

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Badji Mokhtar -Annaba-

Faculté des Sciences

Département de Biologie

Laboratoire d'écologie des systèmes terrestres et aquatiques

Institut Pasteur D'Algérie



**Bio-écologie, position taxonomique et compétence vectorielle du complexe *Culex pipiens* (Diptera ; Culicidae) responsable de la transmission du virus West Nile et du virus de la Fièvre de la Vallée du Rift en Algérie**

Travail de fin d'étude

Année académique 2011-2012

**Présenter par** Mlle. ALAYAT Moufida Saoucen

**Encadreur :** Mme. BOUSLAMA Zihad

**Co-Encadreur :** Mr. BOUBIDI Saïd Chawki

Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme des études supérieures Magistère (Ecole doctorale)

**FILIERE : BIOLOGIE ENVIRONNEMENTALE OPTION : BIOLOGIE ET ECOLOGIE ANIMALE.**

*®Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur, l'autorité académique de l'Université Badji Mokhtar -Annaba-, Le Laboratoire d'Ecologie Des Systèmes Terrestres & Aquatiques et l'Institut Pasteur d'Algérie.*

*Le présent document n'engage que son auteur.*

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Badji Mokhtar -Annaba-

Faculté des Sciences

Département de Biologie

Laboratoire d'écologie des systèmes terrestres et aquatiques

Institut Pasteur D'Algérie.



## MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magistère (Ecole doctorale)

FILIERE : BIOLOGIE ENVIRONNEMENTALE

OPTION : BIOLOGIE ET ECOLOGIE ANIMALE

### Thème

**Bio-écologie, position taxonomique et compétence vectorielle du complexe  
*Culex pipiens* (Diptera ; Culicidae) responsable de la transmission du virus  
West Nile et du virus de la Fièvre de la Vallée du Rift en Algérie**

**Présenté par :**

Mlle. ALAYAT Moufida Saoucen

**Soutenu publiquement le 30/04/2012, devant le jury :**

<b>Président :</b>	Mme. DAAS Ouided	Professeur	Université -Annaba-
<b>Encadreur :</b>	Mme. BOUSLAMA Zihad	Professeur	Université -Annaba-
<b>Co-Encadreur :</b>	Mr. BOUBIDI Saïd Chawki	Assistant de recherche	Institut Pasteur d'Algérie
<b>Examineurs :</b>	Mr. BAIRI Abdelmadjid	Professeur	Université -Annaba-
	Mme. BENDALI Fatiha	Maître de Conférences	Université -Annaba-

2011/2012

# Remerciements

*Au terme de ce travail, je remercie Dieu Tout Puissant de m'avoir aidé à accomplir ce travail et de m'avoir guidé vers ce chemin du savoir et de la science et d'avoir mis à ma disposition ces personnes que je tiens à remercier :*

*Ce travail a été Encadrée par le Professeur Bouzlama Zihad, Directrice du laboratoire EcoSTAg, que je remercie sincèrement pour m'avoir offert des conditions de travail idéales, tant sur le plan matériel et logistique que managérial. De plus, sa disponibilité, son enthousiasme et sa curiosité scientifique sans limite ont beaucoup contribué à la réalisation de ce travail.*

*Mes vifs remerciements vont à Mr. Harrat Zoubir Maître de recherche et chef du service Eco-épidémiologie Parasitaire & Génétique des Populations à l'institut Pasteur d'Algérie, de m'avoir accueilli au sein de son service et dans le laboratoire d'entomologie médicale.*

*Je dois un remerciement particulier à Mr. Boubidi Saïd Chawki, pour m'avoir offert mon sujet de mémoire, mes stages à l'institut pasteur d'Algérie et pour m'avoir Co-encadré, mais aussi pour ses observations intéressantes, pour avoir accepté de corriger ce travail, surtout d'avoir été disponible à chacune de mes sollicitations et les nombreux déplacements sur le terrain nécessaires à l'échantillonnage de divers gîtes larvaires. Merci beaucoup pour Votre excellente direction et Votre générosité.*

*Mme. DAAS Ouided, Professeur à l'université Badji Mokhtar Annaba, c'est pour moi un honneur de vous voir en tant que président de ce jury. Je vous prie d'accepter mes plus sincères remerciements pour avoir accepté de présider et de juger ce travail.*

*Mes sincères remerciements s'adressent également au Pr. BAIRI Abdelmadjid et Dr. BENDALI SAOUDI Fatima, pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.*

*Je remercie Mr. AMARA KORBA Raouf pour son implication dans ce travail. Son intérêt et sa disponibilité ont permis de mener à bien cette étude.*

*Je voudrais témoigner ma reconnaissance à tout le personnel du Service d'Eco-Epidémiologie Parasitaire de l'institut Pasteur d'Algérie dont l'accueil chaleureux lors de mon stage pratique, l'ambiance cordiale et surtout le sens des relations humaines m'ont toujours marqué. Particulièrement Mr. BOUIBA Lazhar pour avoir assuré le bon déroulement de la biologie moléculaire, Mr. GHARNI Rafik et Mr. BENALLAL Kamel.*

*Que mes amis et collègues de l'école doctorale trouvent ici l'expression de ma sincère gratitude.*

*Les travaux présentés dans ce document ont été menés au laboratoire d'entomologie médicale (LEM), de l'Institut Pasteur D'Algérie (IPA). Ils ont été soutenus financièrement par le (RIIP) « Réseau International Des Institut Pasteur » par le projet de recherche « (ACIP) Actions concertées Inter-Pasteuriennes A-8 2009 ».*

*ALAYAT Moufida Saoucen*





# Résumés

# RÉSUMÉ

Le West-Nile (WN) et la Fièvre de la Vallée du Rift (FVR) sont deux arboviroses émergentes ayant un pouvoir de propagation très inquiétant. Le complexe *Culex pipiens* englobe les vecteurs principaux de ces deux arbovirus. Ce complexe comprend deux espèces morphologiquement identiques : *Cx. pipiens pipiens* et *Cx. pipiens molestus*. Leur distinction se base essentiellement sur le typage moléculaire par PCR et par l'étude de leurs bio-écologie. Pour mieux appréhender le rôle des différents membres de ce complexe dans la transmission des arbovirus WN et FVR, trois zones ont été étudiées : El Kala, M'Sila et Tinerkouk (Adrar). L'analyse a portée sur : (I) l'écologie et biologie des espèces, (II) leurs positions taxonomique et (III) leurs compétence vectorielle.

Nos résultats prouvent pour la première fois la présence de la forme hybride issu du croisement des formes *pipiens/molestus* et que les trois formes du complexe *Cx. pipiens* coexiste en Algérie et qu'ils affectionnent des gîtes très variés et peuvent cohabiter ensemble sans aucun problème.

L'analyse des repas de sang des femelles récoltées montre le caractère opportuniste des moustiques du complexe *Cx. pipiens*. Le fait que ces moustiques aient un large spectre d'hôtes explique la circulation du FVR et du WNV sur de nombreuses espèces animales dont l'homme.

Nos infections expérimentales montrent une forte compétence des femelles *Cx. pipiens* vis-à-vis du virus WN (taux de transmission 84%) et une compétence plus modéré pour le virus FRV (50%), ce qui positionne l'Algérie parmi les pays à risque et justifie un système de surveillance concernant ces deux arboviroses. Ces résultats nous ont permis (i) de définir la position taxonomique des espèces du complexe *Cx. pipiens* présents en Algérie et (ii) de fournir un indicateur prédictif de la transmission des virus WN et FVR.

Mot clé : Bio-écologie. *Culex pipiens*. Biologie moléculaire. Algérie. Arbovirus. Transmission. Compétence vectorielle.

# ABSTRACT

The West Nile (WN) fever and Rift Valley fever (RVF) are two emerging arbovirus having a capacity of spread very disturbing. The *Culex pipiens* complex includes the main vectors of this arbovirus. This complex consists of two morphologically identical species: *Cx. pipiens pipiens* and *Cx. pipiens molestus*. Their distinction is based primarily on molecular typing by PCR and studying their bio-ecology. To better understand the role of different members of this complex in the transmission of arbovirus WN and FVR, three areas were studied: El Kala (El-Taref), and M'Sila Tinerkouk (Adrar). The analysis focused on: (I) the ecology and biology of species, (II) and their taxonomic position (III) their vector competence.

Our results demonstrate for the first time the presence of the hybrid form of mixed forms *pipiens* / *molestus* and that the three forms of the complex *Cx. pipiens* coexists in Algeria and they love the lodgings very varied and can live together without any problems.

Analysis of blood meals of females collected shows the opportunistic nature of the complex of mosquitoes of *Cx. pipiens*. The fact that these mosquitoes have a wide host range explains the circulation of RVF and WNV in many animal species including humans.

Our experimental infections show a strong competence of female *Cx. pipiens* for the WN virus (transmission rate 84%) and a more moderate competence for the virus (RVF) (50%), which positions Algeria among countries at risk and justifies a surveillance system for these two arbovirus. These results allowed us (i) to define the taxonomic position of species of the *Cx. pipiens* present in Algeria and (ii) to provide a predictor of the transmission of WN virus and RVF.

Key words : Bio-ecology. *Culex pipiens*. Molecular biology. Algeria. Arbovirus. Transmission. Vector competence.

## ملخص

يعتبر البعوض من أولى الحشرات الناقلة للأمراض للإنسان و الحيوان في جميع أنحاء العالم، قدرتهم على الحركة و مرونتهم و وفرتهم جعلتهم مصدر قلق بالنسبة للقطاع الصحي و من ثم فهم لديهم أهمية كبيرة من الناحية الطبية و البيطرية. من بين هذه المجموعة نجد المركب *Culex pipiens* الذي يفتح إمكانية خاصة و هامة للدراسة في مجالي البحث : من الناحية البيئية و البيولوجية، ففي شمال إفريقيا نجد أن هذا المركب يضم عدة أشكال مختلفة و متميزة وراثيا و لكنها متطابقة شكليا و هي ناقلة خاصة لفيروسى : فيروس حمى النيل و فيروس الوادي المتصدع.

نحن مهتمون في بحثنا هذا بالدراسة البيئية و الحيوية، الدراسة الوراثية و دراسة قدرة هذه الأنواع من الحشرات على نقل هذه الفيروسات تحت شروط المخبر في بلادنا من اجل تحديد مختلف الأشكال المكونة لهذا المركب و معرفة الثنائيات (ناقل، فيروس) الأكثر قدرة على نقل العدوى و لذلك قمنا بـ :

- تحديد البيانات الفيزيائية و الكيميائية الخاصة بالوسط المائي الذي تعيش فيه هذه الحشرات و مدى تأثيرها على كثافة اليرقات.
- تحديد معدلات قدرة التبويض من عدمها لدى الإناث قبل تناول الوجبة الدموية.
- معدلات التلقيح، معدلات الخصوبة، تحديد طريقة التكاثر.
- تحليل وجبات الدم التي تم أخذها من قبل الإناث.
- تحديد الموضع التصنيفي عن طريق تتبع الجينات.
- و أخيرا تتبع مدى قدرة هذه الحشرات على نقل الفيروسين المذكورين أعلاه و ذلك ضمن شروط المخبر.

النتائج المتحصل عليها أظهرت ما يلي :

الأوساط الغنية بالمواد العضوية هي تلك المواقع الحضرية، كما نجد أن الأوساط الأكثر إنتاجية هي المواقع المحيطة بالمدينة نتيجة معدلها العضوي المرتفع و من جهة أخرى رأينا ان معدل الوجبة الدموية يرفع من معدل تلقيح الإناث و لكن دون تأثير على خصوبتهم.

تحليل وجبة الدم المتناولة من طرف الإناث يبين أن هذه الأخيرة تتغذى على العائل الموجود في محيطها فهي تأخذ وجبتها الدموية من الإنسان في المدينة و من الحيوانات في طرف المدينة و في الريف.

أما دراسة تتبع الجينات لمعرفة الموضع التصنيفي أظهرت عدم وجود اختلاف بين الشكلين (*molestus, pipiens*) المكونين لهذا المركب في بلادنا مهما اختلفت الأوساط التي تعيش فيها سواء كانت مغلقة أو مفتوحة في المدينة أو قربها أو في الريف و وجود لأول مرة في الجزائر تحت نوع *Cx. molestus* و كذلك الأشكال الهجينة الناتجة عن تزاوج الشكلين (*molestus, pipiens*) و ذلك في كل المواقع.

و أخيرا أظهرت العدوى التجريبية لهذه الحشرات بواسطة الفيروسين أن هذه الحشرات لها قدرة كبيرة على نشر و نقل فيروس حمى النيل و من جهة أخرى فهي لها قدرة معتدلة على نقل فيروس حمى الوادي المتصدع.

هذه النتائج تسمح لنا بوضع التصنيف الذي تتميز به أنواع هذا المركب في بلادنا كما تزودنا ببيان جازم عن نقل فيروسى حمى النيل و حمى الوادي المتصدع في الجزائر.

**الكلمات المفتاحية :** *Culex pipiens*، الجزائر، فيروس حمى النيل، فيروس حمى الوادي المتصدع، البيئة الحيوية، التصنيف، قدرة النقل،

ELISA, PCR ، طبقات المناخ الحيوية .

<b>Introduction</b> .....	01
<b>2. Matériel et Méthodes</b> .....	05
2.1 Présentation des zones d'étude.....	05
2.1.1 Parc National d'El-Kala (P.N.E.K).....	05
2.1.2 Wilaya de M'Sila.....	06
2.1.3 Tinerkouk, (wilaya d'Adrar).....	06
2.2 Stations d'étude.....	07
2.2.1 Choix des stations.....	07
2.2.2 Description des stations.....	07
2.3 Présentation du matériel biologique.....	08
2.3.1 Position systématique.....	08
2.3.2 Morphologie.....	09
2.3.2.1 L'adulte (Imago).....	10
2.3.2.1.1 Tête.....	11
2.3.2.1.2 Thorax.....	12
2.3.2.1.3 Abdomen.....	12
2.3.2.2 Les œufs.....	13
2.3.2.3 La larve.....	14
2.3.2.3.1 Tête.....	14
2.3.2.3.2 Thorax.....	15
2.3.2.3.3 Abdomen.....	16
2.3.2.4 La nymphe.....	18
2.3.3 Bio-écologie et Ethologie des larves.....	18
2.3.3.1 Gîtes larvaires et influence de leurs composantes sur le développement des larves.....	19
2.3.3.2 Nourriture et respiration des larves.....	20
2.3.4 Bio-écologie et Ethologie des adultes.....	21
2.3.4.1 Emergence et accouplement.....	21
2.3.4.2 Alimentation.....	21

2.3.4.3. Dispersion et recherche d'hôte.....	22
2.3.4.4 Hibernation et longévité.....	23
2.3.5 Différences comportementales et physiologiques entre les forme <i>pipiens</i> et <i>molestus</i> ...	23
2.3.6 Intérêt Médical.....	24
2.3.6.1 La fièvre West Nile.....	24
2.3.6.2 La fièvre de la Vallée du Rift.....	25
2.3.6.3 Cycle du virus chez le moustique.....	27
2.4 Echantillonnage des populations de <i>Culex pipiens</i> .....	28
2.4.1 Estimation de la densité larvaire.....	29
2.4.2 La capture des femelles gorgées.....	29
2.5 Méthodes de laboratoire adoptées.....	29
2.5.1 Description de l'insectarium.....	29
2.5.2 Tri des larves.....	30
2.5.4 Mise en élevage.....	30
2.5.5 Mise en couple.....	30
2.5.6 Gorgement des femelles.....	30
2.5.7 Comptage des pontes .....	31
2.5.8 Comptage des larves néonates.....	31
2.5.9 Préférence trophique.....	31
2.5.9.1 Rappel sur le test ELISA .....	32
2.5.9.2 Déroulement du test ELISA.....	32
2.5.10 Position taxonomique.....	33
2.5.10.1 Rappel sur l'ADN et la PCR.....	33
2.5.10.2 Déroulement de la PCR.....	34
2.5.11 La compétence vectorielle.....	34
2.5.11.1 Infection des tissus du moustique.....	35
2.5.11.2 Estimation de la compétence vectorielle.....	36
2.5.11.3 Une espèce étalon.....	36
2.5.11.4 Infections expérimentales des candidats vecteurs.....	37
2.5.11.4.1 Les infections expérimentales.....	37
2.5.11.4.1.a Les souches virales.....	37
2.5.11.4.1.b Le repas sanguin infectieux.....	37
2.5.11.4.2 La salivation forcée.....	38

2.5.11.4.3 L'immunofluorescence indirecte.....	38
2.6 Analyse statistiques des résultats.....	38
2.6.1 Le test U de Mann Whitney.....	38
2.6.2 L'Anova de Kruskal Wallis.....	38
2.6.3 Le test exact de Fisher.....	39
<b>3. Résultats.....</b>	<b>40</b>
3.1. Ecologie, biologie de la reproduction et préférences trophique.....	40
3.1.1 L'influence des paramètres physico-chimiques et la DBO5 m/l sur la densité larvaire..	40
3.1.2 Autogenèse / Anautogenèse.....	41
3.1.3 Fécondité.....	44
3.1.4 Fertilité.....	44
3.1.5 Mode d'accouplement (sténogamie/eurygamie).....	45
3.1.6 Préférences trophique.....	47
3.1.6.1 Fluctuations spatiales des préférences trophiques.....	49
3.2 Position taxonomique.....	50
3.3 La compétence vectorielle.....	53
3.3.1 Infection par le Virus West Nile.....	53
3.3.1.1 Tinerkouk gîte hypogé urbain.....	54
3.3.1.2 M'Sila, gîte hypogé urbain (Chellal).....	54
3.3.1.3 M'Sila, gîte épigé péri-urbain (Oued El-Ksob).....	55
3.3.1.4 M'Sila, gîte épigé rural (Bechelga).....	55
3.3.2 Infection par le Virus de la Fièvre de la Vallée Du Rift.....	56
3.3.2.1 Tinerkouk, gîte hypogé urbain.....	57
3.3.2.2 M'Sila (Chellal), gîte hypogé urbain.....	58
3.3.2.3 M'Sila (Oued El-Ksob), gîte épigé périurbain.....	58
3.3.2.4 M'Sila (Bechelga), gîte épigé rural.....	58
<b>4. Discussion.....</b>	<b>60</b>
4.1 Ecologie, biologie de la reproduction.....	60
4.2 Préférences trophique.....	61

4.3 Position taxonomique.....	62
4.4 Compétence vectorielle.....	64

<b>Conclusion.....</b>	<b>67</b>
------------------------	-----------

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

## Table des figures

Figure	Titre de la figure	Page
01	Localisation des zones d'études.....	05
02	Position systématique du complexe <i>Culex pipiens</i> (in Amara Korba, 2010).....	09
03	Photo d'une femelle de <i>Cx. pipiens</i> lors d'un repas de sang (In Balenghien, 2007).....	10
04	Morphologie schématique de la tête de <i>Culicinae</i> (vue de profil) a) Femelle, b) Mâle (Wood et al., 1979).....	11
05	Morphologie schématique du thorax chez les <i>Culicidae</i> , indiquant l'emplacement des principaux groupes de soies utilisés en taxonomie (Becker et al., 2003, dont la légende a été complétée).....	12
06	Aspect général du génitalia mâle d'un <i>Culicidae</i> ( <i>Culex pipiens</i> L.).....	13
07	Œufs en Nacelle de <i>Culex pipiens</i> (Cliché Amara Korba, 2010).....	14
08	Larve de <i>Cx. pipiens</i> (In Brunhes et al., 1999).....	14
09	Morphologie externe de la tête de la larve des <i>Culicidae</i> (in Boukraa S., 2010).....	15
10	Chetotaxie de la face dorsale du thorax et de l'abdomen des larves a : <i>Culicinae</i> ; b : <i>Anophelinae</i> (Becker et al., 2003).....	16
11	Soies du siphon et des segments VIII et X d'une larve de <i>Culicinae</i> (Becker et al., 2003, avec légende complétée).....	27
12	Nymphe de <i>Cx. pipiens</i> (In Balenghien, 2007).....	18
13	Cycle du virus chez le moustique (In RID-IP, 2005).....	27
14	Relation entre la densité larvaire et la DBO5.....	41
15	Pourcentage (Autogénèse/Anautogénèse) 20 Couple sang – (El-Kala).....	42
16	Pourcentage (Autogénèse/Anautogénèse), 20 Couple sang – (Les trois gîtes hypogés Urbain des 3 wilayas).....	43
17	Moyenne du nombre d'œufs pondus par toutes les femelles sang – et sang +.....	44
18	Pourcentage de fertilité des femelles en fonction de la présence/absence de sang.....	45
19	Pourcentage de sténogamie/eurygamie des 40 couple (sang + et sang -) El-Kala.....	46
20	Pourcentage de sténogamie/eurygamie des 40 couple (sang + et sang -) M'Sila.....	47
21	Pourcentage de sténogamie/eurygamie des 40 couple (sang + et sang -) Tinerkouk.....	47
22	Fluctuations spatiales des repas de sang prélevés chez des femelles de <i>Culex pipiens</i> collectées au repos dans 4 localités d'Algérie.....	49
23	Observation sous UV d'un gel d'électrophorèse après amplification par PCR ; P : <i>pipiens</i> ; M : <i>molestus</i> et PM : Hybrides.....	51
24	Résultats du Test PCR ; identification des membres du complexe <i>Culex pipiens</i> .....	52
25	Série WN - Graphe montrant le taux de dissémination (A), le taux de transmission (B) et le titre moyen des particules virales présentes dans la salive (C) au 14 <sup>ème</sup> après l'infection.....	55
26	Série FVR - Graphe montrant le taux de dissémination (A), le taux de transmission (B) et le titre moyen des particules virales présentes dans la salive (C) au 14 <sup>ème</sup> jour post-infection. (D, E, F) au 21 <sup>ème</sup> jour post-infection.....	57

## Table des tableaux

---

Tableau	Titre du tableau	Page
01	<i>Récapitulatif des stations d'étude.....</i>	07
02	<i>Estimation de la densité larvaire.....</i>	29
03	<i>Effets de la composition physico-chimique de l'eau des gites sur la densité larvaire.....</i>	41
04	<i>Origine des repas de sang prélevés chez des femelles de Culex pipiens collectées au repos dans des habitations humaines dans 4 localités d'Algérie.....</i>	48
05	<i>Identification moléculaire des populations de Cx. pipiens provenant d'El Kala de M'Sila et de Tinerkouk.....</i>	51
06	<i>Provenance des moustiques sélectionnés pour l'infection expérimentale.....</i>	53
07	<i>Taux d'infection disséminée, taux de salives positives et nombre moyen de particules virales par salive pour Culex pipiens, 14 jours après l'infection avec le virus West Nile.....</i>	54
08	<i>Taux d'infection disséminée, taux de salives positives et nombre moyen de particules virales par salive pour Culex pipiens, 14 et 21 jours après l'infection avec le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift.....</i>	56

*" Il n'est pas d'un homme raisonnable de blâmer par caprice l'étude des insectes, ni de s'en dégoûter par la considération des peines qu'elle donne. La nature ne renferme rien de bas. Tout y est sublime, tout y est digne d'admiration."*

*Aristote*



# Introduction

## INTRODUCTION

Les maladies à transmission vectorielle sont un des problèmes majeurs de santé publique à travers le monde. Transmise par les moustiques du genre Anophèles, 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 et Perez, 1985). Par ailleurs, l'O.M.S. (2007) signale 100 millions d'infections dues à la dengue par an (virus transmis par *Aedes albopictus*). De nombreuses autres maladies à virus (arboviroses) telles que la fièvre jaune, le chikungunya, fièvre de la vallée du Rift, la fièvre du Nil occidental (West Nile Virus) : sont également transmissent par des moustiques (O.M.S, 2007).

Le virus West-Nile (WN) et celui de la fièvre de la Vallée du Rift (FVR) sont deux agents d'arboviroses émergentes ayant un pouvoir de propagation très inquiétant vis-à-vis desquelles l'Algérie n'est pas épargné. En effet, Le virus West-Nile a été introduit en Algérie en 1994 à Tinerkouk, wilaya d'Adrar avec 50 cas confirmés et 8 décès (Leguenno et *al.*, 1996). Ce virus sévi en Afrique, en Asie, en Europe, au Moyen-Orient, en Australie et en Amérique du Nord depuis 1999 et plusieurs épidémies ont été décrites ces dernières années (Gubler et *al.*, 2007). Le virus WN est transmis essentiellement par des moustiques, du genre *Cx. pipiens*. Les hôtes principaux sont les oiseaux, mais il a été isolé chez plus de 30 autres espèces animales (mammifères, amphibiens, reptiles). Les humains, les chevaux (qui peuvent également développer une encéphalite) et d'autres mammifères constituent une impasse parasitaire, car ils ne développent pas suffisamment de virus dans leur sang pour infecter les moustiques.

Le virus de la fièvre de la vallée du Rift (FVR) est un arbovirus appartenant au genre Phlebovirus de la famille des Bunyaviridae. Transmis par de nombreuses variétés de moustiques, dont le complexe *Cx. pipiens*, le virus est la cause d'avortements et de mortalité surtout néonatale chez les ovins, les caprins et les bovins. Chez l'homme, la pathologie offre un large éventail clinique, depuis des formes asymptomatiques ou fébriles bénignes jusqu'à des formes compliquées de méningo-encéphalites, de rétinites, voire mortelles par syndrome hémorragique et hépatite aiguë (Durand et *al.*, 2002). Une frontière commune avec la Mauritanie où la FVR circule sous forme d'enzooties (Nabeth et *al.*, 2001) justifie la crainte d'une introduction du virus en Algérie.

Le complexe *Culex pipiens* Linné, 1758 englobe les vecteurs principaux de ces deux arbovirus. Parmi tous les membres du complexe *Cx. pipiens*, seul *Cx. pipiens* et *Cx. quinquefasciatus*, peuvent être différenciés sur le plan morphologique, au stade mâle adulte, grâce aux génitalia (phalosome) spécifiques de l'espèce (Brownie et al., 1997). Les autres membres du complexe ne peuvent pas être distingués morphologiquement. En effet, *Cx. pipiens* est représenté au Nord de l'Europe et aux Etats-Unis par les formes *pipiens* et *molestus* morphologiquement identiques (Tempelis, 1974). Ces deux sous espèces présentent de grandes différences comportementales et physiologiques. Donc des capacités vectorielles différentes. Les relations évolutives et le statut taxonomique de ces formes est encore mal connu (Gomes et al., 2009).

La détermination précise de ces deux formes se base essentiellement sur le typage moléculaire par PCR qui a fait son entrée en force en entomologie médicale. Pendant ces deux dernières décennies, plusieurs approches moléculaires, utilisant les marqueurs nucléaires (*internal transcribed spacer region*) ITS1 et ITS2 (Miller et al., 1996), le marqueur mitochondrial COII (Guillemaud et al., 1997), le gène de l'acétylcholinestérase *ace-2* (Smith et Fonseca 2004) et des microsatellites (Fonseca et al. 2004a, Smith et al. 2005, Bahnck et Fonseca 2006), ont été mises à profit pour distinguer les membres du complexe *C. pipiens*. Un gène mitochondrial qui code pour la première sous-unité du cytochrome oxydase (COI) serait également utilisé pour distinguer les formes *pipiens* et *molestus*. Néanmoins, l'analyse de sa région 3' a permis de distinguer aisément *Cx. pipiens* et *Cx. torrentium* et non *Cx.pipiens* et *Cx. molestus* (Viogradova et Shaikevich, 2005). Ces deux dernières formes peuvent, par contre, se distinguer sur la base du profil de restriction de la région 5' du gène COI : l'enzyme *HaeIII* permettrait de révéler un site de restriction GG/CC chez les formes *pipiens* qui serait absent chez les formes *molestus* (Shaikevich, 2007). La distinction entre les différentes formes de *Cx. pipiens* présentes dans notre région clarifiera l'implication de chacune d'elles dans une éventuelle transmission vectorielle des virus du WN et de la FVR en cas d'introduction.

La compétence vectorielle, est l'aptitude d'un insecte à être infecté par un pathogène, à assurer son développement et à le transmettre efficacement à un nouvel hôte sensible (Rodhain et Perez 1985, Weaver et al., 2004). Elle est évaluée en laboratoire. Elle varie d'une espèce à l'autre en fonction de divers facteurs, intrinsèques et extrinsèques : comme par exemple la température (Rodhain 1989, Dohm et al., 2002) ; d'autre part, un facteur

quantitatif important intervient, le seuil d'infectivité, dose virale en dessous de laquelle un vecteur, même compétent, ne s'infectera pas ; la durée de la vie d'un insecte et son immunité.

Le Maghreb, une région d'Afrique du Nord limitée par le bassin méditerranéen au nord et les régions sahariennes au sud, semble jouer le rôle de transition ou d'émergence pour ces deux arbovirus (le virus West-Nile et le virus de la fièvre de la Vallée du Rift), qui sont transmis par des moustiques appartenant au complexe *Culex pipiens*. Pour Comprendre la structure de ce complexe au Maghreb on vise à mieux définir ses membres et à identifier ceux qui sont les plus aptes à transmettre les virus WN et FVR et pour mieux appréhender le rôle des différentes espèces dans la transmission des arbovirus WN et FVR et de même, préciser le statut taxonomique du complexe *Cx. pipiens*, un projet ACIP A-8-2009 (Action Concertée Inter Pasteurienne) financé par le Réseau des Instituts Pasteur a été élaboré.

Trois sites ont été étudiés : l'Algérie, le Maroc et la Tunisie. La structure des populations de *Cx. pipiens* a été abordée en analysant : (1) l'écologie et biologie des espèces, (2) leurs positions taxonomique et (3) leur compétence vectorielle vis-à-vis des virus WN et FVR. Les résultats de cette étude nous permettront (I) de définir la position taxonomique des espèces du complexe *Cx. pipiens* présent en Afrique du Nord et (II) de fournir un indicateur prédictif de la transmission des virus WN et FVR. Ainsi, il sera possible d'identifier les couples virus/vecteur les plus performants. Cette mesure est essentielle pour prédire les risques épidémiologiques que représente l'introduction d'un arbovirus dans un environnement où les populations de moustiques locaux présentent une réceptivité à l'infection virale.

Un itinéraire transect Nord-Sud a été choisi afin d'avoir l'analyse la plus complète possible à propos de ce complexe en Algérie en visant trois étages bioclimatiques (Humide, semi-aride et Saharien).

La présente étude comprendra trois volets :

### 1. Ecologie et Biologie des moustiques du complexe *Cx. pipiens*

- Préciser les préférences écologiques des populations larvaires au niveau des gîtes : hypogé/épigé, urbain/périurbain/rural,
- Définir les préférences trophiques des adultes en déterminant l'origine du repas de sang des femelles gorgées capturées dans les différents sites.),
- Définir les caractéristiques biologiques liées à la reproduction des adultes : fécondité (nombre d'œufs pondus), fertilité (nombre de larves néonates), autogénie (capacité à pondre

sans repas sanguin)/anautogénie (un repas de sang est indispensable) des femelles et mode d'accouplement sténogamie (capacité à s'accoupler en cage)/eurygamie (nécessité d'un grand espace pour l'accouplement).

### 2. Positions taxonomique

- Préciser la position taxonomique des espèces du complexe *Cx. pipiens* à l'aide des outils moléculaires (PCR).

### 3. Compétence vectorielle

- Estimer la réceptivité à l'infection virale des populations de *Cx. pipiens* pour les virus WN et FVR.



**Matériel**

**&**

**Méthodes**

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Présentation des zones d'étude

Notre étude a portée sur trois zones biogéographiques et bioclimatiques différentes, selon un itinéraire transect Nord-Sud (Figure 01).

- 1) le Parc National d'El-Kala (wilaya d'El Tarf) qui est une zone humide.
- 2) la wilaya de M'Sila qui est une zone semi-aride à aride.
- 3) Tinerkouk (wilaya d'Adrar) qui est une zone saharienne.

Dans chaque zone nous avons choisi un itinéraire transect : un site urbain, un site péri-urbain et un site rural.

