5**, 310-75.
58. Lecollinet S., Beck C. et Zientara S. 2012. Le virus West Nile: Diagnostic, surveillance et évolution épidémiologique en Europe. *Bull. Acad. Vét. France*, **165** (1).
59. Le Guenno B., Bougermouh A., Azzam T., Bouakaz R. 1996. West Nile: a deadly virus? *Lancet*, **348 (9037)**, 1315.
60. Mattingly P.F., Rozeboom L.E, Knight K.L, Laven H., Drummond F.H., Christophers S.R. and Shute P.G. (1951).The *Culex pipiens* complex. *Trans. Roy. Ent. Soc. London.* **102**, 331-82.

61. Mesbah S. 2009. Maladies infectieuses émergentes et ré émergentes : Le risque et la riposte en Algérie. *Med. Trop.* **69**, 27-32.
62. Messai N., Berchi S. Boulknafd F. et Louadi K. 2011. Inventaire systématique et diversité biologique de *Culicidae* (Diptera: Nematocera) dans la région de Mila (Algérie). *Entomol. faun.* **63(3)**, 203-206.
63. Milla A., Marniche F., Makhloufi A., Daoudi-Hacini S., Voisin J. F. et Doumandji S. 2012. Aperçu de l'avifaune du sahel Algérois. *Algerian journal of arid environment.* **2(1)**, 3-15.
64. Murgue B., Murri S., Triki H., Deubel V., Zeller H.G. 2001. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Ann N Y Acad Sci.* **951**, 117-26.
65. Myriam et Cécile 2003. Extraction d'AND au CTAB sur moustique entier. <http://www.edenfp6project.net/content/download/1071/4201/version/3/%E2%80%8E>. IRD
66. Osório H.C., Zé-Zé L., Amaro F., Nunes A., Alves M.J. 2013. Sympatric occurrence of *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) biotypes *pipiens*, *molestus* and their hybrids in Portugal, Western Europe: feeding patterns and habitat determinants. *Med. Vet. Entomol.* (sous presse).
67. Papa A., Bakonyi T., Xanthopoulou K., Vázquez A., Tenorio A., Nowotny N. (2011). Genetic Characterization of West Nile Virus Lineage 2, Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* **17(5)**, 920-922.
68. Pepperell C, Rau N, Krajden S, Kern R, Humar A, Mederski B, Simor A, Low DE, McGeer A, Mazzulli T, Burton J, Jaigobin C, Fearon M, Artsob H, Drebot MA, Halliday W, Brunton J (2003). West Nile virus infection in 2002: morbidity and mortality among patients admitted to hospital in southcentral Ontario. *Can Med Assoc J.* **168(11)**, 1399-1405.
69. Petersen L.R., Roehrig J.T. 2001. West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* **7(4)**, 611-614.
70. Pilo-Moron E., Vincent J., Le Corroller Y. 1970. Isolation of a West-Nile virus in the extreme south of the Algerian Sahara (Djanet). *Arch. Inst. Pasteur. Alger.* **8**, 181-184.
71. Platonov A.E. 2001. West Nile encephalitis in Russia 1999-2001: were we ready? Are we ready? *Ann. NY. Acad. Sci.* **951**, 102-116.
72. Pradier S., Lecollinet S. and Leblond A. 2012. West Nile virus epidemiology and factors triggering change in its distribution in Europe. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, **31 (3)**, 829-844.
73. Reusken C.B.E.M., De Vries A., Buijs J., Braks M.A.H, Den Hartog W., Scholte E.J. (2010). First evidence for presence of *Culex pipiens* biotype *molestus* in the Netherlands, and of hybrid biotype *pipiens* and *molestus* in northern Europe. *J. Vector Ecol.* **35**, 210-212.
74. Rioux J.A. 1958. Les culicidés du "midi" méditerranéen. Etude systématique et écologique. ED, Lechevalier P. Paris, 303 pages.

