

République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement
Supérieur et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de Magister

Option : Immunologie animale

Thème :

**Etude séro-épidémio-climatique des
dirofilarioses canines dans le Nord
Algérien**

Présenté par : LAIDOU DI Younes

Les membres du jury :

- | | |
|--|------------|
| ➤ Dr. Mohammedi Dahmane, ENSV | Président |
| ➤ Dr. Lamara Ali, MCA ENSV | Examineur |
| ➤ Dr. Bitam Idir, MCA, ESSAIA | Examineur |
| ➤ Pr. Ben-Mahdi Meriem-Hind, ESSAIA-ENSV | Promotrice |

Soutenu publiquement le : 30/10 /2017

DEDICACES

***Au nom de Dieu le tout puissant et le très miséricordieux par la grâce du quel
j'ai pu mener à son terme ce travail que je dédie***

A ma famille

A mes amis

A mes collègues

***À tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près.....
UN GRAND MERCI !!!***

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma reconnaissance et mes remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail et ceux qui m'ont fait l'honneur de le juger.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à **Madame Benmahdi Meriem-Hind**

Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger et directrice de l'Ecole Supérieure des Sciences de l'aliment et des industries agroalimentaires d'Alger, qui m'a permis de réaliser ce travail, m'a aisément ouvert le laboratoire pour mes recherches, elle a toujours bien veillée à ce que ce travail aboutisse et elle m'a toujours encouragée pour aller plus loin. Veuillez trouver ici le témoignage de mon affection et de mon estime.

J'adresse mes remerciements et exprimer ma gratitude à **Monsieur Mohammedi D**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce travail, qu'il trouve ici l'expression de ma parfaite reconnaissance et mes vifs remerciements.

Je dois une reconnaissance particulière à **Monsieur Bitam Idir**,

Maître de Conférences à l'Ecole Supérieure des Sciences de l'aliment et des industries agroalimentaires d'Alger, de m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury et de juger mon travail. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements pour ces conseils très précieux et son encouragement. Il a toujours été très disponible et ouvert à la discussion ce qui m'a permis de bénéficier de son grand savoir. Je le remercie particulièrement pour sa confiance, sa générosité et sa gentillesse, ce fut très enrichissant de le rencontrer.

J'exprime mes vifs remerciements à **Monsieur Lamara Ali**

Maître de Conférences A à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, pour avoir bien voulu examiner mon travail. Tout mon respect et Sincères remerciements.

Je tiens à remercier vivement **Monsieur Lafri Ismail**

Maître de Conférences B à l'institut des sciences vétérinaires de Blida pour son aide précieuse, pour sa gentillesse illimité, sa serviabilité, ses qualités humaines rares et encouragements depuis les premiers pas. Hommages respectueux.

Mes remerciements à **Monsieur Medkour Hacène**

Lauréat du magistère à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger pour son encouragement, les bons moments passés ensemble et tout le temps dépensé dans la réalisation de ce travail. Merci beaucoup frère.

Mes remerciements particuliers

A Monsieur Tahir Djamel

PhD à l'Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Émergentes, Aix-Marseille Université, pour son aide précieuse, sa disponibilité, sa gentillesse illimitée et sa serviabilité. Je lui suis infiniment reconnaissant.

A tous les vétérinaires qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

RESUME

Les Dirofilarioses canines causées par *D. immitis* et *D. repens* nématodes filaires potentiellement zoonotiques. Leur propagation et recrudescence sont largement liées à l'effet climatique, d'où le développement de plusieurs modèles prédictifs. En utilisant un modèle mensuel, la transmission des dirofilarioses est théoriquement possible dans tout le Nord du pays. 12 à 20 Générations de Dirofilariose par an et 5 à 7 mois de transmission sont enregistrées. La combinaison de l'évolution extrinsèque et intrinsèque du parasite chez ses hôtes a permis de développer un modèle épidémioclimatique classant l'ensemble des 45 zones analysées en quatre Secteurs épidémio-climatiques (SE-C) "I, II, III, IV". L'exploration sérologique de *D.immitis* via un ELISA {DiroChek® Zoetis} révèle un Ratio de 4,83, et une fréquence de {82,85% ± 3,26 ; n=140}. Etalée sur ¾ des SE-C, le SE-C-I & III représenté par l'échantillon de Bouira, et le SE-C-IV par Sétif, où les résultats étaient de {(66,07% ± 9,81 ; n=56) ; (85,71% ± 8,29 ; n=14) ; (95,71% ± 3,31 ; n=70)} respectivement ; l'équivalent de {70% ± 3,26 ; n=70} à Bouira et {95,71% ± 3,31 ; n=70} à Sétif. La majorité des facteurs de risque analysés montrent une influence sur la Séroprévalence de la dirofilariose cardiopulmonaire canine. La recherche des microfilaires de *D.immitis* par la technique modifiée de Knott sur une fraction des sujets prélevés à Sétif, a révélé une rareté de l'infection occulte {2,86% ; n=36}, et une prévalence de {94,44% ; n=36}, où {97,14%} de séropositifs sont ainsi détectés. Cinq autres spécimens de Microfilaires ont été retrouvées, à savoir *D.repens* {63,89% ; n=36}, *A.reconditum* {11,11% ; n= 36} et {2,78% ; n=36} partagé entre *Brugia sp* et deux autres espèces non identifiées, toutes ces atteintes parasitaires se corrélaient significativement positivement lorsque les sujets sont atteints par *D. immitis*.

Mots clés : Nord Algérien ; Secteur Epidémio-climatique ; Dirofilarioses Canines ; Microfilaires, Prévalence.

ABSTARCT

Canine Dirofilariasis, caused by *D.immitis* and *D.repens*, who are filarioid nematodes of animals and humans. Their spread and recrudescence are largely related to the climatic effect. From where development of several predictive models. By using a monthly punctual model, the transmission of Dirofilariasis is theoretically possible in all North of the country. Between 12 and 20 annual Heartworm Generation, and 5 to 7 months of transmission are recorded. The parasite's intrinseque and extrinseque evolution combinaison made it possible to classify the 45 area analyzed into four Epidemio-Climatic Clusters "E-CC: I,II,III,IV". The serological investigation of *D.immitis* via an ELISA (DiroChek® Zoetis) revealed a Ratio of 4.83, and a frequency of $\{82.85\% \pm 3.26; n = 140\}$. Spread out over $\frac{3}{4}$ of E-CC, E-CC-I & III represented by the sample of Bouira, and E-CC-IV by the sample of Sétif. Where the results were $\{(66,07\% \pm 9,81; n=56); (85,71\% \pm 8,29; n=14); (95,71\% \pm 3,31; n=70)\}$ respectively. The equivalent of $(70\% \pm 3,26; n=70)$ in Bouira and $(95,71\% \pm 3,31; n=70)$ in Sétif. The majority of the analyzed risk factors show an influence on Seroprevalence and Prevalence of canin Heartworm disease. The search for *D.immitis* microfilariae by Knott's modified technique on a fraction of specimen sampled from Setif revealed a rarity of occult infection $(2.86\%; n = 36)$, and a prevalence of $\{94.44\%; n = 36\}$, where $\{97.14\%\}$ of seropositif individuals are thus detected. Five other specimens of Microfilariae were found, namely *D.repens* $\{63.89\%; n = 36\}$, *A.reconditum* $\{11.11\%; n = 36\}$ and $\{2.78\%; n = 36\}$ shared between *Brugia* sp and two other unidentified species, all these parasite infections correlate significantly positively when the dogs are affected by *D. immitis*.

Key words: Algerian north; Epidemio-Climatic Clusters; Canine Dirofilariasis; Microfilaria; Prevalence.

ملخص

امراض الخيطاء لدى الكلاب الناجمة عن *D.repens* و *D.immitis* نوع من الديدان الخيطية لدى الحيوانات و الانسان. انتشارها و تفاقمها مرتبطان بالتأثير المناخي، الذي هو اساس تطوير عدة نماذج توقعاتية. باستعمالنا لنموذج شهري نقطي تبينت امكانية الانتقال الفرضي لأمراض الخيطاء في جل ارجاء شمال البلد. من 12 الى 20 جيلا سنويا للخيطاء و 5 الى 7 اشهر تعينت فيها العدوى، هذا النوع من الوصف سمح لنا بتصنيف جميع المناطق المدروسة ذات عدد الـ 45 منطقة الى اربع قطاعات مناخية وبائية ق-م-و (IV ; I ; III ; II). الدراسة المصلية – الوبائية-المناخية المحققة باستعمال الفحص الأنزيمي المناعي {DiroChek® Zoetis}، ELISA، ت ان محصلة الاصابة بمرض الخيطاء هو 4.83 و نسبة الانتشار المصلي هي (82,85% $\pm$ 3,26 ; n=140) زعة على 3/4 ق-م-و، ق-م-و I و III الممثلان بعينات البويرة و ق-م-و IV بعينة سطيف، اين كانت النتائج { (95,71% $\pm$ 3,31 ; n=70); (85,71% $\pm$ 8,29 ; n=14) ; (66,07% $\pm$ 9,81 ; n=56) } بالترتيب. ما يعادل بالبويرة (70% $\pm$ 3,26 ; n=70) و (95,71% $\pm$ 3,31 ; n=70) بسطيف. معظم العوامل المؤثرة أظهرت مفعولها على كل من الانتشار و الانتشار المصلي لداء الخيطاء.

ان استكشاف المكروفيلازية بطريقة {Knott modifiée} على قسم من العينات المأخوذة بسطيف، اظهر ندرة الاصابات الصامتة (2,86% ; n=35) ما الانتشار المرضي فيقدر ب (94,44% ; n=36) حيث ان من العينات المصلية الايجابية اكتشفت (97,14%). كما انه تم تعريف خمس انواع اخرى من المكروفيلازية ذات الانتشار فنجد *D.repens* ب (63, 89% ; n=36) و (11,11% ; n= 36) ل *A.reconditum* و (11,11% ; n= 36) مشتركة بين كل من *Brugia sp* نوعان اخران من المكروفيلازية لم يتم تعريفهما. كل هذه الاصابات تناسقها فعالتي ايجابي عندما يكون الفرد مصابا ب *D.immitis*.

الكلمات الاساسية: الشمال الجزائري، القطاع الوبائي المناخي، داء الخيطاء لدى الكلاب، مكروفيلازية، الانتشار و الانتشار المصلي،

I. Partie Bibliographique

Figure	Titre	Page
Figure n° : 1	L'épi-système de la dirofilariose. Les principales interactions entre les éléments impliqués, {le climat, et humain}. modifié à partir de [F. Simon et al, 2017].	05
Figure n° : 2	Distribution géographique des différentes espèces de <i>Dirofilaria</i> chez les hôtes vertébrés dans le monde.	10
Figure n° : 3	Les changements de l'incidence de la dirofilariose humaine selon les cas rapporté	12
Figure n° : 4	La durée approximative de la période de transmission de <i>Dirofilaria</i> spp. par an en Europe	14
Figure n° : 5	Répartition mondiale d' <i>Ae. albopictus</i> en 2011	15
Figure n° : 6	Francesco Birago "1626"	17
Figure n° : 7	Joseph Leidy "1847"	17
Figure n° : 8	Alcide Railliet "1911"	17
Figure n° : 9	Henri Vallée "1911"	17
Figure n° : 10	Cycle de vie biologique de <i>D. immitis</i> et <i>D. repens</i> . mf: <i>Microfilaria</i> d'après	23
Figure n° : 11	Processus et mécanismes de la dirofilariose cardiopulmonaire canine	27
Figure n° : 12	Les changements pathologiques des artères pulmonaires associés à la dirofilariose cardiopulmonaire canine.	28
Figure n° : 13	Dirofilariose sous-cutanée canine à <i>D.repens</i>	30
Figure n° : 14	Révélation immuno-histochimique positive via des Anti-WSP dans des microfilaries	34
Figure n° : 15	Prévision de la réponse immunitaire au cours des infections par <i>D.immitis</i>	35
Figure n° : 16	Mécanismes de survie et d'échappement immunitaire de <i>D. immitis</i> .	37

II. Partie expérimentale

II.1. Etude épidémio-climatique des dirofilarioses canines en Algérie

Figure	Titre	Page
Figure n° : 1	Distribution linéaire comparative du nombre de GDa entre les deux modèles prédictifs	47
Figure n° : 2	Graphique de Bland & Altman de la distribution des moyennes	48
Figure n° : 3	comparaison de la distribution des différences de moyennes à la distribution normale	48
Figure n° : 4	Box plot représentant la moyenne et la médiane des différences	48
Figure n° : 5	Série de lissage, et courbe de transmission théorique de la dirofilariose dans le nord de l'Algérie, selon le modèle mensuel ponctuel	50
Figure n° : 6	Comparaison des activités épidémioclimatiques de la dirofilariose au sein des secteurs géographiques (Classification K-means).	54
Figure n° : 7	Dendrogrammes de Classification des Zones géographique en fonction de leurs activités	56
Figure n° : 8	Proportion des Zones en activité par Secteur correspondent à l'extinction de la période de transmission "Evaluation Hebdomadaire".	62
Figure n° : 9	Carte de repartitions des Quatre Secteurs Epidémio-climatique sur le Nord du pays.	63
Figure n° : 10	Carte à échelle Froid/Chaud de Prévision, fondée à partir du modèle épidémioclimatique. Evaluation de l'intensité de la transmission de la dirofilariose dans les différentes zones géographiques du Secteur-I.	64
Figure n° : 11	Carte à échelle Froid/Chaud de Prévision, fondée à partir du modèle épidémioclimatique. Evaluation de l'intensité de la transmission de la dirofilariose dans les différentes zones géographiques du Secteur-II	65
Figure n° : 12	Carte à échelle Froid/Chaud de Prévision, fondée à partir du modèle épidémioclimatique. Evaluation de l'intensité de la transmission de la dirofilariose dans les différentes zones géographiques du Secteur-III	66
Figure n° : 13	Carte à échelle Froid/Chaud de Prévision. Fondée à partir du modèle épidémioclimatique. Evaluation de l'intensité de la transmission de la dirofilariose dans les différentes zones géographiques du Secteur-IV	67
Figure n° : 14	Carte à échelle Froid/Chaud de Prévision pour l'évaluation de l'intensité de la transmission de la dirofilariose dans les différents Secteurs épidémio-climatique du Nord Algérien	68

II.2. Etude sérologique de la dirofilariose cardiopulmonaire canine

Figure	Titre	Page
Figure n° : 15	Carte Géo-Climatique de la wilaya de Bouira, Situation et Relief.	71
Figure n° : 16	Carte Géo-Climatique de la wilaya de Sétif, Situation et Relief.	72
Figure n° : 17	Carte descriptive de la Zone d'étude selon le Modèle Diro-Epidémio-Climatique { Map-Creator, Copyright ©2003-2015, preamp. Algeria vegetation-Map's. (Original 2017)}.	76
Figure n° : 18	Récapitulatif des principales étapes de la technique sérologique destinée à révéler les antigènes de D.immitis « Di-Ag » « Synthèse personnelle ».	77
Figure n° : 19	Lecture visuelle de la plaque ELISA après révélation	78
Figure n° : 20	Graphique sémantique différentiel comparatif de l'indice de la dirofilariose en fonction des caractères démographiques au sein des échantillons	81
Figure n° : 21	Différentes interactions révélées entre l'âge et la dirofilariose canine	82
Figure n° : 22	Représentation des sujets séropositifs en fonction de l'activité des chiens	84
Figure n° : 23	Représentation des résultats de la sérologie en fonction de l'état clinique de l'animal	85
Figure n° : 24	Chien en défaillance immunitaire	86
Figure n° : 25	Chien présentant un système immunitaire réactionnel	87
Figure n° : 26	Chien présentant un Bon statu immunitaire	87
Figure n° : 27	Dirofilariose cardiopulmonaire canine, Atteinte pulmonaire/ Ascite	87
Figure n° : 28	Dirofilariose cardio-pulmonaire canine clinique avec atteinte multiple associé à une défaillance immunitaire	87
Figure n° : 29	Animal présentant les signes d'un système immunitaire fortement réactionnelle	87
Figure n° : 30	Dirofilariose clinique associée à une leishmaniose sévère	87
Figure n° : 31	Suspicion d'une dirofilariose Cardiopulmonaire clinique "A"; et à localisation Erratique "B",	88
Figure n° : 32	Suspicion d'une dirofilariose oculaire, à D. immitis; et résultat du traitement par une seule injection de l'ivermectine	88
Figure n° : 33	Evolution de la séroprévalence en fonction de l'intensité du risque epidémio-climatique et sa répercussion sur la population canine étudiée	89

II.2. Etude parasitologique des filarioses chez l'hôte réservoir « Canis familiaris »

Figure	Titre	Page
Figure n° : 35	(1,2,3,4,5,) D. immitis; (6,7) D. reconditum; (8,9) D. repens ; (10, 11) D. dracunculoides ; (12) Larve infectante de Depetalonema sp.	96
Figure n° : 36	Extrémité postérieur d'une Brugia sp microfilaria like,	96
Figure n° : 37	Extrémité postérieur d'une Brugia sp microfilaria like,	96
Figure n° : 38	Extrémité postérieur d'une Brugia sp microfilaria like,	96
Figure n° : 39	Espèces non identifiées, obtenues à partir du sang canin	98
Figure n° : 40	Carte des Corrélations, à échelle froid-chaud,	102
Figure n° : 41	Carte des Corrélations Noir et Blanc pour identification des corrélations Positives et Négatives respectivement	102
Figure n° : 42	Carte des Corrélations et leur intensités,	103

I. Partie Bibliographique

Tableau	Titre	Page
Tableau n° : 1	Biologie et épidémiologie des principaux agents des filarioses	4
Tableau n° : 2	Classification, selon l'Inventaire National du Patrimoine Naturel	18
Tableau n° : 3	Listes des moustiques potentiellement vecteurs de <i>Dirofilaria</i>	20
Tableau n° : 4	Classification cliniques des sujets selon l'intensité du risque	33
Tableau n° : 5	Aspects de la dirofilariose chez ses hôtes définitifs	38

II. Partie Expérimentale

II.1. Etude Epidémio-climatique de la dirofilariose cardiopulmonaire canine en Algérie

Tableau	Titre	Page
Tableau n° : 1	Tableau récapitulatif des formules et équations utilisées dans les modèles	43
Tableau n° : 2	distribution des stations météorologiques sur les secteurs Geoclimatiques	43
Tableau n° : 3	Description des stations météorologiques {Classification géo-climatique}	44
Tableau n° : 4	Equations utilisées pour le calcul des UDD hebdomadaire	45
Tableau n° : 5	Statistique Description des résultats obtenus par les deux modèles	47
Tableau n° : 6	Description des Secteur Géo-Climatique via le modèle prédictif classique	49
Tableau n° : 7	Division territoriale via K-means au regard l'impact climatique sur la dirofilariose	55
Tableau n° : 8	distribution de la variance entre les classes et les interclasses au sein de la CHA	55
Tableau n° : 9	Description Epidémio-Climatique obtenue par la CHA	57
Tableau n° : 10	Comparaison inter-secteurs au regard des GDa durant les trois dernières années	58
Tableau n° : 11	Variation annuelles des GDa.	58
Tableau n° : 12	Comparaison entre les quatre Secteurs en fonction de la longueur de la saison de la transmission	59

II.2. Etude sérologique de la dirofilariose cardiopulmonaire canine

Tableau	Titre	Page
Tableau n° :13	Paramétrage de l'échantillonnage stratifié, selon [Toma 2001] et données disponible	74
Tableau n° : 14	Répartition de l'échantillon prélevé en fonction des différentes origines	75
Tableau n° : 15	Résultats de la séroprévalence de <i>D.immitis</i> en fonction des différents secteurs et wilayas étudiés	79
Tableau n° : 16	Répartition des caractères démographiques et leurs Ratios sur les échantillons.	80
Tableau n° : 17	Distribution de l'indice de la dirofilariose en fonction des différents critères démographiques	81
Tableau n° : 18	Effet épidémio-climatique de la dirofilariose sur l'âge (Description utilisant l'âge moyen des effectifs).	83
Tableau n° : 19	Effet de l'âge sur la séroprévalence de la dirofilariose	83
Tableau n° : 20	Résultat de la sérologie en fonction du statut immunitaire des sujets et de sa fréquence au sein de la population testée	86
Tableau n° : 21	Analyse statistique et représentation des résultats de l'effet des GDa confrontées sur la séroprévalence dans les différents secteurs épidémio-climatiques	90
Tableau n° : 22	Analyse statistique et représentation des résultats de l'effet de la période de risque vécue sur la séroprévalence dans les différents secteurs épidémio-climatiques	90

II.3. Etude parasitologique des filarioses chez l'hôte réservoir « *Canis familiaris* »

Tableau	Titre	Page
Tableau n° : 23	Identification morphologique des microfilaries obtenues par la technique modifiée de Knott'	95
Tableau n° : 24	Résultat Effectif/Proportions des Coïnfections Diagnostiquées	100
Tableau n° : 25	L'Analyse de tendance linéaire entre les séropositifs et les différentes coïnfections	100
Tableau n° : 26	Comparaison des prévalences parasitaires observées chez les Séropositifs à <i>Dirofilaria immitis</i>	101
Tableau n° : 27	Corrélations positives significatives entre les différentes coïnfections parasitaires, {Coefficient de Corrélation de Pearson avec P-value, Seuil de Signification =0,05}	101

SOMMAIRE

Dédicaces

Dédicaces

Remerciements

Résumé

Liste des tableaux

Liste des figures

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. INRTRODUCTION	2
2. GENERALITES SUR LES FILARIOSE CANINE	3
2.1. Généralités	3
2.2. Filarioses canines	3
3. Epidémiologie des dirofilarioses	4
A. La complexité biologique	4
B. Facteurs extrinsèques	6
C. Interactions	7
4. Bases fondamentales de l'étude épidémiologique des dirofilarioses	8
4.1. Distribution géographique et prévalences	9
a. Dirofilarioses animales	9
b. Dirofilarioses félines	11
c. Dirofilarioses Humaines	11
4.2. Changement climatique et propagation de la dirofilariose	13
a. Modèles de prévision de la dirofilariose	13
b. Emergence/réémergence du vecteur (Cas d'Aedes albopictus)	15
5. Etude des dirofilarioses à D. immitis & D. repens	16
5.1. Etude des parasites	16
A. Dirofilaria immitis (Leidy, 1856), Railliet et Henry, 1911	16
Etymologie	16
Synonymie	17
Historique	17
B. Dirofilaria repens ; Railliet and Henry, 1911	17

Etymologie	17
Synonymie	17
Historique	18
C. Classification	18
D. Hôtes définitifs	19
a. Hôtes définitifs (réservoir du genre Canis)	19
b. Hôtes définitifs du genre Félin	19
c. Hôtes accidentels	20
E. Hôte intermédiaire	20
F. La bactérie symbiotique (Wolbachia) dans l'étude et la biologie de <i>Dirofilaria</i>	22
G. Cycles de vie et mécanismes biologiques	22
a. Développement chez l'hôte vertébré	23
b. Développement chez le moustique vecteur	25
5.2. Etude des dirofilarioses	26
5.2.1. Physiopathogénie des dirofilarioses chez le chien	26
A. Dirofilariose cardiopulmonaire canine	26
I. Localisations erratiques	28
II. Symptomatologie	29
B. Dirofilarioses sous-cutanée/oculaire	30
5.2.2. Interactions hôte-parasite au cours des dirofilarioses	31
5.2.3. Réponse immunitaire	31
5.2.4. Mécanismes immunopathogénique au cours des dirofilarioses	33
5.2.5. Mécanismes pathogène non reliés à l'immunité	35
5.2.6. Mécanisme de survie parasitaire	36
5.3. Particularité des aspects de dirofilariose-hôte, traitement et diagnostic	37

PARTIE EXPERIMENTALE

ETUDE EPIDEMIO-CLIMATIQUE DES DIROFILARIOSES CANINES EN ALGERIE	40
1. ETUDE EPIDEMIO-CLIMATIQUE DES DIROFILARIOSES CANINES EN ALGERIE	40
A. Problématique et objectif de l'étude	41
A. MATERIELS ET METHODES	
1.1. Etude Epidémio-climatique des dirofilarioses Canines en Algérie	41
1.2. Définition des indicateurs épidémiologiques	41
1.2.1. Strate géographique	41
1.2.2. Secteur géo-climatique	41
1.2.3. Zone géographique	41
1.2.4. Secteur epidémio-climatique	41

1.2.5. Modèles prédictifs	42
1.2.5.1. Modèle classique	42
1.2.5.2. Modèle Mensuel Ponctuel	42
1.2.5.3. Modèle Mensuel Continu	42
1.2.5.4. Modèle epidémio-climatique	42
1.3. Base de données climatiques	43
1.4. Calcule des UDD selon le Modèle classique, basé sur les données quotidiennes	45
1.5. Modèle Mensuel Ponctuel et continu	45
1.6. Calcul du nombre des Unités de Développement de Dirofilariose Annuelle UDDa	46
1.7. Nombre de générations de Dirofilariose/An GDa	45
1.8. Validation du modèle utilisé	46
B. RESULTATS	46
1. Validation du modèle prédictif de la dirofilariose	46
2. Description de l'effet climatique sur la dirofilariose dans le Nord Algérien	48
3. Mise en place d'un modèle epidémio-climatique	51
Définition des nouveaux indicateurs	51
Vitesse de Reproductibilité	52
Nombre de microfilarémie	52
Nombre de Néo-générations	52
Durée de vie de L3 chez le moustique	52
4. Classification des Zones	53
Classification K-means suivit d'une CAH	53
Résultat de la classification de K-means	53
5.3. La classification Ascendante Hiérarchique (CAH)	55
5. Validation du modèle	57
Le nombre de Génération de Dirofilariose annuelle	57
Durée de la période de transmission	59
Comparaison inter-Secteur de la période de transmission	59
Début/Fin de période de transmission	60
7. Exploitation du modèle epidémio-climatique	63

ETUDE SEROLOGIQUE DE LA DIROFILARIOSE CARDIOPULMONAIRE CANINE

2. ETUDE SEROLOGIQUE DE LA DIROFILARIOSE CARDIOPULMONAIRE CANINE	70
Problématique et objectifs	70
1.1. Matériels & Méthodes	70
1.2. Indicateurs épidémiologiques	70

1.2.1. Zones d'étude	70
1.2.1.1. Bouira	70
1.2.1.1.1. Relief	71
1.2.1.1.2. Climat	71
1.2.1.2. Sétif	71
1.2.1.2.1. Relief	73
1.2.1.2.2. Climat	72
1.2.2. Période d'étude	73
1.2.3. Définition du « cas »	73
1.2.4. Unité et Population d'étude	73
1.3. Echantillonnage	73
1.3.1. Calcul du nombre nécessaire d'unités à tirer	73
1.3.1.1. Premier degré	74
1.3.1.2. Deuxième degré	74
1.4. Identification de l'animal et examen clinique	77
1.6. Prélèvement	77
1.5.1. Matériel	77
1.5.2. Mode opératoire	77
1.3.3. Conservation et acheminement	77
1.6. Analyse sérologiques	77
2. Description et principe du test	77
3. Lecture et interprétation	78
3. RESULTATS	79
Résultats de la séroprévalence de la dirofilariose en fonction des zones d'étude	79
I. Etude statistique de la démographie des sous-populations	80
1. Evaluation démographique de la population canine étudiée et présentation des résultats de la sérologie	80
2. Indice de la dirofilariose	80
III. Etude de la séroprévalence en fonction des facteurs de risque	82
III.1. Etude de l'effet associé aux facteurs à effet intrinsèque	82
1. Age	82
2. Sexe	83
3. Statut maternel	83
4. Race	84
5. Activité de l'animal	84
6. Etat clinique	84
7. Statut immunitaire	85
III.2. Etude de l'effet associé aux facteurs à effet extrinsèque	89
1. L'Origine Epidémio-climatique et Géographique	89
2. Le nombre de Générations de Dirofilariose GDa « Confrontées » et la période de transmission vécue	89

ETUDE PARASITOLOGIQUE DES FILARIOSES CHEZ L'HOTE RESERVOIR « *Canis familiaris* »

3. ETUDE PARASITOLOGIQUE DES FILARIOSES CHEZ L'HOTE	92
RESERVOIR « <i>Canis familiaris</i> »	
MATERIEL ET METHODES	92
A. Etude parasitologique des filarioses chez le chien « Hôte définitif »	92
1. Introduction	92
A. Matériel et méthodes	93
1. Prélèvements	93
2. Examen parasitologique	93
3.1. La technique utilisée	93
3.2. Principe de la technique	93
B. RESULTATS ET ANALYSE STATISTIQUES	94
a. Résultats	94
b. Résultats de l'examen parasitologique	98
c. Analyse statistique	99
1.1. Etude comparative des coïnfections parasitaire associées à la Dirofilariose canine {EMH}	99
DISCUSSION	104
I. ETUDE EPIDEMIO-CLIMATIQUE DE DES DIROFILARIOSES CANINES EN ALGERIE	105
1. Validation du Modèle utilisé	105
2. Transmission théorique des dirofilarioses en Algérie selon un modèle mensuel ponctuel	106
3. Le modèle épidémio-climatique	106
3.1. Validation du modèle	106
3.2. Transmission théorique en Algérie selon le modèle épidémioclimatique	107
3.3. Exploitation du modèle épidémio-climatique, stratégie de lutte, prévention et dépistage en Algérie	108
3.4. Evolution annuelle de l'effet climatique sur les Dirofilariose	110
II. ETUDE SEROLOGIQUE DE LA DIROFILARIOSE CARDIOPULMONAIRE CANINE	111
1. Séroprévalence de la Dirofilariose cardiopulmonaire canine en Algérie	111
2. Etude des Facteur de risque influençant la Séroprévalence	111
2.1. Facteurs de risque à effet intrinsèque	111
2.1.1. Le facteur Age	111

2.1.2. Le sexe de l'animal et l'effet du statut maternel	112
2.1.3. La race	113
2.1.4. L'Activité de l'animal	113
2.1.5 L'Etat clinique	114
2.1.6. Le statut immunitaire	115
2.2. Facteurs de risque à effet intrinsèque	115
2.2.1. L'origine géographique	115
2.2.2. Le Secteur Epidémio-Climatique	116
2.2.3. Le nombre de génération de dirofilariose confrontées et période à risque vécue	117
 III. ETUDE PARASITOLOGIQUE	 119
1. Rappel sur la Technique d'échantillonnage, et l'examen parasitologique	119
2. Etude des prévalences déterminées par l'examen parasitologique	119
3. Etude des prévalences des coïnfections parasitaires chez les Séropositifs, et leur corrélations	120
 CONCLUSION	 122
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

Partie Bibliographique

1. INTRODUCTION

Les helminthiases zoonotiques transmises par des vecteurs affectent à l'heure actuelle la santé et l'économie, à la fois dans les pays en voie de développement et les pays développés. Elles se transmettent et sévissent selon le concept d'épi-système [Simón et al, 2017]. Ce dernier inclue l'ensemble des facteurs biologiques, environnementaux, et épidémiologiques à affinité spatio-temporelle spécifique aux zones géographiques. La dirofilariose provoquée par des espèces différentes du genre *Dirofilaria* est une maladie affectant les canidés domestiques et sauvages y compris les félins et accidentellement l'homme, transmises généralement par des espèces différentes de moustiques culicidés. Cette complexité épidémiologique est amplifiée du fait que les espèces de *Dirofilaria* hébergent une bactérie intracellulaire du genre *Wolbachia*, qui joue un rôle principal dans l'embryogenèse, la fertilité et le développement des *Dirofilaria*, parallèlement incriminée dans la pathologie inflammatoire de la maladie. En outre, la transmission par le vecteur est soumise aux conditions climatiques, ce qui rend la dirofilariose susceptible de l'influence du climat et de ses variations.

L'étude de la dirofilariose du point de vue de l'épi-système, exige l'analyse du réseau complexe des interactions établies entre les composantes biologiques, le climat, et les facteurs liés à l'activité humaine, comme les différents problèmes qu'ils posent. Le progrès de la connaissance sur la dirofilariose humaine et animale est en grande partie dû à une approche multidisciplinaire. Néanmoins, différents aspects de la maladie doivent continuer à être étudiée et la coopération entre les pays et les spécialistes impliqués devrait être intensifiée [Simón. et al, 2017].

En Algérie, peu d'études ont été réalisées, et se sont limitées au dépistage épidémiologique de *Dirofilaria immitis*, et pourtant toutes les conditions favorables pour le développement des filarioses, particulièrement les dirofilarioses canines (Climat, Vecteurs, mode de vie des chiens, ainsi qu'une absence de mesures de prévention,.... etc.), d'ailleurs c'est ce qui explique la prévalence de 24,46% pour une population de 184 chiens, mise en évidence dans la région d'Alger [Ben-Mahdi & Madani, 2009].

Le but de ce travail est de connaître le statut des filarioses canines, particulièrement les dirofilarioses à *D. immitis* et *D. repens* chez leurs hôtes, et de mettre en place un modèle prédictif pour leur contrôle épidémiologique (transmission, propagation, prévention et traitement) chez le moustique vecteur, et l'hôte réservoir « *Canis familiaris* », tout en déterminant leur épi-système dans les différentes régions du nord Algérien.

2. GENERALITES SUR LES FILARIOSES CANINES

2.1. Généralités

Les zoonoses vectorielles sont parfois fatales, causant des pertes économiques au sein des populations humaines et animales à travers le monde, et sont responsables d'affections sérieuses sur le plan social et sur le développement économique [B. Faburay, 2015 ; Day, 2011]. Les filarioses sont des helminthiases causées par certaines espèces de la famille des *Onchocercidae* qui est composée d'environ 75 genres qui ont tous des microfilaires sanguicoles ou dermiques. En se servant des piqûres des vecteurs qui s'alimentent sur le sang ou la peau afin de compléter leur cycle, les formes adultes se retrouvent à l'intérieur de l'organisme hôte, loin de tout contact avec le milieu extérieur, tel que les méninges, les vaisseaux lymphatiques et sanguins, ainsi que le tractus intestinal et l'arbre trachéal [Anderson RC, 2000]. Les dirofilarioses font également partie de cette famille parasitaire, elles sont potentiellement zoonotiques, causées par les espèces du genre *Dirofilaria*, transmises par les diptères hématophages. Elles parasitent en premier lieu les chiens domestiques, chats, et autres espèces de mammifères [Simon et al, 2017]. Certaines espèces de *Dirofilaria* causent des infections bénignes, d'autres sont plus virulentes, comme *D. immitis* agent de la dirofilarioses cardiopulmonaire, mettant la vie des animaux infectés en danger. Elle est considérée aux USA comme la plus importante parasitose canine [F. Simon et al, 2017]. Leurs vecteurs s'alimentent sur plusieurs hôtes y compris l'homme, d'où la coexistence des dirofilarioses animales et humaines [Simon et al, 2009]. Précédemment les dirofilarioses humaines se considéraient comme une minorité des maladies accidentelles. Des augmentations dramatiques de leurs fréquences ont été rapportées récemment, associées à de nouveaux aspects cliniques, ce qui a fait d'elles des pathologies émergentes en Europe [Simon et al, 2012]. Ce changement radical de leur statut se trouve lié au concept d'épi-système qui inclue des éléments biologiques et environnementaux, caractérisant le statut épidémiologique spatio-temporel et géographique de ces maladies [Simon et al, 2017].

2.2. Filarioses canines

Le chien constitue l'hôte normal de plusieurs espèces de filaires répertoriées à travers le monde (tableau1), telle que *Dirofilaria immitis* et *Dirofilaria repens*, et à un degré moindre *Acanthocheilonea reconditum*, *Acanthocheilonea dracunculoides*, *Acanthocheilonea grassi*, et *Brugia sp.* Qui se distinguent non seulement par leur biologie, mais aussi par leur propre épi-système [Day, 2016].

Tableau 1: Biologie et épidémiologie des principaux agents des filarioses à partir de [Day, 2016].

Biologie et épidémiologie des principaux agents des filarioses				
Espèce	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>Dirofilaria (Nochtiella) repens</i>	<i>Dipetalonema reconditum</i>	<i>Brugia spp.</i>
Famille	Onchocercidae	Onchocercidae	Setariidae	Onchocercidae
Nom commun de la maladie	Dirofilariose cardiopulmonaire	Filariose sous-cutanée	Filariose sous-cutanée	Filariose à Brugia ou Elephantiose
Hôtes définitifs	CN, CT, Canidés et Félidés sauvages, Lion de mer, le ferret et l'homme	CN, CT, Ours, Hommes, Renards	Canidés	Hommes, Félidés, CN, et les singes
Hôte intermédiaire	Moustiques	Moustiques	Tiques, Puces et Poux	Moustiques
Distribution géographique	Zones tropicale, subtropicales et les régions tempérées du monde	Sud de l'Europe, l'Afrique, l'Asie, l'USA et le Canada	USA, l'Afrique, l'Italie et l'Espagne	L'Inde, Malaysia, et le Sud-Est de l'Asie
Morphologie de l'adulte	M : 120-160 mm F : 250-300 mm	M : 50-70 mm F : 130-170 mm	M : 13 mm F : 23 mm	M : 20 mm* 200-300 µm F : 50 mm * 200-300 µm
Morphologie de la Microfilaire	300*8-10 µm	360*12 µm	270*4,5 µm	210*6 µm
Site de la lésion causée par l'adulte	Le ventricule droit et les artères pulmonaires/ localisation erratiques : l'œil, SNC, artères systémiques et les cavités corporelles	Tissus sous-cutanés	Tissus conjonctifs/ localisations erratiques : Cavités corporelles et les reins	Nodules et vaisseaux lymphatiques
Site de la lésion causée par la microfilaire	Vaisseaux sanguins périphériques	Vaisseaux sanguins périphériques	Vaisseaux sanguins périphériques	Les Capillaires et les vaisseaux lymphatiques

3. Epidémiologie des dirofilarioses

A. La complexité biologique

Les composantes biologiques de l'épi-système des dirofilarioses sont extrêmement complexes, car les espèces de *Dirofilaria* assurent un parasitisme de large spectre à l'échelle des

hôtes intermédiaires et définitifs (Figure 1, tableau 3), leur offrant la capacité d'adaptation dans de nombreux biotopes.

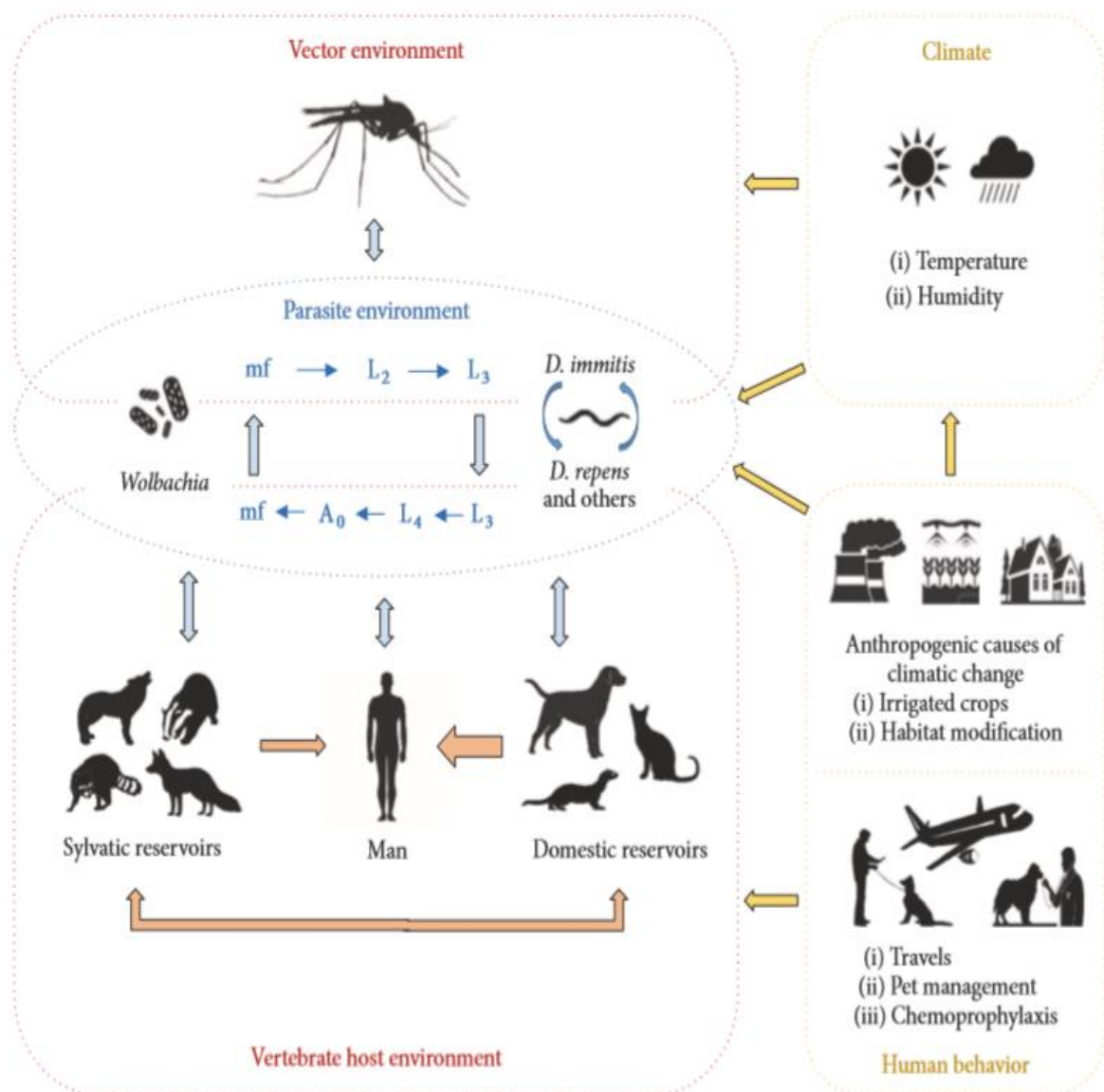


Figure 1: L'épi-système de la dirofilariose et ses principales interactions [Simon et al, 2017].

Au cours du repas sanguin, les vecteurs déposent une hémolymphe bourrée de larves infectantes de *Dirofilaria* (L_3), qui pénètrent activement la peau de l'hôte, une fois à l'intérieur de ce dernier, l'incubation intrinsèque commence et la maturation continue sans aucun arrêt développemental. Les formes larvaires et/ou adultes se localisent dans le système circulatoire, sous-cutané/oculaire, et dans d'autres tissus, en fonction de l'espèce de *Dirofilaria* et de son hôte.

L'hôte canin maintient mieux les microfilaries produites par les femelles adultes dans le système circulatoire faisant de lui un hôte typique de ces parasites, qui assure la contamination du vecteur.

La microfilarémie est quasi-absente chez l'hôte félin, parfois transitoire, et présente à faibles concentrations, alors que chez l'homme les vers n'atteignent même pas leur maturité [Simon, et al., 2012]. Une ou plusieurs espèces de *Dirofilaria* peuvent être en coexistence chez le même hôte et dans la même zone géographique (Figure 2), dont *D. immitis* et *D. repens* sont considérées comme les plus virulentes et les plus fréquentes dirofilarioses dans le monde. En s'appuyant sur la transmission vectorielle assurée par de nombreuses espèces de vecteur, notamment celles des genres *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta*, *Mansonia*, et *Armigeres* [Cancrini et Gabrielli, 2007], elles peuvent infecter un large spectre d'animaux, et tout particulièrement les canidés domestiques et sauvages, avec un potentiel risque zoonotique [Simon et al, 2012 ; Genchi, et al, 2011].

B. Facteurs extrinsèques

Le climat et les facteurs anthropogéniques influencent la biologie du cycle de vie des espèces de *Dirofilaria* (figure 1). Spécifiquement par leur répercussion sur la vie des moustiques, qui sont des organismes écto-thermiques, avec un cycle de vie lié à l'eau, aux facteurs climatiques, tels que la température, la précipitation et l'humidité, ce qui affecte le développement, la densité de leur population, et la période d'activité, ainsi que la diversité des espèces. En outre, le développement des larves L3 (incubation extrinsèque), qui a comme seuil de 14°C, et nécessite une période de 8 à 20 jours pour une température comprise entre 22° à 30° C. L'arrêt transitoire de la transmission s'observe chez les vecteurs, jusqu'à ce que les températures atteignent de nouveau le seuil de 14°C, créant de ce fait la saisonnalité de transmission [Simon et al, 2012]. D'un autre côté l'extension de l'urbanisme et de la construction des systèmes d'irrigation, et des zones de stockage d'eau, ainsi l'utilisation ou non de la chimio-prophylaxie, le transport et l'importation des animaux de compagnie à partir des secteurs endémiques vers les secteurs non endémiques a contribué au changement du statut épidémiologique de ces maladies [Simon et al, 2012 ; Zimmerman et al, 1992 ; Montoya-Alonso et al, 2016]. De même pour la pression de chasse exercée sur les réservoirs sauvages de *Dirofilaria*, et les changements anthropogéniques peuvent avoir des conséquences épidémiologiques, et affectent la circulation des filaires entre le réservoir sauvage, domestique et l'homme [Kravchenko et al, 2016].

C. Interactions

Les différentes interactions établies entre les espèces de *Dirofilaria* et leurs hôtes vertébrés, entre les larves en développement et les vecteurs, et entre les différentes espèces de *Dirofilaria* se trouvant en coïnfection, contribuent à la modulation de la population parasitaire chez l'hôte définitif et par conséquent sur leur transmission. Chez les chiens, les vers vivants de *D. immitis* stimulent une réponse humorale *Th2* non protectrice, associée aux infections microfilariémiques. En revanche une conversion de cette réponse vers une réponse *Th1*, secondaire à la mort des parasites, qui libèrent des bactéries intracellulaires du genre *wolbachia*, ce qui active de nouveau le système immunitaire, ce dernier engendre des phénomènes inflammatoires, des dégénérescences vasculaires, mais également la clairance des microfilaires [Kramer et al, 2005 ; Morchon et al, 2007]. Les chiens peuvent maintenir une population parasitaire adéquate et compatible avec leur survie, en éliminant une partie significative des larves L3 acquises par les infections [Simon et al, 2001].

Le chat constitue un hôte moins approprié, réagissant contre ces affections par une intense réaction immunitaire de type proinflammatoire, qui d'une part empêche et limite la survie des vers adultes, de mêmes pour la production des microfilaires et donc la production peut être fatale pour lui, d'autre part elle empêche ou limite la survie des vers adultes et donc la production des microfilaires, d'autre part se sont des réactions mettant la vie de l'animal en danger [McCall et al, 2008]. A cela s'ajoute la possibilité des localisations erratiques, notamment les localisations cérébrales qui s'entravent au développement naturel des vers [Ader 1979; Cusick et al, 1976; Donahoe et Holzinger 1974; Fukushima et al, 1984; Lindquist et Winters, 1998]. Tant qu'aux hôtes sauvages, ceux du genre canis peuvent développer des infections microfilariémiques de *D. immitis* et/ou *D. repens* plus-ou-moins stables, faisant d'eux des potentiels réservoirs de ces maladies; alors que les autres genres affectés développent uniquement les infections occultes (amicrofilariémiques) [Kravchenko et al, 2016 ; Sacks, 2003].

La désignation d'une espèce animale comme étant un réservoir se détermine non seulement par le pourcentage des individus infectés mais aussi par leur survie et leur capacité de soutenir la reproduction parasitaire à long terme. Les adaptations établies entre le chien et *D. immitis* et *D. repens* ont fait de lui un réservoir typiquement idéal [Simon et al, 2017].

Parmi les hôtes sauvages, ceux qui montrent à la fois les infections microfilariémiques et un comportement qui les met en contact fréquent avec l'homme et l'environnement de la faune domestique, tel que les coyotes, les renards, sont considérés comme des réservoirs dangereux [Lee et al, 2010 ; Kravchenko et al, 2016].

Les différences génétiques inter- et intra-espèces des vecteurs modulent leur résistance aux larves de *Dirofilaria* [Cancrini S. Gabrielli, 2007 ; Morchon et al, 2007]. En outre, l'intensité de l'invasion des tubules de Malpighi par les larves de *Dirofilaria* et leur migration aux compartiments buccaux est responsable de la survie des moustiques. En revanche, ces derniers ont des structures et mécanismes différents qui leur permettent de commander le nombre de larves *L3* qui achèvent leur développement. L'armature buccale, la coagulation du sang, la membrane peritrophique, les defensines de l'hémolymph, et la capacité de mélanisation éliminent une grande partie des larves en développement [Cancrini et Gabrielli, 2007].

Le pourcentage des vecteurs infectés qui survivent à l'infection, la charge parasitaire qu'ils peuvent tolérer, et la prévalence de l'infection déterminent l'écoulement de *L3* vers les hôtes vertébrés. Cependant la coïnfection de *D. immitis* et *D. repens* a été décrites chez les hôtes définitifs et les moustiques vecteurs [Kravchenko et al, 2016 ; Latrofa et al, 2012].

Jusqu'à l'heure actuelle, peu d'études concernant les interactions entre les deux espèces de *Dirofilaria* se trouvant en coïnfection naturelles. Mais des études expérimentales menées sur des chiens montrent que le nombre de vers en maturation de *D. immitis* diminue considérablement si le chien est infecté au préalable par *D. repens*. Ce phénomène ne s'observe que dans les cas où l'ordre des infections est réservé. Cette interaction particulière est le résultat d'une éventuelle modification de la réponse immunitaire naturelle [Genchi et al, 1995].

Néanmoins, le fait que les deux espèces peuvent simultanément accomplir leurs cycles de vie chez le même hôte suggère l'existence de l'exclusion compétitive, qui est un phénomène connu chez les filarioses de l'Afrique [Molyneux et al, 2014].

4. Bases fondamentales de l'étude épidémiologique des dirofilarioses

Le flux de l'information épidémiologique concernant les dirofilarioses animales se concentre sur les dirofilarioses canines, tandis que l'information liée aux dirofilarioses chez les autres hôtes domestiques et sauvages, est en général limitée. Alors que la dirofilariose humaine est soumise à des paradigmes incertains, en effet son image traditionnelle inclut trois concepts:

- (i) *D. immitis* est associée aux nodules pulmonaires, alors que *D. repens* est associés aux nodules sous-cutanées et aux endroits oculaires ;
- (ii) les infections humaines sont provoquées seulement par les vers immatures ;
- (iii) les infections humaines prennent l'allure sporadique et accidentelle ;

Actuellement, le changement de ces paradigmes accompagne les données récentes. Il n'est pas rares d'isoler les vers adultes dans de nouvelles localisations anatomiques distinctes des localisations spécifiques des chacune de ces deux espèces. Les vers adulte de *D. immitis* ont été

retrouvés dans les tissus adipeux crâniens, hépatiques, intraoculaire, et mésentériques ; artères testiculaires ; et les tissus conjonctivaux [Avellis FO et al, 2011 ; Theis JH, 2005], et les vers de *D. repens* été trouvés dans les poumons, le scrotum, le pénis, la corde spermatique, l'épididyme, et les glandes mammaires chez les femelles [Genchi et al, 2011 ; Pampiglione S et Rivas F, 2000]. Une identification incertaine de l'espèce responsable de nodules dirofilaires [Pampiglione S et al, 2009]. A cela s'ajoute les fausses identifications en raison des altérations structurales du parasite, et/ou de sa dégénérescence à l'intérieur des nodules. Dans ces conditions, l'attribution automatique à une espèce particulière en fonction de l'endroit de la lésion du nodule et l'utilisation des techniques diagnostiques avec une valeur prédictive réduite semble insatisfaisante dans l'identification de l'espèce causative dans chaque cas particulier [Simon et al, 2012].

Actuellement la dirofilariose humaine est étudiée par deux perspectives différentes, qui ont fourni des informations complémentaires :

- (i) les études séroépidémiologiques ;
- (ii) (ii) l'examen rétrospectif des cas cliniques étudiés auparavant ;

Les diverses études séroépidémiologiques ont rapporté des taux significatifs de la séoprévalence en anticorps anti-*Dirofilaria*, ce qui suggère un gros risque de l'infection dans les populations humaines vivant dans des secteurs endémiques. Alors que l'examen rétrospectif des cas cliniques accentue l'incidence réelle de la maladie [Simon et al, 2017]. Nous admettons cependant que la dirofilariose humaine est diagnostiquée dans plusieurs pays, l'augmentation dramatique des cas de cette maladie et de son incidence a été confirmée dans le monde entier, notamment les dirofilarioses sous-cutanées/oculaires [Simon et al, 2012 ; Lee et al, 2010 ; Kartashev et al, 2015].

4.1. Distribution géographique et prévalences

a. Dirofilarioses animales

L'épi-système de la dirofilariose se caractérise en Europe et en Asie par la présence de *D. immitis* et *D. repens* coexistence dans la plupart des pays de ces deux continents (Figure 2), et rarement isolées [Genchi et al, 2007]. Des prévalences importantes de *D. immitis* ont été trouvées dans les îles du Canaries, le Madère et dans les pays de la méditerranée (22-40%). La prévalence de *D. repens* qui est comprise entre 23 à 49% dans le Sud-ouest de la Russie et entre 25% à 38% dans quelques pays européens centraux et nordiques [Simon et al, 2012 ; Demiaszkiewicz et al, 2014; Miterpakova et al, 2016]. En Iran, en Chine, et en Inde, des taux

de prévalence compris entre 15 et 60% ont été rapportés pour les deux espèces [Simon et al, 2012 ; K. K. W. To. et al, 2012 ; Wang et al, 2016]. La prévalence de *D.immitis* a augmenté dans quelques régions de l'Inde [Borthakur et al, 2015a&b], mais au Japon des diminutions à 46% en 2001, et à 23% en 2010 ont été rapportées. *D. immitis* a été rapportées chez les félin en Portugal, en Espagne, et en Italie, avec des taux compris entre 3 et 27%, et avec des rapports fréquents en France [Traversa et al, 2010; Vieira et al, 2015]. En Europe, l'augmentation de sa prévalence a été également rapportée de plus en plus dans les populations des renards (3.7%-35%), et celle des chacals (7.7%-23.3%), ainsi que les chiens de *racoona* (31.1%) et parfois chez les loups, alors que *D. repens* a été décrite chez les renards, les loups, les chacals, et les blaireaux avec des taux d'environ 10% dans certains foyers [Kravchenko et al, 2016 ; Vieira et al, 2015 ; Cirovic et al, 2014].