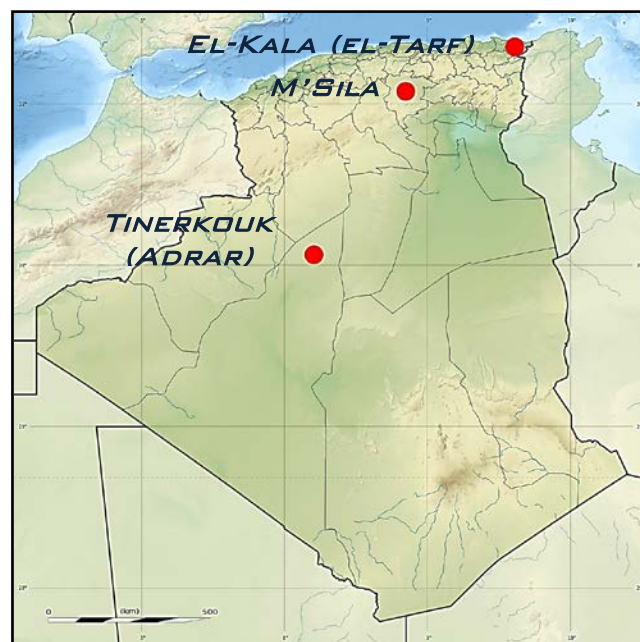


Figure 01 : Localisation des zones d'études (Source D-map.com)

#### 2.1.1 Parc National d'El-Kala (P.N.E.K)

Situé à l'extrême Nord-Est du pays (Élévation : 30 m ; latitude 36.89° Nord ; longitude : 08.43° Est) à 70 km à l'Est d'Annaba le (P.N.E.K) est inclus administrativement dans la Wilaya d'El-Tarf. D'une superficie de 292 km<sup>2</sup>, il est naturellement limité à l'Est par la frontière Allégro-tunisienne, au Nord par le littoral Méditerranéen, à l'Ouest par le système dunaire de Righia et enfin au Sud par les contreforts des monts de la Medjerda (Bouzeriba, 2001). Le climat est tempéré avec des températures moyennes maximales de 22,63°C et les minimales de 12,58°C. Le PNEK est l'une des zones les plus humides et pluvieuses du territoire national avec une moyenne annuelle en 2010 de l'humidité relative (HR) de 79,75%

et une pluviométrie annuelle de 962,8 mm (Agence nationale de Météorologie, 2010). Le P.N.E.K est l'un des plus grands parcs d'Algérie, caractérisé par de nombreux écosystèmes et une importante richesse biologique et paysagère (Benyacoub, 1993). Cette richesse a été bien mise en évidence par (Benyacoub et *al.*, 1998). En effet, on y compte au moins 37 espèces de Mammifères dont 7 rares, 214 espèces d'Oiseaux dont 75 hivernantes et 139 nicheuses. 17 espèces de Reptiles ont été recensées dont 6 peu abondantes et 2 rares. En ce qui concerne les Insectes, 40 espèces d'Odonates, 50 espèces de Syrphidés, 45 espèces de Carabidés et 31 espèces de Lépidoptères ont été jusqu'à ce jour identifiés (Benyacoub et *al.*, 1998). Ainsi qu'un complexe de zones humides classées site Ramsar, qui sont le lac Tonga, le lac Oubeira et la lagune du Mellah, qui constituent d'importants sanctuaires pour les oiseaux migrateurs et de ce fait des sites potentiels pour l'introduction des arbovirus.

### **2.1.2 Wilaya de M'Sila**

La Wilaya de M'Sila est située au Sud-Est d'Alger à 248 km ; elle s'étend sur une superficie de 18175 km<sup>2</sup> pour une population estimée de 882370 habitants. Limitée au Nord par les Wilayas de : Bouira, Bordj Bou-Arredj et Sétif, à l'Est par Batna et Biskra, à l'Ouest par Djelfa et Médéa et au Sud par Djelfa et Biskra.

Du point de vue géographique ; elle est limitée au nord par les monts du Hodna, à l'Est par les monts du Belzma, à l'Ouest par les monts de Ouled Naiel et au Sud par les monts du Zibane. La région de M'Sila se trouve en latitude 35°40' N et en longitude 04°30' N, sur une altitude d'environ 500 m. La Wilaya de M'Sila renferme différents types des zones :

- Zone steppique qui couvre la plus grande partie du territoire soit 56% elle est caractérisée par un couvert végétal clair semé traduisant le degré de dégradation.
- Zone des plaines du Hodna représentant 33%, elle réservée essentiellement à la céréaliculture, aux cultures maraîchères et aux cultures arboricoles.
- Zone de montagnes représente 7% de la superficie totale réservée à la céréaliculture extensive et aux massifs forestiers.

### **2.1.3 Tinerkouk, (wilaya d'Adrar)**

Tinerkouk est l'une des 11 daïra que comporte la wilaya d'Adrar, située à 270 km au Nord- Est du chef-lieu de la wilaya (Élévation : 358 m ; latitude: 29,70° N ; longitude: 00,71° E), sa superficie est de 20131 km<sup>2</sup> la population est de 20590 habitants dont l'activité principale et la culture du palmier dattier, le maraichage saisonnier ainsi que l'élevage de dromadaires et des caprins. Le climat est très aride de type saharien avec une pluviométrie

annuelle de 12 mm et une température annuelle maximale de 48°C et une minimale de 06°C. Le système d'évacuation des eaux usées se fait par lagunage, les eaux sont acheminées par pompage à l'extérieur de la ville et sont déversées dans les lacs artificiels qui vont servir de zones d'évaporation. Ces retenus d'eau sont très fréquentés par des oiseaux migrateurs qui peuvent être potentiellement réservoir du virus WN.

## 2.2 Stations d'études

### 2.2.1 Choix des stations

La présente étude a été réalisée au sein de dix stations appartenant à trois régions bioclimatiques différentes. Trois sites sont retenus dans chaque zone : un site urbain (en plein centre-ville), un site péri-urbain (à la périphérie de la ville) et un site rural. Après examen de l'environnement des stations d'études, dix gîtes sur dix-huit potentiellement favorables au développement des larves de *Culex pipiens* 10 stations ont été sélectionnés (Tableau 1). Six (06) gîtes pour la région du P.N.E.K (Wilaya d'El-Tarf) zone humide méditerranéenne, trois (03) gîtes pour la région de M'Sila (région semi-aride à aride) et un seul (01) gîte pour la région de Tinerkoug (Wilaya d'Adrar) région saharienne.

### 2.2.2 Description des stations (voir annexes)

Tableau 01 : Récapitulatif des stations d'étude

Régions		Stations d'étude	Coordonnées géographiques		Altitude (m)
			Latitude	Longitude	
P.N.E.K.	01	Hypogé Péri-Urbain (HPU) : Les Crêtes	36,88897°	008,44729°	36
	02	Epigé Péri-Urbain (EPU) : Les Crêtes	36,88918°	008,44761°	36
	03	Hypogé Rural (HR) : Tonga	36,88311°	008,52861°	17
	04	Epigé Rural (ER) : Tonga	36,88311°	008,52861°	17
	05	Hypogé Urbain (HU) : Cité 147 logement Bt N°5	36,89263°	008,43717°	26
	06	Epigé Urbain (EU) : Oued d'eau usée	36,89570°	008,43568°	37
M'Sila	07	Hypogé Urbain (HU) : Chellal	35,52095°	004,38642°	420
	08	Epigé Péri-Urbain (EPU) : Oued Ksob	35,69037°	004,53985°	460
	09	Epigé Rural (ER) : Bechelga	35,68081°	004,58342°	456
Tinerkoug	10	Hypogé Urbain (HU) : Tinerkoug	29,70718°	000,71981°	358

**Station 01 (HPU) :** C'est un site péri-urbain, de la ville d'El-Kala. C'est un gîte fermé se trouvant à la périphérie de la ville, dans une cave d'un bâtiment, inondée pendant toutes les saisons par les eaux usées.

**Station 02 (EPU) :** C'est le même un site péri-urbain que la première station, de la ville d'El-Kala. C'est un gîte ouvert, situé à la périphérie de la ville, constitué de fuite d'eaux qui parviennent d'un bâtiment adjacent.

**Station 03 (HR) :** C'est un site rural, de la ville d'El-Kala situé près du lac Tonga. C'est un gîte fermé, dans une un système de conduite d'assainissement inondée par de l'eau claire, pendant toutes les saisons.

**Station 04 (ER) :** C'est le même site rural de la station 03, c'est un gîte ouvert situé tout près du précédent, c'est une fosse à terre battue inondée par l'eau de pluie, pendant toutes les saisons.

**Station 05 (HU) :** C'est un site urbain, au centre-ville d'El-Kala. C'est un gîte fermé se trouvant dans une cave d'un bâtiment caractérisé par une faible luminosité, de l'eau usée et présence de détergents et déchets ménagers, il est inondé pendant toutes les saisons par les eaux usées.

**Station 06 (EU) :** C'est un site urbain, au centre-ville d'El-Kala. C'est un gîte ouvert, représenté par une accumulation des eaux usées fiant le réseau d'assainissement de la ville.

**Station 07 (HU) :** C'est un site urbain, au centre-ville de M'Sila. C'est un gîte fermé se trouvant dans une cave d'un bâtiment caractérisé par une faible luminosité, de l'eau usée et présence de détergents et déchets en tout genre, il est inondé pendant toutes les saisons par les eaux usées.

**Station 08 (EPU) :** C'est un site péri-urbain, de la ville de M'Sila. C'est un gîte ouvert, présentant de l'eau claire.

**Station 09 (ER) :** C'est un site rural, de la ville de M'Sila. C'est un gîte ouvert, et exactement une marre temporaire d'eau couverte d'une végétation très dense.

**Station 10 (HU) :** C'est un site urbain, de la ville de Tinerkouk. C'est un gîte fermé se trouvant près d'un réseau d'eaux usées.

## 2.3 Présentation du matériel biologique

### 2.3.1 Position systématique

Les moustiques, du complexe *Culex pipiens* appartiennent au genre *Culex* à la Sous-famille des Culicinae, la Famille des Culicidées : *Culicidae* (trompe piqueuse-suceuse) ,Sous-ordre des Nématocères : *Nematocera* (antennes longues), l'ordre des Diptères : *Diptera* (1

paire d'ailes + haltères), la Classe des Insectes : *Insecta* (pièces buccales exposées, pattes à plus de 5 segments, thorax développé + ailes, yeux composés + ocelles), la Super-classe des Hexapodes : *Hexapoda* (3paires de pattes, trachées) ,Embranchement des Arthropodes : *Euarthropoda* (corps et pattes segmentés) ,Série des Métazoaires : *Invertebrata* (organismes pluricellulaires mobiles = animaux) (Brunhes et al., 1999).

La position systématique de ce complexe est présentée dans la (Figure 02).

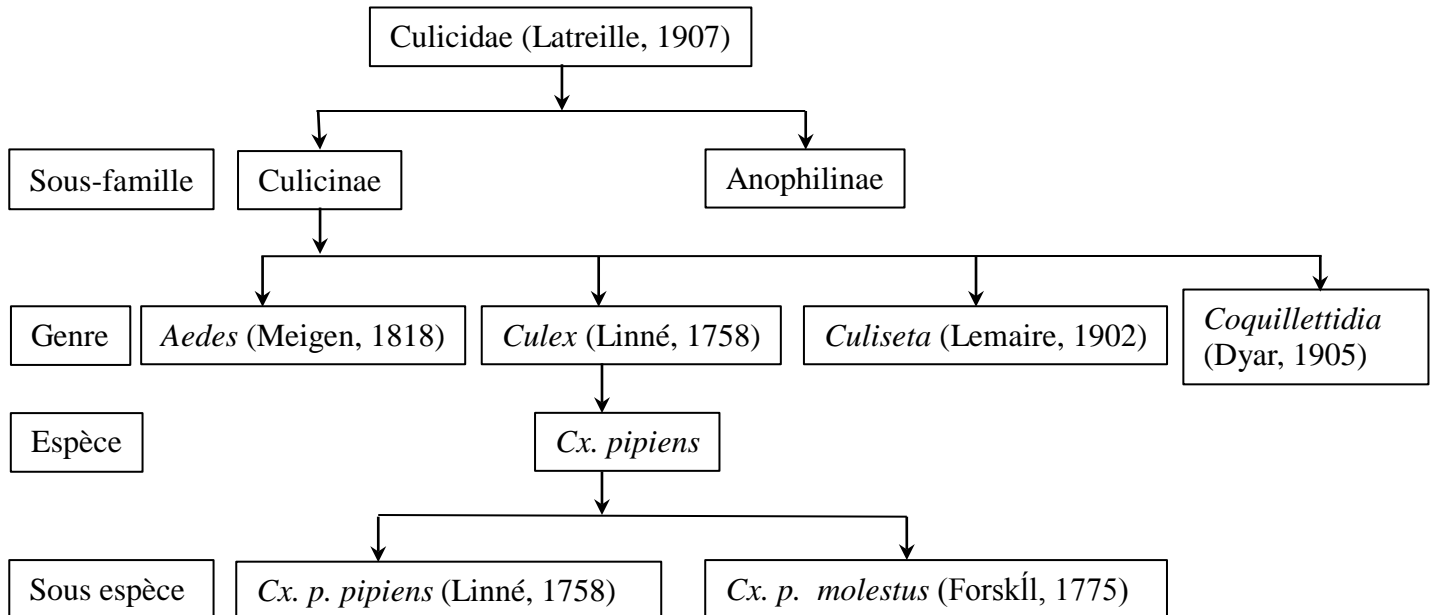


Figure 02 : Position systématique du complexe *Culex pipiens* (in Amara Korba, 2010)

### 2.3.2 Morphologie

Morphologiquement les Culicidae sont caractérisés par des antennes longues et fines à multiples articles (6 à 40 articles), des ailes pourvues d'écailles, les femelles possèdent de longues pièces buccales en forme de trompe rigide vulnérantes de type piqueur-suceur.

Les Culicidae, auxquels appartient le complexe *Culex pipiens*, sont des insectes à métamorphose complète (Holométaboles) de sorte que les trois stades de développement (larve, nymphe et adulte) ont des morphologies différentes, adaptées à leurs modes de vie (voir annexes) : aquatique pour les stades pré-imaginaux, et aérien pour le stade imaginal (Carnevale et Robert, 2009). La morphologie externe – en particulier la chetotaxie – de chaque stade, permet la différenciation entre la plus part des espèces. Pour cela, il est important de décrire dans ce chapitre les différents caractères morphologiques de l'adulte, et des stades pré-imaginaux dont la connaissance est indispensable en systématique.

### 2.3.2.1 L'adulte (Imago)

L'adulte est de taille moyenne environ 9 mm, globalement brun clair, avec des bandes antérieures claires sur les tergites abdominaux, se distingue facilement des autres familles de Nématocères, notamment par les écailles dont leur corps est recouvert et par la trompe (ou proboscis) très allongé. Trois parties bien distinctes compose l'adulte : la tête, le thorax et l'abdomen dont la connaissance est indispensable en systématique (Figure 03).



Figure 03: Photo d'une femelle de *Cx. pipiens* lors d'un repas de sang (In Balenghien, 2007)

#### 2.3.2.1.1 Tête

Deux yeux composés de nombreuses ommatidies s'étendant sur les faces dors-latérales mais aussi sur une petite partie de la face ventrale. Ocelles absents. Les parties antérieure et supérieure de la tête comprenant, de bas en haut et d'avant en arrière, le clypeus (au-dessus de l'insertion de la trompe), le front (qui porte les antennes), le vertex (région juxta-oculaire) et l'occiput (partie postérieure). Dans les échancrures du champ oculaire, s'insèrent les antennes. Celles-ci sont formées de 15 articles chez les mâles et 16 articles chez les femelles. Les deux premiers articles appelés respectivement scape et pédicelle et les articles suivants forment le flagellum, portant à leur base des verticilles de soies, dont la longueur et le nombre varient suivant le sexe. L'appareil buccal de type piqueur-suceur est constitué par une trompe allongée, très développée, toujours dirigée en avant, droite ou courbée (Rodhain et Perez, 1985) (Figure 04). Cette dernière est constituée chez la femelle, la seule qui est hématophage, par une gaine en gouttière (lèvre inférieure ou labium) à concavité tournée vers le haut et terminée par deux lobes sensoriels appelés labelle. Le labium renferme 6 stylets dont l'ensemble forme l'appareil vulnérant. Ces stylets comprennent deux mandibules, deux maxilles, l'hypo-pharynx contenant un canal de petit diamètre (canal salivaire) et le labre (épi-pharynx). En se réunissant les deux derniers, forment l'appareil suceur. De tous les stylets terminés en pointe, seuls les maxilles sont dentées en scie à la partie apicale. Lors de la piqûre, le labium ne pénètre pas dans les téguments mais se replie à leur surface. De part et

d'autre de la trompe, sont insérés les palpes maxillaires, qui se composent de 5 articles chez tous les mâles ainsi que les femelles des Anophielinae et de 3 articles chez les femelles des Culicinae. Chez les mâles, les deux paires de stylets mandibulaires et maxillaires sont réduits ou manquants, ce qui les rend incapables de piquer (Séguy, 1923, 1955 ; Callot et Helluy, 1958 ; Becker *et al.*, 2003).

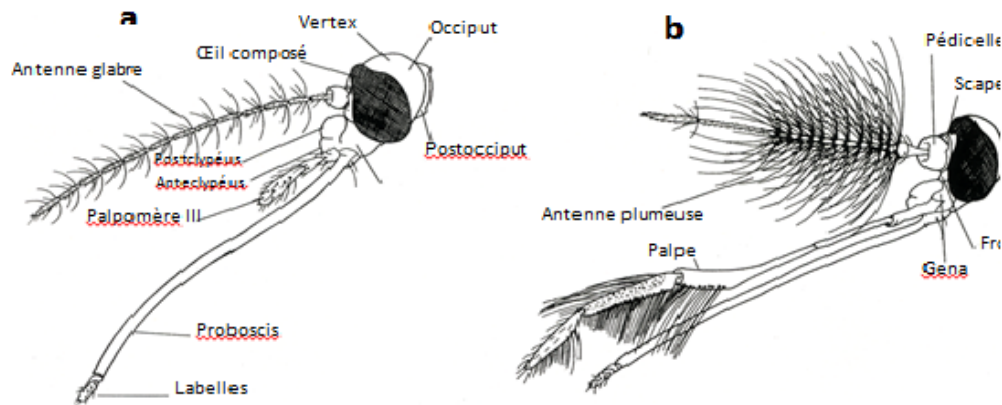


Figure 04 : Morphologie schématique de la tête de Culicinae (vue de profil)

a) Femelle, b) Mâle (Wood *et al.*, 1979)

### 2.3.2.1.2 Thorax

Assez globuleux et renflé à sa partie dorsale, le thorax comporte trois segments soudés, le pro, le méso et le métathorax, dont chacun présente une partie dorsale (tergum) et une partie ventrale (sternum). Les pièces latérales étant les pleures. Sur chacun de ces segments, s'insère une paire de pattes. En outre, le mésothorax, très développé, porte une paire de stigmates ou spiracles, une paire d'ailes et un prolongement postérieur et dorsal qui est le scutellum. La présence ou l'absence de soies post et pré-spiraculaires au niveau du mésothorax constitue l'un des principaux caractères pour distinguer les genres des Culicinae. Le métathorax porte quant à lui une paire de stigmates et une paire de balanciers ou haltères (Rodhain et Perez, 1985) (Figure 05). La membrane alaire, transparente, est soutenue par des nervures longitudinales et transversales délimitant entre elles les cellules dont les plus importantes au niveau systématique sont celles qui sont comprises entre les deux fourchettes radiales R2+3 et R4+5. En outre, ces nervures portent des écailles et le bord postérieur de l'aile est orné d'une frange d'écailles. Des écailles de formes, de couleurs et de dispositions variées, couvrent également les segments thoraciques et les pattes (Hegh, 1921 ; Becker *et al.*, 2003). D'après Séguy (1923), les pattes sont très fragiles, longues et grêles. Leur longueur augmente de la première à la troisième paire. Chaque patte comprend, de sa base à l'extrémité

distale, la hanche ou coxa, le trochanter indistinct, le fémur, le tibia et un tarse de cinq articles, dont le dernier porte deux griffes et parfois un empodium et deux pulvilli. Elles peuvent porter des soies, des poils et présenter des anneaux, formés par des écailles, diversement colorés. L'absence ou la présence de griffes denticulées ou de pulvilli sur les derniers tarse permet de distinguer les genres constituant la famille des Culicidae.

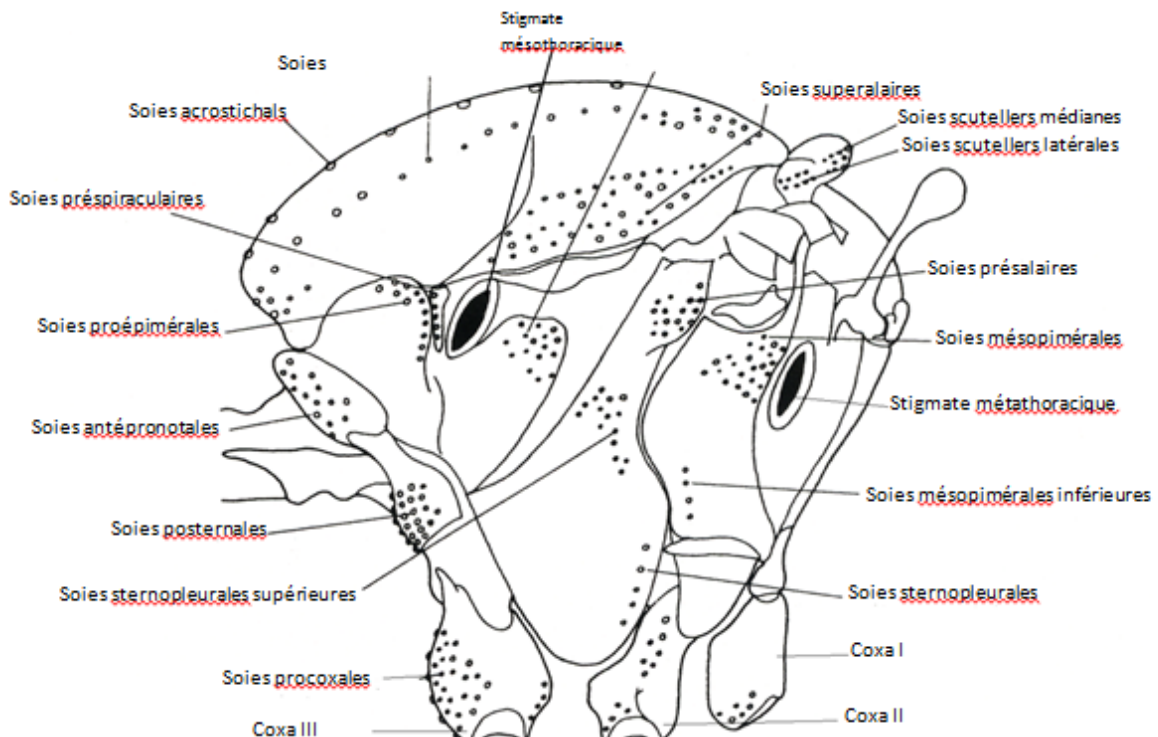


Figure 05: Morphologie schématique du thorax chez les Culicidae, indiquant l'emplacement des principaux groupes de soies utilisés en taxonomie (Becker et al., 2003, dont la légende a été complétée)

### 2.3.2.1.3 Abdomen

Il est formé de dix segments, mais seuls les huit premiers sont différenciés et visibles extérieurement. Ils sont composés chacun d'une plaque chitineuse dorsale, le tergite et d'une plaque ventrale ou sternite reliées par une membrane souple latérale. La localisation des écailles et des soies, leur couleur et leur disposition sur les tergites abdominaux sont très variés (écailles absentes chez les Anophelinae). Les deux derniers segments abdominaux, sont modifiés pour les fonctions reproductrices. Les appendices génitaux ou génitalia du mâle (hypopigium) sont pourvus de diverticules anatomiques complexes et fournissent les meilleurs caractères de systématique. Le IX<sup>e</sup> segment comporte trois articles dont le gonocoxite de forme ovoïde, le gonostyle mince et allongé et un 3<sup>ème</sup> article généralement

réduit à une petite dent ou épine (Figure 06). Cependant le X<sup>e</sup> segment ou segment anal, représente la partie centrale au niveau duquel se remarquent le pénis ou phallosome qui est un organe impair médian, entouré de deux paramères et souvent des protubérances d'aspect très variés (en oursin chez les *Culex* par exemple), ainsi que deux bras latérobasaux, plus ou moins développés, insérés à sa base (Knight et Laffoon, 1971 ; Rodhain et Perez, 1985). Chez la femelle, les segments génitaux de formation très simple, n'ont guère de valeur taxonomique. Le X<sup>e</sup> segment porte deux prolongements, les cerques, principalement visibles pour les genres *Aedes* et *Ochlerotatus*.

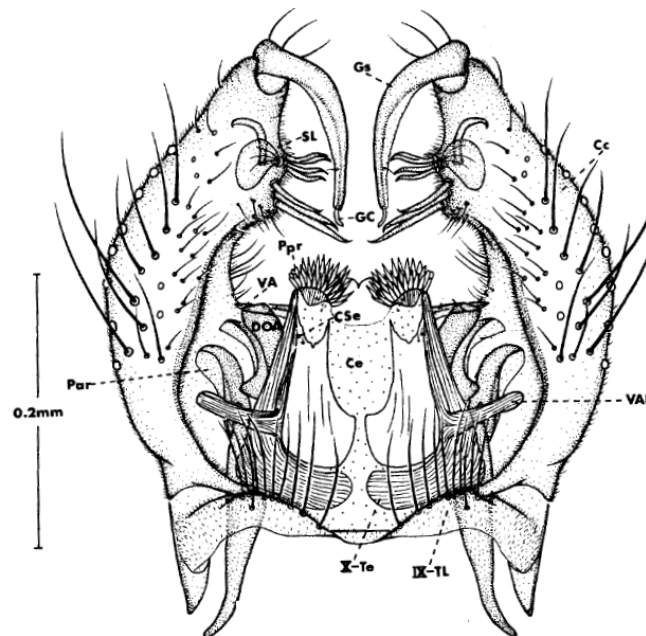


Figure 06 : Aspect général du génitalia mâle d'un Culicidae (*Culex pipiens* L.)

(Cc : gonocoxite ; Ce : cerque ; GC : griffe du gonostyle ; Gs : gonostyle ; Par : paramère ; Ppr : paraprocte ; SL : lobe subapical ; VA : bras ventral ; VAP : bras basal ; X-Te : tergite X ; IX-TL : lobe du tergite IX) (Knight et Laffoon, 1971)

### 2.3.2.2 Les œufs

Les œufs sont pondus en « radeaux » de couleur noire facilement visibles à l'œil nu, directement sur la surface de l'eau, ils sont détruits très rapidement en cas d'assèchement. L'œuf comprend de l'intérieur vers l'extérieur l'embryon, la membrane vitelline pellucide, l'endo-chorion et l'exo-chorion plus ou moins pigmenté et ornementé. Les *Culex*, forment des nacelles plus ou moins régulières où chaque œuf (Fig. 07), qui est muni d'un flotteur micropylaire en socle, se tient verticalement (Séguy, 1955). C'est avec les pattes postérieures croisées que la femelle du moustique guide ses œufs pour obtenir cette formation (Callot et Helluy, 1958).

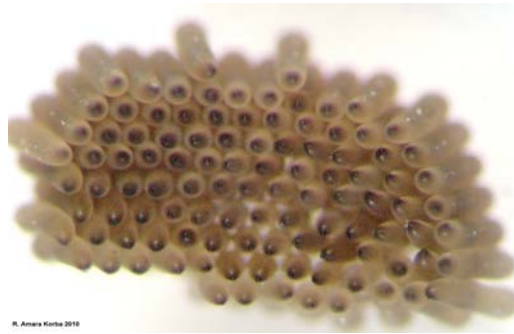


Figure 07: Œufs en Nacelle de *Culex pipiens*  
(Cliché Amara Korba, 2010)

### 2.3.2.3 La larve

Le corps de la larve des Culicidae est divisé en trois parties principales : la capsule céphalique complètement sclérifiée, le thorax aplati composé de trois segments fusionnés (bien plus large que les deux autres parties) et l'abdomen qui se compose de dix segments. D'après Forattini (1996) (in Becker et *al.*, 2003), 222 paires de soies sont insérées tout au long du corps de la larve, leur arrangement est appelé la Chetotaxie ce qui présente le principal critère en taxonomie – morphologique – des larves. Le stade larvaire IV se caractérise par un siphon long et effilé, de même couleur que le corps. Ses mouvements sont rapides et nerveux (Figure 08).

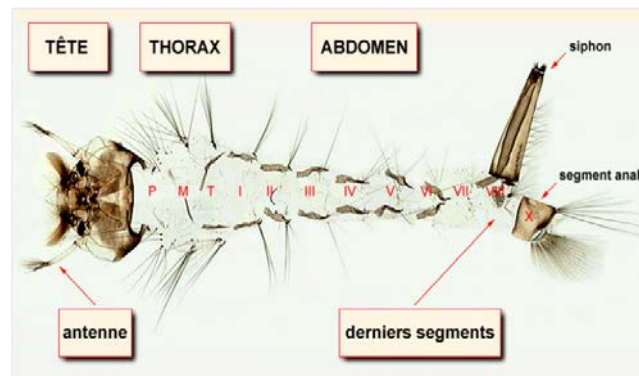


Figure 08 : Larve de *Cx. pipiens*  
(In Brunhes et *al.*, 1999)

#### 2.3.2.3.1 Tête

La capsule céphalique est formée d'une plaque chitineuse médiane, le frontoclypéus et de deux plaques latérales épicroâniennes. Au frontoclypéus est rattachée une plaque antérieure étroite (préclypéus) portant les brosses buccales. Les pièces buccales sont broyeuses, et principalement composées par des mandibules épaisses à pointes aiguës, et d'une plaque mentonnière triangulaire et dentelée appelée mentum (Séguy, 1955 ; Rodhain et Perez, 1985). Préclypéus et frontoclypéus portent 18 paires des soies symétriques codées de 0-C à 17-C (la lettre C désigne les soies qui se trouvent sur les plaques de la tête). La forme et le nombre des

branches de ces soies présentent un grand intérêt taxonomique notamment les soies péclypéales, clypéales, frontales et occipitales. Deux paires d'yeux sont situées sur la parie médio-latérale des plaques épicroaniennes. Les deux yeux antérieurs en forme de taches noirâtres, constituent les yeux composés primordiale du futur adulte. Derrière ceux-ci, se trouvent les deux petits yeux des larves ou stemmata. Les antennes qui se posent dans les angles antéro-latéraux de la tête, sont plus ou moins minces et légèrement effilées. Elles peuvent être plus courtes que la tête et droites ou légèrement incurvées ou aussi longues voire plus longues que la tête et prendre la forme d'une courbe régulière. Le tégument des antennes est souvent couvert des poils et des spicules. Les soies antennaires, nommées de 1-A à 6-A, sont très utiles pour la reconnaissance des genres et certaines espèces appartenant au genre *Culex* (Becker et al., 2003) (Figure 09).

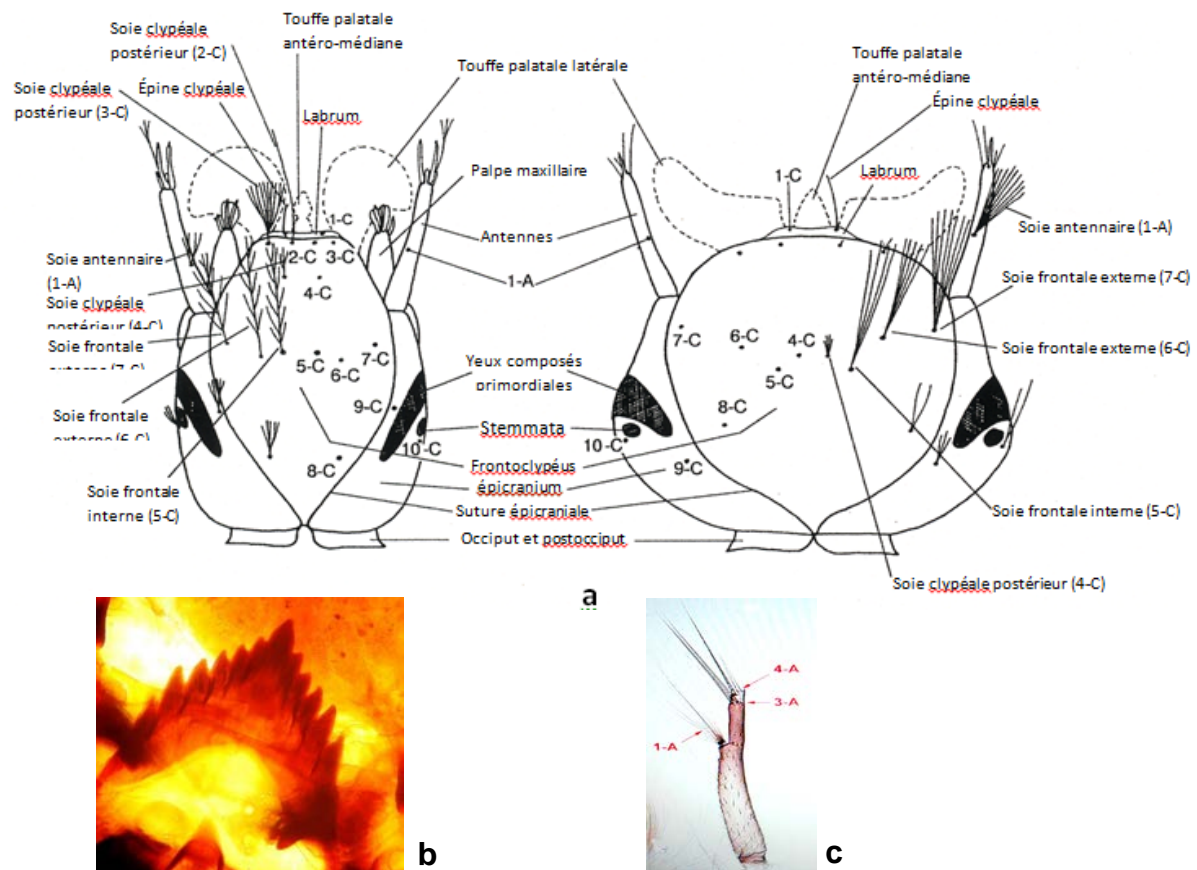


Figure 09: Morphologie externe de la tête de la larve des Culicidae (in Boukraa S., 2010)

a : Vue dorsale chez les Anophilinae (à gauche) et les Culicinae (à droite) (Becker et al., 2003, avec légende complétée). b : Mentum d'une larve de 4<sup>ème</sup> stade de *Culex theileri* (Boukraa S., 2010)  
 c : Antenne et soies antennaires de Culicinae (Schaffner et al., 2001).