- 75.** Rodhain F., Perez C., 1985 - Précis d' entomologie médicale et vétérinaire. Ed. Maloine. Paris. Chapitre **5**, 157-175.
- 76.** Rodhain F. 2010. Encéphalite japonaise : une maladie virale en pleine évolution. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **103 (3)**, 135-155.
- 77.** Roubaud E. 1945. Le problème de l'espèce chez le moustique commun *Culex pipiens* L. *Bull. Soc. Path. Exot.* **47**, 47-60.
- 78.** Roy E. 2004. Municipal mosquito control guidelines. Health Canada, Centre for Infectious Disease Prevention and Control. 53 p.
- 79.** Rudolf M., Czajka C., Borstler J., Melaun C., Jost H., Von Thien H., Badusche M., Becker N., Schmidt-Chanasit J., Kruger A., Tannich E., Becker S. 2013. First Nationwide Surveillance of *Culex pipiens* Complex and *Culex torrentium* Mosquitoes Demonstrated the Presence of *Culex pipiens* Biotype pipiens/molestus Hybrids in Germany. *Plos One*, **8(9)**, 1-9.
- 80.** Senevet G. et Andarelli L. 1954. Les adultes du genre *Culex* en Afrique du nord. *Arch. Inst. Pasteur Alger.* **32(1)**, 37- 70.
- 81.** Service M.W.1993. Mosquito ecology: *Field Sampling Methods .Vector Biology and Control* (2d Ed.), Liverpool School of Tropical Medicine. Elsevier Applied Sciences Ed, UK, 988p. Publishers, London, 583 p
- 82.** Shaikevich E.V. 2007. PCR-RFLP of the COI gene reliably differentiates *Cx. pipiens*, *Cx. pipiens* f. *molestus* and *Cx. torrentium* of the Pipiens Complex. *European Mosquito Bulletin* **23**, 25-30.
- 83.** Sharifi Z., Shooshtari M.M., Talebian A. 2010. A Study of West Nile Virus Infection in Iranian Blood Donors. *Arch. Iran. Med.* **13 (1)**, 1-4.
- 84.** Smith J.L. and Fonseca D.M. (2004). Rapid assays for identification of members of the *Culex (Culex) pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (*Diptera: Culicidae*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **70 (4)**, 339-345.
- 85.** Sotelo E., Gutierrez-Guzmán A.V., Del Amo J., Llorente F., El-Harrak M., Pérez-Ramírez E., Blanco J.M., Höfle U., Jiménez-Clavero M.A. 2011. Pathogenicity of two recent Western Mediterranean West Nile virus isolates in a wild bird species indigenous to southern Europe: the red-legged partridge. *Veter. Res.* **42**, 11-18.
- 86.** Thibault M. 2006. Plan de gestion de la Réserve Naturelle du Lac de Réghaïa (Algérie). Projet Life3 TCY/INT/031. Maghreb zones humides. Protection et développement durable des zones humides en Afrique du nord, 82 pages.

