

République Algérienne Démocratique et Populaire
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
Ministère de l'enseignement supérieur et de la Recherche scientifique
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire - Alger
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة

THESE

Doctorat en Sciences Vétérinaires

Thème

Contribution à la surveillance des vecteurs d'arboviroses et leishmanioses en Algérie

Par
LAFRI Ismail

P^r AISSI Meriem	(Professeur)	(ENSV)	(Président)
D^r BITAM Idir	(M.C.A)	(ENSV)	(Directeur de thèse)
P^r BEN MAHDI Meriem Hind	(Professeur)	(ENSV)	(Co -directeur de thèse)
P^r ARAB Karim	(Professeur)	(UMBB)	(Examineur)
P^r PAROLA Philippe	(Professeur)	(AMU)	(Examineur)
P^r BOUSLAMA Zihad	(Professeur)	(UBMA)	(Examineur)

2015

REMERCIEMENTS

A Pr AISSI Meriem

De l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de
mon jury de thèse. Sincère remerciements

A Dr BITAM Idir

De l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger

Qui a encadré mes projets et m'a fait le très grand honneur
de me superviser de très proche. Pour la confiance et la
patience dont vous m'avez fait preuve, veuillez trouver ici
l'expression de ma sincère gratitude

A Pr BEN MAHDI Meriem Hind

De l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger

Pour la confiance dont elle a fait preuve à mon égard en ayant
cru en moi, d'en avoir suivi ma traçabilité et de me
superviser. Hommages respectueux

A Pr ARAB Karim

De l'Université M'hammed BOUGARRA. Boumerdes

Qui m'a fait l'honneur de prendre part à ce jury. Sincères
remerciements

A Pr PAROLA Philippe

De Aix Marseille Université. France

Qui m'a fait l'honneur de m'accueillir au sein de son unité à
l'URMITE, de m'avoir encadré, superviser et qui a accepté
de siéger à mon jury. Sincères remerciements

A Pr BOUSLAMA Zihad

De l'Université Badji Mokhtar d'Annaba

Qui m'a fait l'honneur de prendre part à ce jury. Sincères
remerciements

Un grand hommage et reconnaissance à mes Directeurs de l'ENSV et de l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida pour leur flexibilité, esprit scientifique et soutien afin de franchir cette étape.

Mr DERFELLOU Kamel, qui m'a toujours ouvert ces portes lors des plus critiques moments durant toute ma post graduation à l'ENSV, mes respects les plus sincères.

Un remerciement particulier à Dr Arezki IZRI de l'hôpital Avicenne Paris, pour l'accueil au sein de son service, l'assurance de mon encadrement et ces précieux conseils, votre élève sera toujours reconnaissant.

Mes remerciements s'adressent au staff technique de l'unité d'entomologie médicale de l'URMITE (Jean Michel et François) pour l'aide, la disponibilité et leur esprit scientifiques.

Je tiens à remercier Dr LALOUT et Mr CHERGUI de l'EPSP Sidi Ali (Mostaganem), Dr BELLOUNDJA Amine (Vétérinaire à Bourkika) pour leurs disponibilités surtout sur terrain.

Je tiens à remercier Dr KERNIF de l'Institut Pasteur d'Algérie, Dr MAMMERIA de l'Université d'Annaba pour ces conseils et orientations.

DEDICACES

Merci a ma famille que je dois cette réussite professionnelle,

A mes parents

Pour avoir fait ce que je suis,

Sans votre soutien a tous niveau, je n'y serais jamais arrive,

A ma Mère

Pour tous les conseils avisés.....

Et pour avoir fourni la matière première

A mon père

Pour m'avoir donné cette vocation et l'amour de la science

Ta vie est un modèle

Ce travail vous est dédié, en témoignage de mon affection

A ma très chère Imene, mon frère et mes sœurs

Pour avoir contribué a ma réussite,

Pour m'avoir soutenu et avoir cru en moi

A tous mes ami (e) s

Sommaire

Résumé		01
Abstract		02
ملخص		03
Introduction générale		04
Chapitre I	Généralités	08
I.1	Les arboviroses	08
I.1.1	Définition	09
I.1.2	Classification	09
I.1.2.1	Arboviroses humaines majeures	09
I.1.2.1.1	La Dengue	12
I.1.2.1.2	La fièvre jaune	14
I.1.2.1.3	Chikungunya virus	16
I.1.2.2	Arboviroses animales majeurs	16
I.1.2.2.1	La fièvre catarrhale ovine	18
I.1.2.2.2	Schmallenberg virus	19
I.1.2.2.3	La peste équine	21
I.1.2.3	Arboviroses zoonotiques	21
I.1.2.3.1	La fièvre de la Vallée du Rift	22
I.1.2.3.2	La fièvre du Nil occidental	24
I.1.2.3.3	Les fièvres à phlébotomes	26
I.2	Les leishmanioses	27
I.2.1	Cycle évolutif des leishmanies	27
I.2.2	La leishmaniose viscérale	28
I.2.3	Les leishmanioses cutanées	28
I.3	Les moustiques	30
I.3.1	Rappels bibliographiques	30
I.3.2	Morphologie et biologie des principaux moustiques pathogènes	30
I.3.3	Classification des moustiques à intérêt médical	36
I.4	Les phlébotomes	37
I.4.1	Rappels bibliographiques	37
I.4.2	Morphologie et biologie des phlébotomes	39
Chapitre II	Inventaire des moustiques (Diptera: Culicidae) en Algérie	42
II.1	Sites et périodes de captures	43
II.2	Matériels et méthodes	44
II.2.1	Méthode d'échantillonnage	44
II.2.2	Méthode de montage et d'identification	43
II.2.3	Méthode d'élevage des moustiques (Changements trophique)	47
II.3	Résultats	47
II.4	Discussion	47
II.5	Conclusion	55
II.6	Production scientifique	56

Chapitre III	Identification des phlébotomes de terrain par MALDI-TOF MS	57
III.1	Introduction	58
III.2	Matériels et méthodes	60
III.2.1	Capture des phlébotomes	60
III.2.2	Identification morphologique des phlébotomes	61
III.2.3	Identification moléculaire des phlébotomes	61
III.2.4	Détection des leishmanies pour les specimens de la data base	
III.2.5	Specimens utilisés pour la création de la data base	62
III.2.6	La préparation des échantillons pour l'analyse avec MALDI-TOF MS	62
III.2.7	MALDI-TOF MS paramètres	63
III.2.8	Validation de l'étude (Blinds tests)	64
III.2.9	L'analyse typologique	64
III.3	Résultats	65
III.3.1	Les analyses par MALDI-TOF MS	67
III.3.2	Blind tests	70
III.4	Discussion	75
III.5	Conclusions et perspectives	80
III.6	Production scientifique	81
	Références bibliographiques	82
	Annexes	93

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Liste des Culicidae capturés dans 15 Wilayas de l'Algérie.	49
02	Nombre et sites de captures des phlébotomes	66
03	Phlébotomes utilisés pour la création de la data base et les arthropodes utilisés pour le Blind test 1.	72
04	Résultats d'incohérence entre morphologie et le MALDI-TOF MS	73

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Répartition mondiale des principaux arboviroses (Gubler <i>et al.</i> , 1996)	09
02	Incidence annuelle moyenne des cas de dengue hémorragique reportés à l'OMS entre 1955 et 1999 (OMS 2000).	10
03	<i>Aedes (aegypti/ albopictus)</i>	10
04	Gites larvaires (pneu usés)	10
05	Distribution de la dengue dans le monde en 2000 source OMS	11
06	En Blanc, les zones africaines et américaine d'endémie amarile (OMS 1999)	13
07	Distribution de la maladie (CHIKV) dans le monde (OMS 2008)	15
08	Zone de circulation possible de la fièvre catarrhale (Zientara <i>et al</i> , 2002)	17
09	Répartition géographique de la peste équine (Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation no 49/S spécial Équidés)	20
10	Répartition de la fièvre de la Vallée du Rift en 2003 (OMS)	22
11	Distribution du virus WN dans le monde (source CDC 2002)	25
12	Illustration schématique du cycle de vie des moustiques (Guillomot, 2005)	31
13	Œufs d' <i>Anophèles</i> . (Hurd , Photo IPNC 2005)	32
14	Œufs de <i>Culex</i> (Starosta,Photo IPNC 2005)	32
15	Œufs d' <i>Aedes aegypti</i> . (Photo IPNC 2005)	32
16	Larve d' <i>Anopheles</i> (Doggett)	33
17	Larve d' <i>Aedes aegypti</i> (Houdant, 2004)	33
18	Larve de <i>Culex Quinquefasciatus</i> (Houdant, 2004)	33
19	Nymphe d' <i>Anophèles</i> (Dogget, 2002)	34
20	Naissance d'un moustique (Pigat, 2003)	34
21	Classification de moustique d'intérêt médical (Rattanaxay, 2003)	36
22	Cycle de développement des phlébotomes (Niang et al, 2000)	41
23	Lieux de capture et de collecte des moustiques en Algérie	43
24	Méthode Dipping (Photo personnelle)	44
25	Piège lumineux CDC (Photo personnelle)	44
26	Technique de préparation des larves de Culicidae (Photo personnelle)	45

27	Préparation des adultes de Nématocères par la méthode de double épingle Technique de la minutie (Boukraa, 2009)	46
28	Œufs de <i>Culex</i> (Photo personnelle)	51
29	Œufs d' <i>Anopheles</i> (Photo personnelle)	51
30	Siphon respiratoire (<i>Culex territans</i>) (Photo personnelle)	51
31	Siphon respiratoire (<i>Culiseta longiareolata</i>) (Photo personnelle)	51
32	Siphon respiratoire (<i>Ochlerotatus dorsalis</i>) (Photo personnelle)	52
33	Siphon respiratoire (<i>Anopheles labranchiae</i>) (Photo personnelle)	52
34	Stratégie de préparation des échantillons pour l'analyse à MALDI-TOF MS	63
35	MALDI-TOF MS profils protéiques de trois différentes espèces du sous-genre <i>Larrousius</i>	68
36	MALDI-TOF MS profils des deux sexes des 6 espèces de la data base	68
37	MALDI-TOF MS profils distincts entre les deux sexes de la même espèce	69
38	MSP Dendrogramme de tous les spécimens de la data base	70
39	Spécimens utilisés pour le Blind test 2	74
40	Résultats des scores (LSVs) obtenus pour les spécimens du Blind test 2	75

Abbreviations

- CHIK.V : Virus Chickungunya
- Ac : Anticorps
- Ag : Antigène
- ELISA : Enzym linked immuno-sorbent Assay
- W. N. V : West Nile Virus
- *Ae* : *Aedes*
- OMS : Organisation mondiale de la santé
- OIE : Office international d'épizootie
- DEN : Dengue
- DHF : Dengue fébrile hémorragique
- CDC : Center of disease control
- FVR : Fièvre de la Vallée du Rift
- FHV : Fièvres hémorragiques virales
- MALDI – TOF MS : *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation time-of-flight mass spectrometry*
- LSVs: Log score value

Résumé

Dans un premier volet du travail, une étude des moustiques immatures et adultes a été menée dans 15 Wilayas de l'Algérie dans le but d'inventorier des Culicidae et de documenter les relations entre les espèces dans leurs différents biotopes. 3 familles, 7 genres et 17 espèces récoltées dont deux records significatifs : des larves de *Culex territans* collectées à 1750 m d'altitude et la confirmation de la présence d'*Aedes albopictus* (vecteur de la Dengue, Chikungunya et autres arboviroses) en Algérie qui est la seconde capture dans notre pays et à l'échelle Maghrébine.

Dans un second volet, nous avons mis en évidence l'identification des phlébotomes de terrain par MALDI-TOF MS, les phlébotomes ont été capturés dans 4 régions de l'Algérie. Un nombre de spécimens représentatif a été identifié morphologiquement et par outils moléculaires, afin de créer une data base composée de 28 phlébotomes, stockés à -80°C, non gorgés et indemnes aux Leishmanies, issus de ces 4 zones de captures. 6 espèces présentes dans ces zones, ont été utilisées pour la création d'une data base afin de produire des spectres de référence. La pertinence de cette méthode a été validée par deux tests à l'aveugle successives (Blind Tests) dont 80 nouveaux spécimens morphologiquement identifiés et stockés à -80 ° C, et 292 spécimens inconnus conservés dans différentes conditions dont certains étaient gorgés. La reproductibilité intra-espèces et la spécificité inter-espèces des profils de protéines ont été observées, une nette différenciation entre les espèces du même sous genre, ainsi que différents genre a été notée. Les sexes n'ont pas pu être distingués dans notre étude. En outre, lorsque les résultats entre la morphologie et le MALDI ont été notées, la biologie moléculaire a confirmée et réconfortée l'identification par MALDI-TOF MS. Cependant, les résultats d'identification MS ont été hétérogènes et faibles pour les spécimens gorgés ou stockés dans l'alcool. La présente étude a mis en évidence l'application de MALDI-TOF MS pour la surveillance entomologique des phlébotomes capturés sur terrain. Le faible coût, la fiabilité et la rapidité de cette méthode nous permet d'initier de nouveaux moyens dans la gestion des maladies transmises par les phlébotomes.

Mots clés: phlébotome, Arboviroses, *Culex*, *Aedes*, Culicidae, moustiques MALDI-TOF MS, identification, insectes, vecteurs.

Abstract

For the first time, a survey of immature and adult mosquitoes was conducted in 15 Wilayas with the aims of inventorying the Culicidae and documenting inter-species relationships in different habitats. In total, 3 families, 7 genera and 17 species were collected, including the first report of *Culex territans* larvae captured at an altitude of 1750 m and the confirmation of the presence of *Aedes albopictus* (Dengue, Chikungunya and other arboviruses vector) in Algeria and the Maghreb, based on a second capture in this country.

The last two decade progresses in *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) has emerged as an accurate tool for arthropod identification. The objective of the present study was to investigate the usefulness of MALDI-TOF MS as a tool for identification of field-caught phlebotomine. To this aim, sand flies were captured from the Center, West and East of the Northern Algerian areas. A subset were identified morphologically and molecularly, and a total of 28 field-caught sand flies stored at -80°C corresponding to the 6 species found in these areas, were used for the creation of a reference spectra database. The relevance of this original method for sand flies identification was validated by two successive blind tests including 80 new specimens morphologically identified and stored at -80°C, and 292 unknown specimens preserved in different conditions among which some were engorged. Intra-species reproducibility and inter-species specificity of the protein profiles were observed, resulting species singular spectra allowing also to distinct specimens at the gender level. Querying of the sand fly database with the MS spectra from the blind test groups, revealed concordant results between morphological and MALDI-TOF MS identification. Moreover, when discrepancy results were noted, molecular biology confirmed always MALDI-TOF MS identification. However MS identification results were more contrasted for specimens engorged or stored in alcohol. The present study highlighted the application of MALDI-TOF MS for the monitoring sand flies fauna captured in the field.

Key words: Arbovirus, *Culex*, *Aedes*, Culicidae, mosquitoes, phlebotomine, sand fly, MALDI-TOF MS, identification, insect, vector.

في الجزء الأول من العمل، أجريت دراسة على البعوض غير ناضجة والكبار في 15 ولاية جزائرية من أجل جرد البعوضيات وتوثيق العلاقة بين الأنواع المختلفة في بيئاتها. 3 عائلات ، 7 جنسا و 17 نوع جمعت حيث اثنين من السجلات الهامة : بركات كيولكس تريبتيس اين جمعت في الارتفاع 1750 م وتم التأكد من وجود ايداس البوبيكتيس في الجزائر حيث انه يعتبر ثاني امسك في بلدنا وعلى نطاق والمغرب العربي.

في الجزء الثاني ، سلطنا الضوء على تحديد هوية ذبابة الرمل وذلك بتقنية المالدي توف حيث تم القبض على ذبابة الرمل في 4 مناطق من الجزائر. عدد من عينات تمثيلية تم تحديد هويتها شكليا وبواسطة الأدوات الجزئية لإنشاء قاعدة بيانات مكونة من 28 ذبابة الرمل ، وتخزينها في -80 درجة مئوية ، لم تكن محتقنة ولا تحتوي الليشمانيا ، كلها من المناطق الاربعة.

الأنواع الستة المتواجدة في هذه المناطق ، استخدمت لإنشاء قاعدة بيانات من أجل إنتاج الأطياف المرجعية. تم تثبيت مائة هذه الطريقة بواسطة اختباري المتتاليات العمياء () ، حيث 80 عينة جديدة محددة الهوية شكليا و مخزنة في-80 درجة مئوية ، و بالإضافة الى 292 عينة مجهولة محفوظة في ظروف تخزين مختلفة ، والتي كان بعضها محتقن. تم ملاحظة قابلية التكاثر و الخصوصية داخل الأنواع لملاح البروتين ، لوحظ وجود تمايز واضح بين الأنواع من نفس جنس وكذلك تم تسجيل اجناس مختلفة . لم نتمكن من التمييز بين الجنسين في دراستنا. وعلاوة على ذلك، عندما لوحظت النتائج بين الشكل والمالدي توف ، أكدت البيولوجيا الجزئية تحديد الهوية الذي تم بواسطة المالدي توف

ومع ذلك، كانت نتائج تحديد المالدي توف م سغير متجانسة ومنخفضة لعينات المحتقنة او المخزنة في الكحول. وأبرزت هذه الدراسة تطبيق مالدي توف لمراقبة الحشرات من ذباب الرمل الذي يتم امساكه في الميدان . انخفاض التكلفة ، و الموثوقية وسرعة هذه الطريقة تسمح لنا أن نقدم طرقا جديدة في إدارة الأمراض التي تنتقل عن طريق ذبابة الرمل.

الكلمات المفتاحية : ذباب الرمل, اربوفيروز, , كيلسيدي, الباعوض, تحديد الهوية , حشرات , ناقلات
الامراض

Introduction générale

La Terre est présentement en train de subir un phénomène appelé le changement global, impliquant entre autre le réchauffement global de la planète amorcé il y a 300 ans. Le climat global a subi une hausse d'environ 0,6°C durant le dernier siècle avec deux périodes de réchauffement, soit entre 1910 et 1945 et de 1976 à aujourd'hui (Walter *et al.*, 2002).

Les maladies transmises par vecteur semblent particulièrement affectées par la hausse de température moyenne de certaines régions. Des exemples connus, dont la maladie de Lyme qui implique une tique et l'encéphalite causée par le virus du Nil occidental qui implique un moustique, seront survolés pour mieux illustrer la problématique (Brower *et al.*, 2001).

Ce sont sans doute les changements démographiques et sociaux actuels qui sont les principaux responsables de la résurgence des maladies infectieuses en général et vectoriels en particulier (Gubler. 2002 et Rodhain. 2003). Parmi ces changements, on peut citer l'urbanisation rapide et anarchique des pays en voie de développement, les déplacements de populations liés aux conflits, la déforestation et la généralisation des échanges (Rodhain. 2003).

Les maladies vectorielles sont un des problèmes majeurs de santé publique à travers le monde. La maladie la plus répandue et la plus meurtrière est le paludisme, avec un à deux millions de morts par an. Les filarioses lymphatiques touchent 100 millions d'individus (Rodhain. 1985).

L'organisation mondiale de la santé (OMS. 2010) estime par an à 300 millions de cas de paludisme clinique dans le monde dont 1.000.000 de décès. Pire ! 90% de ces décès surviennent en Afrique subsaharienne. Les responsables de l'OMS affirment que le paludisme tue 3 enfants africains toutes les 30 secondes.

L'Algérie n'est pas épargnée où la Leishmaniose viscérale présente une incidence annuelle avoisine 0,61 cas pour 100 000 habitants (OMS. 2010).

Cette maladie est peu représentée certes en Algérie contrairement à la leishmaniose cutanée (LC) qui est la plus importante maladie parasitaire, dont nous appartenons aux pays les plus endémiques (Alvar *et al.*, 2012). Mais compte-tenu du réchauffement climatique en sera t-il encore ainsi dans les décennies à venir?

Parallèlement en santé vétérinaire, plusieurs arbovirus zoonotiques et strictement animales sont transmis aux bovins, ovins, caprins, équidés et d'autres animaux par des arthropodes hématophages et présentent une importance économique considérable.

.....Pour cela, Le choix de l'étude sur les Nématocères hématophages d'une manière générale s'est fait à cause des méfaits considérables provoqués par les nombreuses espèces qui jouent un rôle important en pathologie humaine et animale.

En ce qui concerne la taxonomie et l'entomologie des Nématocères (moustiques et phlébotomes) en Algérie, peu de travaux sont réalisés. Des études récentes ont été menées sur les Culicidae, en particulier au sujet de leur systématique, la biochimie, la morphométrie, et les moyens de lutte chimique et biologique (Bouabida *et al.*, 2012; Boudmagh *et al.*, 2013). A présent 50 espèces de moustiques ont été décrits selon (Brunhes *et al.*, 1999) et la première description du moustique tigre (*Aedes albopictus*) en Algérie et l'échelle maghrébine (Izri *et al.*, 2011). 23 espèces de phlébotomes ont été décrites après la dernière description de *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascitti* à Tizi-Ouzou (Berdjane Brouk *et al.*, 2011).

Parallèlement, la surveillance épidémiologique est essentielle dans la stratégie de lutte contre les maladies vectorielles. Disposer d'outils d'identifications précis des vecteurs et des pathogènes associés est indispensable. Les méthodes d'identifications des arthropodes (morphologie, biologie moléculaire) existantes présentent des limites.

Le MALDI- TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation time-of-flight mass spectrometry*) est un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol, cette technologie protonique a émergée il ya quelques années et est actuellement utilisée en routine pour l'identification des bactéries dans de nombreux laboratoires de microbiologie (Riat *et al.*, 2014). Cette technique innovante pourra être considérée comme une alternative pour l'identification des arthropodes hématophages dont on note l'identification des tiques (Yssouf *et al.*, 2013 a), moustiques (Yssouf *et al.*, 2013 b), puces (Yssouf *et al.*, 2014) et les phlébotomes d'élevage (Dvorak *et al.*, 2014). L'un de nos objectif de cette thèse est d'identifier et inventorier par MALDI-TOF MS des phlébotomes d'Algérie capturer sur des zones endémiques aux leishmanies et de créer une base donnée spéciale d'espèces de phlébotomes de l'Algérie.

Chapitre I

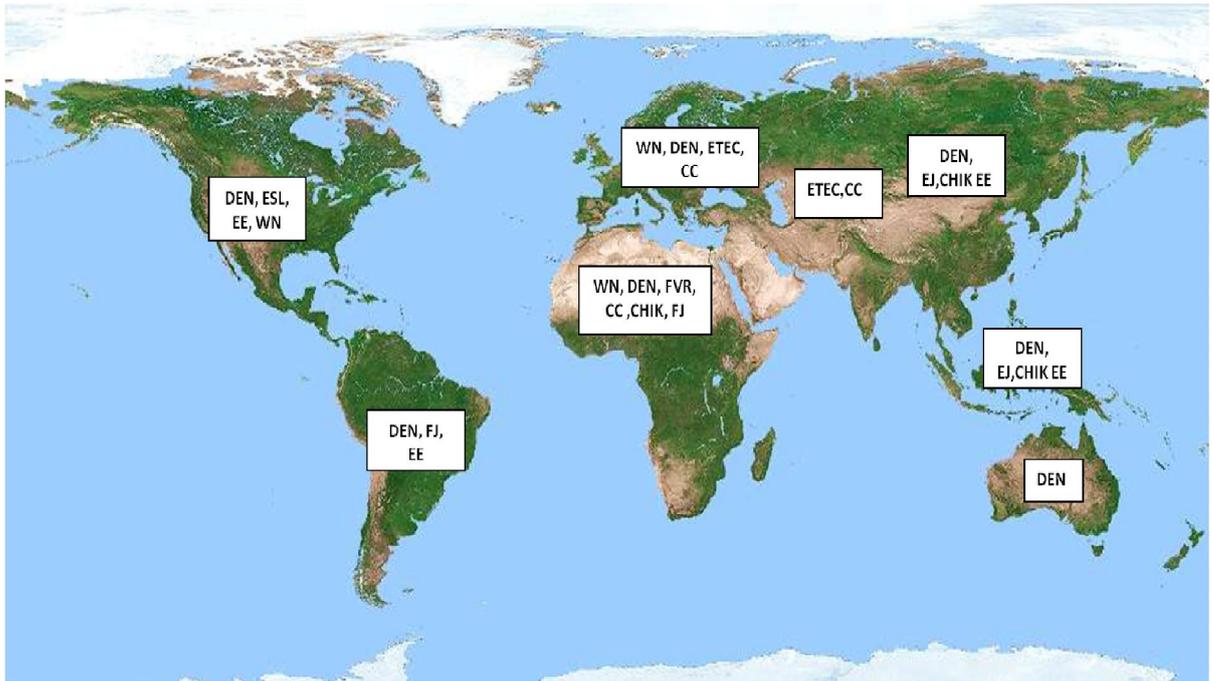
Généralités

I.1. Les arboviroses

I.1.1. Définition

Les arboviroses représentent un ensemble hétérogène de maladies dues à des virus de structures diverses infectant des vertèbres. Leur point commun est une transmission par des arthropodes hématophages, d'où le nom d'arbovirus (**arthropode borne virus**) (Gubler *et al.*, 1996). Les moustiques, les phlébotomes et les tiques sont les principaux vecteurs. Plus de 500 arbovirus sont répertoriés, dont environ 150 ont une importance médicale. Certaines arboviroses sont strictement animales.

Elles peuvent toucher le bétail et entraîner de graves crises économiques dans les pays en voie de développement. La plupart sont communes à l'homme et aux animaux. Les mammifères constituent le réservoir principal des virus, la transmission à l'homme étant accidentelle. Soit l'homme s'introduit dans le foyer naturel et s'interpose dans le cycle zoonotique du fait de ses activités (chasse, travaux forestiers....etc), soit le virus va à la rencontre de l'homme en empruntant des relais animés (arthropodes vecteurs, singes en quête de nourriture, oiseaux migrateurs) (Jouan *et al.*, 1997). Les arboviroses sont cosmopolites, touchant tous les continents mais surtout les zones tropicales (Figure 1) (Gubler *et al.*, 1996)



CC : Crimée-Congo ; CHIK : Chikungunya ; DEN : dengue ; EE : encéphalites équinées EJ : encéphalite japonaise ; ESL : encéphalite Saint Louis ; ETEC : encéphalite à tiques d'Europe centrale FJ : fièvre jaune ; FVR : fièvre de la vallée du Rift ; WN : West Nile

Figure 1: Répartition mondiale des principaux arbovirus (Gubler *et al.*, 1996)

I.1.2. Classification

I.1.2.1. Arbovirus humains majeurs

I.1.2.1.1. La Dengue

C'est l'arbovirose majeure dans l'espèce humaine et elle est en constante progression (Figure 2). L'homme est pratiquement le seul vertébré infecté bien que l'infection de singes ait été mise en évidence en Malaisie et au Sénégal. Le virus de la dengue appartient au genre *Flavivirus* de la famille des *Flaviviridae*. Quatre stéréotypes (DEN 1, 2, 3 et DEN 4), n'assurant pas de protection croisée, sont responsables de 100 millions de cas annuels, de 250 000 cas graves et d'une mortalité de 20 000 à 30 000 cas/an.