### 2.3.2.3.2 Thorax

Le thorax est large et trois séries successives de soies plus ou moins ramifiées en marquent les trois régions autrement indistinctes. Les paires de soies symétriques sont

numérotées 0-P à 14-P sur le prothorax, 1-M à 14-M sur le mésothorax et 1-T à 13-T sur le métathorax. Becker et *al.*, (2003) signalent que seules les soies pro-thoraciques présentent un intérêt taxonomique (Figure 10). Chez les *Uranotaenia*, quelques soies méso-thoraciques et méta-thoraciques peuvent aussi être modifiées et participer à la distinction des espèces (Ramos et Brunhes, 2004).

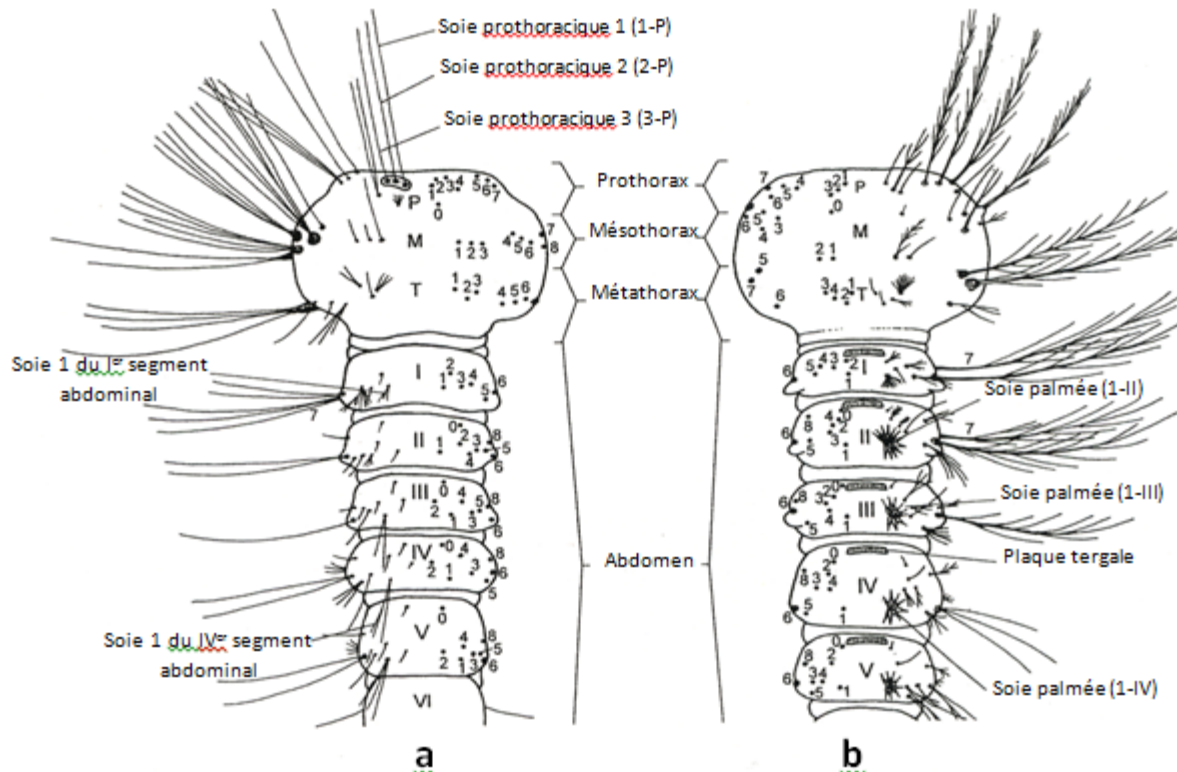


Figure 10: Chetotaxie de la face dorsale du thorax et de l'abdomen des larves  
a : Culicinae ; b : Anophelinae (Becker et *al.*, 2003)

### 2.3.2.3.3 Abdomen

Caractérisé par une forme allongée et sub-cylindrique, l'abdomen des larves de Culicidae est composé de dix segments individualisés. Les sept premiers se ressemblent entre eux, où chaque segment est orné de 15 paires de soies (excepté le segment I où se trouvent seulement 13 paires de soies). La majorité de ces soies sont très peu utilisées en taxinomie, hormis chez les *Anopheles* où l'abdomen est recouvert par certains caractères spécifiques, notamment, les soies palmées et les plaques tergaux. Sur le huitième segment abdominal qui possède un intérêt majeur en taxinomie, deux structures très importantes sont annexées. La première, c'est le peigne qui est constitué par un ensemble s'épines ou d'écailles, variables dans leur forme, leur nombre et leur disposition. Le nombre d'écailles varie de 5 à plus de 100

et peuvent être arrangées en une seule ligne, en double lignes, en forme irrégulière ou encore en forme triangulaire. Celles-ci, s'insèrent sur le bord postérieur d'une plaque chitineuse chez les *Uranotaenia* et les *Anophèles*. La deuxième structure correspond aux deux ouvertures spiraculaires qui s'ouvrent soit directement au niveau du tégument (comme c'est le cas chez les Anophelinae) soit à l'extrémité apicale d'un organe chitinisé de forme troconique, appelé le siphon respiratoire, principal caractère des Culicinae (Figure 11). Il s'agit d'un des caractères les plus utilisés pour l'identification des espèces constituant les Culicinae. Plus ou moins long, ce siphon porte de part et d'autre une rangée d'épines (peigne de siphon) et selon les genres et les espèces, une ou plusieurs touffes de soies.

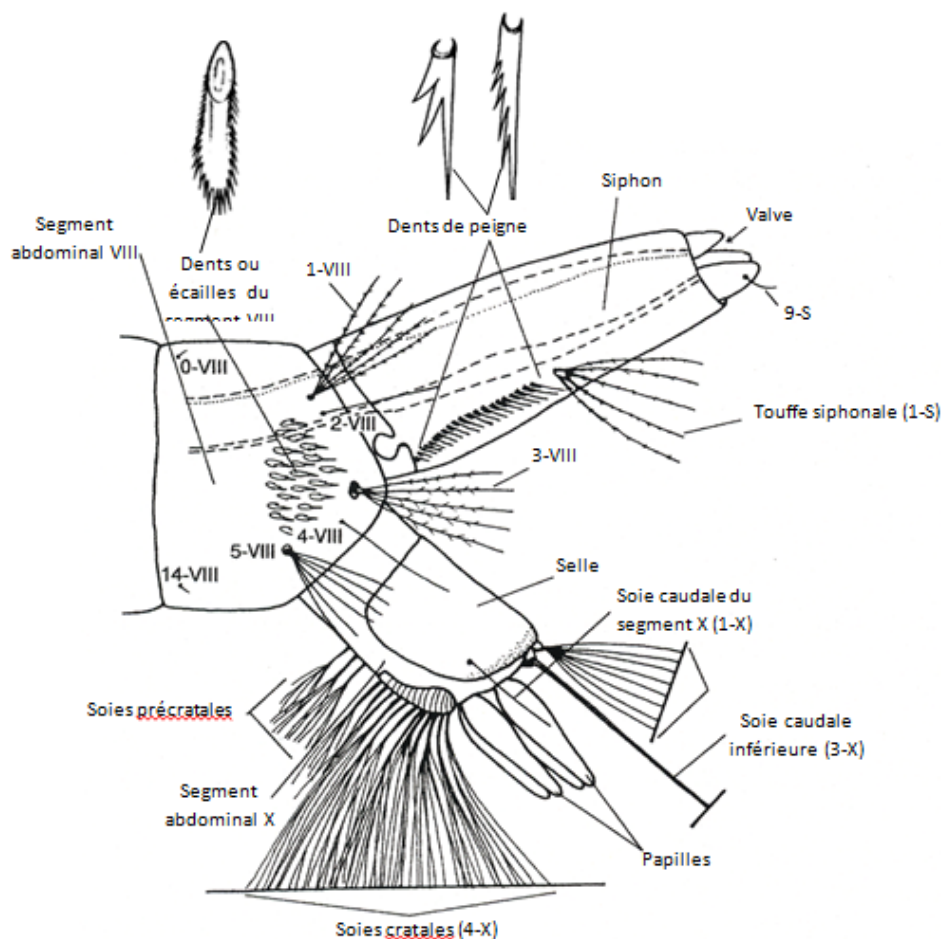


Figure 11: Soies du siphon et des segments VIII et X d'une larve de Culicinae (Becker et al., 2003, avec légende complétée)

Le dernier segment ou segment anal projeté ventralement, ne se trouve pas dans le prolongement du corps, mais forme avec celui-ci un angle de 130°. Il est entouré sur la partie dorso-latérale, d'un renforcement chitineux qui constitue la selle. Cette dernière est ornée d'épines et d'une paire de soies (1-X), de paires de longues soies disposées en une brosse dorsale, d'une ligne de soie et d'une brosse disposée ventralement. Au niveau du bord

postérieur de la selle, quatre papilles anales saillantes entourent l'anus, qui est terminal (Callot et Helluy, 1958 ; Rodhain et Perez, 1985 ; Becker et *al.*, 2003 ; Ramos et Brunhes, 2004).

#### 2.3.2.4 La nymphe

La nymphe des Culicidae ou pupae en anglais, se caractérise par une tête et un thorax réunis en une seule masse globuleuse, le céphalothorax, et une partie postérieure effilée et recourbée constituant l'abdomen ; ce dernier donne à la forme générale de la nymphe un aspect d'une virgule (Figure 12). Sur le sommet de la portion céphalothoracique se projettent deux trompettes respiratoires de formes très variables – souvent longues et cylindriques - équivalents physiologiques du siphon respiratoire de la larve. L'abdomen de la nymphe de Culicidae est composé de huit segments - visibles - où chacun d'eux porte des soies caractéristiques. Une soie palmé se trouve généralement au niveau de premier segment, cependant, le dernier segment est muni de deux palettes natatoires transparentes souvent ornées de denticules et de soies (Hegh, 1921 ; Rodhain et Perez, 1985).

La cuticule du céphalothorax est transparente où les ébauches des appendices locomoteurs, des antennes, de l'appareil buccal et des yeux composés des futurs adultes sont nettement visibles (Becker, 2003). La forme et l'ornementation de ces trompettes peut fournir, avec les palettes natatoires, certains caractères spécifiques aux genres et aux espèces. La disposition des rares soies que la nymphe porte sur le corps peut aussi être utilisée, surtout, lorsque l'identification des larves et des adultes sont difficiles (Séguy, 1923).



Figure 12: Nympe de *Cx. pipiens* (In Balenghien, 2007)

#### 2.3.3 Bio-écologie et Ethologie des larves (voir annexes)

Les larves de moustiques sont aquatiques. Elles se trouvent, au repos, sous la surface de l'eau, respirant l'air atmosphérique en faisant affleurer les spiracles qui s'ouvrent à l'extrémité du siphon respiratoire. Très mobiles, les larves plongent en profondeur

lorsqu'elles se sentent menacées ou pour la recherche de leur nourriture. Les larves ont une croissance discontinue et subissent 4 mues, lui permettant de passer d'environ 2 à 12 mm de long, la durée des 4 stades larvaires est habituellement de 8 à 12 jours lorsque les conditions de température sont favorables, à chaque mue est abandonnée dans l'eau l'exuvie (tégument externe) du stade précédent et la dernière mue transforme la larve du 4<sup>ème</sup> stade en nymphe.

La nymphe, également aquatique, est mobile mais ne s'alimente pas durant toute la durée de ce stade, qui varie entre 2 à 5 jours. Elle prélève l'air atmosphérique grâce à deux trompettes respiratoires. Le stade nymphal est un stade de transition au métabolisme extrêmement actif, au cours duquel l'insecte subit de très profondes transformations morphologiques et physiologiques qui l'amènent du stade larvaire, aquatique et saprophyte, à la forme adulte, aérienne et habituellement hématophage chez les femelles. A la fin de ce stade, le tégument de la nymphe se fend sur le dos suivant une ligne longitudinale. Par cette ouverture, le moustique adulte dégagera successivement son thorax, sa tête, ses pattes, son abdomen, abandonnant dans l'eau l'exuvie nymphale. Ce phénomène de l'émergence dure environ 15 minutes durant lesquelles l'insecte se trouve exposé sans défenses à de nombreux prédateurs de surface (Rodhain et Perez, 1985).

### **2.3.3.1 Gîtes larvaires et influence de leurs composantes sur le développement des larves**

Les gîtes larvaires susceptibles de recevoir des pontes, sont constitués par des collections d'eau dont le type est extrêmement variable suivant l'espèce. Certaines espèces de moustiques sont d'ailleurs extrêmement strictes, alors que d'autres semblent très peu exigeantes. C'est en effet à la femelle pondreuse que revient le choix du gîte. Ce dernier se différencie selon l'importance de sa couverture, en biotope ombragé (sciaphile) ou ensoleillé (héliophile), selon les caractéristiques chimiques de l'eau douce (dulçaquicole) ou salée (halophile) et selon la taille du gîte, grande dimension (rivage de lac, de grand fleuve) ou très petite taille (creux d'arbre, empreinte de pas, petits récipients artificiels) (Rodhain et Perez, 1985). De multiples facteurs peuvent aussi être pris en considération, tels que la température, le pH de l'eau, la lumière et les facteurs biotiques comme la nature et l'abondance de la végétation aquatique et la faune associée. La température de l'eau n'est pas un facteur limitatif, mais peut être considérée comme importante, car elle agit sur la vitesse de développement des larves et des nymphes des Culicidae. Selon Séguy (1955), la lumière a une grande influence sur quelques espèces culicidiennes, et les larves sont plus nombreuses dans les mares abritées du soleil. La végétation aquatique qui sert de nourriture ou d'abris aux

divers animaux, peut également influencer les caractéristiques physico-chimiques de l'eau (Ramade, 1984).

### **2.3.3.2 Nourriture et respiration des larves :**

Dans l'eau du gîte, les larves se trouvent au repos sous la surface, respirant l'air atmosphérique en faisant affleurer leurs spiracles ; ces dernières s'ouvrent soit directement à la face dorsale chez les Anophelinae, où elles se tiennent en position horizontale et adhèrent à la surface grâce à leurs soies palmées, soit à l'extrémité du siphon respiratoire chez les Culicinae, ce qui entraîne une position oblique de la larve par rapport à la surface de l'eau. Quand les larves quittent la surface de l'eau, les lobes qui entourent les spiracles respiratoires se rétractent et les spiracles se ferment automatiquement. Une glande adjacente des spiracles de la larve sécrète des substances hydrophobiques qui empêchent l'eau du milieu d'entrer dans le système respiratoire (Becker et *al.*, 2003).

Les larves de moustiques très mobiles plongent en profondeur - par des mouvements en saccades - lorsqu'elles se sentent menacées ou qu'elles sont à la recherche de leur nourriture. La nourriture des larves consiste surtout en des éléments planctoniques, notamment des algues microscopiques, bactéries, et protozoaires. Sur base du comportement alimentaire de chaque espèce, les larves créent par leurs brosses buccales (touffes palatales céphaliques) des courants qui amènent à leur bouche des particules alimentaires de la surface. Les larves des Anophilinae capturent leur nourriture en surface, par contre les Culicinae s'alimentent sur les particules qui se trouvent en suspension ou au fond de l'eau. Cependant pour certaines espèces carnivores comme les *Toxorhynchites*, *Culex* sous-genre *Lutzia* et les *Aedes* du sous-genre *Mucidus*, les proies sont parfois plus volumineuses, telles que des larves de Chironomidae ou même d'autres Culicidae (Callot et Helluy, 1958 ; Rodhain et Perez, 1985). Les larves appartenant aux genres *Mansonia*, *Aedeomyia*, *Ficalbi* et *Coquillettidia* vivent submergées dans l'eau et restent fixées par leur siphon morphologiquement modifié, aux tiges et aux racines de certaines plantes aquatiques (*Pistia*, *Salvinia*, *Eichhornia*,...) afin d'y prélever l'air nécessaire à la respiration au niveau des vaisseaux aérifères (Séguy, 1923 ; Matile, 1993 ; Becker et *al.*, 2003).

## 2.3.4 Bio-écologie et Ethologie des adultes

### 2.3.4.1 Emergence et accouplement

Les premiers jours de la vie imaginaire permettent le durcissement de la cuticule, la prise d'une alimentation sucrée et la maturation des organes sexuels. L'accouplement se fait 2 ou 3 jours après l'émergence chez les femelles, avant ou après le premier repas de sang. Les mâles sont fertiles après la troisième journée de vie imaginaire. Dans la plupart des cas, l'accouplement est précédé d'un essaimage des mâles observable à quelques mètres du sol ( $\approx$  2 m). Cet essaimage se forme généralement au crépuscule, mais aussi parfois à l'aube, à des heures très répétitives, souvent près de leurs gîtes de développement larvaire (Carnevale et Robert, 2009). Par contre certains moustiques peuvent s'accoupler dans des espaces étroits comme certains *Culex* et *Aedes*. Les Culicidae mâles saisissent les femelles au vol et s'appliquent contre elles ventre à ventre. La copulation peut se dérouler entièrement en vol ou bien commencer en vol et se poursuivre lorsque le couple est au sol. Cette copulation dure de quelques secondes à plusieurs minutes.

### 2.3.4.2 Alimentation

D'une façon générale, les pièces buccales des Culicidae – et en particulier celles des mâles – sont adaptées à piquer et à sucer les sucs végétaux et le nectar des fleurs (Becker et al., 2003). Donc les moustiques mâles ne sont pas hématophages ; de ce fait ils se déplacent assez peu à partir du gîte dont ils sont issus, et ne pénètrent que rarement dans les habitations.

Les moustiques femelles absorbent également des jus sucrés d'origine végétale, mais ont pour la plus par un régime hématophage. Cependant, la prise d'un repas de sang par les femelles, est nécessaire pour la maturation des œufs (Carnevale et Robert, 2009).

En ce qui concerne le mécanisme de la piqûre, le labium se replie à la surface des téguments, les stylets vulnérants pénètrent et recherchent un capillaire sanguin qu'ils cathétérissent. La salive est injectée à plusieurs reprises durant la pénétration des pièces buccales. La quantité de sang ingérée peut varier de 4 à 10  $\mu$ l (Rodhain et Perez, 1985). La plupart des espèces digèrent en dehors des habitations sur des plantes, des arbres, des herbes ou dans des crevasses, des trous d'arbre, dans les anfractuosités des berges des rivières elles sont dites exophiles. D'autres, au contraire, et en particulier beaucoup de celles qui piquent à l'intérieur, digèrent dans les habitations ou les étables elles sont dites endophiles (Callot et Helluy, 1958). Il existe chez certaines espèces de Culicidae, des souches dites « autogènes », où les femelles sont capables d'élaborer des œufs fertiles (leur premier lot d'œufs) sans avoir

effectué de repas de sang. Celles qui ne possèdent pas cette faculté elles sont dite anautogènes (Séguy, 1923, 1955 ; Matile, 1993).

#### **2.3.4.3. Dispersion et recherche d'hôte**

*Culex pipiens* est une espèce largement représentée dans toutes la région holarctique ; dans la région afro-tropicale elle occupe les zones les plus fraîches (Ethiopie, hauts plateaux malgaches...). Très ubiquiste, ses gîtes larvaires sont très variés, souvent d'origine anthropique (vide sanitaire, petit bassin, conteneur abandonné, fossé, rizière, marais...).

Le régime hématophage des femelles entraîne la nécessité de rechercher un hôte convenable, ce qui favorise leur dispersion à partir du gîte d'origine. Les hôtes des moustiques peuvent être des mammifères, des oiseaux, des reptiles ou des batraciens. Les préférences trophiques sont extrêmement variables d'une espèce culicidienne à une autre. Les espèces qui piquent préférentiellement l'homme sont dites anthropophiles, mais elles peuvent être également ornithophiles, herpétophiles ou encore simiophiles (Séguy, 1955 ; Rodhain et Perez, 1985). La localisation des hôtes est basée sur des stimuli olfactifs, visuels et thermiques.

Le vol est indispensable à la femelle pour rejoindre l'animal dont elle sucera le sang. Il l'est également pour lui permettre de gagner les lieux de ponte (Matile, 1993). Il est admis qu'un vol actif des Culicidae varie de 300 m à 9 km (Rodhain et Perez, 1985 ; Carnevale et Robert, 2009). Il est donc important de connaître les possibilités de dispersion des espèces de moustique et en particulier les vecteurs potentiels des maladies pour évaluer les risques d'expansion de chaque maladie ou la zone à traiter. A cette dispersion active, par le vol, s'associe une dispersion passive soit par le vent (dispersion anémochore, selon une direction préférentielle qui est celle du vent dominant), soit par les différents facteurs humains. L'homme, avec les moyens de déplacement dont il dispose, favorise la dispersion des Culicidae à tous les états (œufs, larves, adultes). Le bateau et l'avion effacent les barrières naturelles – comme les océans et les montagnes par exemple – qui protégeaient l'homme de l'introduction et de l'expansion des vecteurs porteurs d'agents pathogènes. Rodhain (1996), signale que le rôle du commerce international des pneus dans l'expansion géographique d'*Aedes albopictus* a été largement démontré.

#### **2.3.4.4 Hibernation et longévité**

Durant l'année, l'activité des moustiques est avant tout conditionnée par les facteurs climatiques : elle s'étend du printemps au début de l'automne dans les régions tempérées. Il est donc nécessaire pour ces insectes d'adapter un mode de vie sous une forme ou une autre durant la saison climatiquement défavorable. Dans les régions tempérées, les anophèles hibernent à l'état de femelles inséminées (Carnevale et Robert, 2009). En Europe, l'espèce *Culex pipiens* passe l'hiver à l'état de femelles au repos dans les lieux abrités, comme les caves et les étables par exemple, alors que les espèces *Aedes rusticus* ou *Anopheles claviger* hiverneront surtout à l'état larvaire. Mouchet et *al.* (1969), signalent que l'hibernation de *Culex modestus* (vecteur du virus West Nile) en Camargue, se fait dans des tas de roseaux et la végétation serrée des roselières. Pendant l'hibernation, les ovaires se développent lentement et progressivement, aux dépens des réserves nutritives accumulées pendant les stades pré-imaginaux ou les sucres des végétaux sucrés acquis après l'émergence.

D'après Séguy (1955), la longévité des moustiques varie suivant les espèces et les lieux qu'ils habitent : elle est étroitement conditionnée par le degré hygrométrique de l'air et la température. La longévité des Culicidae femelles dans la nature est difficile à apprécier ; en pleine période d'activité, elle semble habituellement être de l'ordre de 3 semaines à 3 mois. Par contre, celle qui est observée en laboratoire est toujours supérieure, puisque les insectes ne sont pas exposés aux prédateurs ou à des conditions météorologiques défavorables. Les espèces citadines et anthropophiles montrent une longévité plus accentuée que les espèces rurales ou sylvestres sauvages (Rodhain et Perez, 1985 ; Becker et *al.*, 2003).

### **2.3.5 Différences comportementales et physiologiques entre les formes *pipiens* et *molestus***

Le complexe d'espèce *Cx. pipiens* se compose de deux formes à savoir ; *Cx. p. molestus* et *Cx. p. pipiens*, qui sont morphologiquement identiques. Bien que leur distinction sur le plan morphologique est impossible, présentent d'importantes différences comportementales et physiologiques.

Les larves de *Cx. p. molestus* se développent dans des eaux qui sont généralement souterraines (hypogées), confinées et très polluées par les matières organiques, qui sont sous forme de fossés de drainage d'eaux usées, eaux de fuites, des caves des bâtiments, mare temporaire de la périphérie des villes, vide sanitaire inondé...etc.). Par contre celle de *Cx. p. pipiens* affectionnent les gîtes extérieurs à ciel ouvert (épigées) dont l'eau est propre. La forme *pipiens* se nourrit principalement sur les oiseaux et la forme *molestus* sur les mammifères (Fonseca et *al.*, 2004). Les femelles *Cx. p. molestus* sont dites autogènes (effectuent une première ponte sans repas sanguin) ; utilisent les réserves accumulées lors des stades pré-imaginaux, tandis que

celle de *Cx. p. pipiens* sont anautogènes (pondent seulement après un repas sanguin). Par ailleurs *Cx. p. molestus* a une vie hémodynamiques potentiellement actives toute l'année bénéficiant ainsi des conditions de températures plus douces qui règnent en sous-sol (Roubaud, 1933 ; Laven, 1951). Cependant *Cx. p. pipiens*, à une vie hétéro-dynamiques (les femelles hibernent de mi-octobre à mi-février, se réfugiant dans les grottes, granges, ou troncs creux). Les deux formes diffèrent également par leur mode d'accouplement. La forme *molestus* est sténogame et peut s'accoupler sur un support dans des espaces confinés alors que la forme *pipiens* est eurygame et s'accouple en plein air dans des espaces à ciel ouvert par essaimage.

### **2.3.6 Intérêt Médical**

A ce jour, selon la bibliographie (Brunhes et *al.*, 1999), le complexe *Culex Pipiens* est principalement reconnu pour être vecteur de la *filariose de Bancroft*, le virus *Sindbis*, le *virus de West Nile* et le *virus de la Fièvre de la Vallée du Rift*. Les deux dernier sont les plus susceptibles de provoquer des épidémies en Algérie.

#### **2.3.6.1 La fièvre West Nile**

La fièvre à virus WN est une arbovirose dont l'agent causal est un flavivirus isolé pour la première fois en 1937 dans le district du West Nile en Ouganda, chez une femme souffrant d'une forte fièvre (Smithburn et *al.*, 1940). Endémique à l'Afrique sub-saharienne puis détecté en Egypte dans les années 40, en Roumanie dans les années 50 et en Camargue (France) dans les années 60, le virus WN s'est, ensuite, largement disséminé en Afrique du Nord, en Europe, aux Etats-Unis puis au Canada et au Mexique (Zeller et Schuffenecker, 2004). Il est considéré désormais comme le plus répandu des flavivirus après le virus de la dengue. Il touche l'homme de façon sporadique ou épidémique provoquant une fièvre importante accompagnée de maux de tête et de dos, des douleurs musculaires, des nausées, de diarrhées et des symptômes respiratoires. La maladie peut être fatale pour les personnes âgées et parfois, pour les jeunes enfants. Des cas humains de fièvre à virus WN ont été rapportés en Algérie en 1994, parmi lesquels huit enfants ont trouvé la mort (Le Guenno et *al.*, 1996). Au Maroc en 1996, un cas d'encéphalite humaine a été confirmé (El Harrak et *al.*, 1997). En Tunisie en 1997, le virus WN a été à l'origine d'une vingtaine de morts (Triki et *al.*, 2001). Une nouvelle épidémie moins sévère y est apparue en 2003 (Garbouj et *al.*, 2003). Sur l'autre rive de la Méditerranée, en Europe, le virus WN a provoqué des épidémies en Roumanie (1996, 835 cas dont 17 décès), en Russie (1999, 826 cas dont 40 décès), une épizootie/épidémie dans le Var en France (2003, sept cas d'infection chez l'homme et quatre

chez les chevaux) mais aussi des épizooties en Italie (1998, 42 chevaux morts) et en Petite Camargue en France (2000, 76 chevaux infectés - encéphalomyélite et paralysie des membres postérieurs - dont 21 morts) (AFSSA, 2004). Plus récemment, en été 2008, une nouvelle épizootie s'est déclarée dans le Nord de l'Italie (20 cas chez les chevaux et 4 chez l'homme) (Calzolari et al., 2009). Aux Etats-Unis, une épidémie/épizootie d'une grande ampleur est survenue entre 1999 et 2004 faisant 14549 cas humains dont 566 décès (CDC, 2004) et 21443 cas d'encéphalites chez les chevaux (APHIS, 2004).

Le cycle épidémiologique de la maladie implique des oiseaux migrateurs jouant le rôle de réservoir aviaire, des moustiques ornithophiles principalement du genre *Culex* en tant que vecteurs amplifiant la circulation virale entre les populations d'oiseaux (Hubalek et Halouzka, 1999). Les oiseaux migrateurs assurent l'introduction du virus d'Afrique vers les zones tempérées, en Afrique du Nord et en Europe (Traoré Lamizana et al., 1994 ; Zeller, 1999). En présence de vecteurs ornithophiles tels que *C. pipiens*, le cycle moustiques/oiseaux pourrait être initié si les facteurs favorables à la pullulation des moustiques sont réunis : pluies abondantes survenant généralement en automne, irrigation, températures élevées (Murgue et al., 2001a ; Durand et al., 2004). C'est dans ces conditions que l'infection des équidés et de l'homme pourra se produire en présence de moustiques en fortes densités susceptibles de piquer les mammifères.

### **2.3.6.2 La fièvre de la Vallée du Rift**

Le virus FVR circule sur le continent africain au sein d'un cycle selvatique duquel l'homme était exclu. Les changements liés à la domestication du bétail ont favorisé l'émergence du virus et la survenue d'épizooties plus fréquentes et l'apparition de foyers où ont été observés les premiers cas humains. Le virus FVR a été isolé en 1930 dans la vallée du Rift au Kenya lors d'une enzootie qui tua 3500 agneaux et 1200 brebis (Daubney et al., 1931). Considéré comme un problème essentiellement vétérinaire limité à la partie orientale et australe de l'Afrique, la FVR est sortie de son berceau d'origine en provoquant en Egypte, en 1977, une épizootie et les premiers cas humains (200000 cas, 600 morts; Meegan, 1979) ; cet épisode épidémique coïncide avec la construction du barrage d'Assouan. Le virus réapparaît sporadiquement : en 1987 en Mauritanie suite à la construction d'un barrage le long du fleuve Sénégal (1224 cas humains, 200 morts ; Walsh, 1988) avec quelques cas sporadiques observés au Sénégal (600 à 1500 cas humains ; Sall et al., 1997), en 1991 à Madagascar (Morvan et al., 1992), en 1993 en Egypte (Arthur et al., 1993), entre 1997 et 1998 au Kenya, Tanzanie, Somalie (89000 cas humains et 1000 morts ; Woods et al., 2002), et en 1998 en Mauritanie

(Nabeth et *al.*, 2001). En 2000, la FVR est signalée pour la première fois hors d’Afrique en Arabie Saoudite et au Yémen (516 cas humains et 87 décès ; Jupp et *al.*, 2002). En 2007, des épizooties ont été observées en Afrique de l’Est (Kenya, Tanzanie et Somalie) et une circulation virale est confirmée dans l’Océan Indien dans l’archipel des Comores (<http://www.promedmail.org>, archive number: 20080522.1690).

De ces observations, plusieurs facteurs peuvent être incriminés dans l’émergence de la FVR : (1) les modifications écologiques liées au développement économique (la construction du barrage (Egypte en 1977, Mauritanie en 1987), (2) la déforestation ou changements de pratiques agropastorales (Madagascar en 1990), (3) les changements de mode de vie (la cohabitation avec des animaux domestiques en fortes densités), (4) les perturbations climatiques (l’Afrique de l’Est en 1997), et (5) les échanges commerciaux (Arabie saoudite en 2000).

Le mode de transmission du virus FVR est complexe faisant intervenir différentes espèces de vecteurs de bio-écologie très contrastée. La circulation à bas bruit du virus semble être la règle comme l’atteste l’isolement répété du virus durant les périodes inter-épidémiques (Meegan et Bailey, 1988). Les épizooties surviennent dès la mise en eau de certaines excavations naturelles. Les moustiques ayant conservé le virus par transmission verticale (transmission du virus de la femelle infectée à sa descendance) (Linthicum et *al.*, 1985, 1987) démarrent la circulation virale en contaminant les animaux sauvages. Ces vertébrés deviennent alors la source d’infection pour d’autres populations de moustiques présentes en très fortes densités et caractérisées par une préférence trophique vis à vis d’animaux domestiques (bovins, ovins, caprins, camélidés et buffles). Les animaux domestiques infectés deviennent alors une source de contamination pour l’homme par piqûres de moustiques essentiellement anthropophiles tels que certains membres du complexe *Cx. pipiens* ou par contact direct via l’émission d’aérosols lors de l’abattage des animaux malades.