- 87.** Tiawsirisup S., Platt K.B., Evans R.B., Rowley W.A. 2005. A comparison of West Nile Virus transmission by *Ochlerotatus trivittatus* (COQ), *Culex pipiens* (L.), and *Aedes albopictus* (Skuse). *Vector Borne Zoonotic Dis.* **5**, 40-47.
- 88.** Triki H., Murri S., Le Guenno B., Bahri O., Hili K., Sidhom M., Dellagi K. 2001. Meningo-encephalite à arbovirus West Nile en Tunisie. *Med. Trop.* **61**, 487-490.
- 89.** Tsai T.F., Popovici F., Cernescu C., Campbell G.L., Nedelcu N.I. (1998). West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* **352**, 767-771.
- 90.** Turell M.J., O'guinn M.L., Dohm D.J., Jones J.W. 2001. Vector competence of North American mosquitoes (*Diptera: Culicidae*) for West Nile virus. *J. Med. Entomol.* **38**, 130-134.
- 91.** Vinogradova E.B. 2000. Mosquitoes *Culex pipiens pipiens*: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics and control. PenSoft, Sofia. 280 pages.
- 92.** Vinogradova E.B. 2003. Ecophysiological and morphological variations in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex (*Diptera: Culicidae*). *Acta Soc. Zool. Bohem.* **67**, 41-50.
- 93.** Vinogradova E.B., Shaikevich E.V., Ivanistky A.V. 2007. A study of the distribution of the *Culex pipien* complex (*Insecta: Diptera: Culicidae*) Mosquitoes in the European part of Russia by molecular methods of identification. *Comp. Cytogenet.* **1(2)**, 129-138.
- 94.** Wagner, D.B., Furnier, G.R., Saghay-Marroof, M.A., Williams, S.M., Dancik, B.P. and Allard, R.W. (1987). Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2097-2100.
- 95.** Zeller H.G., Schuffenecker I. 2004. West Nile Virus: An Overview of Its Spread in Europe and the Mediterranean Basin in Contrast to Its Spread in the Americas. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**, 147-156
- 96.** Zientara S., B. Murgue B., Zeller H., Dufour B., Murri S., Labie J., Durand B. et Hars J. 2001. Maladie a virus " West Nile " en France. *Epidémiol. Sant. anim.* **39**, 113-120.

Annexe 1 : Tampons et solutions.

Solution sucrée 10%

- Sucre cristallisé 10 gr
- d'H₂O distillée qsp 100 ml
- Chauffer au micro onde jusqu'à dissolution.

Solution de montage à l'alcool polyvinylique (PVA)

- Alcool polyvinylique (Rhodoviol BS 125) 12 gr.
- Acide formique 20 ml.
- Hydrate de chloral 24 gr.
- Phénol 24 gr.

Kit QIAGEN Quality®

- MgCl₂ 25mM.
- Q-Solution 5X
- PCR Buffer 10X
- Hot Star Taq DNA Polymerase 5 units / μ l
- Mix dNTP 100mM

Solution de Cetyl Trymethyl Ammonium Bromide (CTAB) 2%

- Tris HCL (1M) pH 8.0 100 ml.
- EDTA (0,5M) 20 ml.
- NaCl 81,8 gr.
- CTAB 20 gr.
- H₂O distillée qsp 1l.

Tampon de migration Tris-Acetate-EDTA (TAE 50X)

- Tris base 242 gr
- EDTA (0,5M) pH 8 100 ml
- Acide acétique glaciale 100 % 57,1 ml
- H₂O distillée qsp 1l

Solution EDTA (0,5 M) pH 8

- EDTA 93,5 gr
- H₂O distillée qsp 400 ml
- Ajuster pH 8 avec du NaOH et compléter à 500 ml

Tampon de charge

- Bleu de bromophénol 30 mg
- Glycerine 15 ml
- EDTA (0,5M) pH 8 6 ml
- Tampon Tris (1M) pH 8 0,3 ml
- H₂O distillée qsp 30 ml
- Conserver à -20°C

Gel d'agarose à 1,5 %

- Peser 1,5 gr d'agarose (spéciale biologie moléculaire)
- 100 ml de tampon TAE 1X.
- Dissoudre au micro onde jusqu'à obtention d'une solution limpide
- Laisser refroidir jusqu'à une température de 50°C.
- Ajouter 5 µl de Bromure d'Ethidium (BET), jouant le rôle d'agent intercalent.
- Mélanger délicatement sans faire de bulles.
- Couler dans la cuve à électrophorèse préalablement préparée avec le peigne adéquat.
- Laisser polymériser le gel (devient blanchâtre et rigide).
- Retirer le peigne tout doucement et placer le gel dans la cuve d'électrophorèse contenant le tampon TAE 1X.

Annexe 2 : Appareillages

- Aspirateur à bouche
- Bain marie MEMMERT
- Cage pour élevage de moustique
- Hôte à flux laminaire
- Louche de 500 ml
- Loupe binoculaire
- Thermocycleur TECHNE GENUS
- Transilluminateur à UV.