Aux Etats-Unis, la dirofilariose cardiopulmonaire sévit de manière enzootique dans l'Est, le Sud-Est et le centre du pays, où la prévalence nationale est de 33%. Le Canada est peu affecté, à l'exception de l'Ontario où la prévalence est élevée.

D. immitis domine également dans les populations canines d'Afrique et d'Australie (Figure 2). La prévalence de *D. immitis* est entre 1% et 15% [Simon, et al., 2012 ; Lee et al, 2015 ; Alvasen et al, 2016], et entre 0% et 24,46% en Algérie [Ben-Mahdi & Madani, 2009 ; Ammam & Aissi, 2015], et entre 3 et 6% pour *D. repens* en Afrique [Simon et al, 2009 ; Noden et Soni, 2015]. *D. immitis* est endémique dans le Sud-Est de l'Australie [Nguyen, et al., 2016], où elle a été maintenue dans les secteurs périurbains et/ou les foyers à faible densité de population grâce aux réservoirs sauvages (renards et dingos) [Marks et al, 1998 ; Smout et al, 2016]. En Nouvelle Zélande, les infections provoquées par *D.immitis* et *D. repens* sont d'origine d'Australie [McKenna, 2000].

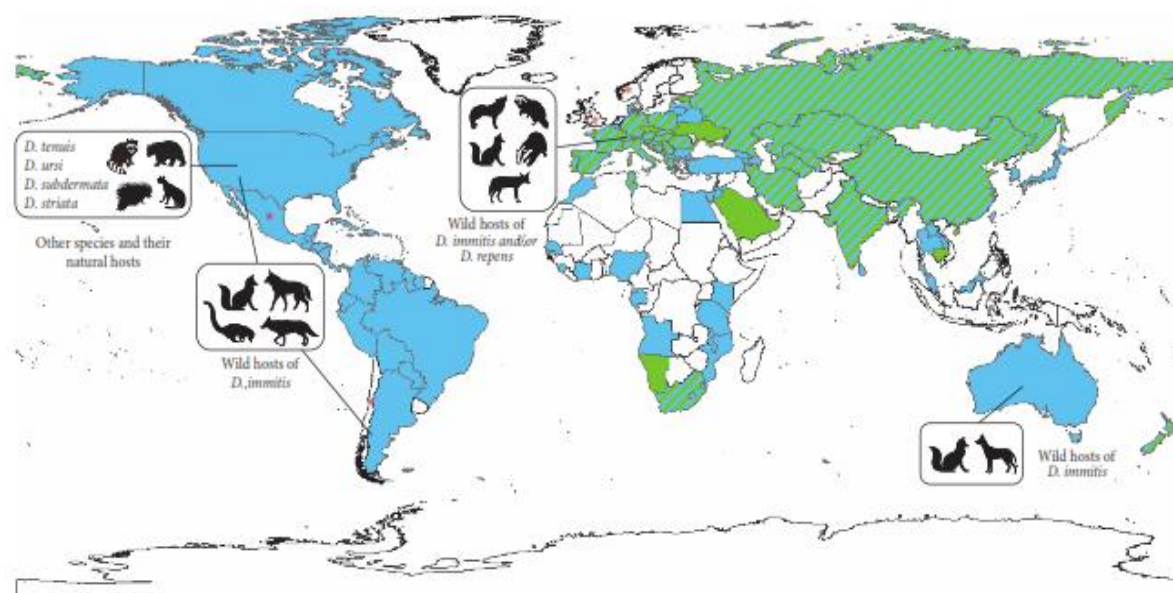


Figure 2: Distribution géographique des différentes espèces de *Dirofilaria* chez les hôtes vertébrés dans le monde. *D. immitis* chez les animaux de compagnie (bleus) ; *D. repens* chez les animaux de compagnie (vert) ; *D. immitis* et *D. repens* chez les animaux de compagnie (barrés) ; sans information (clair) ; (*) infections sous-cutanées sporadiques. D'après [Simon, et al., 2017].

b. Dirofilarioses félines

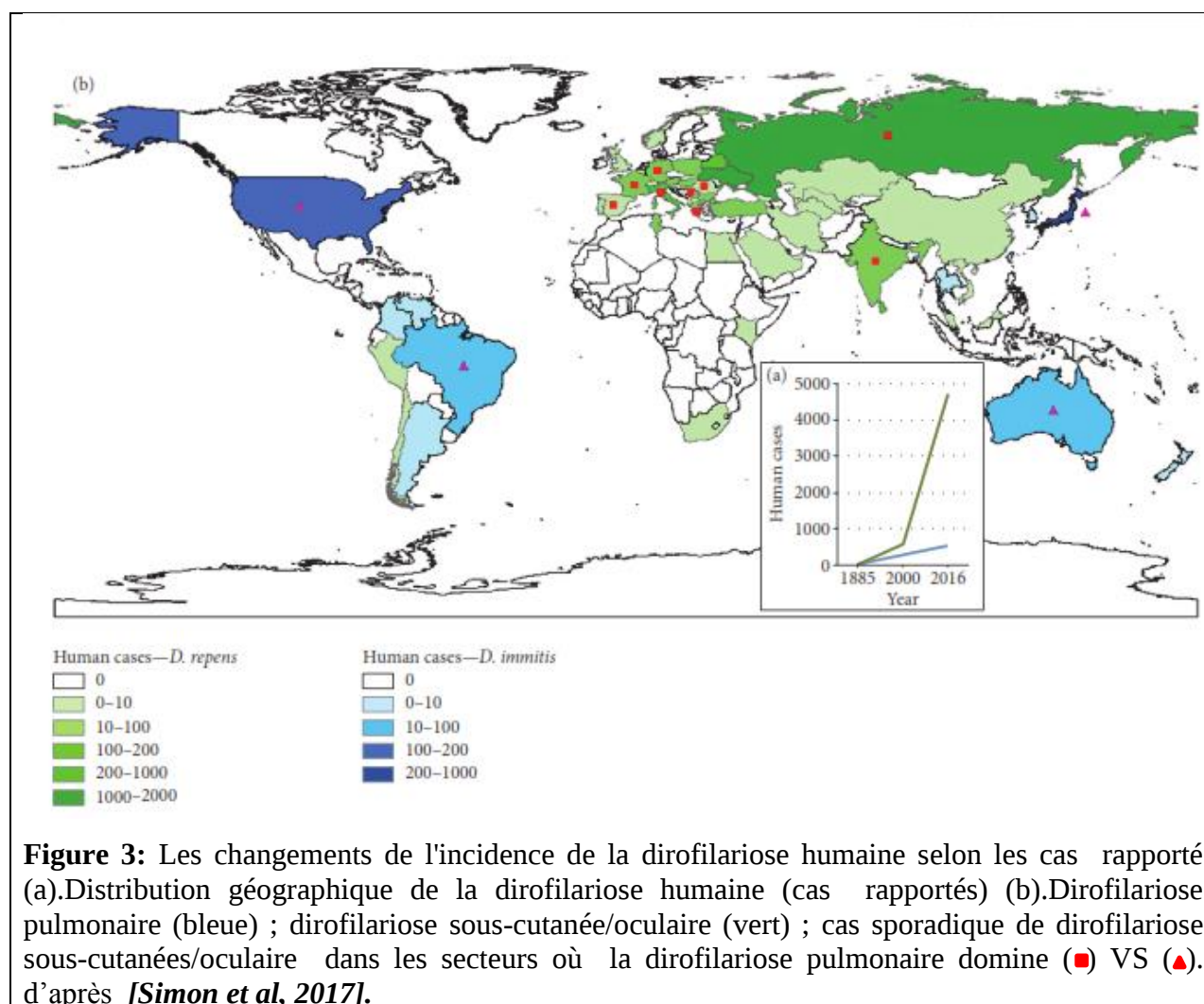
Otto en 1974 a cité des cas de la dirofilariose cardiopulmonaire féline aux USA, incluant Hawaii, et plusieurs autres cas au Brésil, Philippines, Tahiti, Nouvelle Guinée, Indonésie, Chine, et au Japon. Additionnellement à ce rapport d'autres cas ont été rapportés aux USA, et dans plusieurs régions du monde, y compris l'Italie [Venco et al, 1999]. L'Australie [Kendall et al, 1991]. Le Taiwan [Fei et Mo, 1997]. L'inde [Patnaik, 1989]. Le Japon [Roncalli et al, 1998]. Et le Brésil [Labarthe et al, 1998].

c. Dirofilarioses Humaines

Les infections humaines provoquées par *D. repens* sont largement répandues à travers le monde (Figure 3-B), avec approximativement 4490 cas de dirofilariose sous-cutanée/oculaire ont été rapportés en Russie 4250 en Europe, où les incidences les plus élevées ont été observées en Ukraine (1934 cas), en Russie (1440), en Italie (326), et en Biélorussie (131) avec seulement 35 cas pulmonaires attribués à *D. immitis* [Simon et al, 2009 ; Kravchenko et al, 2015; Salamatina et al, 2013]. En Asie (Figure 3-B), le Sri Lanka, avec 135 cas [Senanayake et al, 2013 ; Jayasinghe et al, 2015], et l'Inde, avec au moins 100 cas de sous-cutanée/oculaire et 3 cas de dirofilarioses pulmonaires [Kini et al, 2015], ces pays représentent les plus grands

niveaux d'incidence pour la dirofilariose humaine sous-cutanée/oculaire par rapport aux autres pays [K. K. W. To et al, 2012; Tavakolizadeh et Mobedi 2009; Kwok et al, 2016].

En revanche la dirofilariose pulmonaire à *D. immitis* domine au Japon, avec 280 cas enregistrés [Simon et al, 2009; Akao, 2011; Haro et al, 2016]. En Amérique 175 cas d'infection pulmonaire chez l'homme ont été rapportés, dont 119 cas aux USA [Simon et al, 2012; Biswas, et al, 2013; Malik et al, 2016]. En Brésil avec près de 50 cas [Simon et al, 2012; Bublitz et al, 2016]. Cependant, des rapports sporadiques le Costa Rica, la Colombie, le Venezuela, et Argentine [F. Simon et al, 2012] (Figure 3-B). Par contre les cas des infections sous-cutanées/oculaires qui ont été rapportés au Chili, au Pérou, et au Brésil, sont sporadiques [Simon et al, 2012; Bublitz, et al, 2016; Beltran et al, 2008]. En Tunisie, Seize cas humains ont été enregistrés, dont 15 sont provoqués par des *D. repens* et 1 cas provoqué par *D.immitis* [Saied et al, 2011], d'autres cas sporadiques rapportés aussi en Afrique du Sud et en Egypte [Awadalla, et al., 1998; Moodley et al, 2015]. En Australie, 20 cas d'infection pulmonaire à *D.immitis* ont été rapportés [Jagus et al, 1984] (Figure 3-B).



4.2.Changement climatique et propagation de la dirofilariose

a. Modèles de prévision de la dirofilariose

Le changement climatique causé par l'activité industrielle est accompagné par de considérables augmentations de la température et de la précipitation [Mc Michael et al, 2006]. Ce qui influencé le statut épidémiologique des maladies vectorielles, du fait qu'elles sont considérées parmi les systèmes naturels les plus sensibles aux changements climatiques, comme celui des dirofilarioses qui s'affecte de différentes manières, notamment les augmentations portant sur la densité du vecteur, et la durée de leur période d'activité annuelle, ainsi que l'introduction des espèces envahissantes des vecteurs compétents dans des secteurs endémiques, et le raccourcissement de la période d'incubation extrinsèque du parasite. Ce qui provoqué des augmentations graduelles de leur incidences ces dernières décennies [Bowman et al, 2016 ; Genchi et al, 2011].

Les recherches actuelles ont décrit des liens significatifs entre la prévalence des dirofilarioses et les facteurs climatiques (température et la précipitation), ainsi qu'avec d'autres facteurs [Wang et al, 2014]. Les espèces exotiques de moustique, comme *Aedes albopictus* (le moustique tigre), introduites en Europe et en Amérique au cours des activités commerciales, se sont rapidement adaptées dans beaucoup de secteurs où la dirofilariose est endémique. Une situation semblable s'est produite avec *Aedes koreicus* en Italie et en Suisse, [Capelli et al, 2011 ; Suter et al, 2015]. Tous les deux sont des vecteurs compétents des espèces de *Dirofilaria* avec une activité journalière, complétant de ce fait l'activité nocturne des espèces indigènes [Cancrini et Gabrielli, 2007].

L'objectif crucial de l'étude des liens entre le climat et la santé est de créer les outils qui permettent la prévision du changement afin de prévenir les conséquences. Grace à l'intégration des données obtenues à partir de nombreuses sources, telles que le système d'information géographique (GIS), le positionnement global (GPS), le système de télédétection par satellite (RS), et les disques épidémiologiques et climatiques, ainsi que l'amélioration des logiciels d'analyse, la réalisation de cet objectif est désormais possible [Rinaldi, et al., 2005]. Les modèles prédictifs concernant les dirofilarioses, sont basés sur le concept du **Degré du Développement Quotidien (DDQ)** (de l'anglais : *Growing Degree Days*), issus de l'accumulation des températures requises pour l'incubation extrinsèque des larves de *Dirofilaria* en tenant compte la durée de vie du vecteur.

Cette notion du degré de développement quotidien fut représentée pour la première fois chez *D.immitis* par le nombre de degrés quotidiens dépassant le seuil de 14°C (57° F). c.-à-d. si la température se maintient à 15°C pendant 24 heures on note un degré ou unité, qu'on appelle unité de développement de dirofilariose (UDD), et si la température est de 26°C pendant 24 heures, il y'aura 12°C au-dessus du seuil, et la larve gagne 12 UDD, le bilan cumulatif de ce gain est d'environ 130 UDD pour que la larve devienne infectante "Stade L3", ceci correspond à une génération de dirofilariose (GD) [Lok 1998., Knight & Lok, 1998]. La période du développement sera donc en fonction de la température. Le développement à 30°C des microfilaires de *D. immitis* vers le stade infectant L3 chez *Aedes vexans*, *Ae. triseriatus*, et *Anopheles quadrimaculatus* nécessitant 8 à 9 jours, cette durée augmente à 10-14 jours pour une température de 26°C, et 17 jours à 22°C, et 29 jours à 18°C. Le temps du développement extrinsèque de *D. repens* est partiellement similaire à celui de *D. immitis* pour les différentes températures, le stade infectant est atteint entre 8-13 jours pour une température de 28°-30°C, et 10-11 jours à 26°C, 16-20 jours à 22°C chez *Aedes aegypti*, *Ae. caspius*, *Ae. detritus*, *Ae. vexans*, *An. claviger*, *An. maculipennis*, *Culex pipiens* [Webber et Hawking, 1995 ; Bain, 1978 ; Cancrini et al, 1988]. Chez *Ae. alobopictus* le développement des microfilaires vers le stade infectant L3 prend 14-18 jours à 26°C pour *D. immitis* et 16-18 jours pour *D. repens* [Cancrini et al, 1995]. A ce jour, on considère que *D. immitis* et *D. repens* partagent le meme modèle de prédiction basé sur l'effet de la température [Sassnau et al, 2014].

Les écarts de la température observés au cours de l'année, notamment dans les zones où la température ne se maintient pas aux alentours de 26°C pour la plus grande partie de l'année, provoquent des interruptions du développement larvaires chez le moustique. Le suivi de ce développement en fonction de la température à permis la détermination de la saison de transmission théorique de la dirofilariose au Canada et aux Etats-Unis. [Lok 1998 ; Lichtenfels et al, 1985]. et en Europe (figure 4) [Genchi et al, 2009 & 2011 ; Sassnau et al, 2014].



Figure 4: La durée approximative de la période de transmission de *Dirofilaria* spp. par an en Europe. D'après [Simon F et al, 2012].

Les modèles prédictifs ont permis également la détermination de l'activité théorique dans les zones déclarées déjà (figure 4) [Genchi et al, 2011 ; Genchi et al, 2005 ; Genchi et al, 2009], certains modèles ont indiqués aussi le risque associé à l'introduction d'*Ae. albopictus*, en déterminant sa période d'activité hypothétique dans des secteurs non endémiques [Medlock et al, 2006 ; Medlock et al, 2007]. D'autres modèles incorporent des facteurs géo-environnementaux locaux comme la présence de l'irrigation dans les secteurs à climat secs [Simon et al, 2014], d'autres s'appuient sur des régressions hiérarchiques reliant de multiples facteurs, géo-climatiques, socio-économiques, et des facteurs biologiques, pour la prédiction de l'activité de la dirofilariose [Bowman et al, 2016].

En dépit de la nature prédictive qui n'est pas une science exacte, il a été accepté que l'information produite pourrait fournir des conseils très valables dans l'application des programmes ciblant à contrôler la dirofilariose à *D. immitis* [Mc Michael et al, 2006], et/ou à *D. repens* [Sassnau et al, 2014].

b. Emergence/réémergence du vecteur (Cas d'*Aedes albopictus*)

Aedes albopictus est originaire des forêts de l'Asie du Sud-Est. Il s'est implanté dans de nombreuses parties du monde comme le montre la figure ci-dessous.

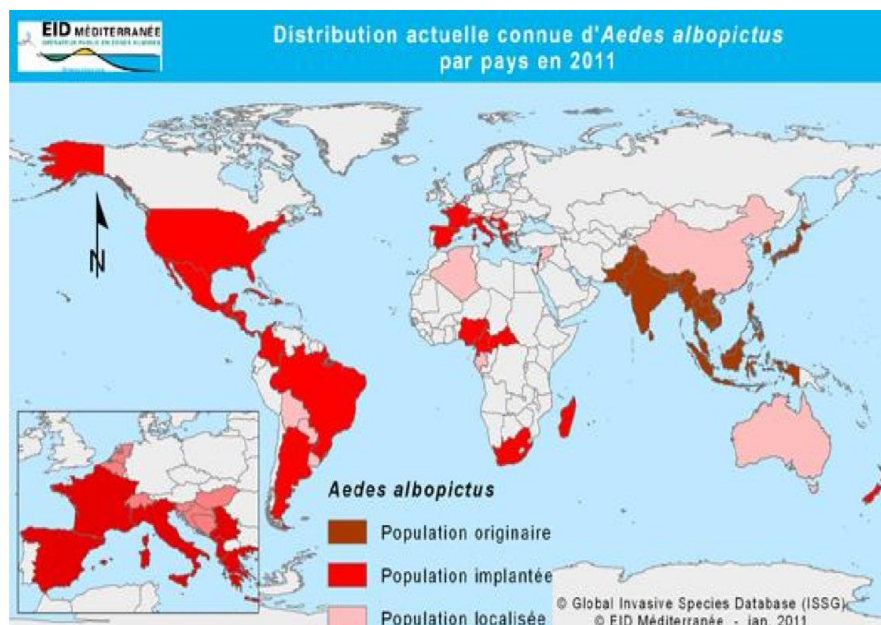


Figure 5: Répartition mondiale d'*Ae. albopictus* en 2011.

Cette expansion s'est faite en deux temps par le transport de ce moustique vers de nouveaux territoires. Dans un premier temps, à partir du 19^{ème} et jusqu'au milieu du 20^{ème} siècle cette espèce a envahi les îles de l'Océan Pacifique et Indien, donc de part et d'autre de l'Asie du Sud-est. A partir de 1962, on retrouve cette espèce à La Réunion, Madagascar, Maurice, Hawaï, et au Japon [Knudsen, 1995a; Knudsen, 1995b; Knudsen et al, 1996]. La deuxième vague de colonisation s'est faite au cours de ces trois dernières décennies et continue jusqu'à nos jours. L'importance du commerce des plantes exotiques et le transport routier, est à l'origine de l'introduction d'*Ae. albopictus* dans de nouveaux pays. Sur le continent Européen, la présence d'*Ae. albopictus* a été signalée pour la première fois en Albanie en 1979 [Adhami et al, 1998].

5. Etude des dirofilarioses à *D. immitis* & *D. repens*

5.1. Etude des parasites

A. *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856), Railliet et Henry, 1911

❖ Etymologie

Le nom *Dirofilaria* [di-ro-fī-lar'e-ə] du Latin :

- Dīrus : Craintif ou Sinistre
- Fīlum : Fil

Ce **Fil sinistre**, est appelé vernaculairement **Nématode du Cœur du chien** [INPN, 2017].

❖ **Synonymie**

Filaria sanguinis Cobbold, 1869; *Dirofilaria louisianensis* Faust, Thomas, et Jones, 1941.

❖ **Historique**

Dirofilaria immitis est l'un des nématodes de la superfamille des Filarioidea. décrite pour la première fois en 1626 par Francesco Birago (figure 6), Nobleman Italien provenant de (Po River Valley en Italie) chez son chien de chasse, “ le chien présenta deux vers, avec la moitié de la longueur d'un bras, rouge comme un feu” Birago l'a faussement identifié comme étant un stade larvaire d'un autre parasite *Dioctophyme renale* [Birago 1626 ; AHS 2014]. L'agent de la dirofilariose cardiopulmonaire canine se fut nommé *Filaria* pour la première fois en 1856, par le parasitologue Américain Joseph Leidy (figure 7), et le nom *Dirofilaria* rapporté au genre par les deux parasitologues français Railliet & Henry (figure 8,9) en 1911.



Figure 6: Francesco Birago "1626"

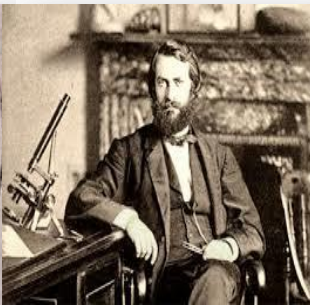


Figure 7: Joseph Leidy "1847"



Figure 8: Alcide Railliet "1911"



Figure 9: Henri Vallée "1911"

B. *Dirofilaria repens* ; Railliet and Henry, 1911

❖ **Etymologie**

Diro = crainte + *filaria* = fil, avec *repens* = rampant.

❖ **Synonymie**

Filaria acutiuscula, (Molin, 1858) ; *Filaria conjunctivae* (Addario, 1885), Espèce CD_NOM = 406740 [INPN, 2017] ; *Dirofilaria conjunctivae* (Addario, 1885) [Desportes, 1940].

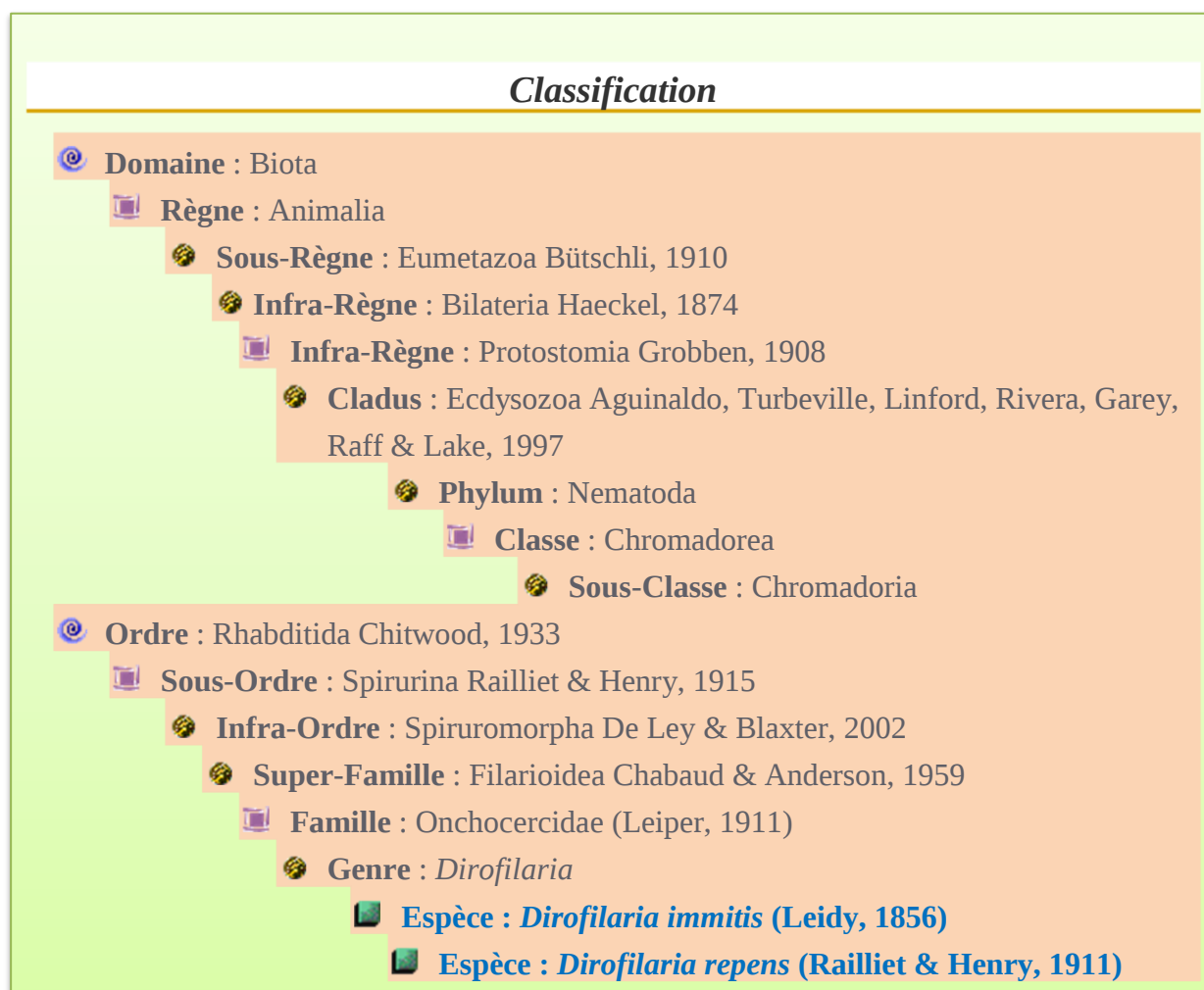
❖ Historique

La première description du parasite a été faite chez le chien par Railliet et Henry (1911a, b). Peu après, le parasite reçoit sa première identification par Desportes (1940) en tant que *Filaria conjunctivae*, Skrjabin (1917) a décrit un cas humain sous le nom des *Loa extraocularis*, et Skrjabin et collaborateurs (1930) ont rapporté le deuxième cas humain de *Dirofilaria repens*. En 1948, Skrjabin et schikhobalova ont identifié les *Loa extraocularis* comme synonyme des *Dirofilaria repens*. Cancrini et collaborateurs (1990) ont déclaré que l'appellation principale soit *Dirofilaria conjunctivae* (Addario, 1885); mais cette appellation n'a pas été actuellement retenue [Day Michael, 2016].

C. Classification

Les espèces du genre *Dirofilaria* sont classées dans le phylum Nematoda, Sur la base des critères biologiques et morphologiques, soutenues par la phylogénie [Smythe et al, 2006].

Tableau 2: Classification, selon l’Inventaire National du Patrimoine Naturel (https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/238736/tab/taxo) consulté (Sept. 2017).



D. Hôtes définitifs

La dirofilariose à *D.immitis* est une parasitose connue depuis l'antiquité, décrite pour la première fois en Europe, chez le chien, comme étant une atteinte causée par un stade larvaire de *Diectophyme renale* [Birago, 1626]. Aux USA, le premier cas de cette parasitose a été également rapporté chez le chien à Erie en 1847, puis elle a été identifiée chez l'homme en nombre important dans le cœur et les vaisseaux de gros calibre, [Leidy JA, 1856], et en dernier lieu chez le chat au début du 20^{ème} siècle [Riley, 1922 ; Travassos, 1921].

a. Hôtes définitifs (réservoir du genre *Canis*)

Le chien domestique *Canis lupus familiaris* représente l'hôte typique de *Dirofilaria immitis*, mais en suivant son histoire, le parasite (*Dirofilaria immitis*) est originaire d'Asie, et il a eu une ancienne pérennité dans les pays méditerranéens. Se fut apportée à l'Amérique par les premiers explorateurs et immigrants au moment de l'arrivée des européens en Amérique. A cette époque il y'a peu de propriétaires de chien domestique (*Canis lupus familiaris*) dans la population Américaine native, mais d'autres hôtes réceptifs de population canine indigène, loups, coyotes et renards, ces animaux ont contracté et maintenu le parasite en Amérique, et plusieurs autres canidés, loup gris, coyote, renard rouge, renard gris, loup à crinière, renard des savanes., à travers le monde, de même pour le chacal (*canis aureus*), chien viverrin « chien martre » (*Nyctereutes procyonoides*), cuon d'Asie (chien sauvage d'Asie) (*Cuon alpinus*), et le Lycaon d'Afrique (*Lycaon pictus*) [Trotti et al, 1911 ; McCall, 2007]. Outre d'Europe (*Lutra lutra*) [Kiku, & Byeong, 2003]. Globalement, toutes les espèces des canidés susmentionnés, peuvent développer l'infection microfilariémique à *D.immitis*, faaisant d'elles les principaux réservoir du parasite [McCall JW, 2007]. ainsi que le Lycaon d'Afrique (*Lycaon pictus*), le chien viverrin (chien martre) (*Nyctereutes procyonoides*) et la Loutre d'Europe (*Lutra lutra*), espèces décrites pour être hôte définitif de *Dirofilaria immitis* [McCall, 2007]. à l'exception du renard du genre *Vulpes* et *Urocyon* qui ne supportent pas l'infection microfilariémique, et sont peu important sur le plan épidémiologique [McCall, 2007 ; Lok, 1988]. Les autres genres des canidés ne sont pas suffisamment étudiés pour déterminer leur éventuel rôle de réservoir de *D immitis* [McCall, 2007].

b. Hôtes définitifs du genre *Félis*

L'infection est décrite aussi chez les Félin, Otto en 1974 a rapporté l'infection des chats par *D.immitis*, ce rapport revient à 1921 aux USA où 12 chats étaient atteints. Récemment

une liste contenant les différentes espèces félines chez lesquelles *D.immitis* a été isolée, qui inclue l'ocelote (*Leopardus pardali*), le puma (*Felis concolor*), la panthère nébuleuse (*Neofelis nebulosa*), le léopard de neige (*Uncia uncia*), le tigre de Bengale (*Panthera tigris*), et le lion (*Panthera leo*) [McCall, 2007], tout comme les renards, les félinés ne supportent pas l'infection microfilariémique, ce qui les exclut de la liste des réservoirs biologiques de *D.immitis* [McCall, 2007].

c. Hôtes accidentels

D'autres hôtes occasionnels peuvent contracter *D.immitis*, sans qu'ils développent la maladie clinique, tels que les primates, les cerfs communs, les castors, les rats musqués, les chevaux, les pandas rouges, les racoos, les ours, les lions, et les furets [Abraham, 1988 ; Trotti, 1997 ; McCall, 2007].

E. Hôte intermédiaire

Les parasites du genre *Dirofilaria* sont transmis le plus souvent par le moustiques, qui ingèrent leur microfilarie au moment du repas sanguin. *D.immitis* est capable de se développer chez plusieurs familles de moustiques. Plus de 60 espèces de moustique autour du monde sont avérées susceptibles d'inoculer le parasite, dont 13 de ces espèces sont classées comme étant des vecteurs compétant aux USA [Lok, 1988]. Scoles (1998) a désigné l'ensemble des moustiques pouvant être des porteurs de *D.immitis* dans la nature, (tableau 3).

Tableau 3: Listes des moustiques potentiellement vecteur de *Dirofilaria*

ESPECES	Zone géographique permettant le développement larvaire chez le vecteur	ESPECES	Zone géographique permettant le développement larvaire chez le vecteur
<i>Aedes aegypti</i>	Brésil, Nigéria, USA, Japon	<i>Anopheles earlei</i>	USA
<i>Aedes albopictus</i>	Taiwan, Brésil, Italie, Japon, USA***	<i>Anopheles francisoi</i>	Philippines
<i>Aedes atropalpus</i>	USA	<i>Anopheles freeborni</i>	USA***
<i>Aedes canadensis</i>	USA***	<i>Anopheles maculopennis</i>	Europe
<i>Aedes cantator</i>	USA***	<i>Anopheles minimus lavirostris</i>	Philippines
<i>Aedes caspius</i>	Italie, Espagne**	<i>Anopheles plumbeus</i>	Europe
<i>Aedes cinereus</i>	USA	<i>Anopheles punctipennis</i>	USA***

<u><i>Aedes excrucians</i></u>	USA***	<u><i>Anopheles quadrimaculatus</i></u>	USA***
<u><i>Aedes infirmatus</i></u>	USA***	<u><i>Anopheles sinensis</i></u>	Chine
<u><i>Aedes fijensis</i></u>	Fiji	<u><i>Anopheles tesellatus</i></u>	Philippines
<u><i>Aedes fitchii</i></u>	USA	<u><i>Anopheles walkeri</i></u>	USA
<u><i>Aedes geniculatus</i></u>	Europe	<u><i>Armigeres subalbatus</i></u>	Taiwan
<u><i>Aedes quamensis</i></u>	Guam	<u><i>Coquillettidia perturbans</i></u>	USA
<u><i>Aedes infirmatus</i></u>	USA	<u><i>Culex anulorostris</i></u>	Guam, Fiji, Océanie
<u><i>Aedes koreicus</i></u>	Chine	<u><i>Culex bitaeniorhynchus</i></u>	Philippines
<u><i>Aedes notoscriptus</i></u>	Australie	<u><i>Culex declarator</i></u>	Brésil*
<u><i>Aedes pandani</i></u>	Guam	<u><i>Culex erraticus</i></u>	USA
<u><i>Aedes pempaensis</i></u>	Afrique	<u><i>Culex gelidus</i></u>	Philippines
		<u><i>Culex nigripalpus</i></u>	USA***
<u><i>Aedes poecilus</i></u>	Philippines	<u><i>Culex pipiens</i></u>	USA***, Switzer land , Italie
<u><i>Aedes polynesiensis</i></u>	Polynésie française, Fiji, Samoa	<u><i>Culex pipiens quinquefasciatus</i></u>	Australie, Philippines, USA***, Fiji, Japon, Taiwan, Brésil, Guam, Océanie, Afrique, Singapore
<u><i>Aedes pseudoscutellaris</i></u>	Fiji	<u><i>Culex pipiens molestus</i></u>	Angleterre
<u><i>Aedes punctor</i></u>	Europe	<u><i>Culex pipiens pallens</i></u>	Japon, Chine
<u><i>Aedes samoanus</i></u>	Samoa	<u><i>Culex restuans</i></u>	USA
<u><i>Aedes scapularis</i></u>	Brésil	<u><i>Culex saltanensis</i></u>	Brésil*
<u><i>Aedes sierrensis</i></u>	USA	<u><i>Culex salinarius</i></u>	USA***
<u><i>Aedes sirrensis</i></u>	USA***	<u><i>Culex sitiens</i></u>	Guam
<u><i>Aedes sollicitans</i></u>	USA***	<u><i>Culex tarsalis</i></u>	USA
<u><i>Aedes sticticus</i></u>	USA***	<u><i>Culex territans</i></u>	USA
<u><i>Aedes stimulans</i></u>	USA***	<u><i>Culex tritaeniorhynchus</i></u>	Japon, Chine, Malaysia
<u><i>Aedes taeniorhynchus</i></u>	USA***, Brésil, Guyana	<u><i>Culex tritaeniorhynchus summorosus</i></u>	Philippines
		<u><i>Mansonia annulata</i></u>	Malaysia
<u><i>Aedes togoi</i></u>	Japon, Taiwan	<u><i>Mansonia bonnea</i></u>	Malaysia
<u><i>Aedes togoi</i></u>	Japon, Thaïlande	<u><i>Mansonia dives</i></u>	Malaysia
<u><i>Aedes triseriatus</i></u>	USA***	<u><i>Mansonia Indiana</i></u>	Malaysia
<u><i>Aedes trivittatus</i></u>	USA***	<u><i>Mansonia titillans</i></u>	Argentine
<u><i>Aedes vexans</i></u>	USA***, Switzer land	<u><i>Mansonia uniformis</i></u>	Singapore, Philippines
<u><i>Aedes vigilax</i></u>	Australie	<u><i>Psorophora columbae</i></u>	USA***
<u><i>Aedes zoosophus</i></u>	USA	<u><i>Psorophora ferox</i></u>	USA***
<u><i>Anopheles bradleyi</i></u>	USA***	<u><i>Wyeomyia bourrouli</i></u>	Brésil*
<u><i>Anopheles crucians</i></u>	USA***		

Modifié et authentifié à partir de [Day. M-J, 2016].

* : Larve isolée en stade non infectant

** : Vecteur suspecté, mais larve non isolée chez le moustique

*** : Larve isolée en stade infectant, vecteur actif aux USA

F. La bactérie symbiotique (Wolbachia) dans l'étude et la biologie de Dirofilaria

Les premiers corps intracellulaires des pseudo-bactéries décrites chez les filaires ont été initialement trouvés chez D.immitis [Harada P et al, 1970]. Les études récentes ont confirmé la nature bactérienne de ces corps [McLaren DJ, 1975], et de leur présence chez les autres filaires, tels que Onchocerca volvulus [Kozec, Marroquin, 1977]. Les études utilisant les techniques électromicroscopiques et moléculaires ont pu classer ces bactéries dans l'ordre Rickettsiales (alpha-2-proteobacteria) et au genre Wolbachia [Sironi et al, 1995]. Ces bactéries ont été également rencontrées dans d'autres organismes, y compris des hexapodes, crustacés, et des chélicérates. Les bactéries du genre Wolbachia sont intracellulaires [Casiraghi, et al., 2001 ; Fenn et Blaxter, 2004], qui ont développé un lien symbiotique avec ces hôtes dont D.immitis et D.repens en sont des membres [Fenn et Blaxter, 2006]. L'étude de ces bactéries via l'antibiothérapie de ses hôtes et le séquençage du génome de Wolbachia ont éclairci la nature des interactions entre ces bactéries et les filaires ainsi que les molécules qui en sont impliquées [Foster et al, 2005 ; Wu M et al, 2004]. Ces études ont suggéré que les bactéries du genre Wolbachia sont impliquées dans les mues et l'embryogenèse des filaires [Bandi et al, 2001], tandis que ces derniers assurent les acides aminés pour la croissance bactérienne [Foster J et al, 2005]. Les bactéries du genre Wolbachia sont transmises verticalement (maternellement), existent chez tous les individus à tous les stades développementaux, mais elles sont particulièrement abondantes chez les larves qui se développent dans les hôtes vertébrés (L3 et L4), et au niveau des cordes hypodermiques des adultes des deux genres, et les organes génitaux des femelles. Ces résultats montrent que le existant est de nature symbiotique, et est essentiel pour le développement larvaire dans les hôtes vertébrés et pour la survie à long terme des vers adultes [Mc Garry et al, 2004]. Wolbachia a été récemment trouvé chez des nouvelles espèces des filaires de la famille Onchocercidae dans divers organes, tels que les gonades somatiques (couche épithéliale) et la paroi intestinale, suggérant que le lien Wolbachia-filaria soit plus complexe et vaste que prévu [Ferri et al, 2011].

G. Cycles de vie et mécanismes biologiques

Le cycle de vie des espèces du genre Dirofilaria fait appel à un hôte vertébré définitif et un vecteur (figure 10). D.immitis et D.repens montrent une faible spécificité de l'hôte vertébré (définitif), pouvant infecter plusieurs espèces de mammifères [Barriga, 1982]. Parmi les hôtes vertébrés, le genre Canis reste l'hôte préférentiel pour lequel les deux espèces sont mieux adaptées, et le prennent comme réservoir typique. Les humains et les chats sont des hôtes moins appropriés [McCall et al, 2008], chez lesquels le développement parasitaire est largement

affecté, en le comparant avec le model canin. La diversité de l'hôte, concerne également les espèces du vecteur, qui sont généralement des femelles de la famille des *Culicidae* [Cancrini et Kramer, 2001].

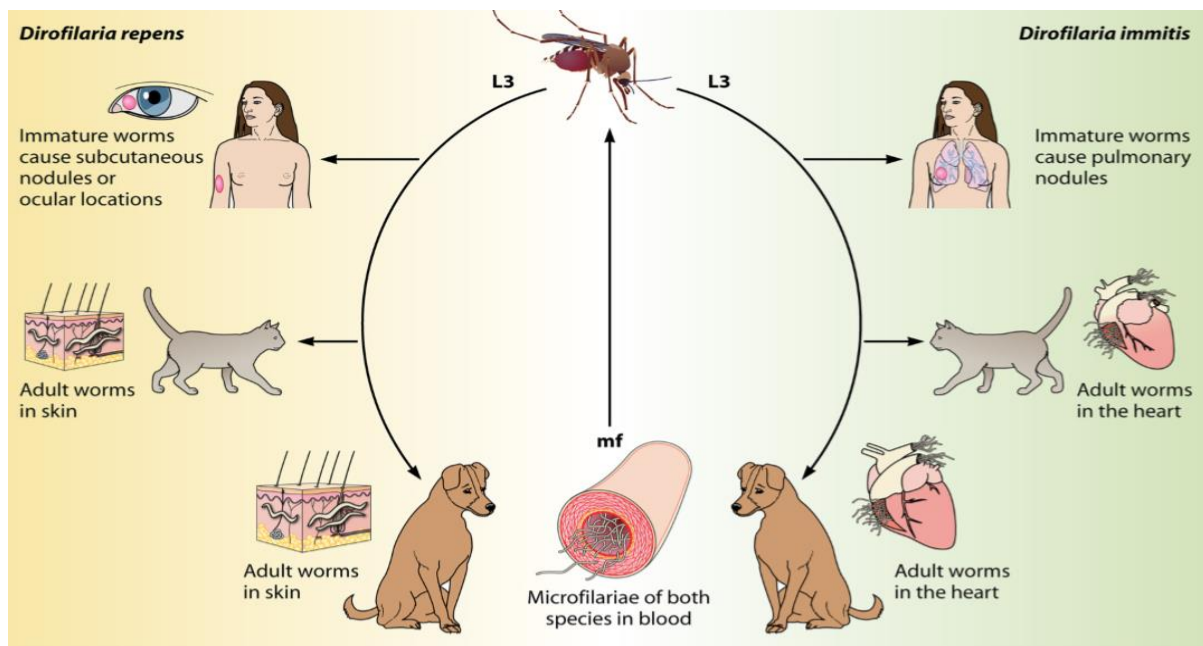


Figure 10: Cycle de vie biologique de *D. immitis* et *D. repens*. mf: *Microfilaria* d'après [Simon et al, 2012].

a. Développement chez l'hôte vertébré

Au cours du repas sanguin, les moustiques déposent une hémolymphe sur la blessure, contenant des larves au stade infectant (L3). Ces dernières pénètrent activement la peau de l'hôte au niveau du point de pique [Simon et al, 2012]. La mue de L3 à L4 se produit peu après l'infection, entre 3 et 12 jours post-infection (j.p.i.) pour *D.immitis*, et la mue suivante, qui produit des vers préadultes aura lieu entre 50 et 70 j.p.i. Les premiers vers préadultes gagnent les artères pulmonaires et le ventricule droit des chiens au bout de 70 à 85 j.p.i. et atteignent la maturité sexuelle à 120 j.p.i. Les vers adultes de *D.immitis* ont un aspect filiforme, avec des femelles mesurant 250 à 300 millimètres de longueur et 1 à 1.3 millimètres de diamètre et des mâles mesurant entre 120 à 200 millimètres de longueur et 0.7 à 0.9 millimètres de diamètre [Manfredi et al, 2007]. Les femelles commencent à produire la première étape larvaire (microfilariae) entre 6 et 9 mois postinfection (m.p.i.) [McCall et al, 2008]. Les Microfilaries qui vivent dans le système circulatoire ont 290 à 330 μm de longueur et 5 à 7 μm de diamètre, avec une queue droite et une extrémité céphalique fusiforme. Les adultes peuvent survivre jusqu'à 7 ans, et les microfilaries plus de 2 ans [Simon et al, 2012]. Certains des chiens infectés n'hébergent pas des microfilaries dans le sang, ayant pour résultat des infections occultes ou

amicrofilaremiques, dont les causes sont multiples, tout particulièrement le vieillissement des vers femelles, infections unisexuelle, et/ou secondaires à la réaction immunitaire de l'hôte [Simón et Genchi, 2000]. Il y a également des variations quotidiennes et saisonnières du taux de la microfilarémie chez le chien [Abraham, 1988]. Des études ont mis en évidence des fluctuations quotidiennes de la microfilarémie chez le chien dans différents endroits géographiques, et le caractère sub-périodique de la concentration sanguine des microfilaires de *Dirofilaria immitis*, dont le nombre maximal des microfilaires circulants dans le sang périphérique est atteint l'après-midi, puis diminue progressivement pour que le niveau le plus bas est enregistré le matin. Le sang périphérique contient 5% à 20% de toutes les microfilaires. En outre, les chiens infectés présentent une microfilarémie relativement élevée le printemps et l'été, contrairement à l'hiver. Les fluctuations quotidiennes et saisonnières sont en corrélation avec la présence temporaire du vecteur dans les différentes régions géographiques, ce qui sélectionne de ce fait une périodicité de transmission des microfilaires [Apiwathnasorn et al, 2006].

Chez le chat, la maturation de la forme adulte de *D. immitis* s'étend jusqu'à 8 m.p.i. ; dotée d'une forme plus courte par rapport à celle observée chez le chien et d'une courte longévité aussi (approximativement 2 ans), le plus souvent ne produisent pas de microfilaires, et dans les cas échéants, la microfilarémie est observée à de très faibles concentrations, et est de nature passagère [Manfredi et al, 2007 ; McCall et al, 2008].

Les vers adultes de *D. repens* résident généralement dans les tissus sous-cutanés de l'hôte définitifs, bien qu'ils puissent également être rencontrés dans la cavité abdominale et dans les fascias musculaires connectives, où ils gagnent leur maturité sexuelle au bout de 6 à 9 m.p.i. [Manfredi MT et al, 2007]. Les vers de *D. repens* sont plus petits que ceux de *D. immitis* : les femelles ont 100 à 170 millimètres de longueur et de 4.6 à 6.3 millimètres de diamètre, et les mâles ont 50 à 70 millimètres de longueur et de 3.7 à 4.5 millimètres de diamètre [Manfredi et al, 2007]. Comme ceux de *D. immitis*, les microfilaires de *D. repens* résident dans la circulation sanguine, mesurant entre 350 à 385 μm de longueur et de 7 à 8 μm de diamètre, avec une queue incurvée et une extrémité céphalique arrondie [Simón et al, 2012]. La découverte liée à la possibilité de maintenir la microfilarémie dans le sang des chats, suggère que les hôtes félins puissent servir de réservoirs à cette espèce [Tarello W, 2002]. Les humains ne sont pas les hôtes appropriés des espèces de *Dirofilaria* ni leur réservoirs, mais ils subissent tout de même des atteintes cliniques par ces parasites, où les vers immatures de *D. immitis* peuvent atteindre une branche de l'artère pulmonaire humaine, déclenchant une réponse inflammatoire qui détruit les

vers, mais le processus pathologique conduit à la formation des nodules pulmonaires dans certains cas [Simón et al, 2005]. Les vers de *D.repens* causent les nodules sous-cutanées et peuvent atteindre la région oculaire au cours des infections humaines [Paes-de-Almeida et al, 2003]. Néanmoins, il existe d'autres localisations erratiques au cours des dirofilarioses à *D. immitis* et à *D. repens* chez l'homme [Pampiglione et Rivasi, 2000 ; Theis, 2005].

b. Développement chez le de moustique vecteur

Les microfilaires de *D. immitis* et *D. repens* sont ingérées par les moustiques femelles au cours du repas sanguin sur des hôtes infectés microfilarémiques. Au bout de 24 heures les microfilaires ingérées gagnent les tubules Malpigiens du tractus digestif, où elles muent vers L2 au bout de 8 à 10 j.p.i. et L2 à L3 au bout de 3 jours [McCall et al, 2008].

La température environnementale constitue la clé voute qui détermine la longueur de la période d'incubation extrinsèque chez le moustique. La forme infectante L3 migre vers le compartiment buccal, où elles résident jusqu'au prochain repas sanguin. Les larves L3 ont approximativement 1 millimètre de longueur et grandissent jusqu'à 1.5 millimètre dans les tissus sous-cutanés des hôtes définitifs lors de l'inoculation [Manfredi, et al, 2007]. L'invasion des tubules Malpighiens et de la migration vers le compartiment buccal du parasite sont critique pour la survie du moustique. Les vecteurs limitent le nombre de larves qui peuvent atteindre le stade L3 par l'intermédiaire de la reconnaissance antigénique et les mécanismes de défenses humorales cellulaires [Castillo et al, 2011]. Des polypeptides antimicrobiens, défensine, ont été identifiés dans l'hémolymph du moustique contaminé par la forme L3 de *D. immitis*. En outre, les vecteurs de *D.immitis* ont la capacité de mélanisation et d'encapsulation des larves L3. la Mélanine est un pigment produit dans les hemocytes via l'intermédiaire de la conversion de la tyrosine en dopamine au cours de l'hydroxylation par le phenol-oxidase [Huang et al, 2005]. La tyrosine, est le facteur limiteur du processus entier, qui peut avoir une origine exogène ou dérive de la phénylalanine (pah), qui est une enzyme nécessaire pour l'accomplissement de la réaction de mélanisation chez les vecteurs [Infanger et al, 2004]. La mélanisation conduit à la formation des structures pseudo-membranaires [Castillo et al, 2011]. L'efficacité de la mélanisation varie entre les espèces et entre les membres de la meme famille suite aux différences dans l'activité de la phenol-oxidase, qui est plus robuste pendant les 14 jours initiale de la vie du moustique [Christensen et al, 1989 ; Li JY et Christensen, 1990]. D'autres mécanismes et structures contribuent à la destruction des larves, telles que l'armature buccopharyngienne (armature cibariale), qui peut endommager les *microfilaires* pendant le repas du sang ; la sécrétion des molécules qui lisent l'epicuticle des vers ; et la coagulation du sang, qui emprisonne les

microfilaires dans le tractus digestive des moustiques, empêchant de ce fait leur passage aux tubules de Malpighi [*Cancrini et Gabrielli, 2007*].

La susceptibilité et la résistance des moustiques à l'infection sont génétiquement déterminées et commandées par un lien génétique d'un allèle récessif, avec les gènes séparés codant pour la susceptibilité et la résistance aux *D. repens* et *D. immitis* [*Cancrini et Gabrielli, 2007*]. Des différences génétiques qui influencent la transmission peuvent également exister au sein d'une seule espèce de moustique, comme le montre l'étude réalisée dans l'ouest de l'Espagne où *D. immitis* est endémique, et qui a montré l'unique existence de ses larves chez l'Haplotype H1 de *Culex pipiens* à la différence des Haplotype H2 & H3 qui n'ont pas présenté des larves parasitaires [*Morchón et al, 2007a*].

5.2. Etude des dirofilarioses

5.2.1. Physiopathogénie des dirofilarioses chez le chien

A. Dirofilariose cardiopulmonaire canine

La dirofilariose cardiopulmonaire canine est une affection sérieuse et potentiellement mortelle, provoquée principalement par les vers adultes de *D. immitis* [*Simon et al, 2012 ; McCall et al, 2008 ; Venco et Vezzoni, 2001*]. Et leurs produits antigéniques, et ceux des bactéries symbiotiques *Wolbachia* [*Kramer et al, 2005*]. Elle se caractérise habituellement par une évolution chronique, qui commence par des atteintes vasculaires et pulmonaires et le cœur droit en second lieu (figure 11) [*Venco, 2007*]. Les premières lésions concernent les parois des artères pulmonaires donnant naissance au reste de la pathologie pulmonaire et cardiaque. Après l'arrivée des vers dans les artères pulmonaires, une hypertrophie de l'endothélium vasculaire, ayant pour résultat le rétrécissement des vaisseaux. De plus, le traumatisme vasculaire engendre une déformation cellulaire, et l'exacerbation de l'espace intercellulaire [*Venco et Vezzoni, 2001*], altérant l'élasticité des parois artérielles [*Kaiser et al, 1989*]. La surface artérielle endommagée facilite le passage de l'albumine, du plasma, et des cellules de sang dans l'espace périvasculaire, stimulant la prolifération des cellules musculaires lisses dans les médias vasculaires, qui induisent la formation de villosités intravasculaire (Artérite pulmonaire proliférative) (figure 12-A), La sévérité de la prolifération des villosités est directement liée à la durée de l'infection, de la charge parasitaire, et de l'intensité de la réaction immunitaire de l'hôte. La paroi artérielle devient rugueuse d'aspect velouté, avec une réduction concomitante de la lumière et de la conformité des artères pulmonaires [*Simon et al, 2012 ; Venco et Vezzoni, 2001*]. La pathologie pulmonaire se développe en faveur de ces changements vasculaires, les

fluides et les protéines qui traversent la paroi vasculaire endommagée causent l'œdème et l'inflammation du parenchyme pulmonaire, les lésions vasculaires peuvent mener à la rupture des vaisseaux pulmonaire à cause de l'augmentation brusque de la charge cardiaque liée à l'effort, et par conséquent, des hémoptysies ou des hémorragies graves du poumon.

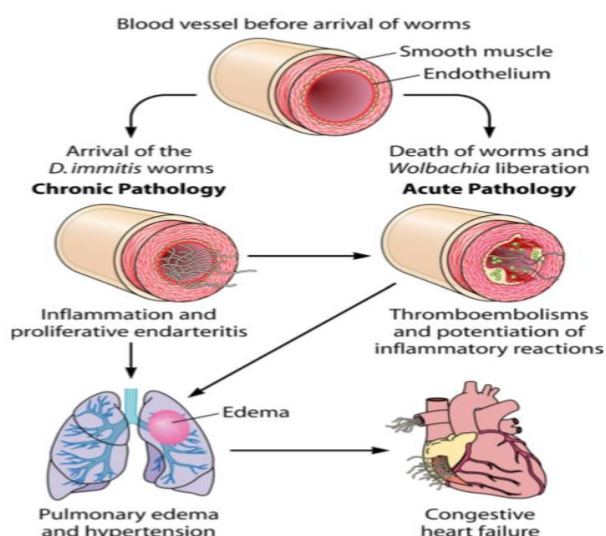


Figure 11: Processus et mécanismes de la dirofilariose cardiopulmonaire canine. d'après [Simon et al, 2012].

L'évolution chronique de la maladie, s'accompagne par la mort des vers, naturelle ou induite via des traitements filaricides, ce qui engendre des phases aiguës représentées principalement par le thromboembolisme (Figure 12-B) et des épisodes inflammatoires graves, mettant la vie de l'animal en danger [Bowman & Atkins, 2009].