### **2.3.6.3 Cycle du virus chez le moustique**

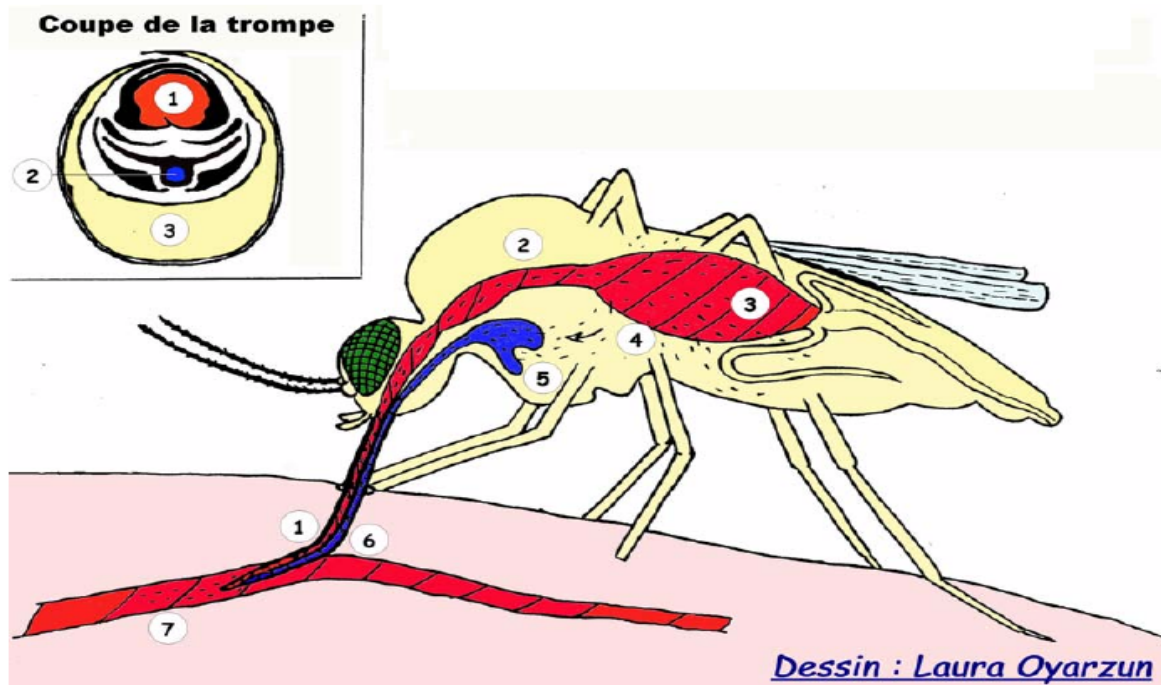


Figure (13) : Cycle du virus chez le moustique (In RID-IP ,2005)

En médaillon, une coupe de la trompe du moustique femelle où l'on distingue :

- (1) : le labre qui renferme le canal alimentaire par lequel le sang et les autres liquides sont aspirés.
- (2) : l'hypopharynx à l'intérieur duquel passe le canal salivaire
- (3) : le labium, sorte de fourreau des pièces buccales qui se replie vers l'arrière lors de la piqûre.
- Les pièces sans numéro sont les mandibules et les maxilles qui, par leurs mouvements, percent les tissus et dirigent la trompe vers un vaisseau sanguin.

- Phase 1 : A l'occasion d'un repas de sang sur un hôte en phase de virémie (virus présent dans le sang périphérique), la femelle moustique prélève une certaine quantité de particules virales.
- Phase 2 : Ces virus remontent avec le sang ingéré dans l'œsophage et aboutissent ...
- Phase 3 : dans l'estomac où ils résistent aux sucs digestifs du moustique.
- Phase 4 : Du fait du haut degré d'adaptation entre le virus et son vecteur, les particules virales vont pouvoir franchir la barrière de la paroi de l'estomac et, après une phase de latence, vont se répliquer avec une grande intensité dans les cellules du moustique.
- Phase 5 : Au cours de l'envahissement de la totalité de l'organisme du moustique, les virus vont se retrouver au niveau des glandes salivaires à l'intérieur desquelles ils vont se concentrer.
- Phase 6 : Lors d'un nouveau repas de sang sur une personne saine, le moustique femelle injecte la salive infectante qui joue à la fois le rôle d'anesthésiant, de

lubrifiant pour les pièces buccales mobiles, d'anticoagulant et d'aide à la digestion grâce aux enzymes qu'elle contient. Entre la phase (1) et la phase (6) s'est écoulé un laps de temps de l'ordre de 10 à 14 jours appelé temps d'incubation extrinsèque, ce temps est dépendant de la température. Par la suite, la femelle devenue infectante le restera pendant tout le reste de sa vie.

- Phase 7 : Ce faisant, elle inocule un peu de virus qui, pour peu que la personne en question soit réceptive, va déclencher la maladie.

## **2.4 Echantillonnage des populations de *Culex pipiens***

Nous avons réalisé des captures du 28 juin au 05 octobre 2010. Au départ 6 stations (gîtes épigés et gîtes hypogés) dans les sites : urbains, péri-urbains et ruraux, devaient être échantillonnées dans chaque région (El-Kala, M'Sila et Tinerkouk). En ce qui concerne El-Kala, les 6 stations ont été échantillonnées, à défaut de trouver des stations disponibles dans les autres régions seulement 03 ont été échantillonnées à M'Sila et 01 seule à Tinerkouk.

- L'échantillonnage des larves c'est fait grâce au Dipping (la technique de la louche) (Silver, 2008), au moins 500 larves de *Cx. pipiens* ont été capturées à partir de chacun des 10 gîtes.

- On n'a réalisé 10 coups de louche (1 litre d'eau par louche) en bordure du gîte larvaire. La densité larvaire de chaque gîte a été estimée par la technique des « classes ». Au niveau de chaque gîte nous avons noté la végétation environnante ainsi que les paramètres physico-chimique (Température, pH, salinité, le pourcentage de l'O<sub>2</sub>) (voir annexes).

- L'eau de chaque gîte a fait l'objet d'une analyse de la DBO5 (demande biologique en oxygène pendant 5 jours) pour estimer la teneur de l'eau en matière organique.

- Une fois prélevés, les échantillons sont mis dans des récipients en plastique munis d'un couvercle. Pendant toute la phase de collecte, les récipients n'ont pas été fermés hermétiquement et ont été installés à l'ombre, afin de limiter la mortalité des larves jusqu'à ce qu'elles soient ramenés au laboratoire.

### 2.4.1 Estimation de la densité larvaire

Le nombre de larves et de nymphes est estimé à chaque coup de louche, on donne un nombre approximatif de stade pré-imaginaux qui est attribué à une classe selon le tableau suivant :

Tableau 02 : Estimation de la densité larvaire.

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

### 2.4.1 La capture des femelles gorgées

La capture des femelles gorgées dans les habitations ainsi que dans les étables et les abris abandonnés (milieux urbains, suburbains et ruraux) a été réalisée au moyen d'un aspirateur à bouche durant le jour dans des sites de repos préférentiels pour les moustiques (intérieur des maisons, cages d'escaliers, étables...etc.). Au total 80 femelles gorgée ont été capturés à raison de 20 femelle/site au niveau des 04 sites suivant : El-Kala Urbain, El-Kala Périurbain, El-Kala Rural et M'Sila Urbain. Celles-ci sont identifiées morphologiquement puis placées dans des tubes contenant du silicagel (dessiccateur) et conservés dans un congélateur jusqu'à analyse du repas de sang.

## 2.5 Méthodes de laboratoire adoptées

Les techniques utilisées au laboratoire consistent en six volets, soit la préparation et le montage des larves, l'identification au laboratoire de l'espèce recueillie sur le terrain, la récupération des adultes émergés, l'étude de la biologie de la reproduction, l'identification des espèces d'hôtes sur lesquelles s'est gorgé le moustique, l'analyse moléculaire afin de distinguer les formes *pipiens* et *molestus* et enfin l'infection expérimentale et l'étude de la compétence vectorielle des moustiques vis-à-vis des virus (WN) et du (FVR).

### 2.5.1 Description de l'insectarium (voir annexes)

Les stades pré imaginaux capturés sont transportés au laboratoire et mis en élevage dans un insectarium comportant des étagères sur les quelles va s'effectuer l'élevage de nos

moustiques. Une température de 24 à 28°C est maintenue grâce à un chauffage et une humidité relative de 60 à 80% est assurée grâce à un humidificateur à ultrasons. Nos élevages ont reçu 12 heures de lumière par jour.

### **2.5.2 Tri des larves (voir annexes)**

À l'aide d'une pipette souple, les larves sont triées de façon à ne garder que l'espèce *Cx. pipiens* dans les bacs. Celles-ci sont déposées vivantes dans une goutte d'eau distillée dans un verre de montre et sont observées et identifiées sous loupe binoculaire à l'aide d'un logiciel d'identification (Les Culicidae de l'Afrique Méditerranéenne, IRD, 1999).

### **2.5.4 Mise en élevage (voir annexes)**

Les larves ainsi triées sont mises en élevage en insectarium dans des bacs en plastiques (30 cm x 10 cm x 5 cm) à raison de 200 larves par litre d'eau distillée et par bac. Les larves sont nourries à l'aide de croquettes pour chat riche en protéines.

Dès leurs apparition les nymphes sont placées une à une dans des tubes à essais avec 10 ml d'eau distillée où elles effectueront leurs émergence. Cette opération est reconduite pour toutes les populations recueillie.

### **2.5.5 Mise en couple (voir annexes)**

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

Les gobelets sont soigneusement couverts par un tulle moustiquaire maintenu avec un élastique et sur lequel est déposé un bout de coton imbibé d'une solution contenant 10% de sucre. Ainsi on doit former 40 couples pour chaque gîte échantillonné. Le couple est maintenu ainsi entre 3 à 5 jours afin de permettre la maturation sexuelle des mâles et des femelles et permettre leur accouplement.

### **2.5.6 Gorgement des femelles (voir annexes)**

Après la mise en couple, 20 femelles parmi les 40 correspondant à chaque gîte sont retirées à l'aide d'un aspirateur à bouche et placées dans une cage cubique (25 cm x 25 cm x 25 cm) recouverte d'un tulle moustiquaire. Ces femelles ne reçoivent pas de jus sucré pendant 24 heures afin d'exciter leurs envies de piquer. Par la suite on place une caille dans une petite cage métallique (20 cm x 10 cm x 10 cm) laquelle est introduite à l'intérieur de la cage

contenant les 20 femelles. Cette opération s'effectue durant toute la nuit. Très tôt le matin la caille est retirée et les femelles, qui se sont gorgées, sont mises individuellement dans un gobelet après avoir retiré les males. Les autres femelles sont maintenues dans la cage afin de refaire un ou deux essais de gorgement les nuits suivantes.

Remettre la solution sucrée, une fois que la femelle s'est nourrie de sang. Pour les 20 couples sans repas de sang, proposer la solution sucrée en continu.

### **2.5.7 Comptage des pontes (voir annexes)**

Après la ponte, on compte le nombre d'œufs (par femelle), à l'aide d'une loupe binoculaire, qu'on transvase soigneusement dans un récipient pour accueillir les larves néonates.

### **2.5.8 Comptage des larves néonates**

Après l'éclosion des larves, on compte leur nombre, à l'œil nu, pour déterminer les taux de fertilité (par femelle, définir le nombre de larves sur le nombre total d'œufs).

### **2.5.9 Préférence trophique (voir annexes)**

Les habitudes alimentaires d'un vecteur déterminent son contact avec l'homme et/ou les animaux et, par la même occasion, avec les pathogènes. Certaines espèces culicidiennes présentent une grande spécificité mais parfois, on peut observer des comportements trophiques différents chez des populations d'une même espèce vivant dans des zones géographiques différentes (Rodhain et Perez, 1985). Les affinités trophiques du complexe *Culex pipiens*, est un facteur important dans l'épidémiologie des affections qu'il transmet. La fréquence de piqûres de *Culex pipiens* sur homme influence la probabilité qu'un moustique, en contact avec un porteur de virus, devienne infecté puis infectant. La transmission d'une maladie à vecteur peut donc être influencée par les comportements de la population locale (Hamon J et al., 1963). La connaissance de la préférence alimentaire d'une espèce culicidienne dans une région donnée constitue donc un paramètre dans la détermination de son rôle vecteur.

### 2.5.9.1 Rappel sur le test ELISA

ELISA est l'acronyme d'un examen de laboratoire appelé (en anglais) Enzyme-linked immunosorbent assay, littéralement « dosage d'immunoabsorption par enzyme liée », c'est -à-dire dosage immuno-enzymatique sur support solide. Ce test entre dans le cadre plus général des EIA (*enzyme immunoassay*), dans lequel le dosage est couplé à une réaction catalysée par une enzyme qui libère un composant coloré suivi par une spectroscopie, par opposition aux RIA (*radio immunoassays*) dans lesquels l'anticorps est marqué par un radioélément et dont le dosage mesure un nombre de désintégrations par secondes. L'ELISA est une technique biochimique, principalement utilisée en immunologie, mais pas uniquement, afin de détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. La technique utilise un ou deux anticorps. L'un de ceux-ci est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire, responsable du nom de la technique, peut aussi causer l'émission d'un signal par un substrat chromogène ou fluorogène.

### 2.5.9.2 Déroulement du test ELISA

Les préférences trophiques ont été analysées par ELISA directe en cherchant, l'espèce d'hôte sur laquelle s'est gorgé le moustique. Les IgG spécifiques de l'hôte vertébré que l'on détecte dans le repas de sang de la femelle seront mis en évidence grâce à un anti-IgG homologue marqué à la peroxydase. Une gamme d'hôtes comprenant les espèces de vertébrés habituellement trouvées dans chaque site a été testée : Homme, Bœuf, Mouton, poule et Cheval.

Les réactions d'ELISA sont effectuées sur des microplaques à 96 cupules en utilisant les abdomens des 80 femelles des moustiques gorgées de sang qui ont été capturées au niveau des habitations et d'une étable d'équidés ( les trois sites d'El Kala ;urbain, périurbain et rural et le site urbain de M'Sila ) et qui ont été triés et identifiés morphologiquement à l'aide d'un logiciel d'identification (Les Culicidae de l'Afrique Méditerranéenne, IRD, 1999),

Les abdomens de chaque femelle gorgée sont découpés délicatement à l'aide d'un bistouri stérile et sont broyées individuellement, à l'aide d'un broyeur à piston, dans des tubes de 1,5 ml contenant 250 µl de tampon PBS. Mettre 50 µl de chaque solution d'abdomen de moustique dans chacun des 10 puits d'une seule ligne (12 puits) de la microplaque, déposer le témoin négatif (PBS) au niveau du premier puits et le témoin positif

(Sérum de sang humain, de bœuf, de mouton, de poule et de cheval dilués et déposés au niveau de la 12<sup>ème</sup> colonne) au niveau du dernier (voir annexe).

Sensibiliser les plaques en les incubant 3 h à la température de la pièce ou la nuit à + 4°C. Après incubation éliminer les solutions de la plaque et effectuer 4 lavages avec une solution de PBS-Tween. Déposer par la suite 50 µl des anticorps conjugués marqués à la peroxydase (Anti IgG-Homme, Anti IgG-Bœuf, Anti IgG-Mouton, Anti IgG-Poule et Anti IgG-Chevale) de façon à ce que chaque rangée corresponde à un anticorps conjugué (voir annexe).

Laisser incuber 1 heure à température ambiante. Cette étape est suivie de deux lavages au PBS-Tween. Par la suite on dépose dans chaque puits 100 µl de la solution du substrat à base d'Ortho-tolidine (composition en annexe).

La révélation s'effectue à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante (coloration bleu). Juste après cette incubation on effectue un blocage avec 50 µl d'acide sulfurique 4N déposé dans chaque puits (Coloration jaune). La lecture de la densité optique est réalisée à 600 et 450 nm sur le lecteur ELISA.

Ce test permet d'obtenir un résultat quantitatif qui se visualise par la présence d'une coloration dans les puits (coloration bleu) où l'antigène recherché est présent. La présence d'une coloration dans un puits indique que l'anticorps lié à l'enzyme s'est fixé à l'antigène qui est représenté par l'anticorps IgG de l'hôte sur lequel le moustique s'est gorgé.

## **2.5.10 Position taxonomique (voir annexe)**

### **2.5.10.1 Rappel sur l'ADN et la PCR**

L'ADN : l'acide désoxyribonucléique est une macromolécule que l'on retrouve dans toutes les cellules vivantes, on dit que l'ADN est le support de l'hérédité ou de l'information génétique ,car il constitue le génome des êtres vivants et se transmet en totalité ou en partie lors des processus de reproduction. L'ADN détermine la synthèse des protéines. Chimiquement l'ADN est composé de séquences de nucléotides ,chaque nucléotide est composé d'un sucre (désoxyribose) ,un phosphate, une base azotée (A,T,C ou G) , l'ADN est une molécule formée de deux brins qui s'apparient selon les couples A-T et C-G ,c'est cette notion de complémentarité qui assure le maintien du double brin.

PCR : « Polymérase Chain Réaction » en anglais, est une méthode de répllication ciblée in vitro, c.-à-d. une réaction d'amplification en chaine de séquences cibles d'ADN pour

détecter d'infimes fragments d'ADN, déterminer d'espèces, étapes préparatoire pour autres techniques (séquençage.....) ,donc la PCR permet d'amplifier une séquence d'ADN pour identifier un gène.

### **2.5.10.2 Déroulement de la PCR**

Dix (10) moustiques pris au hasard, issus de chacune des 10 populations étudiées en insectarium et conservés à – 20 °C, ont fait l'objet d'un typage moléculaire par PCR.

Nous avons amplifié des régions génomiques situées au niveau des microsatellites. Les amorces suivantes ont été utilisées : pipCQ11R 5-CATGTTGAGCTTCGGTGAA-3 ; molCQ11R 5- CCCTCCAGTAAGGTATCAAC-3 et CQ11F2 5 - GATCCTAGCAAGCGAGAAC-3 (Bahnck et Fonseca, 2006). Nous avons utilisé un volume final de 50 µl avec une concentration finale de : 0,1 mol/l de pipCQ11R, 0.15 mol/L de molCQ11R et CQ11F2, tampon PCR 1×, 200 mol/L de chaque dNTP, 2 mol/L de MgCl<sub>2</sub>, 1 U of Taq-polymérase, et 1 patte du moustique à typer comme source d'ADN.

Le programme du Thermocycleur utilisé (voir en annexe).

### **2.5.11 La compétence vectorielle**

Le cycle de transmission d'un pathogène par un insecte vecteur reste intimement dépendant des relations qui lient ce pathogène, son hôte invertébré (le vecteur) et son hôte vertébré. Chaque composante de ce système vectoriel est modélée par des facteurs environnementaux qui composent les facteurs extrinsèques (Beaver et Jung, 1985 ; Reeves, 1965), et par des facteurs intrinsèques, parmi lesquels les mécanismes moléculaires et génétiques contrôlant par exemple la capacité des moustiques à transmettre un pathogène. Les facteurs extrinsèques influent sur les chances de contact entre le vecteur et l'hôte vertébré approprié. Ils comprennent, entre autres, la densité et la composition des populations de vecteurs et de l'hôte vertébré. Les facteurs intrinsèques, sous dépendance d'un contrôle génétique, influent sur les préférences trophiques du vecteur, sa capacité à s'infecter après ingestion du repas de sang infecté, puis à assurer le développement du pathogène, enfin à le transmettre au vertébré lors d'une piqûre. De plus, les facteurs environnementaux, tels que la température, agissent sur les facteurs intrinsèques en affectant la physiologie du vecteur et, par voie de conséquence, le développement et/ou la multiplication du pathogène et, probablement, l'expression des facteurs génétiques qui contrôlent la compétence vectorielle (Hardy et al. 1983).

La compétence vectorielle peut être définie par l'aptitude d'un insecte à s'infecter, amplifier et transmettre le virus en conditions de laboratoire (Rodhain et Perez 1985). Pour démontrer la capacité d'une espèce à transmettre un virus, il faut reproduire expérimentalement le cycle de transmission, c'est-à-dire réaliser (1) le gorgement des moustiques sur un hôte virémique, puis (2) des tests de transmission à un hôte naïf. Pour éviter l'utilisation d'animaux comme hôtes donneurs ou receveurs. On considère que le cycle peut être reproduit par des méthodes artificielles permettant d'exposer oralement les moustiques au virus et d'isoler ce dernier de la salive.

Au fil des années, la liste des espèces compétentes pour le virus West-Nile en laboratoire s'allonge : *Cx. quinquefasciatus* (Varma 1960), *Cx. theileri* (Jupp et al., 1966b), *Cx. tritaeniorhynchus* (Hayes et al., 1980), *Cx. neavei* Theobald (Jupp et al., 1986), et aussi *Aedes geniculatus* (Olivier), *Aedes punctor* (Kirby) et *An. plumbeus* (Vermeil et al. 1960) (*in* Balenghien, 2006).

Les interactions entre le moustique et le virus West Nile ont été étudiées en détail pour les espèces considérées comme impliquées dans les cycles de transmission : *Cx. pipiens* en Israël (Tahori et al., 1955), *Cx. univittatus* en Afrique du Sud (Jupp et McIntosh 1970b ; Jupp 1974 ; Cornel et al., 1993) et *Cx. tritaeniorhynchus* au Pakistan (Ahmed et al., 1979 ; Baqar et al., 1980 ; Hayes et al., 1980 ; Akhter et al., 1982). Enfin, après l'introduction du virus West Nile aux États-Unis en 1999, les études de compétence vectorielle se sont multipliées, testant de nombreuses espèces nord-américaines de moustiques. La quasi-totalité de ces espèces s'est avérées est capable de transmettre le virus, mais à des niveaux très différents (*in* Balenghien, 2006).

#### **2.5.11.1 Infection des tissus du moustique**

La dissémination du virus West Nile dans les différents organes a été bien décrite chez *Cx. quinquefasciatus* (Girard et al., 2004). Le virus infecte d'abord les cellules du tube digestif. Après invasion des cellules intestinales, le virus gagne l'hémocoèle. Le terme de « barrière intestinale » regroupe l'ensemble des filtres (membranes intestinales) possibles associés à ces étapes. Par la suite, le virus arrive dans le système salivaire et se concentre dans la salive. Le terme de « barrière salivaire » correspond aux éléments qui s'opposent à ce passage et donc à la transmission du virus. Le temps nécessaire à un moustique pour devenir infectant (i.e. présence de virus dans la salive) suite au repas infectieux est appelé durée d'incubation extrinsèque. Cette dernière est fortement dépendante de la température. D'autre

part, un facteur quantitatif important intervient, le seuil d'infectivité, dose virale en dessous de laquelle un vecteur, même compétent, ne s'infectera pas (*in* Balenghien, 2006).

### **2.5.11.2 Estimation de la compétence vectorielle**

Elle dépend du seuil d'infectivité et des deux types de barrières (intestinale et salivaire). Le taux d'infection permet de mesurer le seuil d'infectivité, le taux d'infection disséminée l'effet global de la barrière intestinale et le taux de transmission disséminée l'effet de la barrière salivaire (Turell et al., 2000). C'est la barrière intestinale qui est déterminante dans la compétence vectorielle des moustiques pour le virus West Nile. En effet, le taux de transmission disséminée est toujours très élevé quelle que soit l'espèce (Turell et al., 2005). De plus, la transmission du virus West Nile par des femelles inoculées par voie intra-thoracique (évitement de la barrière intestinale) est possible quelle que soit l'espèce de moustique. De tels essais ont été réalisés pour *Cx. vishnui* (Hurlbut, 1956), *Cx. fuscocephala* Theobald, *Cx. pseudovishnui* Colless, *Ae. caspius*, *Ae. indicus* (Theobald) et *Ae. lineatopennis* (Ludlow) (Akhter et al., 1982), *Ae. cantator* (Coquillett) (Turell et al., 2005) ou *Coquillettidia pertubans* (Walker) (Sardelis et al., 2001). Seul *Psorophora ferox* (Von Humboldt) fait exception à la règle et ne transmet pas après inoculation intra-thoracique (Turell et al., 2005). Le taux de transmission (nombre de femelles transmettant le virus par piqûre divisé par le nombre de femelles exposées oralement) permet donc une mesure globale de la compétence vectorielle (*in* Balenghien, 2006).

### **2.5.11.3 Une espèce étalon**

Les résultats des infections expérimentales menées sur *Cx. pipiens* sont relativement homogènes malgré les différences d'origine géographique : Israël (Tahori et al., 1955), Égypte (Hurlbut, 1956), Afrique du Sud (Jupp, 1976) et États-Unis (Turell et al., 2000 ; Turell et al., 2001 ; Goddard et al., 2002). La dose virale nécessaire pour infecter 50 % des femelles (DI50) gorgées sur animal virémique est de  $10^{4,8}$  à  $10^{5,6}$  UFP/ml (Tiawsirisup et al., 2004 ; Erickson et al., 2006) et de  $10^{4,4}$  DL50/ml, après 14 à 18 jours à 26-27 °C (Jupp, 1976), les titres étant relativement comparables. Pour un titre de  $10^7$  PFU/ml, le taux de transmission est compris entre 20 et 70 % pour 14 jours d'incubation à 26-28 °C (Turell et al., 2001 ; Goddard et al., 2002 ; Tiawsirisup et al., 2005a). Toutes ces infections sont réalisées avec la forme *pipiens*. Les résultats semblent équivalents avec la forme *molestus*, gorgée sur poulet virémique ( $10^{6,3}$  à  $10^{7,0}$  UFP/ml), avec un taux de transmission de 47 % (au moins 16 jours à 26 °C) (Turell et al., 2006). *Culex pipiens* peut donc être considéré comme une espèce

moyennement compétente, avec une DI50 assez forte et un taux de transmission moyen (*in Balenghien, 2006*).

#### **2.5.11.4 Infections expérimentales des candidats vecteurs**

Ces infections expérimentales ont été réalisées avec *Cx. pipiens*. Tous les individus (F1) ont été collectés durant l'été 2010 à M'Sila et Tinerkouk, Les moustiques (F3) ont été considérés en fonction de leur statut autogène / anautogènes : (I) autogènes (AU) les moustiques pondent le premier lot d'œufs sans prendre de repas sanguin, et (II) anautogènes (AN) les moustiques pondent leurs œufs après un repas de sang.

##### **2.5.11.4.1 Les infections expérimentales**

###### **2.5.11.4.1.a Les souches virales**

La souche avirulente C13 du VFVR, a été isolée d'un cas humain bénin en République Centre Africaine en 1974 (Muller R. et *al.*, 1995). Cette souche avirulente possède un facteur de virulence, la protéine NSs délétée de 70% de sa phase ouverte de lecture. Le stock viral utilisé pour les infections orales des moustiques a été produit après plusieurs passages sur cellules Vero et un seul passage sur des cellules d'insectes C6/36 (*Aedes albopictus*).

La souche du VWN a été isolée d'un cheval infecté en Camargue en 2000 (Murgue et *al.*, 2001b). Le stock viral a été produit après quatre passages sur cellules Vero et un passage sur C6/36.

Le titre viral des stocks viraux utilisé a été estimé en unité formant plaque UFP/ml, par comptage des plaques de lyse obtenues après infection de cellules Vero de rein de singe.

###### **2.5.11.4.1.b Le repas sanguin infectieux**

Les femelles âgées de 10 à 20 jours sont mises à jeun 24 h avant l'infection. Le repas artificiel est constitué de deux tiers de globules rouges de lapin et un tiers de suspension virale. Le titre viral du repas infectieux est de  $10^{8.5}$  UFP/ml pour le VFVR et de  $10^{7.8}$  UFP/ml pour le VWN. Un phagostimulant, l'ATP, est rajouté dans le repas à une concentration de  $5.10^{-3}$  M. Les femelles se gorgent à travers une membrane d'intestin de porc soutenant le sang infecté pendant 30 min. Ainsi, les femelles pleinement gorgées sont triées, placées dans des boîtes en carton et nourries avec un coton imbibé d'eau sucrée à 10 %.

#### **2.5.11.4.2 La salivation forcée**

Au terme de la période d'incubation extrinsèque qui est de 14 jours pour le VWN, de 14 et 21 jours pour le VFVR, les femelles sont immobilisées par le froid, les ailes et les pattes sont arrachées puis le proboscis est introduit dans un cône contenant 5 µl de sérum de veau foetal (SVF). Après 45 min, le contenu du cône est mis en suspension dans 45 µl du milieu Leibovitz L15 à 10 % de SVF. Les salives et les femelles ayant salivé sont conservées à -80°C jusqu'à leur analyse. Le nombre de particules virales a été estimé en UFP/salive.

#### **2.5.11.4.3 L'immunofluorescence indirecte**

La détection de chaque virus se fait par immunofluorescence indirecte (IFI) sur squash de tête des moustiques (Kuberski et Rosen, 1977). Le taux d'infection disséminée représente le nombre des femelles ayant des squashes positifs rapportés au nombre de femelles ayant survécu au terme de la période d'incubation extrinsèque. Les femelles présentant un squash de tête positif sont ainsi capables d'assurer la dissémination virale au-delà du tube digestif.

Cette étude a été réalisée à l'Unité de « Génétique Moléculaire des Bunyavirus » de l'Institut Pasteur de Paris.

### **2.6 Analyse statistiques des résultats**

On a utilisé le logiciel le logiciel statistica 6.1 version française 2003.

Les comparaisons ont été réalisés par les tests ; Le test U de Mann Whitney, l'Anova de Kruskal-Wallis et le test exact de Fisher avec un seuil de signification de 5%.

#### **2.6.1 Le test U de Mann Whitney**

Permet d'effectuer la comparaison de deux échantillons indépendants, de faibles effectifs, Ce test s'applique essentiellement sur des variables qualitatifs.

#### **2.6.2 L'Anova de Kruskal Wallis**

Ce test est utilisé pour comparer au moins trois échantillons, et tester l'hypothèse nulle suivant laquelle les différents échantillons à comparer sont issus de la même distribution.

### **2.6.2 Le test exact de Fisher**

Ce test est une alternative au test de Chi-deux lorsque les échantillons sont petits. Le principe de ce test est de déterminer si la configuration observée dans le tableau de contingence est une situation extrême par rapport aux situations possibles compte tenu des distributions marginales.



# Résultats

### **3. RÉSULTATS**

L'étude menée durant la période s'échelonnant entre le 28 Mai et le 05 Octobre 2010, avait pour but de mieux appréhender le rôle des différentes espèces dans la transmission des arbovirus WN et FVR et de même, préciser le statut taxonomique du complexe *Cx. pipiens*, trois zones ont étudiées : El Kala (zone humide), M'Sila (zone semi-aride) et Tinerkouk, Adrar (zone saharienne). La structure des populations de *Cx. pipiens* a été abordée en analysant : (I) l'écologie et biologie des espèces, (II) leurs positions taxonomique par PCR et (III) leur compétence vectorielle vis-à-vis des virus WN et FVR par infection expérimentale.

#### **3.1. Ecologie, biologie de la reproduction et préférences trophique**

##### **3.1.1 L'influence des paramètres physico-chimiques (pH, T°C, Salinité g/l, %O<sub>2</sub>) et la DBO5 m/l sur la densité larvaire**

Dans chaque gîte visité on détermine la densité larvaire et on prélève les paramètres physico-chimique, et analysé la teneur d'eau de chaque gîte en matière organique (DBO5) transcrit dans (Tableau 03).

Les densités moyennes les plus élevées ont été remarqué dans les sites suivants : ER El-Kala ; HPU El-Kala ; EU El-Kala, ces résultats sont en fonction de la clarté de l'eau, en effet le nombre de larves augmente dans les eaux les plus claires. Les pH calculés rentraient tous dans la fourchette 7,31 à 8,29 ; les différences remarquées ne sont pas significatives et les écarts ne sont pas représentatifs. La température, la salinité et le pourcentage d'O<sub>2</sub>, suivent le même schéma, voulant dire une fourchette restreinte et des écarts qui ne sont pas significatifs. La DBO5, nous donne une valeur approximative de la teneur en matière organique dans l'eau du gîte, la valeur maximale était remarquée à Tinerkouk, et la valeur minimale à HPU El-Kala.

Tableau 03 : Effets de la composition physico-chimique de l'eau des gîtes sur la densité larvaire.