Annexe 3 : Liste des espèces d'oiseaux observées dans la zone humide de Reghaïa

<i>Famille</i>	<i>Nom scientifique</i>	<i>Nom français</i>	<i>Statut</i>
	<i>Circus pygargus</i>	<i>Busard cendré</i>	
<i>Pandionidae</i>	<i>Pandion haliaetus</i>	<i>Balbusard pêcheur</i>	<i>M.E</i>
<i>Falconidae</i>	<i>Falco tinnunculus</i>	<i>Faucon crécerelle</i>	<i>S.N</i>
	<i>Falco peregrinus</i>	<i>Faucon pèlerin</i>	
	<i>Falco subbutéo</i>	<i>Faucon hobereau</i>	
<i>Phasianidae</i>	<i>Coturnix coturnix</i>	<i>Caille des blés</i>	
	<i>Alectoris barbara</i>	<i>Perdrix gabra</i>	
<i>Rallidae</i>	<i>Crex crex</i>	<i>Râle des genêt</i>	<i>S.N.</i>
	<i>Rallus aquaticus</i>	<i>Râle d'eau</i>	<i>S.N</i>
	<i>Gallinula chloropus</i>	<i>Poule d'eau</i>	<i>S.N</i>
	<i>Porphyrio porphyrio</i>	<i>Poule sultane</i>	<i>S.N</i>
	<i>Fulica atra</i>	<i>Foulque macroule</i>	<i>S.N</i>
	<i>Porzana porzana</i>	<i>Marouette ponctuée</i>	<i>M</i>
	<i>Porzana porva</i>	<i>Marouette poussin</i>	
	<i>Porzana pusilla</i>	<i>Marouette de baillon</i>	<i>M.E</i>
<i>Haematopodidea</i>	<i>Haematopus ostralegus</i>	<i>Huïtrier pie</i>	
<i>Recurvirostridae</i>	<i>Himantopus himantopus</i>	<i>Echasse blanche</i>	<i>M.E</i>
	<i>Recurvirostra avocetta</i>	<i>Avocette</i>	
<i>Charadriidae</i>	<i>Vanellus vanellus</i>	<i>Vanneau huppé</i>	<i>M.H</i>
	<i>Charadrius hiaticula</i>	<i>Grand gravelot</i>	<i>M</i>
	<i>Charadrius dubius</i>	<i>Petit gravelot</i>	<i>M.N</i>
	<i>Pluvialis squatarola</i>	<i>Pluvier argenté</i>	<i>M</i>

	<i>Pluvialis apicaria</i>	<i>Pluvier doré</i>	M.H
<i>Burhinidae</i>	<i>Burhinus oedeedcnemus</i>	<i>Oedicnème criard</i>	M
<i>Scolopacidae</i>	<i>Limosa limosa</i>	<i>Barge à cou noire</i>	M
	<i>Limosa lapponica</i>	<i>Barge rousse</i>	
	<i>Numenius phaeopus</i>	<i>Courlis corlieu</i>	
	<i>Numenius arquata</i>	<i>Courlis cendré</i>	M.H
	<i>Tringa totanus</i>	<i>Chevalier gambette</i>	M.E.H.
	<i>Tringa erythropus</i>	<i>Chevalier arlequin</i>	M.E.H
	<i>Actitis hypoleucos</i>	<i>Chevalier guinette</i>	S
	<i>Philomachus pugnax</i>	<i>Chevalier combattant</i>	M.E
	<i>Tringa ochropus</i>	<i>Chevalier à cul blanc</i>	M.E.
	<i>Tringa stagnatilis</i>	<i>Chevalier stagnatile</i>	M.E.H
	<i>Tringa glareola</i>	<i>Chevaliersylvain</i>	M.E
	<i>Tringa nebularia</i>	<i>Chevalier aboyeur</i>	M.H
	<i>Arenaria interpres</i>	<i>Tournepierrre à collier</i>	
	<i>Lymnocyrtus minimus</i>	<i>Bécasseau sourde</i>	M.H
	<i>Gallinago gallinago</i>	<i>Bécasseau des marais</i>	M.H
	<i>Calidris temminckii</i>	<i>Bécasseau temmink</i>	M.E
	<i>Calidris alba</i>	<i>Bécasseau sanderling</i>	M.H
	<i>Calidris ferruginea</i>	<i>Bécasseau corcoli</i>	M.E
	<i>Calidris minuta</i>	<i>Bécasseau minute</i>	M.E
	<i>Calidris canuta</i>	<i>Bécasseau</i>	M.E