Le changement de la paroi artérielle et la réduction de sa lumière dont les causes sont multiples, des occlusions par la villosité, le thrombus et/ou la présence des vers, à côté des médiateurs inflammatoires, conduit à l'hypertension pulmonaire. Ceci induit une surcharge compensatrice du cœur droit, qui exacerbe la lésion pulmonaire à son tour, et induit une insuffisance cardiaque congestive caractérisé par de l'hypertrophie et de la dilatation (Figure 13-A) amplifiées par le changement de la valve tricuspide. Au cours de la défaillance cardiaque congestive, il y'a une congestion veineuse généralisée secondaire à la pression veineuse accrue.

Dirofilaria immitis cause également un dysfonctionnement rénal grave, la glomérulonéphrite membraneuse a été décrite pour être la conséquence d'un changement dans la membrane basique glomérulaire au cours de la dirofilariose cardiopulmonaire canine [Abramowsky et al, 1981 ; Grauer et al, 1987 ; Klei et al, 1974 ; Ludders et al, 1988], cette glomérulonéphrite est secondaire à la formation des complexes immuns stimulés par des antigènes des microfilaires, des larves et des vers adultes, particulièrement la présence des

microfilaires qui aggrave la situation [Paes-de-Almeida et al, 2003]. Les lésions rénales peuvent évoluer vers une néphrite grave induite par la protéinurie, l'insuffisance rénale et de l'azotémie.

L'atteinte la plus grave au cours d'une dirofilariose cardiopulmonaire est le syndrome de la veine cave (SVC), observé le plus fréquemment chez de petits chiens. Il se produit à la suite du déplacement d'une masse de vers à partir des artères pulmonaires vers le ventricule droit, où ils interfèrent avec la cinétique et le fonctionnement de la valve tricuspide, et par conséquent, l'augmentation de la pression à l'intérieur du ventricule droit, avec obstruction de la valve et de la circulation sanguine, provoquant de ce fait l'insuffisance tricuspide [Simon et al, 2012]. Ces phénomènes aboutissent à l'installation des surcharges volumétriques et de la pression dans l'oreillette droite et la veine cave caudale, avec une exacerbation de la pression veineuse associée à une difficulté dans la circulation de retour. Cette situation mène souvent à la mort de l'animal à cause du développement de l'hémolyse, l'hémoglobinurie et à la coagulation intravasculaire disséminée (CID).

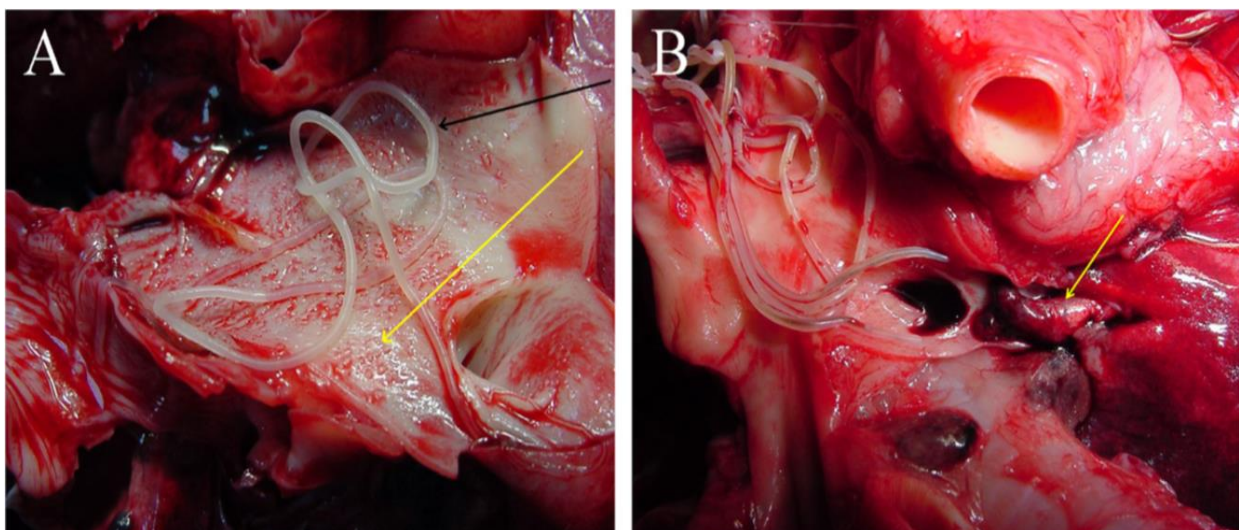


Figure 12: Les changements pathologiques des artères pulmonaires associés à la dirofilariose cardiopulmonaire canine. **(A)** Surface de l'endothélium vasculaire d'une artère pulmonaire d'un chien atteint, montrant les papilles intravasculaires (flèche jaune). La flèche noire indique la présence d'un ver d'adulte. **(B)** Thromboembolisme (flèche jaune), d'après [F. Simon et al, 2012].

I. Localisations erratiques

Dirofilaria immitis peut produire des lésions dans d'autres organes, suite à des localisations erratiques, dont les plus fréquentes sont, le cerveau, le foie, les yeux, et la cavité péritonéale. La majorité des chiens ne manifestent pas une symptomatologie relative à ces atteintes pendant des mois voire des années [Simon et al, 2012 ; McCall et al, 2008].

II. Symptomatologie

La manifestation de la clinique d'une dirofilariose dépend principalement, de la charge parasitaire, les défenses de l'hôte, les dommages artériels et leur état d'aggravation sous l'effort musculaire, qui causent principalement chez le chien est une toux persistante, chronique, non productive, qui augmente avec l'exercice, suivi de la tachypnée modérée ou grave, la dyspnée et/ou stresse respiratoire [Bowman & Atkins, 2009]. La diversité de la pathogénie est due à l'augmentation de l'insuffisance respiratoire qui est observée au fur et à mesure avec la progression de la maladie. Les animaux infectés peuvent présenter avec l'épistaxis de l'hémoptysie, ou l'hémorragie pulmonaire, et le choc hypo-volumique dans les cas graves. Les chiens infectés montrent l'intolérance à l'exercice et de la léthargie qui peuvent être accompagnées par la syncope liée à l'excitation ou à l'activité physique accrue. Quand l'insuffisance cardiaque congestive se développe, l'ascite, l'œdème périphérique, l'hydrothorax et l'hydropéricarde apparaissent. L'ingurgitation veineuse (jugulaire, cutané, épisclérale, ou rétinale) et la congestion viscérale se produisent également, conduisant aux symptomatologies diverses. Au niveau hépatique, la congestion veineuse cause l'hépatomégalie. Cette atteinte hépatique mène à l'insuffisance hépatique, qui peut être accompagné de l'ictère, des concentrations élevées des transférases, et des troubles de coagulation. La splénomégalie congestive se développe également. La mort soudaine est rare mais peut résulter de l'insuffisance cardio-respiratoire, de la cachexie ou des phénomènes thromboemboliques [Bowman & Atkins, 2009].

Lorsque le syndrome de la veine cave (SVC) s'installe, il provoque l'orthopnée avec une grave insuffisance respiratoire (hypoxémie/hypoxie). Au niveau circulatoire il induit les souffles holosystoliques, avec la régurgitation tricuspidiennne, de l'hémoglobininurie suite à l'hémolyse mécanique due aux troubles provoqués par l'interférence des vers accumulés avec le flux sanguin [Simon et al, 2012]. La léthargie ainsi que le poul jugulaire, la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), l'inappétence, et, finalement l'anorexie et la mort secondaire à la syncope cardiaque [Bowman & Atkins, 2009].

En conclusion, au niveau rénal, l'oligurie due à une diminution de pression de filtration et de la protéinurie suite aux lésions glomérulaires congestives, qui peuvent être présentes. Récemment, des anticorps IgG contre *Wolbachia* ont été détectés dans l'urine des chiens atteints de dirofilariose cardiopulmonaire, qui est associée à la présence des microfilaires dans les capillaires rénaux (figure 14-A) et la libération des bactéries *Wolbachia* avec la destruction des microfilaires [Morchón et al, 2012].

B. Dirofilarioses sous-cutanée/oculaire

Le *dirofilariose* sous-cutané chez les chiens est généralement associé à la présence des vers adultes de *D.repens* dans les tissus sous-cutanés et/ou les nodules sous-cutanés (fig. 13) [Grandi et al, 2007], tout comme *D. immitis*, *D. repens* peut avoir des localisations erratiques telle que la conjonctive oculaire, la maladie évolue habituellement sous forme d'une atteinte asymptomatique [Hermosilla et al, 2006].

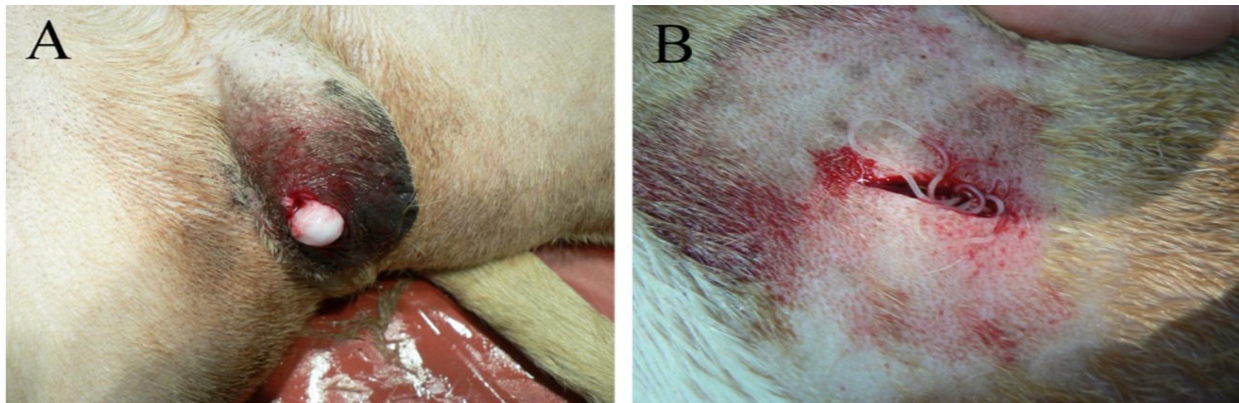


Figure 13: Dirofilariose sous-cutanée canine à *D.repens*. (A) nodule sous-cutané au niveau scrotal chez un chien (B) Forme adulte de *D. repens* dans un nodule sous-cutané ouvert.

Les éventuelles manifestations ont été classées sous forme de deux syndromes cliniques [Scarzi, 1995] :

- **dermatite nodulaire multifocale**, qui est généralement localisée au niveau facial ;
- **dermatite papillaire prurigineuse**.

La diversité des signes dermatologiques se reproduisent de façon saisonnière pendant des années pour les deux atteintes, comme le prurit dans 100% des animaux, l'érythème à (79%), les papules à (62%), de l'alopecie focale ou multifocale à (55%), l'hyperkératose (18%), démangeaison (14%), nodules (12%), l'acanthose « hyperpigmentation et épaissement de la peau dans (5%), et l'eczéma (3%), la pyodermie (3%), et l'œdème (1%). Les symptômes Extra-dermiques incluent la conjonctivite (46%), l'anorexie (35%), vomissement (26%), fièvre (25%), léthargie (20%), et lymphadénomégalie (10%) [Tarello, 2011 ; Tarello, 2010]. Il n'y a pas assez d'études expérimentales concernant les mécanismes pathogènes, mais il est admis à l'heure actuelle que ces lésions et ces altérations sont le résultat des processus mécaniques et immunitaires, certaines études ont décrit des changements au niveau des organes internes tels que la rate, le foie, les reins, les poumons, le cœur, et le cerveau qui sont associés aux infections massives avec les vers d'adulte et les microfilaries [Grandi et al, 2007]. Les cas d'infection in-utéro par

D. repens chez les chiens sont peu fréquentes [Guterbock et al, 1981 ; Hermosilla, et al., 2006], alors que celles de *D. immitis* sont très rares [Dantas-Torres et al, 2009].

Le pronostic dépend des dommages provoqués par les vers et le degré de la réussite de l'extraction chirurgicale [Dantas-Torres et al, 2009].

5.2.2. Interactions hôte-parasite au cours des dirofilarioses

L'interaction hôte-parasite au cours des dirofilariose est de nature complexe, due principalement, à :

- la capacité de *D. immitis* et *D. repens* d'infecter différents hôtes, chez lesquels différents stades développementaux sont atteints par les parasites donnant lieu à différentes pathologies ;
- la présence des bactéries symbiotiques du genre *Wolbachia* dans les larves et les vers adultes des deux espèces susmentionnées, et les hôtes sont exposés aux antigènes des nématodes et des bactéries [Simón et al, 2009].

Le type des réponses induites par les antigènes bactériens et/ou parasitaires ainsi que la dominance de l'une vis-à-vis l'autre, sont liées à la survie ou la mort du parasite, mais il faut noter que la réponse inflammatoire est typique aux cas des dirofilarioses [Simón et al, 2007].

5.2.3. Réponse immunitaire

Avant la découverte de *Wolbachia*, et sa prise en considération dans l'étude de la réponse immunitaire, les modèles canin et expérimentale ont servi comme modèle d'étude de la relation hôte-parasite, dont une partie des données obtenue demeure toujours compatible avec celles obtenues à nos jours, selon lesquelles l'existence des bactéries symbiotiques représente un élément fondamental de la conception de recherches [Simón et al, 2012].

Les réponses immunitaires dirigées contre les infections à *D. immitis* montrent chez le chien des contradictions des données apparentes, où le développement des larves à partir du stade infectant jusqu'à la forme adulte, et la nature chronique de la maladie exige une diminution de l'efficacité de la protection immunitaire, et la capacité du parasite à s'échapper aux mécanisme de contrôle chez l'hôte en réduisant son immunogénicité ou en induisant un état d'immunosuppression et/ou immunotolérance chez l'hôte. Alors qu'on accepte généralement la capacité de modulation du nombre de vers par l'animal, et de les maintenir en nombre compatible avec sa propre survie, en détruisant la plupart des larves acquises au cours des réinfections [Simón et al, 2001].

Différents isotypes d'immunoglobulines (*IgM*, *IgG*, et *IgE*) dirigés contre chaque stade développemental du parasite ont été mis en évidence. Les productions abondantes d'Anti-corps (Ac_s) accompagnent les infections microfilariémiques [Simon et al, 2012 ; Gbakima et al, 1986 ; Grauer et al, 1987 ; Grieve et al, 1985 ; Mejía et al, 1994 ; Tamashiro et al, 1985].

Les mécanismes médiés par les Ac_s sont efficaces dans l'élimination des microfilaires, notamment ceux médiés par les *IgM*, *IgG* qui assurent l'adhésion des neutrophiles sur la surface des microfilaires tout en induisant un effet cytotoxique pour ces dernières [Wakelin, 1984]. En revanche, ces mécanismes perdent leur efficacité sur les formes adultes du parasite. Globalement les infections chroniques sont accompagnées par la suppression de la réponse cellulaire, et la maintenance de la réponse humorale en Ac_s intacte [Grieve et al, 1979 ; Weil et al, 1981].

L'augmentation de la production des anticorps est significative après une thérapie adulticide [Tanaka, Atwell, 1991], en effet, la libération massive des antigènes qui suit le traitement adulticide se corrèle avec l'augmentation des réponses immunopathogénique [Desowitz et al, 1978]. Actuellement, il est évident que la mort des vers adultes et celle des microfilaires induit la libération des bactéries symbiotiques *Wolbachia* dans le sang, qui interagit avec les tissus de l'hôte (figure 14-A&B). Cette altération secondaire à la mort des vers doit être suivie tout au long de la période thérapeutique, dont l'évaluation clinique de l'intensité du risque du thromboembolisme reflète l'effet des phénomènes inflammatoires que provoquent les *Wolbachia* (tableau 4).

Tableau 4: Classification cliniques des sujets selon l'intensité du risque « Faible/Elevé » des complications thromboemboliques suite à une thérapie adulticide d'après [Day. Michael. J, 2016].

RISQUE DE COMPLICATION THROMBOEMBOLIQUE FAIBLE	RISQUE DE COMPLICATION THROMBOEMBOLIQUE ELLEVE
(Les chiens de ce groupe doivent satisfaire les conditions suivantes)	(Les chiens de ce groupe ne présentent pas une satisfaction de l'une ou toutes les conditions suivantes)
➤ Pas de signes cliniques	➤ Signes cliniques liés à la maladie « Ex. Toux, Syncope, Ascites »
➤ Radiographie thoracique normale ➤ Faible degrés des antigènes circulants voir complètement absent avec les microfilaires ➤ Pas de vers visible à l'Echocardiographie	➤ Radiographie thoracique anormale ➤ Niveau élevé des antigènes circulants ➤ Vers visibles par l'Echocardiographie
➤ Pas d'atteintes envahissantes ➤ Possibilité de restriction à l'exercice	➤ Atteintes envahissantes ➤ Pas de Possibilité de restriction à l'exercice

L'isotype IgG destiné contre la protéine dominante de la surface de *Wolbachia* (WSP) a été détecté dans le sang et l'urine des chiens montrant divers aspects cliniques de la dirofilariose [Simon et al, 2007 & 2012], et au cours des infections naturelles et/ou expérimentales du chat [Bazzocchi, et al. 2000 ; Morchón et al. 2004], et chez l'homme atteint de dirofilariose pulmonaire et sous-cutané [Grandi et al, 2008 ; Simón et al, 2003]. En outre, la révélation immuno-histochimique avec des Acs polyclonaux anti-WSP a indiqué la présence de *Wolbachia* dans divers tissus et cellules immunitaires chez des chiens atteints de dirofilariose cardiopulmonaire à *D. immitis* (figure 14-A&B), [Kramer et al, 2003 ; Kramer et al, 2005 ; Morchón et al. 2012]. De même, pour les individus montrant une dirofilariose sous-cutané à *D. repens*, qui ont présenté une forte réponse en IgG anti-WSP et une révélation immuno-histochimique de WSP dans les cellules inflammatoires du granulome [Grandi et al, 2008].

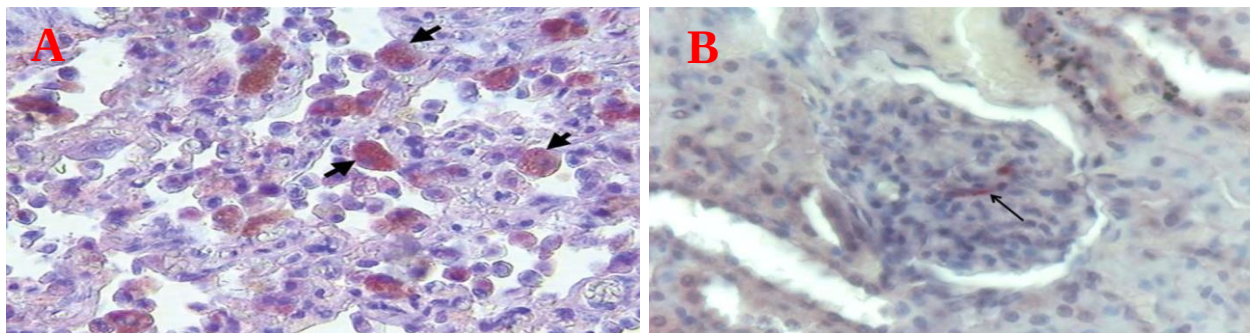


Figure 14: Révélation immuno-histochimique positive via des Anti-WSP ; (A) au niveau pulmonaire d'après [Simon et al, 2007]. (B) au niveau rénal chez un chien atteint par *D. immitis* d'après [Simon et al, 2012].

5.2.4. Mécanismes immunopathogénique au cours des dirofilarioses

Le modèle expérimental de souris *BALB/c* immunisées avec les extraits antigéniques des vers adultes de *D. immitis* (DiSA), montre une réaction immunitaire bipolaire *Th1/Th2* (fig. 15). La réponse *Th2* est dirigée principalement contre les antigènes de *D. immitis*, tandis que la réponse *Th1* elle concerne *Wolbachia* [Marcos-Atxutegi et al, 2003]. Cette polarisation de la réponse immunitaire est également présente au cours des infections naturelles. La réponse *Th2* est caractérisée par des niveaux élevés de l'interleukine-4 (*IL-4*) et l'*IL-10* ARNm et par la dominance de la production l'IgG1 dans les infections canines microfilariémiques. Cependant la réponse *Th1* est caractérisée par une faible expression de l'*IL-10*, alors que la synthèse est importante de l'oxyde nitrique synthétase (*iNOS*) et des IgG2, accompagnant l'infection amicrofilariémique chez le chien [Morchón et al, 2007b].

L'expression de l'*Il-10* est liée à l'hypo-réactivité immunitaire (immunosuppression) au cours des filarioses lymphatiques [Mahanty, et al. 1996 ; Osborne et Devaney, 1999 ; Ravichandran et al, 1997], et la faible réponse cellulaire au cours des helminthiases a été associé aux types des cellules *Th3/TR1* qui produisent les cytokines anti-inflammatoires *Il-10* et transforment le facteur croissance bêta (*TGF-β*) [Doetze A et al, 2000]. Ces données, suggèrent que les microfilaires en circulations lors d'une dirofilariose peuvent induire une polarisation immunitaire vers une l'hypo-réactivité (*Th2*) chez les chiens atteints de dirofilariose cardiopulmonaire. Ce qui permet la survie à long terme des vers [Morchón et al, 2007].

Le modèle prédictif de la réponse immunitaire au cours des dirofilarioses chez l'hôte canin et humain montre que l'origine de la réponse anti-inflammatoire (type *Th-2*), est la stimulation par les antigènes de *D. immitis* et par la présence des microfilaires (figure 15-(1)). Accompagné d'une augmentation de l'expression de l'*IL-4* & *IL-10*, et les ACs *IgG1* (chien) ou *IgE* (homme). Alors que la réponse proinflammatoire (type *Th-1*), est le résultat de la stimulation par les bactéries *Wolbachia* libérées après la mort du vers. La protéine de surface de *Wolbachia* (*WSP*) stimule l'expression d'*IFN* agissant sur les monocytes (probablement via les [*TLR*]) en empêchant leur apoptose. *Wolbachia* stimule également la production d'ACs de type *Th-1* et l'expression des médiateurs proinflammatoires par les cellules endothéliales vasculaires, y compris les facteurs d'adhésion {*ICAM*; *PECAM*; *VCAM*}. Certains de ces stimulus sont également déclenchés par l'antigène somatique de *D.immitis* (*DiSA*), (figure 15-2) [Simon et al, 2012].

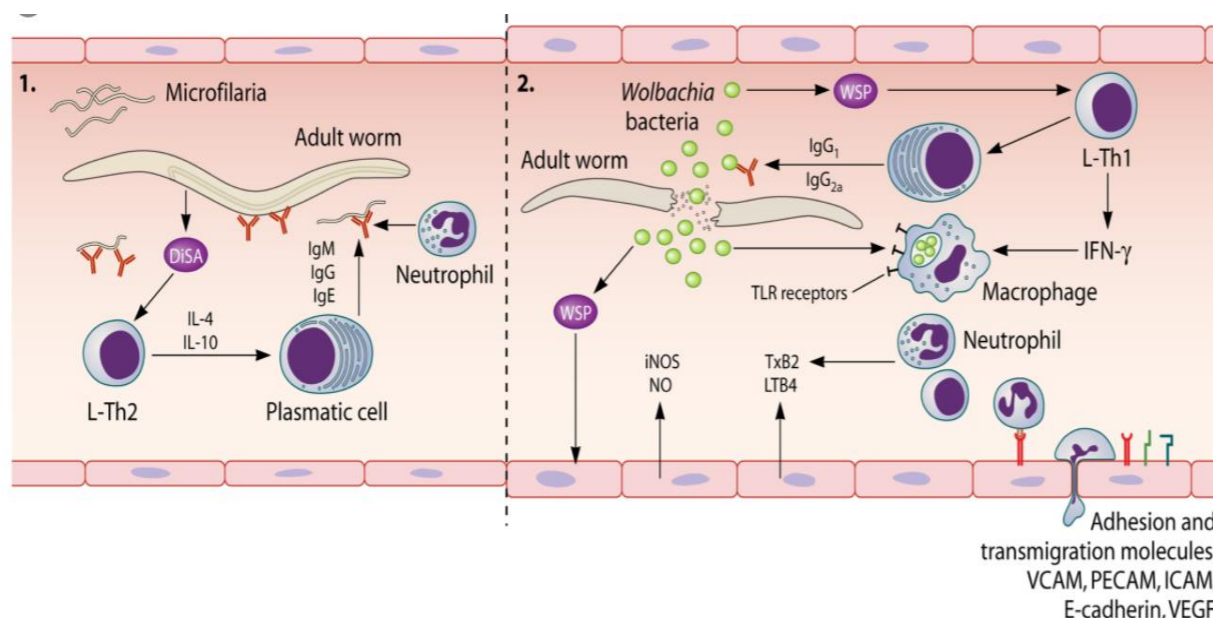


Figure 15: Prédiction de la réponse immunitaire au cours des infections par *D.immitis*. une duplexe réponse immunitaire (Th1-Th2) chez l'hôte. D'après Simon et collaborateurs 2012.

L'inflammation est l'une des principales conséquences de la dirofilariose [Pampiglione et al, 1995 ; Pampiglione et Rivasi, 2000 ; Simón et al, 2007 ; Theis, 2005]. Plusieurs études ont confirmé le lien entre *Wolbachia* et l'inflammation qui succède la mort des vers adultes. L'immunisation des souris BALB/c avec les protéines recombinantes de WSP induit l'expression des iNOS et de l'interféron gamma ($IFN-\gamma$ -ARNm), la production du NO et de l'IgG₁ ($Th1$), qui sont liés à une réponse proinflammatoire médiée par des macrophages [Bogdan, 2001 ; Morchón et al, 2007b]. Les macrophages jouent un rôle dans l'activation et la modulation de cette réponse innée et lient les réponses innées et adaptatives [Taylor et al, 2001]. Les macrophages et les neutrophiles sont également présents dans les infections canines par *D.immitis* [Kramer et al, 2005].

5.2.5. Mécanismes pathogène non reliés à l'immunité

Le concept des mécanismes pathogènes médiés par les filaires adultes qui affectent les cellules endothéliales a été formulé par une équipe de recherche multidisciplinaire à l'université de Michigan entre les années 80 et 90 du siècle précédent. Ces mécanismes sont dus aux sécrétions des filaires qui altèrent la fonction physiologique des cellules endothéliales, et non pas les cellules musculaires lisses, et changeant l'élasticité de la paroi vasculaire. Ces auteurs ont également rapporté que l'altération de la dilatation vasculaire qui en résulte, explique une partie de l'incapacité de satisfaire les demandes circulatoires au cours de l'effort physique chez les chiens atteints d'une dirofilariose cardiopulmonaire à *D. immitis*. En effet *D.immitis* est capable de

sécréter des facteurs pharmacologique actifs qui peuvent altérer la fonction des cellules endothéliales [Kaiser et al, 1989]. Il a été également démontré que l'histamine, qui cause la vasoconstriction chez les chiens sains, elle induit la vasodilation des artères chez chiens atteints à *D. immitis*, cette conversion de l'action des histamines s'observe quand les cellules endothéliales des artères sont éliminées [Kaiser L et al, 1998]. Kitoh et collaborateurs (2001) ont identifié l'ensemble des molécules antigéniques de la surface externe de la forme adulte de *D. immitis* incriminées dans le choc induit au cours des dirofilarioses cardio-pulmonaires, dont l'une des molécules identifiées engendre la vasoconstriction par une action directe sur le muscle lisse au niveau de la paroi vasculaire, et une autre induit la vasodilation suite à la production de l'oxyde nitrique NO par les cellules endothéliales. Toutes ces données montrent que les interactions de *D. immitis* et ces produits avec les cellules endothéliales vasculaires est responsable sur le changement de la réponse vasomotrice des artères au cours de la dirofilariose cardiopulmonaire canine [Simon et al, 2012].

5.2.6. Mécanisme de survie parasitaire

Tout comme les autres parasites, *D. immitis* manipule le système immunitaire et les différents processus biologique de l'hôte, en les détournant à leur profit. L'ensemble des phénomènes, constitue les **Mécanismes parasitaires de survie et d'échappement au système immunitaire**, qui se résument selon Simon et collaborateurs en 2012, en trois évènements (figure 2) selon le stade développemental de *D. immitis*, à savoir :

- (1) Echappement immunitaire à court terme des larves L3 : Cette forme infectante (L3) s'échappe à la réaction immunitaire de l'hôte, en libérant de grandes quantités de deux antigènes extérieurs, de 6 et 35 kDa .
- (2) Echappement immunitaire à long terme : Les vers pré-adultes/adultes masquent leur surface, en adsorbant différentes molécules et cellules de l'hôte. Ils sont aussi munis de glycolipides non immunogènes extérieurs et beaucoup d'iso-formes de protéines du Choc thermique (HSPs) et des enzymes détoxifiantes qui éliminent les produits toxiques synthétisés par les macrophages et les neutrophiles. Tant qu'au Microfilaires, qui ont des protéases externes assurent la digestion des anticorps de l'hôte.
- (3) Modulation de l'environnement vasculaire: Les formes adultes libèrent des métabolites sous forme d'un Excretome/secretome (E/S) qui stimulent les mécanismes anti-inflammatoires de la prostaglandine E2 (PGE2) et les écosanoïde et diminuent la transmigration des monocytes, ainsi qu'ils lient le plasminogène et activent la plasmine pour éliminer les

thromboembolismes en présence de l'activateur tissulaire de la plasminogène (t-PA), dont l'expression est également stimulée par des antigènes d'E/S sur cellules endothéliales vasculaires.

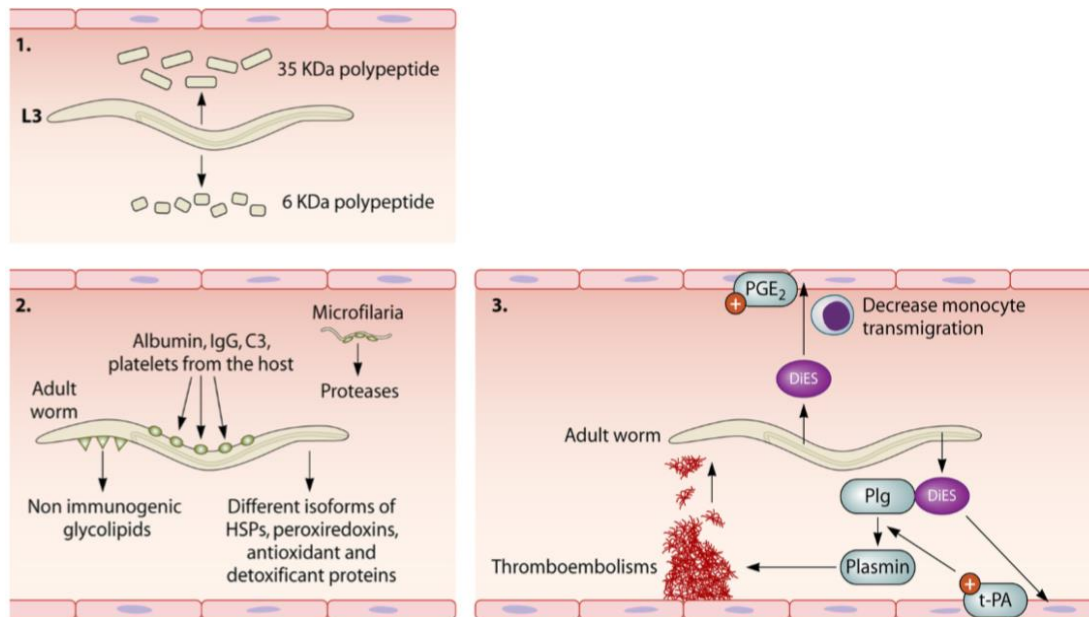


Figure 16: Mécanismes de survie et d'échappement immunitaire de *D. immitis*. DIES : produits excrétoire/sécrétoire de *D. immitis*; PLG: plasminogène modifié à partir de [F. Simon *et al*, 2012].

5.3. Particularité des aspects de dirofilariose-hôte, traitement et diagnostic

C'est en fonction des aspects que peut prendre la dirofilariose chez ses hôtes, qu'on adapte les moyens de diagnostic et du traitement de ces affections comme le montre le tableau 5, en effet le traitement doit prendre en considération l'état clinique [Simon *et al*, 2012]. Tandis que la prévention, elle doit être réalisée au regard de la saisonnalité [Sassnau *et al*, 2014]. Alors que le diagnostic est lié à l'hôte [Simon *et al*, 2012].

Tableau 5: Aspects de la dirofilariose chez ses hôtes définitifs d'après [Simon et al, 2012].

Aspect de la dirofilariose	Hôtes		
	Chiens	Chats	Humains
Paramètres biologiques	✓ Infection à <i>Mf</i>+ ou <i>Mf</i>- ✓ Maturité sexuelle à 4 <i>m.p.i</i> ✓ Adulte persistes plus que 7 ans ✓ D'un faible nombre à un nombre élevé de parasites	✓ Infection <i>Mf</i>- ✓ Maturité sexuelle à 8 <i>m.p.i</i> ✓ La forme adulte persiste 2 ans au max ✓ Faible nombre de 1 à 3 parasites	✓ Infection <i>Mf</i>- ✓ Pas de maturité sexuelle de <i>D. immitis</i> ✓ Généralement un seul vers immature de <i>D. immitis</i> ✓ Maturité atteinte pour <i>D. repens</i>
Immunologie	✓ Infection <i>Mf</i>+ : Réponse Th-2 ✓ Infection <i>Mf</i>- : Réponse Th-1 ✓ Acs anti-WSP peuvent être présent	✓ Forte réponse en Acs contre les <i>Ag</i> de L3. ✓ Forte réponse en Acs les <i>Ag</i> de la forme adulte et de <i>Wolbachia</i>	✓ Réponse de type Th-1 anti-WSP chez les patients avec nodules pulmonaires ✓ Réponse de type Th-2, avec IgE chez les sujets cliniquement sains
Aspect clinique	✓ Evolution chronique en générale ✓ Mort simultanée de plusieurs vers provoque des épisodes aigus ✓ La majorité des symptômes sont liés à l'appareil cardiorespiratoire	✓ Moins constante que la diro canine ✓ Signes Respiratoires, gastro-intestinales, cardiovasculaires et neurologiques	✓ Des nodules pulmonaires bénins, émettant souvent des métastases (Cancer). ✓ Généralement les cas pulmonaires sont asymptomatiques. Sinon symptomatologie non spécifiques. ✓ Cas oculaires sévères s'observe lors des prévalences élevées.
Moyen de Diagnostic	✓ Technique modifiée de Knott ✓ Détection des <i>Ag</i> circulants ✓ Imagerie médicale	✓ Détection des Acs ou les <i>Ag</i> ✓ Imagerie médicale	✓ Détection au cours du diagnostics usuels, indépendants de la dirofilariose ✓ Histologie, sérologie et techniques moléculaires ✓ Recherche directe ou indirecte de <i>Wolbachia</i>, comme diagnostique complémentaire
Traitement	✓ Thérapie adulticide par les mélasonines hydrochloride, renforcé par la doxycycline contre <i>Wolbachia</i> ✓ Prophylaxie par les lactones macrocycliques ✓ Traitement chirurgical pour le SVC	✓ Thérapie adulticide comme dernière solution au cours des dirofilarioses cliniques ✓ Prophylaxie par les lactones macrocycliques	✓ Pas de chimiothérapie ✓ Extraction chirurgicale si nécessaire
<i>Mf</i> + : microfilarémique ; <i>Mf</i> - : amicrofilarémique ; SVC : syndrome de la veine cave ; WSP : Protéines de surface de <i>Wolbachia</i> ; <i>Ag</i> : antigène ; Acs : anticorps ; <i>m.p.i</i> : mois post-infection.			

Partie Expérimentale

***Etude Epidémio-Climatique
des Dirofilarioses Canines en Algérie***

1. ETUDE EPIDEMIO-CLIMATIQUE DES DIROFILARIOSES CANINES EN ALGERIE

A. Problématique et objectif de l'étude

Malgré le débat continu sur le réchauffement climatique et son impact potentiel sur les maladies, le lien entre les infections animales et/ou humaines et l'environnement global est incontestable. En modifiant cet environnement global, le changement de climat exerce un effet potentiellement significatif sur certaines maladies, en particulier celles transmises par des vecteurs [Khasnis et Nettleman, 2005; Rinaldi et al., 2006]. En effet, le changement global du climat affectera le comportement du vecteur de la maladie, qui alternativement peut changer les modèles courants des maladies transmises par la morsure des arthropodes hématophages par exemple [Rogers et Randolph, 2006]. Les récents changements écologiques, climatiques, les mouvements des populations humaine et animale... etc. ont favorisé la diffusion et la recrudescence de la dirofilariose cardio-pulmonaire dans diverses parties du globe et tout particulièrement dans le pourtour méditerranéen [Otranto et al, 2009 ; Genchi et al, 2011 ; Cuervo et al, 2013a ; Karatchev et al. 2014 ; Labarthe et al, 2014].

La température et la période d'incubation extrinsèque (PIE) sont des paramètres de base dans les modèles prédictifs du risque et de la saisonnalité pour les maladies à transmission vectorielle [Nicholas et Laura, 2015]. Une fois ingérées par le moustique, les microfilaires requièrent le cumul de température sous la forme de Degrés Quotidiens (DQ), afin d'atteindre le stade L3 ou stade larvaire infectant [Slocombe et al, 1989, Medlock et al, 2007]. Ce processus est connu sous le nom d'**Incubation Extrinsèque (IE)** de *Dirofilaria*. L'accumulation des DQ commence à partir d'un seuil de température de 14°C [Lok and Knight 1998 ; Slocombe et al, 1989 ; Vezzani et Carbajo 2006 ; Medlock et al, 2007 ; Genchi et al, 2011].

A partir de la valeur des degrés quotidiens cumulés nécessaires pour le passage au stade L3 chez le moustique, un model développé par Slocombe et collaborateurs (1989) permet de déterminer le début et la fin de la période de transmission, ainsi que le nombre de générations de dirofilaires. Rappelons que le développement définitif du stade infectant chez le moustique requiert 130 DQ ou **Unités de Développement de Dirofilariose (UDD)**. En tenant compte de la durée de vie du moustique, la période du développement extrinsèque d'une génération de L3 est de 30 jours successifs d'incubation extrinsèque (**P₃₀**) [Sassnau et al, 2014]. Cette formule a permis d'exploiter les données fournies par les stations météorologiques, dans de nombreuses études, via l'élaboration des modèles prédictifs de la Dirofilariose sur des petits ou larges territoires, à travers le monde, avec détermination de la période de transmission, et du nombre de Générations de Dirofilariose GD_{annuelle} [Lok et Knight, 1998 ; Genchi et al, 2005 ; 2009 ; 2011 ; Vezzani and Carbajo 2006 ; Medlock et al, 2007 ; Mortarino et al, 2008 ; Rinaldi et al, 2011 ; Cuervo et al, 2013b ; Kartashev et al, 2014 ; Sassnau et al, 2014 ; Simon et al, 2014].

Les modèles utilisés sont le plus souvent limités aux températures quotidiennes pour le calcul des UDD [*Genchi et al, 2005 ; 2009 ; 2001 ; Vezzani and Carbajo 2006, Mortarino et al, 2008, Cuervo et al, 2013b ; Kartashev et al, 2014 ; Sassnau et al, 2014 ; Simón et al, 2014*]. Cependant ces approches restent valables uniquement pour les petites étendues géographiques ou moyennes, et non pas pour les grands territoires tel qu'un pays [*Rinaldi et al, 2011 ; Simon et al, 2012 ; Kartashev et al, 2014*].

Le modèle le plus récent utilisé pour le calcul des UDD, sur des larges spectres est celui proposé par Cuervo et collaborateurs en 2015, utilisant les températures mensuelles délivrées par les stations météorologiques. Il permet après un traitement statistique spécifique, de décrire l'activité de la dirofilariose d'une manière ponctuelle, et continue, il s'agit du modèle mensuel Ponctuel et Continu.

Dans le cas des dirofilarioses, les études prédictives liés à leur transmission sont quasiment absentes restent dans tout le continent Africain, y compris l'Algérie.

Par conséquent cette étude épidémio-climatique de la dirofilariose canine a eu les objectifs suivants :

- ✓ Proposition et mis en œuvre d'un modèle climatique prédictif de la dirofilariose ;
- ✓ Etude des liens existants entre le climat et le comportement épidémiologique de la dirofilariose, avec détermination de nouvelles interactions ;
- ✓ Introduction d'un nouveau **Modèle Epidémio-Climatique**, basé sur la décomposition territoriale d'une zone géographique en fonction du comportement épidémiologique de la dirofilariose ;

A. MATERIELS ET METHODES

1.1. Etude Epidémio-climatique des dirofilarioses canines en Algérie

1.2. Définition des indicateurs épidémiologiques

1.2.1. Strate géographique

Nous entendons par strate géographique, l'ensemble des zones géographiques du nord du pays, regroupées sous forme d'une bande horizontale, à une distance déterminée de la mer. Ainsi trois strates ont pu être distinguées : la strate du littoral, la strate du sublittoral et celle des Hauts plateaux.

1.2.2. Secteur géo-climatique

Il correspond à l'ensemble des zones géographiques qui résultent de la rencontre des strates avec les axes verticaux passant par l'Ouest, le Centre et l'Est du pays. Neufs secteurs géo-climatiques sont ainsi identifiés il s'agit des secteurs :

- Littoral (Ouest, Centre et Est)
- Sublittoral (Ouest, Centre et Est)
- Hauts Plateaux (Ouest, Centre et Est)

1.2.3. Zone géographique

Ce terme désigne la plus petite unité de cette stratification qui correspond au territoire décrit par une station météorologique, et qui peut être représenté par une wilaya, ou une des parties de cette dernière. 45 stations et donc zones ont été décrites dans cette étude.

1.2.4. Secteur épidémio-climatique

Les zones pour lesquelles des activités épidémiologique et climatique identiques ont été identifiées représentent un secteur épidémio-climatique, et sont au nombre de quatre, désignés par :

- Secteur-I
- Secteur-II
- Secteur-III
- Secteur-IV

Cette appellation n'est en corrélation ni avec l'activité ni avec l'effectif des zones, elle est juste l'expression écrite du dendrogramme de classification statistique.

1.2.5. Modèles prédictifs

Les modèles prédictifs de description théorique de l'effet climatique sur l'activité et l'épidémiologie de la *Dirofilariose*, pour une zone donnée sont les suivants :

1.2.5.1. Modèle classique

Ce premier modèle fournit le nombre de degrés de développement quotidien UDDq [Slocombe et al, 1989] qui correspond aux données quotidiennes ponctuelles. Il permettra le contrôle de la validité des autres modèles.

1.2.5.2. Modèle Mensuel Ponctuel

Basé sur le même principe que le modèle précédent, sauf qu'il s'appuie sur les données des températures mensuelles qui correspondent à la moyenne mensuelle des températures quotidiennes, permettant le calcul des UDDm, tel que décrit pour la première fois par Cuervo et collaborateurs en 2015.

1.2.5.3. Modèle Mensuel Continu

Inspiré du modèle précédent, il permet de suivre l'évolution de l'activité théorique de la *dirofilariose* d'une manière continue, en déterminant le nombre d'UDD et de GD de chaque semaine de chaque mois, ce qui offre la possibilité de prévoir avec précision l'activité hebdomadaire et la période où la transmission est possible [Cuervo et al, 2015].

1.2.5.4. Modèle épidémio-climatique

Il s'agit du modèle proposé par la présente étude qui associe un ensemble de facteurs climatiques influençant l'épidémiologie de la *dirofilariose* afin de décrire les zones géographiques en fonction de leur activité. Dans la présente étude, ce modèle tient en lieu et place du GIS (Système d'information Géographique) dans la représentation des zones géographiques.

Les formules et les équations mathématiques utilisées dans les modèles étudiés sont reprises dans le tableau 1, ci-dessous.

Tableau 1: Tableau récapitulatif des formules et équations utilisées dans les modèles

	Equations	Sources
01	$T_{moy} = (T_{min} + T_{max})/2$	[Genchi et al, 2014]
02	$UDD = T_{moy} - 14$	
04	$UDDa = \sum_{n=1}^{365} UDDq$	
05	$GH_{anuelle} = UDD_{anuelle} / 130$	[Slocombe et al, 1989 ; Lok et Knight, 1998]
06	$T_{moy\ mensuelle} = \left(\frac{\sum_{n=1}^{30} T_{moy\ quotidienne}}{30} \right)$	[Cuervo et al, 2015]
07	$mMDQ = T_{moy\ mensuelle} - 14$	
08	$1er\ UDDh [(mMDQ_{précédent} * (7,5 * 3)) + (mMDQ_{actuel} * 7,5)]$	
09	$2eme\ UDDh = [(mMDQ_{précédent} * 15) + (mMDQ_{actuel} * 15)]$	
10	$3eme\ UDDh [(mMDQ_{précédent} * 7,5) + (mMDQ_{actuel} * (7,5 * 3))]$	
11	$4eme\ UDDh = [mMDQ_{actuel} * 30]$	
12	$UDDa = \sum_{n=1}^{12} UDDm$	
13	$GH_{anuelle} = UDD_{anuelle} / 130$	

1.3. Base de données climatiques

Les températures quotidiennes Maximales et Minimales sur trois ans (2013, 2014, 2015) ont été collectées pour 45 stations météorologiques de l'Office National de Météorologie (ONM). Les coordonnées géographiques (**Altitude, Latitude, Longitude**), ont été utilisées afin de concevoir des cartes prédictives grâce au Logiciel Map-Creator (**Copyright © 2003-2015, Primap**). Les stations météorologiques sont stratifiées en neuf secteurs géographiques.

Tableau 2: Distribution des stations météorologiques sur les secteurs géo-climatiques

Secteur géo-climatique	Nombre de stations
Littoral Ouest	05
Littoral Centre	02
Littoral Est	05
Sublittoral Ouest	05
Sublittoral Centre	06
Sublittoral Est	02
Hauts Plateaux Ouest	06
Hauts Plateaux Centre	05
Hauts Plateaux Est	09

Tableau 3: Description des stations météorologiques {Classification géo-climatique}

Secteur Géographique	Station	Elévation (m)	Latitude (DD)	Longitude (DD)
Littoral Ouest	GHAZAOUET	830	35100	-1867
	BENI SAF	680	35300	-1350
	ORAN SENIA	900	35633	-600
	ARZEW	40	35817	-267
	MOSTAGANEM	1370	35883	117
Littoral Centre	DAR EL BEIDA	250	36717	3250
	TENES	590	36550	1333
Littoral Est	BEJAIA Aéro	40	36750	5100
	JIJEL Port	20	36833	5783
	SKIKDA	70	36933	6950
	ANNABA	40	36833	7817
	EL KALA	100	36900	8450
Sublittoral Ouest	MAGHNIA	4260	34817	-1783
	TLEMCEN Aéro	8050	34867	-1333
	MASCARA	4740	35600	300
	S. B. ABBES	4500	35183	-2617
	RELIZANE			
Sublittoral Centre	CHLEF	1430	36217	1333
	MILIANA	7150	36300	2233
	MEDEA	9810	36267	2750
	TIZI OUZOU	1950	36700	4050
	BOUIRA	6350	36383	3900
Sublittoral Est	AIN BESSAM	7480	36317	3533
	BOUCHEGOUF	1110	36500	7717
	GUELMA	2270	36467	7467
Hauts Plateaux Ouest	SAIDA	7700	34867	150
	EL KHEITER	10000	34150	67
	EL BAYADH	13410	33667	1000
	MECHERIA	11490	34933	-433
	AIN SEFRA	10580	32767	-600
Hauts Plateaux Centre	NAAMA	11660	33267	-300
	TIARET	11270	35250	1433
	DJELFA	11780	34667	3350
	K. CHELLALA	8000	35167	2317
	BOUSAADA	4610	35333	4200
Hauts plateaux Est	M'SILA	441	35667	4500
	B.B.ARRERIDJ	9280	36067	4767
	SETIF	10380	36183	5417
	CONSTANTINE	6940	36283	6617
	MILA			
	KHENCHELA	11160	35417	7150
	O.E. BOUAGHI	8890	35883	7117
	BATNA	10520	35550	6183
	SOUK AHRAS	6800	36283	7950
	TEBESSA	8130	35483	8132

1.4. Calcul des UDD selon le modèle classique basé sur les données quotidiennes

Les températures quotidiennes moyennes des trois dernières années et les UDD ont été calculées par les formules suivantes :

$$T_{moy} = (T_{min} + T_{max}) / 2. \text{ [Genchi et al, 2014].}$$

$$UDD = T_{moy} - 14 \text{ [Genchi et al, 2011}^{a\&b}]$$

Seules les valeurs positives ont été prises en compte. Les valeurs quotidiennes d'UDD inférieures à zéro (0) ont été signalées par un zéro, traduisant l'absence de développement larvaire a cette valeur [Knight DH et Lok J B, 1995].

La formule suivante a été appliquée sur Excel : $UDD = SI(T_{moy} - 14 < 0 ; 0 ; T_{moy} - 14)$

Le nombre de GDa est obtenu par la division de la somme de ces valeurs (UDDa) par 130.

1.5. Modèle Mensuel Ponctuel et continu

La base de données exploitée par ce modèle a été déduite de la précédente, par l'équation suivante :

$$T_{moy\ mensuelle} = \left(\frac{\sum_{n=1}^{30} T_{moy\ quotidienne}}{30} \right)$$

A partir de ces résultats, il est possible de calculer la moyenne mensuelle des degrés quotidiens (mMDQ) selon la formule :

$$mMDQ = T_{moy\ mensuelle} - 14$$

La base de données (mMDQ), ainsi générée est utilisée pour le calcul des Unités de Développement de la Dirofilariose Hebdomadaire (UDD_h), pour chaque semaine de chaque mois de chaque année, dans le cadre du modèle mensuel continu.

Tableau 4: Equations utilisées pour le calcul des UDD hebdomadaires.

1er	$UDD_h = [(mMDQ\ précédent * (7,5 * 3)) + (mMDQ\ actuel * 7,5)]$	Eq(8)
2eme	$UDD_h = [(mMDQ\ précédent * 15) + (mMDQ\ actuel * 15)]$	Eq(9)
3eme	$UDD_h = [(mMDQ\ précédent * 7,5) + (mMDQ\ actuel * (7,5 * 3))]$	Eq(10)
4eme	$UDD_h = [mMDQ\ actuel * 30]$	Eq(11)

- mMDQ précédent : représente la moyenne des degrés quotidiens du mois précédent ;
- mMDQ actuel : représente la moyenne des degrés quotidiens du mois actuel ;
- UDD_h : représente le cumulatif des UDD atteint chaque semaine pendant l'année ;

Leur calcul est basé sur le principe suivant : chaque mois, qui est converti représente 30 jours, avec 7,5 jours par semaine pour quatre semaines du mois. Avec cependant la possibilité de détecter exactement les semaines de l'année couvrant la période annuelle de l'incubation extrinsèque à partir des UDD_h, étant donnée qu'elles représentent le cumulatif des UDD atteint à chaque semaine [Cuervo et al, 2015].

1.6. Calcul du nombre des Unités de Développement de Dirofilariose Annuelle UDDa

La 4^{ème} UDD_h : représente le cumulatif des UDD mensuelles (UDD_m : Unités de Développement de Dirofilariose Mensuelles) [Cuervo et al, 2015].

Les Unités de Développement de Dirofilariose Annuelles ont été déduite du cumulatif UDD mensuelle (UDD_m) selon la formule suivante : $UDDa = \sum_{n=1}^{12} UDDm$

1.7. Nombre de générations de Dirofilariose/An GDa

Sa valeur a été déterminée par la formule ci-dessous :

$$GD_{annuelle} = UDD_{annuelle} / 130$$

1.8. Validation du modèle utilisé

Les résultats d'UDD_{annuelle} & GH_{annuelle} sont comparés à celles obtenues à partir de la base de Données Quotidiennes Ponctuelles (DQP) initiale, et analysées statistiquement par la méthode de Bland & Altman afin de valider le modèle utilisé.

B. RESULTATS

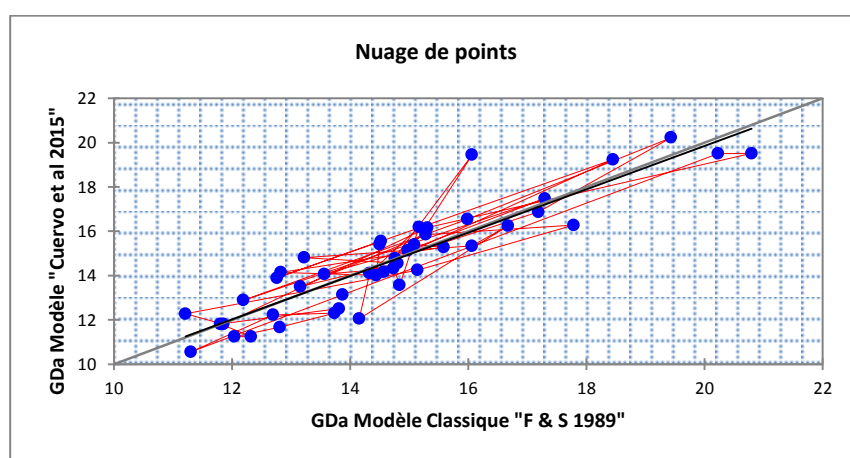
1. Validation du modèle prédictif de la dirofilariose

Les résultats de l'analyse statistique descriptive pour les deux méthodes de calcul de GDa, sont compilés dans le tableau 5. Les valeurs de GDa obtenues par les deux modèles sont très proches, mais nous constatons que le modèle mensuel offre des valeurs inférieures à celles obtenues par le modèle classique, en revanche l'écart type entre ces valeurs est supérieur à celui du modèle classique. Cette description particulière résulte des seuils atteints en dehors de la saison de transmission, qui sont pris uniquement par le modèle classique.

Tableau 5: Statistique descriptive des résultats obtenus par les deux modèles

	Station Météo	Obs. avec données manquantes	Min « GDa »	Max « GDa »	Moyenne « GDa »	Ecart- type
Modèle classique	45	0	11,214	20,796	14,741	2,241
Modèle mensuel ponctuel	45	0	10,556	20,226	14,701	2,416

L'analyse par le test de Student n'a pas montré de différence statistiquement significative $\{t=-0,264 ; p\text{-value}= 0,793\}$. L'ajustement linéaire des valeurs entre les deux modèles semble être parfait $\{R^2=0,97\}$.