Station	Densité Moyenne (Nb Larves)	pH	T° (C°)	Salinité (g/l)	O <sub>2</sub> (%)	DBO5 (mg/l)
HU El-Kala	66	7,31	21,1	0,48	1	190
EU El-Kala	255	7,77	21,4	0,44	1	6
ER El-Kala	380	7,87	26,4	0,79	0	32
HR El-Kala	160	8,29	20,2	0,9	1	6
HPU El-Kala	340	7,85	19,2	0,67	0	3
EPU El-Kala	38	8,01	19,1	0,57	0	28
HU M'sila	27	7,9	19,7	1,06	1	7
EPU M'sila	165	8,11	20,3	1,78	0	12
ER M'sila	165	8,1	24	1,66	1	32
HU Tinerkouk	13	7,4	28,6	0,76	0,5	384

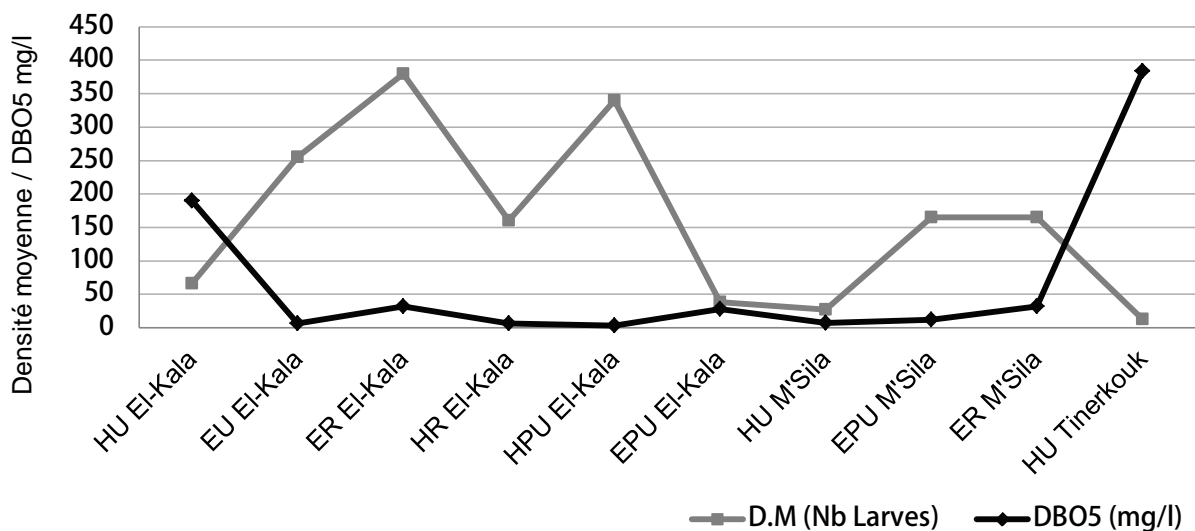


Figure 14 : Relation entre la densité larvaire et la DBO5.

D'après la (Figure 14) nous remarquons que la densité larvaire est inversement proportionnelle à la concentration de l'eau du gîte en matière organique. Plus le gîte est chargé en matière organique plus la densité des larves baisse. Confirmant, les théories selon lesquelles la densité des larves est plus importante dans les eaux claires.

### 3.1.2 Autogénèse / Anautogénèse

Ce caractère biologique est une spécificité de certaines moustiques femelles, primipares, qui ont la possibilité de développer des œufs en utilisant les aliments cumulés au stade larvaire et ce sans prendre un repas sanguin. Elles sont dites autogènes par opposition aux anautogènes qui n'ont pas cette faculté. Lors de notre étude deux séries de comparaisons

ont été réalisées entre le pourcentage des femelles qui ont : pondu par rapport à celles qui n’ont pas pondu parmi les 20 femelles qui n’ont pas reçu de repas sanguin.

- Série I : (HU sang - /EU sang -), (HR sang -/ER sang -), (HPU sang -/EPU sang -) El-Kala. Représentée dans la (Figure 15).

- Série II : (HU sang - El-Kala / HU sang - M’Sila / HU sang- Tinerkouk). Représentée dans la (Figure 16).

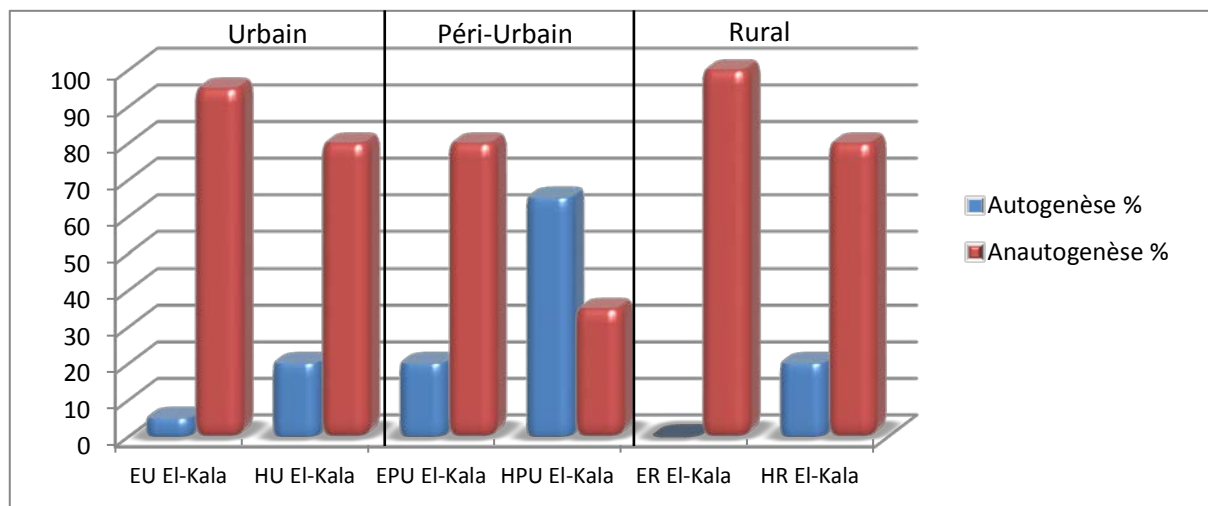


Figure 15 : Pourcentage (Autogenèse/Anautogenèse) 20 Couple sang – (El-Kala).

D’après la (Figure 15), quel que soient les gîtes étudiés (Urbain, Péri-urbain ou Rural), on observe que les femelles des gîtes hypogés ont un taux d’autogenèse plus important que celui des femelles épigés.

Les taux sont normaux et attendus seulement pour les PU, on remarque qu’il y a des autogènes même au niveau des gîtes épigés. Ceci serait expliqué par le fait que les gîtes communiquent entre eux et de ce fait entraînent le passage des larves des gîtes hypogés vers les gîtes épigés.

Concernant les résultats observés chez les femelles des gites HU et HR El-Kala on remarque un faible taux d’autogènes ce qui pourrai être dû à la présence d’une proportion importante d’hybrides anautogènes.

- Dans la série I : les femelles HU sang - ont un taux d’autogenèse plus important que celui des et EU sang - (El-Kala) mais il n’est pas significatif, car le test ne l’a pas mis en

évidence à cause de l'irrégularité des groupes (test de Mann-Whitney,  $U=160$  ;  $p=0,288767$ ). Les femelles HR sang - ont un taux d'autogenèse plus important que celui des et ER sang - (El-Kala) mais il n'est pas significatif, car le test ne l'a pas mis en évidence à cause de l'irrégularité des groupes (test de Mann-Whitney,  $U=170$  ;  $p=0,429082$ ). Par contre les femelles HPU sang - ont montrées une différence significative au niveau de l'autogenèse par rapport aux et EPU sang - (El-Kala) (test de Mann-Whitney,  $U=110$  ;  $p=0,014297$ ). On peut donc en conclure avec 5% de chance de se tromper, que les femelles HPU sang - El-Kala ont un taux d'autogenèse plus important que les femelles EPU sang- El-Kala.

Il est important dans le cadre d'une régression des performances de voir s'il y a des différences entre les femelles au niveau de l'autogenèse dans les 3 wilayas (Figure 16).

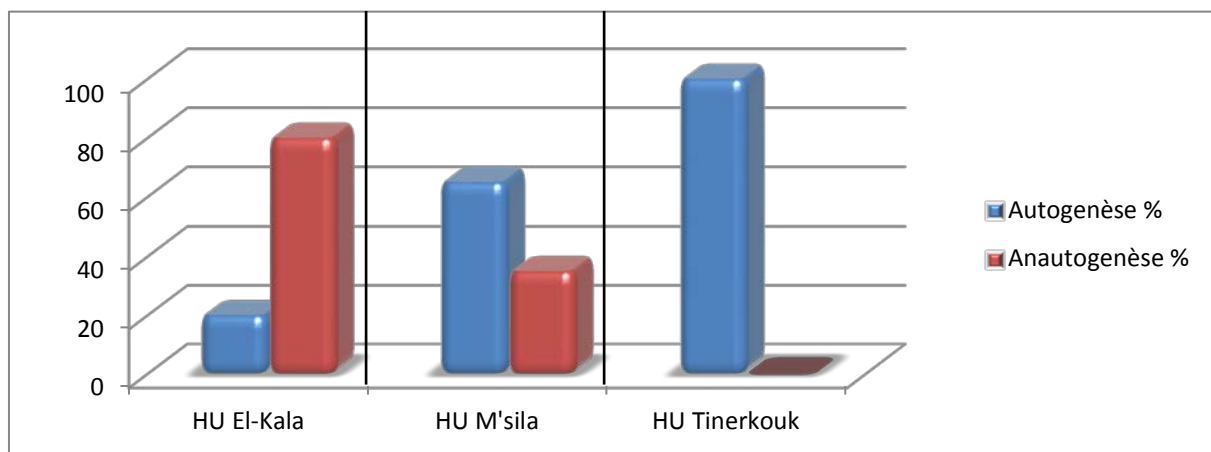


Figure 16 : Pourcentage (Autogenèse/Anautogenèse), 20 Couple sang – (Les trois gîtes hypogés Urbain des 3 wilayas).

- Dans la série II : On a trouvé que les performances d'autogenèse des femelles ont été significativement différentes d'un gîte à l'autre (test de Kruskal-Wallis pour les trois type de gîte,  $\chi^2= 0,00000$  ;  $p=0,00000$ ).

### 3.1.3 Fécondité

On cherche à savoir si le sang permet aux femelles de pondre plus d'œufs.

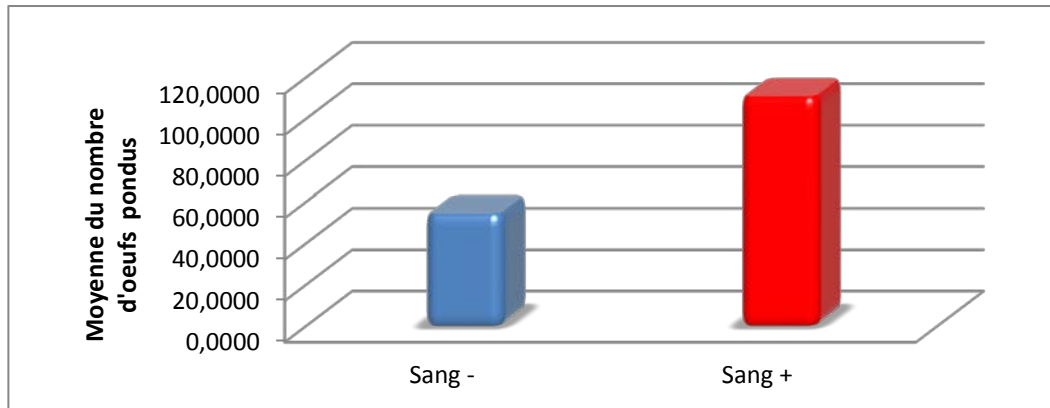


Figure 17 : Moyenne du nombre d'œufs pondus par toutes les femelles sang – et sang +.

La (Figure 17) représente la moyenne du nombre d'œufs pondus par les femelles ayant reçu un repas sanguin par rapport à celles qui n'ont pas reçu.

- Dans cette série (Figure 17) on a comparé entre les moyennes du nombre d'œufs pondus par les femelles sang + et sang -, nous remarquons une différence hautement significative au niveau de la fécondité (test U de Mann-Whitney,  $U=11$  ;  $p=0,00777$ ). On peut donc en conclure avec 5% de chance de se tromper, que les femelles sang + pondent systématiquement plus d'œufs que les femelles sang -.

### 3.1.4 Fertilité

On cherche à savoir si le sang permet aux femelles d'être plus fertiles, en d'autres termes si la prise du repas sanguin agit sur le nombre d'œufs qui vont éclore, donnant des larves. Pour cela on a calculé la moyenne du nombre de larves néonates par rapport aux nombres d'œufs pondus pour les femelles ayant pris du sang et les femelles qui n'ont pas pris de repas sanguin tout gîtes confondus (Figure 18).

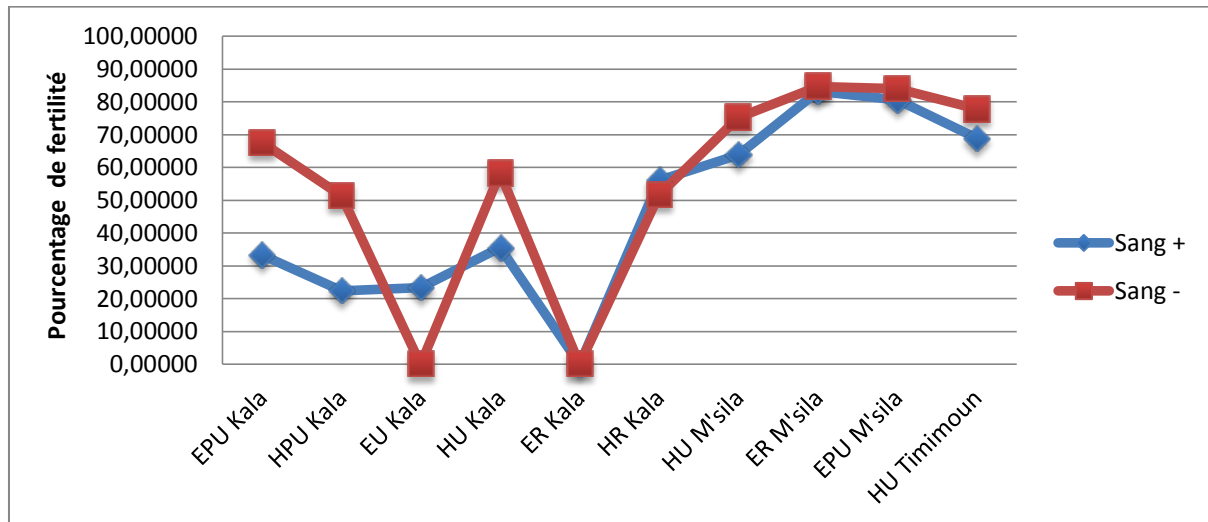


Figure 18 : Pourcentage de fertilité des femelles en fonction de la présence/absence de sang.

D'après la (Figure 18) on remarque que la présence du sang n'influence pas la fertilité des femelles et le test U de Mann Whitney confirme nos observation ( $U=30$  ;  $p= 0,38650$ ).on peut donc conclure avec 5% de chance de se tromper que le sang ne permet pas aux femelles d'être plus fertile.

### 3.1.5 Mode d'accouplement (sténogamie/eurygamie)

Les couples sont dits sténogames lorsqu'ils s'accouplent sur un support dans des espaces confinés (gîtes hypogés) par contre les eurygames préfèrent s'accoupler en plein air dans des espaces à ciel ouvert (gîtes épigés).

Nous avons calculé le pourcentage de réussite de l'accouplement issus des 40 Couples (sang + et sang -) (HU/EU, HR/ER, HPU/EPU) El-Kala. Ce qui se sont accouplés sont sténogame (n'ont pas besoin d'espace), et les autres sont eurygame (ont besoin d'espace). Représenter dans la (Figure 19).

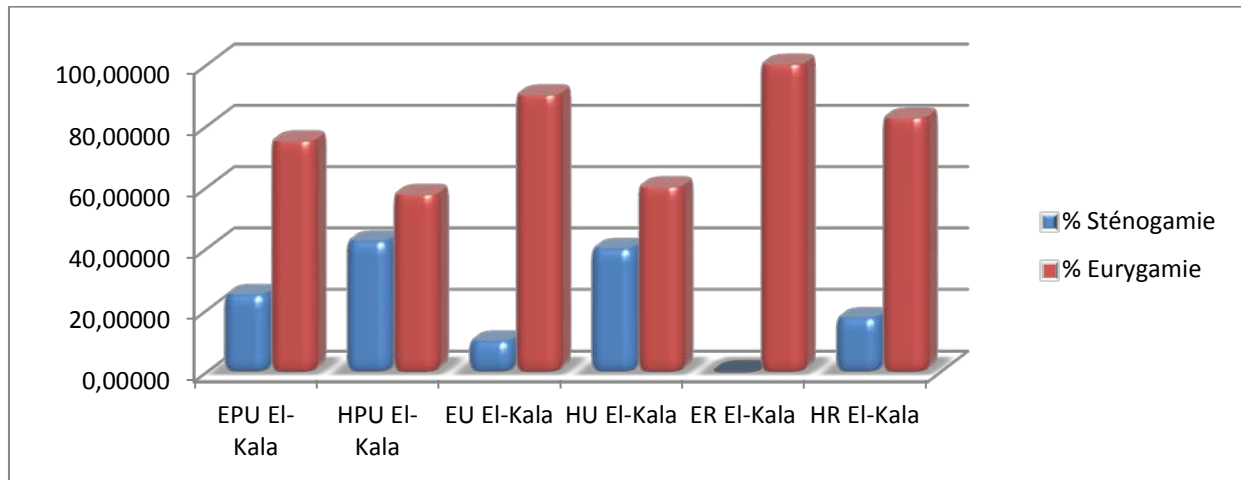


Figure 19 : Pourcentage de sténogamie/eurygamie des 40 couple (sang + et sang -) El-Kala

D'après la (Figure 19) quel que soit le gîte étudié (Urbain, Péri-urbain ou Rural), on observe que les femelles des gîtes hypogés ont un taux sténogamie plus important que celui de femelles épigées. On remarque qu'il y a des sténogames même au niveau des gîtes épigés c'est peut être due au fait que les gîtes communiquent entre eux et il y a passage des larves des gîtes hypogés vers les gîtes épigés.

- Dans cette série (Figure 19) : les femelles **HPU et EPU (El-Kala)** présentent une différence significative au niveau de la sténogamie (test de Mann-Whitney,  $U=345$  ;  $p=0,000005$ ). Les femelles **HU et EU (El-Kala)** présentent des différences au niveau de la sténogamie mais le test ne l'a pas mis en évidence (test de Mann-Whitney,  $U=700$  ;  $p=0,34026$ ). Les femelles **HR et ER (El-Kala)** présentent une différence significative au niveau de la sténogamie (test de Mann-Whitney,  $U= 660$  ;  $p=0,005$ ). On peut donc en conclure avec 5% de chance de se tromper, que les femelles HPU et HR El-Kala ont un taux de sténogamie plus important que les femelles EPU et ER El-Kala respectivement.

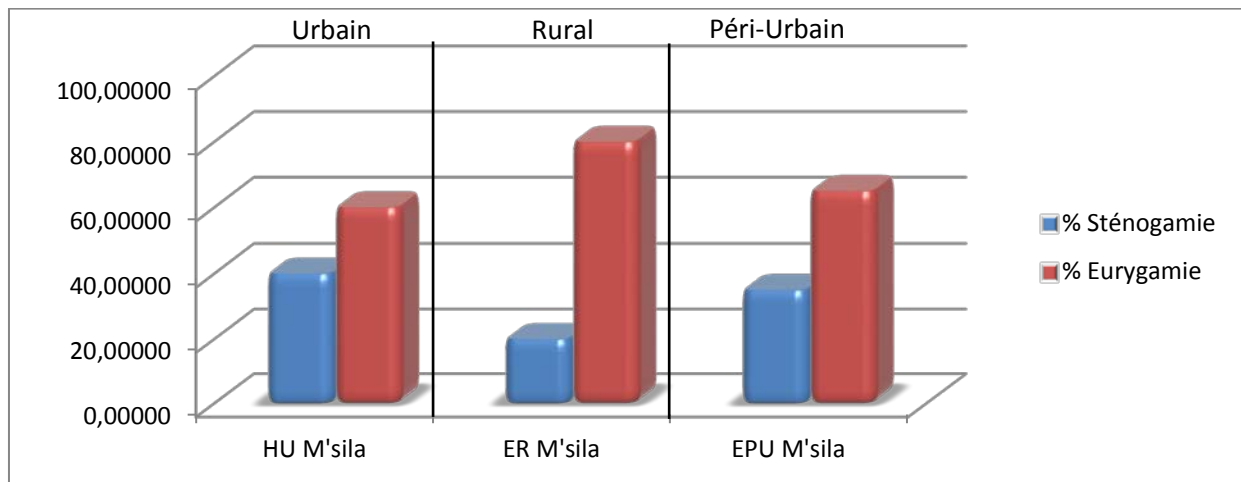


Figure 20 : Pourcentage de sténogamie/eurygamie des 40 couple (sang + et sang -) M'Sila.

On remarque que les pourcentages d'eurygamie sont plus importants que celle de la sténogamie (Figure 20).

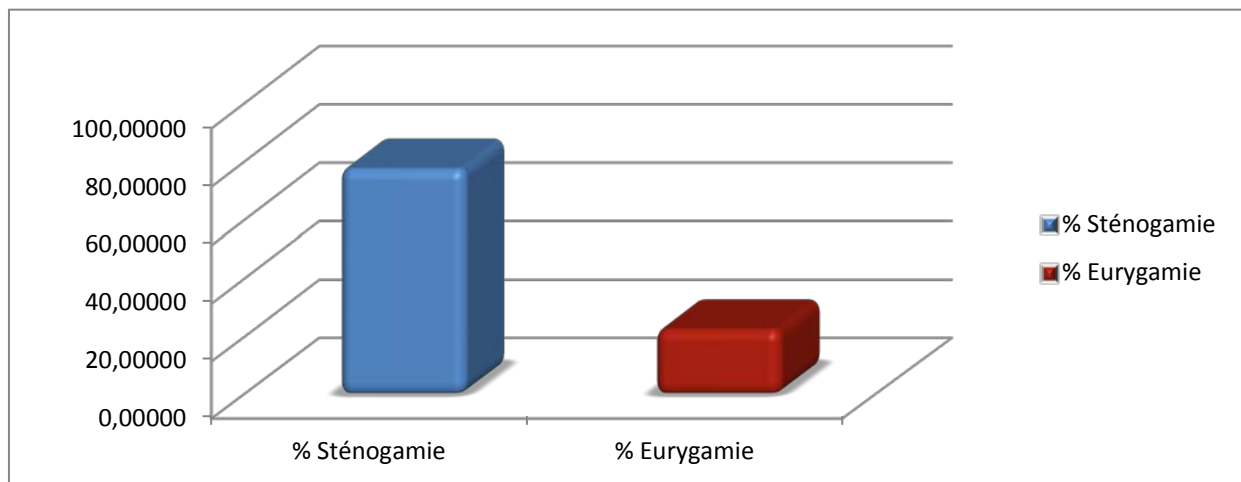


Figure 21 : Pourcentage de sténogamie/eurygamie des 40 couple (sang + et sang -) Tinerkouk.

On remarque que le pourcentage de sténogamie est plus important que celui de l'eurygamie (Figure 21).

### 3.1.6 Préférences trophique

L'étude des préférences trophiques des moustiques dans la nature est difficile et dépend de plusieurs facteurs. À côté des espèces à tendance trophique hautement spécifique, il existe des espèces dont les préférences trophiques dépendent largement de la présence et de l'accessibilité d'hôtes alternatifs.

Dans cette partie, nous passons en revue les variations des préférences trophiques et des taux d'anthropophilie de ce complexe sur un transect nord-sud dans 4 localités d'Algérie, couvrant deux zones biogéographiques, la zone humide et la zone semi-aride.

Les spécimens ont été collectés, au repos durant le jour, dans les habitations et étables par la technique de l'aspirateur à bouche entre (28 Mai et le 05 Octobre 2010). 20 femelles capturées au niveau de chacun des sites suivants : site urbain, périurbain et rural au niveau d'El-Kala et un site urbain au niveau de M'Sila. Les moustiques ont ensuite été triés puis identifiés selon la clé de Brunhes J. et *al.*, (1999) – Les Culicidae d'Afrique méditerranéenne. L'identification des repas de sang pris par les femelles a été effectuée par une technique ELISA directe (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) en cherchant, chez les femelles capturées gorgées de sang, les IgG de différentes espèces (Homme, Bœuf, Mouton, poule et Cheval).

L'origine du repas de sang de 80 femelles gorgées de *Culex pipiens* collectées au repos dans les habitations humaines et les abris d'animaux a été déterminée. Parmi ces repas, 80 ont été identifiés. Globalement, dans les 4 localités prospectées, 38 des repas de sang (47,5%) ont été pris sur homme, 18 repas (22,5%) sur cheval, un seul repas (1,25%) sur poule, Aucun repas n'a été pris sur bœuf ou sur mouton, 7 repas (8,75%) n'ont pas réagi vis-à-vis des anticorps utilisés. Au total 16 repas (20%) ont été pris sur deux ou trois espèces d'hôtes différentes (Tableau 04).

Tableau 04 : Origine des repas de sang prélevés chez des femelles de *Culex pipiens* collectées au repos dans des habitations humaines dans 4 localités d'Algérie.

Gîtes/Origine	Homme		Bœuf		Mouton		Poule		Cheval		Mixte		Inconnue	
	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%
<b>El-Kala U.</b>	<b>20</b>	<b>100</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>El-Kala P.U</b>	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>	<b>5</b>	0	0	<b>13 (H/M)</b>	<b>65</b>	<b>6</b>	<b>30</b>
<b>El-Kala R.</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>18</b>	<b>90</b>	<b>2(C/B)</b>	<b>10</b>	0	0
<b>M'Sila U.</b>	<b>18</b>	<b>90</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>1(H/P)</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>5</b>
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>47,5</b>	0	0	0	0	<b>1</b>	<b>1,25</b>	<b>18</b>	<b>22,5</b>	<b>16</b>	<b>20</b>	<b>7</b>	<b>8,75</b>

H : Homme, M : Mouton, P : Poule, C : Cheval, B : Bœuf / U : urbain, P.U : péri-urbain, R : Rural.

### 3.1.6.1 Fluctuations spatiales des préférences trophiques (Voir Figure 22)

#### - Site Rural d'El-Kala

Au niveau du site Rural d'El-Kala, nos résultats ont montré que 75% des femelles *Cx. pipiens* s'étaient nourries sur Cheval et 25% avaient pris un repas mixte (homme, Bovin, mouton). Le test de Kruskal-Wallis (Chi-Deux = 51,42857 ;  $p = 0,0000$ ) montre qu'au niveau de ce site la préférence trophique des femelles capturées a été nettement en faveur du cheval, on peut donc en conclure avec 5% de chance de se tromper, que les femelles du site Rural d'El-kala sont d'affinité zoophile.

#### - Site Péri-urbain d'El-Kala

De même, dans le site Périurbain d'El-Kala, on a observé que 0 % des femelles gorgés avaient pris un repas de sang sur mouton, 5% se sont nourries sur poule, 65% avaient pris des repas mixtes (homme, Bovin, mouton) et 30% ont pris des repas de sang d'origine inconnue. Dans ce site, il y a une préférence significative des moustiques testées vis-à-vis de l'hôte animale comme le montre le Test de Kruskal-Wallis (Chi-Deux = 8,297872 ;  $p = 0,0040$ ).

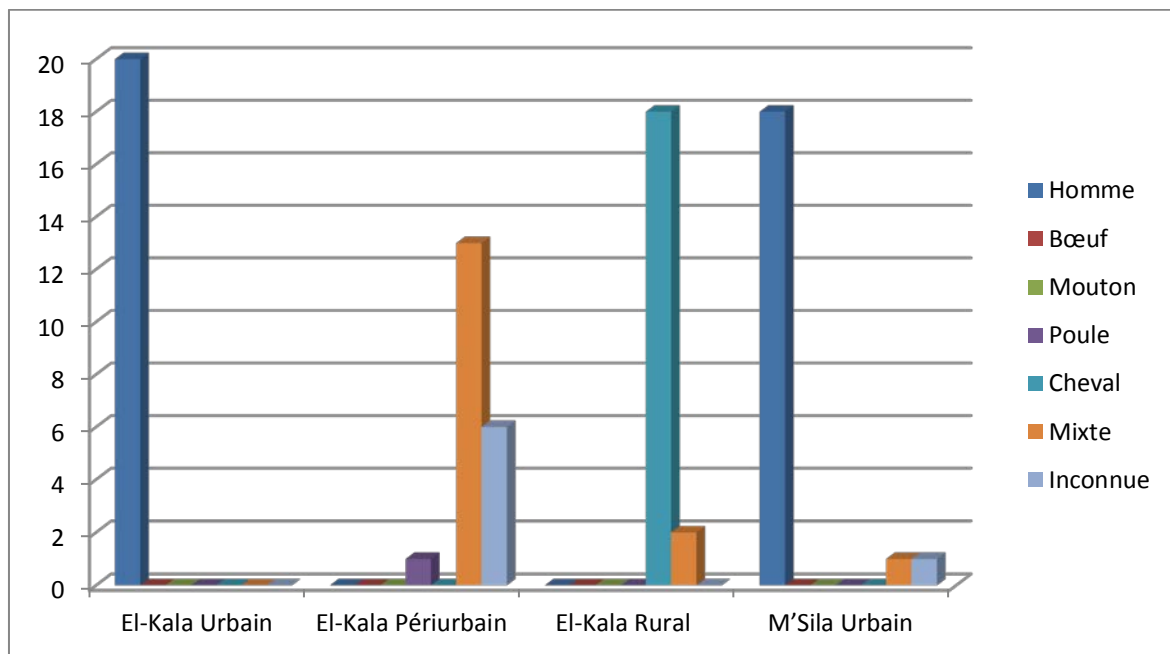


Figure 22 : Fluctuations spatiales des repas de sang prélevés chez des femelles de *Culex pipiens* collectées au repos dans 4 localités d'Algérie.

**- Site Urbain d'El-Kala**

Les femelles issues du site urbain d'El Kala se sont nourries exclusivement (100 %) sur homme (Test de Kruskal-Wallis, Chi-Deux = 15,00000 ;  $p = 0,0001$ ). On peut donc en conclure avec 5% de chance de se tromper, que les femelles du site Urbain d'El-Kala sont anthropophiles.

**- Site Urbain de M'Sila**

Au niveau de ce site, c'est le repas de sang d'origine humaine qui est significativement dominant (90%) (Test de Kruskal-Wallis, Chi-Deux = ;  $p = 0,0000$ ), 5 % des repas de sang ont été pris sur plusieurs hôtes animaux (mixte) et 5 % ont été d'origine inconnues. On peut donc en conclure avec 5% de chance de se tromper, que les femelles du site Urbain de M'Sila sont anthropophiles.

**3.2 Position taxonomique**

Comprendre la dynamique des populations de vecteurs est essentielle à l'élaboration de stratégies de contrôle des maladies. L'étude du complexe *Culex pipiens* présente un défi unique en raison des différences de la capacité vectorielle entre ses deux formes qui sont morphologiquement identique. Une méthode de biologie moléculaire d'amplification d'ADN in vitro (amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne) est apparue comme un des outils pour surmonter ce défi.

Afin d'identifier le statut taxonomique des 10 populations de *Cx. pipiens* étudiées, nous avons procédé à un typage moléculaire par PCR. Les amorces choisies (CQ11R et CQ11F2) peuvent identifier les trois formes du complexe *Cx. pipiens* : *Cx. pipiens pipiens* ; *Cx. pipiens molestus* et les hybrides *pipiens/molestus*. 10 moustiques, pris au hasard, de chacune des 10 populations étudiées, ont fait l'objet d'un typage moléculaire (Figure 23).

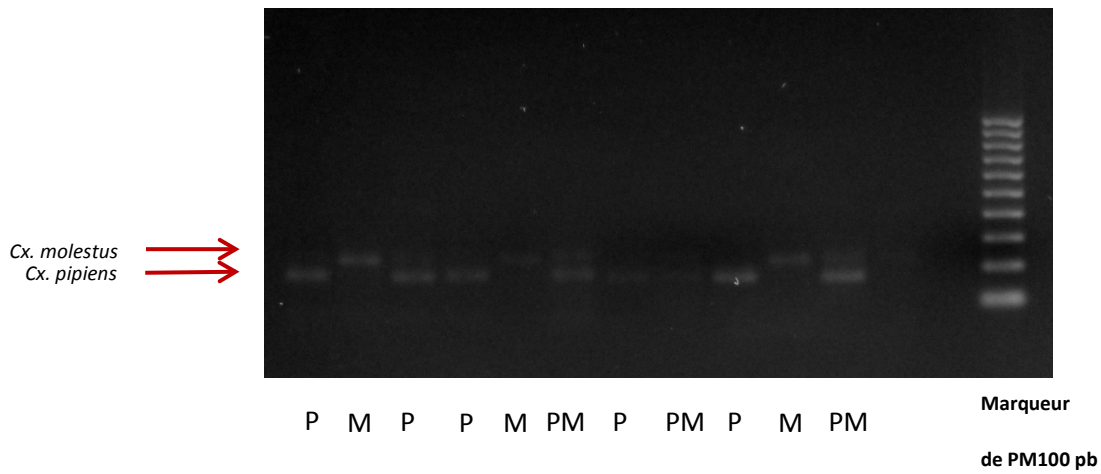


Figure 23 : Observation sous UV d'un gel d'électrophorèse après amplification par PCR ; P : pipiens ; M : molestus et PM : Hybrides

Tableau 05. Identification moléculaire des populations de *Cx. pipiens* provenant d'El Kala de M'Sila et de Tinerkouk.