		<i>maubéche</i>	
	<i>Calidris alpina</i>	<i>Bécasseau variable</i>	<i>M.E</i>
<u><i>Laridae</i></u>	<i>Larus caehinnans</i>	<i>Goeland leucophée</i>	<i>Niche sur l'îlot</i>
	<i>Larus canus</i>	<i>Goeland cendré</i>	<i>M.H</i>
	<i>Larus ridibundus</i>	<i>Mouette rieuse</i>	<i>M.H</i>
	<i>Larus melanocephalus</i>	<i>Larus mélanocéphale</i>	
	<i>Larus minutus</i>	<i>Mouette pygmé</i>	
	<i>Rissa tridactyla</i>	<i>Mouette tridactyle</i>	
	<i>Chlidonias niger</i>	<i>Guifette noire</i>	<i>M.E</i>
	<i>Chlidonias hybridus</i>	<i>Guifette moustac</i>	<i>M.H</i>
	<i>Chlidonias leucopterus</i>	<i>Guifette leucoptère</i>	<i>M</i>
	<i>Gelochelidon nilotica</i>	<i>Sterne hansel</i>	<i>M</i>
	<i>Sterna albifrons</i>	<i>Sterne naine</i>	<i>M</i>
	<i>Sterna sanduicensis</i>	<i>Sterne caugek</i>	<i>M</i>
	<i>Sterna caspia</i>	<i>Strene caspienne</i>	<i>M.H</i>
	<i>Larus fuscus</i>	<i>Goeland brun</i>	<i>M.H</i>
<i>Columbidea</i>	<i>Columba livia</i>	<i>Pigeon biset</i>	<i>S</i>
	<i>Columba palumbus</i>	<i>Pigeon ramier</i>	<i>M</i>
	<i>Streptopelia turtur</i>	<i>Tourterelle des bois</i>	<i>M</i>
	<i>Streptopelia senegalensis</i>	<i>Tourterelle maillée</i>	<i>S</i>
	<i>Streptopelia decaocto</i>	<i>Tourterelle turque</i>	<i>M</i>
<i>Cuculidae</i>	<i>Cuculus canorus</i>	<i>Coucous gris</i>	
<i>Tytonidae</i>	<i>Tyto alba</i>	<i>Chouette effraie</i>	<i>S</i>
<i>Strigidae</i>	<i>Otus scops</i>	<i>Hibou petit-duc</i>	