**Figure 1:** Distribution linéaire comparative du nombre du GDa entre les deux modèles prédictifs

Cependant l'analyse du biais (le biais étant une moyenne de différences) fournie par la technique de Bland et Altman (figure 2 et 3), confirme statistiquement la similarité des valeurs obtenues par les deux modèles $\{\text{Biais}=-0,04/ IC :]-0,346 ; 0,266[\}$, et que les seuils atteints en dehors de la saison de transmission sont négligeables.

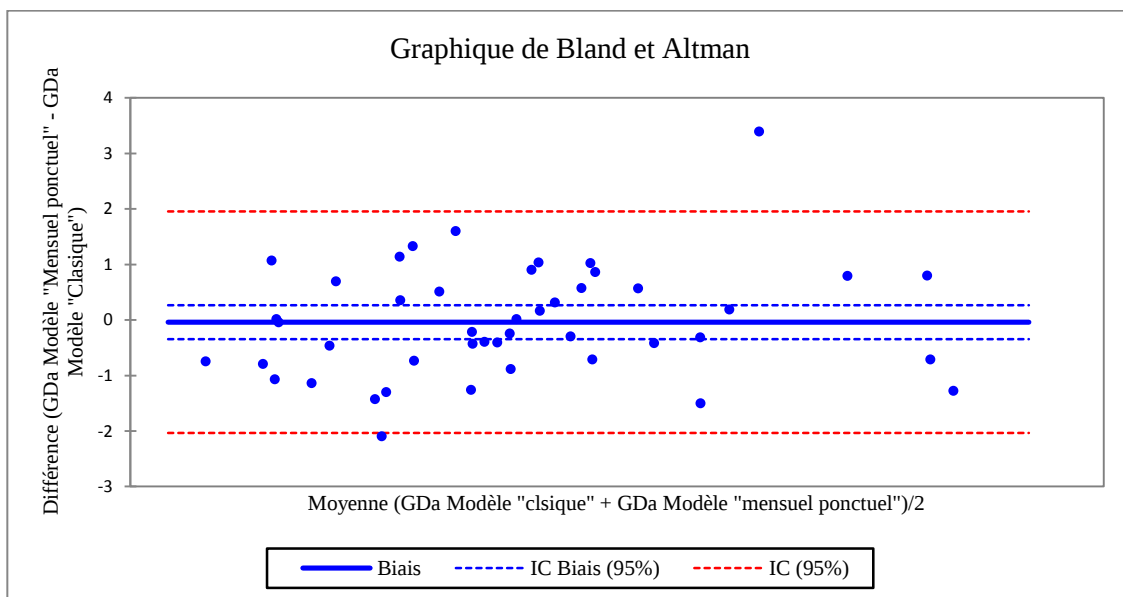


Figure 2: Graphique de Bland & Altman de la distribution des moyennes selon une loi normale.

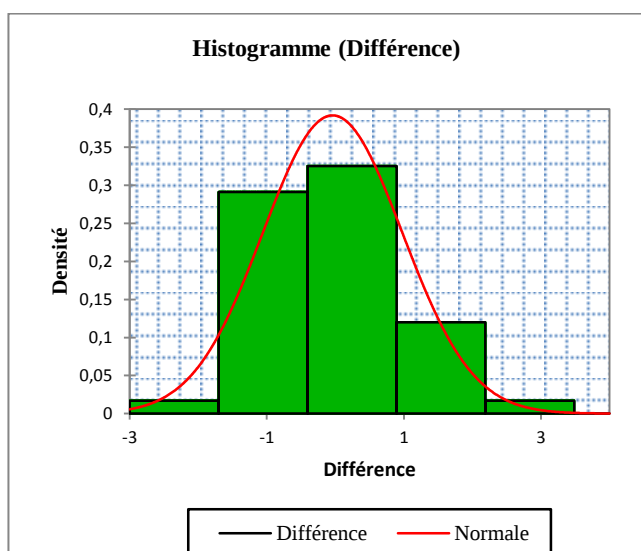


Figure 3: comparaison de la distribution des différences de moyennes à la distribution normale

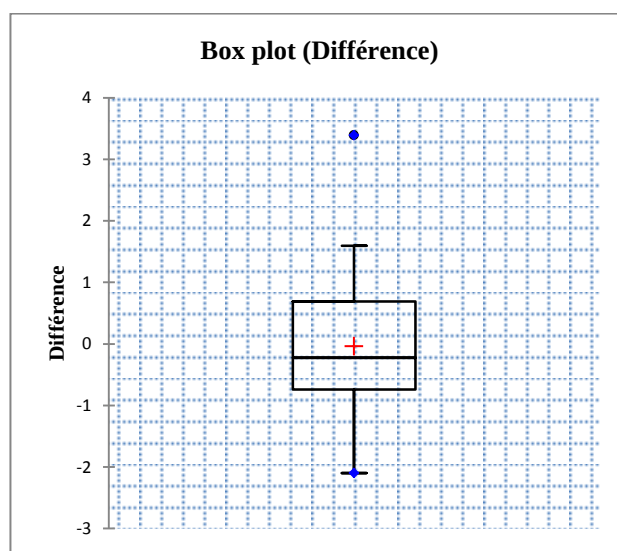


Figure 4: Box plot représentant la moyenne et la médiane des différences

2. Description de l'effet climatique sur la dirofilariose dans le Nord Algérien

Les résultats de l'analyse mathématique des données collectées dans le cadre de l'étude de l'impact climatique sur la période d'incubation extrinsèque du parasite dans chacune des zones géographiques prédéterminées sont présentés dans le tableau 6. Le nombre de générations annuelles de *D. immitis* ainsi que les périodes de transmission ont été ainsi déterminés, à partir du modèle mensuel ponctuel.

Tableau 6: Description des secteurs géo-climatiques selon le modèle mensuel ponctuel

Division géo-climatique		Année			Activité annuelle					Durée
Secteur Géo-climatique	Zones	GDa 2013	GDa 2014	GDa 2015	01/Jan 30/Mar	01/Avr 30/Avr	01/mai 30/Sep.	01/ Oct. 30/Oct.	01/Nov 01/Déc	Nombre /Mois
					0,0%	22,22%	100%	73,73%	0,00%	41,67%
Littoral ouest	GHAZAOUET	12,51	14,17	14,17	-	-	+	+	-	6
	BENI SAF	14,09	17,66	19,45	-	+	+	+	-	7
	ORAN SENIA	12,61	15,09	15,39	-	-	+	+	-	6
	ARZEW	13,52	15,58	15,28	-	-	+	+	-	6
	MOSTAGANEM	11,51	13,83	14,15	-	-	+	+	-	6
Littoral Centre	DAR EL BEIDA	12,26	14,76	14,77	-	-	+	+	-	6
	TENES	14,55	17,19	16,87	-	-	+	+	-	6
Littoral Est	BEJAIA Aéro	13,19	14,74	14,32	-	-	+	+	-	6
	JIJEL Port	14,51	14,84	13,57	-	-	+	+	-	6
	SKIKDA	15,72	15,17	16,18	-	-	+	+	-	6
	ANNABA	12,66	14,33	14,11	-	-	+	+	-	6
	EL KALA	11,79	14,15	12,05	-	-	+	-	-	5
Sublittoral Ouest	MAGHNIA	12,25	14,44	14,01	-	-	+	+	-	6
	TLEMCEM Aéro	12,17	14,50	15,40	-	-	+	+	-	6
	MASCARA	12,09	14,52	15,55	-	-	+	+	-	6
	S. B. ABBES	10,83	12,76	13,89	-	-	+	+	-	6
	RELIZANE	16,13	18,45	19,24	-	+	+	+	-	7
Sublittoral Centre	CHLEF	16,77	19,43	20,23	-	+	+	+	-	7
	MILIANA	13,31	15,98	16,55	-	+	+	+	-	7
	MEDEA	10,02	13,20	12,89	-	-	+	-	-	5
	TIZI OUZOU	14,91	17,30	17,48	-	-	+	+	-	6
	BOUIRA	12,64	14,98	15,13	-	-	+	+	-	6
	AIN BESSAM	11,23	13,56	14,07	-	-	+	+	-	6
Sublittoral EST	BOUCHEGOUF	14,26	16,68	16,25	-	-	+	+	-	6
	GUELMA	14,32	16,06	15,34	-	-	+	+	-	6
Hauts Plateaux Ouest	SAIDA	11,28	13,22	14,81	-	-	+	+	-	6
	EL KHYTHER	12,59	14,81	14,56	-	+	+	-	-	5
	EL BAYADH	11,08	13,16	13,51	-	-	+	-	-	5
	MECHRIA	13,06	15,28	15,85	-	+	+	+	-	7
	AIN SEFRA	15,68	17,79	16,28	-	+	+	+	-	7
	NAAMA	12,79	15,14	14,25	-	-	+	+	-	6
Hauts Plateaux Centre	TIARET	9,61	12,21	12,28	-	-	+	-	-	5
	DJELFA	10,56	11,86	11,81	-	-	+	-	-	5
	K. CHELLALA	13,44	15,31	16,16	-	+	+	+	-	7
	BOUSAADA	19,08	20,80	19,51	-	+	+	+	-	7
	M'SILA	18,52	20,23	19,51	-	+	+	+	-	7
Hauts Plateaux Est	B.B.ARRERIDJ	12,27	13,87	13,13	-	-	+	-	-	5
	SETIF	9,83	11,31	10,56	-	-	+	-	-	5
	CONSTANTINE	11,12	12,70	12,22	-	-	+	-	-	5
	MILA	10,25	13,74	12,30	-	-	+	+	-	5
	KHENCHELA	11,36	12,81	11,67	-	-	+	-	-	5
	O.E. BOUAGHI	10,98	12,04	11,24	-	-	+	-	-	5
	BATNA	11,53	12,32	11,25	-	-	+	-	-	5
	SOUK AHRAS	11,02	12,80	11,81	-	-	+	+	-	6
	TEBESSA	13,05	13,81	12,50	-	-	+	+	-	6

Le développement de la dirofilariose est théoriquement possible dans tout le territoire du nord de l'Algérie (tableau 6 ; figure 5). La plus simple description de cette activité peut être fournie par les mesures classiques extraite du modèle mensuel ponctuel :

- Un nombre de $GD_{annuelle}$ compris entre **[9 ; 20]** caractérisant les différentes zones
- Des valeurs de $GD_{mensuelle}$ générales comprises entre **[0,46 ; 3,26]**, caractérisant le nord du pays pour la saison de transmission.
- Une longueur allant de 5 à 7 mois pour période de transmission entre les différentes zones.
- Le début de l'activité s'observe à partir du mois d'avril avec **22,22%** de zones actives dans le nord du pays, avec une moyenne de **0,46 $GD_{mensuelle}$ / 59 $UDD_{mensuelle}$** .
- La phase plateau de l'activité est entre Mai et Septembre (**100%** de zones Actives).
- Le pic de l'activité s'observe entre Juillet et Aout avec des moyennes comprises entre **[3,15 ; 3,26] $GD_{mensuelle}$ et [425 ; 409] $UDD_{mensuelle}$** .
- L'activité s'estompe à partir du mois d'Octobre, qui caractérise la première baisse d'activité, avec **73,33%** de zones actives, et **0,9 $GD_{mensuelle}$ / 117 $UDD_{mensuelle}$** .
- Aucune zone n'est active à partir du mois de Novembre et durant toute la période hivernale.

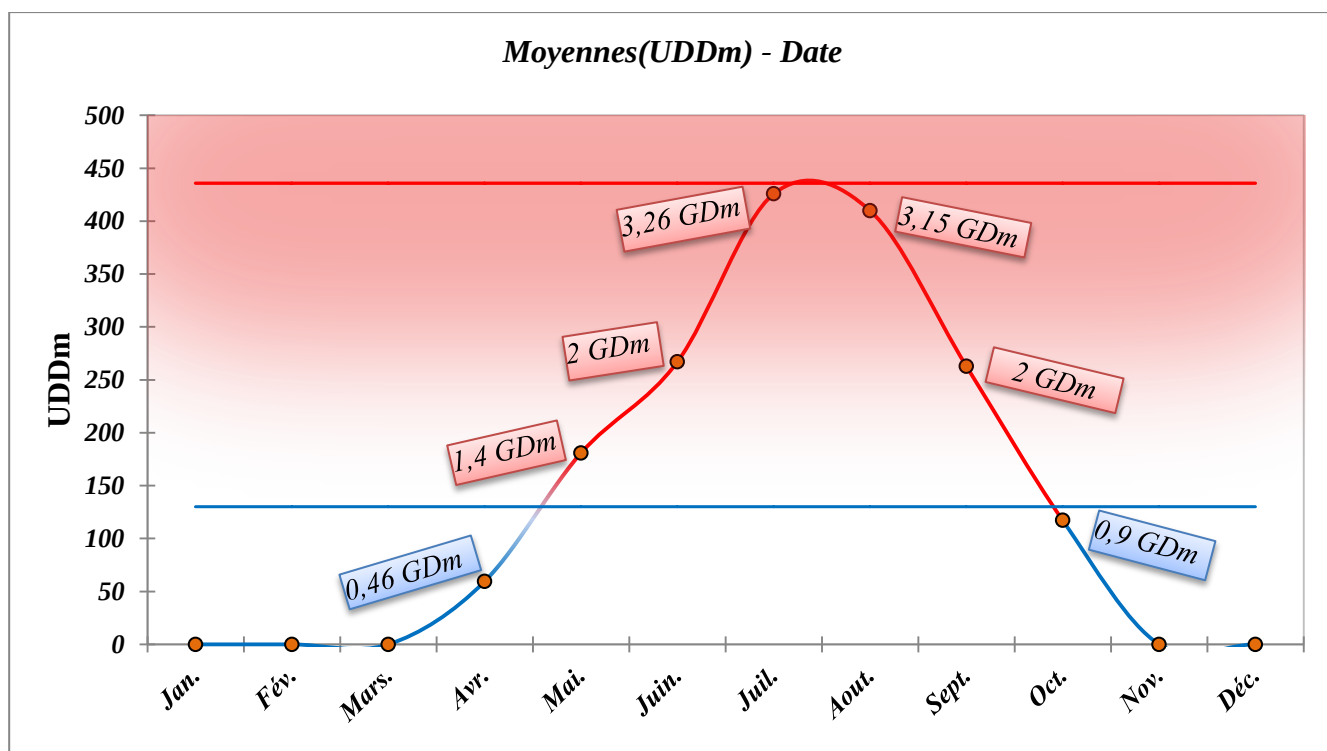


Figure 5: Série de lissage, et courbe de transmission théorique de la dirofilariose dans le nord de l'Algérie, selon le modèle mensuel ponctuel ($UDD_{mensuelle}$ & $GD_{mensuelle}$).

Le lien entre la division territoriale fournie par l'ONM en neuf secteurs géographiques et l'activité épidémio-climatique de la dirofilariose est faible à la fois pour le nombre de GDa { $R^2=0,293$; $F=1,862$; $p\text{-value}=0,097$ }, et pour la longueur de la saison de transmission { $R^2=0,28$; $F=1,748$; $p\text{-value}=0,121$ }.

3. Mise en place d'un modèle épidémio-climatique

Comme nous l'avons indiqué, la répartition des zones géographique en fonction du caractère géo-climatique ne représente pas suffisamment la description et la prédiction de la dirofilariose. Notamment lorsqu'il s'agit de la description d'une zone vaste, tel que le pays où l'impact climatique est amplement différent entre les différentes zones. Classiquement, on n'utilise les modèles prédictifs que pour la confirmation de la possibilité du développement ou non développement de la dirofilariose dans une zone et période déterminées, Sassnau et al en 2014 ont rassemblé un certain nombre de critères qui permettent de mieux décrire le comportement de la dirofilariose, à savoir :

- Date de l'infection du moustique ;
- Date de l'infection de l'hôte : identique à l'apparition des L3 chez le moustique ;
- Début/fin de la période d'incubation intrinsèque ;
- Date de la dernière infection : chez l'hôte et le vecteur ;
- Durée de repos épidémiologique ;

En Algérie la contamination du vecteur s'observe à partir de Mars/ Avril, dans le Nord Algérien, et demeure possible jusqu'au Septembre /Octobre. Tandis que l'infection des chiens est théoriquement possible un mois après l'infection du vecteur c'est-à-dire à partir d'Avril/Mai, et se termine en Octobre/Novembre. Dans les nouveaux foyers éventuellement créés l'apparition des réservoirs microfilarémiques (la première microfilarémie) s'observe entre Novembre et Mai, et correspond à la période de l'incubation intrinsèque chez le chien. Des différences entre zones et secteurs peuvent exister.

— Définition des nouveaux indicateurs

Parmi les objectifs de la présente étude, l'étude de l'impact climatique sur l'épidémiologie de la Dirofilariose, a nécessité la détermination de nouveaux facteurs tels que :

— Vitesse de Reproductibilité

Correspond à la durée moyenne nécessaire pour générer une GD au sein d'une saison de transmission, obtenue selon l'équation suivante : $(VR = P-Tr/N)$. Avec :

- VR : Vitesse de Reproductibilité ;
- P-Tr : durée de la période de transmission en semaine ;
- N : nombre de GDa ;

Ce qui permet de décrire l'activité vectrice du moustique.

— Nombre de microfilarémie

Généralement varie entre 0 et 1, relatif à la longueur de la saison de transmission, si elle dépasse 24 semaines on peut avoir une **néomicrofilarémie**. Ce nombre renseigne sur la vitesse de propagation de la dirofilariose, notamment en zones urbaines, où elle est principalement assurée par la capacité migratoire du moustique à partir du foyer.

— Nombre de néo-générations

Correspond au nombre de néo-générations de L3 chez le moustique, à partir de la 1^{ère} néomicrofilarémie, réservé uniquement aux zones à forte activité.

— Durée de vie de L3 chez le moustique

Correspond à la durée de vie extrinsèque des larves L3, à compter dès leur formation chez le vecteur jusqu'au moment de la mort de ce dernier, tenant en compte la vitesse de reproductibilité et la durée de vie du vecteur estimée à 30 jours.

$DvL3 = 30 - VR$, avec :

- DvL3 : Durée de vie extrinsèque de L3 chez le moustique ;
- 30 : 30 jours pour la durée moyenne de vie d'un moustique ;
- VR : Vitesse de reproductibilité ;

NB : L'ensemble de ces données a été utilisé pour décrire le comportement de la dirofilariose dans chaque zone, des neufs secteurs géographiques précédemment décrits.

4. Classification des zones

La division géographique du territoire ne peut pas être identique à celle apportée par un modèle prédictif de la dirofilariose, c'est la raison pour laquelle des cartes ont été élaborées à ces fins, mobilisant le GIS (Système d'Information Géographique), pour représenter l'activité de la dirofilariose par zones. Dans la présente étude, nous avons essayé d'évoquer cette description suite à une classification statistique des zones en fonction de leurs activités, pour ensuite les signaler sur la carte.

— Classification K-means suivie d'une CAH

La classification des zones géographique est réalisée selon le critère de l'activité de la dirofilariose, avec la possibilité de définir au préalable le nombre de classe souhaité. Nous avons déterminé le nombre pour les classes souhaitées, afin qu'on puisse confirmer l'incompatibilité du phénomène au sein de la Division précédente (Secteur Géo-climatique).

— Résultat de la classification de K-means

Cette classification est utilisée à double effet, le premier consiste à mettre en évidence la différence entre les deux types de division du territoire (Division Géo climatique, et Géo-Epidémiologique de la dirofilariose), car par cette technique statistique on peut déterminer le nombre de secteur qu'on cherche à obtenir, qui dans ce cas déterminé par 9, afin de comparer les deux division de neufs secteur chacune (Figure 6), le second intérêt est de faire suivre cette classification par une autre afin de créer des groupes aussi proches que possibles. Cette classification permet d'avoir les résultats du premier passage à partir de 45 zones vers 9 Classes.

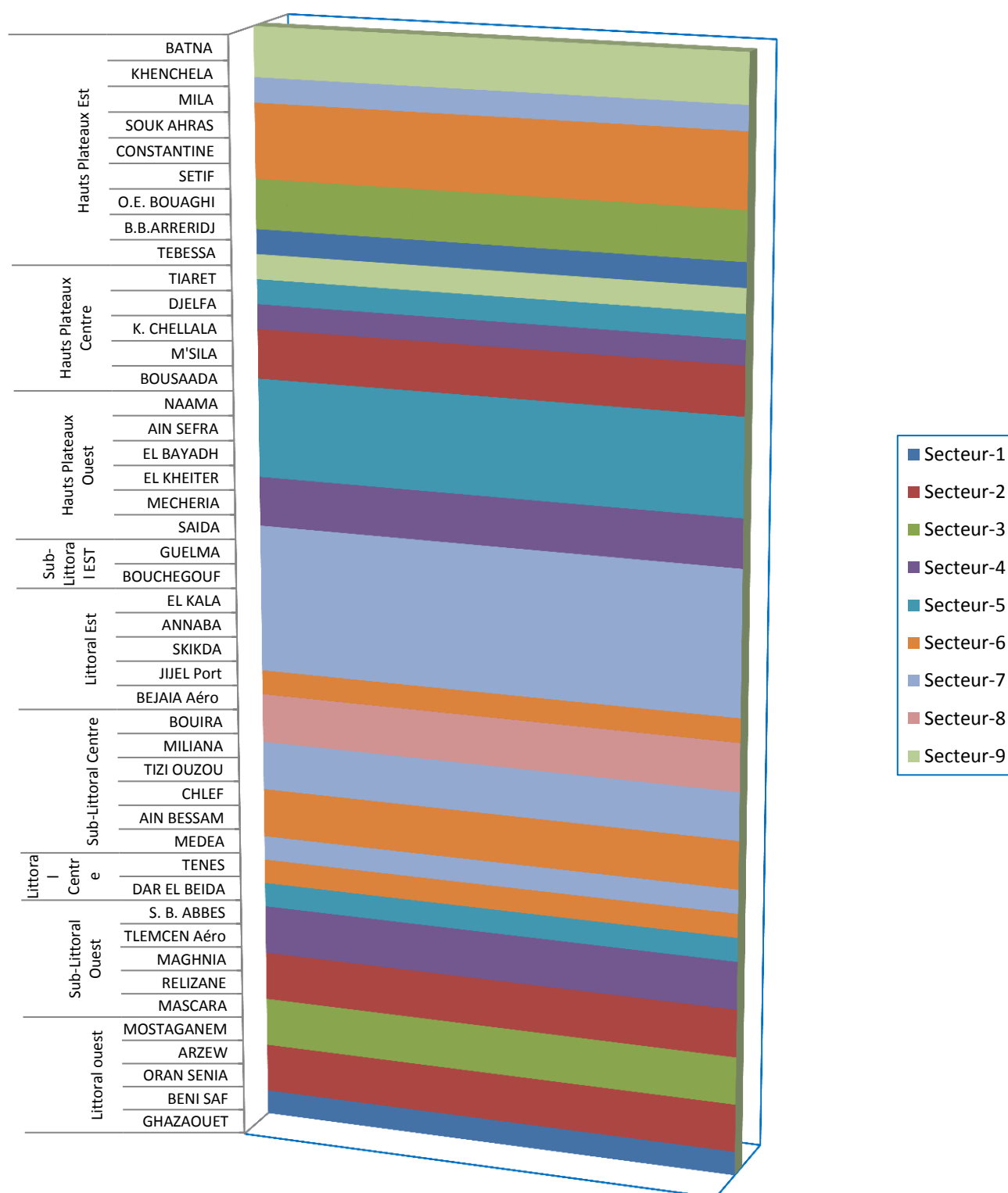


Figure 6: Comparaison des activités épidémioclimatiques de la dirofilariose au sein des secteurs géographiques (Classification K-means).

Tableau 7: Division territoriale via K-means au regard l'impact climatique sur la dirofilariose

Secteur	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Objets	5	5	10	7	3	1	4	3	7
Somme des poids	5	5	10	7	3	1	4	3	7
Variance intra-classe	1660,5	18301,2	644,641	2723,651	272,655	0,000	1028,669	5	3
Distance minimale au barycentre	10,8	85,138	1,234	5,800	3,736	0,000	5,343	2	9,251
Distance moyenne au barycentre	28,54	113,269	18,401	41,796	12,052	0,000	23,299	1	40,181
Distance maximale au barycentre	71,15	197,987	49,113	68,254	17,924	0,000	46,559	6	100,808
Distribution des zones géographiques	GHAZAOU ET	BENI SAF	ORAN SENIA	ARZEW	MOSTAGA NEM	MAGH NIA	S. B. ABBES	TENES	MEDEA
	AIN BESSAM	RELIZANE	TLEMCEAéro	MILIANA	EL KALA		CONSTANTINE	BOUSAA DA	TIARET
	SAIDA	CHLEF	MASCARA	SKIKDA	EL BAYADH		MILA	M'SILA	DJELFA
	B.B.ARRE RIDJ	TIZI OUZOU	DAR EL BEIDA	BOUCHEG OUF			KHENCHE LA		SETIF
	TEBESSA	AIN SEFRA	BOUIRA	GUELMA					O.E. BOUAGHI
			BEJAIA-Aéro	MECHERI A					BATNA
			JJEL Port	K. CHELLAL A					SOUK AHRAS
			ANNABA						
			EL KHEITER						
			NAAMA						

5.3. La classification ascendante hiérarchique (CAH)

Ces résultats, dont les barycentres sont utilisés en deuxième lieu par la **classification Ascendante Hiérarchique (CAH)**, pour aboutir à une répartition des 45 zones analysées, en utilisant la décomposition suivante des variances (Tableau8), on peut avoir quatre classes (Secteurs)à assez différentes les unes des autres, avec **91,6%** de la variance s'enregistre entre elles, en revanche, la variance est faible entre les zones d'une meme classe (Secteur), et ne représente que **8,4%** de la variance globale.

Tableau 8: Distribution de la variance entre les classes et les interclasses au sein de la CHA

	Absolu	Pourcentage
Intra-classe	34754,777	8,40%
Interclasses	379002,079	91,60%
Totale	413756,856	100,00%

Ces dendrogrammes permettent de voir comment le deuxième passage de 9 à 4 classes ou secteur a été effectué, la description en chiffre est fournie par le tableau 9.

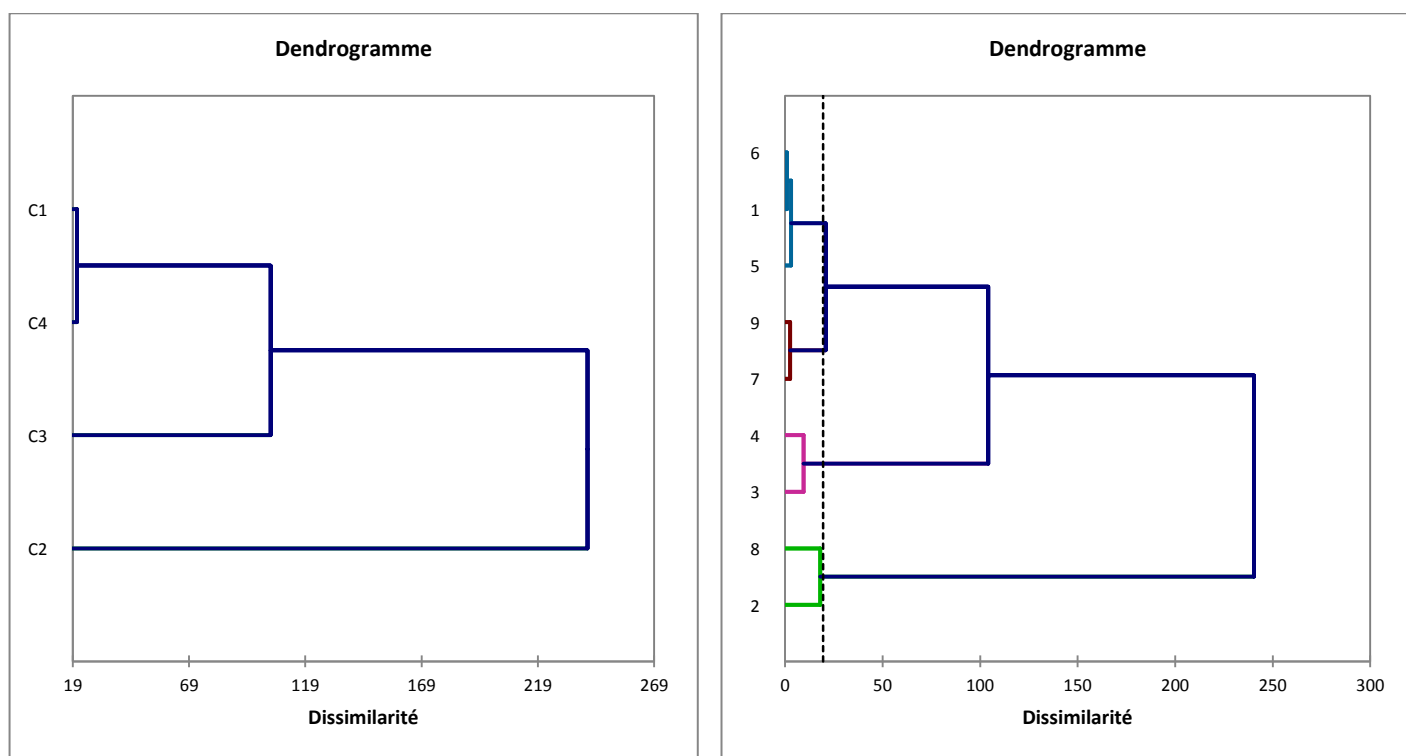


Figure 7: Dendrogrammes de Classification des Zones géographique en fonction de leurs activités.

- Les barycentres des différents paramètres montrent que le **Secteur-II** est le plus actif de tous les autres, caractérisé essentiellement par une intensité de 18,57 GD_{a-2015} (enregistrée au cours d'une saison de 26,88 semaines (201,6 jours), au sein de laquelle les générations de *Dirofilaria* se forment au bout de 1,45 semaine (10,86 jours) chez le vecteur conférant à ce dernier la possibilité de les inoculer tout au long d'une période de 2,55 semaine (19,125 jours), la présence d'un réservoir microfilarémique au sein des zones de ce Secteur sera responsable sur la création de deux nouveaux foyer annuels.
- En deuxième lieu se sont les zones du **Secteur-III**, caractérisée par 15,22 GD_{a-2015} et une saison de 24,12 semaines (180,9 jours) assurant la production d'une génération de *Dirofilaria* tous les 1,62 semaines (12,15 jours), et chaque génération peut être transmise sur une période de 2,38 semaine (17,85 jours) avant que le vecteur meurt. Au sein de ces zones, on peut enregistrer annuellement la création d'un seul foyer à partir d'un seul réservoir microfilarémique.
- En troisième lieu se sont les zones du **Secteur-I**, qui montrent une activité de 13,6 GD_{a-2015} étalées sur une période de 22,89 semaines (171,66 jours), avec un intervalle de 1,69 semaine (12,67 jours)

conférant une activité vectrice du moustique de 2,31 semaines (17,32 jours). Au sein de ces zones, on peut enregistrer annuellement la création d'un seul foyer à partir d'un seul réservoir microfilarémique.

En quatrième et dernier lieu, se trouvant les zones du **Secteur-IV**, le moins actif de tous les autres, caractérisé essentiellement par une intensité de 11,99 GD_{a-2015} et une saison de transmission de 20,09 semaines (150,66 jours), au sein de laquelle les générations de *Dirofilaria* nécessitent le plus de temps pour leur formation 1,71 semaine (12,83 jours) conférant de ce fait 2,29 semaines (17,18 jours) d'activité vectrice du vecteur. Tout comme les deux autres secteurs, on ne peut enregistrer qu'un seul foyer annuel à partir d'un seul réservoir microfilarémique, se trouvant dans l'une des zones de ce secteur.

Tableau 9: Description Epidémioclimatique obtenue par la CHA

	moyenn e UDDa	Nombre « GDa » cumulées (2013/14/1 5)	GDa 2015	Médiane "Nombre Semaines" de la P-Tr (2013/14/1 5)	Période de Transmissio n « P-Tr » 2015 "Semaine"	médiane des Périodes du repos épidémiologi que observées "2013/14/15"	Vitesse de reproductibili té	DvL 3	"Nombre de Néogénératio n de microfilaires "	Nbr de Neo- GD	"Vitesse de Propagation "
I	1699,5	39,22	13,60	22,11	22,89	25,89	1,69	2,31	0,33	0,00	1
II	2305,0	53,19	18,57	26,75	26,88	21,25	1,45	2,55	1,00	1,92	2
III	1890,2	43,62	15,22	24,12	24,59	23,88	1,62	2,38	0,82	0,36	1
IV	1511,7	34,89	11,99	20,09	20,46	27,91	1,71	2,29	0,00	0,00	1

5. Validation du modèle épidémioclimatique

Le modèle épidémioclimatique est une description statistique de l'activité de la dirofilariose, obtenu à partir d'une série de classification accompagnée de la transformation des données réelles en barycentres (moyennes). Pour le contrôle de la validité de cette procédure nous avons exploité les données du modèle mensuel continu précédemment validé, représentées essentiellement par les valeurs de GDa et la période de transmission afin de confirmer la validité de la division épidémioclimatique.

— Le nombre de génération de dirofilariose annuelle

Le modèle épidémioclimatique classe les zones géographiques en quatre secteurs en fonction de l'activité de la dirofilariose. Cette classification montre que :

- ❖ La division est dotée d'une territorialité à effet significatif, liée au nombre de génération de dirofilariose annuelle, validant la façon dont les secteurs sont générés, de sorte que **77% à 85%**, de la variabilité (R^2) entre les secteurs est expliquée par le nombre de GDa.
- ❖ Aucun secteur n'est identique à l'autre en fonction de ce paramètre ;

- ❖ La distance entre les secteurs est évaluée contre le secteur le moins actif (IV), des différences allant de 1,24 voire 1,61 jusqu'à 3,22 GDa, d'une manière significative $p\text{-value} < 0,05$;
- ❖ La division n'est pas influencée par le temps, et le tri des secteurs en fonction de l'intensité de l'activité reste toujours le même tout au long des années 2013, 2014 et 2015 ;

Tableau 10: Comparaison inter-secteurs au regard des GDa durant les trois dernières années

	Source	Constante	Secteur-secteur-I	Secteur-secteur-II	Secteur-secteur-III	Secteur-secteur-IV
2013	% zones	---	20	17,778	37,778	24,444
	Valeur	10,65	1,24	5,57	2,6	0
	t	33,3	2,6	11,31	6,33	---
	Pr > t	< 0,0001	0,0129	< 0,0001	< 0,0001	---
Paramètre du modèle	R ²			0,77		
	F			45,99		
	Pr > F			< 0,0001		
2014	Valeur	12,25	1,49	6,16	2,91	0
	t	45,27	3,68	14,77	8,39	---
	Pr > t	< 0,0001	0,0007	< 0,0001	< 0,0001	---
Paramètre du modèle	R ²			0,85		
	F			77,78		
	Pr > F			< 0,0001		
2015	Valeur	11,99	1,61	6,58	3,22	0
	t	39,8	3,58	14,17	8,34	---
	Pr > t	< 0,0001	0,0009	< 0,0001	< 0,0001	---
Paramètre du modèle	R ²			0,84		
	F			72,08		
	Pr > F			< 0,0001		

En effet la constance de cette caractérisation épidémioclimatique ne signe pas la stabilité de l'effet climatique, qui présente des fluctuations interannuelles pouvant être importantes, notamment l'année 2013 où nous avons enregistré une moyenne générale de **13,86 GDa** $\Leftrightarrow$ **1820,5 UDDa**, qui se montre significativement moins active par rapport aux deux autres années 2014 et 2015 où les valeurs étaient de **{15,49 GDa $\Leftrightarrow$ 2013,66 UDDa}** et **{15,46 GDa $\Leftrightarrow$ 2009,83 UDDa}** respectivement, révélant ainsi une identité de l'activité (tableau 11).

Tableau 11: Variation annuelles des GDa.

		Secteur-I	Secteur-II	Secteur-III	Secteur-IV
P-value associée au Z Variation intra-Secteur	2013-2014	< 0,0001	0,003	< 0,0001	< 0,0001
	2013-2015	< 0,0001	0,004	< 0,0001	< 0,0001
	2014-2015	0,466	0,961	0,795	0,115
P-value associée au t Variation inter-secteur	2013-2014		< 0,0001		
	2013-2015		0,0003		
	2014-2015		0,748		

— Durée de la période de transmission

La longueur de la saison de transmission est déterminée par le modèle Mensuel Ponctuel, et est prise en compte par la modèle proposé, quantifiée en semaine, est évaluée de la manière suivante

- Comparaison inter-secteur: étude unifactorielle (ANOVA à un seul facteur) ;
- Détermination de la variabilité annuelle : test t de Student pour échantillons (appariés) ;
- Evaluation du lien existant entre la répartition des zones et la période de transmission : régression linéaire ;
- Effet du changement climatique sur la période de transmission et les GDa : test Z pour comparaison des variances ;

— Comparaison inter-secteur de la période de transmission

La longueur de la saison constitue un bon critère de distinction entre les secteur épidémioclimatique, de sorte qu'aucun secteur n'est identique à l'autre, responsables de plus de 63% de variabilité entre ces derniers, et avec un écart de 6,55 semaines pour le Secteur-II et 4,25 semaines pour le secteur-III et 2,43 semaines pour le secteur-I, et ceux par rapport au secteur-IV en 2015.

Tableau 12: Comparaison entre les quatre Secteurs en fonction de la longueur de la saison de la transmission ; {Statistique Univariée « ANOVA »}

	Source	Constante	Secteur-secteur-I	Secteur-secteur-II	Secteur-secteur-III	Secteur-secteur-IV
2013	zones	---	20%	17,78%	37,78%	24,44%
	Valeur	19,091	1,354	4,909	2,262	0,000
	t	49,526	2,355	8,264	4,572	---
	Pr > t	< 0,0001	0,023	< 0,0001	< 0,0001	---
Paramètre du modèle	R ²	0,635				
	F	23,786				
	Pr > F	< 0,0001				
2014	Valeur	19,909	2,535	7,966	4,679	0,000
	t	49,109	4,195	12,750	8,993	---
	Pr > t	< 0,0001	0,000	< 0,0001	< 0,0001	---
Paramètre du modèle	R ²	0,814				
	F	59,862				
	Pr > F	< 0,0001				
2015	Valeur	20,455	2,434	6,545	4,251	0,000
	t	59,586	4,757	12,373	9,650	---
	Pr > t	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	---
Paramètre du modèle	R ²	0,810				
	F	58,143				
	Pr > F	< 0,0001				

6. Début/Fin de la période de transmission

Les bornes de la saison d'activité, sont aussi prises en compte et font partie des critères caractérisant les secteurs. Dans ce volet nous allons utiliser le calendrier 2015.

Le modèle mensuel continu offre la possibilité de calculer les UDDh (Hebdomadaire), et donc de déterminer la semaine du début et celle de la fin d'activité pour chaque zone. Ce n'est qu'à partir de la **troisième semaine du mois d'Avril**, que l'on peut observer l'activité dans certaines zones, dont les premières à apparaître sont MECHRIA dans le Secteur-III lui conférant **0,6%** d'activité ($t=0,580$; $p\text{-value}=0,565$). CHLEF, BOUSAADA et M'SILA, ce qui reflète **37,5%** d'activité dans le Secteur-II qui le distingue des autres Secteurs ($t=3,079$; $p\text{-value}=0,004$), en revanche cette activité explique **22,7%** de variabilité significative de l'activation des zones dans le Nord du pays ($R^2=0,407$; $F=9,386$; $p\text{-value}<0,0001$). Une semaine après (**quatrième semaine du mois d'Avril**) on constate l'activation de **75%** des zones dans le Secteur-II ($t=4,841$; $p\text{-value}<0,0001$), et dans seulement **23,52%** du Secteur-III qui demeure statistiquement inactif ($t=1,824$; $p\text{-value}=0,076$), sans aucune activité dans les deux autres Secteurs, de ce fait **41,39%** de variabilité liée à l'activation des zones dans le nord du pays est expliquée ($R^2=0,414$; $F=9,650$; $p\text{-value}<0,0001$). Mais en début de Mai « **première semaine** » une franche activité est observée dans le Secteur-II (**100%** ; $t=5,786$; $p\text{-value}<0,0001$), et le Secteur-III (**41,18%** ; $t=2,861$; $p\text{-value}=0,007$). Sans aucune activité du Secteur-IV, et seulement 2 zones actives (SAIDA et MOSTAGHANEM) soit **22,22%** dans le Secteur-I ($t=1,329$; $p\text{-value}=0,191$). Expliquant **46,37%** de variabilité liée à l'activation des zones géographiques dans le nord du pays ($R^2=0,464$; $F=11,815$; $p\text{-value}<0,0001$). Pendant la **deuxième semaine du mois de Mai** **66,7%** de zones sont actives ($t=3,358$; $p\text{-value}=0,002$) pour le Secteur-I, et **100%** ($t=5,128$; $p\text{-value}<0,0001$) dans le Secteur-II, et **76,5%** ($t=4,564$; $p\text{-value}<0,0001$) pour le Secteur-III, et seul SIDI-Belabbas qui présente à cette date une possibilité de transmission de la dirofilariose dans le Secteur-IV. Avec ($R^2=0,436$; $F=10,557$; $p\text{-value}<0,0001$). La **troisième semaine de ce mois** correspond à la phase plateaux où l'activité est à **100%** pour les trois Secteurs (I, II, et III) $\{t = [5,496 ; 6,6] ; p\text{-values}<0,0001\}$. A cette date MEDEA, TIARET, DJELFA sont actives à côté de SIDI B-ABBAS, ce qui signifie **36,37%**, avec effet significatif ($Z=1,964$; $p\text{-value}=0,05$). La variabilité globale liée à l'activation des zones demeure significative ($R^2=0,569$; $F=18,07$; $p\text{-value}<0,0001$). Mais à partir de la **quatrième semaine du mois de mai**, on note la phase plateaux pour tous les Secteurs.

Parallèlement la transmission de la dirofilariose s'atténue progressivement, mais inversement à son activation, sur une période de cinq semaines. C'est à partir de la **troisième semaine du mois d'Octobre** qu'on commence à enregistrer une baisse d'activité, qui continue progressivement jusqu'à

la troisième semaine du mois de Novembre, pour disparaître complètement à partir de *la quatrième semaine de ce mois*.

La première extinction touche seulement SETIF, DJELFA, et MEDEA ; zones du Secteur-IV, accompagnée d'une baisse d'activité de 72,73%, sans aucune influence sur l'activité dans ce Secteur qui demeure toujours significative ($Z=5,164$; $p\text{-value}<0,0001$), mais le rend distinct du secteur-I ($t=2,630$; $p\text{-value}=0,012$), et du Secteur-II ($t=2,544$; $p\text{-value}=0,015$), et également du Secteur-III ($t=3,055$; $p\text{-value}=0,004$). Ce 22,08% de variabilité entre les Secteurs en fonction de l'atténuation de transmission de la dirofilariose, ($R^2=0,221$; $F=3,872$; $p\text{-value}=0,016$). A la fin du mois d'Octobre « *quatrième semaine* », l'extension de l'extinction des zones affecte $\frac{3}{4}$ des Secteurs, qui commencent à présenter des zones hors activité, de sorte que 41,78% de variabilité significative entre ces derniers sera expliquée par cette diminution d'activité ($R^2=0,418$; $F=9,809$; $p\text{-value}<0,0001$). Mais c'est le Secteur-IV qui est amplement éteint et la transmission théorique de la dirofilariose n'est observée qu'à SIDI B-ABBES ; MILA et SOUK AHRAS, soit 27,27%, et l'activité perd son effet ($Z=1,960$; $p\text{-value}=0,053$), et une différence significative avec les autres secteurs, qui sont encore actifs, dont la comparaison donne $\{t=2,479$; $p\text{-value}=0,017\}$ avec le Secteur-I qui présente 66,67% de zones actives, et $\{t = 4,428$; $4,887$; $p\text{-values}<0,0001\}$ avec les Secteurs-II et III qui présentent respectivement 100 et 94,12% de zones actives. 100% d'inactivité sont atteintes à partir de *la première semaine du mois de Novembre* pour le Secteur-IV, et dans toutes les zones du Secteur-I à l'exception d'EL GHAZAOUET et MOSTAGHANEM qui représentent 22,22% sans effet indicatif de cette activité par rapport au secteur ($Z=1$; $p\text{-value}=0,317$), ni différence significative entre ces deux secteurs ($t=1,297$; $p\text{-value}=0,201$). Par contre les deux autres Secteurs diffèrent du Secteur-IV $\{t = 4,939$; $4,785$; $p\text{-values}<0,0001\}$, et abritent toujours la transmission de la dirofilariose dans 87,5% de zones dans le secteur-II ($Z=7,00$; $p\text{-value}<0,0001$), et dans 70,59% des zones du Secteur-III ($Z=6,197$; $p\text{-value}<0,0001$). Globalement 46,47% de zone active dans le nord du pays, ce qui confirme le risque de transmission de la dirofilariose ($t=6,206$; $p\text{-value}<0,0001$), et on constate que 46,79% de variabilité entre les Secteurs en fonction de leur activité ($R^2=0,468$; $F=12,016$; $p\text{-value}=0,0001$). Une semaine après, le Nord du pays ne présente que 28,89% de zones actives ($t=4,228$; $p\text{-value}<0,0001$), soit 13 zones ($R^2=0,256$; $F=4,693$; $p\text{-value}=0,007$), réparties principalement entre les Secteurs II et III dont l'activité est significativement différente du 0% (comparé avec le Secteur-IV), on note $\{t = 3,283$; $p\text{-values}=0,002\}$ avec le Secteur-II, dont les zones actives sont estimées à 62,5%, et de 41,18% dans le Secteur-III, qui, comparé avec le Secteur-IV ''0,000%'' montre une différence $\{t = 2,597$; $p\text{-values}=0,013\}$. A cette période de l'année la transmission de la dirofilariose ne peut être observée que dans les zones d'EL GHAZAOUET du Secteur-I, qui s'est inactivé la première semaine. La période de transmission se termine brusquement ($t=1,773$; $p\text{-value}=0,080$), à partir de *la troisième semaine du mois de Novembre*, et le début de la

période du repos épidémiologique commence dans le Nord du pays, on trouve 6,67% de zones actives (TENES, BENISAF dans le Secteur-II ; SKIKDA dans le Secteur-III), ce qui représente respectivement 25% ($Z=1,528$; $p\text{-value}=0,127$) et 5,88% ($Z=1$; $p\text{-value}=0,317$) . Au-delà de la troisième semaine aucune activité n'est enregistrée.

Globalement l'activité commence significativement à partir de :

- 3^{ème} semaine d'Avril dans le Secteur-II avec 37,5% de zones actives ;
- 1^{ère} semaine du mois de Mai dans le secteur-III avec 41,18% de zones actives ;
- 2^{ème} semaine du mois de Mai dans le secteur-I avec 66,7% de zones actives ;
- 3^{ème} semaine du mois de Mai dans le secteur-IV avec 36,37% de zones actives ;

L'Arrêt de l'activité devient significatif à partir de :

- 4^{ème} semaine du mois d'Octobre dans le secteur-IV avec seulement 27,27% de zones en activité ;
- 1^{ère} semaine du mois de Novembre dans le secteur-I avec seulement 22,22% de zones en activité ;
- 3^{ème} semaine du mois de Novembre dans le secteur-III avec seulement 5,88% de zones en activité ;
- 3^{ème} semaine du mois de Novembre dans le secteur-II avec seulement 25% de zones en activité ;

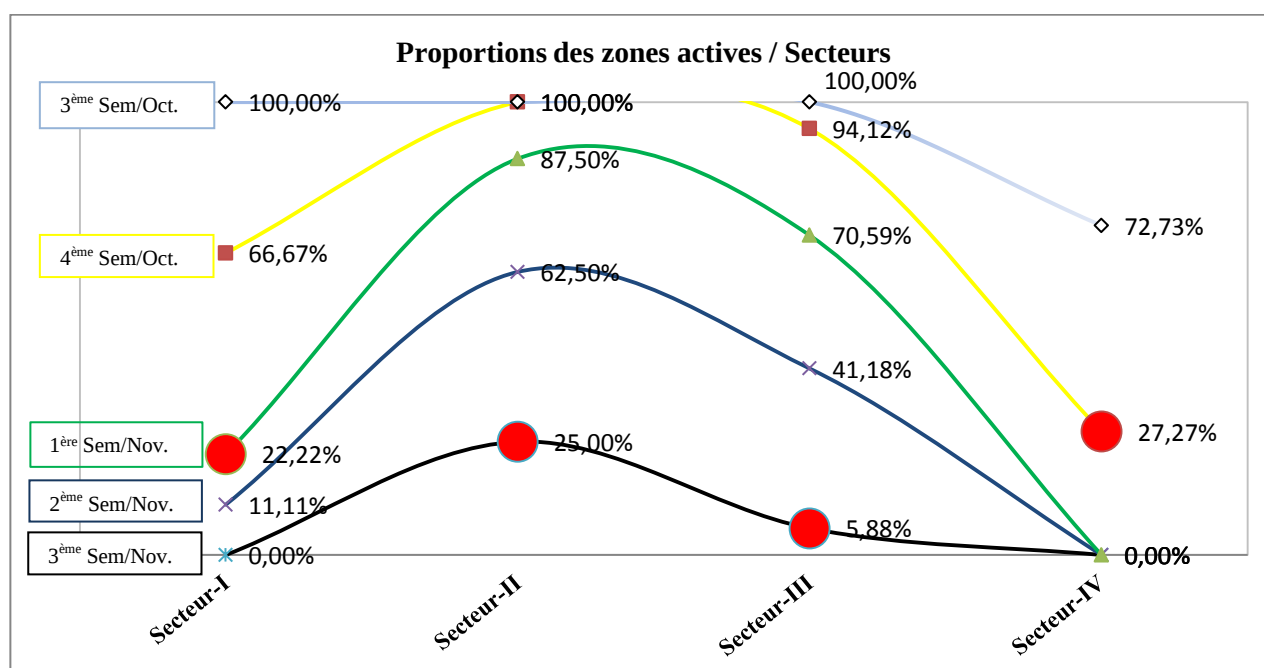
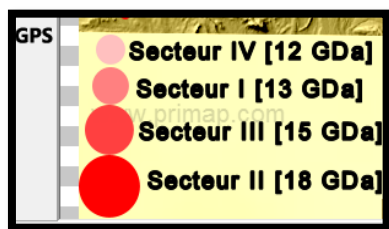


Figure 8: Proportion des zones en activité par Secteur correspondant à l'extinction de la période de transmission "Evaluation Hebdomadaire"/Bulles rouges : Extinction des secteurs épidémio-climatiques.



La division territoriale selon le modèle Epidémio-Climatique.
La dimension des points est en relation directe avec l'intensité de l'activité de la dirofilariose dans la région, et la couleur reflète le Secteur.

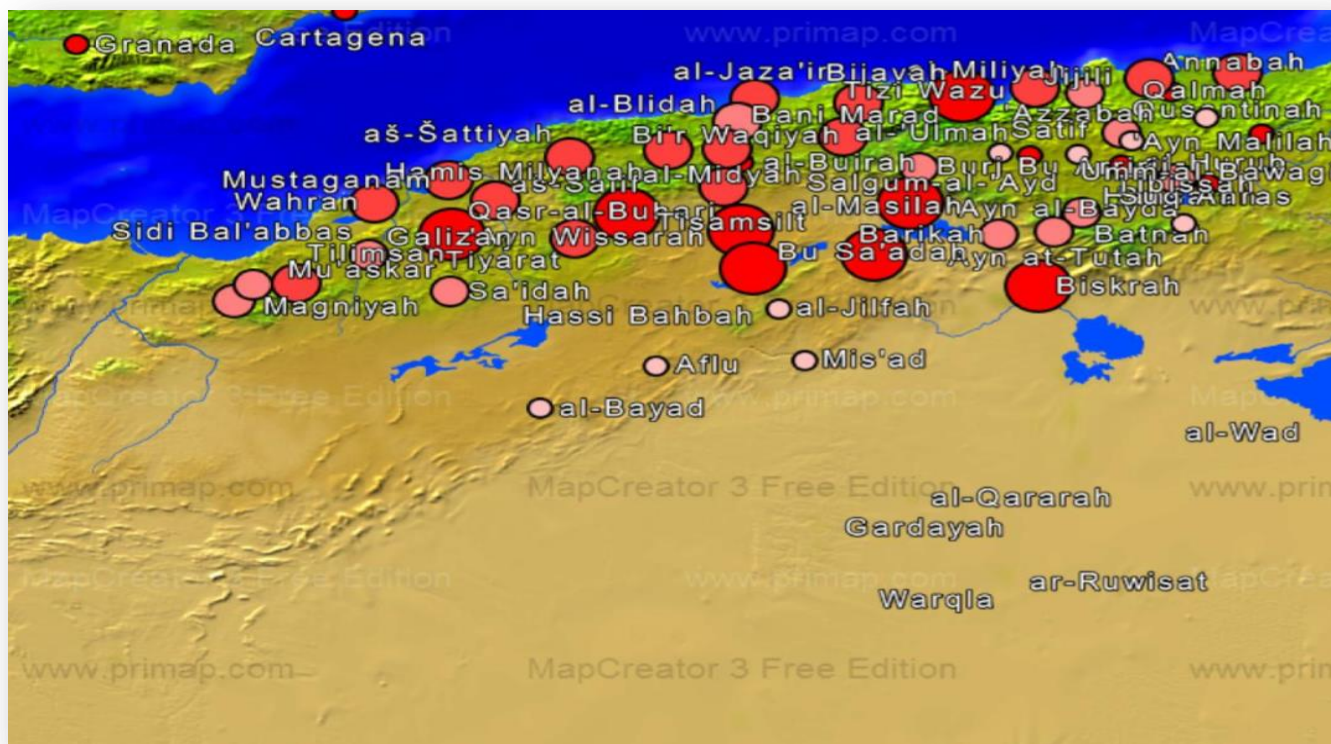


Figure 9: Carte de repartitions des Quatre secteurs Epidémio-climatique sur le Nord du pays
Map-Creator, Copyright ©2003-2015, preamp; Algeria vegetation-Map's. Original 2017.

