



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB-BLIDA**

Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques

Département de Biologie

Mémoire de projet de Fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de

**Master II en biologie**

**Option : Entomologie Médicale**

THEME

**Identification morphologique et analyse  
biochimique du polymorphisme génétique des  
phlébotomes de la région de Batna et Blida**

**Présenté par : M<sup>me</sup> Benikhlef Razika**

Soutenu le 30/09/13

**Membres du jury :**

Présidente :	M <sup>me</sup> Djazouli F.Z.	Maître de Conférences B, USDB
Examinatrices :	M <sup>me</sup> Ayadi R.	Maître de Conférences B, USDB
	M <sup>me</sup> Kara Toumi F.Z.	Maître de Conférences A, USDB
Promotrice :	M <sup>me</sup> Tail G.	Maître de Conférences A, USDB
Co-Promoteur:	M <sup>r</sup> Harrat Z.	Directeur de Recherche, IPA
Invité :	M <sup>r</sup> Benallal K.	Attaché d'Etudes, IPA

**Promotion: 2012-2013**

# Remerciements

---

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à M<sup>me</sup> Djazouli F.Z Maître de Conférences du département de Biologie, Université Saad Dahlab de Blida de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury et d'examiner ce travail.

J'exprime mes vifs remerciements à M<sup>me</sup> Kara Toumi F.Z Maître de Conférences du département de Biologie, Université Saad Dahlab de Blida qui a accepté de juger et d'examiner ce modeste travail.

Je tiens à exprimer ma très grande considération à M<sup>me</sup> Tail Ghania, Maître de Conférences du département de Biologie, Université Saad Dahlab de Blida, à qui je dois mes premiers pas dans le domaine d'Entomologie Médicale, pour ses conseils, ses commentaires et sa bienveillance. Qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude de m'avoir aidée tout au long de ces deux années de Master.

Je remercie infiniment D<sup>r</sup> Harrat Zoubir, Responsable du Centre National de Référence de *Leishmania* et chef de service d'Eco-épidémiologie parasitaire et génétique de population de l'Institut Pasteur d'Algérie, de m'avoir conseillé et accordé la plus grande confiance dans la réalisation de cette étude qui a enrichi mes connaissances dans le domaine de l'Entomologie.

Je ne remerciais jamais assez M<sup>r</sup> Benallal Kamel Entomologiste au Service d'Eco-épidémiologie parasitaire et génétique de population de l'Institut Pasteur d'Alger pour tout l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Sa constante disponibilité tout au long de ce travail, son dynamisme exceptionnel et sa grande rigueur ont largement contribué à l'élaboration de cette étude.

Je tiens aussi à remercier tous mes collègues du service d'Eco-épidémiologie parasitaire pour leur soutien et leur aide : Naouel, Rafik, Ihcen, Souad, Sihem, Ghania, Lazhari & Adlen.

J'adresse mes remerciements à toute personne de la Garde républicaine de la Jumenterie de Blida qui a contribué de près ou de loin à l'avancée de ce travail.

Je remercie mon cher mari qui m'a supporté, aidé et guidé avec ses conseils pendant ces deux années de Master, et aussi mon adorable petit chou mon amour éternel....mon fils Zineddine.

Un grand merci à ma famille pour leur soutien, mes frères, mes sœurs et plus particulièrement mes parents : merci papa et merci mama.

# Glossaire

---

**Allèle:** ce terme représente l'état d'un gène sur un chromosome. Chez les organismes diploïdes, un gène possède deux allèles, chacun sur l'un des deux chromosomes homologues. Si les deux copies sont identiques, l'individu est dit **homozygote**; si les deux copies sont différentes, l'individu est **hétérozygote**. La proportion d'individus hétérozygotes définit l'hétérozygotie de la population pour le marqueur considéré. C'est un des paramètres permettant de quantifier le degré de diversité génétique au sein d'une population.

**Endophile :** Se dit des insectes adultes hématophages qui vivent après leur repas sanguin essentiellement dans les habitations (par opposition à l'insecte exophile).

**Espèces sympatriques :** l'existence de deux espèces phylogénétiquement proches, vivant sur un même territoire, mais ne s'hybridant pas (n'ayant pas de descendance).

**Gène:** Un gène est un enchaînement de bases sur l'ADN destiné à être transcrit puis traduit en une succession d'acides aminés qui formeront une protéine. En génétique des populations, ce terme désigne, plus généralement, un fragment d'ADN non recombinant qui peut être codant ou non.

**Génotype :** l'information portée par le génome d'un organisme, contenu dans chaque cellule sous forme d'acide désoxyribonucléique (ADN).