	<i>Asio flammeus</i>	<i>Hibou des marais</i>	
	<i>Athene noctua</i>	<i>Chouette chevêche</i>	
<i>Apodidae</i>	<i>Apus melba</i>	<i>Martinet alpin</i>	
	<i>Apus apus</i>	<i>Martinet noir</i>	<i>M.E</i>
	<i>Apus pallidus</i>	<i>Martinet pâle</i>	<i>S</i>
<i>Alcedinidae</i>	<i>Alcedo atthis</i>	<i>Martin pêcheur</i>	
<i>Upudidae</i>	<i>Upupa epops</i>	<i>Huppe fasciée</i>	<i>S.N</i>
<i>Meropidae</i>	<i>Merops apiaster</i>	<i>Guêpier d'Europe</i>	
<i>Picidea</i>	<i>Jynx torquilla</i>	<i>Torcol fourmilier</i>	<i>S</i>
<i>Alaudidae</i>	<i>Calandrella brachydactyla</i>	<i>Alouette calandrelle</i>	<i>M.E</i>
	<i>Meelanocoryypha calandra</i>	<i>Alouette calandre</i>	
	<i>Alauda arvensis</i>	<i>Alouette des champs</i>	<i>M.H</i>
	<i>Galerida cristata</i>	<i>Cochevis huppé</i>	<i>N</i>
<i>Hirundidae</i>	<i>Hirundo rustica</i>	<i>Hirondelle de cheminée</i>	
	<i>Riparia riparia</i>	<i>Hirondelle de rivage</i>	<i>M.E</i>
	<i>Hirundo daurica</i>	<i>Hirondelle rousseline</i>	
	<i>Ptyonoooprogne rupestris</i>	<i>Hirondelle de rochers</i>	
	<i>Delichon urbica</i>	<i>Hirondelle de fenêtre</i>	<i>M.H</i>
<i>Motacillidae</i>	<i>Anthus trivialis</i>	<i>Pipit des arbres</i>	
	<i>Anthus pratensis</i>	<i>Pipit des prés</i>	<i>M.H</i>
	<i>Anthus cervinus</i>	<i>Pipit à gorge rousse</i>	<i>M.H</i>
	<i>Anthus spinoletta</i>	<i>Pipit sponcielle</i>	<i>M.H</i>
	<i>Anthus spinoletta</i>	<i>Pipit maritime</i>	

	<i>Anthus campestris</i>	<i>Pipit rousseline</i>	
	<i>Motacilla alba</i>	<i>Bergeronnette grise</i>	<i>M.H</i>
	<i>Motacilla flava</i>	<i>Bergeronnette printanière</i>	<i>M</i>
	<i>Motacilla cinerea</i>	<i>Bergeronnette des ruisseaux</i>	
<i>Pycnonotidae</i>	<i>Pycnonotus barbatus</i>	<i>Bulbul des jardin</i>	<i>S.N</i>
<i>Laniidae</i>	<i>Tchagra senegala</i>	<i>Tchagra à tête noire</i>	<i>N</i>
	<i>Lanius excubitor</i>	<i>Pie-grièche grise</i>	<i>S</i>
	<i>Lanius senator</i>	<i>Pie-grièche à tête rousse</i>	<i>M</i>
<i>Sylviidae</i>	<i>Locustelle naevia</i>	<i>Locustelle tachetée</i>	
	<i>Locustelle luscinioides</i>	<i>Locustelle lusciniôide</i>	<i>N</i>
	<i>Acrocephalus scipaceus</i>	<i>Rousserole effarvatte</i>	<i>N</i>
	<i>Acrocephalus arundinaceus</i>	<i>Rousseline turdoïde</i>	<i>N</i>
	<i>Acrocephalus melanopogon</i>	<i>Lusciniolle à moustaches</i>	<i>H</i>
	<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>	<i>Pragmite des joncs</i>	
	<i>Cettia cetti</i>	<i>Bouscale de cetti</i>	<i>S</i>
	<i>Cisticola juncidis</i>	<i>Cisticole des joncs</i>	<i>S</i>
	<i>Acrocephalus paludicola</i>	<i>Phragmite aquatique</i>	
	<i>Hippolais icterina</i>	<i>Hypolais ictéérine</i>	
	<i>Hippolais polyglotta</i>	<i>Hypollais polyglotte</i>	
	<i>Hippolais pallida</i>	<i>Hypolais pale</i>	
	<i>Sylvia communis</i>	<i>Fauvette grisette</i>	<i>N</i>