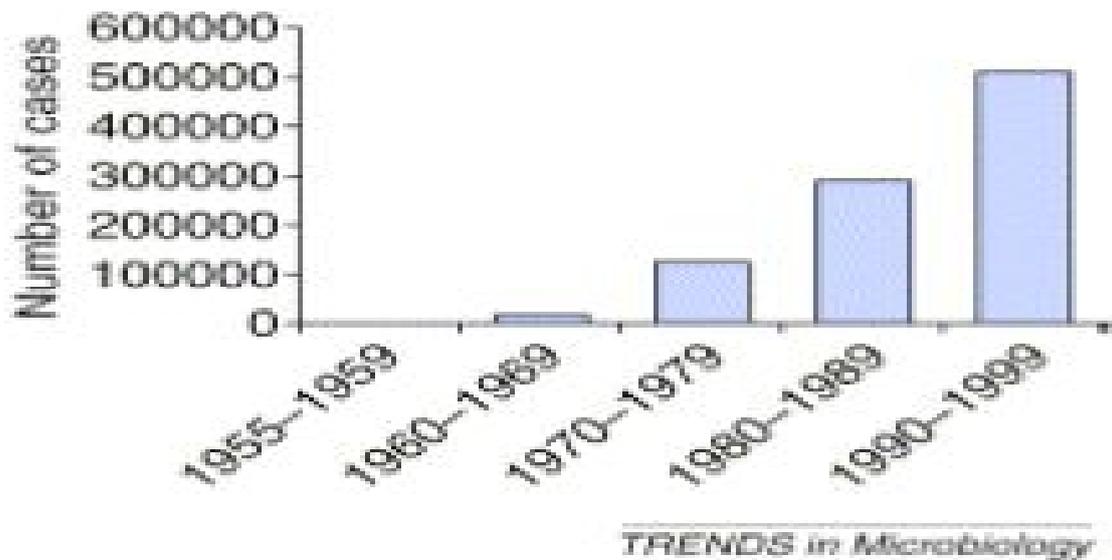


Figure 2: Incidence annuelle moyenne des cas de dengue hémorragique reportés à l'OMS entre 1955 et 1999 (OMS. 2000).

La transmission est assumée par des moustiques du genre *Aedes* dont les larves colonisent les récipients domestiques ou abandonnés, les citernes, les toilettes, les canalisations et les caniveaux. *Aedes aegypti* (Figure 3) anthropophile, domestique et urbain, est le vecteur des épidémies qui touchent les villes et *Aedes albopictus*, espèce sauvage et rurale, est responsable de la transmission endémique du virus en zone urbaine et périurbaine.



Figure 3: *Aedes (aegypti / albopictus)*



Figure 4: gîtes larvaires (pneu usés)

(Photo IPNC 2005)

La dengue est endémo-épidémique en Asie, dans le Pacifique Sud et ne cesse de s'étendre vers l'Amérique centrale et du Sud. En Afrique, la dengue est surtout présente sur les côtes occidentales et orientales, au Sénégal, au Burkina Faso, mais elle n'est ni épidémique ni hémorragique. L'extension d'*Ae. albopictus* à partir de l'Asie serait liée au transport intercontinental de vieux pneus (Figure 4), gîtes d'*Aedes* (Guillet *et al.*, 1999). Des dengues hémorragiques sont signalées à Cuba depuis 1981 et aux Caraïbes depuis 1986, aux Antilles françaises en 1998 (Solomon *et al.*, 1998), la région côtière de la Guyane française (DEN2) en 1991 et 1992. Le Nord de l'Italie est actuellement colonisée par *Ae. albopictus* qui pourrait y transmettre la dengue bien que ce moustique ne soit pas un bon vecteur (Guillet *et al.*, 1999). (Figure 5).

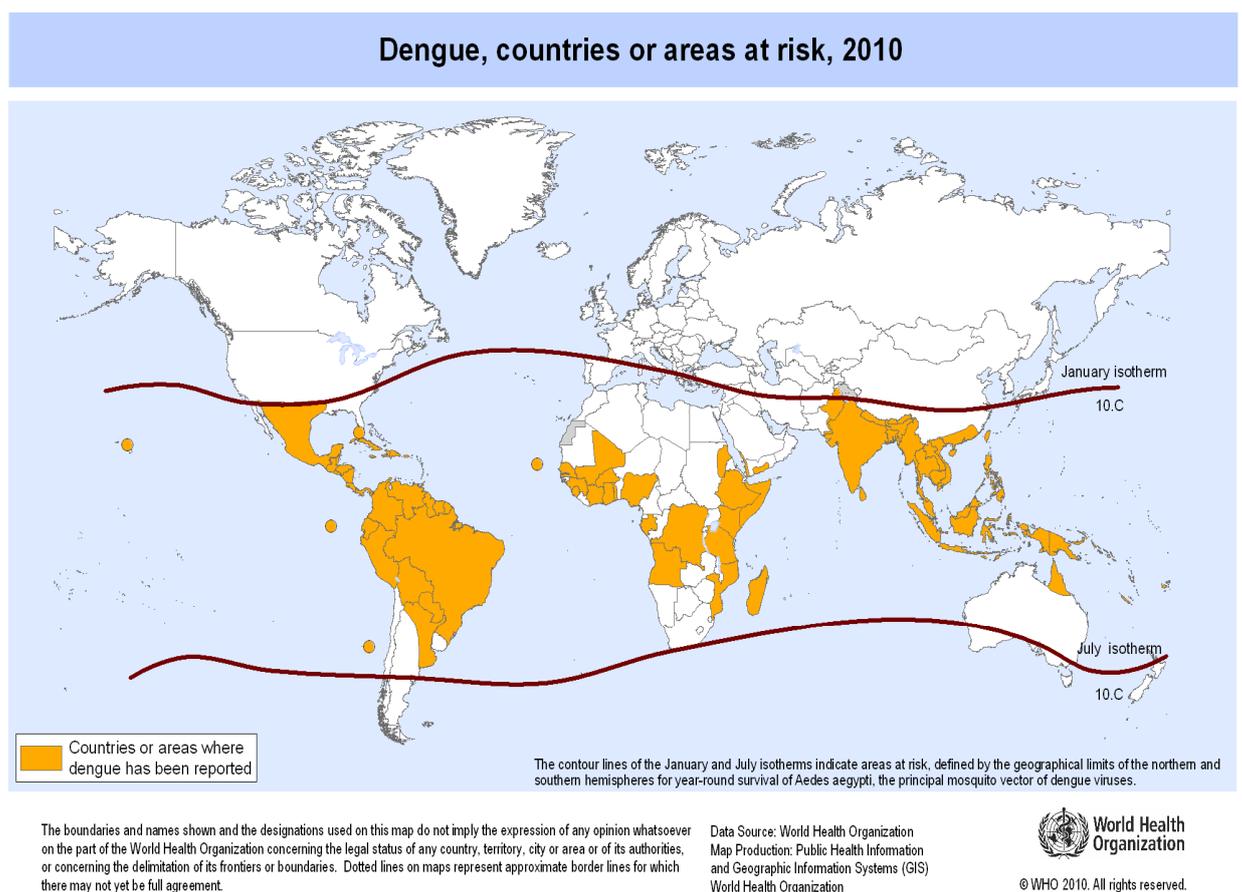


Figure 5: Distribution de la dengue dans le monde en 2010 source OMS.

L'incubation est en moyenne de 5 à 8 jours, 80% des formes sont inapparentes, 10% se traduisent par des symptômes classiques et bénins (fièvre algues début brutal, douleurs dorsales avec attitude guindée des patients donnant son nom de la maladie, et 10% sont graves: dengue hémorragique dont la mortalité est de 50% et dengue avec choc infectieux. Une réinfection par une souche de dengue hétérologue entraînant l'intervention d'anticorps facilitant et une libération massive de cytokines est une des explications aux formes hémorragiques (Kanayanarooj *et al.*, 1997). Aucun vaccin n'étant actuellement disponible, la prévention se résume à la lutte anti vectorielle et aux mesures de prévention individuelle. L'utilisation de moustiquaires est cependant peu adaptée au genre *Aedes* dont l'activité est diurne. (Toulou *et al.*, 1997).

I.1.2.1.2. La Fièvre jaune

Le virus amaril appartient au genre Flavivirus de la famille des Flaviviridae. L'incidence annuelle de la fièvre jaune serait de 200 000 cas /an responsables de 30 000 décès cas /an (Morillon *et al.*, 1998). En Amérique, le principal réservoir du virus est représenté par les singes et accessoirement les marsupiaux. Les moustiques du genre *Aedes* diurnes, sont les principaux vecteurs. La zone d'endémicité s'étend du Venezuela et de la Colombie jusqu'au Panama, les pays les plus touchés étant la Bolivie, le Brésil et la Colombie (bassin amazonien) où l'on signale des cas sporadiques. En Afrique intertropicale, du 15 °N au 15 °S. Les épidémies majeures surviennent actuellement en Afrique de l'Ouest (Sénégal, Nigeria, Ghana, Burkina Faso, Gambie, Mali), le réservoir est assuré par les singes (Figure 6).

I.1.2.1.3. Le virus Chikungunya (alphavirus)

La fièvre Chikungunya est causée par un alphavirus (CHIK.V) à ARN appartenant à la famille des Togaviridae et au séro groupe des virus *arthritogéniques* du type Semliki Forest (Porterfield *et al.*, 1980). Le CHIKV est connu pour être transmis à l'homme par les piqûres des moustiques femelles du genre *Aedes*, notamment par *Ae. Aegypti*, vecteur de la dengue et de la fièvre jaune. Isolé pour la première fois par Ross en 1953 au décours d'une épidémie apparue au Tanganyika (future Tanzanie), son nom dérive de l'attitude particulière des malades: en dialecte du peuple *makonde*, Chikungunya signifie « marcher courbé » (Ross *et al.*, 2001).

En 2004-2005, une épidémie d'infections à CHIKV est partie de l'île de Lamu (13 500 cas, séroprévalence 75%) puis a touchée la côte Kenyaine avant d'atteindre l'archipel des Comores (215 000 cas, 63%) en janvier 2005 (Sergon *et al.*, 2008).

En 2005-2006, sans doute à la faveur d'une mutation de son génome et des transports aériens (Schuffencker *et al.*, 2006), le virus s'est répandu dans les populations non-immunes des îles de l'Océan Indien : La Réunion (300 000 cas, 38 %) (Gerardin *et al.*, 2008), Mayotte (65 000 cas, 37 %) (Sissoko *et al.*, 2008), Maurice, Les Seychelles et Madagascar. En décembre 2005, le CHIKV a également gagné le sous-continent Indien où l'épidémie a pris une ampleur sans précédent (plus de 1400 000 cas dans quinze Etats), dépassant toute possibilité de dénombrement (Yrogolkar *et al.*, 2006). L'Italie, où 257 cas ont été notifiés en deux mois, principalement dans deux petits villages de la province d'Emilia-Romagna (Harisson *al.*, 1971) (Figure 7). Ces chiffres peuvent s'expliquer par l'excellente capacité vectorielle d'*Ae. Albopictus*, le moustique tigré d'Asie, en pleine expansion dans le monde (Lo presti *et al.*, 2014).

Elles se manifestent par une fièvre élevée (> 39°C) d'apparition brutale, des arthralgies souvent intenses touchant préférentiellement les extrémités (poignets, chevilles, phalanges) mais aussi le rachis, contraignant le patient à rester couché (Lo presti *et al.*, 2014).

Les différentes souches de CHIKV sont proches sur le plan antigénique si bien qu'une infection contre une souche est protectrice vis à vis des autres souches. Plusieurs vaccins ont été testés dont le vaccin vivant atténué l'USAMRIID, développé par l'armée américaine dans les années 80 et dont la tolérance est apparue, qui provoquait la formation d'anticorps sans toutefois que l'activité protectrice ait pu être démontrée au plan clinique car aucun des sujets vaccinés n'a été ensuite exposé au CHIKV (Couderc *et al.*, 2009).



Figure 7: Distribution de la maladie (CHIKV) dans le monde (OMS. 2008).

I.1.2.2. Arboviroses animales majeurs

I.1.2.2.1. La fièvre catarrhale ovine

Arbovirose, non contagieuse, inoculable. Elle appartient à la liste des maladies fortifiées à l'OIE et à l'ancienne liste A. C'est une MRC à déclaration obligatoire. Elle a été déclarée pour la première fois en Afrique du Sud en 1902 (Hutcheon. 1902). Sa présence est avérée à l'état enzootique sur tous les continents en zone tropicale et subtropicale (entre 20 et 30° Sud et 40-50° Nord). Aux frontières de son aire de répartition, elle sévit de manière épizootique. Passe en théorie inaperçue chez les bovins (Parsonson *et al.*, 1994).

Causée par un virus de la famille des *Reoviridae*, genre *Orbivirus*. Il en existe 24 sérotypes présentant des relations antigéniques plus ou moins étroites entre eux. Le virus est transmis par des arthropodes du genre *Culicoides* (Martínez-de la Puente J *et al.*, 2015).

C'est un petit virus d'un diamètre compris entre 68 et 70 nm. Le génome est constitué de 10 segments d'ARN bicaténaire, codant chacun pour une protéine (Mohl *et al.*, 2014) et est logé au sein d'une capsid interne composée de 32 capsomères. Les *Culicoides* sont de petits Diptères de 1 à 3 mm de long, aux ailes dépourvues d'écailles, en général tachetées de gris et repliées sur le dos (Fall *et al.*, 2014). Les dessins formés par les taches sont utilisés pour la diagnose. Il existe deux types de vaccins : vaccin à virus inactivé contre les sérotypes 2 et 4, destinés aux ovins; des valences dirigées contre d'autres sérotypes (notamment le 16) seront bientôt disponibles, vaccin à virus atténués sud-africains (avec les inconvénients inhérents à l'utilisation de vaccins vivants) (Zientara *et al.*, 2002).



Figure 8: Zone de circulation possible de la fièvre catarrhale (Zientara *et al.*, 2002)

❖ **Impact économique et sanitaire**

✓ **Impact économique**

L'impact économique d'une maladie dépend de plusieurs facteurs:

Les pertes sont non seulement directes par mortalité et avortements mais aussi indirectes par retard de croissance, déclasserement des carcasses, mauvaise qualité de la laine et restrictions imposées au commerce (interdiction d'exportation). Lors de la première épizootie décrite aux États-Unis en 1952, par exemple, la fièvre catarrhale aurait atteint 350 000 moutons bien que la souche ait été considérée comme peu virulente et les pertes annuelles dues aux restrictions des exportations vers les pays indemnes sont estimés à 125 millions de dollars (Callis. 1985).

De même, les incursions périodiques dans les pays du sud de l'Europe qu'il s'agisse de la fièvre catarrhale (Espagne et Portugal de 1967 à 1970, Grèce en 1980 et Albanie en 1999) ou de la peste équine (Espagne en 1987) démontrent à l'envi que les risques pour les pays limitrophes des zones d'enzootie sont loin d'être négligeables.

✓ **Impact sanitaire**

En revanche, en ce qui concerne les arboviroses du groupe III, seule la maladie humaine est prise en compte alors que l'impact économique de la maladie animale est le plus souvent oublié. L'encéphalite japonaise, par exemple, est considérée en Asie comme l'une des principales causes, sinon la principale, d'encéphalites humaines (45 000 cas cliniques par an dans le monde, dont plus de 10 000 cas en Chine et de 3 000 à 4 000 cas en Inde, entraînant annuellement la mort d'environ 11 000 personnes) alors que les pertes dans l'espèce porcine sont sous-estimées voire totalement ignorées (Callis.1985).

I.1.2.2.2. Schmallenberg virus

Le virus de Schmallenberg a été découvert en novembre 2011, et fait l'objet de recherches épidémiologiques, immunologiques et virologiques dans plusieurs pays européens. Cette fiche technique contient des informations concernant les observations épidémiologiques et les recherches menées à ce jour (octobre 2013) ainsi que des données extrapolées à partir de virus génétiquement proches appartenant aux mêmes genres et séro groupe (Bouwstra *et al.*, 2013).

Les espèces bovines, ovines et caprines sont les plus touchées, la virémie est comprise entre 3 à 5 jours. Les signes cliniques se manifestent différemment selon les espèces: les bovins adultes ont présenté une forme discrète d'infection aiguë durant la période d'activité des vecteurs alors que les malformations congénitales ont concerné un plus grand nombre d'espèces de ruminants (bovins, ovins, caprins et bisons jusqu'à présent). Des cas de diarrhée ont également été rapportés dans quelques élevages ovins et bovins laitiers (Beer *et al.*, 2013).

Quelques cas d'infection à *Orthobunyavirus* avaient été rapportés précédemment en Europe mais aucun virus du sérotype Simbu n'avait été isolé en Europe avant 2011. Le virus de Schmallerberg a d'abord été détecté en Allemagne, en novembre 2011, dans des échantillons prélevés en été et en automne 2011 sur des vaches laitières malades (fièvre et chute du rendement laitier). Des signes cliniques analogues (diarrhée notamment) ont été observés chez des vaches laitières aux Pays-Bas, où la présence du virus de Schmallerberg a également été confirmée en décembre 2011. Depuis le début décembre 2011, des malformations congénitales ont été signalées aux Pays-Bas chez des agneaux nouveau-nés, et le virus de Schmallerberg a été détecté et isolé sur le tissu encéphalique. À ce jour, des cas de mortalité et de malformations congénitales avec positivité de la PCR ont été rapportés par les Pays-Bas, la Belgique, l'Allemagne, le Royaume-Uni, la France, le Luxembourg, l'Espagne, l'Italie, la Suisse, l'Autriche et l'Irlande. En outre, la propagation du virus de Schmallerberg a été rapportée dans de nombreux autres pays. (Conraths *et al.*, 2012)

I.1.2.2.3. La peste équine

La peste équine constitue un véritable fléau de l'élevage équin pour les pays infectés et, à ce titre, est inscrite sur la liste des maladies à déclaration auprès de l'Organisation mondiale de la santé animale. Cette maladie, cantonnée depuis des siècles à son berceau africain, est apparue en Europe en 1966 dans la péninsule ibérique puis au Maroc (Figure 9). Arboviroses strictement animale due aux *Orbivirus*, se transmet chez les équidés de façon indirecte par l'intermédiaire d'arthropodes hématophages. De nombreux vecteurs semblent potentiellement capables de transmettre la maladie (notamment les moustiques des genres *Aedes*, *Culex* et *Anopheles* ou les tiques des genres *Hyalomma* ou *Rhipicephalus*) (Mellor. 1993). Cependant, le vecteur biologique majeur s'avère être un insecte du genre *Culicoides* (du Toit. 1994).

L'incubation est de durée variable selon la virulence de la souche et la réceptivité de l'équidé mais est en moyenne, de 3 à 15 jours (Mellor. 2004). La maladie survient après une poussée fébrile irrégulière et progressivement ascendante. Elle peut évoluer sous des formes différentes selon la prédominance de l'atteinte pulmonaire ou cardiaque. De lourdes pertes économiques sont envisagées et l'euthanasie reste le moyen principal de lutte.

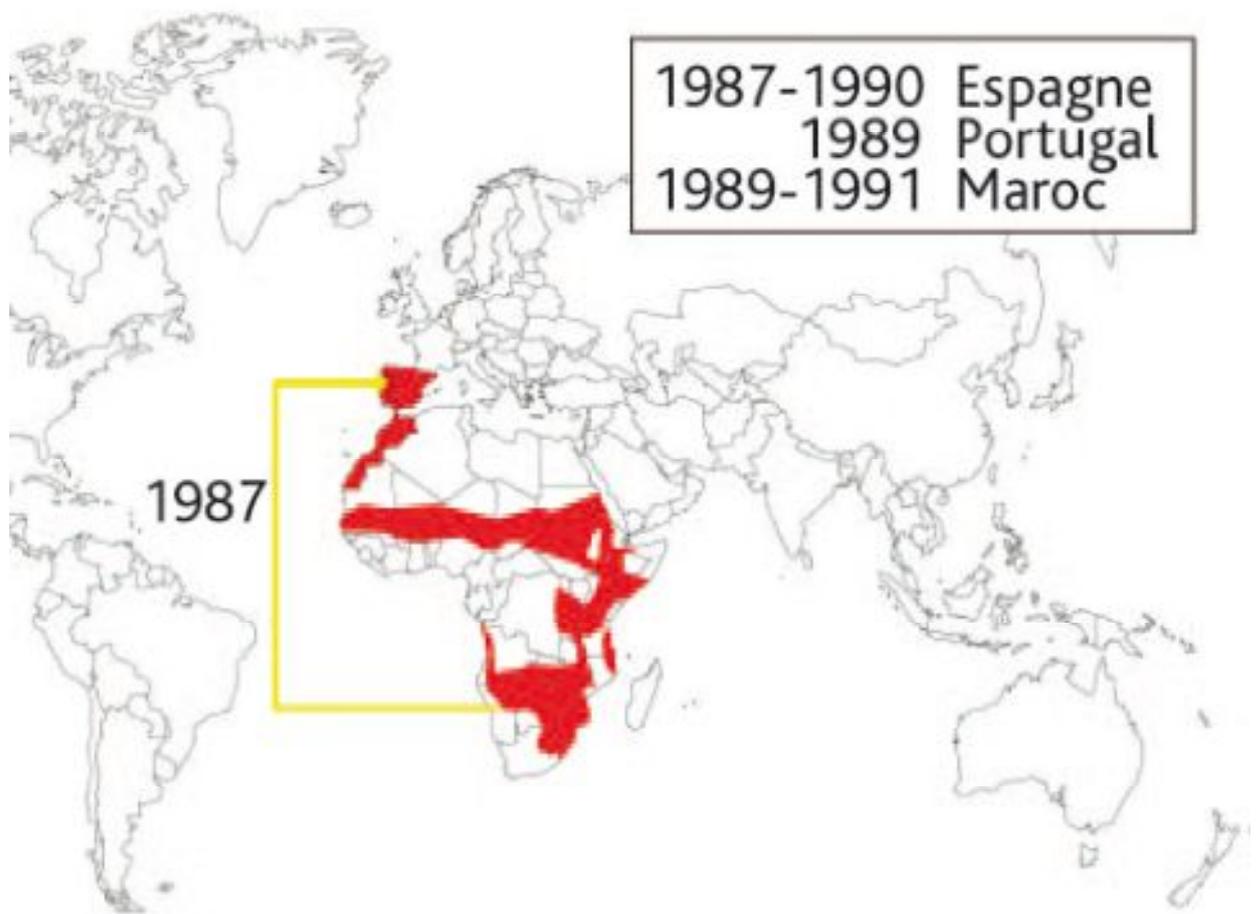


Figure 9. Répartition géographique de la peste équine (Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation no 49/Sécial Équidés)

I.1.2.3. Arboviroses zoonotiques

I.1.2.3.1. La fièvre de la Vallée du Rift

Cette arbovirose due à un Phlebovirus de la famille des Bunyaviridae, dont il n'existe qu'un seul type antigénique, est transmise surtout mais non exclusivement par des *Aedes*, réservoirs de virus. C'est dans la vallée du Rift, au Kenya, que le virus de cette affection a été découvert en 1931 par Montgomery (Nicholas *et al.*, 2014). Les premiers cas humains mortels ont été répertoriés en Afrique du Sud en 1975 puis des épidémies ont touché l'Égypte en 1977, la Mauritanie en 1987, le Kenya en 1998. Des cas de contamination professionnelle sont rapportés chez des équarrisseurs, des éleveurs ou des bouchers. Une contamination humaine par aérosol est possible à partir des produits d'avortement du bétail infecté.

Chez l'homme, dans 95 % des cas, l'infection se traduit par une forme pseudo-grippale non compliquée. Une atteinte oculaire avec photophobie et perte de l'acuité visuelle peut s'observer de même qu'un décollement de la rétine. Exceptionnellement, des méningo-encéphalites ou des formes ictero-hémorragiques sont décrites avec le plus souvent une évolution fatale. Dans les formes hémorragiques, 2 à 4 jours après le début du syndrome grippal, apparaissent des pétéchies, des ecchymoses, des hémorragies sous-cutanées. Une hépatosplénomégalie avec ictère et anémie sont habituelles et le décès par choc survient en quelques jours. (Morillon *et al.*, 1998). Un vaccin inactivé à usage humain a été mis au point. Celui-ci n'est pas homologué ni commercialisé mais on l'a utilisé expérimentalement pour protéger les vétérinaires et le personnel de laboratoire courant un risque élevé d'exposition à la FVR (OMS. 2000).

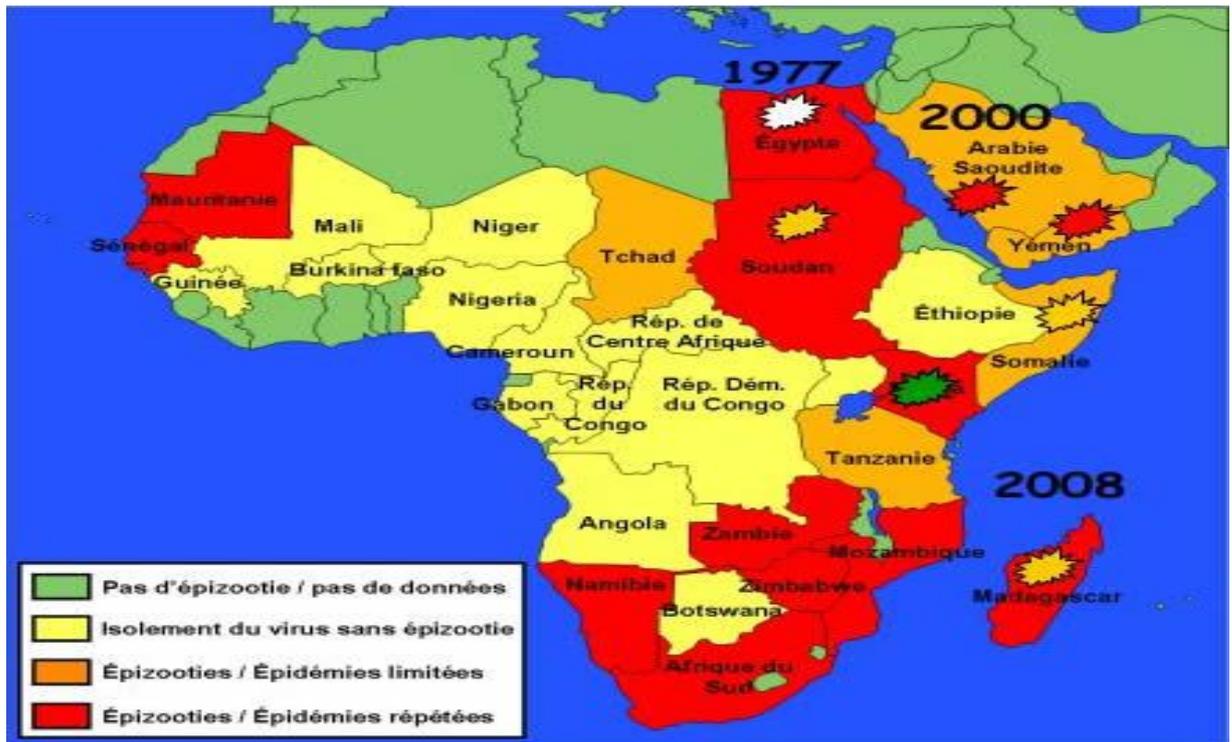


Figure 10: Répartition de la fièvre de la Vallée du Rift en 2003 (OMS).