**Introgression :** désigne le transfert (naturel ou dans certaines circonstances plus ou moins contrôlé) de gènes d'une espèce vers le pool génétique d'une autre espèce, génétiquement assez proche pour qu'il puisse y avoir inter fécondation

**Isoenzymes :** sont des protéines ayant la même fonction enzymatiques mais différant de quelques acides aminés. Ils sont codés par des allèles différents d'un même gène ou par deux gènes différents (rarement plus).

**Locus:** c'est l'emplacement d'un gène sur le chromosome (= localisation cytologique).

**Mutation :** une modification de l'information génétique dans le génome.

**Phénotype :** est l'ensemble des caractères observables d'un individu.

**Phylogénie :** l'étude des liens existant entre espèces apparentées. Grâce à elle, il est possible de retracer les principales étapes de l'évolution des organismes depuis un ancêtre commun et ainsi de classer plus précisément les relations de parentés entre les êtres vivants.

**Polymorphisme :** désigne la coexistence de plusieurs allèles pour un gène ou locus donnés, dans une population.

**Population:** ensemble d'individus de la même espèce entre lesquels les croisements sont libres (c'est la panmixie).

**Prothorax :** le premier segment du thorax de l'insecte situé derrière la tête.

**Recombinaison :** le phénomène conduisant à l'apparition, dans une cellule ou dans un individu, de gènes ou de caractères héréditaires dans une association différente de celle observée chez les cellules ou individus parentaux.

**Taxons :** est une entité conceptuelle qui est censée regrouper tous les organismes vivants possédant en commun certains caractères taxinomiques ou diagnostiques bien définis.

## Résumé

---

L'importance des phlébotomes provient du rôle vecteur joué par certaines espèces dans la transmission des leishmanioses humaines et animales. Ces infections constituent un réel problème de santé publique en Algérie. L'existence de formes atypiques et d'espèces jumelles a nécessité l'introduction de techniques nouvelles biochimiques et moléculaires dans l'étude du polymorphisme génétique des populations. C'est dans cet objectif que nous avons testé l'apport de la technique iso-enzymatique dans l'étude de la variabilité génétique inter et intra-population de phlébotomes de Batna et Blida.

Les techniques de piégeages ont permis de capturer 298 phlébotomes dans les deux régions d'études. Sur les cinq espèces identifiées (*Phlebotomus perniciosus*, *P. papatasi*, *P. longicuspis*, *P. sergenti* et *Sergentomyia minuta*) deux sont les plus abondantes : *Phlebotomus perniciosus* (85,71%) et *Sergentomyia minuta* (56,79%). La comparaison des profils enzymatique chez ces deux populations et le résultat des tests statistiques des fréquences alléliques basée sur les trois systèmes enzymatiques les plus polymorphes (HK, PGM et GPI) a montré un déséquilibre de Hardy Weinberg (HW) des trois loci étudiés chez *P. perniciosus* ( $F_{IS}=0,542$ ) alors que chez *S. minuta*, le déséquilibre de HW des trois loci a été remarqué seulement dans la population de Batna. Par ailleurs, une variabilité génétique modérée a été constatée aussi bien chez *P. perniciosus* ( $F_{ST} = 0,071$  et  $G_{ST} =3,4\%$ ) que chez *S. minuta* ( $F_{ST} = 0,071$  et  $G_{ST} =3,6\%$ ) dans les deux zones d'études.

Mots clés : Phlébotomes, HW, iso-enzyme, variabilité génétique, Blida et Batna (Algérie).

## Abstract

The importance of sand flies is in the vector role of some species that transmit human and animal leishmaniasis. These infections are a real public health problem in Algeria. The existence of atypical and sibling species has involved the introduction of new molecular and biochemical techniques in the study of populations polymorphism. In this objective we tested the contribution of the iso-enzymatic technique in the study of genetic variability within and among populations of sand flies in Batna and Blida.

Trapping techniques have allowed the capture of 298 sand flies in two areas. Among the five species identified (*Phlebotomus perniciosus*, *P. papatasi*, *P. longicuspis*, *P. sergenti* et *Sergentomyia minuta*), two are most abundant *Phlebotomus perniciosus* (85,71%) and *Sergentomyia minuta* (56.79%). Comparison of enzymatic profiles and statistical tests results of allele frequencies based on the three most polymorphic enzyme systems (HK, PGM and GPI) showed a disequilibrium in Hardy Weinberg (HW) in the three loci studied, for *P. perniciosus* ( $F_{IS} = 0.542$ ) whereas in *S. minuta* HW disequilibrium was observed in three loci only in Batna population. However, a moderate genetic variability was observed both in *P. perniciosus* ( $F_{ST} = 0.071$  and  $G_{ST} = 3.4\%$ ) and in *S. minuta* ( $F_{ST} = 0.071$  and  $G_{ST} = 3.6\%$ ) for the two regions.