7. Exploitation du modèle epidémio-climatique

L'objectif crucial de tous les modèles prédictifs est de contrôler la propagation de la maladie. Le contrôle de la dirofilariose a été bien détaillé par Sassnau et collaborateurs en 2014, en optimisant la stratégie de lutte contre les dirofilariose canine via la détermination de :

- Diagnostic ou dépistage primaire ;
- Prévention de l'infection chez le vecteur ;
- Prévention de l'infection chez l'hôte vertébré ;

La présente étude a exploité les résultats du modèle épidémio-climatique dans l'élaboration des carte de risque (Heat maps, figure 11 à 15), avec détermination des ponctualités liées au développement parasitaire chez ses hôtes.

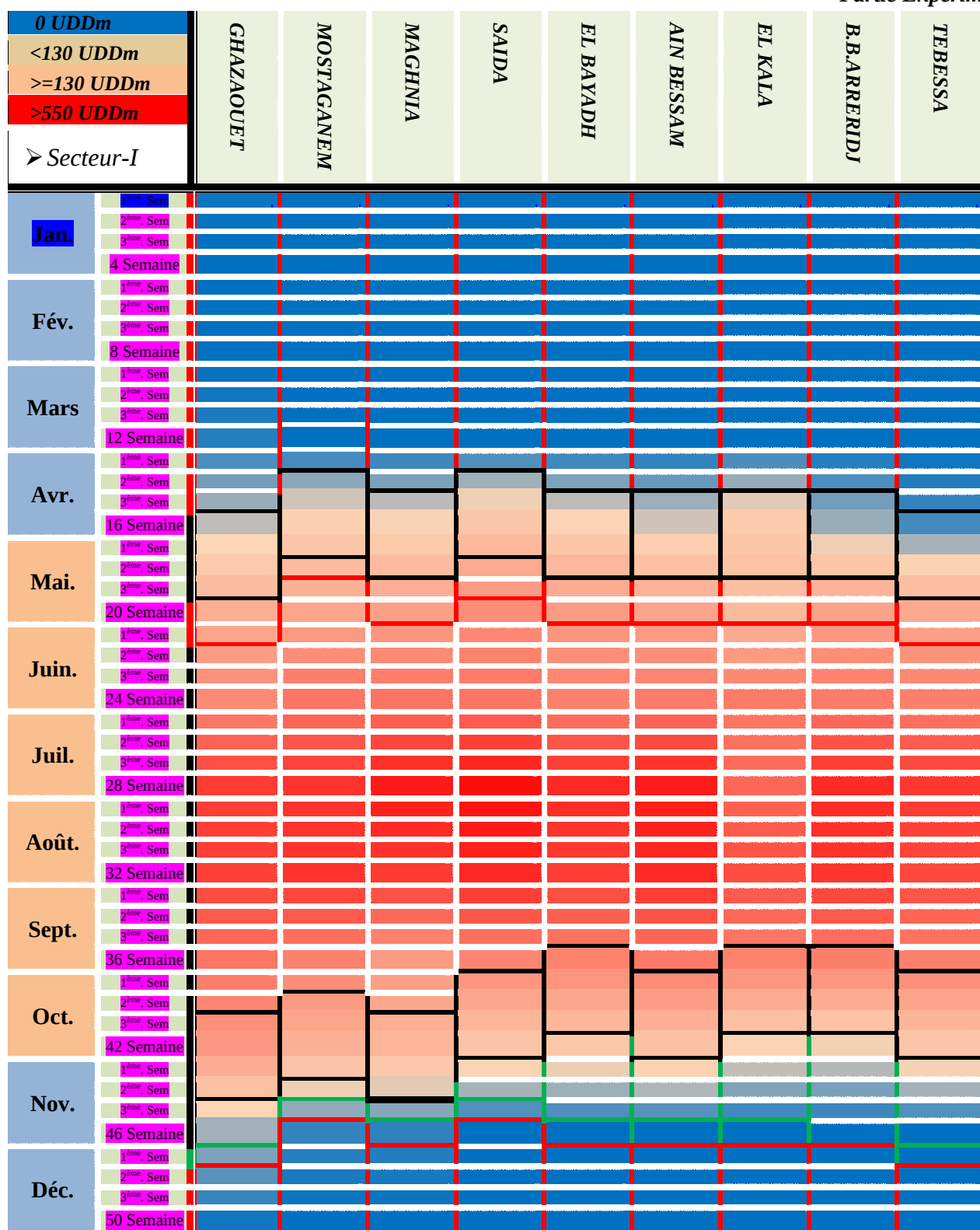


Figure 10: Carte à *échelle Froid/Chaud* de Prévision, fondée à partir du modèle épidémioclimatique. Evaluation de l'intensité de la transmission de la dirofilariose dans les différentes zones géographiques du **Secteur-I** {**Rectangles Noirs** : Correspondent à la première et la dernière incubation extrinsèque dont la première et la dernière semaine de chacune d'elles correspondent à l'infection du vecteur et de l'hôte respectivement...../ **Rectangles Rouges** : Correspondent à la période d'incidence microfilariémique...../ **Rectangles Verts** : Correspondent à la période du repos épidémiologique. ± 2 semaines}.

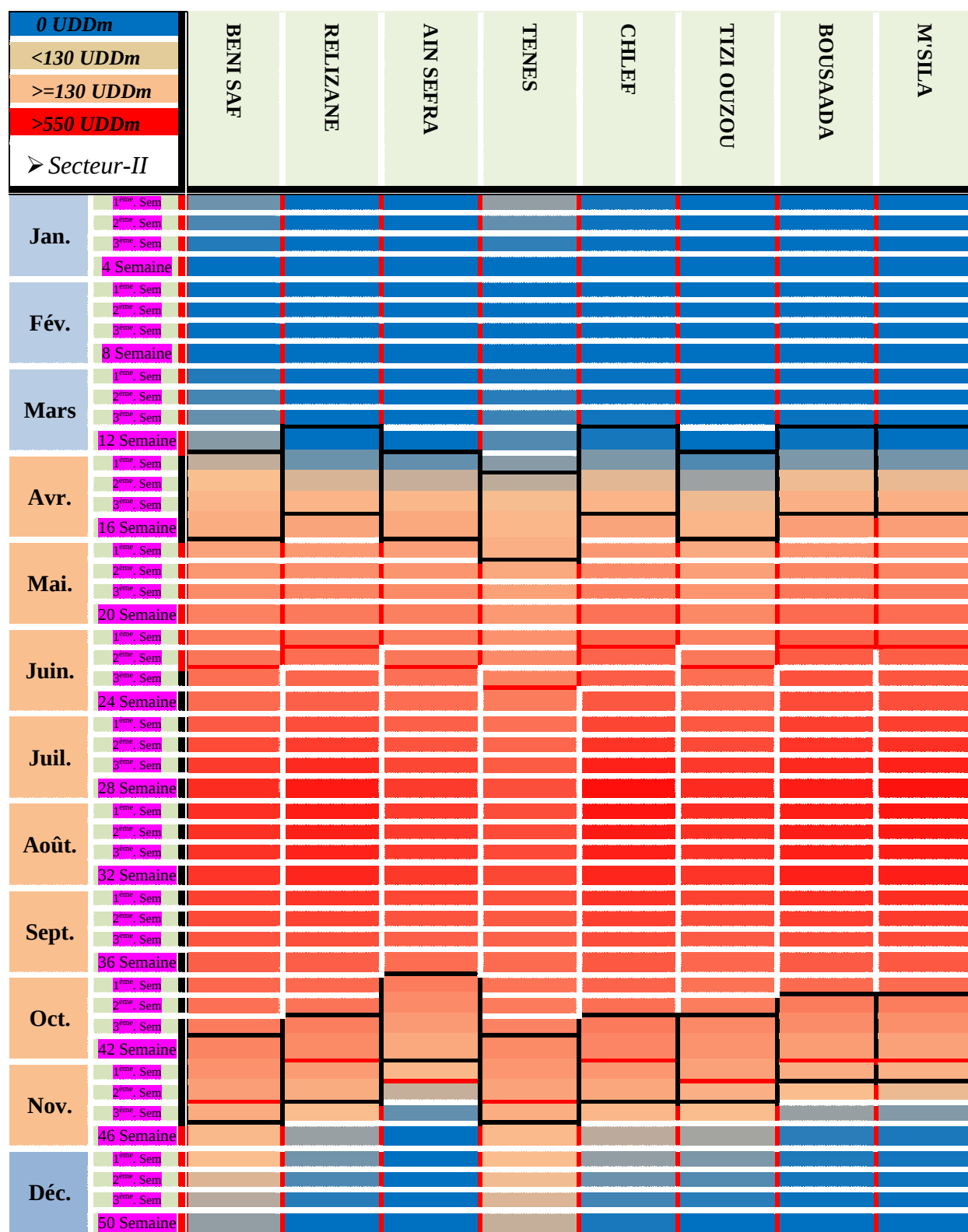


Figure 11: Carte à échelle *Froid/Chaud* de Prévision, fondée à partir du modèle épidémioclimatique. Evaluation de l'intensité de la transmission de la dirofilariose dans les différentes zones géographiques du **Secteur-II** {**Rectangles Noirs** : Correspondent à la première et la dernière incubation extrinsèque dont la première et la dernière semaine de chacune d'elles correspondent à l'infection du vecteur et de l'hôte respectivement...../ **Rectangles Rouges** : Correspondent à la période d'incidence microfilarémique...../ **Rectangles Verts** : Correspondent à la période du repos épidémiologique. ± 2 semaines}

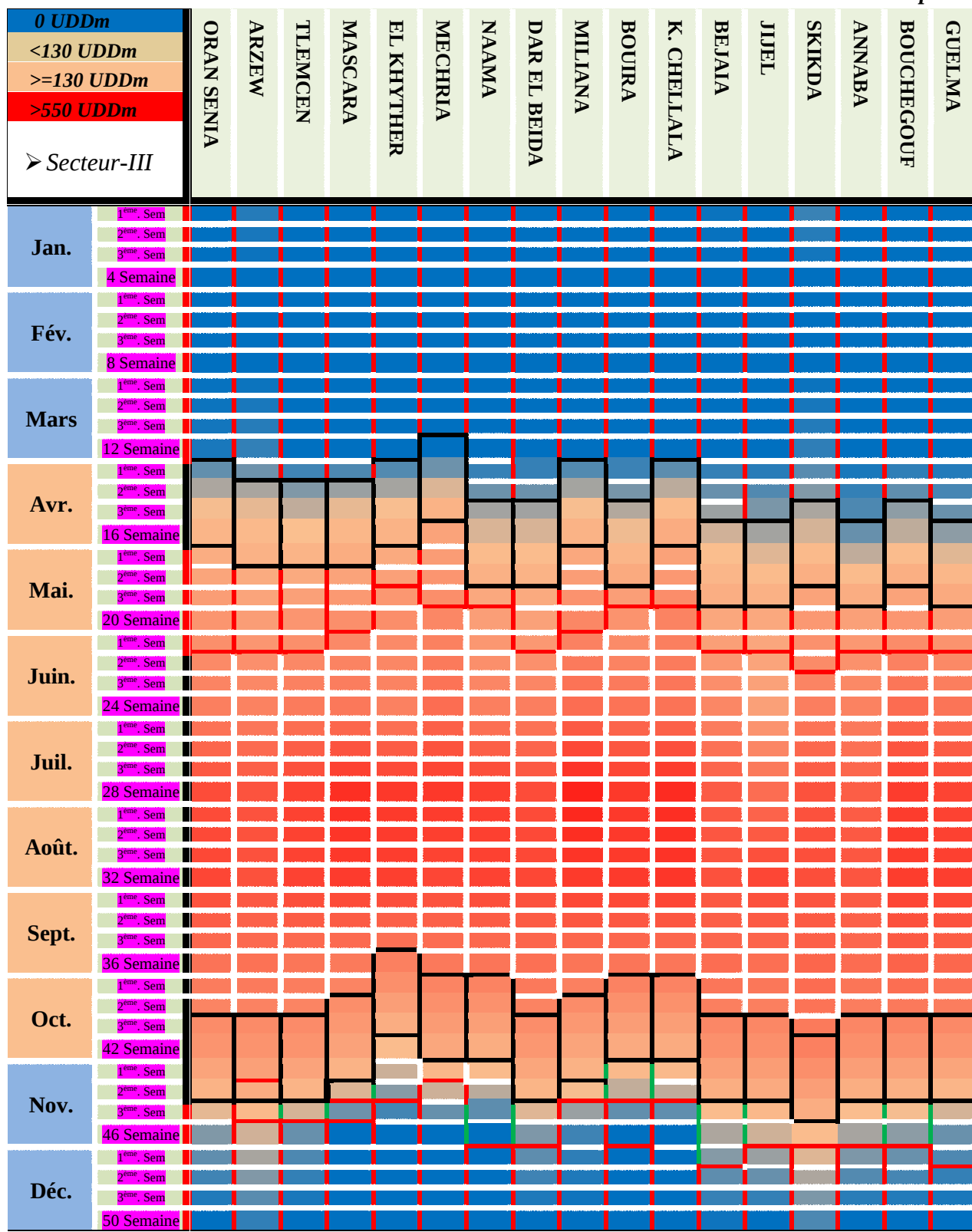


Figure 12: Carte à *échelle Froid/Chaud* de Prévision, fondée à partir du modèle épidémioclimatique. Evaluation de l'intensité de la transmission de la dirofilariose dans les différentes zones géographiques du **Secteur-III** {**Rectangles Noirs** : Correspondent à la première et la dernière incubation extrinsèque dont la première et la dernière semaine de chacune d'elles correspondent à l'infection du vecteur et de l'hôte respectivement...../ **Rectangles Rouges** : Correspondent à la période d'incidence microfilariémique...../ **Rectangles Vertes** : Correspondent à la période du repos épidémiologique. ± 2 semaines}

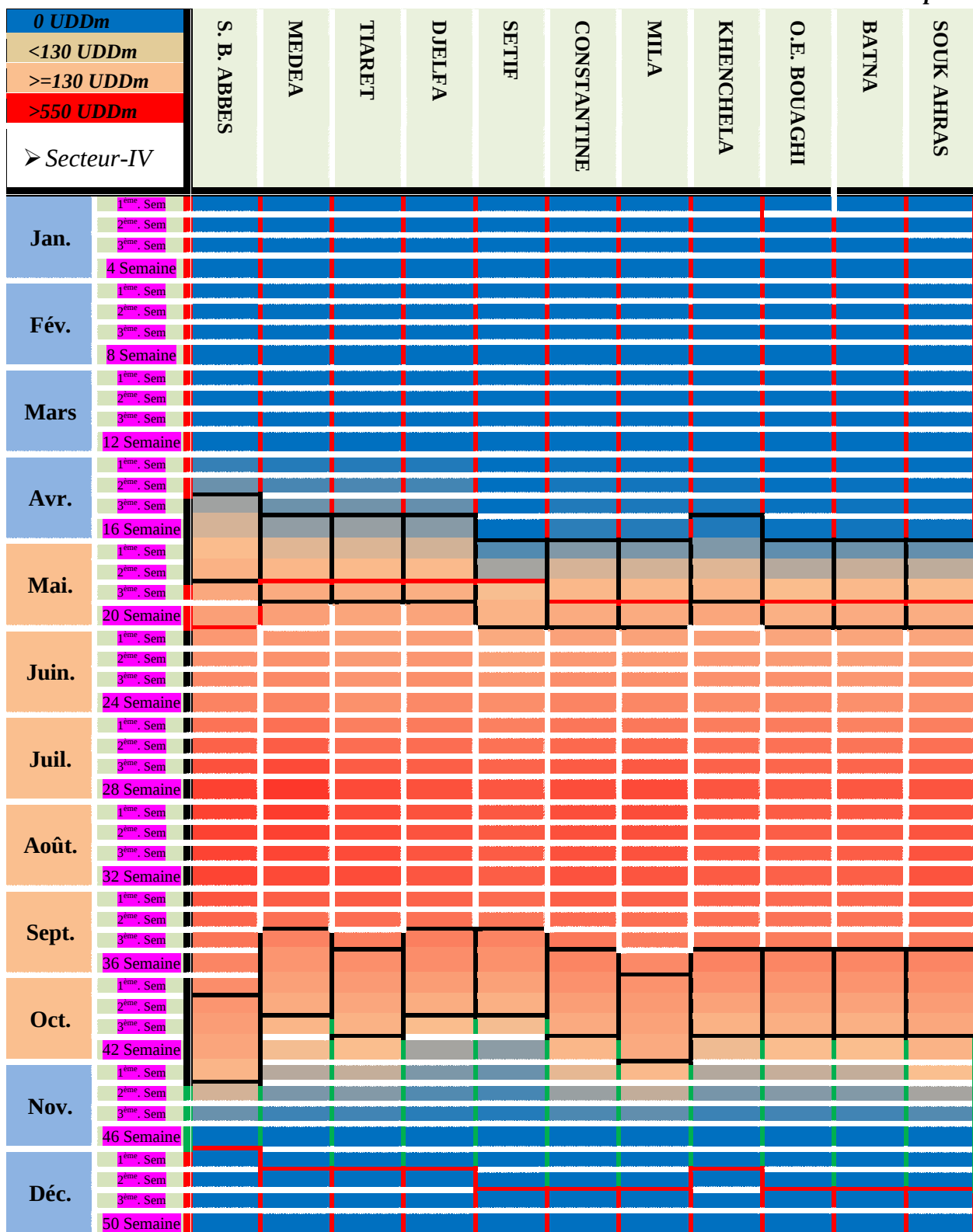


Figure 13: Carte à *échelle Froid/Chaud* de Prévision. Fondée à partir du modèle épidémioclimatique. Evaluation de l'intensité de la transmission de la dirofilariose dans les différentes zones géographiques du **Secteur-IV** {**Cases Noires** : Correspondent à la première et la dernière incubation extrinsèque dont la première et la dernière semaine de chacune d'elles correspondent à l'infection du vecteur et de l'hôte respectivement...../ **Cases Rouges** : Correspondent à la période d'incidence microfilariémique...../ **Cases Vertes** : Correspondent à la période du repos épidémiologique . ± 2 semaines}.

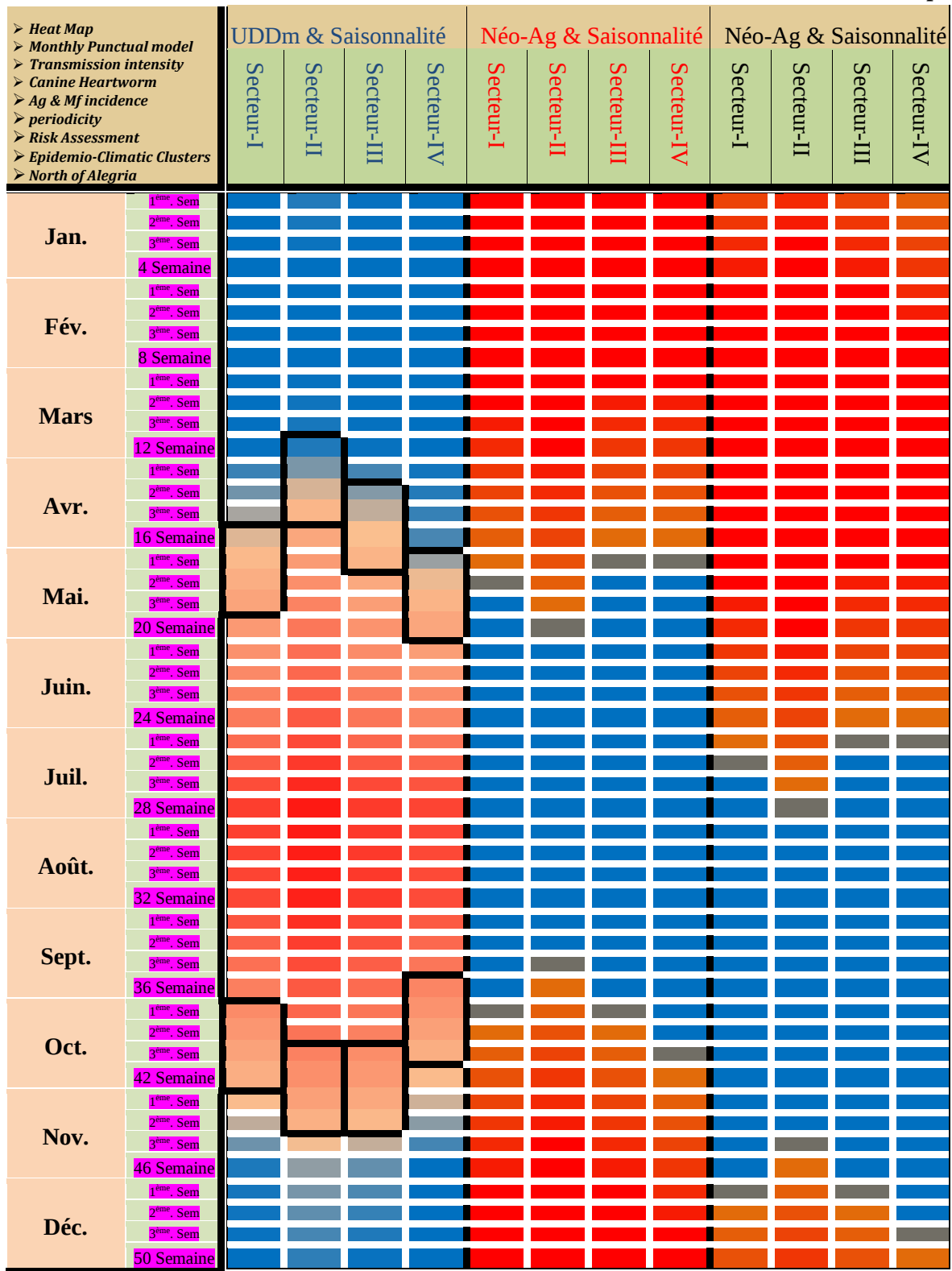


Figure 14: Carte à *échelle Froid/Chaud* de Prévision. Fondée à partir du modèle épidémio-climatique. Evaluation de l'intensité de la transmission de la dirofilariose dans les différents Secteurs épidémio-climatique du Nord Algérien. {**Rectangles Noirs** : Correspondent à la première et la dernière incubation extrinsèque dont la première et la dernière semaine de chacune d'elles correspondent à l'infection du vecteur et de l'hôte respectivement}. Les deux autres colonnes correspondent à la prédiction des nouvelles incidences « Microfilarémie et Ag { ± 2 semaines} ».

Etude Sérologique de la Dirofilariose Cardiopulmonaire Canine

2. ETUDE SEROLOGIQUE DE LA DIROFILARIOSE CARDIOPULMONAIRE CANINE

Problématique et objectifs

En Algérie, la dirofilariose a fait l'objet de très peu d'études et ce malgré que les conditions à son développement et sa recrudescence sont particulièrement réunies (climat, pullulation des vecteurs, chiens errants, mode de vie des chiens, absence des mesures préventive, etc.). Une prévalence de *D. immitis* de 24,46% a été ainsi rapportée pour la région d'Alger en 2009 [Ben-Mahdi & Madani, 2009].

L'objectif de la présente étude a été de déterminer cette prévalence au niveau de deux régions de l'intérieur du pays : Bouira et Sétif.

Ces deux wilayas ont été retenues sur la base des critères suivants :

- Les deux wilayas couvrent deux secteurs géo-climatiques différents : le secteur sublittoral centre et le secteur des hauts plateaux Est et trois secteurs Diro-Epidémio-Climatiques. Ce qui englobe les ¾ de la variabilité climatique modulatrice de la dirofilariose dans le nord du pays (*Secteur I, III, IV*) ;
- L'absence de données épidémiologiques relative à la dirofilariose pour les deux wilayas ;
- La wilaya de Bouira partage les mêmes conditions épidémiologiques que celles d'Alger ;
- La coopération des praticiens vétérinaires des deux wilayas.

1.1. Matériels & Méthodes

1.2. Indicateurs épidémiologiques

1.2.1. Zones d'étude

1.2.1.1. Bouira

La wilaya de Bouira occupe une superficie de 4 439 km² avec 12 Daïras et 45 Communes, elle est bordée par les chaînes montagneuses du Djurdjura et des Bibans, elle est délimitée :

- au nord par les deux wilayas de Boumerdes et de Tizi Ouzou ;
- à l'est par les deux wilayas de Bejaïa et de Bordj Bou Arreridj ;
- au sud par la wilaya de M'sila ;
- à l'ouest par les deux wilayas de Blida et de Médéa (Figure 20).



Figure 15: Carte géo-climatique de la wilaya de Bouira : Situation et Relief.

1.2.1.1.1. Relief

Il est contrasté et comporte cinq grands ensembles physiques :

- La dépression centrale (plaines des Aribes, plateau d'El Asnam, la vallée de Ouadhous et Oued Sahel) ;
- La terminaison orientale de l'Atlas Blidéen ;
- Le versant sud du Djurdjura (nord de la wilaya) ;
- La chaîne des Bibans et les hauts reliefs du sud ;
- La dépression sud des Bibans.

La zone boisée représente 25 % du territoire avec 111 490 ha de massif forestier, dans lequel sont retrouvés : le pin d'Alep, le chêne vert ainsi que le chêne-liège et le cèdre de l'atlas (sud du Djurdjura).

1.2.1.1.2. Climat

Le climat est chaud et sec en été, froid et pluvieux en hiver. La pluviométrie moyenne est de 660 mm/an au nord et de 400 mm/an dans la partie sud. Les températures varient entre 20 et 40 °C de mai à septembre et de 2 à 12 °C de janvier à mars.

1.2.1.2. Sétif

La wilaya de Sétif occupe une superficie de 6 504 km² avec 20 Daïras et 60 Communes, elle est située au nord-est de l'Algérie, limitée :

- Au Nord par les wilayas de Bejaia et Jijel ;
- A l'Est par la wilaya de Mila ;
- Au Sud par les wilayas de Batna et Msila ;
- A l'Ouest par la wilaya de Bordj Bou Arréridj.



Figure 16: Carte géo-climatique de la wilaya de Sétif : situation et relief.

1.2.1.2.1. Relief

Sétif est une wilaya de hautes terres où 3 zones peuvent être distinguées :

- ✓ La zone montagneuse : au Nord représentée par la chaîne des Babors avec 2004 m d'altitude.
- ✓ Les hautes Plaines : occupent la région centrale de la wilaya dont l'altitude varie entre 800 et 1300 m.
- ✓ Lisière de Sud Sétifien : renfermant des cuvettes ou dorment les Chott « Chott El-Baida, Chott El-Frein, Chott El-Melloul près de Guellal ».

1.2.1.2.2. Climat

Le climat est continental avec des étés chauds et secs et des hivers rudes. Le mois le plus pluvieux est avril et le plus sec est celui de juillet. Les pluies sont insuffisantes et irrégulières à la fois dans le temps et dans l'espace ; si les monts de Babor sont les plus arrosés en recevant 700 mm par an, la quantité diminue sensiblement pour atteindre 400 mm en moyenne par an sur les hautes plaines par contre la zone Sud –Sud-Est est la moins arrosée, les précipitations ne dépassent pas les 300 mm.

1.2.2. Période d'étude

L'enquête sérologique transversale s'est déroulée sur une période de 6 mois, de début mars jusqu'à début septembre 2016.

1.2.3. Définition du « cas »

Dans la présente enquête, on entend par cas tout chien atteint de dirofilariose (positif en ELISA).

1.2.4. Unité et Population d'étude

L'unité ou sujet « animal » a été retenu comme unité démographique et non pas un groupe d'animaux dans la mesure où il s'agit de chiens généralement non regroupés.

Un critère d'exclusion (âge) a été introduit : les jeunes chiens âgés de moins de six mois ont été exclus, puisque la première apparition des antigènes parasitaires dans le sang nécessite au moins cinq à six mois. Hormis ce critère, les unités ont été sélectionnées d'une manière aléatoire (population mère constituée de tous les chiens de la région d'étude).

1.3. Echantillonnage

La population canine n'étant pas recensée, nous nous sommes orientés vers l'utilisation d'un échantillon aléatoire à deux degrés, qui demeure selon Toma (2001), la méthode idéale dans ces conditions.

1.3.1. Calcul du nombre nécessaire d'unités

L'échantillonnage a été réalisé de manière aléatoire simple à deux degrés :

- **Premier degré** : Les zones d'études des deux wilayas ont été tirées au sort et l'unité est représentée par la commune.
- **Deuxième degré** : Les animaux (Sujets) prélevés ont été tirés au sort, au sein de chaque commune choisie.

Par conséquent le nombre de communes correspond aux **unités primaires** (nombre : **n**), les animaux (sujets) correspondent aux **nombres secondaires** par unité primaire (nombre : **m**), et le nombre total sera le résultat de la multiplication de **n** par **m**.

1.3.1.1. Premier degré

Une base de sondage regroupant toutes les communes (45 communes pour Bouira et 60 pour Sétif) de la zone d'étude a été constituée à partir du découpage administratif de la wilaya [Loi n° 84-09 du 4 février 1984].

Un taux de sondage de 10% a été retenu pour estimer le nombre de communes à prélever dans chacune des deux strates. La sélection des communes a été réalisée « au hasard ».

Le nombre de communes sélectionnées était de 5 pour Bouira et 6 pour Sétif.

1.3.1.2. Deuxième degré

Le deuxième degré concerne le nombre d'animaux prélevés par commune, obtenu selon la méthode d'échantillonnage stratifié décrite par Toma (2001) (tableau 15), dont les calculs ont été validés par le Logiciel *[epiinfo™ Version 7.2.1.0. 2016, CDC]*.

Tableau 13: Paramétrage de l'échantillonnage stratifié, selon Toma (2001) et données disponibles.

	Désignation	Source	Résultat
Prévalence attendue	Pa	[Ben Mahdi et al 2009]	24,46
Précision relative	Pr	Estimation,	40%
Taille de l'échantillon aléatoire simple	n'	Table d'estimation dans une population infinie	73
Nombre d'unités primaires	n	10%	11
Nombre d'unités secondaires par unité primaire	m'	n'/n	6
Coefficient intra-classe	p	Estimation	0,15
Coefficient d'inflation	CI	$1 + (p * m')$	1,9
Nombre d'unités secondaires à tirer par unité primaire	m	$(CI * n')/m$	12 à 13
Nombre total de sujets à tirer	n*m	CI * n'	139
Nombre total d'unités secondaires à tirer par Wilaya	Bouira	$(m * n_{Bouira})$	63
	Sétif	$(m * n_{Sétif})$	75

En pratique, les nombreuses contraintes rencontrées telles que la perte des échantillons liée à l'hémolyse, le manque de coopération des propriétaires de chien, le nombre de tests ELISA à notre disposition, ont conduit à l'ajustement du nombre d'unités secondaires à 140 soit 70 par Wilaya. Et entre dix et quinze chiens par commune.

L'étalement de cet échantillon au sein de la division épidémio-climatique, a permis de couvrir $\frac{3}{4}$ des secteurs retrouvés dans le nord du pays, il s'agit de :

- **Secteur-I** : représenté principalement par l'ensemble des zones géographiques décrites par la station météorologique d'Ain-Bessam, avec 56 sujets prélevés sur un ensemble de quatre communes ;
- **Secteur-III** : représenté par la station météorologique du chef-lieu de la wilaya « Bouira », dont la seule commune concernée est El-Mokrani, avec 14 sujets prélevés ;
- **Secteur-IV** : représenté dans cette étude par la station météorologique de la wilaya de Sétif, où notre échantillonnage a concerné six de ses communes, avec un total de 70 échantillons prélevés (tableau 16).

Tableau 14: Répartition de l'échantillon prélevé en fonction des différentes origines

Wilaya	Communes	Effectif/Commune	Secteurs E-C	Effectif/Secteur
Bouira	Ain Bessam	15	Secteur-I	56
	Bir Ghablou	14		
	Borj Okhris	14		
	El Hachimia	13		
	El Mokrani	14	Secteur-III	14
Sétif	Ain Abessa	13	Secteur-IV	70
	Ain Roua	12		
	Bougaa	11		
	Hammam Guergour	10		
	Maoklaine	13		
	Tala Ifacene	11		

La situation géographique et épidémio-climatique ainsi que la végétation des zones échantillonnées sont représentées dans une carte élaborée à l'aide du logiciel *[Map-Creator Copyright © 2003-2015 ; primap]* à partir des données fournies par le modèle **épidémio-climatique** précédemment établi dans cette étude (Figure 21).

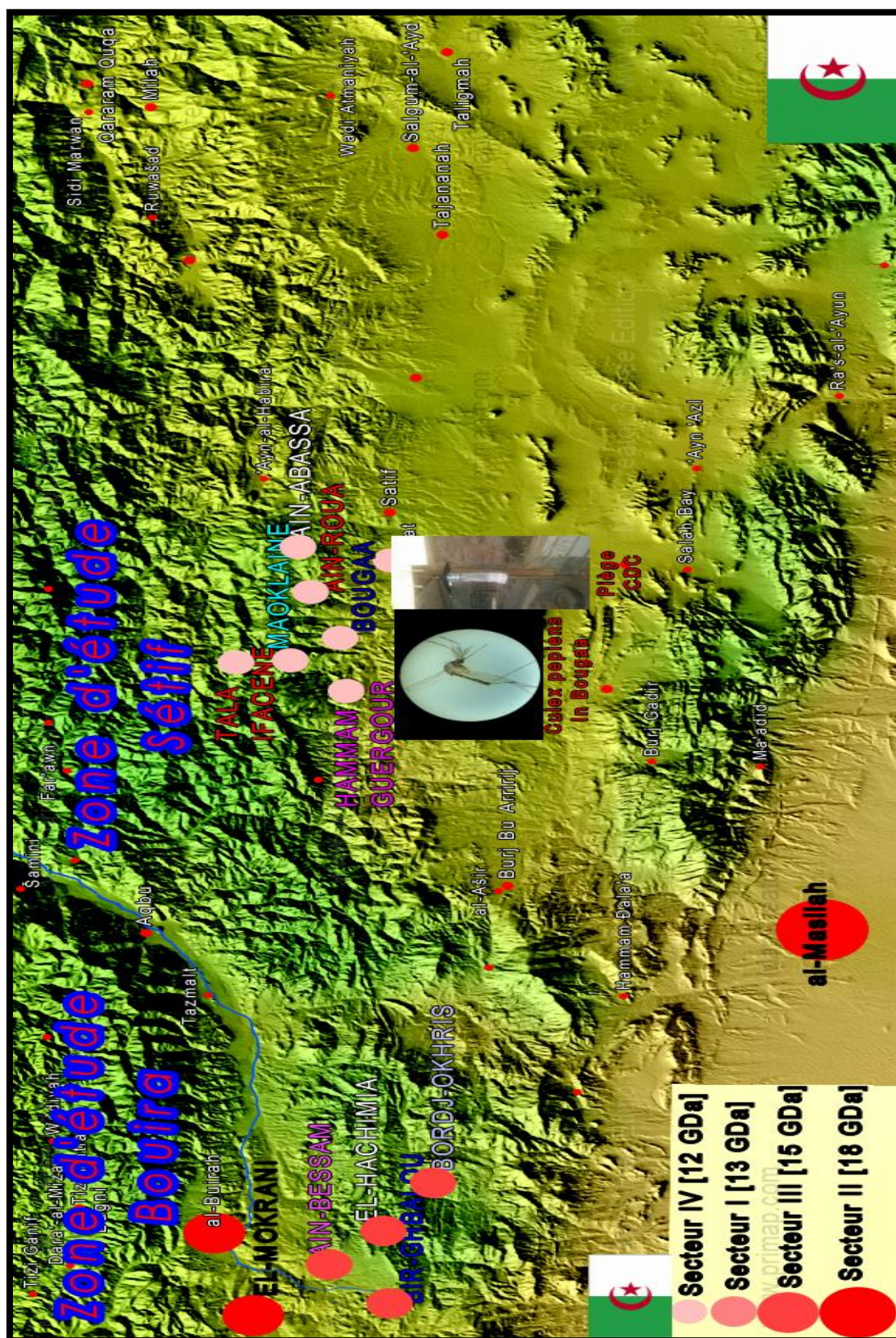


Figure 17: Carte descriptive de la zone d'étude selon le Modèle Epidémio-Climatique
{Map-Creator, Copyright ©2003-2015, preamp. Algeria vegetation-Map's. (Original 2017)}.

1.4. Identification de l'animal et examen clinique

Les informations recueillies lors de l'examen clinique de chaque animal prélevé ont été mentionnées dans une fiche de consultation. Les coordonnées de chaque propriétaire ont également été notées.

1.5. Prélèvement

1.5.1. Matériel

(cf. annexe)

1.5.2. Mode opératoire

Le prélèvement a été réalisé sur une veine périphérique de calibre moyen (veine radiale ou saphène) après rasage et désinfection du site de ponction. Deux prélèvements sanguins par animal ont été effectués, le premier sur tube sec et le second sur tube EDTA. Chaque échantillon a été rigoureusement identifié en notant le numéro de code et la date du prélèvement.

Un total de 140 prélèvements a été collecté, soit 70 par wilaya étudiée.

Conservation et acheminement

Les prélèvements sanguins ont été transportés dans une glacière munie de pains de glace ensuite conservés au réfrigérateur et centrifugés le soir ou le lendemain. Une fois centrifugés à une vitesse de 2500 à 3000 tours/mn pendant 10 mn, les sérums ont été recueillis et mis dans des tubes Eppendorfs référencés, stockés au congélateur.

1.6. Analyse sérologique

2. Description et principe du test

Les antigènes de *D.immitis* ont été recherchés dans les sérums par un kit ELISA indirect (Enzyme linked Immuno Sorbent Assay), test immuno-enzymatique de type sandwich, commercialisé aujourd'hui par le laboratoire Zoetis sous la dénomination Diro-Check.

Les anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes de *D. immitis* sont immobilisés au fond des puits d'une plaque sécable de 48 puits. Un second anticorps conjugué à l'enzyme horseradish peroxidase (HRP). Tout antigène présent dans le sérum sera fixé et sera mis en évidence par la formation d'un complexe spécifique

qui sera révélé par l'apparition d'une coloration bleuâtre suite à l'ajout d'un substrat chromogénique (Figure 23),

L'intensité de la couleur bleue obtenue est proportionnelle à la quantité de filaires présentes [Courtney et al, 1989 ; Hribernik, 1989].

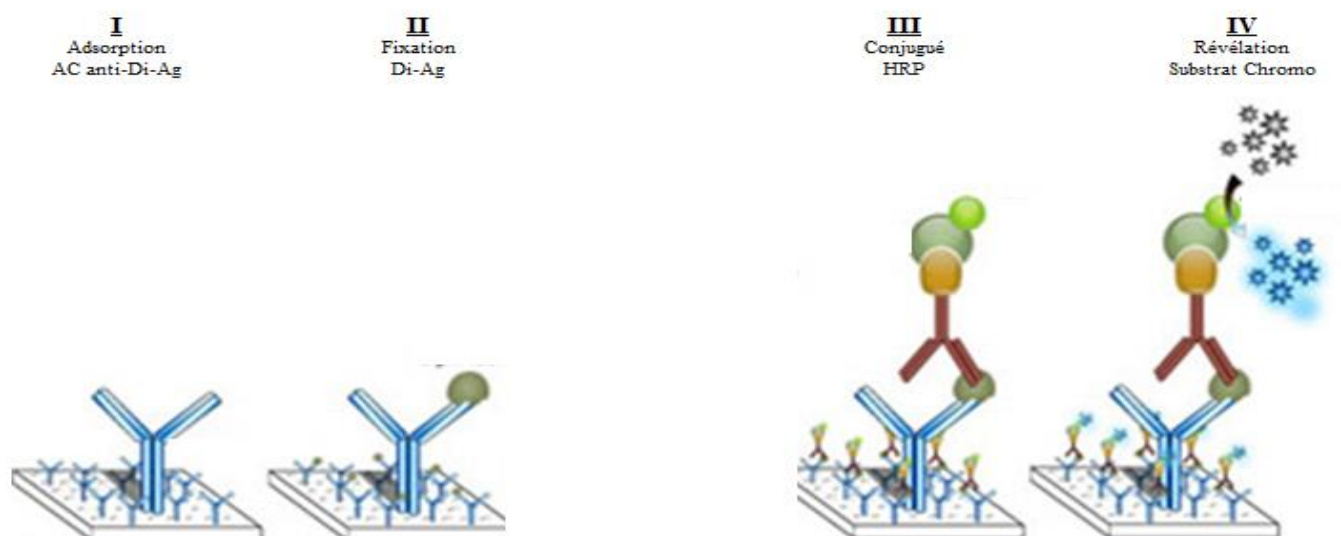


Figure 18: Récapitulatif des principales étapes de la technique sérologique destinée à révéler les antigènes de *D.immitis* « Di-Ag » « Synthèse personnelle ».

Ce kit a été retenu en raison de sa haute spécificité, sa sensibilité et la facilité de sa mise en œuvre [<https://www.drugs.com/vet/dirochek.html>].

La composition et le mode opératoire du kit sont détaillés en annexe.

Lecture et interprétation

Cinq minutes après la dernière étape représentée par l'ajout du substrat révélateur, la lecture des résultats est possible.

Il s'agit d'une lecture visuelle selon les recommandations du fabricant :

- **Contrôle négatif** : aucun changement de couleur « complètement clair »
- **Contrôle positif** : Distinctement bleuâtre
- **Echantillons** : tout changement de couleur vers le bleu est considéré comme positif

La lecture a été réalisée par 4 lecteurs différents (figure 23).



Figure 19: Lecture visuelle de la plaque ELISA après révélation

3. RESULTATS

Sur les 140 sérums prélevés, 116 se sont montrés positifs en ELISA, ce qui correspond à un taux global de 82,85 %.

Résultats de la séroprévalence de la dirofilariose en fonction des zones d'étude

Des valeurs de séropositivité de l'ordre de **95,71 %** et de **70 %** ont été retrouvées respectivement à Sétif et Bouira. La différence de prévalence observée entre ces deux régions était significative comme l'accorde le test t de Student $\{t=4,263 ; p\text{-value}<0,0001\}$. Il existe également des écarts importants entre les séroprévalences obtenues en fonctions de la division épidémioclimatique (tableau 17).

Tableau 15: Résultats de la séroprévalence de *D.immitis* en fonction des différents secteurs et wilayas étudiés

	Secteur-I	Secteur-III	Secteur-IV	S-échantillon 1 (Sétif)	S- échantillon 2 (Bouira)	Echantillon Global
Séroprévalence						
Séroprévalence	66,07%	85,71	95,71	95,71	70	82,85
Pa	9,81%	8,29	3,31	3,31	7,75	3,26
Pr	14,85%	9,67	3,45	3,45	11,07	3,93
IC à 95%	] 56,26; 75,88[	] 77,42; 94[	] 92,4; 99,02[	] 92,4; 99,02[	] 62,25; 77,75[	] 79,59; 86,11[

I. Etude statistique de la démographie des sous-populations

1. Evaluation démographique de la population canine étudiée et présentation des résultats de la sérologie

Les différents critères démographiques constatés au sein de la population canine étudiée, et les sous-populations obtenues suite à la division épidémio-climatique montrent des ratios différents, dont la valeur la plus importante est liée à la dirofilariose (tableau 16).

Tableau 16: Répartition des caractères démographiques et leurs Ratios.

Critère Démographique		Secteur-III		Secteur-I		Secteur-IV		Population d'étude	
		Valeur	Ratio	Valeur	Ratio	Valeur	Ratio	Valeur	Ratio
Sexe	Femelle	4	0,4	16	0,4	13	0,23	33	0,31
	Male	10	2,5	40	2,5	57	4,38	107	3,24
Portées	Au moins une	3	3	9	1,28	11	5,5	23	2,3
	Aucune	1	0,33	7	0,78	2	0,18	10	0,43
Age	Très jeune	6	0,43	24	0,75	6	0,09	36	0,35
	Moyen	7	0,5	26	0,87	52	2,89	85	1,55
	Avancé	1	0,07	6	0,12	12	0,21	20	0,17
Symptômes	Symptomatique	2	0,17	15	0,37	21	0,43	38	0,37
	Non symptomatique	12	6	41	2,73	49	2,33	102	2,68
Statut immunitaire	Défaillant	3	0,27	18	0,5	39	1,26	62	0,79
	non défaillant	11	3,67	36	2	31	0,79	78	1,25
Maladie interférentes « Leishmaniose »	Leishmanien	3	0,27	19	0,49	41	1,41	62	0,79
	Non Leishmanien	11	3,67	39	2,05	29	0,70	78	1,25
Dirofilariose	Séropositifs	12	6	37	2,18	67	22,33	116	4,83
	Séronégatif	2	0,17	17	0,45	3	0,04	24	0,21

2. Indice de la dirofilariose

L'indice de la dirofilariose varie en fonction de la démographie de la population canine étudiée, en particulier en fonction de certains critères démographiques, notamment l'âge avancé, la manifestation

des signes de l'immunosuppression et de la leishmaniose, ou une clinique évocatrice d'une dirofilariose (tableau 19).

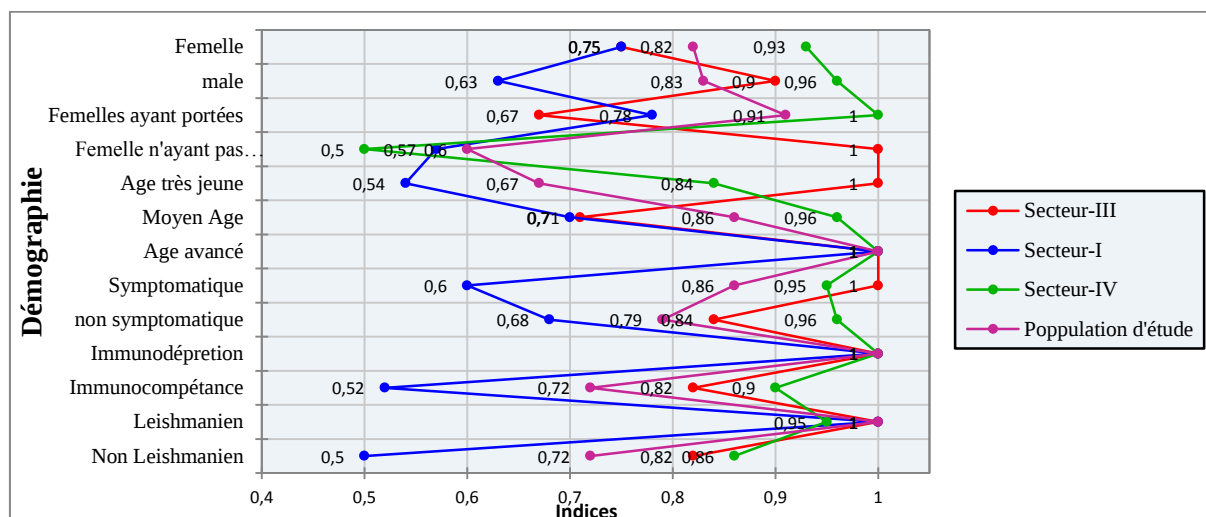


Figure 20: Graphique sémantique différentiel comparatif de l'indice de la dirofilariose en fonction des caractères démographiques au sein des échantillons

Tableau 17: Distribution de l'indice de la dirofilariose en fonction des différents critères démographiques

Indice de la Dirofilariose		Secteur III	Secteur I	Secteur IV	Population d'étude
Sexe	Femelle	0,75	0,75	0,93	0,82
	Male	0,9	0,63	0,96	0,83
Portées	Au moins une	0,67	0,78	1	0,91
	Aucune	1	0,57	0,5	0,6
Age	Très jeune	1	0,54	0,84	0,67
	Moyen	0,71	0,69	0,96	0,86
	Avancé	1	1	1	1
Symptômes	Symptomatique	1	0,6	0,95	0,86
	Non symptomatique	0,84	0,68	0,96	0,79
Statut immunitaire	Défaillant	1	1	1	1
	non défaillant	0,82	0,53	0,9	0,72
Leishmaniose	Leishmanien	1	1	0,95	1
	Non Leishmanien	0,82	0,5	0,86	0,72

Etude de la séroprévalence en fonction des facteurs de risque

III.1. Etude de l'effet associé aux facteurs à effet intrinsèque

1. Age

Un lien multidirectionnel a été démontré entre l'âge des chiens et la dirofilariose cardiopulmonaire canine ainsi qu'avec son activité épidémio-climatique, nos analyses montrent que :

- L'âge influence significativement la séroprévalence de la dirofilariose cardiopulmonaire canine, qui suit une évolution linéaire $\{X^2=9,54 ; p\text{-value}<0,0001 / R^2= 0,874\}$, commençant à partir d'une fréquence de **66,67%** pour la tranche d'âge de **[-1 ; 1,5]** pour qu'elle se stabilise aux alentours de **88%** pour les tranches d'âge de **[2 ; 4,5]** et **[5 ; 8]** ans, puis à **100%** pour les sujets âgés au-delà de **9** ans, (figure 21 & Tableau 19) ;
- L'influence de la dirofilariose sur la fréquence des sujets séropositifs est significative $\{X^2=22,22 ; p\text{-value}<0,0001\}$, qui commence à être enregistrée particulièrement au-delà de la deuxième tranche d'âge **[2 ; 4,5]** ans, qui est la plus fréquentes (**55,17%**), puis une nette diminution de la fréquence des sujets (**18,97%**) de la tranches d'âge suivante **[5 ; 8]** ans, pour que les sujets deviennent rare (**5,17%**) au-delà de **9** ans d'âges, (figure 21 & Tableau 19) ;
- Nos résultats montrent également que l'âge moyen des sujets séropositifs et séronégatifs diminue avec l'augmentation de l'activité épidémio-climatique, notamment les sujets provenant du secteur-III (**15,22 GDa et 24,59 semaine de transmission**) qui ont présentés une moyenne d'âge de **2,3** et **1** an pour les séropositifs et les séronégatifs respectivement, ces moyennes augmentent légèrement vers **3,2** et **1,92** ans chez les sujets du secteur-I (**13,6 GDa et 22,89 semaine de transmission**), et comme valeur maximale **4,14** et **2,93** ans chez les sujets du secteur-IV (**12 GDa, et 20,46 semaines de transmission**). Ceci prouve que les sujets s'infectent et disparaissent tôt dans les zones à forte activité, et vice-versa (tableau 18).

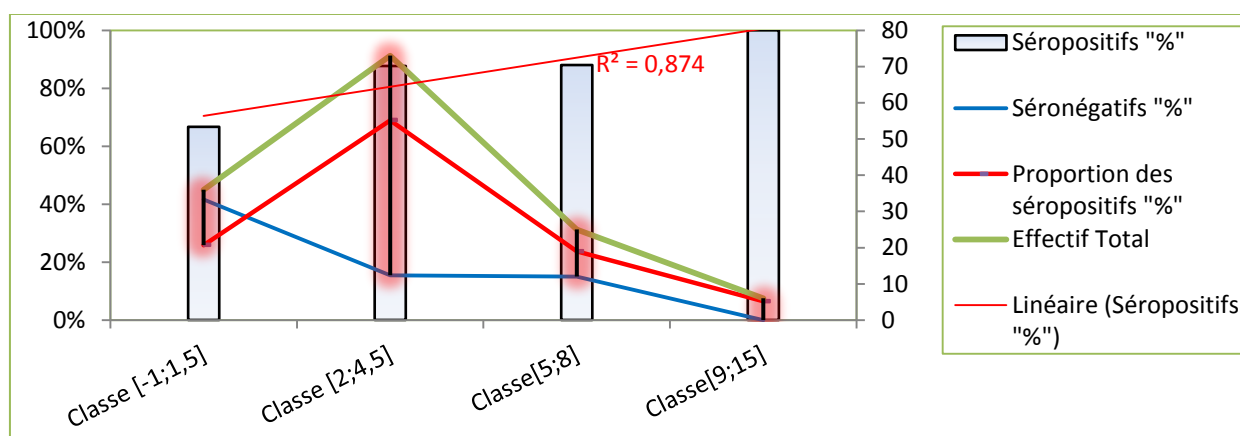


Figure 21: Différentes interactions révélées entre l'âge et la dirofilariose canine

Tableau 18: Effet épidémio-climatique de la dirofilariose sur l'âge (Description utilisant l'âge moyen des effectifs).

Age moyen "ans"	Origine Géographique			Origine Epidémioclimatique			Population étudiée	
	Sétif	Bouira	Statistique	Secteur-IV	Secteur-I	Secteur-III	Age moyen "Sérologie"	Statistique
Séropositifs	4,14	2,96	$t=3,338$ $p=0,001$	4,14	3,2	2,3	3,65	$X^2=22,22$
Séronégatifs	2,93	2,16		2,93	1,92	1	1,96	$p < 0,0001$
Age moyen "Origine"	4,09	2,73	S	4,09	2,76	2,61	3,36	S

Tableau 19: Effet de l'âge sur la séroprévalence de la dirofilariose.

Classe d'âge	Effectif des Positif	Effectif Total	Proportion des Séropositifs	Séroprévalence dans chaque classe d'âge	Statistique (Khi2)
Classe [-1;1,5]	24	36	20,69%	66,67%	$X^2= 9,54$ $p\text{-value}=0,023$
Classe [2;4,5]	64	73	55,17%	87,67%	
Classe [5;8]	22	25	18,97%	88,00%	
Classe [9;15]	6	6	5,17%	100,00%	
Total [-1 ; 15]	116	140	100%	82,86%	S

2. Sexe

La représentation des résultats liés à la séroprévalence en fonction du genre de l'animal montre une séroprévalence de $\{83,17\% \pm 7,07; n=107\}$ chez les mâles, et $\{81,82\% \pm 13,12; n=33\}$ chez les femelles, sans aucune différence significative $\{X^2=3,841 ; p\text{-value}=0,856\}$.

3. Statut maternel

Les résultats obtenus montrent qu'au sein de la fraction des femelles testées, le statut maternel représenté par **Gestation/Portées/Allaitement** doté d'un Ratio de 2,3, montrant un effet significatif sur la séroprévalence des antigènes de *D. immitis* $\{EM-H, X^2=4,297 ; p\text{-value}=0,038\}$, où l'indice de la séropositivité était de $\{91,13\% \pm 11,57; n=23\}$ chez les femelles qui l'ont présenté au moins une seule fois dans leur vie, et $\{60\% \pm 30,4; n=10\}$ chez celles qui ne l'ont jamais eu.

4. Race

La race ne semble pas influencer la sensibilité des chiens envers la dirofilariose $\{X^2 = 20,16 ; p\text{-value de } 0,385\}$.