La fièvre de la vallée du Rift est sans contexte l'exemple le plus illustratif des arboviroses pour lesquelles l'impact économique, aussi important soit-il en médecine vétérinaire, est considéré comme secondaire comparé aux conséquences en santé humaine. L'impact économique de la FVR en a été occulté. En fait, s'il est difficile voire impossible, d'estimer cet impact pendant les silences inter-épizootiques, celui-ci peut se révéler considérable lors d'épizootie (80 à 100 d'avortements chez toutes les espèces domestiques le long du fleuve Sénégal en 1987) (Acha *et al.*, 1989).

Première période: de 1931 à 1977

Dès sa première description en 1931 par Daubney et Coll. au Kenya, sous le nom d'hépatite enzootique, la transmission de la FVR à l'homme a été clairement établie (Daubney *et al.*, 1931).

Pourtant, au cours de la première moitié du siècle, elle est signalée en Afrique australe et de l'Est comme une maladie essentiellement animale pouvant se traduire parfois par de véritables flambées épizootiques comme celle de 1951 en Afrique du Sud, restée célèbre pour avoir entraîné au moins 500 000 avortements et la mort de plus de 100 000 moutons. Même quand elle atteint des hommes, elle est considérée comme une anthroponose secondaire, la maladie humaine restant relativement bénigne, de type pseudo-grippal.

Deuxième période: Les épizooties d'Égypte et de Mauritanie.

• Égypte en 1977

Les études qui ont suivi ont permis de retracer l'évolution de la maladie et de constater, notamment, que le virus circulait depuis au moins six mois chez les animaux. De même, des mortalités et des avortements avaient été signalés dans le sud du pays plusieurs mois auparavant, ce qui laisse à penser que la fièvre de la vallée du Rift est entrée en Égypte en provenance du Soudan, a descendu le long du Nil et a explosé quand elle a rencontré des conditions écologiques favorables (périmètres irrigués le long du canal d'Ismailiya, qui rejoint le Nil au niveau du Caire). Il semble établi, en outre, que sa réapparition en 1993 serait due à une nouvelle introduction et non à son maintien sous forme enzootique. (Meegan *et al.*, 1979).

• Mauritanie en 1987

L'épisode de Mauritanie est lui aussi démonstratif (Jouan *et al.*, 1988). L'épizoo-épidémie qui s'est déclarée en octobre 1987 avait été annoncée par l'Institut Pasteur de Dakar qui avait démontré au cours d'une enquête sérologique sur animaux domestiques qu'un cycle d'amplification existait dans le triangle Kaedi-Selibaby-Aïoun El Atrouss (taux d'anticorps de l'ordre de 16% chez les caprins, de 14% chez les ovins et de 33% chez les dromadaires, contre moins de 10% en temps normal).

Troisième période: depuis 1987 en Mauritanie et au Sénégal.

Depuis cet épisode, la fièvre de la vallée du Rift a fait l'objet de suivis périodiques en Afrique de l'Ouest. Au Sénégal, la diminution des taux d'anticorps chez les petits ruminants laisse à penser que le virus a arrêté de circuler le long du fleuve et dans la région du Ferlo jusque dans les années 1993-1994 (Thiongane *et al.*, 1987). Il en est de même en Mauritanie, où des foyers sont réapparus à la fin des années 90, en 1998 à Aïoun El Atrouss, 1999 : Sud-Tagant.

I.1.2.3.2. La fièvre du Nil occidental

La fièvre à virus West Nile est une arbovirose, causée par un flavivirus de la famille des Flaviviridae, isolée pour la première fois en 1937 en Ouganda et pouvant évoluer vers une encéphalite grave voire mortelle chez l'homme (Hernández-Triana *et al.*, 2014). Le cycle épidémiologique de la maladie repose sur un réservoir principalement aviaire (oiseaux sauvages essentiellement migrateurs) et sur une transmission vectorielle par des moustiques appartenant principalement au genre *Culex* (Hubalek *et al.*, 1999).

D'abord connue en Afrique et observée en Camargue dans les années 60, l'infection par le virus West Nile a véritablement émergée en Europe et surtout sur le continent américain lors de ces dix dernières années (États-Unis depuis 1999, puis Canada en 2000 et Mexique en 2003) (Zeller *et al.*, 2004) (Figure 11). Elle est devenue un véritable enjeu de santé publique aux Etats-Unis où elle est à l'origine d'une épidémie/épizootie de très grande ampleur. Au 1er août 2004, 14 549 cas humains (dont 566 décès) et 21 443 cas chez les chevaux ont été recensés dans ce pays depuis 1999 (CDC Atlanta 2004).

Alors que la circulation virale est réputée enzootique et endémique en Afrique et en Asie (à l'exception d'épidémies décrites en Afrique du Sud en 1974 et en 1983), des épidémies et épizooties sont régulièrement signalées depuis 1994 dans les pays du Maghreb (Ben Hassine *et al.*, 2013). En Europe, le virus West Nile a causé des épidémies en Roumanie (1996, 835 cas dont 17 décès) et en Russie (Volgograd en 1999, 826 cas dont 40 décès) et une épizootie en Italie (1998, 42 chevaux morts) (AFSSA 2004). Le virus a été également à l'origine d'une épidémie / épizootie en Israël en 1999 et en 2000 (471 cas humains, 37 décès) (Weinberger *et al.* , 2001).

Fort-Dodge vient d'annoncer la commercialisation dès le mois de juin 2009, du premier vaccin équin contre l'encéphalite de West-Nile (fièvre du Nil occidental). Ce vaccin, dénommé **Duvaxyn® WNN** ; Il s'agit d'un vaccin inactivé adjuvé. (OIE.2009). Aucun vaccin à usage humain contre le virus West Nile n'est disponible. Les raisons de la variabilité spatio-temporelle des évolutions épizootiques restent difficiles à appréhender. (OIE.2010).

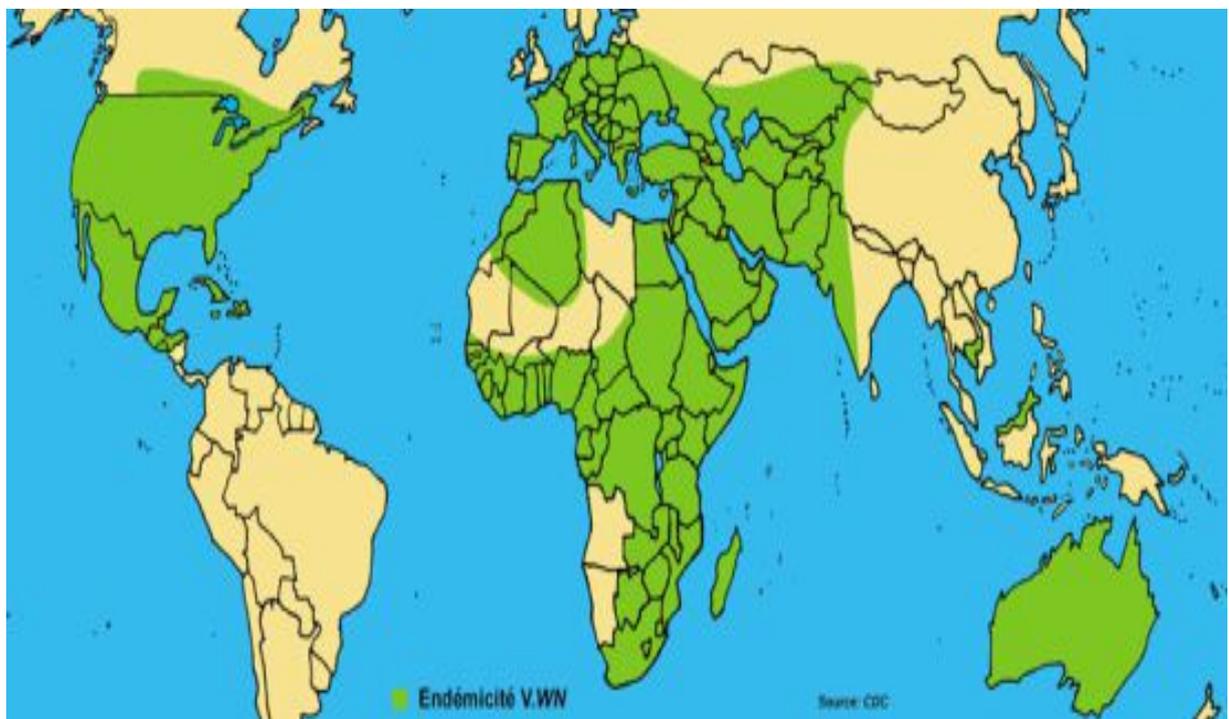


Figure 11: Distribution du virus WN dans le monde (source CDC 2002)

I.1.2.3.3. Les fièvres à phlébotomes

Toscana Virus (TOSV) est un arbovirus qui appartient au genre Phlébovirus, famille des Bunyaviridae. Il a été isolé pour la première fois en 1971 en Toscane, une région du centre de l'Italie, à partir de la mouche du sable *Phlebotomus perniciosus*. Ce virus peut être transmis à l'homme par deux espèces différentes de mouches volantes: *Phlebotomus perniciosus* et *Phlebotomus perfiliewi*, vecteurs de *Leishmania infantum* (Venturi *et al.*, 2003).

L'infection à TOSV était initialement largement décrite dans plusieurs villes en Italie. Actuellement, plusieurs cas ont été rapportés en France, en Espagne et dans le reste des pays méditerranéens (Hemmersbach-Miller *et al.*, 2004), (Echevarria *et al.*, 2003). Ceci témoigne de la dissémination de cette infection dans le pourtour méditerranéen, faisant de cette affection une pathologie émergente dans cette région. Cependant, des cas de méningites et de méningo-encéphalites ont été rapportés dans la littérature (Nicuolo *et al.*, 2005). Les méningites à *Toscana virus* représenteraient environ 52% des méningites aseptiques en Italie (Charrel *et al.*, 2005). Une étude prospective récente a démontré l'implication de *Toscana virus* dans 1,5% des encéphalites en France (Mailles *et al.*, 2009).

En Tunisie, un seul travail récent avait étudié la prévalence de TOSV dans les infections neuro-méningées (Nicuolo *et al.*, 2005). Ce travail estime à 10% les cas de méningites et de méningo-encéphalites virales dues à TOSV (31/315 prélèvements).

(SFSV) a été isolé par (Sabin, 1943), Child Hospital Res. Fdn, Cincinnati (USA), à partir d'un pool de deux sérums prélevés sur humain. (Acav *et al.*, 1996). Lieu de collecte à partir de Palerme, Sicile (Italie), Chez l'homme qui est considéré comme hôte de la maladie, se caractérise par: Fièvre, céphalées, myalgie, arthralgie, douleurs retro orbitales, conjonctivite, anorexie, malaise général (Bartelloni *et al.*, 1976). Les vecteurs sont des phlébotomes: *Phlebotomus sp*, *Phlebotomus papatasi* et sa répartition géographique atteint l'Egypte, Italie, Inde, Iran et Pakistan.

I.2. Les leishmanioses

I.2.1. Cycle évolutif des leishmanies

Les leishmanies sont ingérées au moment du repas sanguin sous la forme amastigote. Ces leishmanioses sont des parasites intracellulaires du système réticulohistiocytaire du sang des vertèbres. La rupture des cellules hôtes intervient au cours de l'ingestion et les amastigotes sont libérés. Très rapidement il se forme autour du repas sanguin une enveloppe chitineuse : la membrane périthrophique à l'intérieur de laquelle, au bout de 24 à 48 heures, les amastigotes se multiplient une ou deux fois puis se transforment en promastigote qui à leur tour se multiplient au bout de 3 à 4 jours, la membrane perithrophique se déchire et laisse échapper les promastigotes qui, selon les espèces gagnent :

- Soit l'intestin postérieur (hypopylaria ; exemple : certains parasites de reptiles dont l'appartenance au genre *Leishmania* est controversée).
- Soit la région péri et supra pylarique (peripylaria; ex *Leishmania braziliensis*, rangée actuellement dans le sous genre *Viannia*).
- Soit l'intestin antérieur (supra pylaria pour toutes les autres espèces de leishmanies).

Au niveau de ces divers sites, la multiplication est active et des modifications morphologiques et biologiques interviennent, il y a alors différenciation des promastigotes métacycliques, infestant pour le vertébré. Ces formes promastigotes migrent vers la partie antérieure du tube digestif où elles sont prêtes à être inoculées lors d'un nouveau repas sanguin. Il existe une spécification zoologique relativement étroite encore que non absolue, au niveau du couple leishmanie- phlébotome. Chaque espèce de leishmanie possède un spectre d'hôte relativement étroit de niveau générique, voir sub- générique (Léger et Depaquit, 2001).

I.2.2. La leishmaniose viscérale (Kala-azar) :

Elle est due aux espèces du complexe *Leishmania donovani* divisées en sous espèces *L. infatum* et *L. d. chagasi*. L'incubation chez l'homme dure généralement 2 à 6 mois. La maladie se manifeste par une faible fièvre, des malaises, puis par une anémie suivie d'un gonflement de l'abdomen et de la rate. L'examen clinique des malades montre une splénomégalie, hépatomégalie, lymphadénopathie et des lésions intestinales. La mort peut survenir en 2 ou 3 ans. Les symptômes peuvent être différents chez l'enfant. Les hôtes réservoirs sont surtout les chiens, mais aussi les renards et les chacals. La maladie chez le chien se manifeste par des lésions cutanées, dépilées et ulcérées. Les animaux présentent alors une anorexie, une fièvre irrégulière, une apathie, une polypnée, une pâleur des muqueuses et un amaigrissement. Parfois, les animaux infestés ne montrent aucun symptôme apparent (Cassier et al, 1998).

I.2.3. Les leishmanioses cutanées

Le premier symptôme est une papule rouge à l'endroit de la piqûre. Puis il se développe un ulcère qui s'élargit et donne différentes formes de lésions selon l'espèce ou la sous espèce de *Leishmania*. On distingue les leishmanioses cutanées du nouveau monde et celles de l'ancien monde.

La leishmaniose du nouveau monde ou la leishmaniose mucocutanée ou « espundia », est répandue en Amérique tropicale et du Mexique à l'Argentine. Elle est due au complexe d'espèces *L. braziliensis* et à ses sous-espèces. Elle provoque des lésions de la bouche, du nez, de la gorge et de la face, suivies de nécrose et de cicatrices. L'incubation dure de quelques jours à quelques mois. L'insecte vecteur est un phlébotome du genre *Psychodopygus* ou *Nyssomyia*. Les hôtes réservoirs sont les chiens et autres animaux domestiques, comme les ânes, et des animaux sauvages.

La leishmaniose cutanée ou « ulcère de chiclero », est rencontrée en Amérique centrale et aux Antilles. Elle est due au complexe d'espèces *L. mexicana* et à ses sous-espèces.

Elle se manifeste par des ulcères naso-pharyngiens mutilants, en particulier chez les agriculteurs exposés aux piqûres de phlébotomes du genre *Nyssomyia*. Les hôtes réservoirs sont des rongeurs, des édentés (paresseux) et l'opossum.

Les leishmanioses de l'ancien monde dus à *L. tropica*, *L. major* et *L. aethiopica* causent trois formes de leishmanioses cutanées. *L. major* est responsable de la forme rurale qui sévit autour du bassin méditerranéen et au Moyen-Orient. Les hôtes réservoirs principaux sont les gerbilles, chez qui les lésions cutanées des oreilles, de la nuque et de la queue ont été observées. *L. tropica* provoque une forme sèche de leishmaniose qui sévit dans les zones urbaines et suburbaines du Moyen- Orient. Le parasite a été isolé des chiens et des rats, mais l'homme serait le principal réservoir de parasites (Cassier et al, 1998).

I.3. Les Moustiques

I.3.1. Rappels bibliographiques

En raison de leur rôle dans la transmission de nombreux agents pathogènes, hématozoaires, filaires et virus, les moustiques ont une importance primordiale en sante publique (Coosemans *et al.*, 1998). A ce titre, ils ont motive et motivent encore des recherches faunistiques qui ont permis de décrire plus de 3 450 espèces, réparties entre 38 genres, appartenant a l'ordre des Diptères (Rodhain *et al.*, 1985).

A l'exception de l'Antarctique, toutes les autres parties du monde hébergent des moustiques, aussi bien dans le cercle arctique qu'a des altitudes de 5500 m (Kettle. 1995). Ils vivent aussi bien dans les milieux naturels que dans les milieux urbains. Dix espèces des genres *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* et *Mansonia*, sont particulièrement agressives vis-à-vis de l'homme. Trois de ces espèces prédominent: *Aedes caspius*, *Aedes detritus* et *Culex pipiens* (Coutin. 1988).

Seules les femelles piquent, leurs pièces buccales vulnérantes sont composées de six stylets mobiles dans une gaine. Un repas de sang est nécessaire à ces femelles pour la maturation de leurs œufs. Les mâles inoffensifs, se reconnaissent immédiatement à leurs antennes plumeuses (Coutin. 1988).

I.3.2. Morphologie et biologie des principaux moustiques pathogènes

L'identification s'effectue au microscope optique ou à la loupe binoculaire, certains caractères macroscopiques permettent de différencier rapidement certains genres.

Les moustiques sont des insectes à métamorphose complète. Cela signifie que, durant leur vie, ils passent successivement par des étapes bien différenciées: œuf, larve, nymphe puis adulte (imago). Les trois premières étapes évoluent en milieu aquatique. L'éclosion des œufs libéré dans ce gite des larves qui, après quatre mues, se transforment en nymphes.

Les formes adultes (imagos) émergent à l'air libre en fendant l'enveloppe nymphale (exuvie) qui leur sert de flotteur pour déplier leurs ailes avant de s'envoler. La durée de ce cycle biologique varie considérablement en fonction de la température atmosphérique et de la nourriture des larves et des femelles (Figure 12).

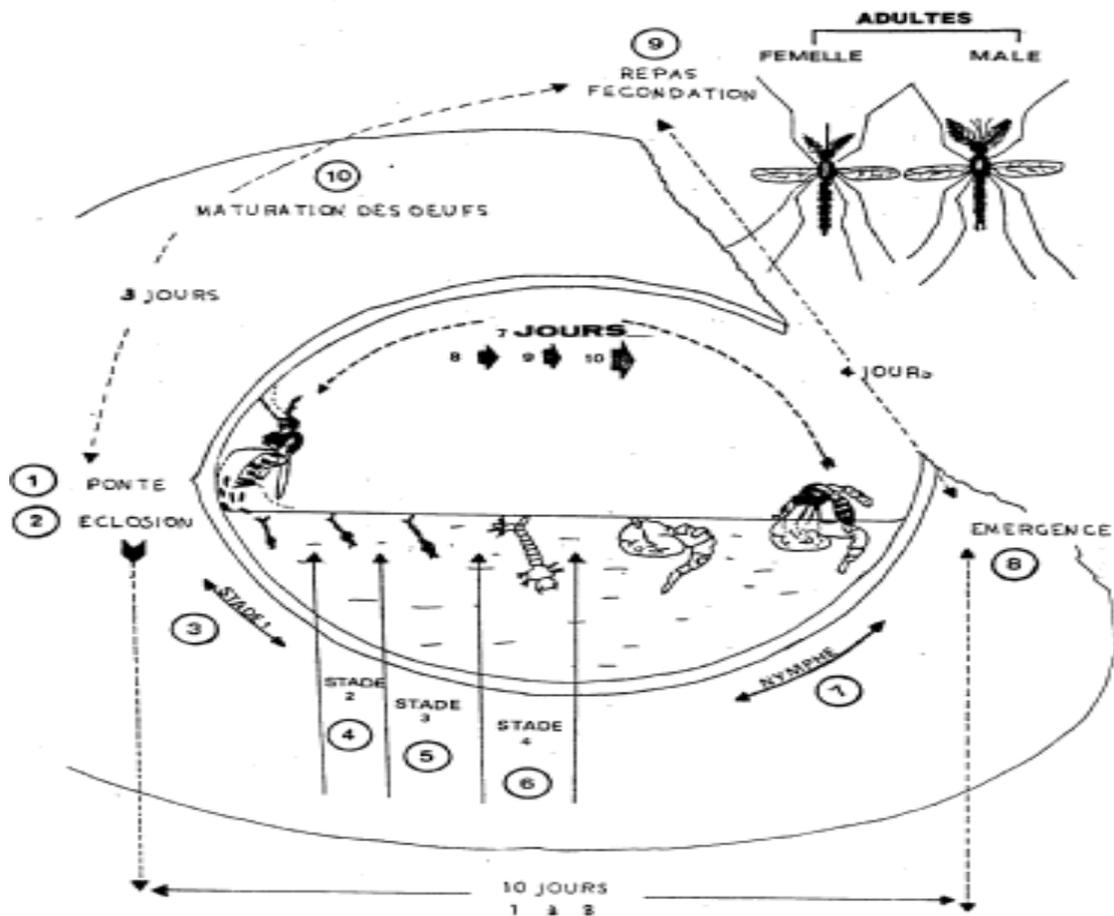


Figure 12: Illustration schématique du cycle de vie des moustiques (Guillomot. 2005)

Les œufs

Les œufs sont très différents suivant les genres et même les espèces. Ils mesurent environ 1 mm de long. Blanchâtre au moment de la ponte, ils s'assombrissent dans les heures qui suivent.

- Ils sont pondus isolément à la surface de l'eau et munis de flotteurs chez les Anophèles, ce qui les rend insubmersibles

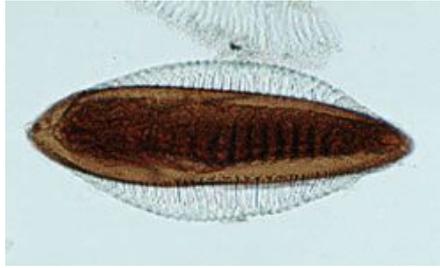


Figure 13 : Œufs d'*Anophèles*. (Hurd , Photo IPNC 2005)

- Ils sont groupés en nacelles flottantes de 50 à 200 œufs chez les *Culex*. Ils éclosent généralement au bout de 2 à 5 jours.



Figure 14: Œufs de *Culex* (Starosta,Photo IPNC 2005)

- Les *Aedes* pondent leurs œufs isolément sur des supports à proximité immédiate de la surface de l'eau, ou à même le sol sec.

Ces œufs pourront attendre la montée de l'eau provoquant l'immersion de ceux-ci et l'éclosion de la larve;



Figure 15 : Œufs d'*Aedes aegypti*. (Photo IPNC 2005)

Larves et nymphe

Larves, nymphes et imagos ont une respiration aérienne. L'air s'introduit dans la larve par un siphon tubulaire (réduit chez les Anophelines à une simple plaque respiratoire). La nymphe respire par une paire de trompettes. Chez les imagos, les trachées qui conduisent l'air aux organes débouchent de chaque côté du thorax par deux, spiracles (stigmates).

- Les larves d'*Anophèles* respirent directement l'air extérieur par des stigmates dorsaux, ce qui leur impose une position de repos parallèle à la surface de l'eau.



Figure 16: Larve d'*Anopheles* (Doggett)

- Les larves d'*Aedes* et de *Culex* respirent par un siphon situé à l'extrémité de l'abdomen et sont donc obliques par rapport à la surface de l'eau.



Figure 17: Larve d'*Aedes aegypti*



Figure 18: Larve de *Culex quinquefasciatus*

(Houdant, 2004)

Les nymphes qui ont la forme d'une virgule, restent généralement à la surface de l'eau mais plongent lorsqu'elles sont dérangées, en déployant et repliant l'abdomen terminé par deux palettes natatoires.

Elles ne peuvent pas se nourrir et elles respirent à l'aide de deux trompettes situées sur le céphalo thorax et non au bout de l'abdomen comme chez la larve; après ce stade on aura la naissance d'un moustique.



Figure 19: Nympe d'*Anophèles*

(Dogget, 2002)



Figure 20: Naissance d'un moustique

(Pigat, 2003)

- **Les males** apparaissent généralement avant les femelles; leur appareil génital externe subit une rotation de 180 degrés avant l'accouplement qui n'a généralement lieu qu'une seule fois. Leur vie est courte.

- **Les femelles**, rapidement après l'émergence, s'accouplent et conservent les spermatozoïdes dans des sortes de sacs, les spermatheques. Les œufs sont fécondés au fur et à mesure de leur sortie des ovaires. La Longévité des femelles peut aller d'une semaine à plusieurs mois. Certaines femelles peuvent hiberner. Selon les espèces, le mode de vie est très variable, les plus dangereuses se nourrissent sur l'homme et se développent près des habitations. (Hervy *et al.*, 1977). Le nombre moyen d'œufs produits par femelle et par cycle d'oviposition est d'environ 100 (Christophers. 1960).

I.3.3. Classification des moustiques a intérêt médical

Les principaux moustiques considérés comme pathogène pour la santé humaine et animale feront l'objet de ce titre (Figure21).

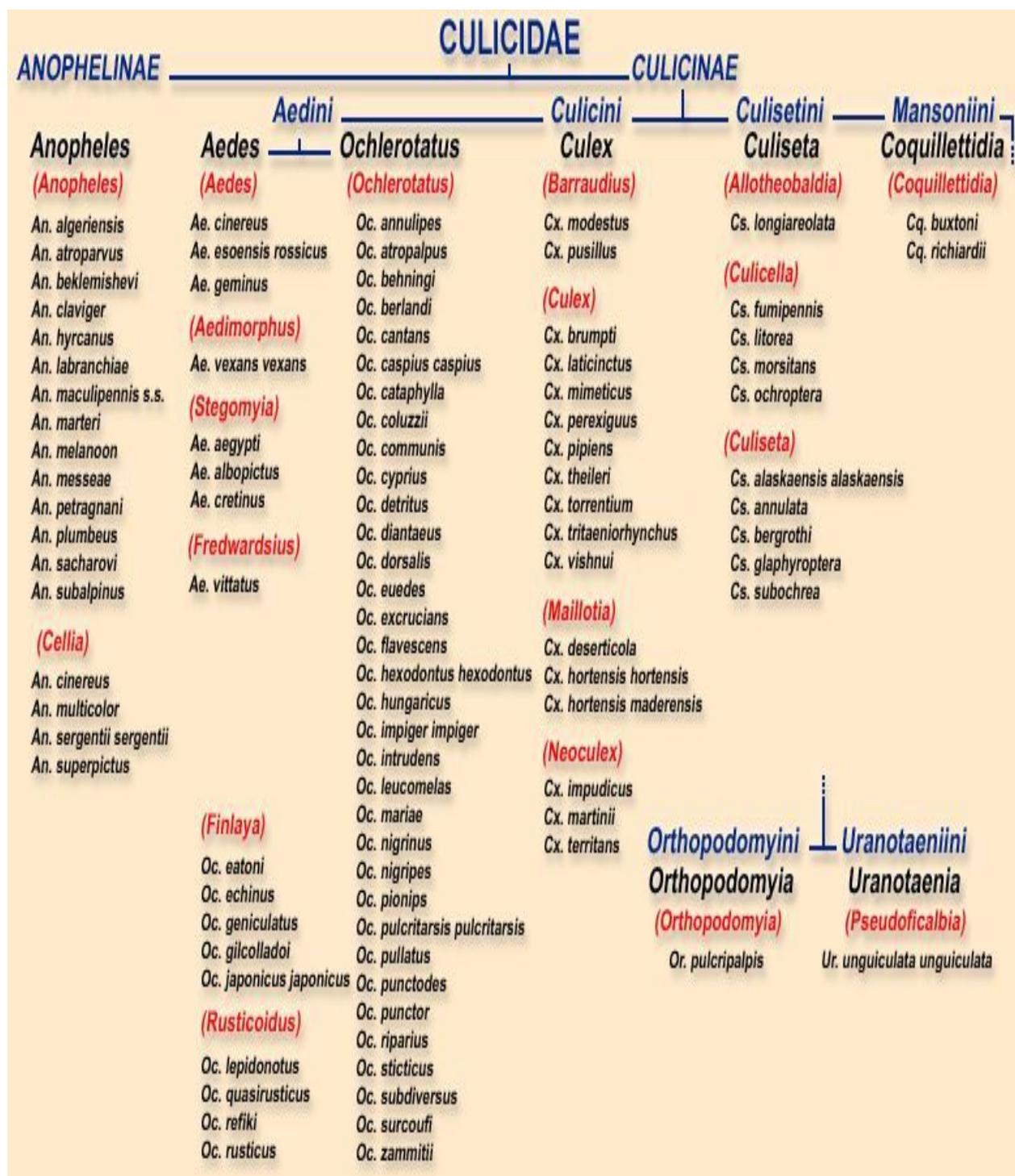


Figure 21: Classification de moustique d'intérêt médical (Rattanaxy. 2003).