Ville	Site	Gîte	<i>pipiens</i> (%)	<i>molestus</i> (%)	Hybrides (%)	Total (%)
El-Kala	Urbain	Hypogé	0	40	50	90
		Epigé	40	30	30	100
	Péri-Urbain	Hypogé	0	70	0	70
		Epigé	10	20	50	80
	Rural	Hypogé	10	80	10	100
		Epigé	10	40	20	70
M'Sila	Urbain	Hypogé	0	20	60	80
	Péri-Urbain	Epigé	10	50	0	60
		Rural	Epigé	33,33	33,33	33,33
Tinerkouk	Urbain	Hypogé	10	30	60	100

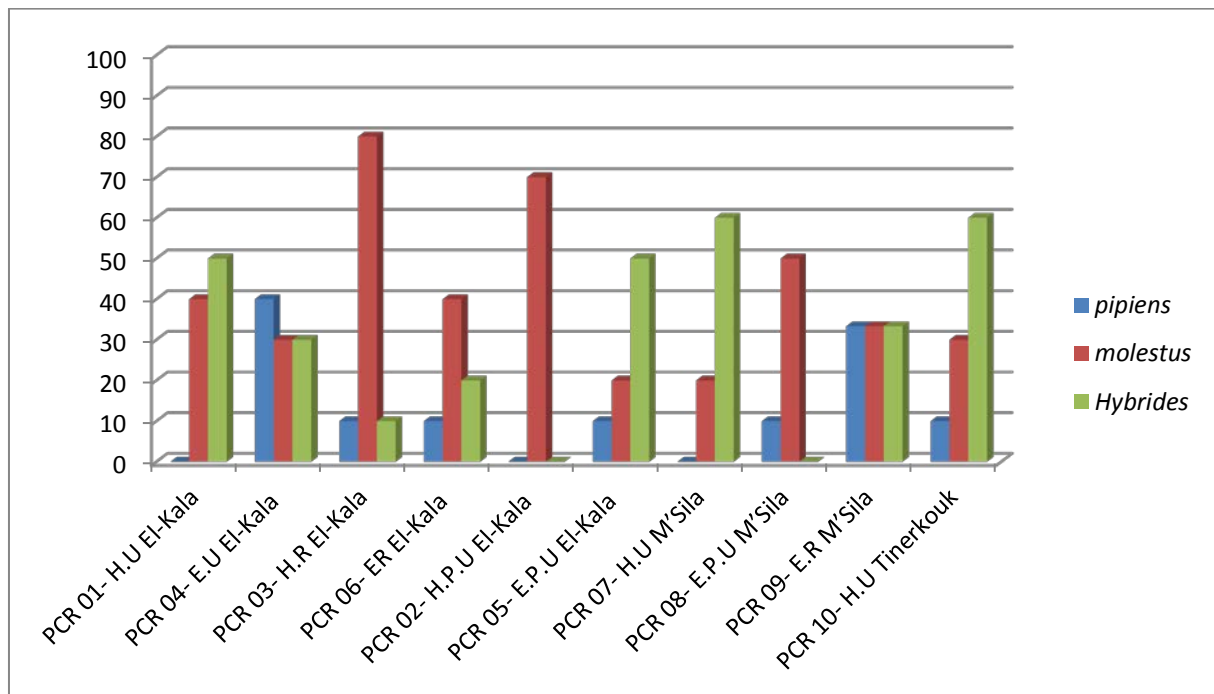


Figure 24 : Résultats du Test PCR ; identification des membres du complexe *Culex pipiens*.

HU : Hypogé Urbain ; HPU : Hypogé Péri-urbain ; HR :Hypogé Rural ; EU : Epigé Urbain ; EPU : Epigé Péri-urbain ; ER :Epigé Rural.

L'étude taxonomique montre que les gîtes étudiés sont mixtes pour la plus part, et contiennent les trois formes génétiques.

On remarque une prédominance de la forme *molestus* suivie par la forme hybride dans les populations étudiées.

Les tests statistiques montrent que la forme *pipiens* a une nette préférence pour les gîtes épigés (Chi-deux (dl=1)  $p=0,0040$ ), (test exact de Fisher ;  $p=0,0038$ ).

Par contre les deux autres formes ne montrent aucune affinité significative pour les gîtes épigé ou hypogé ; forme *molestus* (Chi-deux (dl=1)  $p=0,2241$ ), (test exact de Fisher ;  $p=0,1555$ ) ; forme hybride (Chi-deux (dl=1)  $p=0,3912$ ), (test exact de Fisher ;  $p=0,2603$ ).

### 3.3 La compétence vectorielle

Les moustiques ont été recueillis durant l'été 2010. Les spécimens testés sont ceux de M'Sila et de Tinerkouk. Les moustiques F3 ont été considérés en fonction de leur statut autogène / anautogènes : (I) autogènes (AU) les moustiques pondent le premier lot d'œufs sans prendre de repas sanguin, et (II) anautogènes (AN) les moustiques pondent leurs œufs après un repas de sang (Tableau 06). Les échantillons ont été infectés expérimentalement avec un repas de sang à des titres de  $10^{7,8}$  et  $10^{8,5}$  UFP/ml pour WN et FVR respectivement. Le WNV a été isolé à partir d'un cheval en Camargue en 2000 (Murgue et *al.*, 2001) et le virus de la FVR à partir d'un cas humains en 1974 à Bangui (Muller R. et *al.*, 1995). Les taux de diffusion et de transmission ont été estimés 14-21 jours après l'exposition à l'agent infectieux repas de sang. Le taux de diffusion du virus chez les femelles survivantes a été évalué par immunofluorescence indirecte sur squashes de tête des femelles survivantes tandis que le taux de transmission a été estimé par la détection de la présence du virus dans la salive à l'aide de dosage de plaque sur des cellules Vero.

Tableau 06 : Origine des moustiques sélectionnés pour l'infection expérimentale

Ville	Site	Type de gîte	Autogène (AU) ou Anautogènes (AN)	Echantillon
Tinerkouk	Urbain	Hypogé	AU	A1_AU
			AN	A1_AN
Chellal	Urbain	Hypogé	AU	A2_AU
			AN	A2_AN
Oued El-Ksob	Péri- urbain	Epigé	AU	A3_AU
			AN	A3_AN
Bechelga	Rural	Epigé	AU	A4_AU
			AN	A4_AN

#### 3.3.1 Infection par le Virus West Nile

Les Taux de diffusion ont été évalué sur 91 *Cx. pipiens*, 55 de la forme autogène et 36 de la forme anautogènes, à 14 jours après l'infection avec le virus. Les taux de transmission ont été évalués sur les mêmes individus (Tableau 07).

Tableau 07 : Taux d'infection disséminée, taux de salives positives et nombre moyen de particules virales par salive pour *Culex pipiens*, 14 jours après l'infection avec le virus West Nile.

Echantillon	Taux d'infection disséminée (%)		Taux de transmission (%)		Nombre moyen de particules virales / salive ± écart-type (N)
A1_AU	90.9	(10/11)	45.4	(5/11)	132 ± 278 (5)
A1_AN	80	(8/10)	70	(7/10)	77 ± 125 (7)
A2_AU	85	(17/20)	50	(10/20)	205 ± 384 (10)
A2_AN	83	(5/6)	50	(3/6)	372 ± 630 (3)
A3_AU	95	(19/20)	70	(14/20)	538 ± 1152 (14)
A3_AN	75	(15/20)	65	(13/20)	1033 ± 1898 (13)
A4_AU	100	(4/4)	40	(1/4)	2960 (1)
A4_AN	-	-	-	-	-

(-) non déterminé, (N), nombre de moustiques testés.

### 3.3.1.1 Tinerkouk, gîte hypogé urbain

Les deux formes examinées ont été susceptibles de développer une infection disséminée par le Virus West-Nile avec des titres de  $10^{7.8}$  UFP/ml sans aucune différence significative (Tableau 07). À 14 jours après l'infection, les taux de diffusion est très élevé (90.9%) pour la forme autogène (AU), (80%) pour la forme anautogènes (AN) Test exact de Fisher ( $p= 0,4624$ ) (Figure 25A).

Le virus a été trouvé dans la salive de 52,4% des femelles testé de Tinerkouk, le taux de transmission était estimée à 45.4% pour la forme (AU) et 70% pour la forme (AN) Test exact de Fisher ( $p = 0,2449$ ) (Figure 25 "B, C").

### 3.3.1.2 M'Sila, gîte hypogé urbain (Chellal)

Les deux formes examinées ont été susceptibles de développer une infection disséminée par le Virus West-Nile avec des titres de  $10^{7.8}$  UFP/ml sans aucune différence significative (Tableau 07). À 14 jours après l'infection, les taux de diffusion est très élevé (85%) pour la forme autogène (AU), (83%) pour la forme anautogènes (AN) Test exact de Fisher ( $p= 0,6759$ ) (Figure 25A).

Le virus a été trouvé dans la salive de 50% des femelles testé de Chellal, le taux de transmission était estimée à 50 % pour la forme (AU) et 50 % pour la forme (AN) Test exact de Fisher ( $p= 0,6776$ ) (Figure 25 "B, C").

### 3.3.1.3 M'Sila, gîte épigé péri-urbain (Oued El-Ksob)

Les deux formes examinées ont été susceptibles de développer une infection disséminée par le Virus West-Nile avec des titres de  $10^{7,8}$  UFP/ml sans aucune différence significative (Tableau 07). À 14 jours après l'infection, les taux de diffusion sont très élevé, 95% pour la forme autogène (AU), et 75% pour la forme anautogènes (AN) Test exact de Fisher ( $p= 0,0909$ ) (Figure 25A).

Le virus a été trouvé dans la salive de 67,5% des femelles testé de Oued El-Ksob, le taux de transmission est estimé à 70 % pour la forme (AU) et 65 % pour la forme (AN) Test exact de Fisher ( $p= 0,5000$ ) (Figure 25 "B, C").

### 3.3.1.4 M'Sila, gîte épigé rural (Bechelga)

Seul la forme autogène a été examinées elle a été susceptibles de développer une infection disséminée par le Virus West-Nile avec des titres de  $10^{7,8}$  UFP/ml. À 14 jours après l'infection, les taux de diffusion est très élevé (100%) (Figure 25A).

Le virus a été trouvé dans la salive de 40 % des femelles testé de Bechelga, le taux de transmission a été estimé à 40 % (Figure 25 "B, C").

Il n y a pas de différences significative dans le taux d'infection disséminée entre les deux formes (AU) et (AN) dans les 4 localités testé. Test exact de Fisher ( $p= 0,0756$ ).

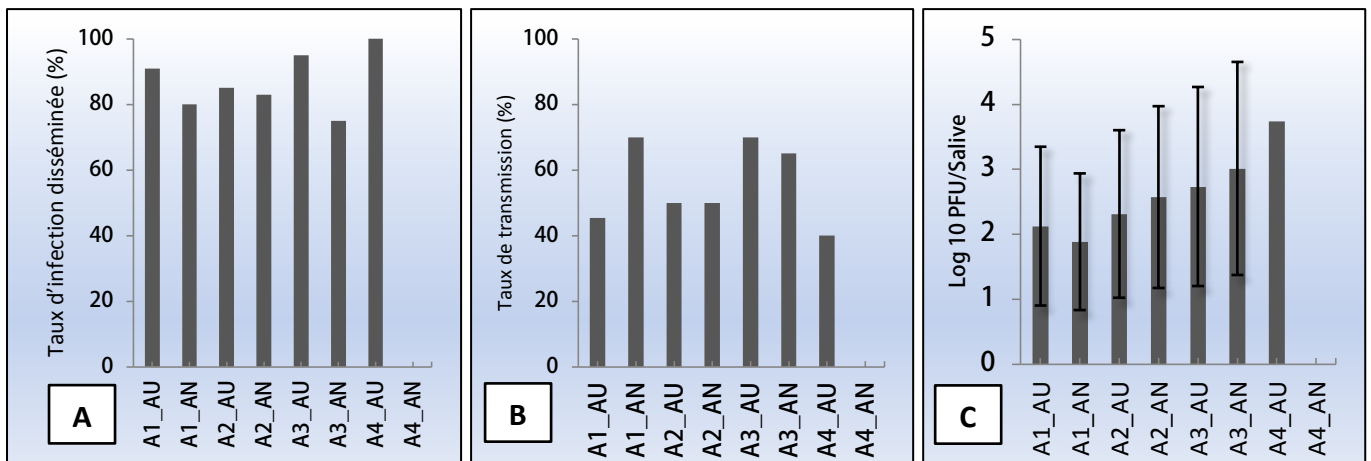


Figure 25 : Série WN - Graphe montrant le taux de dissémination (A), le taux de transmission (B) et le titre moyen des particules virales présentes dans la salive (C) au 14<sup>ème</sup> après l'infection.

### 3.3.2 Infection par le Virus de la Fièvre de la Vallée Du Rift

Les taux de diffusion ont été évalué sur 90 *Cx. pipiens* 51 de la forme autogène et 39 de la forme anautogènes, à 14 et 21 jours après l'infection avec le virus. Les taux de transmission ont été évalués sur les mêmes individus (Tableau 08).

Tableau 08 : Taux d'infection disséminée, taux de salives positives et nombre moyen de particules virales par salive pour *Culex pipiens*, (a) 14 et (b) 21 jours après l'infection avec le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift.

<b>(a) 14 Jours</b>					
<b>Echantillon</b>	<b>Taux d'infection disséminée (%)</b>		<b>Taux de transmission (%)</b>		<b>Nombre moyen de particules virales / salive ± écart-type (N)</b>
<b>A1_AU</b>	11.1	(1/9)	0	(0/9)	-
<b>A1_AN</b>	38	(8/21)	28.5	(6/21)	144 ± 237 (6)
<b>A2_AU</b>	0	(0/10)	0	(0/10)	-
<b>A2_AN</b>	-	-	-	-	-
<b>A3_AU</b>	6.2	(1/16)	18.7	(3/16)	20 ± 30 (3)
<b>A3_AN</b>	0	(0/18)	0	(0/18)	-
<b>A4_AU</b>	6.2	(1/16)	12.5	(2/16)	24 ± 31 (2)
<b>A4_AN</b>	-	-	-	-	-
<b>(b) 21 Jours</b>					
<b>Echantillon</b>	<b>Taux d'infection disséminée (%)</b>		<b>Taux de transmission (%)</b>		<b>Nombre moyen de particules virales / salive ± écart-type (N)</b>
<b>A1_AU</b>	25	(4/16)	6.2	(1/16)	268 (1)
<b>A1_AN</b>	20	(1/5)	40	(2/5)	4 ± 2 (2)
<b>A2_AU</b>	33.3	(2/6)	50	(3/6)	18 ± 13 (3)
<b>A2_AN</b>	0	(0/5)	0	(0/5)	-
<b>A3_AU</b>	21.4	(3/14)	28.5	(4/14)	7 ± 11 (4)
<b>A3_AN</b>	10	(2/20)	15	(3/20)	16 ± 15 (3)
<b>A4_AU</b>	9	(1/11)	0	-11	-
<b>A4_AN</b>	0	(0/7)	14.2	(1/7)	2 (1)

(-) non déterminé, (N), nombre de moustiques testés.

### 3.3.2.1 Tinerkouk, gîte hypogé urbain

Les deux formes examinées ont été susceptibles de développer une infection disséminée par le virus (RVF) avec des titres de  $10^{8,5}$  UFP/ml sans aucune différence significative (Tableau 08). À 14 jours après l'infection, les taux de diffusion sont relativement faible, 11,1% pour la forme autogène (A1\_AU) et 38% pour la forme anautogènes (A1\_AN) Test exact de Fisher ( $p= 0,1486$ ) (Figure 26A).

Le virus n'a été trouvé que dans la salive des femelles (AN) testé de Tinerkouk, le taux de transmission était estimé à 28,5% (Figure 26 "B, C").

De 14 à 21 jours d'incubation, le taux de diffusion ne semblent pas avoir changé de façon significative (Test exact de Fisher entre (A1\_AU-14) et (A\_AU-21)  $p= 0,3905$ ) pour la forme (AU) on obtient 25%. Le taux de diffusion ne semblent pas non plus avoir changé de façon significative (Test exact de Fisher entre (A1\_AN-14) et (A1\_AN-21)  $p= 0,4197$ ). Qui a atteint 20% (Figure 26 "D, E, F")

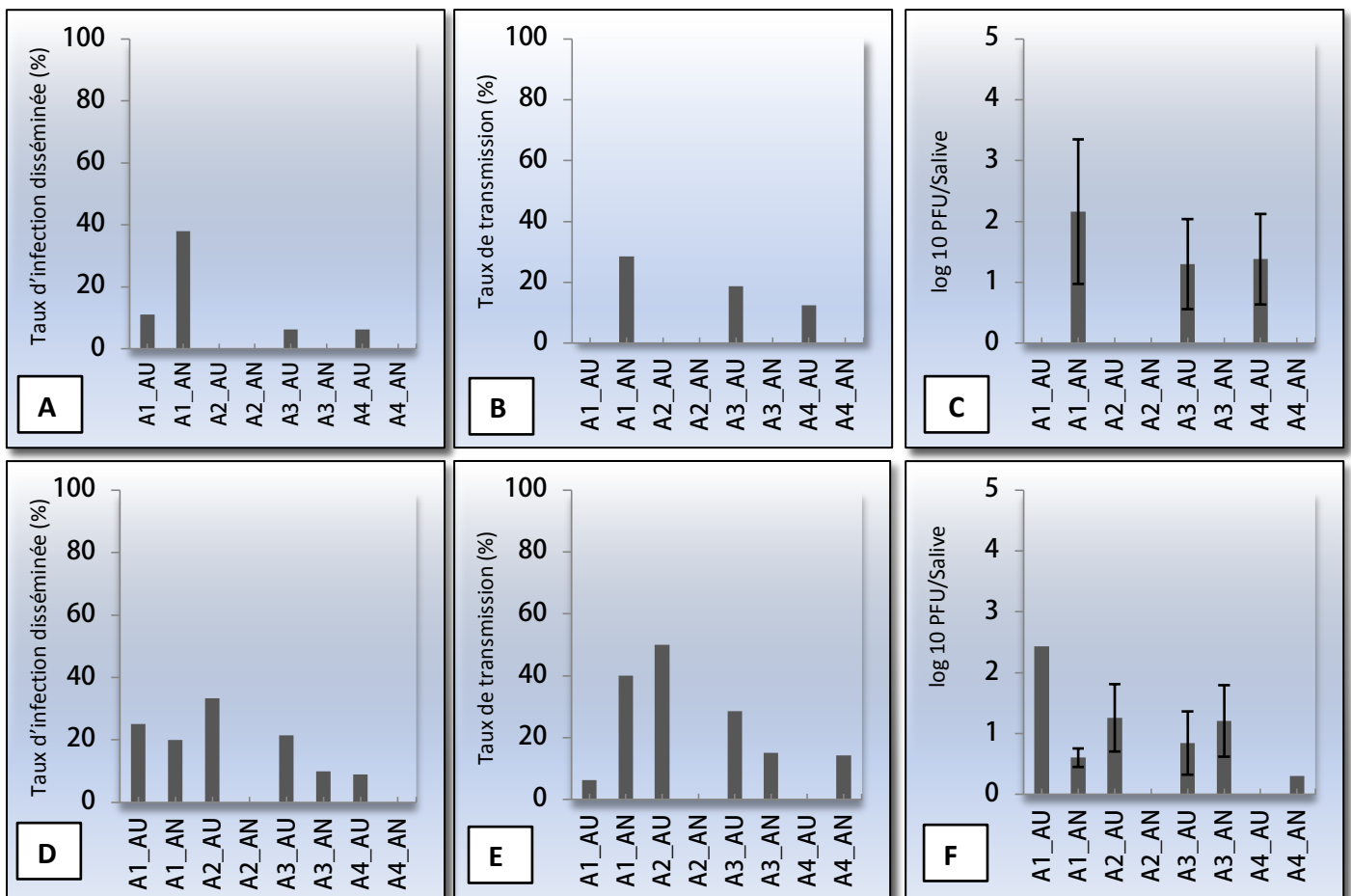


Figure 26 : Série FVR - Graphe montrant le taux de dissémination (A), le taux de transmission (B) et le titre moyen des particules virales présentes dans la salive (C) au 14<sup>ème</sup> jour post-infection. (D, E, F) au 21<sup>ème</sup> jour post-infection.

### 3.3.2.2 M'Sila (Chellal), gîte hypogé urbain

Seule la forme autogène (A2\_AU) a pu être testée, elle n'a pas été capable de développer une infection disséminée par le virus (RVF) avec des titres de  $10^{8,5}$  UFP/ml, il n'y a eu ni transmission ni présence du virus dans la salive (Figure 26 "A, B, C").

De 14 à 21 jours d'incubation, Le taux de diffusion ne semblent pas avoir changé de façon significative (Test exact de Fisher entre (A2\_AU-14) et (A2\_AU-21)  $p= 0,1250$ ) avec un taux de diffusion de 33,3% (Figure 26 "D, E, F").

Par contre le virus a été détecté plus tardivement, à 21 jours, dans la salive des femelles avec un taux de transmission de 50% (A2\_AU-14) et (A2\_AU-21) test de Fisher significative ( $p= 0,0357$ ) (Figure 26 "D, E, F").

### 3.3.2.3 M'Sila (Oued El-Ksob), gîte épigé périurbain

Parmi les deux formes examinées seule la forme autogène A3\_AU a pu développer une infection disséminée par le virus RVF avec des titres de  $10^{8,5}$  UFP/ml. À 14 jours après l'infection, les taux de diffusion ont été très faible (6,2%) (Figure 26A).

Le virus n'a été trouvé que dans la salive des femelles (A3\_AU) testé d'Oued El-Ksob, le taux de transmission était estimé à 18,7% (Figure 26 "B, C").

De 14 à 21 jours d'incubation, le taux de diffusion ne semblent pas avoir changé de façon significative (Test exact de Fisher entre (A3\_AU-14) et (A3\_AU-21)  $p= 0,2490$ ) pour la forme (A3\_AU-21) on obtient 21% et 10% pour la forme (A3\_AN-21) (Figure 26D).

Il n'y a pas de différences significative entre le taux de transmission de (A3\_AU-14) et (A3\_AU-21) (Test exact de Fisher  $p= 0,4186$ ). Pour la forme (A3\_AN-21) on remarque la présence du virus dans la salive des femelles avec un faible taux de transmission de 15% (Figure 26 "E, F").

### 3.3.2.4 M'Sila (Bechelga), gîte épigé rural

Seule la forme autogène A4\_AU-14 a été testée, elle a développé une infection disséminée par le virus RVF avec un titre de  $10^{8,5}$  UFP/ml. À 14 jours après l'infection, les taux de diffusion sont très faible (6,2%) (Figure 26A).

Le virus a été trouvé dans la salive des femelles testé de Bechelga, le taux de transmission a été estimé à 12,5% (Figure 26 "B, C").

De 14 à 21 jours d'incubation, le taux de diffusion ne semblent pas avoir changé de façon significative (Test exact de Fisher entre (A4\_AU-14) et (A4\_AU-21)  $p= 0,6825$ ). Le virus n'a pas été détecté dans la salive des femelles (Figure 26D).

Pour la forme (A4\_AN-21) ont n'à détecter aucune infection disséminée par le virus (RVF), mais le virus est présent dans la salive avec un taux de transmission relativement faible de 14,2% (Figure 26 "E, F").



# Discussion

## 4. DISCUSSION

### 4.1 Ecologie, biologie de la reproduction

Comprendre la structure du complexe *Culex pipiens* en Afrique du Nord vise à mieux définir ses membres et à identifier ceux qui sont les plus aptes à transmettre les virus WN et FVR. L'analyse de la bio-écologie de ces vecteurs est un préalable indispensable à cette compréhension.

Il est admis chez la plupart des auteurs qu'il existe deux formes de *Cx. pipiens* qui diffèrent principalement sur des aspects physiologiques et génétiques (Mattingly, 1952 ; Urbanelli et al., 1981 ; Bullini, 1982 ; Vinogradova et al., 1996). Par contre d'autres auteurs comme Harbach et al, (1984) considèrent que *pipiens* et *molestus* forment une même espèce et que toutes les différences observées sont essentiellement d'ordre physiologique et n'affectent pas le statut de l'espèce.

Notre étude a permis, grâce à des observations effectuées sur le terrain et en insectarium, d'apporter des réponses sur : l'influence des paramètres physico-chimique sur la densité larvaire, l'autogénie/l'anautogénie, l'influence du repas sanguin sur la fécondité et la fertilité ainsi que le mode d'accouplement sténogame ou eurygame.

Les propriétés chimiques et physiques de l'environnement des larves ont été étudiées comme des éléments qui pourraient influencer le développement larvaire. Des facteurs, tels que le pH et la présence de sels dissous, sont moins fortement corrélés à la densité larvaire et ne sont probablement pas des facteurs déterminants (Kamura, 1959). Les mesures des paramètres physico-chimiques des 10 gîtes étudiés, montrent des valeurs très proches d'un gîte à l'autre concernant la température, le pH, la salinité et le taux d'oxygène, ce dernier a exprimé des valeurs très faible montrant que tous les gîtes sont pauvres en oxygène dissous, ce qui s'explique par la présence relativement importante de micro-organismes qui utilisent cette molécule pour oxyder la matière organique nécessaire à leurs développement.

Le calcul de la DBO5 indique une corrélation inversement proportionnelle entre la charge en matière organique des gîtes et la densité larvaire. Plus la charge en matière organique augmente plus la densité larvaire diminue ce qui est en adéquation avec les constatations de plusieurs auteurs. En effet, au Cameroun, Doby et Mouchet (1957) ont observé que la charge en matières organiques conditionnait la répartition des larves des

différentes espèces dans les divers types de gîtes de la région de Yaoundé. Pour Fernando (1964), les formes pré-imaginales de *Cx. pipiens* à Rangoon, sont toujours associées à des milieux pollués. Cependant, leurs larves ne pouvaient effectuer leur développement normalement car le degré de pollution des gîtes est un facteur limitant de la dynamique des populations pré-imaginales de *Cx. pipiens* (Subra, 1975). Bien qu'au niveau de nos résultats, les gîtes les plus chargés en matière organique sont ceux des sites urbains, on constate que les gîtes les plus productifs sont ceux des sites périurbains dont la teneur en matière organique due à l'activité humaine est optimale pour le développement larvaire.

L'autogenèse ainsi que l'anautogenèse sont un trait majeur de la biologie de la reproduction qui sépare les deux formes du complexe *Cx. pipiens*. L'étude de ces caractères en insectarium nous a montré, mis à part le gîte épigé rural d'El-Kala, qu'il n'y a pas de gîtes mono-spécifique. Ce qui est en accord avec les travaux de Dobrotworsky, (1955) ; Knight & Abdel-Malek, (1951), qui ont trouvés que les populations autogène et anautogène *Cx. pipiens* ont souvent été prises dans les mêmes collections, de même des collections mixtes ont été couramment observées dans une étude réalisée à Boston.

Nos résultats confirment les constatations de (Vinogradova et al., 1996), les gîtes épigés sont colonisés essentiellement par les formes anautogènes. Nous avons également eu des résultats inattendus comme pour le cas des gîtes de la zone humide (El-Kala). On remarque pour le gîte HU El-Kala une prédominance de la forme anautogène ce qui est inattendu vu la nature du gîte. Ce cas peut s'expliquer par le fait que ce gîte comporte une population mixte ou bien une forte proportion d'hybrides qui sont le résultat du croisement des deux formes *pipiens* et *molestus*. Ce croisement est tout à fait possible et a été réalisé au laboratoire sur des *Cx. pipiens* de Saint-Pétersbourg, Russie (Vinogradova, 2000).

Une autre possibilité de mixage est le fait que les deux types de gîtes, hypogé et épigé, communiquent entre eux et permettent le mélange des deux formes avant que nos prélèvements soient réalisés. Nous avons eu un autre résultat inattendus celui du gîte HR El-Kala, ce gîte aurait dû être principalement colonisé par des formes autogènes alors que c'est l'inverse qui a été constaté. On pense que c'est à cause du fait qu'en milieu rural comme celui du lac Tonga (El Kala) la présence de la forme anautogène est tellement dominante qu'elle a colonisée tous les gîtes potentiels au développement de cette espèce.

On constate également un gradient proportionnel Sud-Nord en termes de taux des hybrides qui composent les gîtes hypogés, voulant dire que les proportions les plus fortes se trouvent au Nord.

D'après le résultat obtenu et les tests statistiques réalisés on peut affirmer avec 5% de chance de se tromper que le repas sanguin permet aux femelles d'être plus féconde (elles pondent plus d'œufs) mais n'influence en aucun cas la fertilité de ces dernières. Ce constat nous montre que l'apport du sang donc la présence de l'hôte est un facteur important qui augmente le taux de reproduction de ces moustiques y compris ceux de la forme autogène qui a de meilleurs pontes en présence du sang. Par contre la fertilité n'est nullement liée à l'apport du sang mais uniquement au mode d'accouplement des *Cx. pipiens*.

D'après les résultats obtenus et les tests statistiques réalisés on remarque qu'une proportion plus élevée de sténogames se trouve dans les gîtes hypogés et les eurygames sont plus représentés dans les gîtes épigés, ce qui est en accord avec les constatations de (Vinogradova, 2003).

#### **4.2 Préférences trophique**

Au cours de cette étude, l'analyse des repas de sang des femelles récoltées montre que ces moustiques ont pris des repas sanguins sur les hôtes qui étaient présent dans leur entourage. Ces moustiques se sont montrés anthropophiles en milieu urbain et zoophiles en milieu péri-urbain et rural. Selon certains auteurs, les deux formes, *molestus* et *pipiens*, présenteraient des préférences trophiques différentes, la forme *pipiens* se nourrit principalement sur les oiseaux et la forme *molestus* sur les mammifères (Fonseca et al., 2004). De plus, il existe des hybrides issus des deux formes et qui sont présents aux Etats-Unis d'Amérique et au sud de l'Europe (Fonseca et al., 2004, Gomes et al., 2009). D'autres travaux récents, ont également montré, la présence de formes hybrides au nord de l'Europe (Reusken et al., 2010). Les hybrides ont des préférences trophiques mixtes pour les oiseaux et les mammifères (Fonseca et al., 2004). Ce fait démontre le caractère opportuniste des moustiques du complexe *Cx. pipiens*. La préférence trophique est un caractère génétiquement déterminé dont l'expression peut varier selon la disponibilité de l'hôte. En effet, l'indisponibilité de l'hôte pourrait forcer le vecteur à se nourrir sur d'autres espèces (La Deau et al., 2007 ; Kilpatrick et al., 2007). Le fait que ces moustiques aient un large spectre d'hôtes explique la circulation du FVR et du WNV sur de nombreuses espèces animales dont l'homme.

### 4.3 Position taxonomique

L'analyse taxonomique des espèces du complexe *Cx. pipiens* présents dans les trois sites sera d'un intérêt primordial pour identifier les systèmes moustique-virus les plus performants dans la transmission virale. Les membres du complexe *Cx. pipiens* présentent des caractéristiques bioécologiques différentes ce qui leur confèrent des capacités vectorielles différentes et par conséquent des rôles épidémiologiques différents dans la transmission de certains arbovirus.

Le typage moléculaire par PCR nous a permis de définir les membres du complexe *Cx. pipiens* présents au Maroc en se basant sur la variabilité génétique de la région flanquante du microsatellite CQ11 (Bahnck et Fonseca 2006).

Nos résultats montrent une composition plurispécifique de la plus part des gîtes étudiés qu'ils soient épigé ou hypogés ce constat est en accord avec les travaux de Villani et al., (1986) ainsi que Nudelman et al., (1988) qui ont montré qu'en Israël et en Egypte, il n'y avait pas des différences entre *Cx. pipiens pipiens* et *Cx. pipiens molestus* et que tous les gîtes quel que soit leur nature (hypogé ou épigé) produisent des femelles autogènes. Nous remarquons aussi concernant la population étudiée de Tinerkouk que l'étude de la biologie de la reproduction nous a montrer que toutes les femelles étudiées étaient autogènes par contre nos test PCR sur ces mêmes femelles ont montrées la présence des trois formes de *Cx. pipiens*. Il serait possible qu'il y est adaptation des formes hybrides et *pipiens* qui sont présentes dans un gîtes très riche en matière organique qui leurs a permis de stocker des réserves conséquentes leurs conférant ainsi la capacité d'effectuer une première autogène.

Le test Chi-deux ( $df=1$  ;  $p=0,0040$ ) montre qu'il y a une préférence significative de la forme *pipiens* pour les gîtes épigés ce qui rejoint les constatations de Vinogradova et al., (1996), par contre les formes *molestus* et les *hybrides* n'ont pas montrés de préférence particulières pour les gîtes épigés et hypogés.

Les résultats obtenus montrent, pour la première fois, la présence de *Cx. pipiens* sous la forme *molestus* en Algérie, ainsi que la présence des formes hybrides entre la forme *pipiens* et la forme *molestus* en Afrique du Nord. Indistinctement, les trois formes coexistent dans les gites hypogés et épigés, dans la zone urbaine, périurbaines et rurale et à travers toute l'Algérie.