5. Activité de l'animal

L'activité de l'animal n'influence pas la séroprévalence de la dirofilariose dans la présente étude $\{X^2 = 2,610 ; p\text{-value} = 0,625\}$, à l'exception des chiens errants qui sont significativement positifs $\{p\text{-value associée au test exact de Fisher} < 0,05\}$.

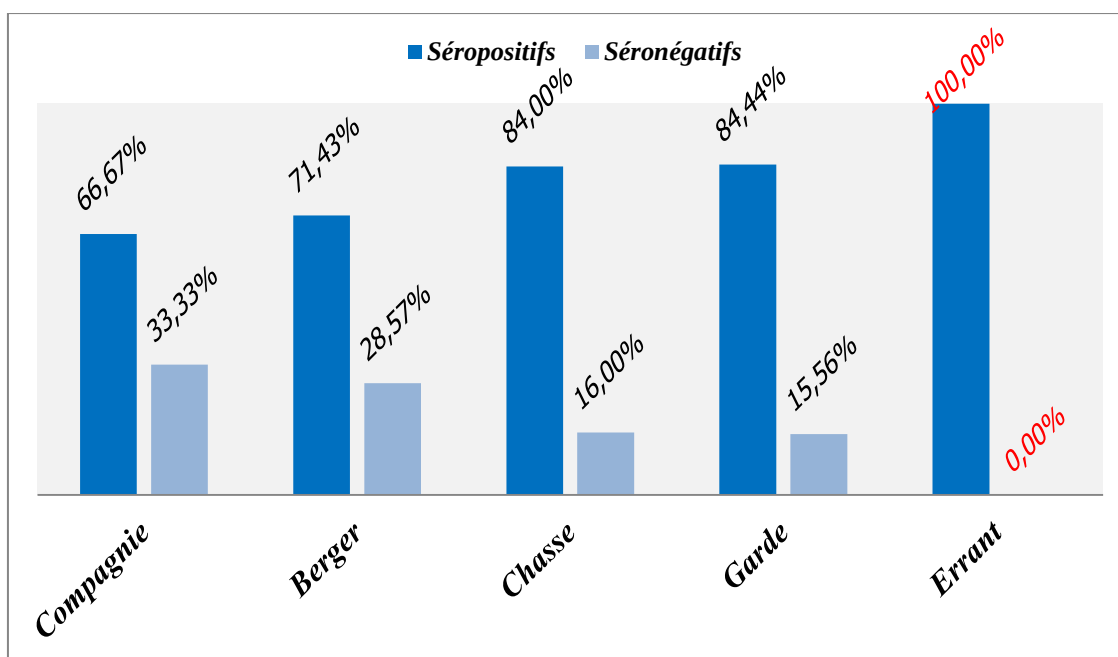


Figure 22: Représentation des sujets séropositifs en fonction de l'activité des chiens

6. Etat clinique

La clinique de l'animal n'influence pas la séroprévalence $\{X^2_{EM-H} = 0,92 ; p\text{-value} = 0,34\}$, et les cas diagnostiqués peuvent être asymptomatiques $\{85,23\% ; n = 88\}$ ou symptomatiques $\{78\% ; n = 52\}$. En revanche chez ces derniers se sont les sujets présentant tout particulièrement de la dépilation, une atteinte respiratoire isolée ou en association avec une adénopathie et/ou de l'abattement $\{p\text{-values associées au test exact de Fisher} < 0,05\}$, (Figure 23).

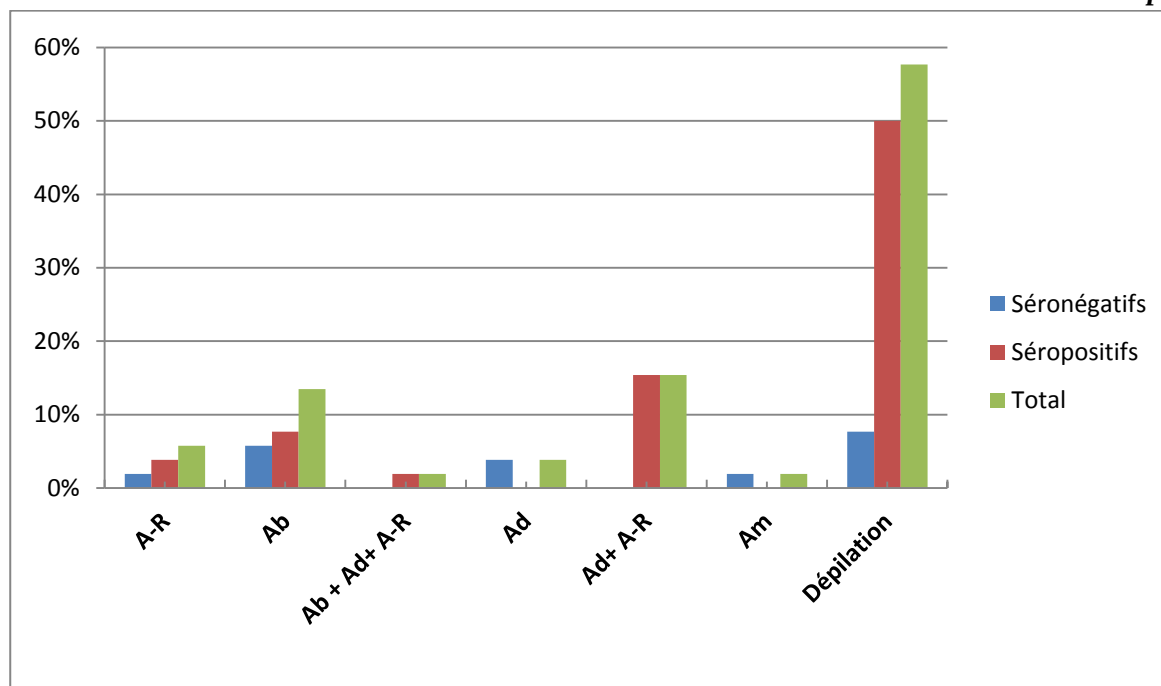


Figure 23: Représentation des résultats de la sérologie en fonction de l'état clinique (*A-R* : Atteinte respiratoire ; *Ab* : Abattement ; *Ad* : Adénopathie ; *Am* : Amaigrissement).

7. Statut immunitaire

En se référant à certains indices tel que la présence de maladies immunodépressives comme la leishmaniose qui a été diagnostiquée et confirmée sérologiquement sur notre échantillonnage au cours d'une autre étude menée parallèlement à la nôtre, la présence d'infections bactériennes multiples, la présence de gale, en plus d'autres facteurs liés à l'embonpoint de l'animal, et l'état des organes immunitaires, trois statuts immunitaires ont été distingués :

- **Bon statut immunitaire ;**
- **Système immunitaire réactionnel :** organes immunitaires fortement stimulés ;
- **Système immunitaire défaillant :** constitue le cas le plus fréquent, associé le plus souvent à une leishmaniose clinique au stade avancé, ou des infections opportuniste multiples (Bactériennes et Parasitaires) ;

L'ensemble des résultats obtenus au regard de cette évaluation sont compilés dans le tableau 20, qui montre que les sujets présentant un système immunitaire défaillant sont les plus atteints (96,77%) et les plus fréquents (42,86%), suivis par ceux qui ont un bon statut immunitaire et en dernier lieu se sont les sujets qui présentent un statut immunitaire réactionnel.

Tableau 20: Résultat de la sérologie en fonction du statut immunitaire des sujets et de sa fréquence au sein de la population testée.

Statut	Exact de Fisher		Indices/classe		Indice global	
	Séronégatifs	Séropositifs	Séronégatifs	Séropositifs	Séronégatifs	Séropositifs
Bon statut immunitaire	<	>	13,51%	86,49%	3,57%	22,86%
Système immunitaire réactionnel	>	<	41,46%	58,54%	12,14%	17,14%
système immunitaire défaillant	<	>	3,23%	96,77%	1,43%	42,86%
Les valeurs affichées en rouge sont significatives au seuil $\alpha=0,05$						

L'analyse statistique de la séroprévalence en fonction du statut immunitaire montre une différence significative. { $X^2= 25,871$; $p\text{-value} < 0,0001$ }.



Figure 24: Chien en défaillance immunitaire {Leishmaniose Clinique, Atteinte respiratoire, atteinte du BAU avec écoulement génital} « Photo originale, 2016 ».



Figure 25: Chien présentant un système immunitaire réactionnel. « Photo originale, 2016 ».



Figure 26: Chien présentant un bon statut immunitaire « Photo originale, 2016 ».



Figure 27: Dirofilariose cardiopulmonaire canine, Atteinte pulmonaire/ Ascite « Photo originale, 2016 ».



Figure 28: Dirofilariose canine Clinique avec atteinte multiple associée à une défaillance immunitaire « Photo originale, 2016 ».



Figure 29: Animal présentant les signes d'un système immunitaire fortement réactionnel, et atteinte pulmonaire « Photo originale, 2016 ».



Figure 30: Dirofilariose clinique associée à une leishmaniose sévère « Photo originale, 2016 ».



Figure 31: Suspicion d'une dirofilariose Cardiopulmonaire clinique "A"; et à localisation Erratique "B", « Photos originales, 2017 ».

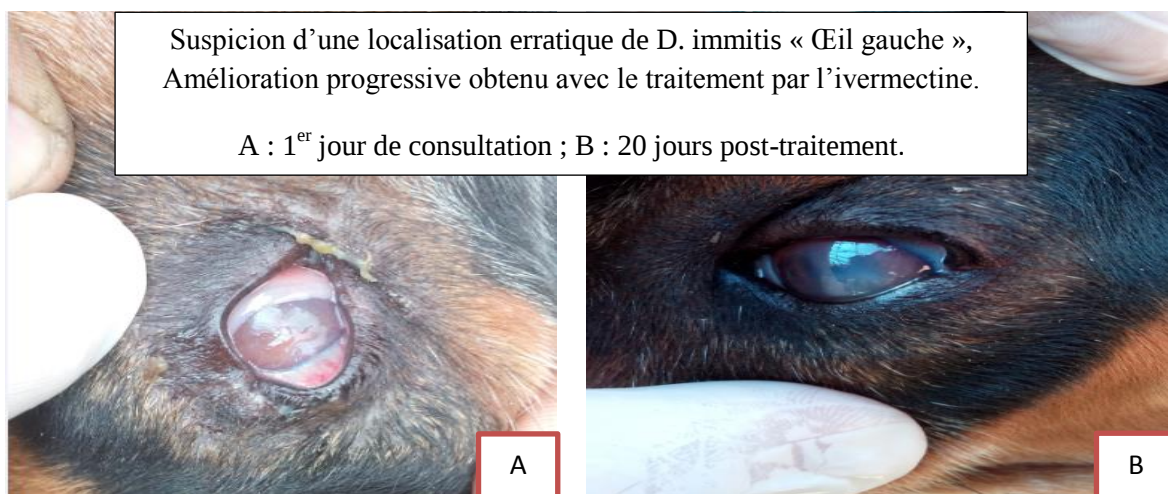


Figure 32: Suspicion d'une dirofilariose oculaire, à *D. immitis*; et résultat du traitement par une seul injection de l'ivermectine, « Photos originales, 2017 ».

III.2. Etude de l'effet associé aux facteurs à effet extrinsèque

1. L'origine épidémio-climatique et géographique

Comme nous l'avons indiqué par les résultats consignés dans le tableau n°17, l'origine de l'animal influe sur la séroprévalence de la dirofilariose cardiopulmonaire canine, en effet les sujets prélevés à Sétif sont plus atteints {95,71%} par rapport à ceux prélevés à Bouira {70%} d'une manière significative { $t=4,263$; $p\text{-value}<0,0001$ }. Si on tient compte maintenant de l'origine épidémio-climatique, l'influence demeure { $X^2=19,34$; $p\text{-value}<0,0001$ }, mais avec une instabilité de la compatibilité avec l'activité épidémioclimatique, et la séroprévalence la plus élevée est enregistrée dans le secteur épidémio-climatique le moins actif (Secteur-IV) avec {95,71%}, suivie par le Secteur-III qui est le plus actif, avec {85,71%}, et en dernier lieu le secteur-I avec {66,07%}.

2. Le nombre de générations de dirofilariose GDa confrontées et la période de transmission vécue

Une nouvelle approche adoptée par la présente étude pour l'évaluation du risque épidémio-climatique au sein d'une population canine identifiée, qui utilise le concept de l'intensité du risque que subit l'animal en fonction de son âge et son origine épidémio-climatique, ceci se définit principalement par le nombre de GDa confrontées par l'animal tout au long de sa vie ou la longueur de la période de transmission vécue. Quatre classes sont ainsi générées, et au sein de chacune d'elles le risque vécu par les sujets est identique en dépit des différences liées à l'âge et à l'origine (Tableau 21 & 22). On trouve qu'au sein de chaque classe la similarité des risques vécus est accompagnée par des séroprévalences relativement identiques (figure 33).

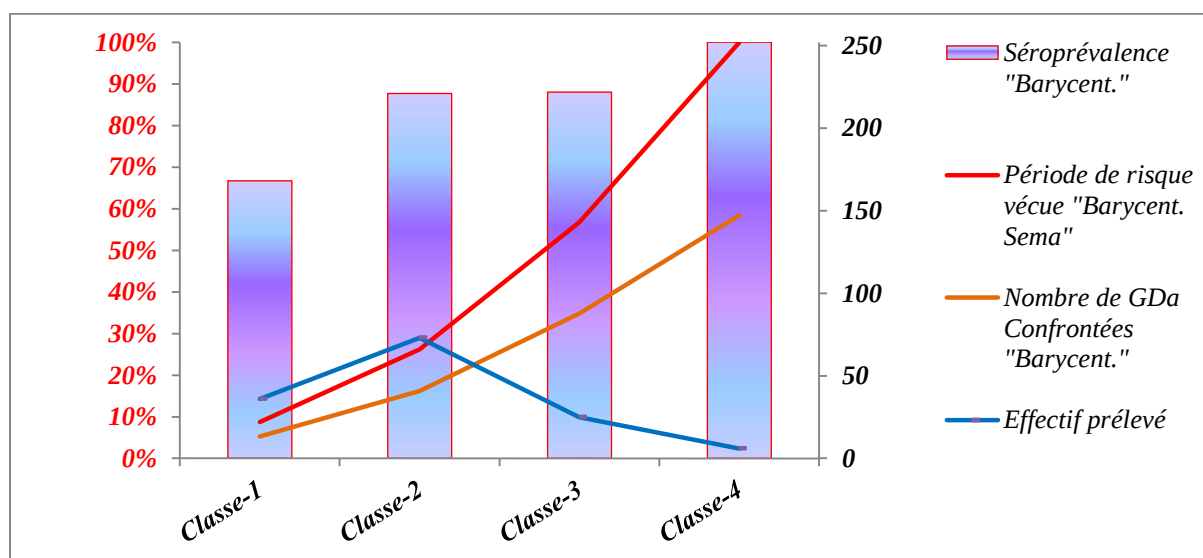


Figure 33: Evolution de la séroprévalence en fonction de l'intensité du risque épidémio-climatique et sa répercussion sur la population canine étudiée

Tableau 21: Analyse statistique et représentation des résultats de l'effet des GDa confrontées sur la séroprévalence dans les différents secteurs épidémio-climatiques.

Description			Effectifs		Pourcentages			Statistique		
Classes	Classes		Effectif des positifs	Total	Prévalence/ Barycentres	Pourcentage des Positifs de chaque classe	Pourcentage dans l'effectif positif	Pourcentage dans chaque classe	Test Z Interclasse	Khi2
1 ^{ère} Classe	Bary. 13,33 GDa	GDa S-IV [12]	5	6	66,67%	3,57%	4,31%	83,33%	Z=4 p-value= 0,355	X ² = 28,52
		GDa S-I [13]	13	24		9,29%	11,21%	54,17%		
		GDa S-III [15]	6	6		4,29%	5,17%	100%		
2 ^{ème} Classe	40,83 GDa	GDa S-IV [24;50]	42	43	87,67%	30,00%	36,21%	97,67%	Z=1,655 p-value= 0,098	
		GDa S-I [27;54]	17	24		12,14%	14,66%	70,83%		
		GDa S-III [30;60]	5	6		3,57%	4,31%	83,33%		
3 ^{ème} Classe	87,67 GDa	GDa S-IV [60;96]	16	17	88%	11,43%	13,79%	94,12%	Z=1,412 p-value= 0,158	p-value 0,0015
		GDa S-I [67;108]	5	6		3,57%	4,31%	83,33%		
		GDa S-III [75;120]	1	2		0,71%	0,86%	50,00%		
4 ^{ème} Classe	147,25 GDa	GDa S-IV [108;160]	4	4	100%	2,86%	3,45%	100%	Z=1,732 p-value= 0,083	
		GDa S-III [121;200]	2	2		1,43%	1,72%	100%		
Total			116	140		82,86%	100%	,,/,/,	N S	S

Tableau 22: Analyse statistique et représentation des résultats de l'effet de la période de risque vécue sur la séroprévalence dans les différents secteurs épidémio-climatiques.

Classes			Effectif		Pourcentage			Statistique	
Période à risque vécue (En semaine)/Secteur			Effectif des positifs	Total	Pourcentage des Positifs de chaque classe	Pourcentage dans l'effectif positif	Pourcentage dans chaque classe	Test Z Interclasse	Khi 2
1 ^{ère} Classe	22 Sem.	P-Tr S-IV [20]	5	6	3,57%	4,31%	83,33%	Z=4 p-value= 0,355	X ² = 28,52
		P-Tr S-I [22]	13	24	9,29%	11,21%	54,17%		
		P-Tr S-III [24]	6	6	4,29%	5,17%	100%		
2 ^{ème} Classe	66 Sem.	P-Tr S-IV [40;80]	42	43	30,00%	36,21%	97,67%	Z=1,655 p-value= 0,098	
		P-Tr S-I [44;88]	17	24	12,14%	14,66%	70,83%		
		P-Tr S-III [48;96]	5	6	3,57%	4,31%	83,33%		
3 ^{ème} Classe	143 Sm.	P-Tr S-IV [100;160]	16	17	11,43%	13,79%	94,12%	Z=1,412 p-value= 0,158	
		P-Tr S-I [110;176]	5	6	3,57%	4,31%	83,33%		
		P-Tr S-III [120;192]	1	2	0,71%	0,86%	50,00%		
4 ^{ème} Classe	252 Sm.	P-Tr S-IV [180;300]	4	4	2,86%	3,45%	100%	Z=1,732 p-value= 0,083	
		P-Tr S-I [198;330]	2	2	1,43%	1,72%	100%		
Total			116	140	82,86%	100%	,,/,/,	NS	S

***Etude Parasitologique des
filarioses chez l'hôte réservoir
« Canis familiaris »***

3. ETUDE PARASITOLOGIQUE DES FILARIOSES CHEZ L'HOTE RESERVOIR « Canis familiaris »

MATERIEL ET METHODES

A. Technique d'étude des filarioses chez le chien « Hôte définitif »

1. Introduction

Différentes techniques permettent la mise en évidence des microfilaries, à savoir l'examen de la goutte épaisse, l'histochimie, et la technique de concentration utilisant soit des filtres tel que le test de filtration, ou la technique modifiée de Knott [Claudio Genchi et al, 2007].

Dans le cas de la Dirofilariose Cardiopulmonaire Canine, le test de référence reste la technique de Knott modifiée [Ben-Mahdi & Madani, 2009]. Qui permet la détection de 93,75% des chiens microfilarémiques [Ducos, & Ducos, 1990].

Comme nous ne disposons pas de données publiées sur les filarioses canines en Algérie. Ce travail avait pour objectif principal de faire un état des lieux de la situation à Sétif-Algérie.

Les objectifs spécifiques assignés à cette étude sont :

- Confirmation de la présence de D.immitis par le Standard de référentiel « La technique modifiée de Knott »
- Recherche et identification morphologique de toutes les microfilaries retrouvées, et mise au point sur les filarioses canines

Matériel et méthodes

1. Prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés 8 mois après le dépistage sérologique sur une fraction de la même population canine de Sétif concernée par l'étude sérologique présentée précédemment.

Des prélèvements du sang veineux réalisés sur tube EDTA, selon la technique décrite par Medaille et ses collaborateurs en 2005. Tout comme les prélèvements réalisés pour la sérologie.

**A ne pas
négliger**

- Prélèvement sur tube avec anticoagulant (EDTA).
- La microfilarémie dans le sang périphérique qui n'est pas constante tout au long du nyctémère, connue par son cycle circadien où elle est beaucoup plus importante l'après-midi [Bowman & Atkins., 2009], en France le taux maximal est atteint à 20 :00 h [Euzeby, 1990].
- La nécessité d'utiliser du sang frais ni congelé ni altéré afin de ne pas détruire les microfilaires.
- Notre disponibilité et celle du propriétaire.

Les prélèvements ont été réalisés entre 16 h et 19 h, déposés dans une glacière (+ 4 °C), gardés au réfrigérateur le soir, transportés tôt le matin à +4°C, pour qu'ils soient analysés au niveau du laboratoire. 36 sujets ont été prélevés.

2. Examen parasitologique

2.1. La technique utilisée

Nous avons utilisé une technique de concentration des microfilaires circulants dans le sang périphérique, et qui permet aussi de décrire morphologiquement les différentes espèces, On parle de la technique *modifiée de Knott*.

2.2. Principe de la technique

La modification de la technique de Knott (1930) a été rapportée par Newton et Wright (1956) pour la concentration et l'identification des microfilaires chez le chien.

Un ml de sang entier est mélangé à 10 ml de formol à de 2% ou une autre solution hémolysante, une centrifugation pendant 5 minutes à 1500 voire 1800 t/mn. Après l'élimination du surnageant, le sédiment est mélangé à une quantité identique du bleu de méthylène en raison de 1/1000. Le culot est étalé sur une lame et observé au microscope.

Cette technique combine un certain nombre d'avantages importants. Toutes les microfilaires présentes initialement dans l'échantillon sont d'abord concentrées dans un peu de sédiment, composé principalement de leucocytes, de débris d'hémolyse et des érythrocytes, faisant d'elle une technique très sensible, capable de détecter même les infections de faible densité. Avec cependant la possibilité de mesurer la taille des microfilaires et leur description morphologique afin d'identifier les espèces.

A. RESULTATS ET ANALYSE STATISTIQUES

a. Résultats

Parmi les 140 sujets analysés par la sérologie (ELISA Diro-Chek), 36 sujets provenant du Secteur-IV (Wilaya de Sétif) ont pu être prélevés huit mois après pour l'examen parasitologique, dont 35 sujets étaient des séropositifs, et seul un cas séronégatif. Ce dernier se montre toujours amicrofilarémique avec un autre sujet en Knott modifiée, et les 34 sujets restants sont positifs par les deux tests, soit une proportion de **94,44%**.

- ✓ L'examen parasitologique a permis non seulement de confirmer la dirofilariose cardiopulmonaire canine due à *D.immitis* mais aussi de révéler l'existence des microfilarémies autre que celle causée par *Dirofilaria immitis*.
- ✓ En littérature l'identification des différentes espèces des microfilaires se base essentiellement sur la taille, le mode de mouvement, la forme des extrémités, morphologie interne du microfilaire, la capacité d'adsorption du colorant, et la différenciation histochimique [Kelly, 2006].
- ✓ Dans notre étude nous nous sommes référés uniquement aux critères morphologiques pour l'identification des espèces.

NB : la numérotation utilisée dans le tableau 23 pour les critères morphologique est la même utilisée pour les figures.

Tableau 23: Identification morphologique des microfilaires obtenues par la technique modifiée de Knott

Espèces	Description morphologique
<u>Dirofilaria immitis</u> [J. D. Kelly, B. V. Sc., 2006] [Genchi <i>et al</i>, 2005] [Puteri. Az. <i>et al</i>, 2010] Figures : 1, 2, 3, 4, 5	✓ Sans enveloppe ✓ Extrémité antérieure conique (pointée), cette conicité s'observe tout au long des 30-40 derniers μm.^{3, 4} ✓ Extrémité postérieure rectiligne, se déviant rarement de l'axe longitudinale.^{2, 3} ✓ La forme générale rectiligne, rarement un croissant légèrement incurvé.¹
<u>Acanthocheilonema</u> <u>reconditum</u> Ou <u>Depetalonema</u> <u>reconditum</u> [J. D. Kelly, B. V. Sc., 2006] [Genchi <i>et al</i>, 2005] [Puteri. Az. <i>et al</i>, 2010] Figure : 6, 7	✓ Sans enveloppe ✓ Extrémité antérieure obtue, avec la présence d'un crochet céphalique (Cephalic Hook).⁶ ✓ Extrémité postérieure formant un arc, avec la présence d'un crochet avant la terminaison du corps (Button Hooked), signature de <u>Depetalonema</u>.⁷ ✓ Une absence totale de rectitude, ondulé, avec formation d'un croissant profond.⁷
<u>Dirofilaria repens</u> [Genchi <i>et al</i>, 2005] [Puteri. Az. <i>et al</i>, 2010] Figure : 8, 9 <u>Bruqia sp</u> [Genchi <i>et al</i>, 2005] [Puteri. Az. <i>et al</i>, 2010] Figure : 11, 12, 13	✓ Sans enveloppe ✓ Extrémité antérieure obtue.⁸ ✓ Extrémité postérieure filiforme, pointue, sous l'aspect d'une poignée de parapluie.⁹ ✓ Forme générale régulière.⁸ ✓ Présence d'enveloppe ✓ Présence d'un espace céphalique (Entre le corps et l'extrémité antérieure).¹²

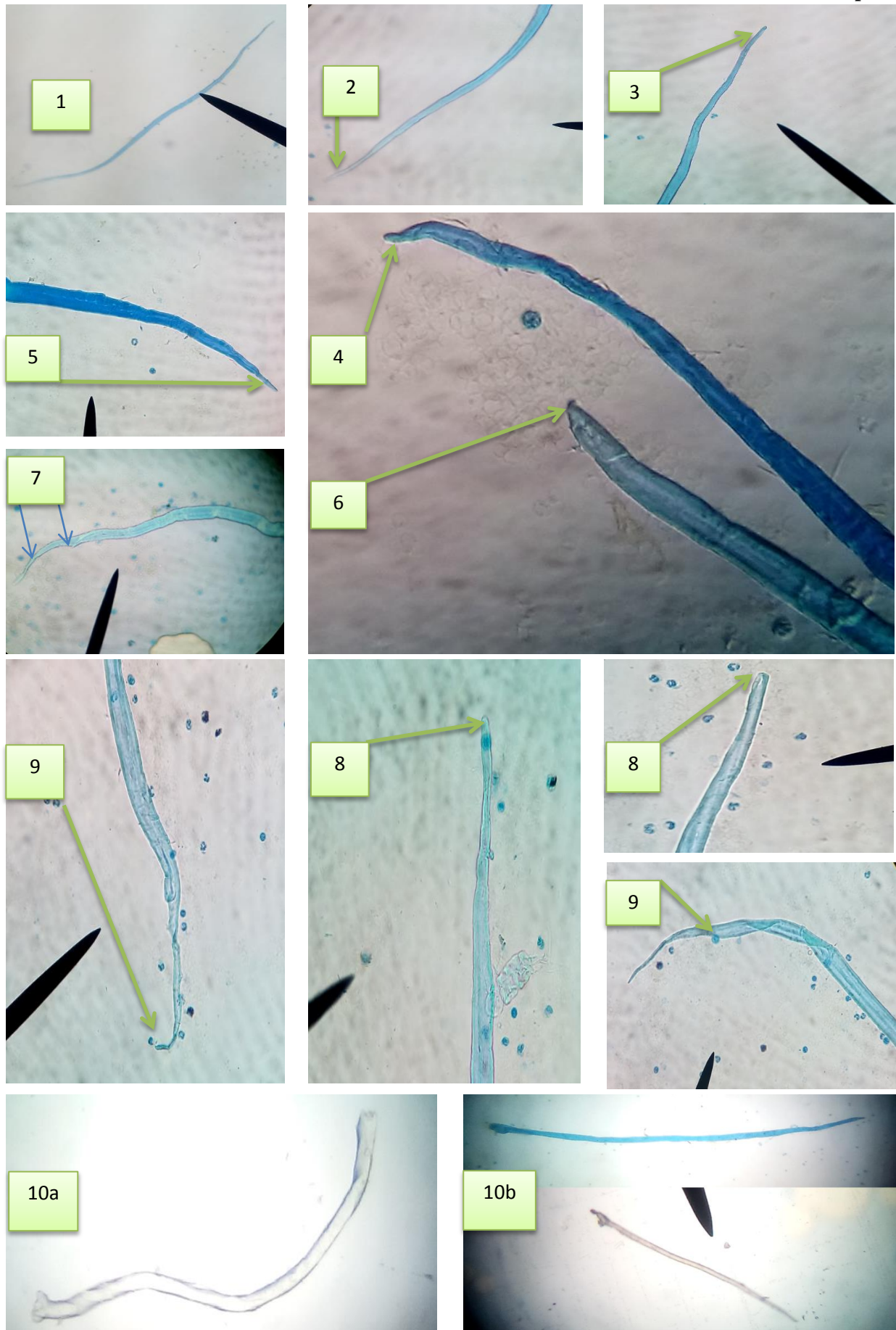


Figure 35: Photos (1, 2, 3) « Grossissement $\times 10$ », (4, 5) « Grossissement $\times 100$ », *D. immitis*; (6,7) « Grossissement $\times 100$ », *A. reconditum*; (8,9) « Grossissement a $\times 40$, b $\times 10$ », *D. repens*; (10) « Grossissement $\times 40$ », Larves infectantes. (Obtenus à partir de Knott modifiée), Originales 2017.

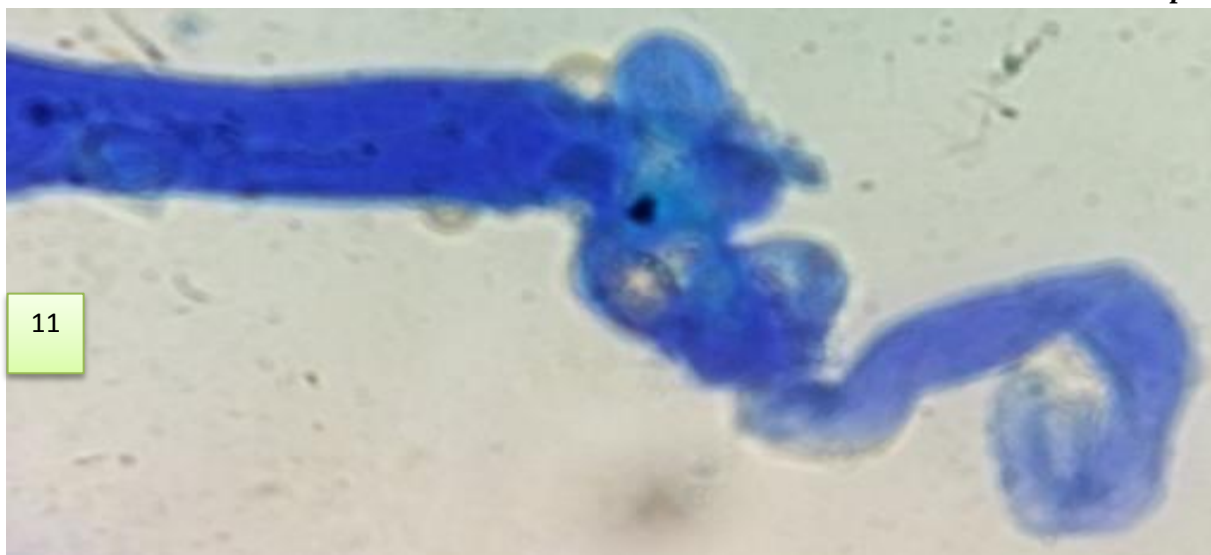


Figure 36 : Extrémité postérieur d'une *Brugia* sp microfilaria like, mise en évidence par la technique modifiée de Knott sur sang du chien « grossissement : *100 », Originale 2017.



Figure 37 : Extrémité postérieur d'une *Brugia* sp microfilaria like, mise en évidence par la technique modifiée de Knott sur sang du chien « grossissement : *40 », Originale 2017.



Figure 38 : Extrémité postérieur d'une *Brugia* sp microfilaria like, mise en évidence par la technique modifiée de Knott sur sang du chien « grossissement : *100 », Originale 2017.



Figure 39: Espèces non identifiées, obtenues à partir du sang canin via la technique modifiée de Knott « grossissement : $\times 40$ », Originales 2017.

a. Résultats de l'examen parasitologique

La recherche des microfilaraires sanguicoles via la technique modifiée de Knott, a montré que sur les 36 sujets analysés :

- 34 {94,44% $\pm$ 7,44%} sont microfilarémiques à *D.immitis* ;
- 23 {63,89% $\pm$ 15,69%} sont microfilarémiques à *D.repens* ;
- 4 {11,11% $\pm$ 10,31%} sont microfilarémiques à *A.reconditum* ;
- 1 {2,78% $\pm$ 5,42%} sont microfilarémiques à *Brugia sp* ;
- 1 {2,78% $\pm$ 5,42%} sont microfilarémiques à un spécimen non identifiée (a)
- 1 {2,78% $\pm$ 5,42%} sont microfilarémiques à un autre spécimen non identifiée (b)

Additionnellement, les examens sérologiques destinés à la révélation des antigènes de *D.immitis* et les anticorps anti-*Leishmania* montrent que sur les meme sujets testés :

- 35 {97,22% $\pm$ 5,42%} sont séropositifs à *D.immitis* ;
- 14 {38,89% $\pm$ 15,89%} sont séropositifs à *Leishmania* ;

b. Analyse statistique

Dans cette partie d'étude, le traitement des résultats obtenus a fait appel à la corrélation de Pearson, le test de Mantel (EM-H) et le test de Student, le χ^2 et parfois le Test Exact de Fisher. Avec IC= 95%, $\alpha= 0,05\%$.

1.1. Etude comparative des coïnfections parasitaire associées à la Dirofilariose canine {EMH}

Il est important d'indiquer que sur les 36 sujets testés :

- 06 {16,67%} ont présenté une mono-infection à *D.immitis* ;
- 15 {41,67%} ont présenté une bi-infection, dont :
 - 01 {02,78%} Infecté par *D.immitis* « Infection occulte » et *Leishmania* ;
 - 03 {08,33%} infectés par *D.immitis* «non occulte » et *Leishmania* ;
 - 11 {30,56%} infectés par *D.immitis* et *D.repens* ;
- 12 {33,33%} ont présenté une triple infection, dont :
 - 7 {19,44%} infectés par *D.immitis*, *D.repens* et *Leishmania* ;
 - 3 {08,33%} infectés par *D.immitis*, *D.repens* et *A.reconditum* ;
 - 2 {02,78%} infectés par *D.immitis*, *D.repens* et microfilaria non identifiées « a&b ».
- 02 {05,56%} ont présenté une triple infection, dont :
 - 1 {2,78%} infecté par *D.immitis*, *D.repens*, *Leishmania* et *Brugia sp* ;
 - 1 {2,78%} infecté par *D.immitis*, *D.repens*, *Leishmania* et *A.reconditum* ;
- 01 {02,78%} n'a présenté aucune de ces infections.

L'analyse détaillée de ces résultats révèle ce qui suit :

- L'absence de différence entre les différentes combinaisons parasitaires rencontrées chez les séropositifs { $X^2= 2,858$; $p\text{-value}=0,091$ } ;
- L'OR le plus élevé correspond à la bi-infection *D.immitis*+*D.repens* {OR=2,164}, suivi par celui de la Triple Infection où la Leishmaniose se manifeste avec les deux précédentes {OR=1,187} ;
- La fréquence de *D.immitis* est la plus importante que toutes les autres infections (tableau 26) ;
- Toutes les atteintes parasitaires observées sont significativement positivement corrélées, chez les sujets séropositifs à *D.immitis* (tableau 27 & figures 40, 41 et 42) ;
- Aucune différence entre le résultat de la sérologie et celui obtenu par la technique modifiée de Knott qui a permis de détecter 97,14% de séropositifs à *D.immitis* { $t=0,58$; $p\text{-value}=0,56$ } ;

Tableau 24: Résultat Effectif/Proportions des coinfections Diagnostiquées "Knott Modifiée/ELISA: DiroChek/IMR: Witness Leishmania". {Lecture Diagonale, du Haut à gauche vers le bas à droite, symétrie par rapport à l'autre plan diagonal déterminée par les cases dupliquées, correspondant aux proportions des infections}.

	B. SP	M. N. IDENT	M {A. R}	LEISH	M {D. R}	INF OCC	M {D. I}	SERON	SEROP
Séropositif	1	2	4	14	23	1	34	0	35 97,22%
Séronégatif	0	0	0	0	0	0	0	1 2,78%	0,00%
Microfilarémie {D. immitis}	1	2	4	13	23	0	34 94,44%	0,00%	94,44%
Infection occulte {D. immitis}	0	0	0	1	0	1 2,86%	0,00%	0,00%	2,78%
Microfilarémie {D. repens}	1	2	3	8	23 63,89%	0,00%	63,89%	0,00%	63,89%
Leishmaniose	1	2	2	14 38,89%	22,22%	2,78%	36,11%	0,00%	38,89%
Microfilarémie {A. reconditum}	0	0	4 11,11%	5,56%	8,33%	0,00%	11,11%	0,00%	11,11%
Microfilaraires Non identifiés	0	2 5,56%	0,00%	5,56%	5,56%	0,00%	5,56%	0,00%	5,56%
Brugia sp.	1 2,78%	0,00%	0,00%	2,78%	2,78%	0,00%	2,78%	0,00%	2,78%

B.SP= Brugia sp ; **M. N. IDENT=** Microfilaraires Non identifiés ; **M {A. R}=** Microfilarémie {A. reconditum} ; **LEISH=** Leishmaniose ; **M {D. R}=** Microfilarémie {D. repens} ; **INF OCC=** Infection occulte ; **M {D. I}=** Microfilarémie {D.immitis} ; **SERON=** Séronégatifs ; **SEROP=** Séropositifs.

Tableau 25: L'Analyse de tendance linéaire entre les séropositifs et les différentes coinfections, avec la moyenne estimée pour chaque Score-Ag qui en est associé, et l'OR.

Agents infectieux et nature de l'Infection		Effec	Pr%	OR	Chi2
Non infecté	aucune infection	1	2,78%	0,141	Chi2 de tendance linéaire (Extended Mantel-Haenszel, « EM-H ») $X^2 = 2,858$ $p\text{-value} = 0,091$
Mono-Infection	{D. immitis}	6	16,67%	1	
	Ag-{D. immitis}	1	2,78%	0,141	
Bi-infection	(Infec occulte) + Leish	3	8,33%	0,447	
	M-{D. immitis} + M-{D. repens}	11	30,56%	2,164	
Triple infections	M-{D. immitis} + M-{D. repens} + Leish	7	19,44%	1,187	
	M-{D. immitis} + M-{D. repens} + A. reconditum	3	8,33%	0,447	
	M-{D. immitis} + M-{D. repens} + M. non identifiée	2	5,56%	0,289	
Tétra-infection	M-{D. immitis} + M-{D. repens} + Leish + M{Brugia Sp}.	1	2,78%	0,141	
	M-{D. immitis} + M-{D. repens} + Leish + M-{A. reconditum}	1	2,78%	0,141	

M : Microfilarémie ; **Ag :** Antigénémie ; **Leish :** Leishmaniose ; **D :** Dirofilaria ;

Tableau 26: Comparaison des prévalences parasitaires observées chez les séropositifs à *D.immitis*

Parasitoses	Maladies	« prévalence »	Ecart-type	t: {Valeur observée}	t {Valeur critique}	p-value {bilatérale}
Combinaison 1	Microfilarémie { <i>D. immitis</i> }	0,94	0,23	6,102	1,99	< 0,0001
	Leishmaniose	0,39	0,5			
Combinaison 2	Microfilarémie { <i>D. immitis</i> }	0,94	0,23	3,4	1,99	0,001
	Microfilarémie { <i>D. repens</i> }	0,64	0,5			
Combinaison 3	Séropositif { <i>D. immitis</i> }	0,97	0,17	0,58	1,99	0,56
	Microfilarémie { <i>D. immitis</i> }	0,94	0,23			
Combinaison 4	Microfilarémie { <i>D. repens</i> }	0,64	0,5	2,16	1,99	0,034
	Leishmaniose	0,39	0,5			
Combinaison 5	Microfilarémie { <i>D. immitis</i> }	0,94	0,23	12,68	1,99	< 0,0001
	Microfilarémie { <i>A. reconditum</i> }	0,11	0,32			
Combinaison 6	Microfilarémie { <i>D. repens</i> }	0,64	0,49	5,44	1,99	< 0,0001
	Microfilarémie { <i>A. reconditum</i> }	0,11	0,32			
Combinaison 7	Leishmaniose	0,39	0,49	2,83	1,99	0,006
	Microfilarémie { <i>A. reconditum</i> }	0,11	0,32			

Tableau 27: Corrélations positivement significatives observées entre les différentes coinfections parasitaires, {Coefficient de Correlation de Pearson avec P-value/Seuil de Signification =0,05}, Extraites de la matrice de Corrélation de Pearson.

	M {D. i}	SéroP	M {D. r}	Leish	M Non identifiés	Brugia sp.	Inf occulte {D. immitis}	SéroN
Microfilarémie {D. immitis}	r=1 {p=0}	r=0,999 {p<0,0001}	r=0,97 {p<0,0001}	r=0,878 {p=0,002}	r=0,736 {p=0,026}	r=0,713 {p=0,031}	////	////
Séropositif	r=0,999 {p<0,0001}	r=1 {p=0}	r=0,97 {p<0,0001}	r=0,888 {p=0,001}	r=0,73 {p=0,026}	r=0,713 {p=0,031}	////	////
Microfilarémie {D. repens}	r=0,97 {p<0,0001}	r=0,97 {p<0,0001}	r=1 {p=0}	r=0,813 {p=0,008}	r=0,73 {p=0,024}	r=0,713 {p=0,031}	////	////
Leishmaniose	r=0,878 {p=0,002}	r=0,888 {p=0,001}	r=0,813 {p=0,008}	1 {p=0}	r=0,735 {p=0,024}	r=0,772 {p=0,015}	////	////
Microfilaires Non identifiés	r=0,73 {p=0,026}	r=0,73 {p=0,026}	r=0,736 {p=0,026}	r=0,735 {p=0,024}	r=1 {p=0}	////	////	////
Brugia sp.	r=0,713 {p=0,031}	r=0,713 {p=0,031}	r=0,713 {p=0,031}	r=0,772 {p=0,015}	////	r=1 {p=0}	////	////
Infection occulte {D. immitis}	////	////	////	////	////	////	r=1 {p=0}	r=0,73 {p=0,023}
Séronégatif	////	////	////	////	////	////	r=0,73 {p=0,023}	r=1 {p=0}

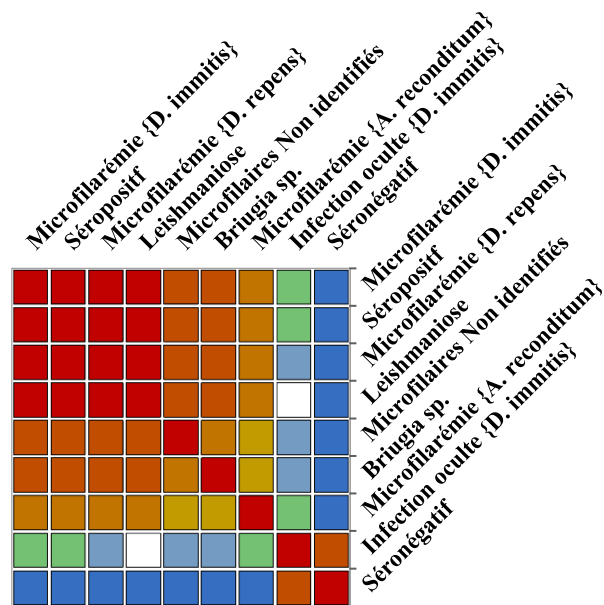


Figure 40: Carte des corrélations, à échelle froid-chaud, Du bleu vers le rouge, selon l'intensité des corrélations négatives & positives respectivement, et le vert traduit l'absence de toute corrélation.

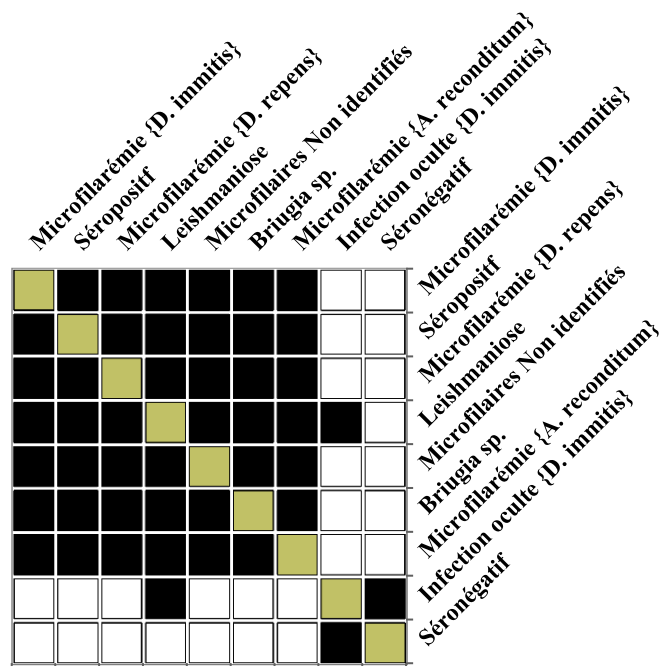


Figure 41: Carte des corrélations noir et blanc pour l'identification des corrélations positives et négatives respectivement.

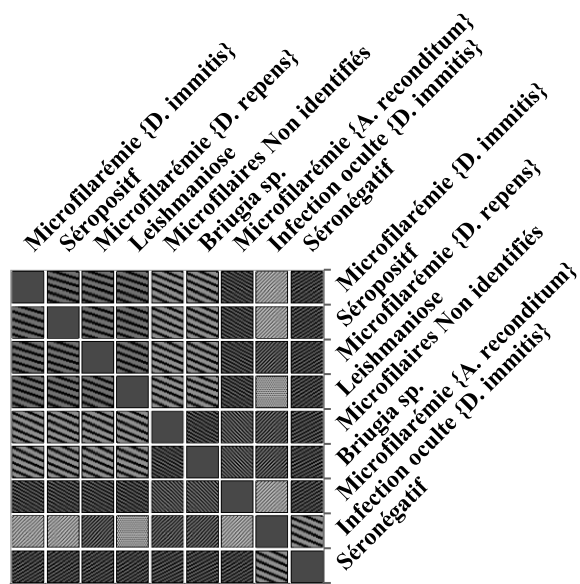


Figure 42: Carte des corrélations et leur intensités, les lignes partant du bas à gauche vers le haut à droite correspondent aux corrélations positives, et vice-versa

Discussion

I. ETUDE EPIDEMIO-CLIMATIQUE DES DIROFILARIOSES CANINES EN ALGERIE

1. Validation du modèle utilisé

Les modèles climatiques prédictifs utilisant le concept du degré de développement quotidien (DDQ) ont été développés pour plusieurs maladies à importance parasitaire [Malone, 2005]. Cependant les modèles climatiques développés pour le contrôle des dirofilarioses sont basés essentiellement sur la détermination de l'effet de la température sur l'incubation extrinsèque des larves parasites chez le moustique, qui est une exploitation des résultats de l'étude de Fortin & Slocombe (1981), qui ont mis en évidence que le développement à 30°C, des microfilaires de *D. immitis* vers le stade infectant L3 chez *Aedes vexans*, *Ae. triseriatus*, et *Anopheles quadrimaculatus* nécessitaient 8 à 9 jours, cette durée augmentait à 10-14 jours pour une température de 26°C, et 17 jours à 22°C, et 29 jours à 18°C. Le temps du développement extrinsèque de *D. repens* est partiellement similaire à celui de *D. immitis* pour les différentes températures, le stade infectant est atteint entre 8-13 jours pour une température de 28°-30°C, et 10-11 jours à 26°C, 16-20 jours à 22°C chez *Aedes aegypti*, *Ae. caspius*, *Ae. detritus*, *Ae. vexans*, *An. claviger*, *An. maculipennis*, *Culex pipiens* [Webber et Hawking, 1995 ; Bain, 1978 ; Cancrini et al., 1988]. Chez *Ae. alobopictus* le développement des microfilaires vers le stade infectant L3 prend 14-18 jours à 26°C pour *D. immitis* et 16-18 jours pour *D. repens* [Cancrini et al, 1995]. Il se trouve qu'à partir de ces données, des modèles climatiques prédictifs ont été développés pour le contrôle du développement et de la saisonnalité de *D. immitis* et *D. repens* en Europe [Genchi et al, 2011]. Et l'inspiration de tous les autres modèles, Sassnau et collaborateurs ont utilisé la notion de P₃₀, qui correspond au nombre de périodes de 30 jours successifs où la transmission est possible pour décrire l'activité de la dirofilariose d'une zone et période données [Sassnau et al, 2014].

Les deux modèles (Classique et mensuel ponctuel/continu) fournissent des résultats identiques, notamment ceux liés aux nombre de générations de dirofilaires { $t = -0,264$ et $p\text{-value} = 0,79$; $R^2 = 0,97$ }, dont les valeurs obtenues par les deux méthodes sont corrélées significativement positivement pour l'ensemble des zones décrites { $r_s = 0,14$; $J = -0,123$; $0,447$ }.

Le biais qui existe entre les deux modèles reste négligeable { $\text{Biais} = -0,04$ / IC : $J = -0,346$; $0,266$ }, ce qui traduit d'une part, la validité du modèle mensuel ponctuel comme nous l'avons indiqué, d'autre part les seuils atteints en dehors de la saison de transmission sont aussi négligeables, signalant ainsi le caractère purement saisonnier de la dirofilariose en Algérie. Cette même validité du modèle mensuel ponctuel a été obtenue sur le territoire de l'Amérique Latine où

les valeurs de GDa sont identiques $\{F=0,16 \text{ et } p\text{-value}=0,85\}$, et montrent une bonne corrélation $\{r_s=0,4 \text{ et } p\text{-value}<0,001\}$ [Cuervo et al, 2015].

2. Transmission théorique des dirofilarioses en Algérie selon un modèle mensuel ponctuel

Le modèle mensuel ponctuel a prouvé sa validité, notamment lorsqu'il s'agit d'un pays ou un continent [Cuervo et al, 2015]. Son utilisation dans la présente étude a révélé la possibilité de la transmission théorique des dirofilarioses dans tout le nord Algérien, mais avec des intensités variables comprises entre 10 à 20 GDa. Cette intensité a été rapportée par le même modèle prédictif en Amérique Latine dans le secteur géographique {délimité par : $40^\circ W$; $70^\circ W$ & $30^\circ S$ et $20^\circ S$ } se trouvant au milieu du continent, bordé par des zones à activité intense dans le Nord {30 à 45 GDa}, et faible dans le Sud {0 à 10 GDa} [Cuervo et al, 2015]. Notre pays qui présente une similarité avec les pays du bassin méditerranéens où 11 à 15 GDa ont été enregistré par le modèle classique [Genchi et al, 2009 ; Luis Simón et al, 2014 ; Lavinai Ciucà et al, 2016].

3. Le modèle épidémio-climatique

3.1. Validation du modèle

Les modèles prédictifs décrivent généralement les zones géographiques par l'intensité (nombre de GDa ou UDDa) et la saisonnalité de la transmission de la dirofilariose, mobilisant de ce fait le système d'information géographique (GIS) pour la création des cartes prédictives [Genchi et al, 2009^{a&b} ; Sassnau et al, 2014 ; Luis Simón et al, 2014 ; Lavinai Ciucà et al, 2016]. Ces cartes restent séduisantes, mais elles oublient en général d'inclure plusieurs facteurs potentiellement importants, tels que l'influence du microclimat, les habitudes biologiques et l'adaptation des moustiques vecteurs, les variations dans le temps du développement larvaire, l'espérance de vie des moustiques et les fluctuations de la température [AHS, 2014]. Le modèle épidémio-climatique développé dans la présente étude a permis de mieux décrire l'activité de la dirofilariose en combinant les prédictions liées au développement intrinsèque et extrinsèque de *Dirofilaria* chez ses hôtes définitif et intermédiaire respectivement, tel que la vitesse de reproductibilité, la durée de vie des larves infectantes chez le moustique et le nombre des néo-génération issues des incubations intrinsèque et extrinsèque avec la détermination de la vitesse de propagation. Cet ensemble de paramètres complète le modèle proposé par Sassnau et collaborateurs en 2014, basé sur la notion des dates et périodes liées à l'infection des hôtes de dirofilaria [Sassnau et al, 2014]. Quatre secteurs épidémio-climatiques caractérisent le nord Algérien. Il est toujours possible d'enrichir les

modèles prédictifs par de nouveaux paramètres et données épidémiologiques, notamment les espèces du vecteur incriminées dans la transmission des dirofilarioses, qui peuvent vivre et se reproduire sur des périodes bien plus longues, comme *Aedes albopictus* (3 mois) [Löwenberg Neto et Navarro-Silva, 2004], *Aedes sticticus* (3 mois) [Gjullin et al, 1950], *Ochlerotatus* (autrefois *Aedes*) *trivittatus* (2 mois) [Christensen et Rowley, 1978], *Aedes vexans* (2 mois) [Gjullin et al, 1950], et *Aedes canadensis* (plusieurs mois) [Pratt et Moore, 1960]. Voir même des cas d'hibernation d'*Anopheles quadrimaculatus* qui peut survivre 4 à 5 mois [Hinman and Hurlbut, 1940]. Dans ce sens, le modèle le plus complet reste celui qui prend en charge tous ces paramètres. Récemment, aux USA, Bowman et collaborateurs ont développé un modèle Spatio-temporel qui inclue seize de ces facteurs y compris les espèces de moustique, ce qui a permis d'obtenir un meilleur ajustement pour la prédiction de l'activité de la dirofilariose en fonction des zones géographiques $\{R^2 = 0,94\}$ [Bowman et al, 2016].