I.4. Les phlébotomes

I.4.1. Rappels bibliographiques

Les phlébotomes sont des insectes de petite taille de couleur pâle à allure de moustiques. Leur corps est couvert d'une pilosité épaisse et les antennes sont formées de 12 à 30 articles, verticillés et munies d'organes sensoriels spéciaux. Le thorax convexe, suture mésonatale nulle. Les ailes sont lancéolées, couvertes de longs poils ; la frange du bord postérieur est parfois très longue, la nervure médiane présente 4 branches, cellule discoïdale ouverte. Au repos, les ailes sont ordinairement disposées en toit sur l'abdomen, parfois élevées, faisant un angle avec le corps (Abonnenc, 1972). Les phlébotomes ont une activité nocturne, ils commencent à s'agiter au crépuscule à condition que la température soit suffisante (19- 20C°) et qu'il n'y ait pas de vent. Certaines espèces sont attirées par la lumière, le plus souvent de faible intensité, d'autres espèces sont endophiles et pénètrent volontiers dans les maisons, les étables, etc. D'autres sont exophiles (Leger et depaquit ,2001) ; très sensibles aux courants d'air, ils ne se déplacent que par des temps absolument calmes. Leur vol est silencieux et s'effectue par bonds rapides sur des parois verticales de bas en haut lorsqu'ils sont dérangés. Seule les femelles sont hématophages. Elles piquent et sucent le sang des animaux et de l'homme, mais elles peuvent se nourrir également de sucres végétaux et de jus sucrés, ce que font les mâles exclusivement. On peut rencontrer les phlébotomes dans divers régions du globe mais quelle que soit la latitude ou l'altitude, le développement de leur larves terricoles, exige une température relativement constante, voisine de 28 C°, une obscurité quasi complète, un milieu nutritif formé de déchets organiques animaux ou végétaux, un calme absolu et un degré d'humidité voisin de la saturation (Abonnenc, 1972).

- **Le Genre *Phlebotomus* :**

Les soies des tergites abdominaux toutes dressées, l'armature cibariale est absente ou rudimentaire, la spermathèque complètement ou incomplètement segmentées et le style des génitalia comporte 4 à 5 épines (Rondani, 1843 in Abonnenc, 1972).

- **Le genre *Sergentomyia* :**

Les soies abdominales sont couchées dans la plupart des espèces ; quelques unes sont dressées dans un sous-genre ; l'armature cibariale est bien développée ; les spermathèques sont tubulaires, capsuliformes ou segmentées. Les génitalia des mâles ont un style avec 4 longues épines et 1 petite soie sur le côté interne (França et Parrot, 1921 in Abonnenc, 1972).

- **Les phlébotomes d'Algérie :**

La présence des Phlébotomes a été rapportée pour la première fois en Algérie en 1912 par Foley et Leduc et signalés plus tard par Parrot et Sergent dont les travaux ont été menés de 1917 à 1960 (Dedet et al, 1984). 24 espèces sont connues en Algérie, 14 du genre *Phlebotomus* et 10 du genre *Sergentomyia* (Belazzoug, 1991 ; Berdjane Brouk *et al.*, 2012), chaque espèce a sa propre distribution écologique, exceptée dans les montagnes du Sahara central où les deux espèces *Phlebotomus perniciosus* et *Phlebotomus papatasi* qui sont méditerranéennes mais qui appartiennent aussi au secteur zoogéographique éthiopien se produisent ensemble. *Phlebotomus perniciosus* et *Phlebotomus papatasi* sont les vecteurs prouvés de *Leishmania infantum* (leishmaniose viscéral) et de *Leishmania major* respectivement (Belazzoug, 1991).

I.4.2. Morphologie et biologie des phlébotomes

Les stades jeunes pré imaginaux des phlébotomes sont terricoles alors que les adultes sont aériens ; la morphologie des différents stades est en rapport direct avec ces modes de vie.

Stades pré imaginaux :

Les phlébotomes sont des insectes holométaboles, leur développement comporte une métamorphose complète se distinguant par trois phases pré imaginale : oeuf, larve, nymphe et une phase imaginaire

Œuf :

L'œuf des phlébotomes à la forme d'une ellipse allongée incurvée de 300 à 400 μ de longueur et de 9 à 13 μ de largeur, la face dorsale est sensiblement convexe et la face ventrale concave ; ses dimensions varient suivant les espèces (Abonnenc, 1972). Les œufs fraîchement pondus de couleur blanchâtre prennent cinq à six jours après la ponte, une teinte brunâtre. La surface est ornée d'un réseau de granulations déterminant des cellules polygonales (Abonnenc, 1972).

Stades larvaires :

Les phlébotomes passent par quatre stades larvaires séparés par des mues.

1er stade :

À ce stade, la larve vermiforme et eucéphale atteint une longueur allant de 0.46 à 1 mm. A la suite de la capsule céphalique, on observe trois segments thoraciques et neuf segments abdominaux. Les pièces buccales sont broyeuses (Abonnenc, 1972).

Le 1er stade larvaire se distingue par la présence d'une éclosion céphalique, le 3^{ème} segment de l'antenne est discoïde. Il y a absence de la soie 1 sur le prothorax antérieur, de la soie 6 du prothorax antérieur, du mésothorax et métathorax.

La soie 5 des abdominaux I-VIII sont lisses ou faiblement spéculées. Présence d'une seule paire de soie caudales et les derniers segments de l'abdomen ne sont pas chitinisés. Une seule paire de stigmates situés à la partie postérieure de l'abdomen.

2ème stade :

Le troisième segment de l'antenne est plus long que large ; présence de soie 1 au prothorax antérieur ; soie 6 du prothorax antérieur, du métathorax et métathorax. Les soies 5 des segments abdominaux sont épineuses. Présence de 4 soies caudales; tégument spéculé ; segment caudal chitinisé sur la face dorsale. Présence d'une deuxième paire de stigmate respiratoire situé à la partie antérieure du corps (Abonnec, 1972).

3ème stade :

La larve à ce stade ne se différencie du précédent que par chitination dorsale plus accusée sur le 8ème segment abdominal (Abonnec, 1972).

4ème stade :

A ce stade la larve des phlébotomes est entièrement développée. Elle présente outre les caractères du 3ème stade, une chitination plus intense des segments abdominaux VIII et IX . Les spécules du segment caudal sont très saillants, très forts et très pigmentés, presque noirs. Ils forment un peigne bien développé. C'est une larve du type euriciforme ; son corps est cylindrique et comprend la tête, 3 segments thoracique et 9 segments abdominaux (Abonnec, 1972).

Stade Nymphal:

Avant d'entamer le processus de la nymphose, la larve du 4ème stade demeure immobile avec la partie antérieure du corps relevée. La nymphe des phlébotomes comprend un céphalothorax et un abdomen.

Les 4 premiers segments (tête et trois segments thoraciques) sont plus ou moins soudés entre eux et constituent le céphalothorax. Les autres, bien différenciés forme l'abdomen avec 9 segments. Les deux derniers segments sont habituellement cachés dans la dépouille de la larve qui sert de support à la nymphe. Ainsi fixé au substrat, la nymphe peut se tenir verticalement. Elle mesure 3 mm de long et une fissure apparaît sur le côté dorsal (Nématocère orthoraphe) de la cuticule par laquelle sortira lentement l'imago (Abonnec, 1972).

Stades imaginaux :

D'après Abonnec (1972), les phlébotomes ailés ont un corps de 1.5 à 3.5 mm de couleur pâle, jaune, gris ou brun. Leurs corps est couvert de poil gris clair et comprend trois parties portant ou non des appendices ; la tête, le thorax, et l'abdomen.

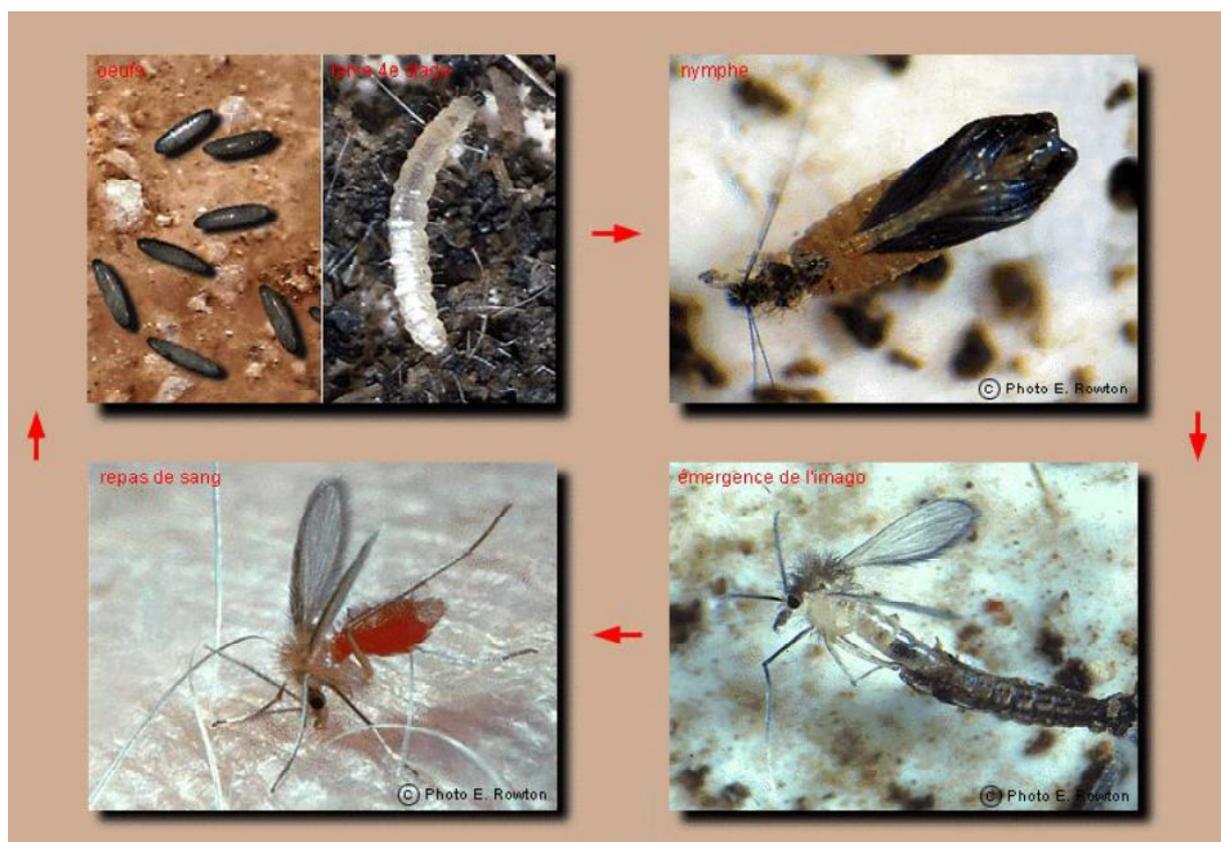


Figure 22 : Cycle de développement des phlébotomes (Niang et al, 2000)

Chapitre II

Inventaire des moustiques (Diptera: Culicidae) en Algérie

II. Inventaire des moustiques (Diptera: Culicidae) en Algérie

II.1. Sites et périodes d'étude

Les échantillons de moustiques larves et adultes ont été prélevés dans 15 Wilayas, réparties de l'extrême Est à l'extrême Ouest, du Sud au Nord de l'Algérie (Figure 23), en rassemblant les différents étages bioclimatiques, c'est un travail réalisé sur 4 ans de Septembre 2010 à Juin durant les 4 saisons de l'année.

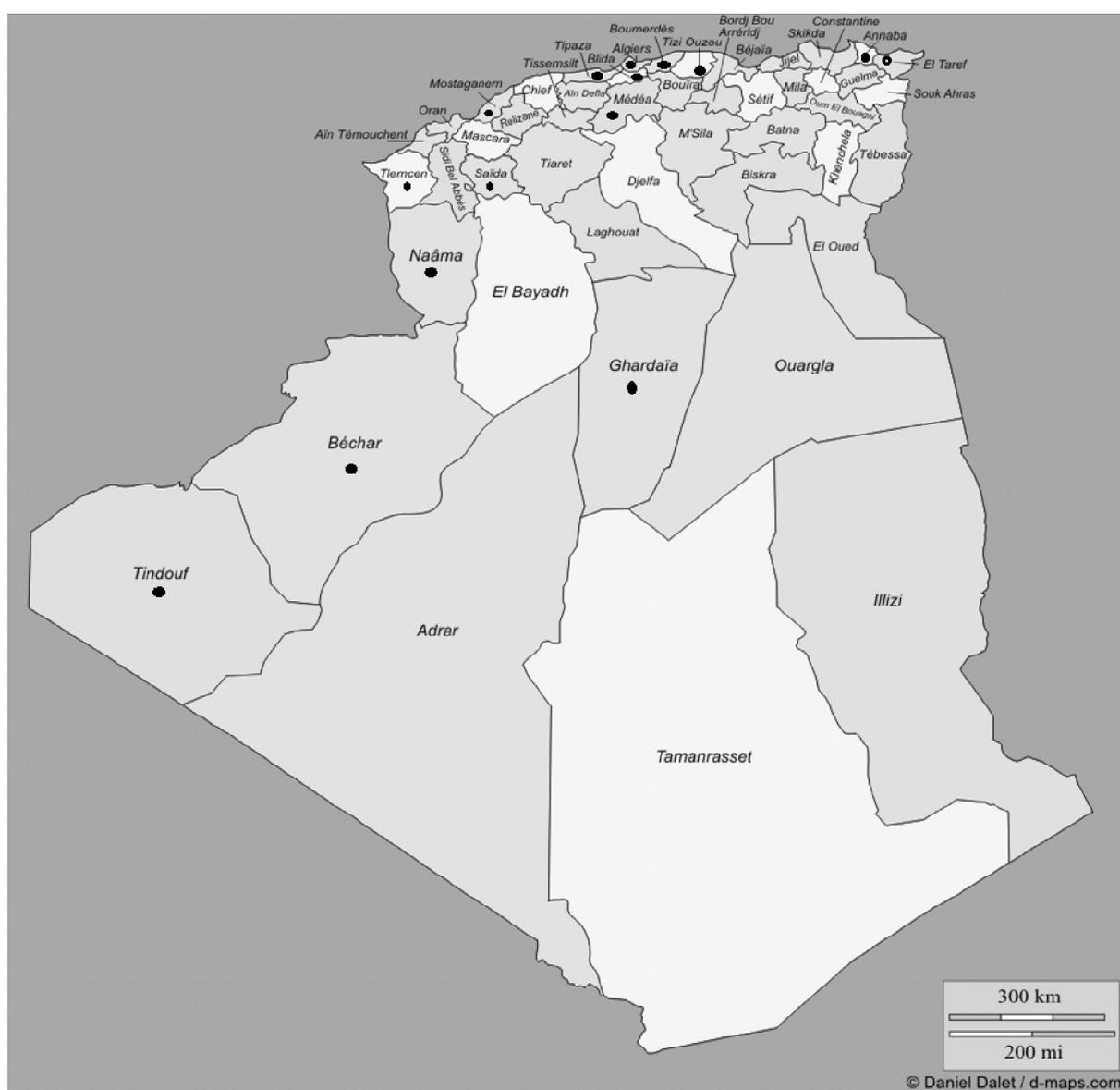


Figure 23: Lieux de capture et de collecte des moustiques en Algérie.

II.2. Matériels et méthodes

II.2.1. Méthode d'échantillonnage

Les larves de moustiques aquatiques ont été collectées à l'aide de la technique de "Dipping". Cette méthode consiste à plonger une louche en plusieurs endroits du gîte larvaire (Figure 24). La capture des adultes a été réalisée à l'aide des pièges lumineux CDC (John W. Hock Société, Gainesville, FL, USA) déposés à l'intérieur des abris d'animaux (vaches, chèvres, moutons, poules, équidés et lapins) (Figure 25) et à l'intérieur des habitations humaines. Ce dispositif fonctionne pendant plus de 12 heures (18:00-à-08h00) afin d'attirer le maximum d'insectes. Les moustiques ont été collectés et capturés entre Juin jusqu'à Octobre durant les 4 années de travail suite à l'activité estivale de ces insectes.



Figure 24 : Méthode Dipping (personnelle) Figure 25 : Piège lumineux CDC (personnelle)

II.2.2. Méthode de montage et d'identification

La systématique des Culicidae collectées et capturées a été étudiée principalement à l'aide d'un logiciel d'identification: de (Bruhnes *et al.*, 1999) pour les moustiques de l'Afrique méditerranéenne, et une clé dichotomique de (Himmi *et al.*, 1995) pour les moustiques existant au Maroc. D'après (Krida *et al.*, 1998) seules les larves du 4^{ème} stade sont récupérées et prises en considération pour des montages entre lame et lamelle. Dans le cadre de la présente étude, nous nous sommes inspirés du protocole proposé par (Matile. 1993) pour la préparation et le montage des échantillons :

Les larves sont portées à ébullition sur platine chauffante dans une solution de KOH à 10 %, elles y demeurent jusqu'à un niveau d'éclaircissement suffisant. Après, elles subissent 2 bains de 3 mn dans l'eau distillée afin de les débarrasser des traces de potasse. Elles sont mises successivement dans l'alcool absolu pendant 3 mn puis dans le toluène pour quelques secondes. Les indications du nom de l'espèce, de la date et du lieu de la récolte doivent être mentionnées sur lame après identification lors de l'examen à l'aide de microscope photonique (Figure 26).

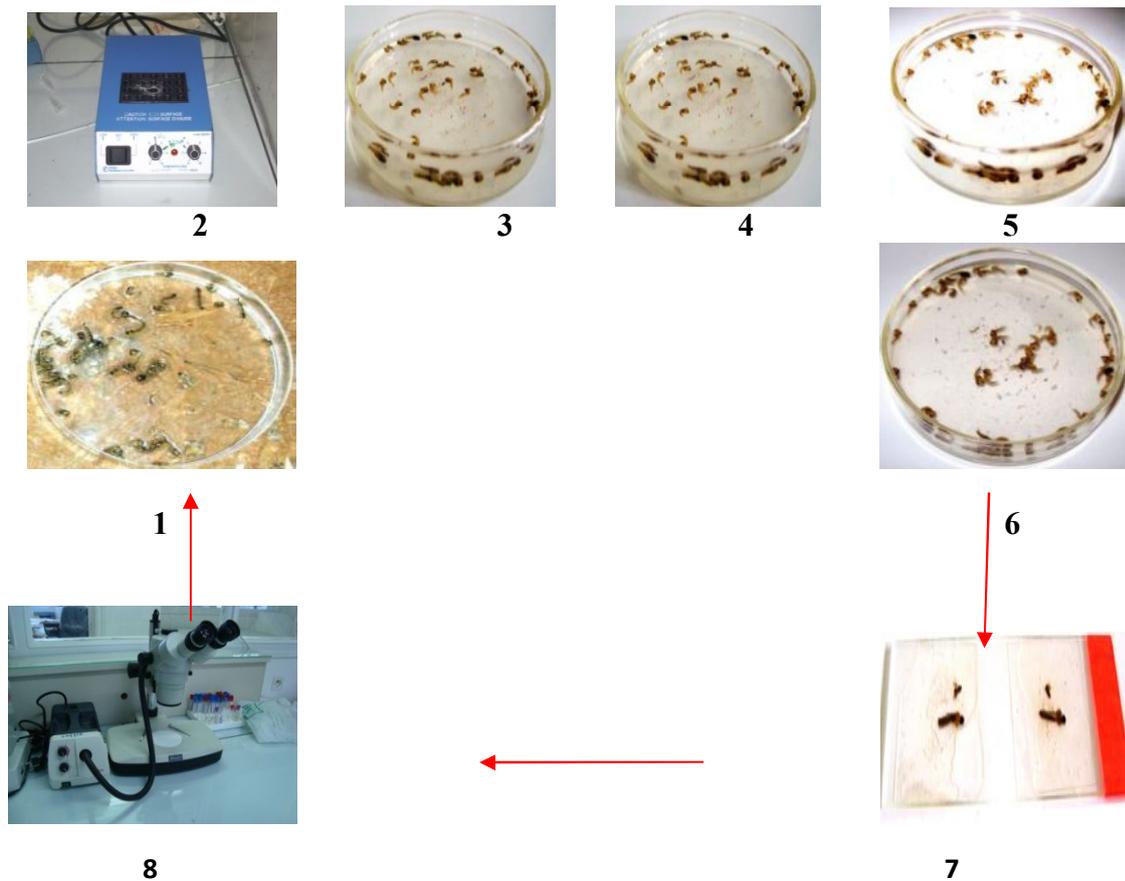


Figure 26 : Technique de préparation des larves de Culicidae (personnelle).

Légende :

1 : Larves de Culicidae / 2 : Trempage des larves dans solution de KOH à 10% pendant 4 mn sans atteindre ébullition. / 3, 4 : Rinçage à l'eau / 5 : Transvaser les larves dans l'éthanol à 100° pendant 3mn / 6 : Les mettre dans le toluène pour quelques secondes / 7 : Montage de la larve sur une lame dans une goutte de liquide de Faure / 8 : Observation sous microscope photonique

D'après (Séguy. 1923) la préparation des adultes de moustiques destinés à l'étude systématique se fait à sec, compte tenu du fait que leur identification est basée principalement sur les caractères morphologiques externes. C'est pour cela que nous avons utilisé la méthode de la double épingle (Matile. 1993). L'insecte est posé sur le dos et il est maintenu dans cette position en le maintenant avec une pince fine par une patte ou par une aile. Une minutie portée par une paillette en carton est enfoncée lentement entre les pattes médianes jusqu'à ce que la pointe ressorte de deux millimètres par la face dorsale. La paillette est retournée pour la poser sur le bord de la plaque de polystyrène. L'épingle entomologique est piquée et enfoncée sur la paillette jusqu'à la hauteur désirée, la distance entre la tête de l'épingle et le carton étant de 10 à 15 mm. Les pattes sont allongées avec soin et les ailes redressées pour dégager l'extrémité de l'abdomen. Tous ces organes offrent des caractères utiles pour l'identification (Langeron. 1942; Séguy. 1951) (Figure 27).

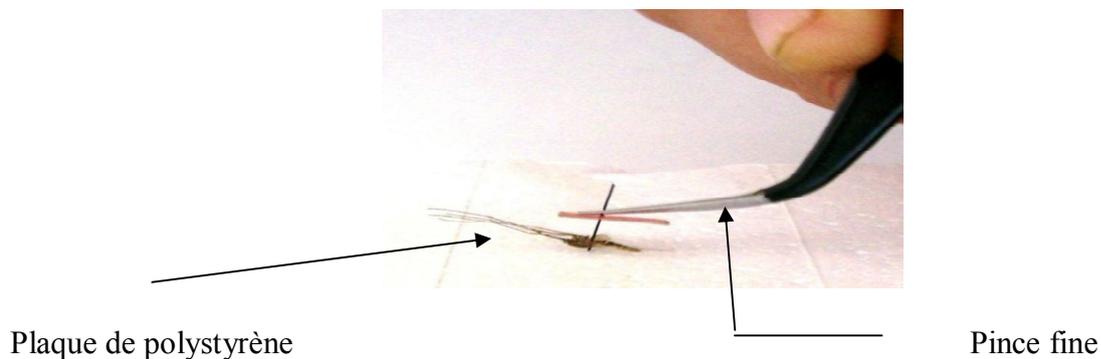


Figure 27 : Préparation des adultes de Nématocères par la méthode de double épingle

Technique de la minutie (Boukraa. 2009)

II.2.3. Méthode d'élevage des moustiques (Changements trophique)

La mise en élevage des stades immatures (larvaires) dans une cage appropriée dans des conditions de laboratoire, la nourriture des males grâce au coton imbibé avec de l'eau sucrée et les femelles étaient servis d'un Rat de laboratoire (espèce Wistar) tranquilisé par de l'Acépromazine. Cette approche a pour but d'évaluer les changements trophiques et de comportements dans des conditions de laboratoire. La température de la salle d'élevage est maintenue à 26 °C, l'humidité relative oscille entre 85 et 90 % et la photopériode est de 12 h.

II.3. Résultats

Au total, 1394 moustiques adultes et 3196 larves ont été inventoriés dans 15 Wilayas en Algérie (tableau 1). Ces espèces appartiennent à deux sous-familles: Culicinae et Anophelinae. Leur identification a révélé la présence de sept genres: *Uranotaenia*, *Aedimorphus*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Culex*, *Culiseta* and *Anopheles*, with 17 species: *Aedes albopictus* Skuse, 1894, *Aedimorphus vexans* Meigen, 1830, *Anopheles labranchiae* Falleroni, 1926, *An. multicolor* Cambouliu, 1902, *Culex deserticola* Kirkpalrick, 1924, *Cx. hortensis* Ficalbi, 1889, *Cx. pipiens* Linnaeus, 1758, *Cx. territans* Walker, 1856, *Cx. theileri* Theobald, 1903, *Culiseta litorea* (Shute, 1928), *Cs. longiareolata* Macquart, 1838, *Ochlerotatus coluzzii* Rioux, Guilvard & Pasteur, 1998, *O. detritus* Haliday, 1833, *O. dorsalis* Meigen, 1830, *O. flavescens* Muller, 1764, *O. geniculatus* Olivier, 1791 and *Uranotaenia unguiculata* Edwards, 1913. *Culex pipiens* et *Culiseta longiareolata* étaient les plus dominantes espèces. Dans les sites urbains, la richesse totale était élevée et représentée avec 8 espèces. Les sites ruraux marquent aussi une richesse totale importante avec 6 espèces inventoriées. En revanche, seulement trois espèces ont été observées dans les sites de marais salants. Le moustique ornithophile (*Culiseta litorea*) a été identifié lors de l'invasion de moustiques de l'Est d'Alger, par ailleurs, la mise en élevage de cette espèce, avait pour but d'évaluer les changements trophiques et comportementaux de *Culiseta litorea* a fait l'objet des données suivantes :

- **18 Septembre 2012:** Mise en élevage des stades immatures collectés sur terrains (Larves et Nymphes), après 03 jours, les adultes commencent à émerger.
- **21 Septembre 2012:** Nourriture des adultes à base de coton imbibé d'eau sucré afin de les faire survivre.
- **02 Octobre 2012:** Un délai de 11 jours sans repas sanguin a été laissé pour les femelles pares avant de les nourrir à partir d'un Rat de laboratoire (espèce Wistar) tranquilisé par de l'Acépromazine.