#### 4.4 Compétence vectorielle

*Culex pipiens* est l'espèce de moustiques la plus répandue dans les pays du Maghreb que l'on soupçonne d'être impliquées dans la transmission du VWN et RFV. Nous avons constaté que les populations de *Cx. pipiens* recueillis en Algérie ont été très sensibles à l'infection et peuvent facilement transmettre le VWN et dans une moindre mesure VFVR.

Pour être transmis à un hôte vertébré, un arbovirus doit être en mesure d'atteindre et d'infecter les glandes salivaires. Après s'être nourries sur un hôte vertébré virémique, le virus ingéré doit pénétrer dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen, se répliquer et par la suite, échapper à l'intestin moyen. Le virus diffuse dans les tissus des cavités corporelles infectant les organes y compris les glandes salivaires. Des particules virales infectieuses sont injectées dans un nouvel hôte vertébré à travers la salive. Les obstacles, situés au niveau du moustique, conduisant à la transmission sont décrits: l'intestin moyen et les glandes salivaires (revue dans Kramer et Ebel, 2003). C'est l'efficacité de ces barrières qui détermine le niveau de la compétence vectorielle des moustiques. Pour les deux virus testés, le VWN et VFVR, l'intervalle de temps entre l'ingestion d'un repas de sang virémique et la capacité d'un moustique à transmettre un agent pathogène, décrit comme la période d'incubation extrinsèque (PIE).

Lorsqu'ils sont exposés à une maladie infectieuse repas de sang contenant le VWN, toutes les souches de moustiques étaient capables de garantir l'efficacité de diffusion virale et la transmission au jour 14 pi (post infection). Nos résultats sont en accord avec le rôle prédominant déjà constaté de *Cx. pipiens* dans la transmission du VWN. Le DIR variaient de 75% à 100%, et le TR de 40% à 70%. Le nombre de particules virales extraites de la salive était jusqu'à ~ 12800 particules. La compétence vectorielle est principalement influencée par la charge virale, la période d'incubation et la température. Nous avons utilisé un titre viral de  $10^{7,8}$  PFU\*/ml et une température d'incubation de 28 ° C, les deux facteurs qui influent sur l'amplification virale (Anderson et al., 2010). En effet, les doses minimales infectieuses nécessaires pour infecter *Cx. pipiens* doit être supérieure à  $10^{5,0}$  PFU/ ml (Turell et al., 2000) et des températures élevées augmente la réplication virale (Reisen et al., 2006).

---

\*PFU (Plaque Forming Unit) : en virologie, les zones de lyse cellulaire (CPE) en culture cellulaire monocouche, dans des conditions de recouvrement, initiée par une infection avec une particule de virus unique.

Des études antérieures ont montré des variations spatiales dans la compétence vectorielle de *Cx. pipiens* par rapport au VWN (Kilpatrick et al., 2007 ; Vaidyanathan et Scott, 2007 ; Reisen et al., 2008). Nous avons également observé des variations géographiques dans la compétence vectorielle par rapport à ce virus mais les différences entre un site et un autre se sont montrées non significatives.

Nous avons utilisé pour VFVR, le Clone 13, qui est une souche naturellement atténué avec une délétion de 70% des gènes NSs jouant un rôle clé dans la pathogenèse de la FVR (Bridgen et al., 2001; Weber et al., 2002). Il a été démontré que cette suppression n'a pas d'incidence sur la réplication virale chez les moustiques (Moutailler et al., 2008). Nous avons constaté que 14 jours après l'exposition au VFVR, certains moustiques testés ont été en mesure de développer une infection disséminée DIR à 38 %, ces valeurs sont inférieures à celles constatées pour les colonies de laboratoire de *Cx. pipiens* (Faran et al., 1988). La plupart des échantillons étaient en mesure de transmettre le virus avec un maximum de ~ 620 particules virales détectées dans la salive. L'infection de l'intestin était probablement l'obstacle le plus important de la diffusion virale (Hardy et al., 1983). L'incapacité de *Cx. pipiens* à transmettre VFVR est principalement due à l'inefficacité des virions à s'échapper des cellules épithéliales de l'intestin moyen pour infecter les organes cibles secondaires. En augmentant la période d'incubation jusqu'à 21 jours, 78,6% des échantillons de moustiques développent une infection disséminée et 91% étaient en mesure de fournir des particules infectieuses dans la salive. Ainsi, les *Cx. pipiens* avec une infection disséminée qui n'ont pas de salives infectieuses au jour 14 pi peuvent développer des infections virales une semaine plus tard (Faran et al., 1987).

En outre, la barrière de l'intestin semble ne pas fonctionner en retardant la libération du virus dans la cavité générale de *Cx. pipiens* infectés par le VFVR (Turell et al., 1984). Il semblerait qu'il y est une diffusion sporadique du virus à travers l'intestin moyen plutôt que d'un blocus complet du virus dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen.

Nos échantillons contiennent un mélange de moustiques autogènes (AU) et anautogènes (AN), une caractéristique qui différencie *molestus* de *pipiens*, deux formes du complexe *Cx. pipiens* (Harbach et al., 1984). Les deux formes sont soupçonnées d'avoir des compétences vectorielles différentes (revue dans Farajollahi et al., 2011). En effet, nous avons constaté que lorsqu'ils sont infectés par le VFVR, les moustiques AU étaient plus performants pour assurer la diffusion et la transmission virale, 14 jours après l'exposition à l'agent

infectieux (voir la figure VFVR-14jours). Nous émettons l'hypothèse que la forme *molestus* pourrait donc être impliquée au début de la saison car les populations autogènes peuvent se reproduire sans se nourrir de sang et de devenir rapidement prédominante dans les sites de reproduction des larves. Présentes dans de fortes densités, la forme *molestus* peut contracter le VFVR en se nourrissant de bétail infecté au cours des repas de sang ultérieures. Étonnamment, les moustiques anautogènes ont montrés un retard dans la transmission de la FVR au laboratoire; les populations AN étaient capables de transmettre seulement 21 jours après le repas de sang infectieux (voir Figure VFVR-21jours). Nous avons suggéré que la forme *pipiens* intervienne dans la transmission après la forme *molestus*. Ainsi, une fois introduit par le bétail infecté, un cycle de la FVR peut être initiée lorsque la densité des moustiques AU est suffisamment élevées pour déclencher l'émergence de l'épidémie/épizooties. Plus tard, un grand nombre de moustiques AN peut accentuer la transmission. L'Algérie partage des frontières avec des pays d'endémie pour la FVR. En 2010, une grave épidémie a été signalée dans une région extrêmement aride près des frontières avec le Maroc et l'Algérie (El Mamy et *al.*, 2010) en Mauritanie. L'introduction du bétail infecté a soulevé des inquiétudes quant à l'émergence future de la FVR. En effet, les flambées de FVR en Egypte en 1977 et en Arabie saoudite en 2000 ont été provoquées par le commerce des animaux virémiques (Abd El-Rahim et *al.*, 1999; Sall et *al.*, 1998).



**Conclusion**

## **CONCLUSION**

Le complexe *Cx. pipiens* en particulier et le genre *Culex. sp* en général sont un groupe de moustiques qui n'ont pas reçu beaucoup d'attention par les entomologistes, classés le plus souvent comme agents de nuisances alors qu'ils peuvent être de redoutables vecteurs de maladies dangereuses pour l'homme et l'animale et parfois même mortelles.

Bien que, dans notre connaissance, ce complexe est vecteur depuis longtemps d'un certain nombre de maladies comme la filariose de Bancroft, le paludisme aviaire, le virus de l'encéphalite de Saint Louis, la FVR et la fièvre WN, c'est plutôt une épidémie causée par cette dernière aux USA entre 1999 et 2004 qui a attiré l'attention des entomologistes sur ce complexe encore très mal connu.

Notre contribution à l'étude de ce complexe d'espèces « très complexe », réalisée pour la première fois en Algérie, montre le risque qu'encourent tous les algériens face à ce moustique « ordinaire » qui semble presque familier tellement il est présent presque au quotidien et dans pratiquement tous les foyers.

De plus, nos résultats prouvent que les trois formes de *Cx. pipiens* affectionnent des gîtes très variés et peuvent cohabiter ensemble sans aucun problème. Nous infirmons par la même occasion la théorie qui stipule que les deux formes *pipiens* et *molestus* n'ont aucune chance de se rencontrer à cause de la différence de leur comportement d'accouplement (l'une qui s'accouple dans les espaces larges et ouverts et l'autre dans les espaces confinés et fermés). La présence des trois formes et surtout celle des hybrides, issus de l'accouplement des *pipiens* avec les *molestus*, dans presque tous les gîtes étudiés est un constat qui réfute cette théorie.

Comme le WN, la FVR pourrait devenir épizootique et épidémique dans les pays du Maghreb si elle est introduite. En attendant que les vaccins soient disponibles et utilisés sur une très grande échelle afin de limiter leur expansion, à la fois le WN et la FVR continueront à être un enjeu crucial pour la santé humaine et animale. Dans un futur proche, la protection de la santé publique continuera à s'appuyer sur le contrôle des moustiques. D'autres études sont nécessaires pour comprendre la bio-écologie de *Cx. pipiens* et les autres moustiques vecteurs en Algérie.

*"On peut espérer que, lorsqu'ils seront les  
maîtres du monde, les insectes se  
souviendront avec reconnaissance que nous  
les avons plutôt bien nourris lors de nos  
pique-niques."*

*Colette*



**Références**

**Bibliographiques**

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd El-Rahim IHA, Abd El-Hakim U, Hussein M. *An epizootic of Rift Valley fever in Egypt in 1997*. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 1999, 18 (3) : 741-748.
- AFSSA. 2004. *Rapport sur la surveillance de l'infection à virus West Nile en France*. Agence Française de sécurité Sanitaire des Aliments, Paris, France. 48p.
- Ahmed T., Hayes C.G. et Baqar S. (1979) *Comparison of vector competence for West Nile virus of colonized populations of Culex tritaeniorhynchus from southern Asia and the Far East*. Southeast Asian. J Trop Med Public Health 10 (4): 498-504.
- Akhter R., Hayes C.G., Baqar S. et Reisen W.K. (1982) *West Nile virus in Pakistan. III. Comparative vector capability of Culex tritaeniorhynchus and eight other species of mosquitoes*. Trans R Soc Trop Med Hyg 76 (4): 449-53.
- Amara Korba Raouf (2011) *Bio-écologie du complexe Culex pipiens (Diptera: Culicidae) responsable de la transmission du virus West Nile et du virus de la Fièvre de la vallée du rift en Algérie*. Mémoire de Master II, Université- Badji Mokhtar –Annaba- Algérie : 57p.
- Jeffrey A. Anderson, Li-Hua Ping, Oliver Dibben, Cassandra B. Jabara1, Leslie Arney, Laura Kincer, Yuyang Tang, Marcia Hobbs, Irving Hoffman, Peter Kazembe, Corbin D. Jones, Persephone Borrow, Susan Fiscus, Myron S. Cohen1, Ronald Swanstrom, and the Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology (2010) *HIV-1 Populations in Semen Arise through Multiple Mechanisms*. PLoS Pathog 6(8): e1001053. doi:10.1371/journal.ppat.1001053.
- Aouinty B, Oufara S, Mellouki F, Mahari S, *Évaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (Ricinus communis L.) et du bois de thuya (Tetraclinis articulata (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés : Culex pipiens (Linné), Aedes caspius (Pallas), Culiseta longiareolata (Aitken) et Anopheles maculipennis (Meigen)*. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2006 10 (2), 67 – 71.
- APHIS. 2004. *West Nile virus*. Animal and Plant Health Inspection Service, United States Department of Agriculture, Washington, Etats-Unis.
- Arthur RR, el-Sharkawy MS, Cope SE, Botros BA, Oun S, Morrill JC, Shope RE, Hibbs RG, Darwish MA, Imam IZ. *Recurrence of Rift Valley fever in Egypt*. Lancet 342, 1149-1150.
- Bahnck et Fonseca 2006. *Rapid assay to identify the two genetic forms of Culex (Culex) pipiens L. (Diptera: Culicidae) and Hybrid populations*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 75, 251-255.
- Balenghien T. (2003) *Effet du confinement dans la propagation d'une maladie contagieuse au sein d'un réseau structuré de troupeaux*. Mémoire de DEA, Grenoble, Université J. Fourier : 60 p.
- Balenghien T. (2006) *De l'identification des vecteurs du virus West Nile à la modélisation du risque d'infection dans le sud de la France*. Thèse de Doctorat, Grenoble, Université J. Fourier : 235 p, <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00129514/fr/>.

- Baqar S., Hayes C.G. et Ahmed A. (1980) *The effect of larval rearing conditions and adult age on the susceptibility of Culex tritaeniorhynchus to infection with West Nile virus*. Mosq News 40 (2): 165-71.
- Beaver PC, Jung RC: *Animal Agents and Vectors of Human Disease*, ed 5. Philadelphia, Lea & Febiger, 1985.
- Becker N., Petric D., Zgomba M., Boase C, Dahl C., Lane J. and Kaiser A, 2003 – *Mosquitoes and their control*. Ed. Kluwer Academic, New York, 498 p.
- Benyacoub S., Louanchi M., Baba Ahmed R. et al. (1998). Plan directeur de gestion du Parc National d'El Kala et du complexe des zones humides. Projet GEF (Global Environment Facility) Banque Mondiale. 220 p. + 28 cartes. Disponible au Parc National d'El Kala.
- Boukraa S., 2010 – *Bio-systématique des moustiques (Diptera : Culicidae) dans et aux alentours des fermes d'élevage en Belgique*. Mémoire Ingénieur, Gembloux Agro Bio-Tech, Université de LIEGE, Belgique. 109 p.
- Bridgen Anne, Friedemann Weber, John K. Fazakerley, and Richard M. Elliott, (2001) *Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis*. PNAS 2001 98 (2) 664-669; doi:10.1073/pnas.98.2.664
- Brownie J, Shawcross S, Theaker J, Whitcombe D, Ferrie R, Newton C, Little S (1999). *The elimination of primer dimmer accumulation in PCR*. Nucleic acids research 25, 3235-3241.
- Brunhes J., Rhaim A., Geoffroy B., Angel G. et Hervy J.P, 1999 – *Les Culicidae d'Afrique méditerranéenne*. Logiciel de l'Institut de Recherche pour le Développement (I.R.D.), Montpellier, ISBN 2-7099-1446-8.
- Bruno Gomes, Carla A Sousa, Maria T Novo, Ferdinando B Freitas, Ricardo Alves, Ana R Côrte-Real, Patrícia Salgueiro, Martin J Donnelly, António PG Almeida and João Pinto. *Asymmetric introgression between sympatric molestus and pipiens forms of Culex pipiens (Diptera: Culicidae) in the Comporta region, Portugal*. BMC Evolutionary Biology 2009, 9:262.
- Bullini. 1982. *The electrophoretic approach to the study of parasites and vectors*. Parassitologia. 27, 1-11.
- Callot J., et Helluy J., 1958 – *Parasitologie médicale*. Ed. Médicales Flammarion, Paris, 645 p.
- Calzolari et al. 2009. *West Nile surveillance in mosquitoes in Emilia-Romagna (Italy)*. Proceeding papers 5th European Mosquito Control Association Workshop. Abstract 1.8. 32-33.
- Carnevale P. et Robert V., 2009 – *Les anophèles. Biologie, transmission du Plasmodium et lutte anti-vectorielle*. Ed. I. R. D., Marseille, 389 p.
- CDC. 2004. *West Nile virus*. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Etats-Unis. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile>.
- Cornel A.J., Jupp P.G. et Blackburn N.K. (1993) *Environmental temperature on the vector competence of Culex univittatus (Diptera: Culicidae) for West Nile virus*. J Med Entomol 30 (2): 449-56.

- Daubney et al. 1931. *Enzootic hepatitis of Rift Valley fever: an undesirable disease of sheep, cattle and man from East Africa*. Journal of Pathology and Bacteriology 34, 545-549.
- Dobrotworsky, N. V. (1955) *Proc. Linn. Soc. N.S.W.*, 80, 33.
- Dohm, D.J., M.L. O'Guinn, M.J. Turell, 2002a. *Effect of environmental temperature on the ability of Culex pipiens (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus*. J. Med. Entomol., 39: 221-225.
- Doby, J. M. & Mouchet, J. (1957) *Bull. Soc. Path. exot*, 50,945-957.
- Durand J. P., L. Richecoeur, C. Peyrefitte, J.P. Boutin, B. Davoust, H. Zeller, M. Bouloy, H. Tolou (2002). *La Fièvre De La Vallée Du Rift : Infections Sporadiques De Militaires Français Hors Des Zones D'Épidémies Actuellement Connues*. Med Trop 2002; 62 : 291-294.
- Durand et al. 2004. *Virus West Nile: à nouveau en France chez l'homme et les chevaux*. Rev Prat. 54, 703-710.
- El Harrack et al, 1997. *Isolement du virus West Nile au Maroc*. Virology 1, 248-249.
- El Mamy et al, 2010. *Généralités sur La Fièvre de la Vallée du Rift*. 5ème colloque International francophone de Microbiologie Animale, Marrakech du 03 au 06 avril 2011.
- Erickson S.M., Platt K.B., Tucker B.J., Evans R.B., Tiawsirisup S. et Rowley W.A. (2006) *The Potential of Aedes triseriatus (Diptera: Culicidae) as an Enzootic Vector of West Nile Virus*. J Med Entomol. 43 (5): 966-70.
- Farajollahi, Ary, Fonseca, Dina M. Kramer, Laura D. Kilpatrick, A. Marm "Bird biting" mosquitoes and human disease: A review of the role of Culex pipiens complex mosquitoes in epidemiology. Infection, Genetics and Evolution, v.11, no.7, 2011 Oct, p.1577(9) (ISSN: 1567-1348).
- Faran, M. E., M. J. Turell, W. S. Romoser, R. G. Routier, P. H. Gibbs, T. L. Cannon, and C. L. Bailey. 1987. *Reduced survival of adult Culex pipiens infected with Rift Valley fever virus*. Am. J. Trop Med. Hyg. 37: 403-409.
- Faran ME, Romoser WS, Routier RG, Bailey CL 1988. *The distribution of Rift Valley virus in the mosquito Culex pipiens as revealed by viral titration of dissected organs and tissues*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 39: 206-213.
- Fernando (C.H.), 1964. - *Report on a study of some freshwater habitats in Rangoon with special reference to the ecology of Culex pipiens fatigans*. J. Ceylon med. Sci., 13, 78-112.
- Fonseca et al. 2004. *Outbreak of West Nile virus in North America response*. Science 306, 1473-1475.
- Garbouj et al. (2003). *La maladie du Nil occidental*. Bulletin épidémiologique. 3, 4-6.
- Girard Y.A., Klingler K.A. et Higgs S. (2004) *West Nile virus dissemination and tissue tropisms in orally infected Culex pipiens quinquefasciatus*. Vector Borne Zoonotic Dis 4 (2): 109-22.
- Goddard L.B., Roth A.E., Reisen W.K. et Scott T.W. (2002) *Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus*. Emerg. Infect. Dis. 8 (12): 1385-91.

- Gomes, B., C.A. Sousa, M.T. Novo, F.B. Freitas, R. Alves, A.R. Côrte-Real, P. Salgueiro, M.J. Donnelly, A.P. Almeida, and J. Pinto. 2009. *Asymmetric introgression between sympatric molestus and pipiens forms of Culex pipiens (Diptera: Culicidae) in the Comporta region, Portugal*. BMC Evol. Biol. 9: 262.
- Gubler DJ, 2007 - *The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere*. 2007 Clin Infect Dis.; 45:1039–46.
- Guillemaud et al. 1997. *Contrasting levels of variability between cytoplasmic genomes and incompatibility types in the mosquito Culex pipiens*. Proceedings of the Royal Society. Biological Sciences. 22, 245-251.
- Hamon, J., Sales, J. & Eyraud, M. (1963) Riv. Malar., 42, 54.
- Harbach et al. 1984. *Culex (Culex) molestus Forskal: Neotype designation, description, variation and taxonomic status*. Proceeding Entomological Society Wash 86, 521-542.
- Hardy, J. L., Houk, E. J., Kramer, L. D. & Reeves, W. C. (1983). *Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses*. Annu Rev Entomol 28, 229–262.
- Hayes C.G., Basit A., Bagar S. et Akhter R. (1980) *Vector competence of Culex tritaeniorhynchus (Diptera: Culicidae) for West Nile virus*. J Med Entomol 17 (2) : 172-7.
- Hegh E., 1921 – *Les moustiques, mœurs et moyens de destruction*. Ed. Imprim. Indust. & Financ., Bruxelles, 239 p.
- Hubalek and Halouzka. 1999. *West Nile virus fever: a re-emerging mosquito-borne viral disease in Europe*. Emerging Infectious Diseases 39, 113-120.
- Hurlbut H.S. (1956) *West Nile virus infection in arthropods*. Am J Trop Med Hyg 5 (1): 76-85.
- Jupp P.G., McIntosh B.M. et Brown R.G. (1966). *Laboratory transmission experiments with West Nile and sindbis viruses and Culex (Culex) theileri Theobald*. Afr J Med Sci 31 (3): 95-7.
- Jupp P.G. et McIntosh B.M. (1970) *Quantitative experiments on the vector capability of Culex (Culex) univittatus Theobald with West Nile and Sindbis viruses*. J Med Entomol 7 (3): 371-3.
- Jupp P.G. (1974) *Laboratory studies on the transmission of West Nile virus by Culex (Culex) univittatus Theobald; factors influencing the transmission rate*. J Med Entomol 11 (4): 455-8.
- Jupp P.G. (1976) *The susceptibility of four South African species of Culex to West Nile and Sindbis viruses by two different infecting methods*. Mosq News 36 (2): 166-73.
- Jupp P.G., McIntosh B.M. et Blackburn N.K. (1986) *Experimental assessment of the vector competence of Culex (Culex) neavei Theobald with West Nile and Sindbis viruses in South Africa*. Trans R Soc Trop Med Hyg 80 (2): 226-30.
- Jupp et al. 2002. *The 2000 epidemic of Rift Valley fever in Saudi Arabia: mosquito vector studies*. Medical and Veterinary Entomology 16, 245-252.
- Kilpatrick et al. 2007. *Genetic influences on mosquito feeding behavior and the emergence of zoonotic pathogens*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 77, 667-671.

- Knight, K. L. et Abdel Malek, A. A. (1951) *Bull. Soc. Fouad I Entom.*, 35, 175.
- Knight, K.L. et Laffoon J.L., 1971. *A mosquito taxonomic glossary. V. Abdomen (except female genitalia)*. *Mosq. Syst. Newslett.* 3 (1) : 8–24.
- Kramer LD, Ebel GD, *Adv. Virus Res*, 2003; 60:187–232.
- Kuberski T.T. et Rosen L. (1977) *A simple technique for the detection of dengue antigen in mosquitoes by immunofluorescence*. *Am J Trop Med Hyg* 26 (3): 533-7.
- La Deau et al. 2007. *West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations*. *Nature* 447, 710-713.
- Laven H., 1951. *Crossing experiments with Culex strains*. *Evolution* 5, 370-375.
- Le Guenno B., Bougermouh A. Azzam T., Bouakaz R. *West Nile: a deadly virus ? The Lancet*, 1996, 348, 1315.
- Linthicum et al. 1985. *Rift Valley fever virus (Family Bunyaviridae, genus Phlebovirus), isolation from Diptera collected during an inter-epizootic period in Kenya*. *Journal of Hygiene* 95, 197-209.
- Linthicum et al. 1987. *Detection of Rift Valley fever viral activity in Kenya by satellite remote sensing imagery*. *Science* 235, 1656-1659.
- Lopatin O. E. 1988: *Biological, ecological and biochemical characteristics of synanthropic populations in two Culex pipiens subspecies*. Unpubl. PhD. Thesis. Alma-Ata, 16 pp (in Russian).
- Matile L., 1993 – *Diptères d'Europe occidentale*. Ed. Boubée, Paris , T. I, 439 p.
- Mattingly, P. F. 1952. *The problem of biological races in the Culex pipiens complex*. *Proc. Linn. Soc. Lond.* 163: 53D55.
- Mattingly P. F., 1967. *The systematics of the Culex pipiens Complex*. *Bull. Org. mond. Santé, Bull. Wild Hlth Org.*, 1967, 37, 257-261.
- Meegan. 1979. *Rift Valley fever epizootic in Egypt 1977-78. I. Description of the epizootic and virological studies*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73, 618-623.
- Miller et al. 1996. *Phylogeny of fourteen Culex mosquito species, including the Culex pipiens complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA*. *Insect Molecular Biology*. 5, 93-107.
- Meegan & Bailey. 1988. *Rift Valley fever. In: The Arboviruses Epidemiology and Ecology, IV*, T.P. Monath (Ed), CRC, Boca Raton. 51-76.
- Morvan et al. 1991. *Possible Rift Valley fever outbreak in man and cattle in Madagascar*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85, 108-109.
- Mouchet J., Rageau J. et Chippaux A., 1969 - *Hibernation de Culex modestus Ficalbi (Diptera, Culicidae) en Camargue*. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. Méd. et Parasitol.*, 7 (1) : 35–37.

- Moutailler, S., G. Krida, F. Schaffner, M. Vazeille and A.B. Failloux, 2008. *Potential vectors of rift valley fever virus in the mediterranean region*. Vector Borne Zoonotic Dis., 8: 749-753.
- Muller R, Saluzzo JF, Lopez N, Dreier T, Turell M, et al. (1995) *Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in the small segment*. Am J Trop Med Hyg 53: 405–411.
- Murgue B., Murri S., Zientara S., Durand B., Durand J.P. et Zeller H. (2001a) *West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years*. Emerg Infect Dis 7 (4): 692-6.
- Murgue et al. (2001b). *West Nile outbreak in horses in Southern France, 2000*. Emerging Infectious Diseases. 7, 962-966.
- Nabeth *et al.* 2001. *Rift Valley fever outbreak, Mauritania, 1998: Seroepidemiologic, virologic, entomologic, and zoologic investigations*. *Emerging Infectious Diseases* 7, 1052-1054.
- Nudelman et al. 1988. *Physiological characteristics of Culex pipiens in the Middle East*. Medical and Veterinary Entomology 2, 161-169.
- O. M. S., 2007 - *La mobilisation sociale pour la prévention et la lutte contre les arboviroses (la dengue)*. Colloque “Chikungunya et autres arboviroses en milieu tropical, 3 et 4 Décembre 2007, Saint Pierre (Réunion), 25 p.
- Ramade F., 1984 – *Eléments d'écologie – Ecologie fondamentale*. Ed. Mc Graw-Hill, Paris , 397p.
- Ramos H.-C. et Brunhes J., 2004 – *Insecta, Diptera, Culicidae, Uranotaenia. Faune de Madagascar 91*. Ed. IRD Édition, CIRAD, MNHN-Paris, Montpellier, 463 p.
- Reeves W.C. 1965. - *Ecology of mosquitoes in relation to arboviruses*. Ann. Rev. Ent., 10 : 25-46
- Reisen W.K., Fang Y. et Martinez V.M. (2006) *Effects of Temperature on the Transmission of West Nile Virus by Culex tarsalis (Diptera: Culicidae)*. J Med Entomol 43 (2): 309-17.
- Reisen WK, Lothrop HD, Wheeler SS, Kensington M, Gutierrez A, Fang Y, Garcia S, Lothrop B. *Persistent West Nile virus transmission and the displacement St Louis encephalitis virus in southeastern California, 2003–2006*. J Med Entomol 2008b;45:494–508.
- Reusken, C., De Vries, A., Buijs, J., Braks, M. A., den Hartog, W. & Scholte, E. J. (2010) *First evidence for presence of Culex pipiens biotype molestus in the Netherlands, and of hybrid biotype pipiens and molestus in northern Europe*. Journal of Vector Ecology 35, 210-212.
- Rodhain F. et Perez C., 1985 – *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire*. Ed. Maloine S. A., Paris , 458p.
- Rodhain F., 1996 - *Worldwide spread of Aedes albopictus*. Bul. Soci. Path. Exot., 89 (2) : 137-141.
- Roubaud, 1933 - *Essai synthétique sur la vie du moustique commun Culex pipiens. L'évolution humaine et les adaptations biologiques du moustique*. Ann. Sci. Nat. (Zoologie), 16.
- Sall et al. 1997. *Variability of the NSs protein among Rift Valley fever virus isolates*. Journal of General Virology 78, 2853-2858.

- Sall AA, Zanotto PMA, Vialat P, Sene OK, Bouloy M. Origin of 1997-98 Rift Valley fever outbreak in East Africa. *The Lancet*, 1998, 352 (9140): 1596-1597.
- Sardelis M.R., Turell M.J., Dohm D.J. et O'Guinn M.L. (2001) *Vector competence of selected North American Culex and Coquillettidia mosquitoes for West Nile virus*. *Emerg Infect Dis* 7 (6): 1018-22.
- Schaffner E., Angel G., Geoffroy B., Hervy J.-P., Rhaiem A. et Brunhes J., 2001 – *Les moustiques d'Europe*. Logiciel d'identification et d'enseignement de I. R. D., Montpellier, ISBN 2-7099-1485-9.
- Seguy E., 1923 – *les moustiques de France*. Ed. Paul Lechevalier, Paris, 225 p.
- Seguy E, 1955 - *Introduction à l'étude Biologique et Morphologique des insectes Diptères*. Ed. Muséum Nationale, Rio-de-Janeiro, 260 p.
- Shaikevich 2007. *PCR-RFLP of the COI gene reliably differentiates Cx. pipiens, Cx. pipiens f. molestus and Cx. Torrentium of the Papiens Complex*. *European Mosquito Bulletin*. 23, 25-30.
- Silver John B., 2008 – *Mosquito ecology. Field sampling methods*. Ed. Springer, Netherlands, 1494 p.
- Smith et al. 2005. *Cross-species comparison of microsatellite loci in the Culex pipiens complex and beyond*. *Molecular Ecology Notes*, 5, 679-700.
- Smith et Fonseca 2004. *Rapid assays for identification of members of the Culex (Culex) pipiens complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae)*. *American Journal of Tropical Medicine*. 70, 339-345.
- Smithburn, K. C., Hughes, T. P., Burke, A. W., and Paul, J. H. (1940). *A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda*. *Am. J. Trop. Med.* 20, 471–492.
- Spielman A., 1967 *Population Structure in the Culex pipiens Complex of Mosquitos*. *Org.mond. Santé, Bull. Wild Hlth Org.*, 1967. 37, 271-276.
- Subra R , Hébrard G *Ecologie de Culex pipiens fatigans larves dans une zone de forte endémicité de la filariose de Bancroft*. *Tropenmed Parasitol* 1975 Mar; 26 (1):48-59.
- Tahori A.S., Sterk V.V. et Goldblum N. (1955) *Studies on the dynamics of experimental transmission of West Nile virus by Culex molestus*. *Am J Trop Med Hyg* 4 (6): 1015-27.
- Tempelis. 1974. *Host feeding patterns of mosquitoes with a review of advances in analysis of blood meals by serology*. *Journal of Medical Entomology* 11, 635-653.
- Tiawsirisup S., Platt K.B., Evans R.B. et Rowley W.A. (2004) *Susceptibility of Ochlerotatus trivittatus (Coq.), Aedes albopictus (Skuse), and Culex pipiens (L.) to West Nile virus infection*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 4 (3) : 190-7.
- Tiawsirisup S., Platt K.B., Evans R.B. et Rowley W.A. (2005) *A Comparison of West Nile Virus Transmission by Ochlerotatus trivittatus (Coq.), Culex pipiens (L.), and Aedes albopictus (Skuse)*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5 (1) : 40-7.