3.2. Transmission théorique en Algérie selon le modèle épidémioclimatique

L'activité commence généralement et différemment dans les différents secteurs à partir du mois d'avril $\{R^2=0,407 ; F=9,386 ; p\text{-value}<0,0001\}$. Mais l'activité ne devient considérable qu'à partir de la troisième semaine de ce mois, et ce pour le secteur-II **$\{37,5\%$ de zones en activité ; $t=3,079 ; p\text{-value}= 0,004\}$** , et la première semaine du mois de mai pour le secteur-III **$\{41,18\%$ de zones en activité ; $t=2,861 ; p\text{-value}=0,007\}$** , la deuxième semaine du mois de mai pour le secteur-I **$\{66,7\%$ de zones en activité ; $t=3,358 ; p\text{-value}=0,002\}$** , et finalement le secteur-IV qui s'active complètement à partir de la quatrième semaine du mois de mai **$\{100\%$ de zones en activité**. Cette activité se maintient à sa phase plateau pour les quatre secteurs jusqu'au début d'octobre. Pour qu'ensuite l'extinction de l'activité commence à s'enregistrer dans le secteur-IV à partir de la quatrième semaine du mois d'octobre lui conférant une période de 20 semaines de transmission théorique, puis le secteur-I qui s'éteint au début de novembre après 22 semaines transmission, tandis que les deux autres secteurs (III & II) l'activité persiste jusqu'à la troisième semaine du mois de novembre, ce qui correspond à 25 et 27 semaines de transmission respectivement.

Cette saisonnalité de l'activité théorique de la dirofilariose semble être proportionnellement similaire avec celle obtenue en Espagne, décrite par 20% de zones en activité le mois d'Avril, 60% en Mai, 93,33% en Juin et comme valeur maximale 100% en juillet, à partir du mois d'Aout la baisse de l'activités des zones commence à être enregistrée 86,67% de zone actives, 60% d'activité en mois de Septembre, et qui disparaît en mois d'Octobre sauf dans les zone à activité annuelle qui

représentent 6,67% [Luis Simón et al, 2014]. En Europe le pic d'activité géographique est atteint généralement le mois de Juillet avec 96,68% soit 1255/1298 zones actives qui baissent légèrement au mois d'Aout 1195/1298 92,06% [C. Genchi et al, 2005 & 2009]. Une étude réalisée en 2011 sur le Nord-Est du continent Européen incluant 19 pays (L'Albanie, Autriche, Belarus, Herzégovine De la Bosnie, Croatie, République Tchèque, Allemagne, Grèce, Hongrie, Lettonie, Lituanie, Macédoine, Moldavie, Pologne, Roumanie, Serbie, Slovaquie, Slovénie, Ukraine) avec 854 zones analysés, a montré une activité de 13,11% en mois de Mai, 42,74% Juin, 64,17% en Juillet avec un pic au mois d'Aout 64,40%, pour ensuite enregistrer la diminution à partir du mois de Septembre 26,81%, 7,61% en Octobre, et 1,05% en Novembre [Genchi et al, 2011]. Le sud de l'Amérique Latine présente 41/49 zones actives soit 83,67% d'activité totale, et au sein des 41 zones actives, il était décrit qu'une zone présente une activité continue durant toute l'année 2,44%. Le début de l'activité s'observe le mois d'Aout 7,32%, qui augmente progressivement à 14,63% de zones actives au mois de Septembre, 48,78% en Octobre, 82,93% en Novembre, une phase plateau est notée tout au long de la période comprise entre Décembre et Mars avec 97,56% d'activité, à partir du mois de Mars la diminution s'observe 92,68% le mois d'Avril, 43,9% Mai, et 9,76% le mois de Juin [Cuervo et al, 2013].

3.3. Exploitation du modèle epidémio-climatique, stratégie de lutte, prévention et dépistage en Algérie

La prévention contre la propagation et l'endémisation des dirofilarioses chez les chiens est possible [McCall et al, 2008 ; Traversa et al, 2013 ; Genchi et al, 2013].

Les stratégies de prévention chez les chiens contre le risque des dirofilarioses tiennent compte de trois points [Sassnau et al, 2014]:

- ❖ Diagnostic ou dépistage primaire ;
- ❖ Prévention de l'infection chez le vecteur ;
- ❖ Prévention de l'infection chez l'hôte vertébré ;

Le dépistage est réalisé par des techniques sérologiques, généralement des ELISA destinés à la détection des antigènes de *D. immitis* qui n'est possible qu'à partir du cinquième voire le sixième mois post-infection. Chez les chiens faiblement infectés la détection des antigènes n'est pas possible, et si elle l'est, elle prend un caractère sporadique [AHS, 2014]. Cependant les autres moyens de diagnostic (Parasitologie ou Biologie moléculaire) sont applicables uniquement sur les sujets en phase de patence au-delà de sept mois post-infection [AHS, 2014 ; Sassnau et al, 2014].

Dans ces cas le dépistage d'infections contractées l'année dernière peut fournir des faux négatifs [Sassnau et al., 2014]. Ceci entraîne un échec de prévention et de dépistage de ces parasitoses.

Le chien est le réservoir le plus important des dirofilarioses à *D. immitis* et *D. repens*. La prévention des deux infections s'obtient par le traitement via les dérivés des lactones macrocycliques [McCall, 2005 ; McCall et al, 2008 ; Fok et al, 2010 ; Genchi et al, 2013]. La prévention est basée sur l'activité larvicide de ces dérivés sur le 3^{ème} et le 4^{ème} stade (L3 & L4) larvaire des *Dirofilaria* [Sassnau et al, 2014]. Actuellement, l'administration de ces produits a pour objet d'interrompre le développement des larves inoculées par le moustique durant les 30 à 60 jours précédents. Toutes les substances préventives contre les dirofilarioses ont un large spectre, et leur administration mensuelle est tolérable. Ce qui est très utile en période de forte activité [Sassnau et al, 2014]. Pour une meilleure prévention, la première administration est faite le premier mois de la saison de transmission (début d'exposition au risque), et la dernière administration dans le mois qui suit l'arrêt de l'activité du moustique. Cependant les dérivés des lactones macrocycliques ont une activité préventive de type rétroactive sur les infections patentes et la microfilarémie, ce qui correspond au 3^{ème} à 4^{ème} mois post-infection [McCall, 2005].

Grâce au modèle épidémio-climatique fourni par la présente étude, il est possible d'améliorer le dépistage, le traitement et la prévention des dirofilarioses canines dans le nord de l'Algérie. Trois administrations des dérivés de lactone macrocyclique sont souhaitables, de sorte que la première administration corresponde au début de la saison dans chacun des secteurs épidémio-climatiques, ce qui correspond à la 3^{ème} Sem/Mai ; 4^{ème} Sem/Avr. ; 1^{ère} & 4^{ème} Sem/Mai pour les quatre secteurs épidémio-climatique (I, II, III, IV) respectivement. La deuxième administration à un intervalle de 3 mois, afin de la faire avec la période la plus active (Juillet-Aout) et rester toujours dans le cadre de la prévention contre les infections patentes (3 à 4 mois). Ce qui correspond à la 2^{ème} Sem/Aout. ; 3^{ème} & 4^{ème} Sem/Juil. Et 3^{ème} Sem/Aout, pour les Secteurs-I, II, III, IV respectivement, la troisième administration à un intervalle de 4 mois, si la saison de transmission est suffisamment longue, ceci coïncide avec la dernière semaine de la saison de transmission pour le secteur-II (2^{ème} semaine du mois de novembre), qui est aussi la dernière semaine de la saison de transmission dans le secteur-III, et elle aura lieu la 4^{ème} et la 3^{ème} Sem/Oct. Pour les Secteur-I et IV respectivement.

Le calendrier de prévention en Algérie, que nous venons de proposer est un peu lourde en le comparant avec celle recommandée en Allemagne, qui consiste en deux administrations à 4 mois

d'intervalle, coiffant la saison de transmission, dont la première est recommandée en fin de mai/début de juin et la deuxième en fin de septembre/début d'octobre [Sassnau et al, 2014].

Le dépistage sérologique orienté vers la détection des antigènes de *D. immitis* sera de plus en plus efficace à partir de la 1^{ère} semaine du mois d'octobre dans les secteurs-I et III, et la 3^{ème} semaine du mois de septembre dans le secteur-II et la 3^{ème} semaine du mois d'octobre dans le secteur-IV.

Le résultat du diagnostic parasitologique et/ou moléculaire visant les microfilaires, devient de plus en plus fiable à partir de la première semaine du mois de décembre dans les secteurs-I et III, et la 3^{ème} semaine du mois de novembre dans le secteur-II et la 3^{ème} semaine du mois de décembre dans le Secteur-IV.

3.4. Evolution annuelle de l'effet climatique sur les Dirofilariose :

L'évolution de l'effet climatique, notamment le nombre de GDa et la durée de la période de transmission à subir une augmentation significative entre 2013 et 2015, parallèlement la période et le nombre de GDa ont augmentés, tout en gardant le lien entre elles $\{R^2>0,78\}$ pour les trois années. Ce caractère évolutif de l'activité climatique des dirofilariose a été observé dans les différentes régions du globe et particulièrement en Europe [Luis Simón et al, 2014 ; Genchi et al, 2005 & 2009 ; Sassnau et al, 2014]. Et aux USA [Bowman. et al, 2016]. Ainsi qu'en Amérique Latine [Cuervo et al, 2013 & 2015].

II. ETUDE SEROLOGIQUE DE LA DIROFILARIOSE CARDIOPULMONAIRE CANINE

1. Séroprévalence de la Dirofilariose cardiopulmonaire canine en Algérie

L'étude sérologique réalisée sur 140 chiens provenant du Nord Algérien {Sétif & Bouira}, a permis de révéler l'existence des antigènes de *D. immitis* dans le sang de $82,85\% \pm 3,26$, de ces chiens. Cette séroprévalence indique un état alarmant dans ces régions. En effet, ce type de résultats est souvent rencontré dans les zones endémiques, notamment lorsqu'il s'agit de zones (plus de 74% dans le nord Est de Formosa (Amérique de sud) [Mancebo et al., 1992]). En Asie, particulièrement à Hoengsöng-gun 84,4%, et 53,8% chez les chiens vivant à l'extérieur [Lee, 2003 ; Liu et al, 2005]. En Europe, notamment les pays méditerranéens des prévalences allant de 2% à 48% ont été rapportées [FEDD, 2007]. En Italie les chiens qui n'ont pas subi une prévention présentent des prévalences allant de 50% à 80% [Genchi et al, 2001].

En Afrique (Tanzanie) une prévalence de 10,2% a été rapportée [Matola, 1991]. Dans notre pays une prévalence de 24,46% a été rapportée à Alger en 2009 [Ben-Mahdi & Madani, 2009] et 0,0% à Tiaret, en 2015 [Abdelkader & Aissi, 2015]. Cette différence des chiffres, peut être liée à l'épidémiologie de cette maladie qui semble être en lien direct avec un ensemble de facteurs modulant son activité d'une région à l'autre, et d'une période à l'autre.

2. Etude des facteurs de risque influençant la séroprévalence

La connaissance des facteurs de risques susceptibles de favoriser l'infection par *Dirofilaria immitis* chez le chien est nécessaire pour une bonne compréhension de son épidémiologie, son diagnostic, ainsi que leurs implication en terme de stratégie de prévention afin de limiter sa propagation.

2.1. Facteurs de risque à effet intrinsèque

2.1.1. Le facteur âge

L'âge est considéré comme un facteur de risque important [Köse et al, 2012]. Dans cette étude, plusieurs interactions ont été rapportées entre ce facteur et la dirofilariose cardiopulmonaire canine. La séroprévalence de cette dernière s'influence par l'âge $\{X^2=9,54 ; p\text{-value}<0,0001\}$, l'augmentation de l'âge chez les chiens s'accompagne par l'augmentation de la séroprévalence

{ $R^2 = 0,874$ }, ceci rejoint les résultats de Carla Maya où la progression de l'âge est accompagnée d'une augmentation de la prévalence {4,3% ; 13,4% & 15,8% qui correspondent respectivement aux tranches d'âge suivantes [1–11], [12–83] et [84–192] mois} [Carla Maya et al, 2016]. Idem pour la majorité des autres études [Yuasa Y et al., 2012 ; Yildirim A et al, 2007 ; Lavinia Ciucà et al, 2016 ; Guk-Hyun Suh et al, 2017 ; Martina Miterpáková, et al., 2016 ; J. A Montoya-Alonso et al, 2015 ; Ana Luisa Vieina et al, 2014 ; Ana Margarita et al, 2014 ; Dario Vezzani et al, 2011 ; Chukwuebuka Iniobong Ikenna Ugochukwu et al., 2016]. Globalement l'augmentation de la séroprévalence entre les jeunes et les adultes peut être expliquée par l'exposition au risque qui s'intensifie avec l'âge [Yuasa Y et al, 2012 ; Yildirim A et al, 2007].

Dans l'autre sens l'âge de la population canine s'influence par la présence de la dirofilariose { $X^2=22,22$; $p\text{-value}<0,0001$ }, que nous avons expliqué par l'effet engendré par l'activité épidémioclimatique de la dirofilariose qui semble avoir un lien avec l'âge des sujets, de sorte que ces derniers s'infectent et disparaissent tôt dans les zones à forte activité, et vice-versa.

L'âge moyen de l'atteinte par la dirofilariose est estimé à 3,65 ans dans la population canine étudiée, cette juvénilité est accompagnée par une forte endémisation {82,86% $\pm$ 3,26}. En comparant nos résultats avec ceux des autres études, on constate que la juvénilité disparaît progressivement d'une manière inversement liée à la prévalence ou la séroprévalence de la dirofilariose, il a été rapporté que l'âge de 5,6 ans est accompagné d'une prévalence de 20,6% [Yumi Y et al, 2012]. Alors que l'âge de 7,32 ans s'observe au sein d'une population faiblement atteinte 2,4% [J. A. Montoya-Alonso et al, 2014]. Généralement l'âge moyen de l'atteinte par la dirofilariose est >5ans lorsque les prévalences sont comprises entre 2 et 15% [Carla Maya et al, 2016 ; J. A. Montoya-Alonso et al, 2015 ; Ana Luisa Vieina et al, 2014 ; Ana Margarita et al, 2014 ; Dario Vezzani et al, 2011].

2.1.2. Le sexe de l'animal et l'effet du statut maternel

Dans notre étude, l'effet du genre de l'animal sur la dirofilariose est jugé statistiquement neutre { $X^2=3,841$; $p\text{-value}=0,856$ }, tout comme la majorité des études [Guk-Hyun Suh et al, 2017 ; Lavinia Ciucà et al, 2016 ; Martina Miterpáková et al, 2016 ; Ana Luisa Vieina et al, 2014 ; Rapti and Rehbein 2010 ; Yumi Yuasa et al, 2012 ; Ben-Mahdi & Madani, 2009 ; Yaman et al, 2009 ; Montoya et al, 2006 ; Song et al, 2003]. En revanche certains auteurs ont rapporté que l'atteinte est plus fréquente chez les males que chez les femelles [José Alberto Montoya-Alonso et al, 2015 ; Ana Margarida et al, 2014 ; Mircean V et al, 2012 ; Dario Vezzani et al, 2011 ; Traversa D et al, 2010]. Expliqué par le fait que les males attirent plus de moustiques [Montoya et

al., 1998]. Récemment l'étude de Montoya a montré le contraire, et ce sont les femelles qui s'infectent considérablement cette fois-ci [*J ; A. Montoya-Alonso et al, 2016*].

Jusqu'à l'heure actuelle, l'instabilité de ce facteur n'est pas bien étudiée chez l'espèce canine, mais elle a été mieux expliquée chez l'espèce féline en évaluant l'effet de l'intégralité sexuelle sur la dirofilariose cardiopulmonaire, de sorte que l'infection est considérable chez les femelles sexuellement intactes suivie par les males sexuellement intactes et en troisième lieu l'effet devient négligeable chez les sujets stériles [*Tina S. et al, 2000 ; Julie K. Levy et al, 2017*]. Ce même résultat a été obtenu au regard du statut maternel, représenté dans la présente étude par la gestation/portée/allaitement {*EM-H, $X^2=4,297$; $p\text{-value}=0,038$* }, et se sont les femelles qui ont eu ce statut qui s'infectent le plus {*91,13% $\pm$ 11,57; $n=23$* }, suivies par les mâles {*83,17% $\pm$ 7,07; $n=107$* }, et en troisième lieu les femelles qui n'ont pas eu ce statut {*60% $\pm$ 30,4; $n=10$* }. Ce qui peut être expliqué par l'effet accompagnant le changement naturel la physiologie sexuelle chez l'hôte vertébré.

2.1.3. La race

Notre étude montre que la séroprévalence de la dirofilariose n'est pas influencée pas par la race de l'animal { *$X^2= 20,16$; $p\text{-value de } 0,385$* }. A l'opposé des résultats d'autres études où les races croisées sont plus atteintes que les races locales ou exotiques [*Chukwuebuka Iniobong Ikenna Ugochukwu et al, 2016 ; J. A. Montoya-Alonso et al, 2015*]. Mais il a déjà été décrit que l'influence entre les races croisées et locales est négligeable. L'effet réside essentiellement dans la longueur des poils, qui peut être liée à certaines races particulières, ce qui module l'infection par *D. immitis* [*Dario Vezzani et al, 2011*].

2.1.4. L'activité de l'animal

L'activité de l'animal n'influence pas la séroprévalence de la dirofilariose dans la présente étude { *$X^2= 2,610$; $p\text{-value}= 0,625$* }, à l'exception des chiens errants qui sont significativement positifs, ce que l'on explique par l'effet de l'absence totale des mesures préventives, et d'entretien chez ces chiens. Ce genre de constat a été observé en Italie où les chiens qui n'ont pas subi de prévention, présentent des prévalences allant de 50% à 80% [*Genchi, et al., 2001*]. Revenant à l'évolution de la séroprévalence observée dans cette étude, qui est en lien avec le mode de vie qu'exige l'activité de l'animal, les valeurs sont de plus en plus importantes si l'animal passe plus de temps à l'extérieur. Ceci rejoint les résultats de la majorité des études. Les réservoirs qui ne subissent pas de protections (vie à l'extérieur) notamment les canidés sauvages (*Canis lupus*, *C.*

latrans, *C. aureus*, *Vulpes vulpes*, *Urocyon spp.* Et *Nyctereutes procyonides*) montrent des prévalences relativement élevées : Aux USA, 21 à 42% chez les coyotes [McCall JW. et al., 2008]. Entre 58 à 100% chez les renards en Island [Roemer et al, 2000], 82% chez les coyotes en Floride [Amber M. Aher et al, 2016]. Le mode de vie à l'extérieur rend l'animal sensible à la dirofilariose [Anastasia Diakou, et al, 2016 ; Ana Luisa Vieira et al, 2014 ; Ben-Mahdi & Madani, 2009].

2.1.5. L'état clinique

La clinique de l'animal n'influence la séroprévalence de la dirofilariose ($\chi^2_{EM-H} = 0,92$; $p\text{-value} = 0,34$). Par contre chez les sujets présentant des manifestations cliniques, la fréquence de la dirofilariose devient de plus en plus importante lorsque les atteintes clinique sont multiples, cette influence a été déjà rapportée par plusieurs études [Ben-Mahdi & Madani, 2009 ; Serrano. Parreno et al, 2017 ; AHS, 2014]. L'ensemble des symptômes extraits du tableau clinique de la dirofilariose, ne reflètent pas toujours l'atteinte, notamment les signes isolés tel que l'amaigrissement ou l'adénopathie, ceci a été rapporté dans les infections immatures, ou à une mort parasitaire suivie d'une clairance des antigènes [McCall et al, 2008 & Dwight Bowman and Atkins, 2009 ; AHS, 2014]. En revanche l'impact devient important à partir de l'apparition des atteintes respiratoires isolées, ou en association avec les autres signes, ces combinaisons se figurent dans le tableau clinique de la dirofilariose [Serrano. Parreno et al, 2017]. Bowman et Atkins ont défini la clinique de la dirofilariose par une clinique occulte dans la majorité des cas tout comme notre résultat où {85,23%, $n = 88$ } de séropositifs sont asymptomatiques. Ce type de résultat a déjà été décrit en Algérie, avec {75,56%, $n = 45$ } de sujet sans signes cliniques mais séropositifs [Ben-Mahdi & Madani, 2009] et {58,97% ; $n=156$ } sans symptômes [J. C. Méndez et al, 2014]. Par contre si les symptômes cliniques sont exprimés au cours des infections chroniques ou sévères, l'atteinte pulmonaire est toujours présente [McCall et al., 2008 & Dwight Bowman et Atkins, 2009], ou au moins l'un des signes suivants : Toux, dyspnée, Hémoptysie, emphysème pulmonaire, syncope et ascite, cachexie, intolérance à l'exercice [J. C. Méndez et al, 2014]. En revanche la séropositivité associée à la dépilation {86,67% ; $n=30$ }, peut être expliquée par le simple fait que l'absence des poils amplifie la prédisposition des sujets aux piqures de moustiques. Ce même phénomènes est rapporté chez les chiens à poils courts qui permettent eux aussi une accessibilité facile à la peau par les moustiques vecteurs [Vezzani et al, 2011 ; Miterpáková et al, 2016].

2.1.6. Le statut immunitaire

Plusieurs études suggèrent qu'une réponse immunitaire protectrice se développe éventuellement contre les différents stades de développement de *D. immitis* chez son hôte [Doug, 2017]. Suite à des infections expérimentales, toutes les larves L3 inoculées n'arrivent pas au terme de leur développement [Yoshida et al, 1997]. Ce qui a été expliqué par l'effet de la réponse immunitaire qui entrave le développement parasitaire [Yoshida et al, 1997 ; Mejia and Carlow 1994 ; Doug, 2017]. Dans la présente étude une approche d'évaluation du statut immunitaire a été adoptée, en se référant à certains indices connus pour leur effet immunosuppresseur, notamment la leishmaniose clinique. Ce qui a permis de révéler effectivement un lien significatif entre ce facteur et la séroprévalence en antigène de *D. immitis* { $X^2= 25,871$; $p\text{-value} < 0,0001$ }.

Cette même approche est rencontrée dans une étude menée sur l'espèce féline aux USA et au Canada sur 34975 chat, où les maladies immunodéprimantes représentées par la Leucose Féline ou l'atteinte par le virus de l'Immunodéficience féline {FeLV ; FIV}, notamment lorsqu'il s'agit de la triple-infection avec la Dirofilariose {OR=25 ; $p\text{-value}<0,001$ } [Levy et al, 2017]. Maintenant, chez les chiens aucune étude expliquant la séroprévalence par les immunodépressions secondaires à des coinfections, n'a été documentée, sauf au Portugal, où dans particulièrement les zones endémiques par ces deux parasitoses, la majorité des chiens atteints par la Dirofilariose étaient coinfectés par la Leishmaniose (19/26 Co-infectés) [Carla Maya et al, 2016].

2.2. Facteurs de risque à effet intrinsèque

2.2.1. L'origine géographique

Les résultats obtenus, montrent que l'origine géographique semble avoir un effet significatif sur la séroprévalence de la dirofilariose cardiopulmonaire canine { $t=4,263$; $p\text{-value}<0,0001$ }, et les sujets se trouvant à Sétif {95,71%, $n=70$ }, sont les plus atteints par rapport à ceux issus de Bouira {70%, $n=70$ }. Ce qui s'accorde également avec les autres résultats rapportées en Algérie, on trouve {0%, $n=1300$ } à Tiaret [Ammam & Aissi, 2015] et {24,46%, $n=184$ } à Alger [Ben-Mahdi & Madani, 2009]. Ceci est compatible avec ce qui a été rapporté ailleurs sur les variations de la séroprévalence de la dirofilariose canine en fonction de l'origine géographique [Javad, et al, 2014 ; Suh et al, 2017 ; Alberto Montoya-Alonso et al, 2015 ; Vezzani et al, 2011 ; Elhamiani Khatat et al, 2017 ; Anastasia Diakou et al, 2016]. De même pour la dirofilariose féline [Levy et al, 2017].

En effet, le changement de l'origine géographique, s'accompagne par le changement de la quasi-totalité des facteurs modulateurs de l'épidémiologie des dirofilarioses, et des maladies

vectorielles en générale, ce qui explique ce lien entre la prévalence et l'origine de l'animale. Aux USA, il a été décrit que les principaux facteurs de risque influençant l'épidémiologie de la dirofilariose sont des facteurs liés à l'origine géographique et à l'écologie, particulièrement la précipitation, l'humidité relative, l'altitude, les surfaces d'eau et la couverture végétale, les espèces de moustiques, ainsi la densité de la population humaine, et les facteurs écologiques [Bowman et al, 2016 ; Wang et al, 2014].

2.2.2. Le secteur épidémio-climatique

Selon nos résultats, les dépistages sérologique et moléculaire couvrent 5 zones géographiques réparties sur les quatre Secteurs épidémio-climatiques précédemment désignés par le modèle épidémio-climatique. Où la fréquence de l'atteinte par *D.immitis* est en association avec le Secteur de provenance, mais avec une instabilité de la compatibilité entre l'intensité de l'activité épidémio-climatique et la fréquence de la maladie chez son hôte vertébré. On compte des séroprévalences différentes { $X^2 = 19,34$; $p\text{-value} < 0,0001$ }, dans le Secteur-IV « Sétif » {Pr : 95,71% +/-3,31 ; 20,45 semaine de transmission ; 11,99 GDa/an} , et {Pr : 66,07% +/-9,81 ; 22,88 semaine de transmission ; 13,60 GDa } dans le Secteur-I « Ain-Bessam »; et finalement le Secteur-III « Bouira » avec {Pr : 85,71% +/-8,29 ; 24,58 semaine de transmission ; 15,21 GDa}.

En effet, cette différence de prévalence peut dans certain cas, résulter de l'effet épidémio-climatique, tout comme le montre les résultats de la sérologie obtenu dans le Secteur-I et III (Ain Bessam & Bouira). Ce cas est particulièrement associé à l'homogénéité démographique des deux sous-populations canine dépistées, et leur voisinage géographique, laissant s'exprimer l'effet climatique.

En revanche l'effet climatique peut ne pas être suffisamment incriminé, et il existe des zones qui ont une activité épidémio-climatique identique mais des écarts important de séroprévalence, comme le montre le résultat que nous avons rapporté à Sétif (95,71%) (Zone du secteur-IV) et celui rapporté récemment à Tiaret (0,00%) (Zone du secteur-IV) [Ammam & Aissi, 2015].

Dans d'autres situations, où l'effet épidémio-climatique est dominé par des facteurs autres que le climat, la fréquence de la dirofilariose sera inversement liée à l'activité épidémio-climatique. Les résultats obtenus dans le secteur-IV et ceux du secteur-II en sont un bon exemple.

Globalement le changement de la zone géographique s'accompagne par un changement du statut de la dirofilariose, [Cuervo et al, 2015 ; Montoya-Alonso et al, 2015 ; Lok JB, 1988]. Mais en regardant les résultats qui s'opposent à ce genre de situation, on trouve que le modèle prédictif fondé sur l'effet climatique, reste intéressant, mais il perd de valeur lorsque les autres facteurs dominant ou altèrent son impact.

La Société Américaine de la dirofilariose cardio-pulmonaire a expliqué ce phénomène associé aux changements environnementaux, le changement climatique naturel aussi celui induit par l'homme, et les déplacements des animaux, ont augmenté le potentiel infestant de *Dirofilaria immitis*. Le développement des projets immobiliers commerciaux et résidentiels dans les zones non endémiques et dans les zones à faible incidence d'infestation, ont conduit à une diffusion et à une prévalence accrue de la dirofilariose en altérant le drainage de terrains inexploités et en acheminant l'eau dans les nouvelles zones urbaines [AHS, 2014]. Ainsi les microfluctuations qui touchent l'une des zones d'un secteur donné peuvent être selon Morchón le résultat de l'étalement urbain qui conduit à la formation d'îlots de chaleur, comme les bâtiments et les parkings qui accumulent la chaleur durant la journée, et créent ainsi des microenvironnements qui peuvent potentiellement aider au développement des larves de *Dirofilaria immitis* chez les moustiques vecteurs durant les mois froids qui sont classés par les modèles prédictifs parmi les mois inactifs, et allonger ainsi la période de transmission [Morchón et al, 2012].

2.2.3. Le nombre de génération de dirofilariose confrontées et période à risque vécue

Brown et collaborateurs (2012) ont recommandé l'évaluation de l'effet des facteurs de risque entre 7 mois à 2 ans avant le jour de l'exploration de la séroprévalence comme perspective dans leur étude [Brown et al, 2012]. Une autre étude indique que la démographie de l'échantillon constitue un facteur influençant la dirofilariose [Dario Vezzani et al, 2011]. Les particularités de la région, et le mode de vie des individus doivent être pris en considération pour un meilleur contrôle des dirofilarioses, ainsi le nombre des périodes de 30 jours successifs « P30 » où la transmission des dirofilarioses est possible a été utilisé en Allemagne pour caractériser une zone et une période données [Sassnau et al, 2014].

Dans notre étude l'âge de l'animal et l'intensité de l'activité épidémio-climatique liée à son origine, ont fait l'objet de l'évaluation de l'effet que subissent les sujets en fonction de ces paramètres, et son impact sur la séroprévalence, différentes classes sont générées en fonction de cet impact, qui influencent significativement $\{X^2=28,52 ; p\text{-value}=0,0015\}$, et équitablement $\{p\text{-value}$

associées au test $Z > 0,05$ la séroprévalence de la dirofilariose au sein des différentes sous-populations canine testées.

A la différence du résultat précédent, liée à l'interprétation de la séroprévalence vis-à-vis l'origine épidémio-climatique, où l'incompatibilité entre les valeurs est omniprésente. L'interprétation devient meilleure, en utilisant l'impact qu'induit l'activité épidémio-climatique dans une population canine donnée, d'une zone donnée. Les séroprévalences obtenues sont en lien direct avec cet impact, on compte {**Moy GDa confrontées=49,04 ; Période à risque vécue= 82,17 semaines ; Age moy=4,09 ans; $P_{révalence}=95,71\%$** } à Sétif « Secteur-IV », et {**Moy GDa confrontées= 39,72; Période à risque vécue=64,17 semaines ; $P_{révalence}=85,71\%$** } pour le secteur-III, et finalement le Secteur-I avec {**Moy GDa confrontées=37,54 ; Période à risque vécue=63,18 semaines ; $P_{révalence}=66,07\%$** }.

Comme nous l'avons indiqué, la validation des modèles prédictifs via des enquêtes sérologiques peut échouer dans certains cas. Ceci a été rapporté en Amérique Latine particulièrement à Bogota en Colombie et la Ville appelée où des incohérences entre les séroprévalences et l'activité climatique ont été rapportées [Cuervo et al, 2015]. Mais en général la séroprévalence est proportionnellement liée au nombre de GDa ou UDDa [Lavinia Ciucà et al, 2016 ; Cuervo et al, 2015 ; Bowman et al, 2016 ; Dongmei Wang et al, 2014], ainsi avec la longueur de la période de transmission [Claudio Genchi et al, 2005 ; J.M. Medlock et al, 2007]. En Espagne, particulièrement à Barcelone, le modèle de prédiction géo-spatiale de l'activité de la dirofilariose utilisant le nombre de GDa, a été validé par une enquêtes sérologique [Montoya-Alonso et al, 2015]. Dans la présente étude cette nouvelle approche d'évaluation a permis de corriger les biais masquant l'effet climatique, tout en améliorant aussi la qualité des prévisions si la démographie de la population canine est connue.

III. ETUDE PARASITOLOGIQUE

1. Rappel sur la technique d'échantillonnage, et l'examen parasitologique

Avant de faire l'analyse des résultats obtenus dans cette étude, il nous paraît nécessaire de discuter le protocole général et le principe de l'examen parasitologique, afin de faire ressortir ses avantages et ses limites.

Il s'agit de la technique modifiée de Knott, la technique de référence pour le diagnostic de la dirofilariose [Magnis J, et al., 2013]. Une technique de concentration des microfilaires [Genchi et al., 2007]. Ces derniers présentent chez *D. immitis* et *D. repens* des fluctuations tout au long du nycthémère [Angela Monica Ionica, et al, 2017], connues sous le nom du cycle circadien, qui présente aussi un lien avec l'origine géographique [Di Cesare et al, 2013; Bowman & Atkins, 2009]. Ce qui rejoint les résultats rapportés ailleurs, en Tanzanie, où le maximum des concentrations des microfilaires est enregistré à 11h :00 [Matola YG. 1991]. A 6h pm en Angleterre [Webber et Hawking, 1955]. Entre 19h :00 et 21h :00 en Corée [Rhee JK et al., 1998]. Et entre 21h :00 à 22h :00 au Japon [Nogami S et al, 2000]. Vers 1h :00 en Roumanie [Angela Ionica et al, 2017].

Théoriquement il est possible d'améliorer la détection de ces produits en choisissant la date de l'examen, comme il a été rapporté par la présente étude. Et celle de Capelli, où le nombre le plus important des néo-parasites correspond à ceux contractés en pic d'activité climatique (Juillet), et le nombre de parasites contractés explique la microfilarémie $\{r=0,75 ; p<0,01\}$ [Capelli, G et al, 1996].

La présente étude a exploité ces paramètres afin d'améliorer la sensibilité de l'examen parasitologique, qui a permis la détection 93,75% de sujets microfilarémiques sont ainsi détectés [Ducos & Ducos, 1990]. Du fait qu'aucune étude décrivant le cycle circadien n'été faite ni en Algérie ni en Afrique, nous nous sommes référés à la description du cycle circadien fait en France, où le taux maximal est atteint à 20 :00 h [Euzéby. J., 1990]. Nos prélèvements étaient réalisés entre 16 h et 19 h, au mois de mars ce qui correspond au 9^{ème} mois post-infection pour les parasites contractés en plein activité épidémio-climatique {Juillet-Aout/ [3,15 ; 3,26] GD_{mensuelle} et [425 ; 409] UDD_{mensuelle}}. Ce qui nous a permis de détecter les microfilaires chez 97,14% de séropositifs.

2. Etude des prévalences déterminées par l'examen parasitologique

L'examen parasitologique basé sur l'identification morphologique des microfilaires montre l'existence de six spécimens, agents des filarioses canines dans la région de Sétif, dont la plus importante filariose est celle engendrée par *Dirofilaria immitis* avec $\{94,44\% \pm 7,44 ; n=36\}$ suivit par *Dirofilaria repens* $\{63,89\% \pm 15,69 ; n=36\}$, et en troisième lieu *Acanthocheilonema ou*

Depetalonema reconditum {11,11% $\pm$ 10,31 ; n=36}, suivit par Brugia sp {2,78% $\pm$ 5,42; n=36}, finalement et avec la même fréquence que cette dernière, deux autres spécimens de microfilaria-like non identifiées.

Ce même cumul de filariose a été déjà observé en Brésil chez un autre carnivore, le Coati (Nasua nasua Linnaeus, 1766, Carnivora: Procyonidae), [Figueirêdo Duarte Moraes et al, 2017].

Concernant notre étude où 97,14% de séropositifs se sont avérés microfilarémiques par la technique modifiée de Knott, ce qui marque la rareté de l'infection occulte {2,86% $\pm$ 5,54; n=35}. Ceci s'oppose aux autres études où l'infection occulte est connue par sa grande variabilité de 5 à 25% [L. Stogdale 1984]. Parfois 30% [Megat Abd Rani et al., 2010]. Ce que l'on explique par l'infection chronique déclarée sérologique huit mois avant, et donc absence de l'infection patente, principale cause selon Rawlingsca et al, (198 et Otto, (1978). De même pour l'infection unisexuelle que nous supposons rare, du fait que l'endémicité est trop importante dans la région {95,71% $\pm$ 3,31 ; n=70}. A tous ces facteurs, s'ajoute la périodicité diurne et la saisonnalité [Stogdale, 1984], qui ont été respectées dans la présente étude.

3. Etude des prévalences des coïnfections parasitaires chez les Séropositifs, et leur corrélations

Sur l'ensemble des 36 (100%) sujets étudiés, 35 (97,22%) se sont montrés séropositifs en antigènes de D. immitis, au sein de ces derniers 34 (94,44%) ont présentés aussi la microfilarémie. Cependant le reste des parasitoses diagnostiquées se trouvant en coexistence avec la dirofilariose à D. immitis, d'une manière significativement positivement corrélées entre elles une fois la microfilarémie de D. immitis est présente {0,7 $\leq r \leq 1$; p-value < 0,05}. En revanche, aucune identité entre les fréquences de ces coïnfections n'a été démontrée {t ; p-value < 0,05}. Cependant le dernier sujet séropositif ne montre pas de microfilarémie de D. immitis, mais il présente en coïnfection une leishmaniose subclinique.

Cette association particulière des parasitoses au cours d'une dirofilariose à D. immitis, s'explique par la réponse immunitaire induite par D. immitis qui assure l'induction et la maintenance d'une réponse non protectrice. En effet les sujets microfilarémiques à D. immitis ont une réponse de type Th-2 associée à l'existence de six protéines antigéniques assurant la maintenance de cette réponse immunitaire, par contre les sujets amicrofilarémiques, présentent une réponse de type Th1, résultant de la stimulation par les antigènes de l'endosymbionte Wolbachia, et

de sept autres antigènes de *D. immitis* qui agissent sur la réponse Th1, et ces deux catégories d'antigènes de *D. immitis* ne s'observent pas en coexistence [Oleaga., et al., 2009]. De même pour la leishmaniose canine, où la manifestation clinique de la maladie est conjointe à une réponse de type Th-2, alors que le portage asymptomatique est lié à une réponse de type Th-1 [Yannick et al, 2004]. D'un autre côté, on trouve que les mécanismes et les interactions avec le système immunitaire sont proportionnellement similaires avec les autres filarioses, qui elles aussi favorisent une réponse de type Th-2 [Doug, 2017].

Conclusion

Cette étude nous a permis de mettre en évidence un état alarmant dans le nord Algérien en général et dans les wilayas de Sétif et Bouira en particulier.

Nos analyses mettent aussi en exergue d'un ensemble de facteurs de risque responsables de la transmission des dirofilarioses, et secondairement de l'amplification du réservoir pathogènes au sein de la population canine.

Les examens destinés à la révélation des microfilaires pourraient être améliorés si le prélèvement est réalisé selon des normes chronologiques spécifiques de la filariose dépistée.

Le même calendrier de prévisions, permet de lutter efficacement contre ces maladies, en améliorant la lutte dirigée contre le vecteur et celle contre le réservoir en agissant au bon moment, avec plus d'effet, et à moindre coût. Il serait souhaitable de mettre en place la lutte anti-vectorielle le mois de Juillet et Aout, et une lutte anti-réservoir principalement entre Janvier et Avril.

L'existence des infections multiples, potentiellement zoonotiques, exige une étude approfondie, afin d'explorer le réservoir canin, et d'évaluer son risque pour la santé publique, notamment pour la rage, leishmaniose, la borreliose, les rickettsioses... etc.

Le modèle prédictif que nous avons développé pour le contrôle des dirofilarioses canines, prend en charge uniquement les prévisions liées au développement intrinsèque et extrinsèque du parasite, et mérite d'être enrichi par de nouveaux indicateurs épidémiologiques, notamment les espèces de vecteurs incriminées dans la transmission, les facteurs anthropogéniques, écologique et socio-économiques, avec détermination de leurs implications dans l'épi-système des dirofilarioses en Algérie pour un meilleur contrôle.

Une sensibilisation des vétérinaires, et des propriétaires reste très utile et doit être entreprise afin limiter la propagation de la maladie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. A. Montoya-Alonso, E. Carreton, R. Morchon, L. Silveira Viera, Y. Falcon, and F. Simon., "The impact of the climate on the epidemiology of *Dirofilaria immitis* in the pet population of the Canary Islands," *Veterinary Parasitology*, vol.216, 2016; pp.66–71.
2. Abdelkader Ammam and Meriem Aissi. Contribution to the study of canine heartworm in Tiaret (Algeria). *Animal and Veterinary Advances* 14 (11), 2015; 340-344.
3. Abramowsky, CR. Powers, KG. Aikawa, M. Swinehart, G., *Dirofilaria immitis*. Immunopathology of filarial nephropathy in dogs. *Am. J. Pathol.* 1981; 104:1–12.
4. Aher, AM., Caudill, D., Caudill, G., Butryn, RS., Wolf, D., Fox, M., Blake, DP., Cunningham, MW. Prevalence, genetic analyses, and risk factors associated with heartworm (*Dirofilaria immitis*) in wild coyotes (*Canis latrans*) from Florida. USA. *J Wildl Dis.* 2016 Oct; 52(4):785-792.
5. Akao., "Human dirofilariasis in Japan," *Tropical Medicine and Health*, vol.39, 2011; pp.65–71.
6. Albonico, F., Loiacono, M., Gioia, G., Genchi, C., Genchi, M., Mortarino, M., Rapid differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood by real-time PCR coupled to high resolution melting analysis. *Vet. Parasitol.* 200, 2014; 128–132.
7. Alvasen, S., Johansson, M., Hoglund, J., Ssuna, R., and Emanuelson, U., "A field survey on parasites and antibodies against selected pathogens in owned dogs in Lilongwe, Malawi," *Journal of the South African Veterinary Association*, vol.87, no.1, 2016; pp.e1-e6.
8. American Heartworm Society guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. 2005; URL: www.heartwormsociety.org.
9. American Heartworm Society, Current canine guidelines for the prevention, diagnosis and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. 2014.
10. Ana Luís, Vieira., Maria João, Vieira., João Manuel, Oliveira., Ana Rita, Simões., Pablo Díez-Banós, and Juan, Gestal. Prevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs of central Portugal. *Parasite*, 2014, 21,5
11. Ana, Margarida., Alho, Miguel., Landum, Catia Ferreira., Jose, Meireles., Luzia, Gonçalves., Luis Madeira, de Carvalho., Silvana, Belo. Prevalence and seasonal variations of canine dirofilariosis in Portugal. *J.vet parasitol.* 2014. 08.014.
12. Ana, Oleaga., Ricardo, Pérez-Sánchez., Elaine, Pagés., Cristina, Marcos-Atxutegi., Fernando, Simón. Identification of immunoreactive proteins from the dog heartworm (*Dirofilaria immitis*) differentially recognized by the sera from dogs with patent or occult infections. *Molecular & Biochemical Parasitology* 166, 2009, 134–141.
13. Angela Monica, Ionica., Ioana Adriana, Matei., Gianluca, D'Amico., Lucia, Victoria Bel., Mirabela Oana, Dumitrache., David, Modrý and Andrei Daniel, Mihalca. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* show circadian co-periodicity in naturally co-infected dogs. *Parasites & Vectors*, 2017; 10:116.
14. Atkins, CE. Comparison of results of three commercial heartworm antigen test kits in dogs with low heartworm burdens. *J Am Vet Med Assoc*; 2003, 222:1221–23.
15. Avellis, FO., et al. A case of human conjunctival dirofilariosis by *Dirofilaria immitis* in Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2011; 451–452.
16. Bain, O. Développement en Camargue de la filaire du chien, *Dirofilaria repens* Railliet et Henry, 1911, chez les *Aedes halophile*. *Bull. Muséum National Hist. Naturelle* 351, 1978 ; 19–27.
17. Bandi, C., Dunn, AM., Hurst, GD., Rigaud, T. Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism. *Trends Parasitol.* 2001; 17:88–94.
18. Barriga, OO. *Dirofilariasis*, 1982; p 93–110. In Steele JH, Schultz MG. (ed), *Hand book series in zoonoses*, vol 2. CRC Press Inc, Boca Raton, FL.
19. Bazzocchi, C., et al. WSP gene sequences from the *Wolbachia* of filarial nematodes. *Curr. Microbiol.* 2000; 41:96–100
20. Beltran, G., Cancrini, G., Reategui, R., Melgar et al., "Filariosis humana en la selva peruana : reporte de tres casos," *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, vol.25, 2008; pp. 257–260.
21. Ben-Mahdi, M-H., Madani, M. Prevalence of canine *Dirofilaria immitis* infection in the city of Algiers, Algeria. *Afr J Agric Res* 2009; 4 (10): 1097-100.
22. Birago, F., 1626. *Trattato cinegetico, ovvero della caccia*. Sfondrato, V., Milano, p. 77.

23. Biswas, P., Reilly, A., Perez, and M. H. Yassin. "Human pulmonary dirofilariasis presenting as a solitary pulmonary nodule: a case report and a brief review of literature," *Respiratory Medicine Case Reports*, vol. 10, 2013; pp. 40–42.
24. Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2001; 2:907–916
25. Bowman, DD., Atkins, CE. Heartworm biology, treatment and control. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2009; 39:1127–58.
26. Bowman, DD., Georgi, JR. *Georgis' Parasitology for Veterinarians.* 9th ed. Saint Louis: Saunders/Elsevier; 2009.
27. Brown, HE., Harrington, LC., Kaufman, PE., McKay, T., Bowman, DD., Nelson, CT., Wang D, Lund R. Key factors influencing canine heartworm, *Dirofilaria immitis*, in the United States. *Parasites Vectors*, 2012, 5:245.
28. C, Lee., S. P. Montgomery., J. H, Theis., B. L, Blagburn., and M. L, Eberhard., "Public health issues concerning the wide spread distribution of canine heartworm disease," *Trends in Parasitology*, vol. 26, no. 4, , 2010; pp. 168–173.
29. C. Genchi., L. Rinaldi., C. Cascone., M. Mortarino., and G. Cringoli. "Is heartworm disease really spreading in Europe?" *Veterinary Parasitology*, vol. 133, no. 2-3, 2005; pp. 137–148, 113
30. C. Nguyen., W. L. Koh., A. Casteriano et al. "Mosquito-borne heartworm *Dirofilaria immitis* in dogs from Australia," *Parasites and Vectors*, vol. 9, , 2016; p. 535.
31. Cancrini and S. Gabrielli C. Genchi, L. Rinaldi, and G. Cringoli. "Vectors of *Dirofilaria* nematodes: biology, behavior and host/parasite relationships," in *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections, Eds., 2007; p. 211, Rolando Editore, Naples, Italy,
32. Cancrini, G., Gabrielli S. Vectors of *Dirofilaria* nematodes: biology, behavior and host/parasite relationships, 2007, p 211. In Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G (ed), *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. Rolando Editore, Naples, Italy.
33. Cancrini, G., Kramer, L. Insect vectors of *Dirofilaria* spp, 2001; p 63–82. In Simón F, Genchi C (ed), *Heartworm infection in humans and animals.* Ediciones Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.
34. Cancrini, G., Pietrobelli, M., Frangipane di Regalbono, A., Tampieri, M. P., Della Torre, A., Development of *Dirofilaria* and *Setaria* nematodes In *Aedes albopictus*. *Parassitologia* 35, 1995 ; 141–145.
35. Cancrini, G., Yanchang, S., Della Torre, A., Coluzzi, M., 1988. Influenza della temperatura sullo sviluppo larvale di *Dirofilaria repens* in diverse specie d'anzare. *Parassitologia* 30 (Suppl. 1), 38 (in Italian with English summary).
36. Capelli, G., Frangipane di Regalbono, A., Simonato, G., Cassini, R., Cazzin, S., Cancrini, G. et al. Risk of canine and human exposure to *Dirofilaria immitis* infected mosquitoes in endemic areas of Italy. *Parasit Vectors*. 2013; 6:60.
37. Capelli, A., Drago, S., Martini et al. "First report in Italy of the exotic mosquito species *Aedes* (Finlaya) koreicus, a potential vector of arboviruses and filariae," *Parasites and Vectors*, vol. 4, no. 1, article 188, 2011.
38. Capelli, G., Poylayen, G., Bertotti, F., Giupponi, S. and Martini, M., 1996. The host-parasite relationship in canine heartworm infection in a hyperendemic area of Italy. *Veterinary Research Communications*, 20 (4), 320-330.
39. Carla, Maia., Laura, Altet., Lorena, Serrano., José, Manuel, Cristóvão., Maria, Dolores Tabar., Luís, Cardoso., Lenea, Campino., and Xavier, Roura., Olga, Francino. Molecular detection of *Leishmania* infantum, filariae and *Wolbachia* spp. in dogs from southern Portugal. *Parasites & Vectors* , 2016; 9:170.
40. Casiraghi, M., Anderson, T. J., Bandi, C., Bazzocchi, C., Genchi, C. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology*, 2001; 1:93–103
41. Castillo, J. C., Reynolds, S. E., Eleftherianos, I. Insect immune response to nematode parasites. *Trends Parasitol.* 2011; 27:537–547.
42. Christensen, B. M., Huff, B. M., Miranpuri G. S., Harris H. L., Christensen L. A. 1989. Hemocyte population changes during the immune response of *Aedes Aegypti* to inoculated microfilariae of *Dirofilaria immitis*. *Int. J. Parasitol.* 75:119–123.
43. Christensen, B. M., Rowley, W. A. Observations on the laboratory biology and maintenance of *Aedes trivittatus*. *Mosquito News*. 1978; 38:9-14.
44. Chukwuebuka, Iniobong, Ikenna, Ugochukwu., Nebolisah, Omekam., Emmanuel, Ikenna, Ugochukwu. Incidence of *Dirofilaria immitis* in dogs presented at University of Nigeria, Nsukka Veterinary

- Teaching Hospital using wet smear and buffy coat techniques. *Asian Pac J Trop Dis*, 2016; 6(8): 627-630
45. Cirovic, A., Penezic, I., Pavlovicv et al., "First records of dirofilaria repens in Wild Canids from the region of central Balkan," *Acta Veterinaria Hungarica*, vol.62, no.4, ,2014; pp.481–488.
46. Courtney, CH., Zeng, Q., Bean, ES. Predicting Heartworm Burdens with the DiroCHEK Heartworm Antigen Test Kit. *J Am Anim Hosp Assoc*, 1989; : 25: 643-646.
47. Cuervo, P.F., Fantozzi, M.C., Di Cataldo, S., Cringoli, G., Mera y Sierra, R., Rinaldi, L., Analysis of climate and extrinsic incubation of *Dirofilaria immitis* in 268 southern South America. *Geospatial Health* 8, 2013 ; 175-181.
48. Cuervo, P.F., MeraySierra, R., Waisman, V., Gerbeno, L., Sidoti, L., Albonico, F., Mariconti, M., Mortarino, M.,Pepe,P., Cringoli,G.,Genchi,C.,Rinaldi,L., Detection of *Dirofilaria immitis* in mid western arid Argentina. *Acta Parasitol*.58, 2013; 612- 614.
49. Cuervo, P.F., Rinaldi, L., Cringoli, G., Modeling the extrinsic incubation of *Dirofilaria immitis* in South America based on monthly and continuous climatic data, *Veterinary Parasitology*. 2015; 02. 010.
50. D. Bowman., Y. Liu., and C. S. McMahan., "Forecasting United States heartworm *Dirofilaria immitis* prevalence in dogs," *Parasites and Vectors*, vol. 9, 2016; p. 540.
51. D. Malik., A. Amaraneni., S. Singh., and R. Roach., "Man's best friend: how humans can develop *Dirofilaria immitis* infections," *IDCases*, vol.4, 2016; pp.43–45.
52. D. Traversa., A. Di Cesare., and G. Conboy., "Canine and feline cardiopulmonary parasitic nematodes in Europe: emerging and underestimated," *Parasites and Vectors*, vol.3, 2010; no.1, article 62.
53. Dantas-Torres, F., et al. Ocular dirofilariosis by *Dirofilaria immitis* in a dog: first case report from Europe. *J. Small Anim. Pract.* 2009 ; 50: 667–669.
54. Dantas-Torres, F., Otranto, D., *Dirofilariosis in the Americas: a more virulent *Dirofilaria immitis*?* *Parasite Vectors*, 2013 ; 6,288.
55. Darío, Vezzani., Aníbal, E., Carbajo., María F. Fontanarrosa., Carla, F., Scodellaro, Julia Basabe., Griselda, Cangiano., Diego, F. Eiras. Epidemiology of canine heartworm in its southern distribution limit in South America: Risk factors, inter-annual trend and spatial patterns. *Veterinary Parasitology* 176 , 2011; 240–249.
56. Desowitz; RS., Barnwell, JW., Palumbo, NE., Una, SR., Perri, SF. Rapid decrease of precipitating and reaginic antibodies in *Dirofilaria immitis*-infected dogs which develop severe adverse reactions following treatment with diethylcarbamazine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1978; 27:1148– 1151.
57. Di, Cesare A., Otranto, D., Di Giulio, E., Simonato, G., Latrofa, MS., La Torre, F., et al. Microfilarial periodicity of *Dirofilaria repens* in naturally infested dogs. *Parasitol Res.* 2013; 112:4273–9.
58. Diakou, A., Kapantaidakis, E., Tamvakis, A., Giannakis, V., Strus, N. *Dirofilaria* infections in dogs in different areas of Greece. *Parasit Vectors*. 2016; Sep 20;9(1):508.
59. Djamel, Tahir., Fadi, Bittar., Hélène, Barré-Cardi., Doudou, Sow., Mustapha, Dahmani., Oleg, Mediannikov., Didier, Raoult., Bernard, Davoust., Philippe, Parola. Molecular survey of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* by new real-time TaqMan® PCR assay in dogs and mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Corsica (France). *Veterinary Parasitology* 235, 2017; 1–7.
60. Doetze, A., et al. Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by T(h)1 to T(h)2 shift. *Int. Immunol.* 2000; 12:623–630.
61. Dongmei, Wang., Dwight D, Bowman., Heidi, E Brown., Laura, C Harrington., Phillip, E Kaufman., Tanja, McKay., Charles Thomas, Nelson., Julia L, Sharp and Robert, Lund. Factors influencing U.S. canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) prevalence. *Parasites & Vectors*, 2014; 7:264
62. Doug S., Carithers. Examining the role of macrolides and host immunity in combatting filarial parasites. *Parasites & Vectors* ,2017; 10:182
63. Dreyer, G., Noroes, J., Figueredo-Silva, J. and Piessens, W.F., 2000. Pathogenesis of lymphatic disease in bancroftian filariasis: a clinical perspective. *Parasitology Today*, 16, 544–548.
64. Ducos De Lahitte. J., Ducos De Lahitte. B., Diagnostic des filarioses au laboratoire. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, 1990 ; 25, 349-356.
65. Dwight D. Bowman., Robert B. Lund., Yan Liu, Christopher, S., McMahan, Shila K., Nordone, Michael J., Yabsley., Forecasting United States heartworm *Dirofilaria immitis* prevalence in dogs. *Parasites & Vectors*, 2016; 9:540.
66. Euzeby. J., Chimio-thérapie spécifique de la dirofilariose cardio-vasculaire du chien. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, 25, 1990 ; 357-363.
67. F. Simon., R. Morchon., J. Gonzalez-Miguel., C. Marcos-Atxutegi., and M. Siles-Lucas., "What is new about animal and human dirofilariosis?" *Trends in Parasitology*, vol. 25, no.9, 2009; pp.404–409,

68. F. Simon., L. H. Kramer., A.Roman., W.Blasini., R.Morchon., C.Marcos-Atxutegi., G.Grandi and C.Genchi., Immunopathology of *Dirofilaria immitis* Infection. *Veterinary Research Communications*, 31, 2007; 161–171.
69. F.Simon., R. Morchon., J. Gonzalez-Miguel., C. Marcos-Atxutegi., and M. Siles-Lucas., “What is new about animal and human dirofilariosis?” *Trends in Parasitology*, vol. 25, no. 9, 2009; pp. 404– 409.
70. Faburay., “The case for a “one health” approach to combating vector-borne diseases,” *Infection Ecology and Epidemiology*, vol. 5,no.1, Article ID 28132, 2015.
71. Fedd. “First European *Dirofilaria* Days.” Abstract Book, 2007; p. 38. Zagreb, Croatia.
72. Federation,” *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*,vol.6, pp.35–38,2016.
73. Fenn K, Blaxter M. 2004. Are filarial nematode *Wolbachia* obligate mutualist symbiont? *Trends Ecol. Evol.* 19:163–166.
74. Fenn, K., Blaxter, M. *Wolbachia* genomes: revealing the biology of parasitism and mutualism. *Trends Parasitol.* 2006; 22:60–65.
75. Fernando, Simón., Mar, Siles-Lucas., Rodrigo, Morchón., Javier, González-Miguel., Isabel, Mellado., and Jose, Alberto, Montoya-Alonso., Elena, Carretón., Human and Animal *Dirofilariasis*: the Emergence of a Zoonotic Mosaic. *Clinical Microbiology Reviews.* 2012; p. 507–544
76. Ferri, E., et al. New insights into the evolution of *Wolbachia* infection in filarial nematodes in ferred from a large range of screened species. *PLoS One* 6:e20843, 2011, doi:10.1371/journal.pone.0020843.
77. Fok, E., Jacsó, O., Szebeni, Z., Gyorffy, A., Sükösd, L., Lukács, Z., Schaper, R., 2010. Elimination of *Dirofilaria* (syn. *Nochtiella*) repens microfilariae in dogs with monthly treatments of moxidectin 2.5%/imidacloprid 10% (Advocate Bayer) spot-on. *Parasitol. Res.* 106 (April (5m)), 1141–1149, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-1783-4> (Epub 2010 Feb 18).
78. Fortin, J., Slocombe, J. Temperature requirements for the development of *Dirofilaria immitis* in *Aedes triseriatus* and *Aedes vexans*. *Mosq News.* 1981; 41:625–633.
79. Foster J, et al. 2005. The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biol.* 3:e121. doi:10.1371/journal.pbio.0030121
80. Frank, GR., Pace, PM., Donoghue, AR.; Antigenemia and microfilaremia in canine experimental dirofilariasis. In *Recent advances in heartworm disease: Symposium 01*, San Antonio, Texas, USA, 20–22 April, 2001; Edited by Seward RL, Knight DH. Batavia: American Heartworm Society; 2001:211–14.
81. G D. Wang., D. D. Bowman., H. E. Brown. et al., “Factors in fluencing US. Canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) prevalence,” *Parasites and Vectors*, vol. 7, no. 1, article 264, 2014.
82. G J, Weil., M S, Malane., K G, Powers. and L, S, Blair. immitis-infected dogs. found in the serum of *Dirofilaria* Monoclonal antibodies to parasite antigens. *J immunol.* 1985; 134:1185-1191
83. G. Kini., J. B. Leena., P. Shetty., R. H. Lyngdoh., D. Sumanth., and L. George., “Human dirofilariasis: an emerging zoonosis in India,” *Journal of Parasitic Diseases*,vol.39,no.2,pp.349–354, 2015.
84. G. L. Zimmerman., S. E. Knapp., W. J. Foreyt., N. T. Erekson., and G. Mackenzie., “Heartworm infections in dogs in Northwestern United States and British Columbia, Canada,” in *Proceedings of the Heartworm Symposium '92*, M. D. Soll, Ed., 1992; pp. 15–20, American Heartworm Society, Batavia, Illinois, USA,
85. G. S. Bublitz., M. J. Serapiao., V.D. Roberge ., K.M. Coelho., and C. J. Serapiao., “Dirofilariose humana em Joinville-SC: avaliac, aoclinicopatologica dos primeiros casos relatados na regio Sul,”*Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*,vol.48,no.5, 2012; pp.383–389.
86. Gbakima, AA., el-Sadr, W., Greene, BM. Delayed isotype switching in *Dirofilaria immitis* infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1986; 80:305– 308.
87. Genchi, C., Kramer, LH., Prieto, G., Epidemiology of canine and feline dirofilariasis, a global view. In: Simón, F., Genchi, C., eds. *Heartworm infection in humans and animals*. Ediciones Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, 2001; pp 121-34.
88. Genchi, C., Kramer, LH., Rivasi, F. *Dirofilarial* infection in Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011; 1307–1317
89. Genchi, C., Mortarino, M., Rinaldi, L., Cringoli, G., Traldi, G., Genchi, M. Changing climate and changing vector-borne disease distribution: the example of *Dirofilaria* in Europe. *Vet Parasitol.* 2011b; 176:295–299.
90. Genchi, C., Rinaldi, L., Cascone, C., Mortarino, M., Cringoli, G: Is heartworm disease really spreading in Europe? *Vet Parasitol* 2005; 133:137–48.
91. Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M., Cringoli, G. Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Vet Parasitol.* 2009; 163:286–292.