La dose est de 0,1 ml par voie intramusculaire. Après 30 min, la totalité des moustiques femelles étaient gorgées (80 femelles), des bacs d'eau remplis de l'eau de gîte naturels étaient déposés à l'intérieur de la cage de l'élevage pour la ponte des œufs. L'agressivité des femelles était marquée aussi par l'état des pattes de l'animal rougeâtre avec un état de congestion très poussée suite aux piqûres avec agression.

- **05 Octobre 2012:** apparition des barquettes d'œufs (64 barquettes) flottantes dans les bacs d'eau après la ponte, un délai de 03 jours a été noté entre le repas sanguin et la ponte. Il est à remarqué que le moustique habituellement réalise sa ponte à une durée de plus de 06 jours, voir plus dans les conditions optimum.
- **07 Octobre 2012 :** Apparition de milliers de Larves du premier stade de développement; un délai de 48 Heures a été noté entre la ponte et l'éclosion des œufs. Il est à noté aussi que c'est une durée inhabituelle d'éclosion des œufs que normalement estimée à 5 jours.

Il est à conclure que les durées minimales enregistrées lors de notre expérimentation concernant la ponte et l'éclosion des œufs, de même l'agressivité enregistrée lors du moment de prise du repas sanguin ont favorisés cette invasion remarquable au niveau de la zone industrielle de Rouiba.

Comme records, on note la première mise en évidence d'un moustique (larve de *Culex territans*) à 1750 m d'altitude dans les hauteurs de Tizi-Ouzou, ainsi que la deuxième capture d'*Aedes albopictus* en Algérie et a l'échelle Maghrébine, capturé a Illoula Oumalou (2 femelles vivantes durant le même jour et le même piège CDC déposé) à 1400 m d'altitude qui s'éloigne de 48 Km par rapport au lieu de sa première capture à Larabaa Nath Irathen (Izri *et al.*, 2011).

Tableau 1 : Liste des Culicidae capturés dans 15 Wilayas de l'Algérie.

Especes	Nombre de specimens		Sites (Nord / Sud / Ouest / Est)
	Larve	Adulte	
<i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> Skuse, 1894	-	2	Tizi-Ouzou (N)
<i>Aedimorphus vexans</i> Meigen, 1830	13	-	Ghardaïa (S)
<i>Anopheles (Anopheles) labranchiae</i> Falleroni, 1926	35	174	Blida, Tizi-Ouzou (N)
<i>Anopheles (Cellia) multicolor</i> Cambouliu, 1902	137	102	Tamanrasset, Ghardaïa, Tindouf (S) - Naama, Tlemcen (O)
<i>Culex (Culex) pipiens</i> Linné, 1758	1365	823	El Tarf, Annaba (E) - Saida, Mostaganem, Tlemcen (O) -Alger, Blida, Tipaza, Médéa,

			Tizi-Ouzou (N)
<i>Culex (Culex) theileri</i> Theobald, 1903	34	-	Alger (N)
<i>Culex (Maillotia) deserticola</i> Kirkpalrick, 1924	29	-	Alger, Blida (N)
<i>Culex (Maillotia) hortensis</i> Ficalbi, 1889	57	-	Alger, Blida (N) - Tindouf (S)
<i>Culex (Neoculex) territans</i> Walker, 1856	3	-	Tizi-Ouzou (N)
<i>Culiseta (Allotheobaldia) longiareolata</i> Macquart, 1838	1250	271	El Tarf, Annaba (E) - Saida, Mostaganem, Tlemcen, Bechar (O) - Alger, Blida, Tipaza, Médéa, Tizi-Ouzou (N) - Tindouf (S)
<i>Culiseta (Culicella) litorea</i> Shute, 1928	60	20	Alger (N)
<i>Ochlerotatus flavescens</i> Muller, 1764	41	-	Tipaza (N)
<i>Ochlerotatus (Finlaya) geniculatus</i> Olivier, 1791	64	-	Boumerdes (N)
<i>Ochlerotatus coluzzii</i> Rioux, Guilvard & Pasteur, 1998	21	-	Tipaza (N)
<i>Ochlerotatus detritus</i> Halyday, 1833	68	-	Tipaza (N)
<i>Ochlerotatus dorsalis</i> Meigen, 1830	19	-	Ghardaïa (S)
<i>Uranotaenia unguiculata</i> Edwards 1913	-	2	Alger, Blida (N)



Figure 28 : Œufs de *Culex*

(Photo personnelle)



Figure 29 : Œufs d'*Anopheles*

(Photo personnelle)



Figure 30 : Siphon respiratoire (*Culex territans*)

(Photo personnelle)



Figure 31 : Siphon respiratoire (*Culiseta longiareolata*)

(Photo personnelle)



Figure 32 : Siphon respiratoire (*Ochlerotatus dorsalis*) Figure 33 : Siphon respiratoire (*Anopheles labranchiae*)

(Photo personnelle)

(Photo personnelle)

II.4. Discussion

Les résultats de la présente étude, combinés avec des informations de la littérature sur la faune Culicidienne de l'Algérie, mettent en évidence un certain nombre de points qui méritent de l'attention. Senevet & Andarelli (1960) ont recensé sur une période de trente années de travail sur le terrain, un total de 27 espèces de Culicidae dans la région d'Alger, appartenant à deux sous-familles, celles des Anophelinae et des Culicinae. De son côté, (Brunhes et *al.*,2000), rapportent que la faune Culicidienne d'Algérie est riche de 48 espèces. Cette diversité réside dans la climatologie et la diversité des biotopes offerts au développement des Culicidae. Dans la région de Constantine, Berchi (2000), a noté la présence de 7 espèces de Culicidae appartenant à 2 sous-familles, celle des Anophelinae et celle des Culicinae. Il s'agit de *Cx. pipiens*, *Cx. mimeticus*, *Cx. theileri*, *Cx. hortensis*, *C. longiareolata*, *An.labranchiae* et *Uranotaenia unguiculata*. D'après Hassaine (2002), le peuplement Culicidien de l'Afrique méditerranéenne est composé de 67 espèces appartenant à deux sous-familles et à sept genres différents. Dans la région Ouest d'Algérie (Tlemcen), elle a notée 20 espèces de Culicidae.

Ce nombre d'espèces qui est relativement important, peut être expliqué par le grand nombre d'échantillonnages réalisés dans cette région ainsi que la période de prospection sur terrain qui a duré deux années. En effet, selon (Faurie *et al.*, 1980), le nombre d'espèces inventoriées est en fonction du nombre d'individus récoltés. Dans la région de Mila, (Messai *et al.*, 2010), ont noté la présence de 12 espèces de Culicidae appartenant à 2 sous familles, celle des Anophelinae et celle des Culicinae. Il s'agit de (*Cx. pipiens*, *Cx. modestus*, *Cx. theileri*, *Cx. hortensis*, *Cx. antennatus*, *Cx. laticinctus*, *Cx. deserticola*, *Cx. sp.*, *C. longiareolata*, *An. labranchiae*, *An. pharoensis* et *U. unguiculata*).

A partir des résultats obtenus (Tableau 1), Le genre *Culex* occupe la première position, il est représenté par 5 espèces, *Cx. pipiens*, est l'espèce la mieux représentée. La deuxième position est occupée par le moustique *Culiseta longiareolata*, c'est l'espèce la plus abondante et la plus fréquemment récoltée au niveau des différents gîtes prospectés. Le genre *Culex* a été représenté par 5 espèces : *Cx. pipiens*, *Cx. theileri*, *Cx. deserticola*, *Cx. territans* et *Cx. hortensis*, avec la nette dominance de *Cx. pipiens* représenté par un nombre de 1365 larves et 823 adultes, capturés et collectés dans les zones urbaines et rurales ce qui est dû à son pouvoir d'adaptation aux différentes conditions écologiques et de résistance. Ces résultats sont compatibles avec un grand nombre d'études récentes. Dans la région de Mila, (Messai *et al.*, 2010) ont recensés la présence de 12 espèces, 8 appartenant au genre *Culex* (*Cx. pipiens*, *Cx. modestus*, *Cx. antennatus*, *Cx. hortensis*, *Cx. deserticola*, *Cx. theileri*, *Cx. laticinctus* and *Culex sp.*). Dans la région de Biskra, (Merabti & Ouakid, 2008) ont inventoriés 22 espèces, 6 appartenant au genre *Culex* (*Cx. hortensis*, *Cx. pipiens*, *Cx. modestus*, *Cx. theileri*, *Cx. laticitus* et *Cx. torentium*).

Dans la région de Tebessa, (Bouabida *et al.*, 2012) ont recensés 9 espèces dont 5 appartenant au genre *Culex* (*Cx. pipiens*, *Cx. theileri*, *Cx. hortensis*, *Cx. perexiguus* et *Cx. laticinctus*). Une étude récente confirme que le moustique ornithophile *Cx. pipiens* du Maghreb est un vecteur expérimentale efficace pour la transmission de virus du Nil occidental et le Virus et fièvre de la Vallée du Rift Virus (Amraoui *et al.*, 2012).

Suite à l'invasion remarquable de la zone industrielle de Rouiba (Alger), au sein de la SNVI a partir du 13 Septembre 2012, Il est a remarqué que le début de l'invasion des moustiques est provoqué par le réseau d'assainissement qui était bouché ou il y'avait concentration des stades pré-imaginaux .Après les travaux d'assainissement, les derniers (barquettes, larves et nymphes) ont été déplacés par pression lors du phénomène du débouchage en plus de la dispersion des femelles adultes vers les autres eaux stagnantes de la zone afin de pondre leurs œufs, ce qui a provoqué la dispersion, l'agressivité du faite qu'elles étaient bloqués dans le regard fermés sans repas sanguin (elles étaient affamées), ce qui a provoqué l'agressivité par rapport au comportement d'attaque pour prendre rapidement le repas chez les travailleurs.

Par ailleurs, il est a noté que cette espèce à préférence ornithophile, qui ne pique que rarement les mammifères, est une espèces des zones humides marécageuses (Brunhes *et al.*, 1999), aucun agent pathogène n'a été attribué a cette espèce (Service. 1970).

Aedes albopictus est une des dernières espèces envahissantes dans la région méditerranéenne (Adhami *et al.*, 1998) et est connu pour avoir le potentiel de transmission verticale des virus de la femelle infectée à ces œufs, confirmé aussi pour *Aedes aegypti* et *Culex* (Baqar *et al.*, 1993). Étonnamment, dans les deux dernières décennies, *Ae. albopictus* a atteint une répartition presque mondiale, actuellement trouvé dans les États-Unis, Amérique centrale et du Sud, en Afrique, en Europe et au Moyen-Orient.

Plusieurs facteurs ont contribué à la propagation rapide de cette espèce de moustique, parmi les plus importantes sont la résistance de ses desséchés, les œufs dormants et leur transport efficace passif dans le monde entier, souvent dans des pneus usagés (Tatem *et al.*, 2006). La capacité d'*Aedes albopictus* à servir comme un redoutable vecteur pour la transmission des maladies a été démontré expérimentalement pour 26 arbovirus (Gratz, 2004). Il convient de noter que nous avons capturé deux femelles de ce redoutable moustique dans le même département que celle de la première capture en Algérie et à l'échelle Maghrébine à été effectuée à Tizi-Ouzou (Izri *et al.*, 2011).

II.5. Conclusion

Cette étude, qui est complémentaire à d'autres enquêtes entomologiques des moustiques effectuées en Algérie, a pour bute d'enrichir nos connaissances sur de la distribution d'espèces de moustiques à importance médicale en Algérie. Parmi les 17 espèces de Culicidae inventoriées, la plupart sont des reconnus comme vecteurs potentiels d'agents pathogènes qui causent des maladies humaines et animales dans diverses régions du monde. Les résultats obtenus devraient être utiles pour l'élaboration d'un programme national de contrôle et de surveillance des moustiques en Algérie. Les études ultérieures devraient porter sur les relations entre la richesse, la diversité des populations de vecteurs et les interactions entre hôte, vecteurs et réservoirs.

II.6. Production scientifique

Bull. Soc. zool. Fr., 2014, 139(1-4) : 255-261.

Entomologie

AN INVENTORY OF MOSQUITOES (DIPTERA: CULICIDAE) IN ALGERIA

par

Ismail LAFRI^{1,2*}, Idir BITAM³,

Assia BENELDJOUZI⁴, Meriem Hind BEN MAHDI²

A survey of immature and adult mosquitoes was conducted in 15 departments with the aims of inventorying the Culicidae and documenting inter-species relationships in different habitats. In total, 3 families, 7 genera and 17 species were collected, including the first report of *Culex territans* larvae captured at an altitude of 1750 m and the confirmation of the presence of *Aedes albopictus* (Dengue, Chikungunya and other arboviruses vector) in Algeria and the Maghreb, based on a second capture in this country.

Keywords: Arbovirus, *Culex*, *Aedes*, Culicidae, mosquitoes.

Chapitre III

Identification des phlébotomes de terrain par MALDI-TOF MS

III.1. Introduction

Un instrument de type **MALDI-TOF** est un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*) et un analyseur à temps de vol (TOF, *time-of-flight mass spectrometry*).

L'une des caractéristiques importantes d'une spectrométrie de masse est la finesse des pics, mesurée par la résolution du spectromètre de masse. La résolution est définie comme étant le rapport de la masse du pic sur la largeur à mi-hauteur. Plus la résolution est élevée, plus les pics sont fins. Il est alors possible de visualiser deux molécules de masses proches. Les instruments MALDI-TOF peuvent être équipés avec un réflectron (miroir électrostatique ou « miroir à ions ») qui dévie les ions avec un champ électrique, doublant ainsi la longueur du chemin de vol de l'ion et augmentant la résolution de l'instrument.

C'est une technique bien établie pour un débit élevé, précise et reproductible de l'identification des micro-organismes cliniquement pertinentes (bactéries, levures, champignons filamenteux) à faible coût et avec une préparation minimale de l'échantillon (Mellmann *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010). Les organismes sont rapidement identifiés en comparant leurs spectres MALDI-TOF avec des espèces disponibles dans la base de données suite à des spectres de référence. Cette protéomique a été appliquée pour l'identification des métazoaires, les espèces de poissons (Mazzeo *et al.*, 2008), ou des plantes (variétés de lentilles) (Caprioli *et al.*, 2010).

Le MALDI-TOF MS a également été démontré comme étant efficace pour la différenciation des arthropodes comme les espèces de *Drosophila*. On a constaté que les spectres générés obtenus à partir des extraits protéiques de spécimens entiers sont reproductible, unique pour chacune des espèces testées (Feltens *et al.*, 2010). En 2011, les espèces de *Culicoides* ont été identifiées par le MALDI-TOF MS et ont montrées que les analyses des échantillons sans l'abdomen étaient conformes, indépendante de l'âge et le sexe (Kaufmann *et al.*, 2011).

Une autre étude sur les *Culicoides* a montrée que seuls les thorax des spécimens frais donnent des profils et des spectres cohérentes et que les pattes, la tête et les ailes pourraient être utilisées pour l'identification morphologique, cette étude a confirmée l'utilisation du MALDI-TOF MS comme un outil alternatif pour identifier les spécimens capturés sur terrain (Kaufmann *et al.*, 2012).

Récemment, une étude d'identification de sept espèces de tiques par MALDI-TOF MS a signalée que les tiques entières ou des parties du corps, génèrent des spectres permettant l'identification des espèces (Karger *et al.*, 2012). Un travail parallèle a confirmé l'identification sans ambiguïté de six espèces de tiques sur la base de l'analyse de leurs profils a partir des pattes (Yssouf *et al.*, 2013a).

Concernant un autre groupe d'arthropode, les spectres du MALDI-TOF MS se sont révélés être capables d'identifier les espèces de moustiques appartenant au genre *Anopheles* utilisant le thorax et la tête pour l'extraction des protéines (Muller *et al.*, 2013). En parallèle, l'analyse des extraits protéiques préparés à partir des pattes de moustiques a permis d'établir une data base avec 13 espèces de moustiques (Yssouf *et al.*, 2013 b) ; De même les stades immatures des moustiques ont pu être différencier par cet outil innovant (Dieme *et al.*, 2014).

Les siphonaptères ont été aussi différencié et identifier par MALDI-TOF MS suite aux extraits protéiques effectués sur des thorax de puces d'élevage (Yssouf *et al.*, 2014).

Finalement, une autre étude a indiqué que le MALDI-TOF MS pourrait être appliquée avec succès pour l'identification des espèces méditerranéenne vectrices des *Leishmania* (Dvorak *et al.*, 2014). Dans cette étude, le MALDI-TOF MS a pu différencier avec succès cinq espèces de phlébotomes appartenant a quatre sous-genres qui ont été originaires des zones distinctes et élevées au laboratoire.

L'auteur a souligné que les modifications de profil MS étaient détectables entre les spécimens de la même espèce ayant des origines géographiques distinctes et que le MALDI-TOF MS reste incapable de différencier entre les sexes. Cependant réellement sur le terrain, les phlébotomes vivent en sympatrie et généralement regroupés en espèces qui appartiennent au même sous-genre (proche génétiquement); donc est ce que les phlébotomes capturés directement sur terrain sont-ils identifiables et l'identification par MALDI-TOF MS sera elle réalisable comme l'expérience faite sur des spécimens de laboratoires préalablement identifiés?

Par le biais de cette étude, nous avons cherché pour la première fois d'établir une data base des phlébotomes des deux sexes d'Algérie, capturés sur terrain, issus de zones endémiques aux *Leishmania*, en second lieu de démontré la faisabilité d'identification des spécimens de terrain par MALDI-TOF MS, et d'évaluer ce système d'identification par des (Blind tests); Évaluer son pouvoir discriminant pour identifier et distinguer entre les espèces du même sous-genre, les mêmes espèces capturés dans 4 sites différents et sa capacité à identifier les femelles gorgées.

III.2. Matériels et méthodes

III.2.1. Captures des phlébotomes

Les phlébotomes de cette présente étude ont été capturés entre Juin 2012 et Octobre 2013 dans quatre régions du Nord de l'Algérie : Mostaganem de l'Ouest ($35^{\circ} 0,53' 39''$ N / $0^{\circ} 05' 25''$ E), Tizi-Ouzou du Centre ($36^{\circ} .42'21.23''$ N / $4^{\circ} .17'13.92''$ E), Annaba de l'Est ($36 .65'00''$ N / $7^{\circ} .58'33''$ E) et M'sila des hauts plateaux de l'Est ($35^{\circ} .35'13''$ N / $4^{\circ} .40'08''$ E). Les leishmanioses Cutanées et Viscérales ont été rapportées dans ces zones.

La méthodologie de capture repose sur l'utilisation des pièges lumineux CDC qui reste la technique de référence selon l'OMS [John W. Hock Société, Gainesville, FL, USA, CDC]. Déposés à l'intérieur d'abris d'animaux et aux habitations humaines pour une durée de 13 heures à compter de 18h00 jusqu'à 7h00 du matin. Les phlébotomes qui étaient vivants au moment de la collecte ont été regroupés afin d'avoir 30 spécimens par tube et stockés dans de l'azote liquide afin d'être transférés dans des congélateurs à -80°C jusqu'à utilisation ultérieure. Les spécimens morts au moment de la collecte ont été stockés dans l'éthanol à 70% à une température ambiante.

III.2.2. Identification morphologique des phlébotomes

Le tête et le dernier tiers postérieur de l'abdomen sont des parties décisives pour leur identification morphologique (dents du pharynx, les organes génitaux et cibarium), ils ont été coupés à l'aide de micro-aiguilles stériles et placés dans une solution de Marc-André pendant 15 min à 37°C, avant d'être montés sous une lamelle dans une goutte de tampon d'alcool de polyvinyle pour l'identification morphologique en utilisant les clés d'identifications spécifiques (Abonnenc. 1972 ; Leger *et al.*, 1983).

III.2.3. Identification moléculaire des phlébotomes

Le reste de l'abdomen a été utilisé pour l'extraction d'ADN pour l'identification des espèces de phlébotomes et la détection des *Leishmania* avec des kits Qiagen (Qiaamp ADN mini kit, Hildesheim, Germany). L'identification moléculaire a été effectuée par la méthode des PCR standard et séquençage pour l'analyse de l'échantillon destiné à amplifier un fragment d'environ 500 pb en utilisant les gènes cytochrome-b (Cyt-b) suivants : primers Phleb_CytB_MBF (5'-GGAGGAGTAATTGCHCTWGTHAT-3'), Phleb_CytB_MBR (5'-AGATATTTACCTKCWTCTTTTRTGTTT -3').

Pour amplifier l'ADN mitochondrial, la PCR a été effectuée en utilisant le profil thermique suivant: une dénaturation initiale de 15 min (94 ° C); suivie par 39 cycles à 94 ° C pendant 30 s (dénaturation), 48 °C pendant 30 s (alignement) et 72 °C pendant 1 minute (extension); et une extension finale à 72 °C pendant 5 minutes de 5µl de l'ADN génomique avec 20 µl du Mix de PCR. Les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel ChromasPro, version 1.34 (Technelysium Pty, Ltd., Tewantin, Queensland, Australia), et comparées avec des séquences disponibles dans le GenBank.

III.2.4. Détection des leishmanies pour les specimens de la data base

Pour la détection des *Leishmania*, on a utilisé les primers suivants :

Leish_CytB_MBF (5'-TGTATGCAGATMATWTGTGGTGTKT-3'),

Phleb_CytB_MBR (5' -GAATCTTATCAGATGTTTTTAAKGTATCAAC- 3'). Comme contrôle positif de détection moléculaire des *Leishmania*, axénique *L.donovani* 1S2D, cloner LdB, et cultivées (Saar *et al.*, 1998). Le même protocole d'amplification de l'ADN a été adopté.

III.2.5. Spécimens utilisés pour la création de la data base

La data base a été créée en utilisant des phlébotomes des deux sexes capturés sur terrain dans 4 sites différents, non-engorgé, stockés à -80 °C et non infectés par les *Leishmania*, un nombre représentatif de chaque espèce capturée a été inclus dans la data base.

III.2.6. La préparation des échantillons pour l'analyse avec MALDI-TOF MS

Les thoraxes, ont été homogénéisés manuellement dans 10 µL d'acide formique à 70% et 10 µL d'acétonitrile à 50% dans des microtubes à 1,5 ml utilisant des pistons (Fischer Scientific, Strasbourg, France). Les homogénats ont été centrifugés à 13 000 rpm pendant 5 minutes, et 1 µL du surnageant de chaque échantillon a été déposé sur une cible en acier (Bruker DaltonicsTM, Wissembourg, France) en quatre points pour chaque échantillon.

Ensuite, 1 μL de la matrice CHCA composé d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamic saturé (Sigma®, Lyon. France), 50% d'acétonitrile, acide trifluoroacétique 2,5% et de l'eau de qualité HPLC a été directement superposé sur chaque échantillon dans la cible, séché pendant plusieurs minutes à une température ambiante et introduite dans l'instrument MALDI-TOF MS pour l'analyse (Yssouf *et al.*, 2013 b). (Figure 34).

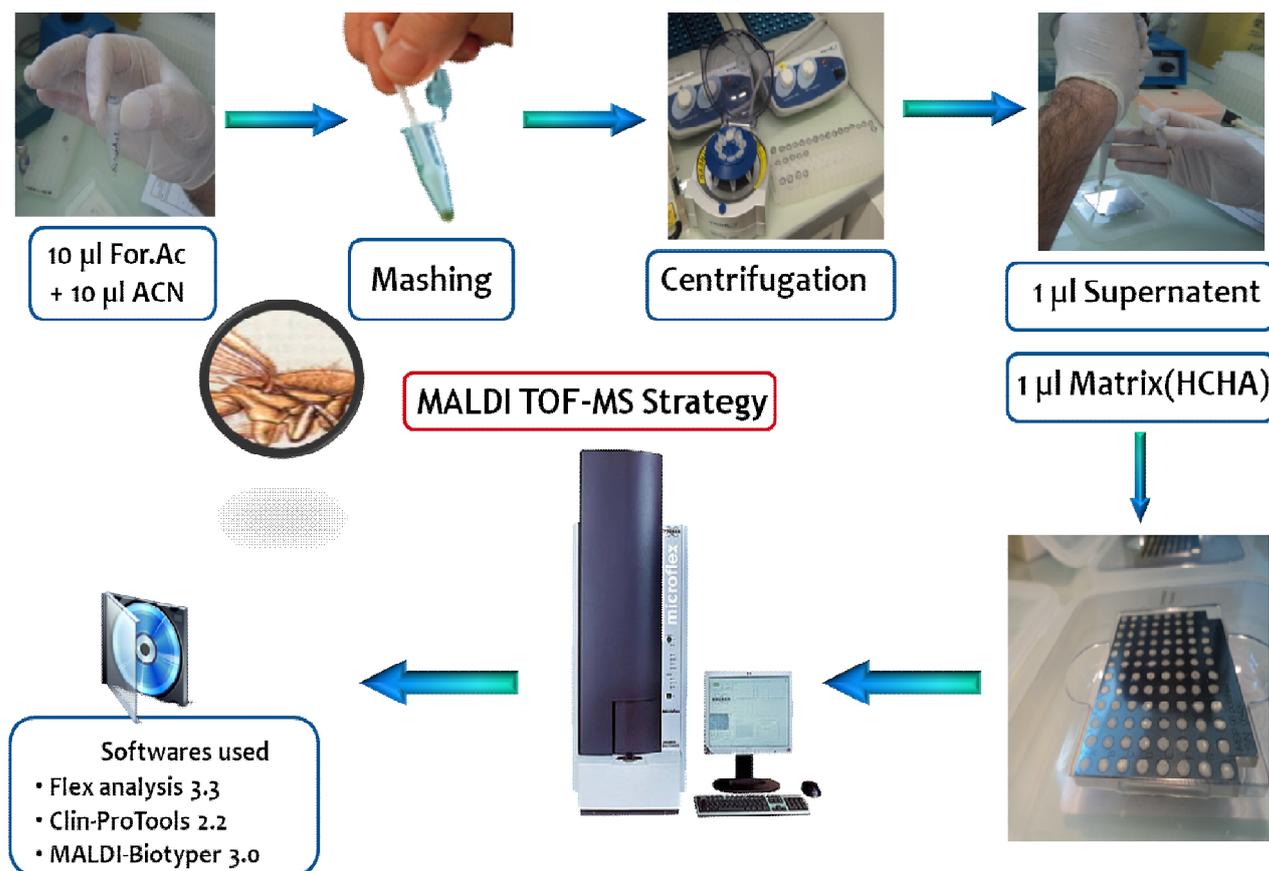


Figure 34 : Stratégie de préparation des échantillons pour l'analyse à MALDI-TOF MS

(personnelle)

III.2.7. MALDI-TOF MS paramètres

Les profils de masse des protéiques ont été obtenus en utilisant le Microflex LT MALDI-TOF spectrométrie de masse (Appareil Bruker Daltonics) avec un logiciel Flex de control (Bruker Daltonics). Les mesures ont été réalisées dans le mode ions positifs linéaire (Fournier *et al.*, 2009) dans une plage de masse comprise entre 2 à 20 kDa.