	<i>Sylvia borin</i>	<i>Fauvette des jardins</i>	
	<i>Sylvia atricapilla</i>	<i>Fauvette à tête noire</i>	<i>S.N</i>
	<i>Sylvia melanocephala</i>	<i>Fauvette mélanocéphale</i>	<i>S</i>
	<i>Sylvia rueppelli</i>	<i>Fauvette de Rüppelle</i>	
	<i>Sylvia conspicillata</i>	<i>Fauvette à lunettes</i>	
	<i>Sylvia sarda</i>	<i>Fauvette sarde</i>	
	<i>Sylvia undata</i>	<i>Fauvette pitchou</i>	<i>M</i>
	<i>Phylloscopus trochilus</i>	<i>Pouillot fitis</i>	
	<i>Phylloscopus collybita</i>	<i>Pouillot véloce</i>	<i>M.H</i>
	<i>Phylloscopus sibilatrix</i>	<i>Pouillot siffleur</i>	
<i>Muscicapidae</i>	<i>Muscicapa striata</i>	<i>Gobe –mouche gris</i>	
	<i>Ficedula hypoleuca</i>	<i>Gobe- mouche noir</i>	
<i>Turdidae</i>	<i>Saxicola torquata</i>	<i>Traquet pâtre</i>	
	<i>Saxicola rubetra</i>	<i>Traquet des prés</i>	
	<i>Oenanthe oenanthe</i>	<i>Traquet motteux</i>	
	<i>Oenanthe hispanica</i>	<i>Traquet oreillard</i>	
	<i>Turdus merula</i>	<i>Merle noir</i>	<i>S.N</i>
	<i>Turdus torquatus</i>	<i>Merle à plastron</i>	
	<i>Phoenicurus ochrusos</i>	<i>Rouge queue noir</i>	
	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	<i>Rouge queue à front blanc</i>	
	<i>Erithacus rubecula</i>	<i>Rouge gorge</i>	<i>M.E.H</i>
	<i>Luscinia svecica</i>	<i>Gorge bleue à miroir</i>	<i>M.H</i>
	<i>Luscinia megarhynchos</i>	<i>Rosignole philomèle</i>	<i>M</i>
	<i>Cercotrichas galactotes</i>	<i>Agrobate roux</i>	

	<i>Turdus philomelos</i>	<i>Grive musicienne</i>	
<u>Paridae</u>	<i>Parus caeruleus</i>	<i>Mésange bleue</i>	S.N
	<i>Parus major</i>	<i>Mésange charbonnière</i>	S
<u>Troglodytidae</u>	<i>Troglodytes troglodytes</i>	<i>Troglodyte mignon</i>	N
<u>Emberizidae</u>	<i>Emberiza hortulana</i>	<i>Bruant ortolan</i>	
	<i>Emberiza schoeniclus</i>	<i>Bruant des roseaux</i>	M.H
	<i>Miliaria calandra</i>	<i>Bruant proyer</i>	
<u>Fringillidae</u>	<i>Fringilla coelebs</i>	<i>Pinson des arbres</i>	N
	<i>Fringilla montifringilla</i>	<i>Pinson du nord</i>	
	<i>Carduelis carduellis</i>	<i>Chardonneret élégant</i>	S.N
	<i>Carduelis chloris</i>	<i>Verdier d'Europe</i>	S
	<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	<i>Gros- bec casse noyaux</i>	
	<i>Acanthis caccabina</i>	<i>Linotte mélodieuse</i>	N
	<i>Serinus serinus</i>	<i>Serin ceni</i>	N
<u>Phoecidae</u>	<i>Passer hispaniolensis</i>	<i>Moineau espagnol</i>	S
	<i>Passer domesticus</i>	<i>Moineau domestique</i>	S
		<i>Moineau hybride</i>	
<u>Sturnidae</u>	<i>Sturnus vulgaris</i>	<i>Etourneau sansonnet</i>	M.H
	<i>Sturnus unicolor</i>	<i>Etourneau unicolore</i>	S
<u>Oriolidae</u>	<i>Oriolus oriolus</i>	<i>Loriot d'Europe</i>	
<u>Corvidae</u>	<i>Corvus corax</i>	<i>Grand corbeau</i>	S
	<i>Pica pica</i>	<i>Pie bavarde</i>	