92. Genchi, C., Bowman, D., Drake, J. Canine heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in Western Europe: survey of veterinary awareness and perceptions. *Parasit Vectors*. 2014 Apr 29; 7:206.
93. Genchi, C., Genchi, M., Petry, G., Kruedewagen, EM., Schaper, R. Evaluation of the efficacy of imidacloprid 10 % / moxidectin 2.5 % (Advocate®, Advantage® Multi, Bayer) for the prevention of *Dirofilaria repens* infection in dogs. *Parasitol Res*. 2013 Aug ;112 Suppl 1:81-9.
94. Genchi, C., Guerrero, J., McCall, J. W., and Venco, L. Epidemiology and prevention of *Dirofilaria* infections in dogs and cats. In “*Dirofilaria immitis* and *D. repens* in Dog and Cat and Human Infections” (C. Genchi, L. Rinaldi, and G. Cringoli, eds.) , 2007; pp. 147–161. Rinaldo Editore, Napoli, Italy.
95. Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in dog and cat and human infections. In Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (Eds.): *Mappe parassitologiche* 8. Rolando Editore, Naples, 2007; pp. 211
96. Genchi, F. S., Basano, Bandi C. et al., “Factors influencing the spread of heartworms in Italy: interaction between *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens*,” in *Proceedings of the Heartworm Symposium '95*, vol. 133, 1995; pp. 65–71, American Heartworm Society, Batavia, Italy,.
97. Genchi, J., Guerrero, J. W., McCall, and L. Venco., “Epidemiology and prevention of *Dirofilaria* infections in dogs and cats,” in *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in Dog and Cat And Human Infections, C. Genchi, L. Rinaldi, and G. Cringoli, Eds., pp. 147–161, Rolando Editore, Naples, Italy, 2007.
98. Genchi, L., H Kramer., and F. Rivasi., “Dirofilarial infections in Europe,” *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 11, no. 10, 2011; pp.1307–1317,
99. Genchi, L., Rinaldi, M., Mortarino, M., Genchi, and G. Cringoli., “Climate and *Dirofilaria* infection in Europe,” *Veterinary Parasitology*, vol. 163, no. 4, 2009; pp. 286–292,
100. Gjullin, CM., Yates, WW., Stage HH. Studies on *Aedes vexans* (Meig.) and *Aedes sticticus* (Meig.) floodwater mosquitoes in the lower Columbia River Valley. *Ann Entomol Soc Am*. 1950; 43:262-275.
101. Grandi, G., Morchón, R., Kramer, L., Kartashev, V., Simón, F. Wolbachia in *Dirofilaria repens*, an agent causing human subcutaneous dirofilariasis. *J. Parasitol*. 2008; 94:1421–1423.
102. Grandi, G., Živic`njak, T., Beck, R. Pathogenesis of *Dirofilaria* spp. infection, 2007; p 59–66. In Cringoli G (ed), *Mappe parasitologiche*, vol 8. Università ` degli Studi di Napoli Federico II, Naples, Italy.
103. Grauer, GF., et al. Clinicopathologic and histologic evaluation of *Dirofilaria immitis*-induced nephropathy in dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1987; 37:588–596.
104. Grieve, RB., Gebhardt, BM., Bradley, RE., Sr. *Dirofilaria immitis*: cell-mediated and humoral immune responses in experimentally infected dogs. *Int. J. Parasitol*. 9, 1979; 275–279.
105. Grieve, RB., Knight, DH. Anti-*Dirofilaria immitis* antibody levels before and after anthelmintic treatment of experimentally infected dogs. *J. Parasitol*. 71, 1985; 56–61.
106. Guillermo, Pacheco. Progressive changes in certain serological responses to *Dirofilaria immitis* infection in the dog. *J. parasitol*. 1966; p. 311-317.
107. Guterbock, WM., Vestre, WA., Tood, KS, Jr. Ocular dirofilariasis in the dog. *Mod. Vet. Pract*. 62, 1981; 45–47.
108. H. Molyneux., E. Mitre., M. J. Bockarie., and L. A. Kelly-Hope., “Filaria zoogeography in Africa: ecology, competitive exclusion, and public health relevance,” *Trends in Parasitology*, vol. 30, no. 4, 2014; pp. 163–169,
109. H. Noden., and M. Soni., “Vector-borne diseases of small companion animals in Namibia: literature review, knowledge gaps and opportunity for a one health approach,” *Journal of the South African Veterinary Association*, vol. 86, no. 1, article 1307, 2015.
110. Harada, P., et al. Electron-microscopical study on the mechanism of oogenesis in *Dirofilaria immitis*. In Sasa M (ed), *Recent advances in researches of filariasis and schistosomiasis in Japan*. Baltimore University Press, Baltimore, MD; 1970.
111. Haro, S. Tamiya., and A. Nagashima., “A rare case of human pulmonary dirofilariasis with a growing pulmonary nodule after migrating infiltration shadows, mimicking primary lung carcinoma,” *International Journal of Surgery Case Reports*, vol. 22, , 2016; pp. 8–11.
112. Harwood., R. F. and James., M. T. *Entomology in human and Animal Health*. 7th edn., Baillière Tindall., 1980; London, p. 208.
113. Heidi, E Brown., Laura, C Harrington., Phillip, E Kaufman., Tanja, McKay., Dwight, D Bowman., Dongmei, Wang., and Robert, Lund ., C Thomas, Nelson; Key factors influencing canine heartworm, *Dirofilaria immitis*, in the United States. *Parasites & Vectors*, 2012; 5:245.

114. Hermosilla, C., Pantchev, N., Dyachenko, V., Gutmann, M., Bauer, C. First autochthonous case of canine ocular *Dirofilaria repens* infection in Germany. *Vet. Rec.* 158; 2006; 134–135.
115. Huang, CY., Christensen, BM., Chen, CC. Role of dopachrome conversion enzyme in the melanization of filarial worms in mosquitoes. *Insect Mol. Biol.* 14, 2005; 675–682.
116. Infanger, LC., et al. The role of phenylalanine hydroxylase in melanotic encapsulation of filarial worms in two species of mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 2004; 1329–1338.
117. J. Day., “One health: the importance of companion animal vector-borne diseases,” *Parasites and Vectors*, vol.4,no.1, article 49,2011.
118. J. Mc Michael., R. E. Woodruff., and S. Hales., “Climate change and human health: present and future risks,” *The Lancet*, vol. 367, no. 9513, 2006, pp. 859–869,
119. J.A. Montoya-Alonso., E. Carretón., R. Morchón., L. Silveira-Viera., F. Simón., Y. Falcón. The impact of the climate on the epidemiology of *Dirofilaria immitis* in the pet population of the Canary Islands. *Veterinary Parasitology* 216, 2016 ; 66–71.
120. J.W. McCall., C. Genchi., L.H. Kramer., J. Guerrero., and L. Venco., “Heartworm disease in animals and humans,” *Advances in Parasitology*, vol. 66, 2008; pp. 193–285.
121. Javad, Khedri., Mohammad Hossein, Radfar., Hassan, Borji., Mohammad, Azizzadeh., Baharak Akhtardanesh. Canine Heartworm in Southeastern of Iran with Review of disease distribution. *Iranian J Parasitol: Vol. 9, No. 4, Oct –Dec 2014; pp.560-567.*
122. Jayasinghe, S. R. Gunawardane., M. A. Sitheeqe., and S. Wickramasinghe., “A case report on oral subcutaneous *Dirofilariasis*,” *Case Reports in Infectious Diseases*, vol. 2015, Article ID 648278, 2015; 4 pages.,
123. José Alberto, Montoya-Alons., Elena, Carretón., Luis, Simón., Javier, González-Miguel., Laín , García-Guasch., Rodrigo, Morchón., Fernando, Simón. Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs from Barcelona: Validation of a geospatial prediction model. *Vet. Parasitol*, 2015.
124. Julie K. Levy., Amie N. Burling., Michael M. Crandall., Sylvia J. Tucker., Erin G. Wood., Jessie D. Foster. Seroprevalence of heartworm infection, risk factors for seropositivity, and frequency of prescribing heartworm preventives for cats in the United States and Canada. *J Am Vet Med Assoc* 2017; 250:873–880.
125. K. Borthakur., D. K. Deka., S. Islam., and P. C. Sarmah., “Occult dirofilariosis in dogs of North Eastern region in India,” *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, vol.10,no.1, 2015b; pp.92–97.,
126. K. C. Lee., J. A. E. Ignace., I. D. Robertson., and P. J. Irwin., “Canine vector-borne infections in Mauritius,” *Parasites and Vectors* ,vol.8,no.1,article174, 2015.
127. K. W. To., S. S. Y. Wong., R. W. S. Poon et al., “A novel *Dirofilaria* species causing human and canine infections in Hong Kong,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol.50,no.11,2012; pp.3534–3541,
128. Kaiser, L., Spickard, RC., Sparks, HV., Jr, Williams JF. *Dirofilaria immitis*: alteration of endothelium-dependent relaxation in the in vivo canine femoral artery. *Exp. Parasitol.* 69, 1989; 9–15.
129. Kaiser, L., Williams, JF. *Dirofilaria immitis*: heartworm infection convertshistamine-induced constriction to endothelium-dependent relaxation in canine pulmonary artery. *Exp. Parasitol.* 88, 1998; 146–153.
130. Kartashev, V., Afonin, A., González-Miguel, J., Sepúlveda, R., Simón, L., Morchón, R., Simón, F., Regional warming and emerging vector borne zoonotic dirofilariosis in the Russian Federation, Ukraine, and other post-Soviet states from 1981 to 2011 and projection by 2030. *Biomed Res Int*, 2014; 858936.
131. Kartashev, T., Tverdokhlebova, A. Korzan et al., “Human subcutaneous/ocular dirofilariosis in the Russian Federation and Belarus, 1997–2013,” *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 33, 2015; pp. 209–211,
132. Khasnis, A.A., Nettleman, M.D., Global warming and infectious disease. *Arch. Med. Res.* 36, 2005; 689–696.
133. Khatat, Sarah Elhamiani., Khallaayoune, Khalid., Errafyk, Nabil., Van Gool., Frans, Duchateau., Luc, Daminet., Sylvie, Kachani., Malika, El Amri., Hamid, Azrib., Rahma, Sahibi., Hamid., Detection of *Anaplasma* spp. and *Ehrlichia* spp. antibodies, and *Dirofilaria immitis* antigens in Dogs from Seven Locations of Morocco. *Veterinary Parasitology*. 2017; 04.004.
134. Kitoh, K., et al. Relaxing and contracting activities of heartworm extract on isolated canine abdominal aorta. *J. Parasitol.* 87, 2001; 522–526.
135. Klei, TR., Crowell, WA., Thompson, PE. Ultrastructural glomerular changes associated with filariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23, 1974; 608–618. 210.

- 136.Knight, DH., Lok, JB. Seasonality of heartworm infection and implications for chemoprophylaxis. Clin Tech Small Anim Pract, 1998; 13:77–82.
- 137.Knott, J., A method for making microfilarial surveys on day blood. T Roy Soc Trop Med H 33, 1939; 191-6.
- 138.Köse, M., Erdogan, M., Serological screening of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infections in Turkey. Berl Munch Tierarztl 125, 2012; 503-8.
- 139.Kozec, WJ., Marroquin, HF. Intracytoplasmic bacteria in *Onchocerca volvulus*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1977; 663–678.
- 140.Kramer, L., Simón, F., Tamarozzi, F., Genchi, M., Bazzocchi, C. Is *Wolbachia* complicating the pathological effects of *Dirofilaria immitis* infections? Vet. Parasitol. 133, 2005; 133–136
- 141.Kramer, LH., Passeri, B., Corona, S., Simóncini, L., Casiraghi, M. Immunohistochemical/ immunogold detection and distribution of the endosymbiont *Wolbachia* of *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi* using a polyclonal antiserum raised against WSP (*Wolbachia* surface protein). Parasitol. Res. 89, 2003; 381–386
- 142.Krishnan, L., Guilbert, LJ., Russell, AS., Wegmann, TG., Mosmann, TR., and Belosevic, M., Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. Journal of Immunology 156, 1996a; 644–652.
- 143.Krishnan, L., Guilbert, LJ., Wegmann, TG., Belosevic, M., and Mosmann, TR., T helper 1 response against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells. Journal of Immunology 156, 1996b; 653–662.
- 144.L. Rinaldi, C., Genchi, V., Musella, M., Genchi, and G. Cringoli., “Geographical information systems as a tool in the control of heartworm infections in dogs and cats,” Veterinary Parasitology, vol. 176, no. 4, pp. 286–290, 2011.
- 145.L. Stogdale. Testing for Occult Heartworm Infection. Can Vet J ,1984; 25: 171-174.
- 146.Langer-Gould, A., Garren, H., Slansky, A., Ruiz, PJ., and Steinman. L., Late pregnancy suppresses relapses in experimental autoimmune encephalomyelitis: Evidence for a suppressive pregnancy-related serum factor. Journal of Immunology, 2002; 169: 1084–1091.
- 147.Latrofa, M.S., Dantas-Torres, F., Annoscia, G., Genchi, M., Traversa, D., Otranto, D., A duplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of and differentiation between *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in dogs and mosquitoes. Vet. Parasitol. 185, 2012 ;181–185.
- 148.Lavinia, Ciuca., Giuseppe, Cringoli., Vincenzo, Musella., Antonio, Bosco., Liviu, D. Miron., Laura Rinaldi., Maria Paola, Maurelli. Geographic distribution of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in stray dogs of eastern Romania. *Geospatial Health* 2016; 11:499.
- 149.Lee, S. E., The survey of canine dirofilariasis and differential diagnosis of microfilaria. In “Thesis for Degree of Master of Veterinary Medicine”, 2003; p. 27. Chungnam National University, South Korea.
- 150.Li, JY., Christensen, BM. Immune competence of *Aedes trivittatus* hemocytes as assessed by lecitin binding. Int. J. Parasitol. 1990; 76:276–278.
- 151.Licitra, B., Chambers, E.W., Kelly, R., Burkot, T.R., Detection of *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) by polymerase chain reaction in *Aedes albopictus*, *Anopheles punctipennis*, and *Anopheles crucians* (Diptera: Culicidae) from Georgia, USA. J. Med. Entomol. 2010; 47, 634–638.
- 152.Liu, J., Song, K. H., Lee, S. E., Lee, J. I., Haysaki, M., You, M. J., and Kim, D. H. Serological and molecular survey of *Dirofilaria immitis* infection in cats in Gyunggi province, South Korea. Vet. Parasitol. 130, 2005; 125–129.
- 153.LokJB, Knight DH. Laboratory verification of a seasonal heartworm transmission model. In: Recent advances in heartworm disease. Tampa (FL); 1998 ; p. 15–20.
- 154.Lok JB, Knight DH: Laboratory verification of a seasonal heartworm transmission model.InRecent advances in heartworm disease: Symposium'98, Tampa, Florida, USA, 1–3 May, 1998. Edited by Seward RL, Knight DH. Batavia: American Heartworm Society; 1998:15–20.
- 155.LokJB. *Dirofilaria* p.: taxonomy and distribution. In: Boreham PFL, Atwell RB, editors. *Dirofilariasis*. London: CRC Press; 1988 ; p.1–28.
- 156.Löwenberg, Neto P., Navarro-Silva, MA., Development, longevity, gonotrophic cycle and oviposition of *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) under cyclic temperatures. *Neotrop Entomol.* 2004; 33: 29-33.
- 157.Ludders, JW., Grauer, GF., Dubielzig, RR., Ribble, GA., Wilson, JW. Renal microcirculatory and correlated histologic changes associated with dirofilariasis in dogs. Am. J. Vet. Res. 1988; 49:826–830.

158. Luis, Simón ., Alexandr, Afonin., Lucía, Isabel López-Díez., Javier, González-Miguel., Rodrigo, Morchón., Elena, Carretón., José, Alberto Montoya-Alonso., Vladimir, Kartashev., Fernando, Simón. Geo-environmental model for the prediction of potential transmission risk of *Dirofilaria* in an area with dry climate and extensive irrigated crops. The case of Spain. *Veterinary Parasitology* 200 , 2014; 257–264.
159. Luisa, Velasquez., Byron, L., Blagburn, Rebecca Duncan-Decoq., Eileen M. Johnson., Kelly E. Allen., James, Meinkoth., Jeff Gruntmeir, Susan E Little. Increased prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen in canine Samples after heat treatment, *Vet. Parasitol.* 2014.
160. M. Medlock., D. Avenell., I. Barrass., and S. Leach., “Analysis of the potential for survival and seasonal activity of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in the United Kingdom,” *Journal of Vector Ecology*, vol. 31, no. 2, 2006; pp. 292–304.
161. M. Medlock., K. R. Snow., and S. Leach., “Possible ecology and epidemiology of medically important mosquito-borne arboviruses in Great Britain,” *Epidemiology and Infection*, vol. 135, no.3, 2007; pp. 466–482.
162. M. Miterpakova., A. Iglodyova., V. Cabanova., E. Stloukal., and D. Miklisova., “Canine dirofilariosis endemic in central Europe—10 years of epidemiological study in Slovakia,” *Parasitology Research*, vol. 115, no. 6, 2016; pp. 2389–2395.
163. M. Oi., S. Yoshikawa., Y. Ichikawa., K. Nakagaki., J. Matsumoto., and S. Nogami., “Prevalence of *Dirofilaria immitis* among shelter dogs in Tokyo, Japan, after a decade: Comparison of 1999–2001 and 2009–2011,” *Parasite*, vol. 21, 2014; p.10,
164. M. S. Latrofa., F. Dantas-Torres., G. Annoscia., M. Genchi., D. Traversa., and D. Otranto., “A duplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of and differentiation between *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in dogs and mosquitoes,” *Veterinary Parasitology*, vol. 185, no. 2-4, 2012; pp. 181–185,
165. M.F. Jagusch., R.M. Roberts., H.H. Rea., and D.R. Priestley., “Human pulmonary dirofilariasis,” *New Zealand Medical Journal*, vol. 97, 1984; pp. 556–558,
166. M.P. Senanayake., M.L. Infaq., S.G. Adikaram., and P.V. Udagama., “Ocular and subcutaneous dirofilariasis in a Sri Lankan infant: an environmental hazard caused by dogs and mosquitoes,” *Paediatrics and International Child Health*, vol. 33, no. 2, 2013; pp. 111–112.
167. Magnis, J., Lorentz, S., Guardone, L., et al. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasit Vectors*, 2013; 6: 48.
168. Mahanty, S., et al. High levels of spontaneous and parasite antigen driven interleukin-10 production are associated with antigen-specific hypo-responsiveness in human lymphatic filariasis. *J. Infect. Dis.* 1996; 173: 769–773.
169. Malone, J.B., Biology based mapping of vector-borne parasites by geographical information system and remote sensing. *Parasitologia* 47, 2005; 27-50.
170. Mancebo, O., Russo, A., Bulman, G., Cabajal, L., and Villavicencio de Mancebo, V. *Dirofilaria immitis*: Características, prevalencia y diagnóstico de la dirofilariasis en la población canina en áreas urbanas, suburbanas, y rurales de la Prov. De Formosa (Argentina) y descripción de la enfermedad en el coati común (*Nasua nasua*). 1992; *Pet's* 8, 95–117.
171. Manfredi, MT., Di, Cerbo A., Genchi, M. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats, 2007; p 39–47. In Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G (ed), *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. *Mappe parassitologiche*, vol 8. Università degli Studi di Napoli Federico II, Naples, Italy.
172. Marcela Figuerêdo, Duarte Moraes., Marina Xavi, da Silva., Paulo Cesar, Magalhães-Matos., Ana Cláudia Alexandre, de Albuquerque., José Hairton, Tebaldi., Luis Antônio, Mathias., Estevam, G. Lux Hoppe., Filarial nematodes with zoonotic potential in ring-tailed coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766, Carnivora: Procyonidae) and domestic dogs from Iguazu National Park, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2017. 01.003.
173. Marconcini, M. Magi., G. Macchioni., and M. Sasseti., “Filariosis in foxes in Italy,” *Veterinary Research Communications*, vol. 20, no. 4, 1996; pp. 316–319,
174. Marcos-Atxutegi C, et al. Th1 response in BALB/c mice immunized with *Dirofilaria immitis* soluble antigens: a possible role for Wolbachia. *Vet. Parasitol.* 112, 2003; 117–130.
175. Marks and T. E. Bloomfield., “Canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) detected in red foxes (*Vulpes vulpes*) in urban Melbourne,” *Veterinary Parasitology*, vol. 78, no. 2, 1998; pp. 147–154.

- 176.Martina, Miterpáková., Eduard, Stloukal., Adriana, Iglódyová., Dana, Miklisová., Viktória, Cabanová. Canine dirofilariosis endemic in Central Europe—10 years of epidemiological study in Slovakia. *Parasitol Res* ,2016; 115:2389–2395.
- 177.Matola, YG. Periodicity of *Dirofilaria immitis* microfilariae in a dog from Muheza district, Tanzania. *J Helminthol*. 1991; 65:76–8.
- 178.McCall, J., Genchi, C., Kramer, L., Guerrero, J., Dzimiński, M., Supakorndej, P., Mansour, A., McCall, S., Supakorndej, N., Grandi, G., Carson, B. Heartworm and Wolbachia: therapeutic implication. *Veterinary Parasitology*. 2008; 158, 204–214.
- 179.McCall, JW., Genchi, C., Kramer, LH., et al. Heartworm disease in animals and humans. *Adv Parasitol*. 2008; 66:193-285.
- 180.McCall, JW., Genchi, C., Kramer, LH., Guerrero, J., Venco, L. Heartworm disease in animals and humans. *Adv. Parasitol*. 66: 2008; 193–285.
- 181.McCall, JW. A parallel between experimentally induced canine and feline heartworm disease. In “Proceedings of XVII World Small Animal Veterinary Association World Congress, 24th–27th September 1992;” pp. 255–261. Delfino Publisher, Rome.
- 182.McCall, JW. The safety-net story about macrocyclic lactone heartworm preventatives: A review, an update and recommendations. *Vet. Parasitol*. 133, 2005; 197–206.
- 183.McGarry, HF., Egerton, GL., Taylor, MJ. Population dynamics of Wolbachia bacterial endosymbionts in *Brugia malayi*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 2004; 135:57–67.
- 184.McKenna. “*Dirofilaria* infections in New Zealand,” *Surveillance*, vol.27, 2000; pp.13-14.
- 185.McLaren, DJ., Worms, MJ., Laurence, BR., Simpson, MG. Microorganisms in filarial larvae (Nematoda). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 1975; 69:509–514.
- 186.Medlock, JM., Barrass, I., Kerrod, E., Taylor, MA., Leach, S. Analysis of climatic predictions for extrinsic incubation of *Dirofilaria* in the United Kingdom. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2007; 7:4–14.
- 187.Megat, Abd Rani PA., Irwin ,PJ., Gatne, M., Coleman, GT., McInnes, LM., Traub, RJ. A survey of canine filarial diseases of veterinary and public health significance in India. *Parasit Vectors*. 2010 Apr ; 8;3:30.
- 188.Mejía, JS., Carlow, CKS. An analysis of the humoral immune response of dogs following vaccination with irradiated infective larvae of *Dirofilaria immitis*. *Parasite Immunol*. 1994; 16:157–164.
- 189.Méndez, JC., Carretón, E., Martínez, S., Tvarijonavičiute, A., Cerón, JJ., Montoya-Alonso, JA. Acute phase response in dogs with *Dirofilaria immitis*. *Vet Parasitol*. 2014 Aug ; 29;204(3-4):420-5.
- 190.Michael, J. Day. *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*, (eBook - PDF) 5th Edition. CRC Press Inc, BocaRaton, FL.
- 191.Mircea, Mircean., Angela, Monica Ionica., Viorica, Mircean., Adriana, Györke., Andrei, Razvan Codea., Flaviu, Alexandru Tabaran., Marian, Taulescu., Mirabela, Oana Dumitrache. Clinical and pathological effects of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* in a dog with a natural co-infection. *Parasitology International*. 2017 ; 02.003
- 192.Mircean, V., Dumitrache, MO., Györke, A., Pantchev, N., Jodies, R., Mihalca, AD., Cozma, V., Seroprevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections (*Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia canis*) in dogs from Romania. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2012;595-604.
- 193.Montoya, JA, Morales, M., Juste, MC., Bañares, A., Simón, F., Genchi, C., Seroprevalence of canine heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in Tenerife island, an epidemiological update. *Parasitol Res* 2006; 100:103-5.
- 194.Montoya-Alonso, JA., Carretón, E., Morchón, R., Silveira-Viera, L., Falcón, Y., Simón, F. The impact of the climate on the epidemiology of *Dirofilaria immitis* in the pet population of the Canary Islands. *Vet Parasitol* 2016; 216 : 66-71.
- 195.Montoya-Alonso, JA., Carretón, E., Simón, L., González-Miguel, J., GarcíaGuasch, L., Morchón, R., Simón, F., Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs from Barcelona: validation of a geospatial prediction model. *Vet Parasitol* 2015; 212:456-9.
- 196.Montoya-Alonso, JA., Carretón, E., García-Guasch, L., Expósito, J., Armario, B., Morchón, R., Simón, F. First epidemiological report of feline heartworm infection in the Barcelona metropolitan area (Spain). *Parasit Vectors*. 2014 Nov; 12;7:506.
- 197.Moodley, C. N. Govind., A. K. C. Peer et al., “First detection of human dirofilariasis in South Africa,” *Infectious Disease Reports*, vol. 7, no. 1, article 5726, 2015.
- 198.Morchon, R., Carreton, E., Gonzalez-Miguel, J., Mellado-Hernandez, I., Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe: new distribution trends. *Front Physiol* 2012; 3:196.
- 199.Morchon R, Carreton E, González-Miguel J, Mellado-Hernández I. Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe - new distribution trends. *Front Physiol*. 2012; 3:196.

- 200.Morchón, R., et al. Specific IgG antibody response against antigens of *Dirofilaria immitis* and its *Wolbachia* endosymbiont bacterium in cats with natural and experimental infections. *Vet. Parasitol.* 2004; 125:313–321. 292
- 201.Morchón, R., et al. Haplotype H1 of *Culex pipiens* implicated as a natural vector of *Dirofilaria immitis* in an endemic area of Western Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007; 7:653–658.
- 202.Morchón, R., et al. Dogs with patent *Dirofilaria immitis* infection have higher expression of circulating IL-4, IL-10 and iNOs mRNA than those with occult infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007; 115:184– 188.
- 203.Morchón, R., et al. Anti-*Wolbachia* surface protein antibodies are present in the urine of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis* with circulating microfilariae but not in dogs with occult infections. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012; 12:17–20.
- 204.Mortarino, M., Musella, V., Costa, V., Genchi, C., Cringoli, G., Rinaldi, L., GIS modeling for canine dirofilariosis risk assessment in central Italy. *Geospat Health* 2008; 2:253-61.
- 205.N. Awadalla., D. M. Bayoumi., I. R. Ibrahim., “The first case report of suspected human dirofilariosis in the eyelid of a patient from Alexandria,” *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, vol. 28, 1998; pp. 941–943.
- 206.N. Sacks., E.P. Caswell-Chen., “Reconstructing the spread of *Dirofilaria immitis* in California coyotes,” *Journal of Parasitology*, vol.89,no.2, 2003; pp.319–323.
- 207.Newton, W. L. Longevity of an experimental infection with *Dirofilaria immitis* in a dog. *J. Parasitol.* 1968; 54, 187–188.
- 208.Nogami, S., Murasugi, E., Shimazaki, K., Maeda, R., Harasawa, R., Nakagaki, K. Quantitative analysis of microfilarial periodicity of *Dirofilaria immitis* in cats. *Vet Parasitol.* 2000; 92:227–32.
- 209.Norma, Vollmer Labarthe., Jonimar Pereira, Paiva., Larissa, Reifur., Flavya, Mendes-de-Almeida., Carlos Jose, Carvalho Pinto., Paulo Sérgio, Juliani., Maria Angela, Ornelas de Almeida., Alexandre, Merlo., and Leucio, Câmara Alves. Updated canine infection rates for *Dirofilaria immitis* in areas of Brazil previously identified as having a high incidence of heartworm infected dogs. *Parasites & Vectors* 2014 ; 7:493.
- 210.Osborne, J., Devaney, E. Interleukin-10 and antigen-presenting cells actively suppress Th1 cells in BALB/c mice infected with the filarial parasite *Brugia pahangi*. *Infect. Immun.* 1999; 67:1599–1605.
- 211.Otranto, D., Capelli, G., Genchi, C., Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. *Parasit.Vectors* 2,S2. 2009.
- 212.Otto, GF. The significance of microfilaremia in the diagnosis of heartworm infection. In: *Proceedings of the heartworm symposium '77*. Bonner Springs: Veterinary Medicine Publishing Company, 1978; 22-30.
- 213.Paes-de-Almeida, EC., Ferreira, AMR., Labarthe, NV., Caldas, MLR., McCall, JW. Kidney ultrastructural lesions in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). *Vet. Parasitol.* 2003; 113:157– 168.
- 214.Pampiglione, S., Canestri Trotti, G., Rivasi, F. Human dirofilariosis due to *Dirofilaria* (*Nochtiella*) *repens*: a review of world literature. *Parassitologia* 1995; 37:149–193.
- 215.Pampiglione, S., Rivasi, F., Gustinelli, A. Dirofilarial human cases in the Old World, attributed to *Dirofilaria immitis*: a critical analysis. *Histopathology* 2009; 54:192–204.
- 216.Pampiglione, S., Rivasi, F. Human dirofilariosis due to *Dirofilaria* (*Nochtiella*) *repens*: an update of world literature from 1995 to 2000. *Parassitologia* 2000; 42:235–242.
- 217.Piccinni, M-P., Scaletti, C., Maggi, E., and Romagnani, S. Role of hormone-controlled Th-1 and Th-2type cytokines in successful pregnancy. *Journal of Neuorimmunology* ,2000; 109: 30–33.
- 218.Pratt, HD., Moore, CD. *Mosquitoes of Public Health Importance and Their Control*. United States Government Printing Office, Washington, DC, 1960.
- 219.Puteri, Azaziah Megat Abd Rani., Peter, J Irwin., Mukulesh, Gatne., Glen T, Coleman., Rebecca J, Traub., Linda, M McInnes. A survey of canine filarial diseases of veterinary and public health significance in India. *Parasites & Vectors* 2010; 3:30.
- 220.R. Morchon, C. Bazzocchi, J. Lopez-Belmonte et al., “iNOs expression is stimulated by the major surface protein (rWSP) from *Wolbachia* bacterial endosymbiont of *Dirofilaria immitis* following subcutaneous injection in mice,” *Parasitology International*, vol.56,no.1,pp.71–75,2007.
- 221.R. Morchón, J., González-Miguel, I., Mellado, S., Velasco, A., Rodríguez-Barbero, F. Simón., Adult *Dirofilaria immitis* excretory/secretory antigens upregulate the production of prostaglandin E2 and

- downregulate monocyte transmigration in an “in vitro” model of vascular endothelial cell cultures. *Veterinary Parasitology* 170, 2010; 331–335
- 222.R. Morchon, M. D., Bargues, J. M., Latorre et al., “Haplotype H1 of *Culex pipiens* implicated as natural vector of *Dirofilaria immitis* in an endemic area of Western Spain,” *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 7, no. 4, 2007; pp. 653–658.
- 223.R. Poulin., F.Maure., “Host manipulation by parasites: a look back before moving forward,” *Trends in Parasitology*, vol. 31, no. 11, 2015; pp. 563–570.
- 224.R.P.W.Kwok., P.P.C.Chow., J.K.M. Lametal., “ Human ocular dirofilariasis in Hong Kong,” *Optometry and Vision Science*,vol.93,no.5, 2016; pp.545–548,
- 225.Rapti, D., Rehbein, S., Seroprevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in Albania. *Parasitol Res* 2010; 107:481-5.
- 226.Ravichandran, M., Mahanty, S., Kumaraswami, V., Nutman, TB., Jayaraman, K. Elevated IL-10 mRNA expression and downregulation of Th1-type cytokines in microfilaraemic individuals with *Wuchereria bancrofti* infection. *Parasite Immunol.* 1997; 19:69–77.
- 227.Rawlings, C. A., Dawe, D. L., McCall, JW. Four types of occult *Dirofilaria immitis* infections in dogs. *J. Am. Vet. Med.* 1982; Assoc. 180, 1323–1326.
- 228.Rhee, JK., Yang, SS., Kim, HC. Periodicity exhibited by *Dirofilaria immitis* microfilariae identified in dogs of Korea. *Korean J Parasitol.* 1998; 36:235–9.
- 229.Rinaldi, L., Musella, V., Biggeri, A., Cringoli, G., New insights into the application of geographical information systems and remote sensing in veterinary parasitology. *Geospat. Health* 1, 2006; 33–47.
- 230.Rinaldi, L., Genchi, C., Musella, V., Genchi, M., Cringoli, G., Geographical information systems as a tool in the control of heartworm infections in dogs and cats. *Vet. Parasitol.* 2011;176, 286-290.
- 231.Rishniw, M., Barr, S. C., Simpson, K. W., Frongillo, M. F., Franz, M., and Dominguez Alpizar, J. L. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.* 2006; 135, 303–314.
- 232.Roemer, G. W., Coonan, T. J., Garcelon, D. K., Starbird, C. H., and McCall, J. W. (2000). Spatial and temporal variation in the seroprevalence of canine heartworm antigen in the Island fox. *J. Wildl. Dis.* 36, 723–728.
- 233.Rogers, D.J., Randolph, S.E., Climate change and vector-borne diseases. *Adv. Parasitol.* 2006; 62, 345–381.
- 234.S. Tavakolizadeh., I. Mobedi., “Orbital dirofilariasis in Iran: a case report,”*Korean Journal of Parasitology*, vol.47,no.4, 2009; pp. 397–399.
- 235.S. Wang., N. Zhang., Z. Zhang et al., “Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in dogs in Henan province, central China,” *Parasite*,vol.23, 2016; p.43,
- 236.S.K. Borthakur., D.K. Deka., S.Islam., D.K. Sarma., and P.C. Sarmah., “Prevalence and molecular epidemiological data on *Dirofilaria immitis* in dogs from Northeastern States of India,”*Scientific World Journal*, vol. 2015, Article ID 265385, 2015a; 7 pages,
- 237.Saied, K. Amara, S. Bouchouchaetal., “Anunusual cause of hand nodule: peritendon dirofilariasis,” *Chirurgie de la Main*, vol.30,no.1, 2011 ; pp.66–68,
- 238.Sassnau, R., Czajka, C., Kronefeld, M., Werner, D., Genchi, C., Tannich, E., Kampen, H., *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* DNA findings in mosquitoes in Germany: temperature data allow autochthonous extrinsic development. *Parasitol Res* 2014a; 113:3057-61.
- 239.Sassnau,R.,Daugschies,A.,Lendner,M.,Genchi,C., Climatesuitabilityforthe transmission of *Dirofilaria immitis* and *D.repens* in Germany. *Vet. Parasitol.* 2014b; 205, 239-245.
- 240.Scarzi M.. Cutaneous dirofilariosis in dogs. *Obiettivi Doc. Vet.* 1995; 16:11–15.
- 241.Serrano-Parreño, B., Carretón, E., Caro-Vadillo, A., Falcón-Cordón, S., Falcón-Cordón, Y., Montoya-Alonso, JA. Pulmonary hypertension in dogs with heartworm before and after the adulticide protocol recommended by the American Heartworm Society. *Vet Parasitol.* 2017 Mar 15; 236:34-37.
- 242.Shihoko, Komine-Aizawa., Yasuyuki, Izumi., Shinjiro, Imai., Koichiro, Fujita., Satoshi, Hayakawa. The therapeutic potential of the recombinant antigen from *Dirofilaria immitis* (rDiAg) for immune-mediated pregnancy loss. *Journal of Reproductive Immunology* 92, 2011;21– 26.
- 243.Simón, F., et al. Immunoglobulin G antibodies against the endosymbionts of filarial nematodes (*Wolbachia*) in patients with pulmonary dirofilariasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10:180–181.
- 244.Simón, F., et al. Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. *Vet. Res. Commun.* 2007 ; 31:161–171.
- 245.Simón, F., Genchi, C., Prieto, G., Allende, E. Immunity in the vertebrate hosts, 2001; p218. In Simón, F., Genchi, C. (ed), *Heartworm infection in humans and animals*. Ediciones Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.

246. Simón, F., Genchi, C. Dirofilariasis and other zoonotic filariases: an emerging public health problem in developed countries. *Res. Rev. Parasitol.* 2000; 60:1–16.
247. Simón, F., López-Belmonte, J., Marcos-Atxutegi, C., Morchón, R., MartínPacho, JR. What is happening outside North America regarding human dirofilariasis? *Vet. Parasitol.* 2005; 133:181–189.
248. Simón, F., Morchón, R., Gonzáles-Miguel, J., Marcos-Atxutegi, C., Siles-Lucas, M: What is new about animal and human dirofilariosis? *Trends Parasitol* 2009; 25:404-409.
249. Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., et al. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25 : 507-544.
250. Simon, A., Afonin, L. I., López-Díez et al., “Geo-environmental model for the prediction of potential transmission risk of *Dirofilaria* in an area with dry climate and extensive irrigated crops: the case of Spain,” *Veterinary Parasitology*, vol. 200, no. 3-4, 2014; pp.257–264.
251. Simon, C., Genchi, G., Prieto., and E. Allende., “Immunity in the vertebrate hosts,” in *Heartworm Infection in Humans and Animals*, F. Simon and C. Genchi, Eds., 2001; p. 218, Ediciones Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain,
252. Simón, L., Afonin, A., López-Díez, L.I., González-Miguel, J., Morchón, R., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., Kartashev, V., Simón, F., Geo-environmental model for the prediction of potential transmission risk of *Dirofilaria* in an area with dry climate and extensive irrigated crops. The case of Spain. *Vet. Parasitol.* 2014; 200, 257–264.
253. Simon, M. Siles-Lucas, R. Morchon et al., “Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 25, no. 3, pp. 507–544, 2012. 7
254. Simon, M. Siles-Lucas, R. Morchon et al., “Human and animal dirofilariasis : the emergence of a zoonotic mosaic,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 25, no. 3, 2012; pp. 507–544,
255. Sironi, M., et al. Molecular evidence of close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1995; 74:223–227
256. Slocombe, JOD., Surgeoner, GA., Srivastava, B. Determination of heartworm transmission period and its use in diagnosis and control. *Proc Heartworm Symp.* 1989; 89:19–26.
257. Smout, L. F. Skerratt., J. R. A. Butler., C. N. Johnson., and B. C. Congdon., “Dingoes (*Canis dingo* Meyer, 1793) continue to be an important reservoir host of *Dirofilaria immitis* in low density housing areas in Australia,” *Veterinary Parasitology*, vol. 215, 2016; pp. 6–10.
258. Song, KH., Lee, SE., Hayasaki, M., Shiramizu, K., Kim, DH., Cho, KW., Seroprevalence of canine dirofilariosis in South Korea. *Vet Parasitol* 2003; 114:231-6.
259. Suh, GH., Ahn, KS., Ahn, JH., Kim, HJ., Leutenegger, C., Shin, S. Serological and molecular prevalence of canine vector-borne diseases (CVBDs) in Korea. *Parasit Vectors.* 2017 Mar 16; 10(1):146.
260. Szekeres-Bartho, J., Barakonyi, A., Par, G., Polgar, B., Palkovics, T., and Szereday, L., Progesterone as an immunomodulatory molecule. *International Immunopharmacology*, 2001; 1: 1037–1048.
261. T. Suter., E. Flacio., B. F. Farina., L. Engeler., M. Tonolla., and P. Müller., “First report of the invasive mosquito species *Aedes koreicus* in the Swiss-Italian border region,” *Parasites and Vectors*, vol. 8, no. 1, article 402, 2015.
262. Tamashiro, WK., Powers, KG., Levy, DA., Scott, AL., Quantitative and qualitative changes in the humoral response of dogs through the course of infection with *Dirofilaria immitis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1985; 34: 292–301.
263. Tanaka, K., Atwell, RB. The humoral response in natural *Dirofilaria immitis* infections in dogs. *Aust. Vet. J.* 1991; 68:396–399.
264. Tarello, W. Dermatitis associated with *Dirofilaria (Nochtiella) repens microfilariae* in dogs from central Italy. *Acta Vet. Hung.* 2002; 50:63–78.
265. Tarello, W. Clinical aspects of dermatitis associated with *Dirofilaria repens* in pets. In *Dermatitis linked with helminthic infections. Meril Pre-Congress of the ESVD-ECVD Meeting*, Florence, Italy. 2010.
266. Tarello, W. Clinical aspects of dermatitis associated with *Dirofilaria repens* in pets: a review of 100 canine and 31 feline cases (1990-2010) and a report of a new clinic case imported from Italy to Dubai. *J. Parasitol. Res.* 2011; 578385.
267. Taylor, MJ., et al. *Wolbachia* bacteria in filarial immunity and disease. *Parasite Immunol.* 2001; 23:401–409.
268. Taylor, M. J., Cross, H. F., Ford, L., Makunde, W. H., Prasad, G. B. K. S., and Bilo, K. *Wolbachia* bacteria in filarial immunity and disease. *Parasite Immunol.* 2001; 23, 401–409.
269. Theis, JH. Public health aspects of dirofilariasis in the United States. *Vet. Parasitol.* 2005; 133:157–180.

270. Tina, S. Kalkstein., Lana, Kaiser., and John, B. Kaneene. Prevalence of heartworm infection in healthy cats in the lower peninsula of Michigan. JAVMA, 2000; Vol 217, No. 6.
271. Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Benet, J.J., Shaw, A., Moutou, F. et Louza, A., Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. Alfort, France aema. 2eme Edit. 2001 ; p 68.
272. Tonelli, QJ. Factors affecting the accuracy of enzyme immunoassay for *Dirofilaria immitis* adulte antigen. In: Seward RL, editor. Proceedings of the American Heartworm Symposium. Batavia, IL, USA: American Heartworm Society; 1989; P. 161-5.
273. Traversa, D., Di Cesare, A., Conboy, G., Canine and feline cardiopulmonary parasitic nematodes in Europe: emerging and underestimated. Parasite Vector 2010; 3:62.
274. Traversa, D., Mazzi. A., Di Cesare. A., Famigli Bergamini. P., Fracassi. F., Fanini. G., Aste. G., Pampurini. F., Boari. A., Potential efficacy of monthly administration of spot-on moxidectin 2,5% imidacloprid 10% in the simultaneous prevention of major canine filarioses. Parasitol. Res. 112 (November (11)). 2013; 3753-3756.
275. V. Kartashev., T. Tverdokhlebova., A. Korzan et al., "Human subcutaneous/ocular dirofilariasis in the Russian Federation and Belarus, 1997–2013," International Journal of Infectious Diseases, vol. 33, 2015; pp. 209–211.
276. V. Kravchenko., G. Itin., V. Kartashev et al., "Dirofilaria immitis and *D. repens* in sylvatic reservoirs of Krasnodar Krai (Russian Federation), "Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, vol. 6, 2016; pp. 35–38.
277. V. Salamatin., T. M. Pavlikovska., O. S. Sagach et al., "Human dirofilariasis due to *Dirofilaria repens* in Ukraine, an emergent zoonosis: epidemiological report of 1465 cases," Acta Parasitologica, vol. 58, no. 4, 2013; pp. 592–598.
278. Venco, L., Vezzoni, A. Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs and cats, 2001; p 161–177. In Simón F, Genchi C (ed), Heartworm infection in humans and animals. Ediciones Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.
279. Venco, L., Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs, 2007; p 117– 125. In Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G (ed), *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. Rolando Editore, Naples, Italy.
280. Vezzani, D., Carbajo, AE. Spatial and temporal transmission risk of *Dirofilaria immitis* in Argentina. Int J Parasitol. 2006; 36:1463–1472.
281. Vieira, L., Silvestre-Ferreira, AC., Fontes-Sousa, AP., Balreira, AC., Morchón, R., Carretón, E., Vilhena, H., Simón, F., Montoya-Alonso, JA., Seroprevalence of heartworm (*Dirofilaria immitis*) in feline and canine hosts from central and northern Portugal. J Helminthol 2014; 14:1–5.
282. Vieira, A. C., Silvestre-Ferreira, A. P., Fontes-Sousa et al., "Seroprevalence of heartworm (*Dirofilaria immitis*) in feline and canine hosts from central and northern Portugal," Journal of Helminthology, vol. 89, no. 5, 2015; pp. 625–629.
283. W. Demiaszkiewicz., G. Polanczyk., B. Osinska et al., "The prevalence and distribution of *Dirofilaria repens* in dogs in the Mazovian Province of central-eastern Poland," Annals of Agricultural and Environmental Medicine, vol. 21, no. 4, 2014; pp. 701–704.
284. Wakelin, D., Immunity to parasites: how parasitic infections are controlled, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 1984.
285. Wang, D., Bowman, DD., Brown, HE., Harrington, LE., Kaufman, PE., McKay, T., et al. Factors influencing US Canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) prevalence. Parasit Vectors. 2014; 7:264–82.
286. Webber, WAF., Hawking, F. Experimental maintenance of *Dirofilaria repens* and *D. immitis* in dogs. Exp Parasitol. 1955; 4:143–164.
287. Wegmann, TG., Lin, H., Guilbert, L., and Mosmann, TR., Bidirectional cytokine interactions in the maternal–fetal relationship: Is successful pregnancy a TH2 phenomenon? Immunology Today, 1993; 14: 353–356.
288. Weil, GH., Ottesen, EA., Powers, KC. *Dirofilaria immitis*: parasitespecific humoral and cellular immune responses in experimentally infected dogs. Exp. Parasitol. 1981; 51:80–86.
289. Weil, GJ., Malane, MS., Powers, KG. Detection of circulating parasite antigens in canine dirofilariasis by counter immuno-electrophoresis. Am J Tro Med Hyg. 1984; 33:425–30.
290. William, M. O. Boto., Kendal, G., Powers, and David, A. Levy. Antigens of *Dirofilaria immitis* which are immunogenic in the canine host: Detection by immuno-staining of protein blots with antibodies of occult dogs. J. immunol. 1984; Vol. 133. No. 2.
291. Wilmington, DE., USA. american Heartworm Society, 2014. <http://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/canine-guidelines.html> (Consulté en 2017).

292. Wu, M., et al. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biol.* 2004; 2:e69.
293. Yaman, M., Guzel, M., Koltas, IS., Demirkakik, M., Aktas, H. Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs, from Hatay province, Turkey. *Journal of Helminthology*, 2009; 83, 255–260.
294. Yannick, Vanloubbeck., and Douglas, E. Jones., The Immunology of *Leishmania* Infection and the Implications for Vaccine Development, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004; 1026: 267–272.
295. Yildirim, A., Ica, A., Atalay, O., Duzlu, O., Inci, A., Prevalence and epidemiological aspects of *Dirofilaria immitis* in dogs from Kayseri province, Turkey. *Res Vet Sci*, 2007; 82:358-63.
296. Yoshida, M., Nakagaki, K., Nogami, S., Harasawa, R., Maeda, R., Katae, H., and Hayashi, Y. Immunologic protection against canine heartworm infection. *J. Vet. Med.* 1997; Sci. 59, 1115–1121.
297. Yuasa, Y., Hsu, TH., Chou, CC., Huang, CC., Huang, WC., Chang, CC. The comparison of spatial variation and risk factors between mosquito-borne and tick-borne diseases: seroepidemiology of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* spp. and *Dirofilaria immitis* in dogs. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease*, 2012; 35, 599–606.



Figure 1: Matériel de l'Examen Clinique, et du prélèvement sanguin chez les chiens. "Photo Originale, 2016"



Figure 2: Prélèvement sanguin sur la veine saphène "Photo Originale, 2016"



Figure 3: Stockage et conservation des différents types de prélèvements réalisés. "Photo Originale, 2016"



Figure 4: Composition du Kit Diro-Chek (Réactifs) "Photo Originale, 2017".

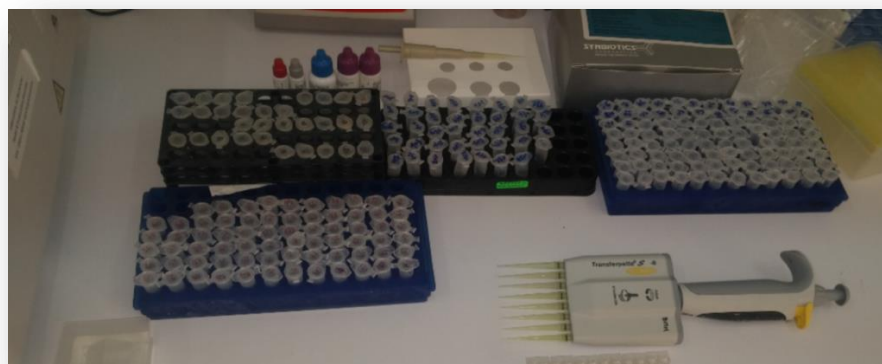


Figure 5: Préparation du matériel pour l'analyse sérologique "Photo Originale, 2017"



Figure 6: Principales étapes de la technique modifiée de Knott au Laboratoire.