Chaque spectre correspond à des ions obtenus à partir de 240 tirs de laser effectués dans six régions du même endroit. Les profils de spectre obtenus ont été visualisés avec le logiciel Flex analysis 3.3 et exportés vers le MALDI-Biotyper v. 3,0 (Bruker). La reproductibilité des spectres a été évaluée en analysant les profils spectraux moyens obtenus à partir des quatre points pour chaque spécimen de la même espèce en utilisant le ClinProTools, version 2.2, programme (Bruker).

III.2.8. Validation de l'étude (Blinds tests)

Une comparaison des spectres de chaque espèce de référence a été réalisée pour interroger la data base. La fonction «start identification" dans le MALDI Biotyper permet l'identification de chaque échantillon à tester, le niveau d'identification et de signification a été déterminé en utilisant les valeurs de scores obtenues (LSVs) données par le logiciel MALDI-Biotyper v.3.3 correspondant à un degré identifié des intensités de signaux des spectres de masse de l'échantillon à tester avec les spectres de référence. Un score d'identification s a été obtenu pour chaque Blind test.

Blind test 1. Un test a été réalisé avec des spécimens non gorgés des deux sexes stockés à -80 °C et morphologiquement identifiés. L'identification moléculaire a été réservée pour les résultats incohérents entre les identification morphologique et les identification par MS, ensuite nous avons choisi au hasard (16%) des échantillons pour l'identification moléculaire et la validation de ce test.

Blind test 2. Un deuxième test a été réalisé en utilisant des spécimens inconnus gorgés et non gorgés des deux sexes stockés à -80 °C et d'autres stockés dans l'ethanol 70%, pour déterminer les facteurs qui peuvent influencer sur la qualité des spectres. (10%) des spécimens non gorgés stockés à -80 °C ont été sélectionnés au hasard pour l'identification moléculaire et la validation du test.

III.2.9. L'analyse typologique

L'analyse typologique (MSP dendrogramme) a été effectuée sur la base de la comparaison des spectres obtenus par le logiciel MALDI-Biotyper et de les regroupés selon le profil de masse protéique (signaux de masse et intensités) (Sauer *et al.*, 2008). Plusieurs analyses ont été effectuées afin de déterminer comment les organismes sont liés et regroupés les uns aux autres. Nous avons effectué le regroupement des spectres de masse de toutes les espèces testées qui ont été chargées dans la data base finale en utilisant la fonction de MSP dendrogramme.

L'objectif était de déterminer si cette méthode pourrait être utilisée pour regrouper et différencier les différents genres, sous-genres, espèce et sexes de phlébotomes de terrain.

III.3. Résultats

Les phlébotomes de cette étude ont été capturés dans quatre régions du Nord de l'Algérie. Un total de 2692 phlébotomes capturés durant 11 nuits de capture (Tableau 2). Parmi ceux-ci, 102 phlébotomes stockés à -80°C ont été soumis à l'identification morphologique en utilisant les clés d'identifications taxonomiques pour l'inventaire de six espèces, y compris: *P. perniciosus* (n=43, 24 male (m)), 19 femelle (f)), *P. longicuspis* (n=21, 12 male (m)), 9 femelle (f)), *P. perfiliewi* (n=14, 6 male (m)), 9 femelle (f)), *P. papatasi* (n=20, 16 male (m)), 4 femelle (f)), *P. sergenti* (n=1, 1 femelle (f)), *S. minuta* (n=3, 1 male (m)), 2 femelle (f)). Ces 6 espèces de phlébotomes morphologiquement identifiés ont été utilisées dans la présente étude pour évaluer le niveau de justesse d'identification par MALDI-TOF MS.

Tableau 2: Nombre et sites de captures des phlébotomes

Sites de captures	Période	Nombre de nuits de captures	Nature de l'abri	Nombre de specimens conservés (Azote liquid /Alcool)	Total des phlébotomes capturés
Annaba	Juin 2013	3	Bovin	300 / 56	356
Mostaganem	Juin 2012	2	Caprin	560 / 847	1407
M'sila	Juillet 2014	3	Volaille	31 / 24	55
Tizi-Ouzou	Aout 2013	4	Volaille	352 / 549	901

III.3.1. Les analyses par MALDI-TOF MS

Les thorax de 102 phlébotomes morphologiquement identifiés y compris deux genres, 4 sous-genres et 6 espèces, ont été soumis à une analyse MALDI-TOF MS. De ceux-ci, 28 spécimens des six espèces ont été identifiées et validés par l'analyse moléculaire pour être servis comme une data base de référence (Tableau 2).

La qualité des spectres et l'intensité des pics est conforme à toutes les espèces étudiées, les profils des protéines étaient très similaires entre les échantillons de la même espèce dans la plage de masse de 2 à 20 kDa, et les intensités de signal ont été très fortes conduisant à évaluer la reproductibilité intra -espèce et la spécificité inter-espèce. Les profils protéiques étaient spécifiques pour les différentes espèces de tous les sous-genres et genres avec plusieurs pics uniques de chaque espèce qui ont permis l'identification fiable des espèces et conduisant à la classification taxonomique des phlébotomes analysés.

En utilisant le logiciel Flex analysis, nous avons observé que les profils obtenus à partir de toutes les espèces de phlébotomes étaient similaires entre les espèces. L'alignement des spectres de différents spécimens en utilisant le logiciel ClinProTools 2.2 confirme la reproductibilité intra- espèces (Figure 35) et la spécificité inter-espèces (Figure 36).

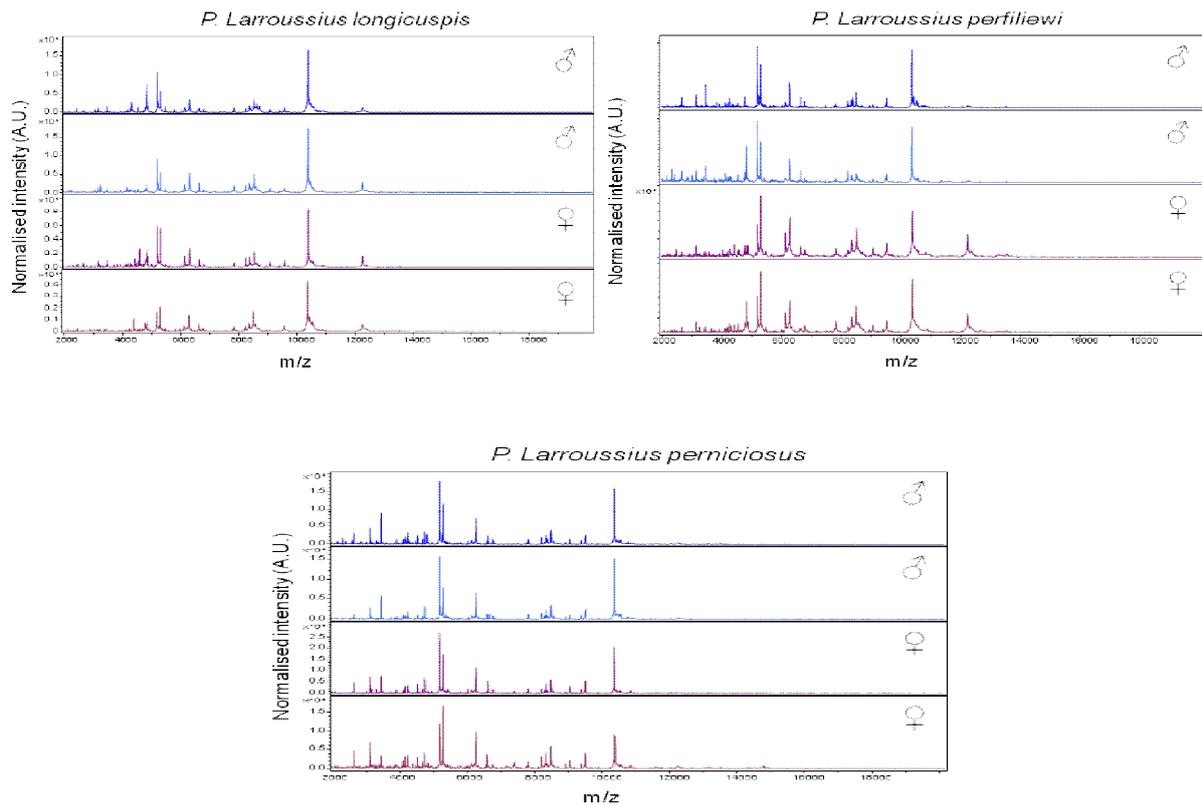


Figure 35 : MALDI-TOF MS profils protéiques de trois différentes espèces du sous-genre *Larrousius*

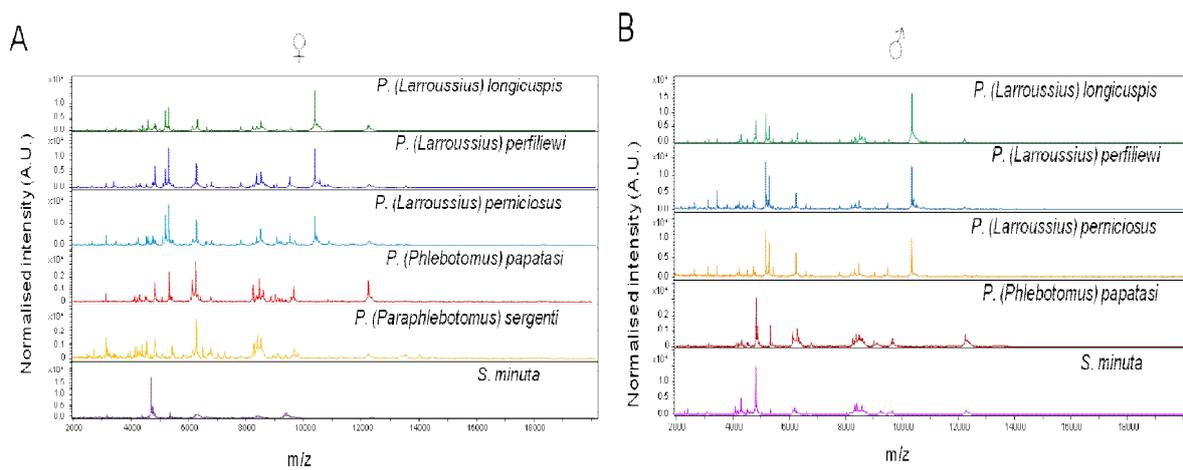


Figure 36 : MALDI-TOF MS profils des deux sexes des 6 espèces de la data base

Sur la base de ces résultats, les spectres de ces six espèces ont été chargés pour créer la data base. Cependant, les profils des phlébotomes des deux sexes appartenant à la même espèce ont révélé une petite dichotomie visuelle montrant par le Clin-ProTools. Pour certaines espèces, un léger décalage de profil a été apprécié entre les deux sexes (figure 37).

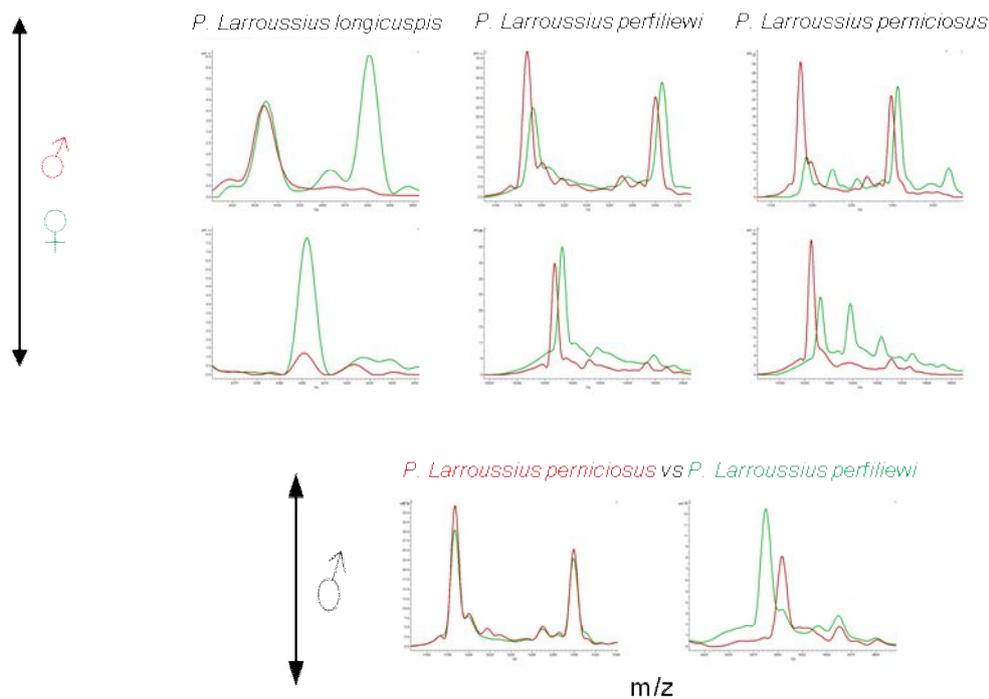


Figure 37 : MALDI-TOF MS profils distincts entre les deux sexes de la même espèce

Pour confirmer la reproductibilité intra-espèces et la spécificité inter-espèces des spectres et de visualiser les distances entre les différentes espèces de phlébotomes des deux sexes, les profils protéiques MS ont été utilisés pour générer un dendrogramme. L'analyse de la concentration a révélé que tous les spécimens de la même espèce ont été regroupés sur le même clade et distinctes des autres espèces, à l'exception de *P. perniciosus* mâle qui a été regroupé avec *P. perfilewii* mâle. En outre, les sexes ont été bien séparés pour toutes les espèces (Figure 38).

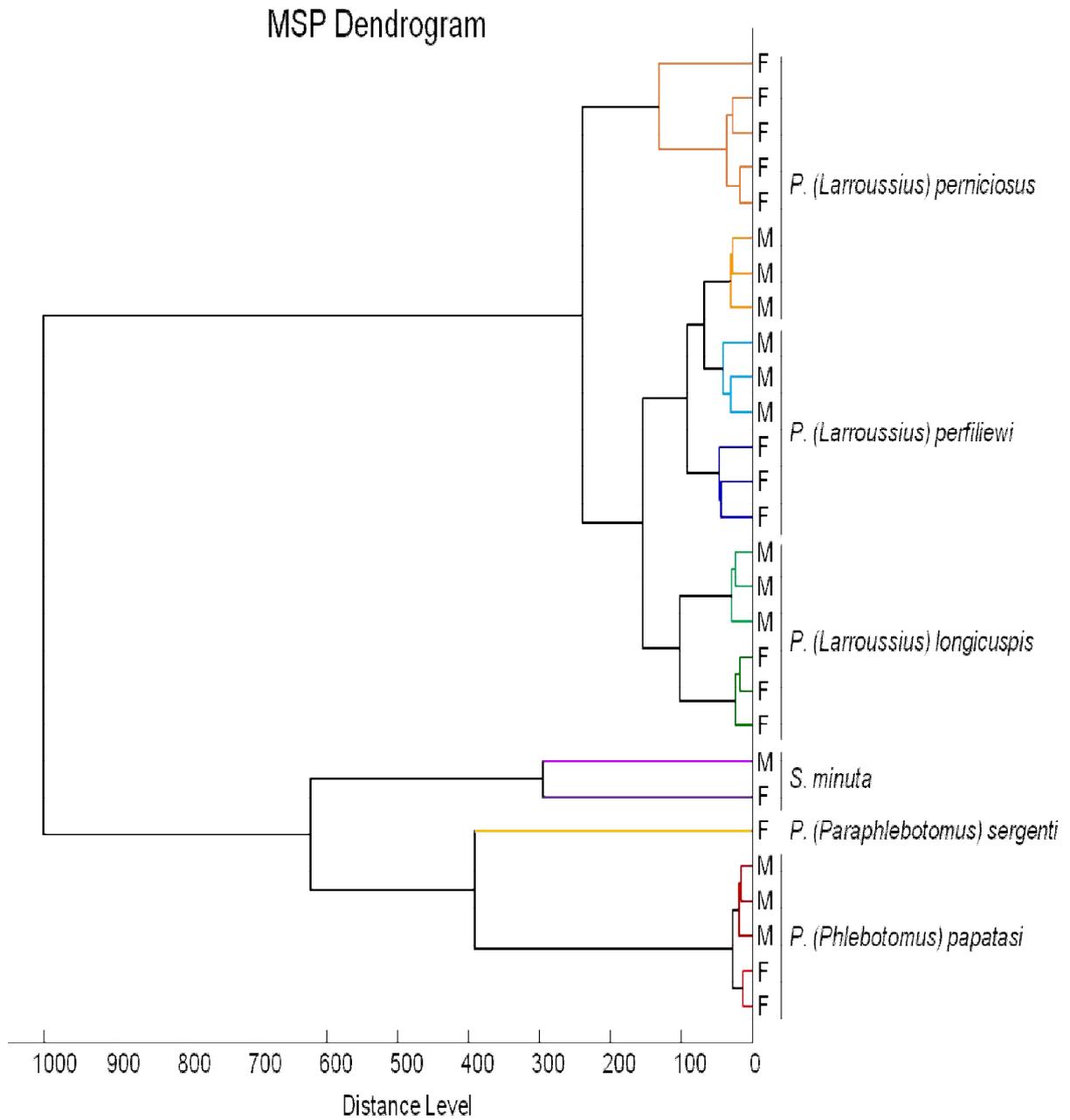


Figure 38 : MSP Dendrogramme de tous les spécimens de la data base

III.3.2. Blind tests

Blind test 1. Un total de 80 échantillons conservés à -80 °C, ont été testés contre la data base de référence. Une comparaison de ces échantillons préalablement morphologiquement identifiés avec les spectres de référence de la base de données en utilisant le logiciel MALDI-Biotyper a révélé des résultats satisfaisants, car 75 échantillons testés (4 points par échantillon) ont conduit à une identification cohérente et correcte entre l'identification morphologique et l'identification par MALDI-TOF MS au niveau des espèces, avec de bons scores compris entre (1,907-2,760) obtenus (Tableau 3). Pour tous les échantillons testés, le pourcentage d'identification correct du sexe a été estimé avec (94,92%). Concernant les cinq spécimens dont on a observé une incohérence de l'identification entre la morphologie et le MALDI-TOF MS, l'analyse moléculaire a soutenu fortement l'identification par MS (Tableau 4). Par conséquent, nous avons choisi de manière aléatoire (n = 17, 23%) des échantillons utilisés pour l'identification moléculaire et la validation du premier Blind test.

Tableau 3 : Phlébotomes utilisés pour la création de la data base et spécimens utilisés pour le Blind test 1.

Identification morphologique	Sites de la capture	Nombre de spécimens inclus dans la database (sexes [#])	Nombre de spécimens utilisés pour blind test 1	ID log score-values* [low-High]	Identification correcte du sexes (%)
<i>P. (Larroussius) perniciosus</i>	(Tizi-Ouzou, Mostaganem), Algeria	8 (3M, 5F)	35 (21M,14F)	[2.073-2.760]	96.87 %
<i>P. (Larroussius) perfiliewi</i>	(Tizi-Ouzou, Annaba), Algeria	6 (3M, 3F)	9 (3M,6F)	[2.356-2.581]	90 %
<i>P. (Larroussius) longicuspis</i>	(Tizi-Ouzou), Algeria	6 (3M, 3F)	15 (9M,6F)	[2.305-2.649]	93.33 %
<i>P. (Phlebotomus) papatasi</i>	(Msila), Algeria	5 (3M, 2F)	15(13M,2F)	[2.178-2.785]	94.44 %
<i>P. (Paraphlebotomus) sergenti</i>	(Mostaganem), Algeria	1F	0		-
<i>Sergentomyia minuta</i>	(Tizi-Ouzou, Mostaganem), Algeria	2(1M, 1F)	1F	[1.907]	100 %
Total	-	28	75		-

Tableau 4 : Résultats d'incohérence entre morphologie et le MALDI-TOF MS

Identification morphologique	Sites de captures	Identification par MALDI-TOF MS	ID log score-values* [High]	Nombre de spécimens inclus dans la data base (sexes [#])	Identification moléculaire
<i>P. (Larrousius) perfiliewi</i>	(Annaba), Algérie	<i>P. (Larrousius) perniciosus</i>	[2.551]	6 (3M, 3F)	<i>P. (Larrousius) perniciosus</i>
<i>P. (Larrousius) longicuspis</i>	(Mostaganem), Algérie	<i>P. (Larrousius) perniciosus</i>	[2.276]	6 (3M, 3F)	<i>P. (Larrousius) perniciosus</i>
<i>P. (Larrousius) perniciosus</i>	(Mostaganem), Algérie	<i>P. (Larrousius) longicuspis</i>	[2.191]	8 (3M, 5F)	<i>P. (Larrousius) longicuspis</i>
<i>P. (Larrousius) perfiliewi</i>	(Tizi-Ouzou), Algérie	<i>P. (Larrousius) perniciosus</i>	[2.211]	6 (3M, 3F)	<i>P. (Larrousius) perniciosus</i>
<i>P. (Larrousius) perniciosus</i>	(Tizi-Ouzou), Algérie	<i>P. (Larrousius) longicuspis</i>	[2.421]	8 (3M, 5F)	<i>P. (Larrousius) longicuspis</i>

Blind test 2. Un total de 217 échantillons inconnus ont été testés contre la data base de référence, y compris 196 spécimens stockés à -80°C avec 15 femelles gorgées et 21 échantillons conservés dans l'alcool (Figure 33). Les spécimens non gorgés stockés à -80 °C (n = 181) ont révélés des résultats satisfaisants avec des scores élevés compris entre (1,952 - 2,802) avec une identification de sexe estimée avec (84,54%) (Figure 39), (n = 17, 10%) de ces spécimens ont été choisis au hasard pour l'identification moléculaire afin de valider ces résultats. Pour les femelles gorgées et les échantillons conservés dans l'alcool, seulement 1/3 ont présenté un des résultats cohérents entre l'identification moléculaire et l'identification par MS avec des scores d'identification représentatifs (LSVs > 1,950). Les autres spécimens étaient incohérents avec des faibles scores très hétérogènes (Figure 40).

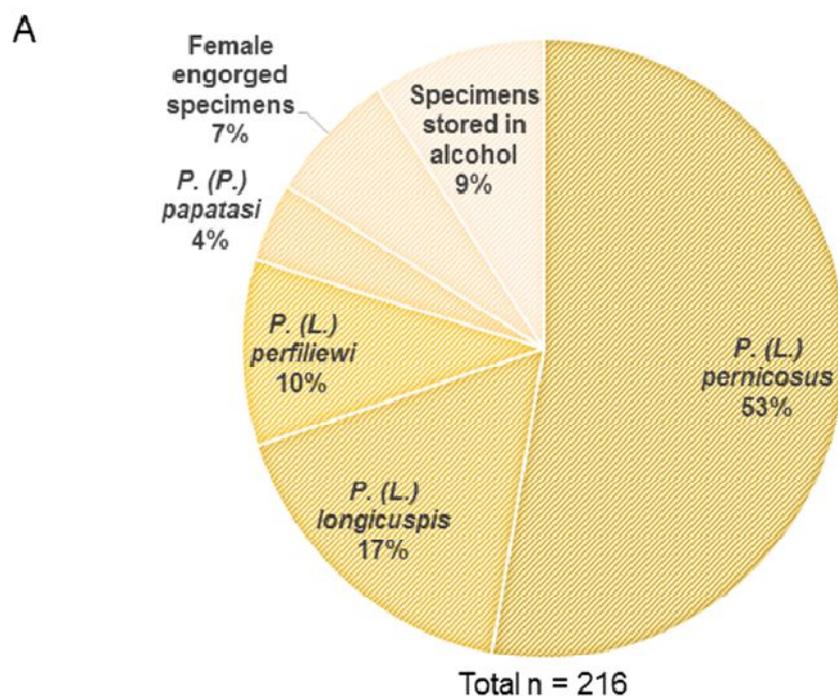


Figure 39 : Spécimens utilisés pour le Blind test 2

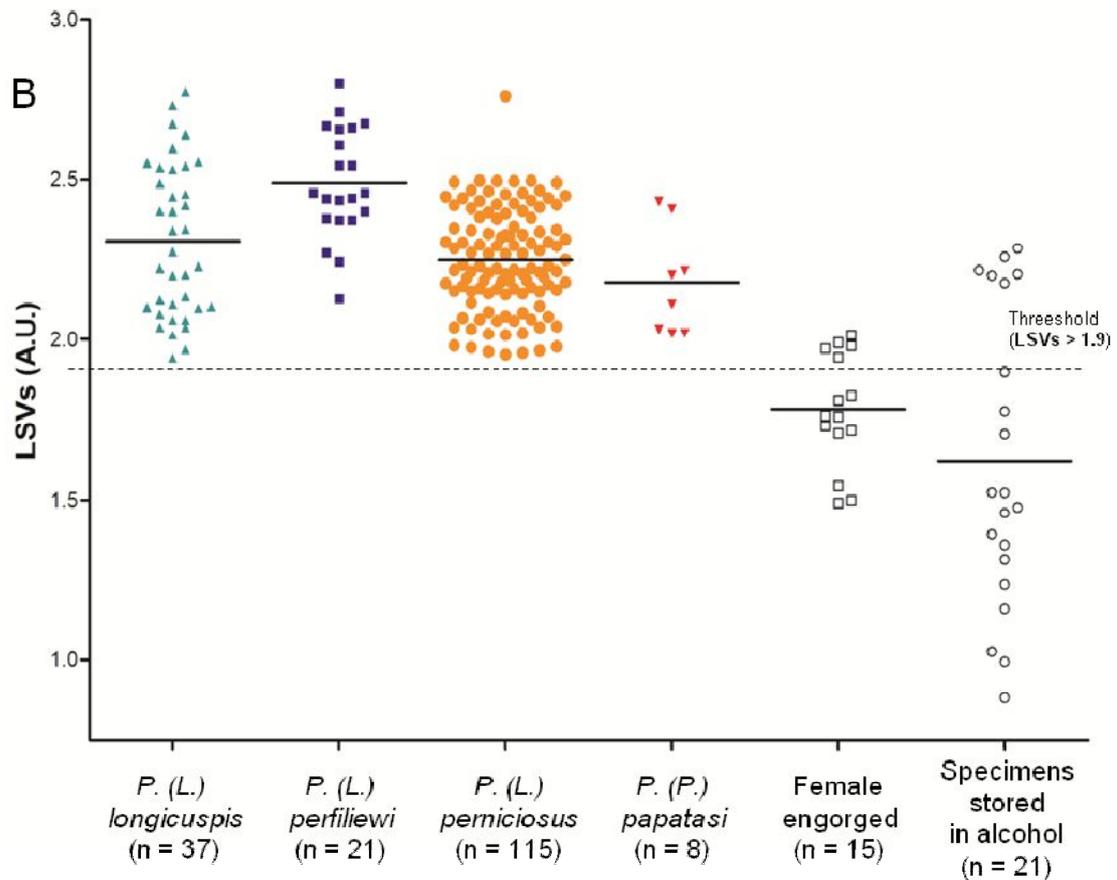


Figure 40 : Résultats des scores (LSVs) obtenus pour les spécimens du Blind test 2

III.4. Discussion

Les phlébotomes sont mis en cause dans la transmission de plusieurs maladies émergentes et ré émergentes pathogènes humains et vétérinaires dans plusieurs pays, considérés comme les principaux vecteurs des *Leishmania*, *Bartonella bacilliformis* et certains arbovirus (Depaquit *et al.*, 2010). Leur rôle médical et épidémiologique, insiste sur la nécessité pour une identification précise des espèces qui est essentielle pour des mesures de contrôle efficaces qui ne demeurent pas toujours facile à réaliser (Depaquit *et al.*, 2010).