- Traore-Lamizana et al. 1994. *Isolations of West Nile and Bagaza viruses from mosquitoes in Central Senegal (Ferlo)*. Journal of Medical Entomology 31, 934-938.
- Triki et al. 2001. *West Nile viral meningo-encephalitis in Tunisia*. Medecine Tropicale 61, 487-490.
- Turell M.J., Bailey C.L. et Rossi C.A. (1984) Increased mosquito feeding in Rift Valley Fever virus-infected lambs. Am J Trop Med Hyg 33 (6): 1232-8.
- Turell M.J., O'Guinn M. et Oliver J. (2000) *Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus*. Am J Trop Med Hyg 62 (3): 413-4.
- Turell M.J., O'Guinn M.L., Dohm D.J. et Jones J.W. (2001) *Vector competence of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus*. J Med Entomol 38 (2): 130-4.
- Turell M.J., Dohm D.J., Sardelis M.R., O'Guinn M.L., Andreadis T.G. et Blow J.A. (2005) *An update on the potential of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile Virus*. J Med Entomol 42 (1): 57-62.
- Urbanelli et al. 1981. *Adattamento all' ambiente urbano nella zanzara Culex pipiens* In : Moroni A., Ravera O. Et Anelli A (eds). Ecologia, Atti I Congressi nazionali S. It. E., pp 305-316. Zara, Parma.
- Vaidyanathan R, Scott TW. *Geographic variation in vector competence for West Nile virus in the Culex pipiens (Diptera: Culicidae) complex in California*. Vector Borne Zoonotic Dis. 2007;7:193–198.
- Varma M.G.R. (1960). *Preliminary studies on the infection of Culicine mosquitoes with the Tamilnad strain of West Nile virus*. Indian J Med Res 48: 537-48.
- Vermeil C., Lavillaureix J. et Reeb E. (1960) *Sur la conservation et la transmission du virus West Nile par des arthropodes*. Bull Soc Pathol Exot 53 : 273-9.
- Villani et al. 1986. *Electrophoretic variation of Culex pipiens from Egypt and Israel*. Biol. J. Linn. Soc. 29, 49-62.
- Vinogradova E. B., Reznik S. YA. & Kuprijanova E. S. 1996: *Ecological and geographical variations in the siphonal index of Culex pipiens larvae (Diptera: Culicidae)*. Bull. Entomol. Res. 86: 281–287.
- Vinogradova E. B. 2000: *Culex pipiens pipiens mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control*. Sofia-Moscow: Pensoft, 250p.
- Vinogradova E. B. 2003 *Eco-physiological and morphological variations in mosquitoes of the Culex pipiens complex (Diptera: Culicidae)* Acta Soc. Zool. Bohem. 67: 41–50, 2003.
- Vinogradova et Shaikovich 2005. *Differentiation between the urban mosquito Culex pipiens pipiens f. molestus and Culex torrentium (Diptera, Culicidae) by the molecular methods*. Parasitologia. 39, 574-576.
- Walsh. 1988. *Rift Valley fever rears its head*. Science 240, 1379-1399.

- Weber W, Fux C, Daoud-El Baba M, Keller B, Weber CC, Kramer BP, Heinzen C, Aubel D, Bailey JE, Fussenegger M. 2002. *Macrolidebased transgene control in mammalian cells and mice*. Nat Biotechnol 20(9):901– 907.
- Weaver, S. C., C. Ferro, R. Barrera, J. Boshell, and J. C. Navarro. 2004. *Venezuelan equine encephalitis*. Annu. Rev. Entomol. 49: 141-174.
- Wood, D.M., P.T. Dang and R.A. Ellis, 1979. *The Mosquitoes of Canada (Diptera: Culicidae)*. Canadian Department of Agriculture Publication, Ottawa, Canada, 390p.
- Woods et al. 2002. *An outbreak of Rift Valley fever in Northeastern Kenya, 1997-98*. Emerging Infectious Diseases 8, 138-144.
- Zeller. 1999. *West Nile : une arbovirose migrante d'actualité*. Médecine Tropicale. 59, 490-494.
- Zeller and Schuffenecker. 2004. *West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 23, 147-156.



# Annexes

## **Annexes :**

### Station d'études et Méthodes d'échantillonnage



*Epigé Péri-Urbain Les Crêtes El-Kala*



*Gîte Hypogé Péri-Urbain Les Crêtes El-Kala*



*Larves Culex pipiens gîte Epigé Péri-Urbain Les Crêtes El-Kala*



*Gîte Hypogé Urbain -Cave d'un Bâtiment- El-Kala*



*Méthode du Dipping gîte Epigé Urbain*



*Gîte Epigé Urbain -Oued d'eau usée- El-Kala* X

Station d'études et Méthodes d'échantillonnage (Suite).



*Méthode du Dipping gîte Epigé  
Rural Tonga*



*Larves Culex pipiens gîte Epigé  
Rural Tonga*



*Gîte Epigé Rural Tonga*



*Relever des paramètres physico-chimiques gîte  
Hypogé Rural Tonga*



*Gîte Hypogé Urbain Chellal  
Wilaya de M'sila*



*Larves gîte Epigé Péri-Urbain Oued  
Ksob Wilaya de M'sila*

Station d'études et Méthodes d'échantillonnage (Suite).



*Epigé Rural Bechelga Wilaya de M'Sila*



*Gîte Hypogé Urbain Tinerkouk  
Wilaya d'Adrar*



*Collecte de femelles gorgées à l'aide d'un  
aspirateur a Bouche*



*Collecte de femelles gorgées dans les sites de repos (Rural  
El-Kala - Tonga) (étable)*

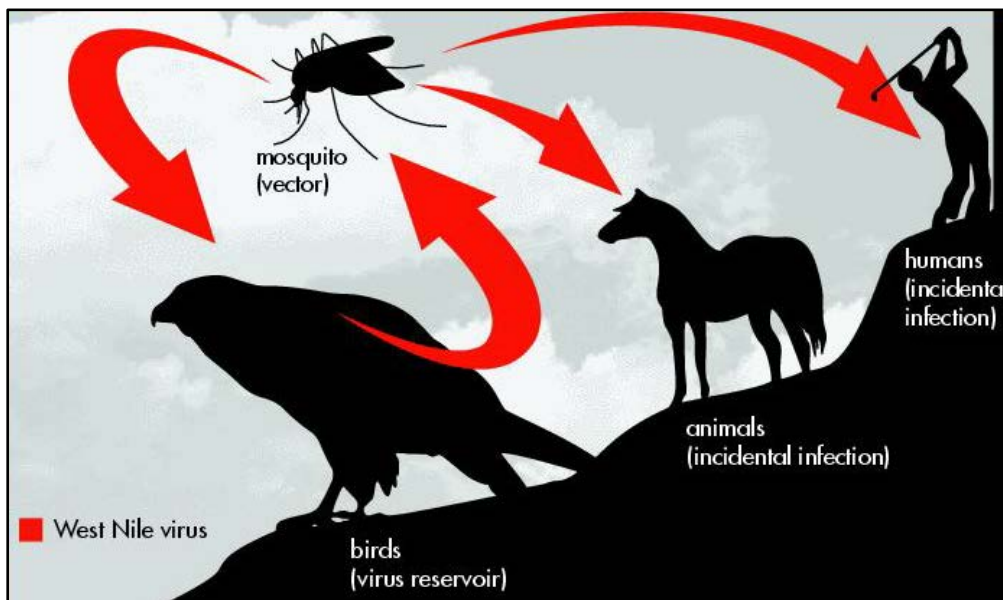
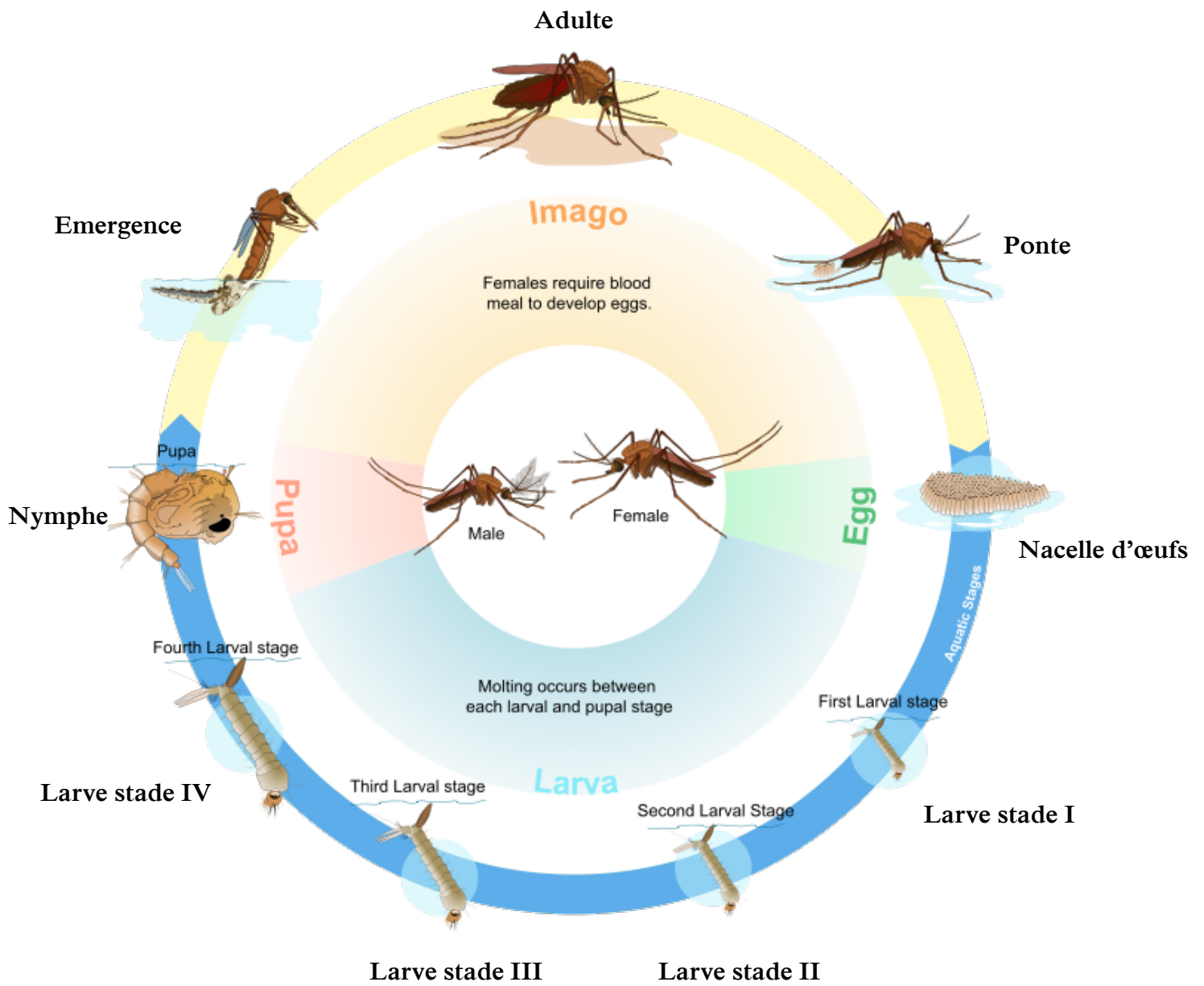


*Tri et identification des femelles gorgées  
récoltés dans des tubes contenant du  
silicagel, et conservation à -20° C.*



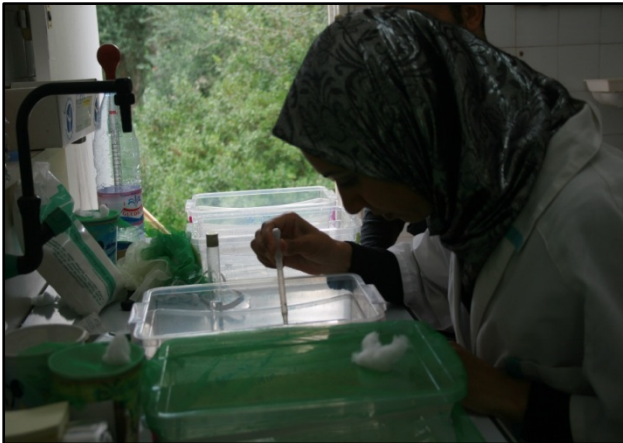
*Collecte de femelles gorgées dans les sites de repos (Péri-  
urbain El-Kala) (Habitations Humaines)*

Cycle de développement de *Culex pipiens*



Cycle de transmission du virus West - Nile

## Méthodes de laboratoire adoptées



*Tri des Larves et Nympe (Cliché*



*Isolation des nymphes  
(Cliché Gharni R., 2010)*



*Préparation de la mise en couple  
(Cliché Gharni, 2010)*



*Mise des femelles pour le gorgement de sang  
sur Caille (Cliché personnel, 2010)*



*Retrait des femelles pour le gorgement de sang à l'aide  
d'un aspirateur a bouche (Cliché Gharni, 2010)*



*Hôte : Caille « Coturnix japonica » (Cliché  
personnel, 2010)*



*Insectarium (Cliché personnel, 2010)*

**Humidificateur à Ultrasons**



*Radiateur a bain d'huile  
(Cliché personnel, 2010)*



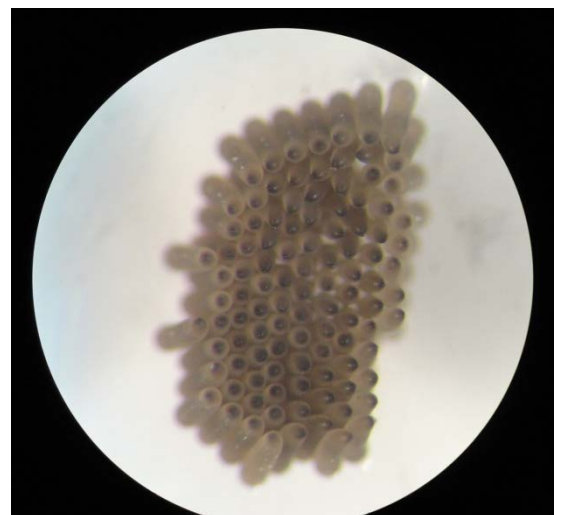
*Mise en couple (Cliché personnel, 2010)*



*Lampe à ultraviolet (Cliché personnel, 2010)*



*Comptage des œufs (Cliché personnel, 2010)*



*Vue d'une nacelle d'œufs sous  
binoculaire x10 (Cliché personnel,  
2010)*

## Protocol ELISA REPAS DE SANG

Technique Didier Fontenille, d'après Beier JC et al. Fév. 2002, LIN.

- Beier, J.C., Perkins, P.V., Wirtz, R.A., Koros, J., Diggs, D., Gargam, T.P.I.I., Koech, D.K. (1988) *Bloodmeal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tested on Anopheles (Diptera : Culicidae) in Kenya*. J. Med. Entomol. 25: 9-16. (et Sarthou pour la coloration).

01 - Préparer le Tampon "Repas de sang" (à garder à + 4°C, 1 à 2 semaines)

Pour 1/2 litre :

- 2,5 g de caséine dans 50 ml de NaOH 0,1N;
- Faire bouillir jusqu'à totale dissolution
- Ajouter 450 ml de PBS.
- Ajouter 0,025 % Tween 20 (soit 125 µl/1/2 l).
- Ajouter 0,05 g Thiomerosal.
- Ajouter 0,01 g Phenol rouge

Agiter 2 h

- Préparer le **Tampon Citrate pH4** :

Pour **1 litre** :

- Acide citrique, 1 H<sub>2</sub>O 11,77 g.
- Hydroxyde de Sodium 4,48 g.

Dissoudre la soude dans 200 ml d'eau bidistillée, puis l'acide citrique dans cette solution.

Ajouter 400 ml d'eau bidistillée. Ajuster le pH à 4 avec de l'acide Chlorhydrique 1N.

Compléter à 1 l avec de l'eau bidistillée.

02 - Avec **SPOTS** (Confetti sur papier filtre)

\* Découper le spot, le mettre env.dans 0,8 ml de PBS

(selon la quantité probable de sang)

\* Vortexer 1 ou 2 fois I

\* Laisser au moins 1 h I

Avec **ABDOMENS COUPES** (moustiques secs)

\* Broyer dans 250 µl de PBS

\* ajouter environ 750 µl de PBS

03 - Préparer les **témoins positifs** : sang dilué au 1/100 en moyenne.

10  $\mu$ l de sérum d'espèce dans 1 ml de PBS (homme (1/100), poulet (1/200), boeuf (1/100), mouton (1/30), chèvre (1/30), porc (1/100), cheval (1/100), chien (1/100), rat, .....).

04 - **Sensibiliser les plaques.**

Mettre 50  $\mu$ l de solution de sang à tester par puits (un moustique par colonne).



*Sensibilisation des plaques (Cliché personnel, 2011)*

05 - **Incubation 3 h** à la température de la pièce ou la nuit à + 4°C

06 - Préparer les anticorps spécifiques d'espèces marqués à la peroxydase :

Reconstituer les IgG marquées selon la notice. Garder au congélateur.

Pour **une plaque** il faut :

50  $\mu$ l X 12 = 600  $\mu$ l (+50  $\mu$ l) = 650  $\mu$ l de solution de chaque IgG marquées

Dilutions à faire (**dilution à vérifier par un damier, fonction de la marque**) :

Homme	1/4000	1 $\mu$ l IgG +	4 ml Tampon pour TROIS plaques
Boeuf	1/1000	2 $\mu$ l IgG +	2 ml Tampon
Poule	1/2000	1 $\mu$ l IgG +	2 ml Tampon
Mouton	1/500	4 $\mu$ l IgG +	2 ml Tampon
Cheval	1/1000	2 $\mu$ l IgG +	2 ml Tampon

07 - Ajouter dans chaque tube d'IgG marquées les **sérums hétérologues** au 1/1000<sup>ème</sup>.

Exemple: Tube anti homme : aux AC marqués anti-homme dans 4 ml tampon

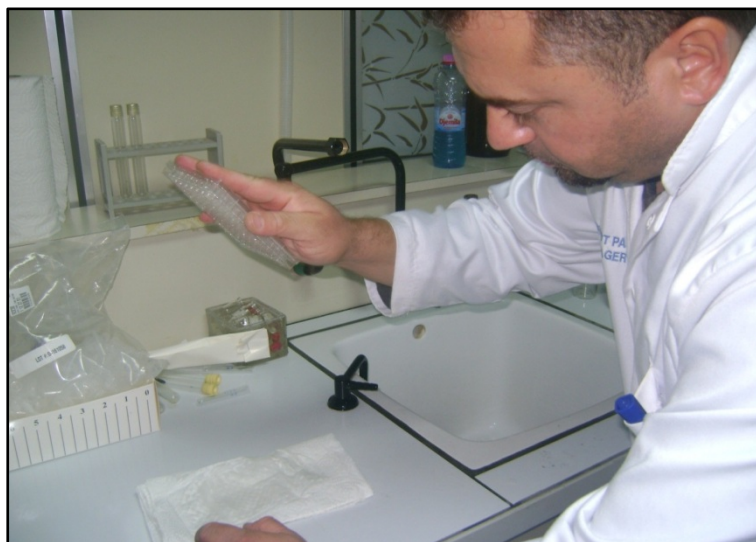
- ajouter 4 $\mu$ l de sérum de boeuf + 4 $\mu$ l de sérum de poule + 4 $\mu$ l de sérum de mouton + 4 $\mu$ l de sérum de cheval + 4 $\mu$ l de sérum de porc + 4 $\mu$ l de sérum de chèvre + 4 $\mu$ l de sérum de chien etc... (Tous les autres sérums sauf Homme).

SAUF pour Mouton et Chèvre : ne PAS mettre de sérum de mouton avec AC marqués anti-chèvre, ne PAS mettre de sérum de chèvre avec AC marqués anti-mouton.

08 - **Laver 2 fois** au PBS-Tween



*Lavage de la plaque deux fois au PBS-Tween (Cliché personnel, 2011)*



*L'assèchement de la plaque (en la frappant vigoureusement sur un papier absorbant) (Cliché personnel, 2011)*

09 - Distribuer **50 µl par puits de solution d'IgG marquées**. Mettre une IgG par rangée.



*Distribution de 50µl par puits de solution d'IgG marquées (une IgG par rangée), et laisser incuber une heure à la température de la pièce sur la paillasse. (Cliché personnel, 2011)*

10 - Incubation 1 h à RT sur la paillasse

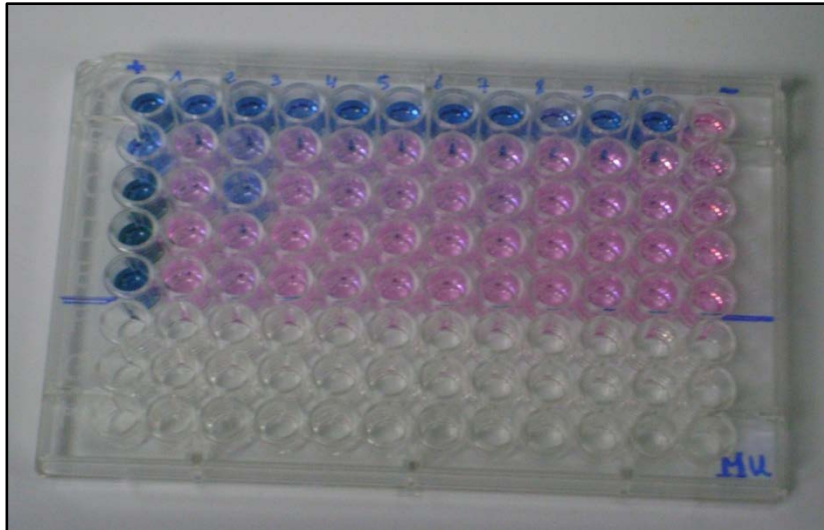
11- Vider La Plaque. Laver 4 Fois Au Pbs/Tween 20

12 - 10 minutes avant la fin de l'incubation, préparer le substrat de la peroxydase (selon Lhuillier, Sarthou et al 2002) :

Pour 3 plaques :

- 5 mg d'Ortho-tolidine dans 0,25 ml de N,N-**diméthyl formamide**
- 30 ml de **Tampon citrate**
- 12 µl de **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** à 10% (ou 4 µl à 30%).

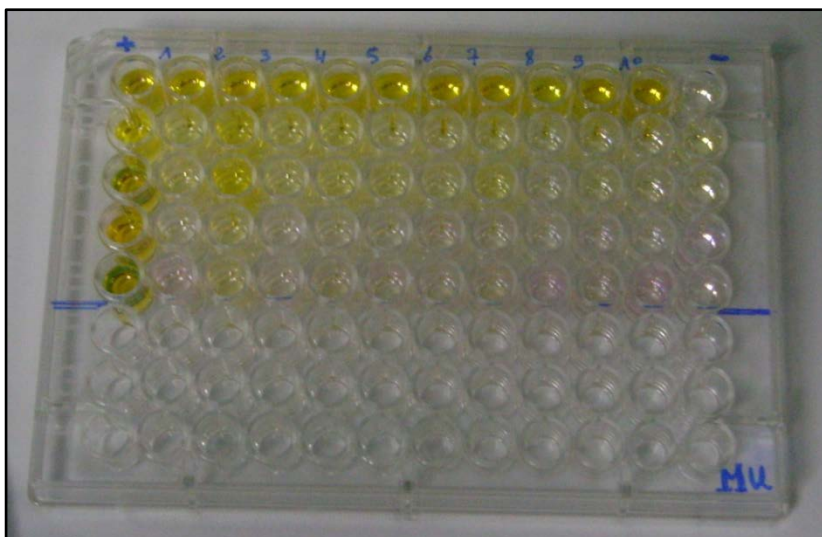
13 - Distribuer **100µl** de **substrat** par cupule



*La distribution de substrat dans chacun des puits, et enfin incuber la plaque à l'obscurité pendant 30minutes (coloration bleu), 1er lecture.  
(Cliché personnel, 2011).*

14 - **Incubation** à l'obscurité, pendant 30 minutes (coloration bleu 620 nm)

15 - Blocage par 50 µl d'**acide sulfurique** 4N : Coloration jaune



*Blocage de la réaction par le dosage de 50µl d'acide sulfurique 4N dans chaque puits. (Cliché personnel, 2011).*

16 - Lecture à 620 et 450 nm sur le lecteur Elisa

SERVICE ECO-EPIDEMIOLOGIE PARASITAIRE - Institut Pasteur D'Algérie  
UNITE D'ENTOMOLOGIE MEDICALE.

N° plaque:

**ELISA Repas de Sang**

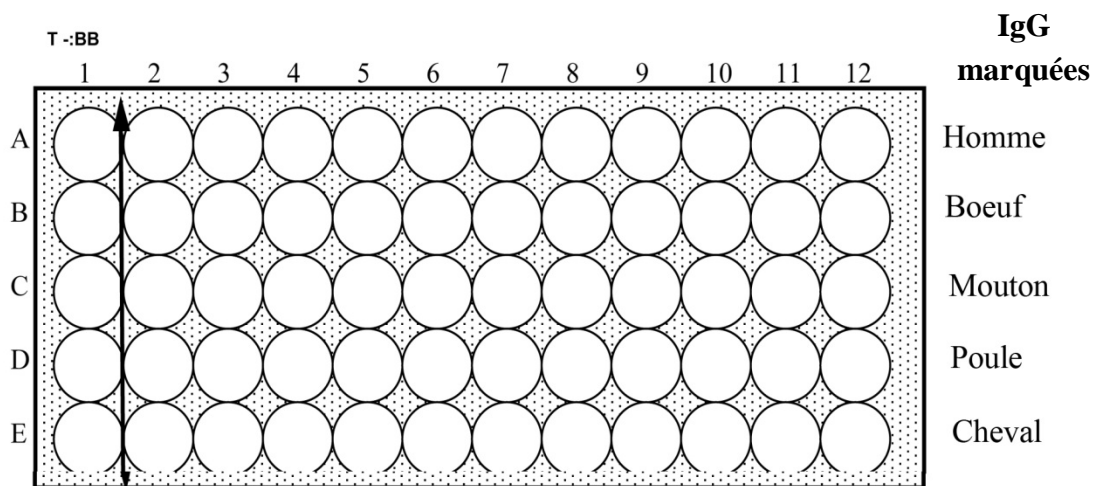
Saisi dans la base et controlé le:

Date : 21/11/2011

OPERATEUR ELISA: **Boubidi S.C**

Origine des moustiques: **M'Sila Urbain**

Date capture:



*Schéma de la plaque (ELISA Repas de Sang)*



*La lecture de la plaque par spectrophotomètre (lecture à 450nm sur le lecteur ELISA).*

## Protocole PCR

### I. Préparation de mélange réactionnel (Mix)

L'ensemble de la manipulation PCR s'effectue sous la hotte à flux laminaire, avec des gants, afin d'être dans un environnement le plus propre possible. Le Mix (mélange réactionnel) est tout d'abord réalisé en introduisant dans l'ordre et en vortexant : le tampon 1x, 2mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 200μmol/L dNTP , les amorces(0,1μmol/L de pipCQ11R,0,15μmol/L de molCQ11R et de CQ11F2), 0,15mg/mL de BSA(albumine sérum de bovin) et 1U de La Taq-polymérase qui est sortie du congélateur à -20°C et ajoutée à la dernière minute (dès qu'elle est sortie du congélateur, elle est immédiatement placée dans la glace), il ne faut plus vortexer sous risque d'inactiver la Taq. Finalement, l'eau est introduite et le Mix est mélangé doucement .

Le Mix est ensuite répartie de façon homogène dans les différents tubes (50μL).En dernier lieu,1μL d'ADN(1 patte de moustique : comme source d'ADN) est ajouté tube par tube, en veillant bien à changer de cône entre chaque tube (et toujours mettre ces tubes dans un congélateur pour éviter la contamination.

**-dNTP (nucléotide)** Les dNTP (deoxynucleotide triphosphate), ce mélange contient les différentes bases A, T, G, C sous la forme ATP,TTP,CTP,GTP

**Les amorces :** Les amorces ou oligonucléotides (primer), ce sont des polymères nucléotidiques, de 10 à 30 paires de base, de séquences spécifiques du gène à amplifier.

**1-pipCQ11R Amorcer1** pour la forme *pipiens*.

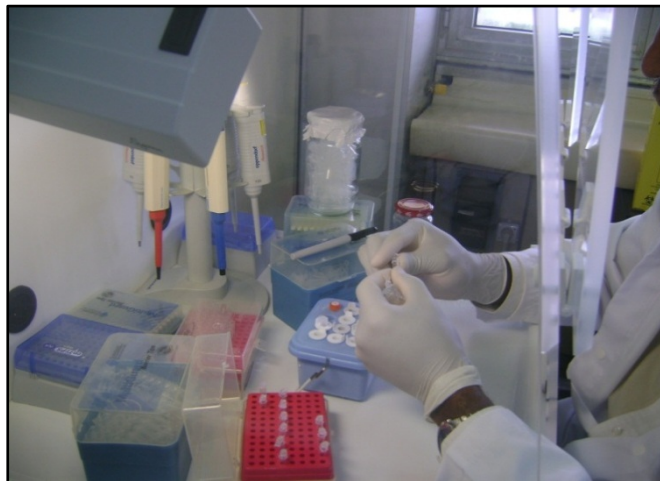
**2-molCQ11R Amorcer2** pour la forme *molestus*.

**3-CQ11F2 Amorcer3** pour la forme *hybride*.

**-Tampon** Un tampon 10X est souvent utilisé, il contient en général du Tris-Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub> (15mM), pH8.7.

**-Mgcl2** MgCl<sub>2</sub>, les ions magnésium sont importants dans la PCR, ils influent sur l'activité enzymatique de la Taq, ne pas mettre de MgCl<sub>2</sub> augmente l'astringence de la réaction.

**-Taq :** protéine, la Taq polymérase est une ADN polymérase thermostable. Elle résiste à des températures répétées pouvant atteindre jusqu'à 95°C.



*Préparation de mélange réactionnel  
(Cliché personnel, 2011)*

## II. Phase d'amplification

On met les tubes contiennent les échantillons à amplifiés rapidement dans le thermocycleur, où ils passent par trois phases d'amplification :

Phase de pré-dénaturation (1cycle): 94°C pendant 5 minutes

Phase d'hybridation-élongation (35cycles):

- 94°C pendant 30 seconds
- 55°C pendant 30seconds,
- 72°C pendant 1 minute,

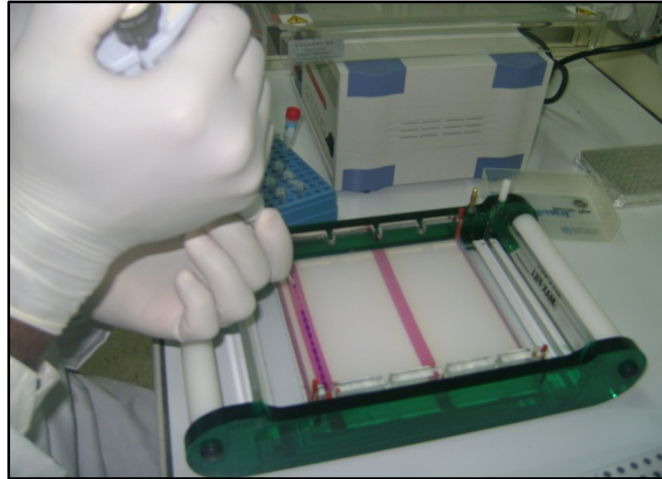
Phase d'élongation finale (1cycle) :72°C pendant 5 minutes.



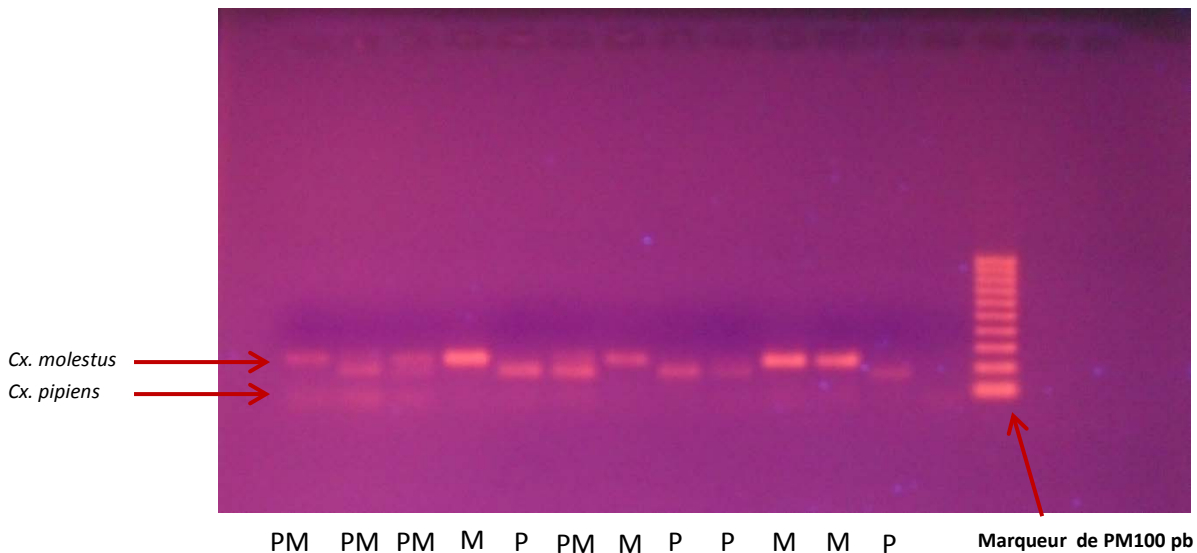
*Mettre les tubes (Mix + ADN) dans le thermocycleur pour l'amplification de l'ADN Amplification par Taq-polymérase (Cliché personnel)*

### III. L'analyse des produits PCR

Lorsque la PCR est terminée, les produits amplifiés sont étudiés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. pour une durée d'environ 1H30. La révélation se fait sous UV, pour cela il est nécessaire d'introduire dans le gel du bromure d'ethyidium (**BET**). Les bandes observées sur le gel sont censées être spécifiques des fragments d'ADN des échantillons encadrés par les amorces, maintenant amplifiés.



*Migration des produits amplifiés par électrophorèse sur gel d'agarose.  
(Cliché personnel)*



*Observation sous UV d'un gel d'électrophorèse après amplification par PCR ; P : pipiens ; M : molestus et PM : Hybrides. (M'Sila Epigé Rural)  
(Cliché personnel)*