L'échantillonnage des populations de phlébotomes pour évaluer les risques de contracter ces agents pathogènes est souvent accompli en utilisant les pièges lumineux (CDC), munis d'ampoules à 6 V. Ils sont utilisés pour attirer et collecter les phlébotomes qui se trouvent à courtes distances qui n'excédant pas plus de deux mètres (Killick-Kendrick *et al.*, 1985). Les pièges CDC sont considérés comme un procédé de piégeage particulièrement efficace lorsqu'il est combiné avec une source de dioxyde de carbone (CO₂), ce qui est particulièrement attrayant pour les femelles hématophages (Alexander. 2000). Par conséquent, les pièges collants adhésifs sont peu coûteux et ne nécessitent pas d'alimentation électrique qui les rend particulièrement utiles dans certaines régions des pays sous-développés. Ils reposent sur le piégeage des phlébotomes par interception passive plutôt que l'attraction (Alexander. 2000).

L'identification précise des espèces de phlébotomes est alors indispensable pour prévenir les maladies transmises par ces arthropodes hématophages. Bien que les approches morphologiques et moléculaires sont des techniques standards pour l'identification des arthropodes, ils restent toujours difficile à appliquer, notamment parce qu'ils nécessitent des compétences entomologiques, informations sur les séquences génomiques cibles, ils prennent beaucoup de temps et ils sont coûteux.

Ces différentes limitations des méthodes morphologiques et moléculaires pour l'identification phlébotomes ont conduit à l'élaboration d'une approche alternative en utilisant une stratégie unique pour l'identification des vecteurs des *Leishmania*.

Le MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry), est une technique bien établie, précise et reproductible de l'identification des micro-organismes cliniquement pertinentes (bactéries, levures, champignons et filamenteux) à faible coût et avec une préparation minimale de l'échantillon (Santos *et al.*, 2010).

Les organismes sont rapidement identifiés en comparant leurs spectres MALDI-TOF avec les spectres de référence des espèces disponibles dans sur la base de données. Cette protéomique a été appliquée pour l'identification des métazoaires, les espèces de poissons (Mazzeo *et al.*, 2008) ou des plantes (Caprioli *et al.*, 2010); MALDI-TOF MS a été également démontré comme étant efficace pour la différenciation des arthropodes comme les espèces de *Drosophila* (Feltens *et al.*, 2010). Ils ont constaté que des extraits protéiques obtenus à partir des spécimens entiers donnent des spectres reproductible, unique pour chacune des espèces testées. En 2011, les espèces de *Culicoides* ont été identifiées par le MALDI-TOF-MS et ont montrées que les analyses des échantillons sans l'abdomen étaient conformes, indépendante de l'âge et le sexe (Kaufmann *et al.*, 2011). Les profils proteiques obtenus par MALDI-TOF MS ont pu identifiés précisément des espèces cryptiques même étroitement liés dans le complexe d' *Anopheles gambiae*. (Freiwald *et al.*, 2009). Elle a également efficace pour une identification précise de 20 espèces de moustiques de six genres a partir des profils des d'extraits de protéines des pattes (Yssouf *et al.*, 2013 b). Dans le même groupe d'arthropode, un autre travail souligne que MALDI-TOF MS peut être utile pour l'identification rapide et fiable des espèces de moustiques à des stades immatures aquatiques (Diem *et al.*, 2014).

Récemment, le MALDI-TOF MS a été appliqué avec succès pour l'identification des espèces de phlébotomes d'élevage utilisant les thorax (Dvorak *et al.*, 2014).

Les phlébotomes sont morphologiquement proches des *Culicoides* par leurs petite taille du corps (1 a 5 mm), ainsi qu'ils comprennent des espèces spécifiques de haute importance épidémiologique, qui en font des candidats idéaux pour des approches alternatives afin d'avoir une identification rapide et efficace (Dvorak *et al.*, 2014).

Dans l'étude précédente, le MALDI-TOF MS a été appliqué avec succès pour l'identification de cinq espèces de mouches de sable avec quatre sous-genres qui ont été originaires des zones distinctes et élevés en laboratoire. Cependant, réellement sur le terrain, les phlébotomes vivent en sympatrie et généralement en groupe d'espèces du même sous-genre, très proches génétiquement. Pour cela, la présente étude a évaluée le pouvoir discriminatoire du MALDI-TOF MS de classer correctement et identifier les espèces de phlébotomes stockées à -80 °C, capturées dans quatre régions du Nord de l'Algérie, endémiques aux leishmanioses. L'identification morphologique des phlébotomes a révélée l'inventaire de six espèces, y compris (*P. perniciosus*, *P. longicuspis*, *P. perfiliewi*, *P. sergenti*, *P. papatasi* et *S. minuta*), ces phlébotome évalués dans cette étude sont reconnus comme vecteurs potentiels de *Leishmania* (Alvar *et al.*, 2012) et certains arbovirus (Izri *et al.*, 2008) qui sont répandues dans les régions tropicales et / ou tempérées du monde.

Nos résultats suggèrent que les spectres du MALDI-TOF MS obtenus a partir d'extraits protéiques des thorax, ailes et pattes de phlébotomes, sont un outil approprié pour identifier les phlébotomes de terrain et rejoignent les résultats de la précédente étude d'identification des phlébotomes d'élevage (Dvorak *et al.*, 2014). Nous avons choisi d'utiliser uniquement les thorax (thoraxes + ailes + pattes) pour éviter d'éventuelles traces résiduelles des repas de sang dans les spectres qui peuvent biaiser les profils et les résultats de façon générale (Kaufmann *et al.*, 2012 ; Dvorak *et al.*, 2014).

Par l'analyse et la manipulation de plus de 350 échantillons appartenant à deux genres, quatre sous-genres et six espèces de phlébotomes a intérêt médical importants, nous avons montré que l'analyse des extraits protéiques des thorax de phlébotomes de terrain par MALDI-TOF MS, est une technique appropriée pour leur identification, en utilisant une data base de référence.

Toutes les espèces analysées produisent des profils protéiques spécifiques et distinctes d'espèces, cohérents et reproductibles, l'analyse des spectres a révélée une reproductibilité intra-espèces et une spécificité inter-espèces, compatible avec les identifications morphologique et moléculaires. En outre, la classification hiérarchique basée sur le Dendrogramme MSP, a soulignée que tous les spécimens de la même espèce ont été regroupées dans la même branche, soutenant la reproductibilité intra-espèces, cela réconforte les résultats antérieurs sur les autre identification des arthropodes par MALDI-TOF MS (Karger *et al.*, 2012 ; Kaufmann *et al.*, 2011 ; Yssouf *et al.*, 2014 a ; Yssouf *et al.*, 2014 b ; Dieme *et al.*, 2014). Les résultats obtenus par cette méthode d'identification ont confortées les résultats obtenus en utilisant des méthodes morphologiques et moléculaires, par l'interrogation de notre data base de référence contre les deux Blind tests. La validation de la data base a été établie par un Blin test 1, avec 80 spécimens stockés à -80 °C et préalablement morphologiquement identifiés, dans lequel 94% des spécimens ont été correctement identifiés par MALDI-TOF-MS avec des scores d'identification élevés (LSVs > 2,073), le séquençage des 5 échantillons dont les résultats étaient incohérents entre l'identification morphologique et le MALDI-TOF MS, a réconforter et soutenu fortement l'identification par MALDI- TOF MS d'où l'intérêt de cette approche innovante en épidémiologie des maladies vectorielle. Cependant, les résultats obtenus à partir du (Blind test 2) montrent que 100% des spécimens inconnus stockés à -80 °C ont été correctement identifiés par MALDI-TOF-MS avec des scores d'identification élevés (LSVs > 1.950) avec une homogénéité marquée, à l'inverse des résultats obtenus pour les femelles gorgées et les spécimens stockés dans l'alcool, qui étaient hétérogènes avec de faibles scores marqués (LSVs > 0.8), sauf que seul un tiers des échantillons présentent un des résultats cohérents entre l'identification moléculaire et MALDI-TOF MS identification avec des scores élevés (LSVs >1.950).

Ces résultats de soutiennent le travail sur les femelles gorgées des *Culicoides*, confirmant que les résidus de sang perturbent les profils protéiques et ou les identifications par MALDI-TOF MS en réduisant les intensités (Kauffman *et al.*, 2011).

Nous avons noté des différences entre les mâles et les femelles non gorgées pour certaines espèces avec un léger décalage de profil apprécié entre les deux sexes. Par conséquent, l'identification correcte du sexe a été estimée de (94,92%) pour le (Blind test 1) et de (84,54%) pour le (Blind test 2). Pour cela, il en résulte que les sexes sont loin d'être différencier, ce résultat rejoint le travail précédent ou les sexes de phlébotomes ne sont pas différencier (Dvorak *et al.*, 2014). Donc, dans notre mode d'extraction des protéines destinées aux analyses par MALDI-TOF MS, seuls les thoraxes ont été inclus et les organes génitaux des deux sexes qui sont considères comme la seule partie différente pour les deux sexes ont été réservés pour la morphologie, des études ultérieure peuvent confirmer l'hypothèse d'arriver a une différenciation complète des deux sexes après le broyage des organes génitaux (Dvorak *et al.*, 2014).

III.5. Conclusions et perspectives

L'identification rapide et efficace des espèces de phlébotomes contribue à la conception et la mise en œuvre de mesures de prévention efficaces pour les maladies transmises par les phlébotomes. Cet outil contribuera également à des études de la biologie des vecteurs et de l'interaction entre les pathogènes, vecteurs et réservoirs, y compris l'évolution de la dispersion de la population de vecteurs et le risque de transmission de la maladie. La méthode évaluée dans cette étude présente plusieurs avantages, y compris une analyse rapide et un faible coût de consommables.

Nos résultats démontrent que le thorax des phlébotomes stockés à -80 °C sont suffisantes pour distinguer les espèces par MALDI-TOF-MS (Dvorak *et al.*, 2014). En général, les sexes ne peuvent pas être différenciés et seuls quelques spécimens stockés dans l'alcool et des femelles gorgées ont été identifiés dans notre étude.

D'autres recherches sont nécessaires pour établir la différence entre les sexes et pour expliquer le léger décalage observé et d'identifier toutes les femelles gorgées et les spécimens stockés dans l'alcool. Cette installation sera également utilisé pour les enquêtes entomologiques en cours et futurs de distinguer et identifier les phlébotomes et de créer une base de données pour les vecteurs infectés par *Leishmania*.

Enfin, d'autres études de recherche sont nécessaires pour établir l'utilité du MALDI-TOF MS qui pourra être utilisée pour l'entomologie médicale et vétérinaire, et que cette technologie est très prometteuse pour la lutte contre les maladies vectorielles.

III.6. Production scientifique

Identification of field-caught *Leishmania* vectors (phlebotomine sand flies) by MALDI-TOF MS in Algeria. Ismail LAFRI^{1,2,6}, Lionel ALMERAS¹, Idir BITAM^{1,2,3,4}, Amina YSSOUF¹, Claire-Lise FORESTIER¹, Arezki IZRI⁵, Didier RAOULT¹ and Philippe PAROLA¹. (Submitted to Plos Neglected Tropical Diseases).

Références bibliographiques

- Abonnenc E, Pastre J. [Capture of Phlebotomus in the Republic of South Africa, with a description of *P. macintoshi*, n. sp. (Diptera, Psychodidae)]. Bull Soc Pathol Exot Filiales. 1972 Sep-Oct
- Acav and Anonyme, 1969 - Arbovirus names. The American Committee on arthropod-borne viruses. American Journal of Tropical Medicine & Hygiene
- Acha P. N., Szyfres B. - Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux. 2e édition, Office international des épizooties ed. Paris, 1989.
- ADHAMI, J. & REITER, P. (1998).- Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J. Amer. Mosquito Control Assoc.*, 14, 340-343.
- Alexander B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. Med Vet Entomol. 2000 Jun
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7(5)
- AMRAOUI, F., KRIDA, G., BOUATTOUR, A., RHIM, A., DAABOUB, J., HARRAT, Z., BOUBIDI, S.- C., TIJANE, M., SARIH, M. & FAILLOUX, A.-B. (2012).- *Culex pipiens*, an experimental efficient vector of West Nile and Rift Valley Fever Viruses in the Maghreb region. *PLoS ONE* 7 (5), e36757. doi:10.1371/journal.pone.0036757.
- BAQAR, S., HAYES, C.G., MURPHY, J.R. & WATTS, D.M. (1993). Vertical transmission of West Nile virus by *Culex* and *Aedes* species mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 48 (6), 757-762.
- Bartelloni and Tesh, 1976 - Clinical and serologic responses of volunteers infected with phlebotomus fever virus (Sicilian type). American Journal of Tropical Medicine & Hygiene, 25
- Beer M, Conraths FJ, van der Poel WH. Schmallenberg virus--a novel orthobunyavirus emerging in Europe. *Epidemiol Infect.* 2013 Jan

- Ben Hassine T, De Massis F, Calistri P, Savini G, BelHaj Mohamed B, Ranen A, Di Gennaro A, Sghaier S, Hammami S. First detection of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in Equids in the South-West of Tunisia. *Transbound Emerg Dis.* 2014 Oct
- Berchi S. (2000). *Bioécologie de Culex pipiens L. (Diptera: Culicidae) dans la région de Constantine et perspectives de lutte.* Thèse de doctorat es Sciences, Université de Constantine, 133 p.
- Berdjane-Brouk Z, Charrel RN, Bitam I, Hamrioui B, Izri A. Record of Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii Grassi, 1908 and Phlebotomus (Larrousius) chadlii Rioux, Juminer & Gibily, 1966 female in Algeria. *Parasite.* 2011 Nov
- Bouabida H, Djebbar F & Soltani N. Etude systématique et écologique des Moustiques (Diptera: Culicidae) dans la région de Tébessa (Algérie) –*Faunistic Entomology* 2012 65, 99-103
- Boudemagh N, Bendali-Saoudi F and Soltani N. Inventory of Culicidae (Diptera: Nematocera) in the region of Collo (North-East Algeria). *Annals of Biological Research,* 2013, 4 (2):94-99
- Bouree P., La fièvre jaune, *Lettre Infect.* 7 (1992) 613-617.
- Bouwstra RJ, Kooi EA, de Kluijver EP, Verstraten ER, Bongers JH, van Maanen C, Wellenberg GJ, van der Spek AN, van der Poel WH. Schmallenberg virus outbreak in the Netherlands: routine diagnostics and test results. *Vet Microbiol.* 2013 Jul 26
- Brower V. Tackling the most difficult diseases. Genetics and genomics open new strategies to fight vector-borne diseases. *EMBO Rep.* 2001
- Brunhes J., Hassaine K., Rhaim A. & Hervy J.P. (2000). Les Culicidae de l'Afrique méditerranéenne: espèces présentes et répartition (Diptera: Nematocera). *Bulletin de la Société Entomologique de France* 105(2), p. 195-204.
- Brunhes J., Rhaim A., Geoffroy B., Angel G. & Hervy J.P. (1999). Les Culicidae de l'Afrique méditerranéenne. *Logiciel de l'Institut de Recherche et de Développement de Montpellier (France).*
- Callis J. Bluetongue in the United States. *Prog Clin Biol Res.* 1985

- Caprioli G, Cristalli G, Ragazzi E, Molin L, Ricciutelli M, Sagratini G, Seraglia R, Zuo Y, Vittori S. A preliminary matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight approach for the characterization of Italian lentil varieties. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2010 Oct 15
- Cassier P., Brugerolle G., Combes C., Crain J., Raibaut A., 1998 – Le parasitisme une
- Charrel RN, Gallian P, Navarro-Mari JM, Nicoletti L, Papa A, Sanchez- Seco MP, et al. Emergence of *Toscana virus* in Europe. *Emerg Inf Dis* 2005
- Christophers- *Aedes aegypti* (L.). *The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure.* Ed. Cambridge University Press, London- New York, 1960, I-XII + 739 p.
- Conraths FJ, Kämer D, Teske K, Hoffmann B, Mettenleiter TC, Beer M. Reemerging Schmallenberg virus infections, Germany, 2012. *Emerg Infect Dis.* 2013 Mar
- CoosemansM., Van Gompel A, Les principaux arthropodes vecteurs de maladies. Quels risques pour le voyageur d'être piqué ? D'autre contaminé?, *Bull. Soc. Pathol. Ex.* 91 (5-5bis) (1998) 467-473
- Couderc T, Khandoudi N, Grandadam M, et al. Immunoprophylaxis and therapy for Chikungunya virus infection. *J Infect Dis* 2009
- Coutin . R : insectes N74(1988) N 4.
- Daubney R., Hudson J.R., GarnhamP.C. - Enzootic hepatitis or rift valley fever. An undescribed virus disease of sheep, cattle and man from East Africa. *J. Pathol. Bacteriol.* 1931
- Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry PE, Peyrefitte C. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro Surveill.* 2010 Mar 11
- Dieme C, Yssouf A, Vega-Rúa A, Berenger JM, Failloux AB, Raoult D, Parola P, Almeras L. Accurate identification of Culicidae at aquatic developmental stages by MALDI-TOF MS profiling. *Parasit Vectors.* 2014 Dec 2
- du Toit R.M. (1944) The transmission of bluetongue and horse sickness by Culicoïdes. *Onderstepoort J. Vet. Sci.*, 19, 7-16.

- Dvorak V, Halada P, Hlavackova K, Dokianakis E, Antoniou M, Volf P. Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Parasit Vectors*. 2014 Jan 14
- Echevarria J.M., De Ory F., Guisasola M.E., et al. Acute meningitis due to Toscana virus infection among patients from both the Spanish Mediterranean region and the region of Madrid. *J Clin Virol* 2003 *equilibre dynamique*. Ed Masson, Paris : 361p.
- Fall M, Diarra M, Fall AG, Balenghien T, Seck MT, Bouyer J, Garros C, Gimonneau G, Allène X, Mall I, Delécolle JC, Rakotoarivony I, Bakhoun MT, Dusom AM, Ndao M, Konaté L, Faye O, Baldet T. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) midges, the vectors of African horse sickness virus - a host/vector contact study in the Niayes area of Senegal. *Parasit Vectors*. 2015 Jan 21
- Faurie C., Ferra C. & Medori P. (1980). *Ecologie*. Baillière J.B. (ed.), Paris, 1091 p.
- Feltens R, Görner R, Kalkhof S, Gröger-Arndt H, von Bergen M. Discrimination of different species from the genus *Drosophila* by intact protein profiling using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *BMC Evol Biol*. 2010 Apr 7
- Gerardin P, Guernier V, Perrau J, et al. Estimating Chikungunya prevalence in La Reunion Island outbreak by serosurveys : two methods for two critical times of the epidemic. *BMC Infect Dis* 2008 ; 8 : 99.
- GRATZ, N.G. (2004). Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*, *Med. Vet. Entomol.*, 215° 227.
- Gubler D.J., The global resurgence of arboviral diseases, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* SO (1996)449-451.
- Guillet P., Nathan M., *Aedes albopictus*, une menace pour la France ?, *Med. Trap.* 59 (1999) 49-52.
- Harison VR, Eckels KH, Bartelloni P, et al. Production and evaluation of formalin-killed Chikungunya vaccine. *J Immunol* 1971

- Hassaine K. (2002). *Bioécologie et biotypologie des Culicidae (Diptera: Nematocera) de l'Afrique méditerranéenne. Biologie des espèces les plus vulnérantes (Ae. Caspius, Ae. Detritus, Ae. Mariae et Cx. pipiens) dans la région occidentale algérienne.* Thèse de doctorat es Sciences, Université de Tlemcen, 191 p.
- Hemmersbach-Miller M., Parola P., Charrel R.N., et al. Sandfly fever due to Toscana virus : an emerging infection in southern France. *Eur J Intern Med* 2004
- Hernández-Triana LM, Jeffries CL, Mansfield KL, Carnell G, Fooks AR, Johnson N. Emergence of west nile virus lineage 2 in europe: a review on the introduction and spread of a mosquito-borne disease. *Front Public Health.* 2014 Dec 8
- Hervy J-P - Expérience de marquage-lâcher-recapture portant sur *Aedes aegypti* Linné, en zone de savane soudanienne ouest-africaine. I. Le cycle trophogonique. *Cah. O. R. S. T. O. M., sér. Ent. Méd. et Parasitol.,* 1977
- Himmi O., Dakki M., Trari B. & Elagbani M.A. (1995). Les Culicidae du Maroc. Clés d'identification avec données biologiques et écologiques. *Travaux de l'Institut Scientifique série Zoologie, Rabat* 44, 50 p.
- Hubalek Z, Halouzka J - West Nile fever : a reemerging mosquito- borne viral disease in Europe. *Emerg Inf Dis* 1999
- Hutcheon, D. (1902). "Malarial catarrhal fever of sheep." *Vet Rec* 14: 629-633.
- Izri A ; Bitam I ; Charel RN. First entomological documentation of *Aedes albopictus* in Algeria. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Jul
- Jouan A., Arboviroses. Des virus, des moustiques, des animaux et des hommes, *Med Trop.* 57 (1997) 28S-36s
- Jouan A., LE Guenno B., Digoutte J.P. et Coll. - An RVF epidemic in southern Mauritania. *Ann. Inst. Pasteur Virol.* 1988 ; 139 : 307- 308.

- Kanayanarooj., Vaughn D.W., Nimmannitya S., Green S., Suntayakorn S., Kunentrasai N. et al., Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness, *J. infect. Dis.* 176 (1997) 313-321.
- Karger A, Kampen H, Bettin B, Dautel H, Ziller M, et al. (2012) Species determination and characterization of developmental stages of ticks by whole animal matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Ticks Tick Borne Dis* 3: 78–89.
- Kaufmann C, Schaffner F, Ziegler D, Pfluger V, Mathis A (2012) Identification of field-caught *Culicoides* biting midges using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Parasitology* 139: 248–258.
- Kaufmann C, Ziegler D, Schaffner F, arpenster S, fluger V, et al. (2011) Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry of characterisation of *Culicoides nubeculosus* biting midges. *Medical and Veterinary Entomology* 25: 32–38.
- Kettle D.S., *Medical and Veterinary Entomology*, 2 nd ed., CAB international, 1995, London, 725 p
- Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Peters W, Rioux JA, Bray RS. Zoonotic cutaneous leishmaniasis in Saudi Arabia: the incrimination of *Phlebotomus papatasi* as the vector in the Al-Hassa oasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985
- Krida G., Rhaim A., Jerraya A et Bouattoura., 1998 - Morphologie comparée de quatre stades larvaires de *Culex (Culex) pipiens* Linné récolté en Tunisie (Diptera, Culicidae). *Bull. Soc. Ent. France*, 103 (1) : 5 - 10.
- Léger N, Pesson B, Madulo-Leblond G, Abonnenc E. [Differentiation of females of the subgenus *Larrousius* Nitzulescu 1931 (Diptera-Phlebotomidae) of the Mediterranean region]. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1983
- Léger N., Depaquit J., 2001 – Les phlébotomes et leur rôle dans la transmission des leishmanioses. *Revue Française des laboratoires* № 338, 41-48.
- Lo Presti A, Lai A, Cella E, Zehender G, Ciccozzi M. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. *Asian Pac J Trop Med.* 2014 Dec

- Mailles A, Stahl JP; Steering Committee and Investigators Group. Infectious encephalitis in France in 2007: a national prospective study. *Clin Infect Dis*. 2009 Dec 15
- Martínez-de la Puente J, Figuerola J, Soriguer R. Fur or feather? Feeding preferences of species of *Culicoides* biting midges in Europe. *Trends Parasitol*. 2015 Jan
- Matile L., 1993 - *Diptères d'Europe occidentale*. Ed. Boubée, Paris, T. I, 439 p.
- Mazzeo MF¹, Giulio BD, Guerriero G, Ciarcia G, Malorni A, Russo GL, Siciliano RA. Fish authentication by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2008 Dec 10
- Meegan J.M. - The Rift Valley fever epizootic in Egypt 1977-1978. 1. Description of the epizootic and virological studies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 1979
- Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, Dunn J, Hall G, Wilson D, Lasala P, Kostrzewa M, Harmsen D. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol*. 2008 Jun
- Mellor P.S. (1993) African horse sickness: transmission and epidemiology. *Vet. Res.*, 24, 199-212.
- Mellor PS, Hamblin C. African horse sickness *Vet Res*. 2004 Jul-Aug; 35(4):445-66.
- Merabeti B, Ouakid M. L, 2011. Contribution to the study of mosquitoes (*diptera :culicidae*) in the oasis of the region of Biskra (North-Est of Algeria). *Proceedings of the International Seminar on faunal biodiversity in arid and semi-arid areas*.
- Messai N., Berchi S., Bouknafd F. & Louadi K. (2010). Inventaire systématique et diversité biologique de Culicidae (Diptera: Nematocera) dans la région de Mila (Algérie). *Entomologie faunistique – Faunistic Entomology* 63(3), p. 203- 206.
- Mohl BP, Roy P. Bluetongue virus capsid assembly and maturation. *Viruses*. 2014 Aug 21
- Morillon. M., Tolou H., Les fièvres hémorragiques virales, *Lettre Infect*. 13 (1998) 41 Q-427
- Morillon. M., Tolou H., Les fièvres hémorragiques virales, *Lettre Infect*. 13 (1998) 41 Q-427

- Muller P, Pfluger V, Wittwer M, Ziegler D, Chandre F, et al. (2013) Identification of Cryptic Anopheles Mosquito Species by Molecular Protein Profiling. PLoS One 8: e57486.
- Niang A-A., Geoffroy B., Angel G., Trouillet J., Killik-Kendrick R., Hervy J-P., Brunhes J., 2000 – Les phlébotomes de l'Afrique de l'Ouest. Logiciel d'identification et d'enseignement, IRD édition.
- Nicholas DE, Jacobsen KH, Waters NM. Risk factors associated with human Rift Valley fever infection: systematic review and meta-analysis. Trop Med Int Health. 2014 Dec
- Nicuolo GD, Pagliano P, Battisti S, Starace M, Mininni V, Attanasio V, et al. *Toscana virus* central nervous system infections in southern Italy. J Clin Microbiol 2005
- Nicuolo GD, Pagliano P, Battisti S, Starace M, Mininni V, Attanasio V, et al. *Toscana virus* central nervous system infections in southern Italy. J Clin Microbiol 2005
- Parsonson, I. M., L. H. Thompson, et al. (1994). "Experimentally induced infection with bluetongue virus serotype 11 in cows." Am J Vet Res 55(11)
- Riat A, Cherkaoui A, Emonet S, Greub G, Schrenzel J. [Which benefits for the clinician to implement MALDI-TOF/MS in the bacteriology laboratory?]. Rev Med Suisse. 2014 Nov 12
- Rodhain F, Perez C., Précis d'entomologie médicale et vétérinaire, Maloine editeur, 1985, Paris, 458 p.
- Rodhain. F ; - Le rôle joué par l'urbanisation et les transports dans l'évolution des maladies à vecteurs. Mondes et Cultures, 1991, 51, pp. 130-152.
- Ross RW. The Newala epidemic. III. The virus : isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. J Hyg 1956 ; 54 : 177-91.
- Saar Y, Ransford A, Waldman E, Mazareb S, Amin-Spector S, Plumblee J, Turco SJ, Zilberstein D. Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. Mol Biochem Parasitol. 1998 Sep 1;95(1):9-20.
- Santos C, Paterson RR, Venâncio A, Lima N. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. J Appl Microbiol. 2010 Feb

- Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, et al. (2008) Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. PLoS One 3: e2843.
- Schuffnecker I, Iteman I, Michault A, et al. Genome microevolution of Chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. PLoS Med 2006 ; 3 : e263.
- Seguy E., 1923 - *les moustiques d'Europe*. Ed. Paul Lechevalier, Paris, 234 p.
- Seguy E., 1951 - *Ordre des Diptères (Diptera Linné, 1758) : 449 à 744 in GRASSE P.P., Traité de Zoologie, anatomie, système nerveux, biologie. Insectes supérieurs et Hemipteroïdes*. Ed. Masson et Cie, Paris, T. X, fasc. I, 975 p.
- Senevet G. & Andarelli L. (1960). Contribution à l'étude de la biologie des moustiques en Algérie et dans le Sahara algérien. *Archive de l'Institut Pasteur, Algérie* 38(2), p. 306-326.
- Sergon Y, Njuguna C, Kalani R, et al. Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *Am J Trop Med Hyg* 2008 ; 78 : 333-7.
- Service N.W. The taxonomy and distribution of two sibling mosquitoes, *Culiseta morsitans* (Theobald) and *C. litorea* (Shute). *J. nat. Hist.*, 1970, 4: 481-491
- Sissoko D, Moendanze A, Malvy D, et al. Seroprevalence and risk factors of Chikungunya virus infection in Mayotte, Indian Ocean, 2005-2006 : a population-based survey. PLoS ONE 2008,3.
- Solomon T, Thao LT, Dung NM, Kneen R, Hung NT, Nisalak A, Vaughn DW, Farrar J, Hien TT, White NJ, Cardoso MJ. Rapid diagnosis of Japanese encephalitis by using an immunoglobulin M dot enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 1998 Jul
- TATEM, A.J, HAY, S.I. & ROGERS, D.J. (2006).- Global traffic and disease vector dispersal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 6242-6247.
- Thiongane Y., Zeller H, Lo M.M. et Coll. - Baisse de l'immunité naturelle vis-à-vis de la fièvre de la vallée du Rift chez les ruminants domestiques du bassin versant du fleuve Sénégal après l'épizootie de 1987. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1994

- Tolou H., Baudon D., Laroche R., Actualites des infections a virus dengue. Aspects epidemiologiques et pathogeniques, *Med. Trop.* 57 (1997) 71-76.
- Venturi G., Madeddu G., Rezza G., et al. Detection of Toscana virus central nervous system infections in Sardinia Island, Italy. *J Clin Virol* 2003
- Walter, Gian-Reto et al. Ecological responses to recent climate, *Nature*, vol .416, mars, 2002, p. 389.
- Walther GR, Post E, Convey P, Menzel A, Parmesan C, Beebee TJ, Fromentin JM, Hoegh-Guldberg O, Bairlein F. Ecological responses to recent climate change. *Nature*. 2002 Mar 28
- Weinberger M, Pitlik SD, Gandacu D *et Coll* - West Nile fever outbreak, Israel 2000: epidemiologic aspects. *Emerg Inf Dis* 2001
- Yergolkar PN, Tandale BV, Arankalle VA, et al. Chikungunya outbreaks caused by African genotype, India. *Emerg Infect Dis* 2006 ; 12
- Yssouf A, Flaudrops C, Drali R, Kernif T, Socolovschi C, Berenger JM, Raoult D, Parola P. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of tick vectors. *J Clin Microbiol.* 2013 Feb (a).
- Yssouf A, Flaudrops C, Drali R, Kernif T, Socolovschi C, et al. (2013) Matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of tick vectors. *J Clin Microbiol* 51: 522–528. (a).
- Yssouf A, Socolovschi C, Flaudrops C, Ndiath MO, Sougoufara S, Dehecq JS, Lacour G, Berenger JM, Sokhna CS, Raoult D, Parola P. Matrix-assisted laser desorption ionization--time of flight mass spectrometry: an emerging tool for the rapid identification of mosquito vectors. *PLoS One*. 2013 Aug 15 (b)
- Yssouf A, Socolovschi C, Flaudrops C, Ndiath MO, Sougoufara S, Dehecq JS, Lacour G, Berenger JM, Sokhna CS, Raoult D, Parola P. Matrix-assisted laser desorption ionization--time of flight mass spectrometry: an emerging tool for the rapid identification of mosquito vectors. *PLoS One*. 2013 Aug 15 (b)

- Yssouf A, Socolovschi C, Leulmi H, Kernif T, Bitam I, Audoly G, Almeras L, Raoult D, Parola P. Identification of flea species using MALDI-TOF/MS. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2014 May
- Yssouf A, Socolovschi C, Leulmi H, Kernif T, Bitam I, Audoly G, Almeras L, Raoult D, Parola P. Identification of flea species using MALDI-TOF/MS. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2014 May
- Zeller H, Schuffencker I - West Nile virus : an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis* 2004
- Zientara S, Sailleau C, Dauphin G, Roquier C, Rémond EM, Lebreton F, Hammoumi S, Dubois E, Agier C, Merle G, Bréard E. Identification of bluetongue virus serotype 2 (Corsican strain) by reverse-transcriptase PCR reaction analysis of segment 2 of the genome. *Vet Rec*. 2002 May 11
- Dedet J-P., Addadi K., Belazzoug S., 1984 – Les Phlébotomes (Diptera: Psychodidae) d'Algérie. *Cah. ORSTOM. Sér. Ent. Méd. Parasitol* .vol XXII, № 2, 99-127.

Entomologie

AN INVENTORY OF MOSQUITOES (DIPTERA: CULICIDAE) IN ALGERIA

par

Ismail LAFRI^{1,2*}, Idir BITAM³,

Assia BENELDJOUI⁴, Meriem Hind BEN MAHDI²

A survey of immature and adult mosquitoes was conducted in 15 departments with the aims of inventorying the Culicidae and documenting inter-species relationships in different habitats. In total, 3 families, 7 genera and 17 species were collected, including the first report of *Culex territans* larvae captured at an altitude of 1750 m and the confirmation of the presence of *Aedes albopictus* (Dengue, Chikungunya and other arboviruses vector) in Algeria and the Maghreb, based on a second capture in this country.

Keywords: Arbovirus, *Culex*, *Aedes*, Culicidae, mosquitoes.

Inventaire des moustiques (Diptera : Culicidae) de l'Algérie

Une étude des moustiques immatures et adultes a été menée dans 15 départements de l'Algérie dans le but d'inventorier des Culicidae et de documenter les relations entre les espèces dans leurs différents biotopes. 3 familles, 7 genres et 17 espèces récoltées dont deux records significatifs : des larves de *Culex territans* collectées à 1750 m d'altitude et la confirmation de la présence d'*Aedes albopictus* (vecteur de la Dengue,

Authors Affiliations:

1. Institute of Veterinary Science, University of Blida 1, Algeria 09000.
2. National High School of Veterinary, Algiers, Algeria 16000.
3. M'hamed Bougarra University, Laboratoire Valcore, Boumerdes, Algeria 35000.
4. Pasteur Institute of Algeria, Algiers, Algeria 16000.

*Corresponding author: Lafri Ismail, Institute of Veterinary Science, University of Blida 1, Algeria 09000; National High School of Veterinary, Algiers, Algeria 16000. E-Mail: s_lafri@hotmail.fr

Author's E-mails: Bitam Idir: idirbitam@gmail.com; Beneldjouzi Assia: assia.beneldjouzi@yahoo.com; Ben Mahdi Meriem Hind: mhbenmahdi@yahoo.fr. Conflicts of interest: the authors declare that they have no competing interests.

Bulletin de la Société zoologique de France 139 (1-4)

Chikungunya et autres arboviroses) en Algérie qui est la seconde capture dans notre pays et à l'échelle Maghrébine.

Mots-clés: Arboviroses, *Culex*, *Aedes*, Culicidae, moustiques.

Introduction

Far from being controlled, in many regions of the world mosquito-borne diseases are flourishing, causing significant global morbidity and mortality, particularly in children and adolescents (MACKENZIE *et al.*, 2004). The family Culicidae is a diverse group of largely haematophagous insects. A number of species are vectors of viruses, nematodes and protozoa. Due to their wide geographical distribution, abundance and harmfulness, mosquitoes are important vectors for various pathogens

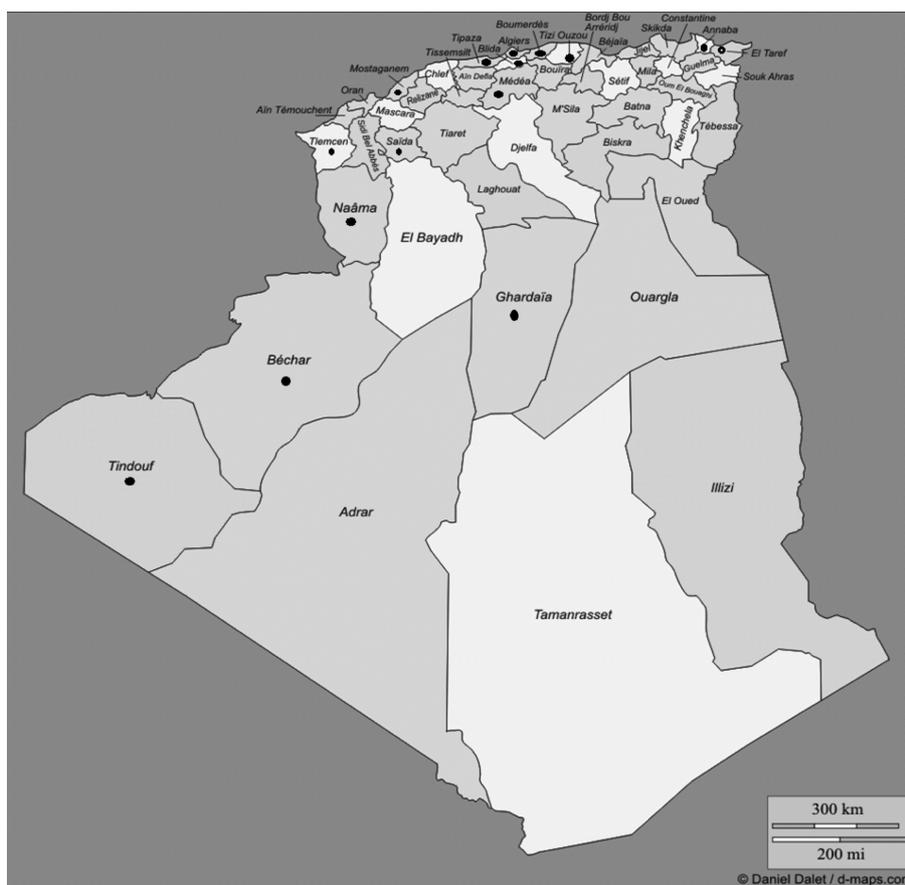


Figure 1

Trapping locations of mosquitoes in Algeria.
Lieux de capture et de collecte des moustiques en Algérie.

Inventory of mosquitoes in Algeria

affecting both humans and animals, such as *Plasmodium*, lymphatic filariasis, West Nile Virus and other arboviruses (DHADIALLA & RAIKHEL, 1994; RAIKHEL & LEA, 1991). For these reasons, regular campaigns are undertaken with the aims of controlling these diseases, as well as to reduce the nuisance caused by mosquitoes in urban and touristic centres. Recent studies have been carried out on the Culicidae of Algeria, especially concerning their systematics, biochemistry, morphometry, and the means of their chemical and biological control (BOUABIDA *et al.*, 2012; BOUDMAGH *et al.*, 2013). The objectives of the present work were to inventory the Culicidae of 15 departments of Algeria (Figure 1) and to compare the specimens obtained with previous faunal surveys in terms of the effects of climatic, demographic and global variations.

Materials and methods

Sampling method

Specimens collected from different departments were harvested at the larval and adult stages.

The study was carried out from September 2010 to June 2014. Mosquito larvae were collected using the "Dipping" technique. This method consists of dipping a ladle in several places of water. For animal shelter, we used a bucket with a capacity of 5 litres and a rope. The capture of adults was carried at animal shelters (cows, goats, sheep, chickens, equids and rabbits) and inside human habitations. In each household a single CDC light trap (John W. Hock Company, Gainesville, FL, USA) was installed and run for over 12 hours (6:00 PM – 8:00 AM) to capture mosquitoes.

Mounting and identification of specimens

The mosquitoes were returned to the laboratory, where larvae were cleared in 5% NaOH (for 3 days), rinsed with distilled water (3 baths for 2 to 5 minutes), and mounted between a slide and a cover slip in a drop of glycerine. Larvae and adult mosquitoes were identified using the morphological keys of BRUNHES *et al.* (1999).

Inventory

In total, 1394 adult mosquitoes and 3196 larvae were trapped in 15 departments in Algeria (Table 1). These species belong to two subfamilies: Culicinae and Anophelinae. Their identification revealed the presence of seven genera, *Uranotaenia*, *Aedimorphus*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Culex*, *Culiseta* and *Anopheles*, with 17 species: *Aedes albopictus* Skuse, 1894, *Aedimorphus vexans* Meigen, 1830, *Anopheles labranchiae* Falleroni, 1926, *An. multicolor* Cambouliu, 1902, *Culex deserticola* Kirkpalrick, 1924, *Cx. hortensis* Ficalbi, 1889, *Cx. pipiens* Linnaeus, 1758, *Cx. territans* Walker, 1856, *Cx. theileri* Theobald, 1903, *Culiseta litorea* (Shute, 1928), *C. longiareolata* Macquart, 1838, *Ochlerotatus coluzzii* Rioux,

Bulletin de la Société zoologique de France 139 (1-4)

Table 1

List of Culicidae captured in 15 departments of Algeria.
Liste des Culicidae capturés dans 15 départements d'Algérie.

Season	Number of individuals		Sites (North / South / West / East)
	Larvae	Adults	
<i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> Skuse, 1894	-	2	Tizi-Ouzou (N)
<i>Aedimorphus vexans</i> Meigen, 1830	13	-	Ghardaïa (S)
<i>Anopheles (Anopheles) labranchiae</i> Falleroni, 1926	35	174	Blida, Tizi-Ouzou (N)
<i>Anopheles (Cellia) multicolor</i> Cambouliu, 1902	137	102	Tamanrasset, Ghardaïa, Tindouf (S) - Naama, Tlemcen (W)
<i>Culex (Culex) pipiens</i> Linné, 1758	1365	823	El Tarf, Annaba (E) - Saida, Mostaganem, Tlemcen (W) - Algiers, Blida, Tipaza, Médéa, Tizi-Ouzou (N)
<i>Culex (Culex) theileri</i> Theobald, 1903	34	-	Algiers (N)
<i>Culex (Maillotia) deserticola</i> Kirkpalrick, 1924	29	-	Algiers, Blida (N)
<i>Culex (Maillotia) hortensis</i> Ficalbi, 1889	57	-	Algiers, Blida (N) - Tindouf (S)
<i>Culex (Neoculex) territans</i> Walker, 1856	3	-	Tizi-Ouzou (N)
<i>Culiseta (Allotheobaldia) longiareolata</i> Macquart, 1838	1250	271	El Tarf, Annaba (E) - Saida, Mostaganem, Tlemcen, Bechar (W) - Algiers, Blida, Tipaza, Médéa, Tizi-Ouzou (N) - Tindouf (S)
<i>Culiseta (Culicella) litorea</i> Shute, 1928	60	20	Algiers (N)
<i>Ochlerotatus flavescens</i> Muller, 1764	41	-	Tipaza (N)
<i>Ochlerotatus (Finlaya) geniculatus</i> Olivier, 1791	64	-	Boumerdes (N)
<i>Ochlerotatus coluzzii</i> Rioux, Guilvard & Pasteur, 1998	21	-	Tipaza (N)
<i>Ochlerotatus detritus</i> Halyday, 1833	68	-	Tipaza (N)
<i>Ochlerotatus dorsalis</i> Meigen, 1830	19	-	Ghardaïa (S)
<i>Uranotaenia unguiculata</i> Edwards 1913	-	2	Algiers, Blida (N)

Guilvard & Pasteur, 1998, *O. detritus* Haliday, 1833, *O. dorsalis* Meigen, 1830, *O. flavescens* Muller, 1764, *O. geniculatus* Olivier, 1791 and *Uranotaenia unguiculata* Edwards, 1913. *Culex pipiens* and *Culiseta longiareolata* were the most dominant species. In the urban sites, the total richness was high, with 8 species. The rural sites also mark an important total richness, with 6 species. In contrast, only 3 species were observed in salt marsh sites. We note the first record of *Cx. territans* in Algeria, at an altitude of 1750 m. We note also the second record in Algeria (and the Maghreb) of *Ae. albopictus*, which was found at Illoula Oumalou (Tizi Ouzou), 48 Km from its first capture at Larabaa Nath Irathen (IZRI *et al.*, 2011), situated in the same department.

Inventory of mosquitoes in Algeria

Discussion

Results from the present study, combined with information from the literature on the culicid fauna of Algeria, highlight a number of points that deserve further attention. As usual in entomological field surveys, providing final species names for certain mosquitoes is a challenge, particularly for females from which cuticular scales and setae have been abraded in traps. Based on more than thirty years of fieldwork, SENEVET & ANDARELLI (1960) identified 27 species of Culicidae in Algiers, belonging to the subfamilies Anophelinae and Culicinae. This diversity is explained by the climate and the diversity of natural and urban habitats available for the development of Culicidae. In the region of Constantine, BERCHI (2000) noted the presence of seven species belonging to the subfamilies Anophelinae and Culicinae: *Cx. pipiens*, *Cx. mimeticus*, *Cx. theileri*, *Cx. hortensis*, *C. longiareolata*, *An. labranchiae* and *U. unguiculata*. According to HASSAINE (2002), the Culicid fauna of Mediterranean Africa consists of 67 species, belonging to two subfamilies and seven genera. In the western region of Algeria (Tlemcen), 20 species of Culicidae are recorded. This relatively high number of species can be explained by the large number of samples taken in this area, as well as the long period of sampling that lasted two years. According to FAURE *et al.* (1980), the number of species inventoried is in accordance with the number of individuals collected. In the Mila region, MESSAI *et al.* (2010) noted the presence of 12 species of Culicidae belonging to two subfamilies: *Cx. pipiens*, *Cx. modestus*, *Cx. theileri*, *Cx. hortensis*, *Cx. antennatus*, *Cx. laticinctus*, *Cx. deserticola*, *Cx. sp.*, *C. longiareolata*, *An. labranchiae*, *An. pharoensis* and *U. unguiculata*. From the results obtained in our study (Table 1), the genus *Culex* is the most abundant, it is represented by five species, with *Cx. pipiens* as the most frequent species. The second position is occupied by the genus *Culiseta*, with *C. longiareolata* being the most abundant and most frequently collected species at the different houses surveyed. The genus *Culex* was represented by 5 species: *Cx. pipiens*, *Cx. theileri*, *Cx. deserticola*, *Cx. territans* and *Cx. hortensis* of which *Cx. pipiens* was the most abundant, with 1365 larvae and 823 adults, captured both in urban and rural sites, due to its high ecological elasticity and ability to colonize different environments. This species is typically characterized as urban, being very common in towns. These results are consistent with many recent studies. In the region of Mila, MESSAI *et al.* (2011) noted the presence of 12 species, eight of these belonging to the genus *Culex* (*Cx. pipiens*, *Cx. modestus*, *Cx. antennatus*, *Cx. hortensis*, *Cx. deserticola*, *Cx. theileri*, *Cx. laticinctus* and *Culex* sp.). In the region of Biskra, MERABTI & OUAKID (2008) recorded 22 species, six of which belonging to *Culex* (*Cx. hortensis*, *Cx. pipiens*, *Cx. modestus*, *Cx. theileri*, *Cx. laticinctus* and *Cx. torentium*). In the region of Tebessa, BOUABIDA *et al.* (2012) recorded nine species, including five of *Culex* (*Cx. pipiens*, *Cx. theileri*, *Cx. hortensis*, *Cx. perexiguus* and *Cx. laticinctus*). A recent study confirms that *Cx. pipiens* from the Maghreb is an efficient experimental vector for the transmission of West Nile Virus and Rift Valley Fever Virus (AMRAOUI *et al.*, 2012).

Bulletin de la Société zoologique de France 139 (1-4)

Aedes albopictus is a recent invasive species in the Mediterranean region (ADHAMI *et al.*, 1998) and is known to have the potential for vertical transmission of viruses from the infected female to their eggs, confirmed for *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti* and *Culex* (BAQAR *et al.*, 1993). Amazingly, in the last two decades, *Ae. albopictus* has attained an almost global distribution, presently being found in the United States, Central and South America, Africa, Europe and the Middle East. Several factors contributed to the rapid spread of this mosquito species, among the most important of which are the resistance of its desiccated, dormant eggs and their efficient passive transport around the world, often in used tires (TATEM *et al.*, 2006). The ability of *Aedes albopictus* to serve as a vector for transmitting disease has been experimentally demonstrated for 26 arboviruses (GRATZ, 2004). It should be noted that we captured two females of this dreadful mosquito in the same department as that of the first capture in Algeria and the Maghreb was made (IZRI *et al.*, 2011).

Conclusions

This study, which is a complement to other mosquito surveys performed, adds to our knowledge of the distribution in Algeria of medically important species. Among the 17 species of Culicidae found, most are potential or proven vectors of pathogens that cause diseases in humans and domestic animals in various areas of the world. The results obtained should be useful for developing a control program to direct operations and to assess its efficiency. Future studies should address the possible relations between richness and diversity of populations of disease vectors and the risk of human infection.

Acknowledgements

This study was partially supported by the French Research Agency (ANR) through the PHLEBOMED, JEAI (Jeune Équipe Associée à IRD). The authors acknowledge the staff of Pasteur Institute of Algeria (Écologie des Systèmes Vectoriels), the staff of HURBAL company, Mr BACHIRI (Reserve Nationale de Reghaia), Prof Djamel YALA (Service de Tuberculoses) on Pasteur Institute of Algeria and Dr Aicha Beya MAMMERIA (El Tarf University) for helpful advice.

RÉFÉRENCES

- ADHAMI, J. & REITER, P. (1998).- Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J. Amer. Mosquito Control Assoc.*, **14**, 340-343.
- AMRAOUI, F., KRIDA, G., BOUATTOUR, A., RHIM, A., DAABOUB, J., HARRAT, Z., BOUBIDI, S.-C., TIJANE, M., SARIH, M. & FAILLOUX, A.-B. (2012).- *Culex pipiens*, an experimental efficient vector of West Nile and Rift Valley Fever Viruses in the Maghreb region. *PLoS ONE* **7** (5), e36757. doi:10.1371/journal.pone.0036757.
- BAQAR, S., HAYES, C.G., MURPHY, J.R. & WATTS, D.M. (1993).- Vertical transmission of West Nile virus by *Culex* and *Aedes* species mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **48** (6), 757-762.

Inventory of mosquitoes in Algeria

- BERCHI, S. (2000). *Bioécologie de Culex pipiens L. (Diptera: Culicidae) dans la région de Constantine et perspectives de luttés*. Thèse de Doctorat es Sciences. Université de Constantine, Algérie, 133 p.
- BOUABIDA, H., DJEBBAR, F. & SOLTANI, N. (2012).- Étude systématique et écologique des Moustiques (Diptera: Culicidae) dans la région de Tébessa (Algérie). *Entomology fauna - Faunistic Entomology*, **65**, 99-103.
- BOUDMAGH, N., BENDALI-SAOUDI, F. & SOLTANI, N. (2013).- Inventory of Culicidae (Diptera: Nematocera) in the region of Collo (North-East Algeria). *Ann. Biol. Res.*, **4** (2), 94-99.
- BRUNHES, J., RHAIM, A., GEOFFROY, B., ANGEL, G. & HERVY, J.P. (1999).- *The Culicidae of Mediterranean Africa*. Institute of Software Research and Development in Montpellier.
- DHADIALLA, T.S. & RAIKHEL, A.S. (1994).- Endocrinology of mosquito vitellogenesis. In Davey, K.G., Peter, R.E., Tobe S.S. (eds.), *Perspectives in Comparative Endocrinology*. Nat. Res. Council of Canada, Ottawa, pp. 275-281.
- FAURIE, C., FERRA, C. & MEDORI, P. (1980).- *Écologie*. Baillière J.B. (ed.), Paris, 1091 p.
- GRATZ, N.G. (2004).- Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*, *Med. Vet. Entomol.*, 215e 227.
- HASSAINE, K. (2002).- *Bioécologie et biotypologie des Culicidae (Diptera: Nematocera) de l'Afrique méditerranéenne. Biologie des espèces les plus vulnérantes (Ae. caspius, Ae. detritus, Ae. maria et Cx. pipiens) dans la région occidentale algérienne*. Thèse de doctorat es Sciences, Université de Tlemcen, 191 p.
- IZRI, A., BITAM, I. & CHARREL, R.N. (2011).- First entomological documentation of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) in Algeria. *Clin. Microbiol. Infect.*, **17** (7), 1116-1118.
- MACKENZIE, J.S., GUBLER, D.J. & PETERSEN, L.R. (2004).- Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and Dengue viruses. *Nature Med.*, **10** (12), S98-S109.
- MERABTI, B. & OUAkid, M.L. (2011).- Contribution to the study of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the oasis of the region of Biskra (North-East of Algeria). *Proceedings of the International Seminar on faunal biodiversity in arid and semi-arid areas*.
- MESSAI, N., BERCHI, S., BOULKNAFD, F. & LOUADI, K. (2010).- Inventaire systématique et diversité biologique des Culicidae (Diptera: Nematocera) dans la région de Mila (Algérie). *Entomologie faunistique – Faunistic Entomology*, **63** (3), 203-206.
- RAIKHEL, A.S. & LEA, A.O. (1991).- Control of follicular epithelium development and vitelline envelope formation in the mosquito. Role of juvenile hormone and 20- hydroxyecdysone. *Tissue Cell*, **23**, 577-591.
- SENEVET, G. & ANDARELLI, L. (1956).- *Anopheles of North Africa and the Mediterranean Basin*. Entomological Encyclopedia, P. Lechevalier Éditions, Paris, XXXIII, 280 p.
- TATEM, A.J, HAY, S.I. & ROGERS, D.J. (2006).- Global traffic and disease vector dispersal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 6242-6247.

(reçu le 13/08/2014 ; accepté le 11/11/2014)