Keywords: sand flies, HW, isoenzymatic, genetic variability, Blida and Batna (Algeria).

## ملخص

أهمية ذبابة الرمل في الجزائر تكمن في دورها كناقل لأنواع مختلفة لمرض اللشمانيا (الإنسانية و الحيوانية). هذا المرض يشكل آفة حقيقية للصحة العمومية. وجود الأنواع الغير نمطية حث على ادخال تقنيات حديثة كالكيمياء الحيوية والبيولوجية الجزيئية في دراسة التباين السكاني.

انطلاقا من هذا الهدف، اختبرنا مساهمة تقنية الإزوانزيم في دراسة التباين الوراثي السكاني لذبابة الرمل في منطقتي باتنة والبليدة. تقنية الإلتقاط ساعدت على حصر 298 ذبابة رمل في كلتا المنطقتين. من بين الأنواع الخمس المشخصة، اثنتان كانتا الأكثر وفرة *Phlebotomus perniciosus* (85.71%) و *Sergentomyia minuta* (56.79%). أظهرت مقارنة للمحات الأنزيمية ونتائج الإختبارات الإحصائية للأنزيمات خلافا في توازن (HW) عند *P. perniciosus* ( $F_{IS} = 0.542$ ) عند الأنزيمات الأكثر تعددا (HK, PGM و GPI)، في حين وجدناه أيضا فقط عند *S. minuta* في منطقة باتنة.

من جهة اخرى لاحظنا وجود تنوع جيني طفيف للنوعين بين المنطقتين :

$(0.071=F_{ST}) (3.4\%=G_{ST})$  - *S. minuta* -  $(0.071=F_{ST}) (3.6\%=G_{ST})$  *P. perniciosus*

كلمات البحث: HW, ذبابة الرمل, الإزوانزيمية, التباين الجيني, باتنة والبليدة (الجزائر).

## Liste des figures

Figure 1 : Morphologie du phlébotome adulte .....	6
Figure 2 : Morphologie de l'appareil génital du phlébotome .....	7
Figure 3 : Cycle biologique des phlébotomes.....	9
Figure 4 : Les différents étages bioclimatiques en Algérie.....	11
Figure 5 : Formes de <i>Leishmania</i> .....	12
Figure 6 : Cycle et transmission de <i>Leishmania</i> .....	14
Figure 7: Localisation de la région de Blida et du site de piégeage des phlébotomes.....	17
Figure 8: Localisation de la région de Batna et du site du piégeage des phlébotomes .....	18
Figure 9 : Vue d'ensemble des sites de captures des phlébotomes à Batna .....	19
Figure 10 : Emplacement des pièges adhésifs dans la région de Batna.....	20
Figure 11 : Emplacement des pièges lumineux (CDC) dans la région de Batna .....	21
Figure 12 : capture manuelle des phlébotomes vivants sur paroi verticale dans la région de Batna ...	22
Figure 13 : Selection et conservation des phlébotomes .....	22
Figure 14: Eclaircissement et montage des phlébotomes capturés par pièges huileux .....	24
Figure 15 : Dissection, montage et identification morphologique des phlébotomes capturés par CDC .....	25
Figure 16: Les grandes étapes de l'isoélectrofocalisation.....	30
Figure 17: Critères de bases de l'identification des spécimens capturés .....	35
Figure 18: Distribution des différentes espèces de phlébotomes dans les deux zones d'études .....	36
Figure 19 : Distribution des phlébotomes selon le sexe et le type de piégeage dans la région de Batna .....	36
Figure 20 : Profil électrophorétique des enzymes étudiées chez <i>P. perniciosus</i> et <i>S. minuta</i> dans la région de Blida.....	39
Figure 21: Profil électrophorétique des enzymes étudiées chez <i>P. perniciosus</i> et <i>S. minuta</i> dans la région de Batna .....	39

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des espèces de phlébotomes existantes en Algérie.....	10
Tableau 2 : Distribution des phlébotomes capturés par pièges lumineux (CDC) et par pièges adhésifs dans la région de Batna .....	34
Tableau 3 : Distribution des phlébotomes capturés par pièges lumineux (CDC) dans la région de Blida .....	34
Tableau 4: Distribution des espèces sélectionnées pour le typage iso-enzymatique dans les deux zones d'études.....	37
Tableau 5: Résultat du typage enzymatique sur gel de polyacrylamide selon les différents paramètres testés .....	37
Tableau 6: Résultat du typage enzymatique sur gel d'agarose selon les différents paramètres testés .....	38
Tableau 7: Codage des allèles selon leurs distances de migration .....	38
Tableau 8: Taux de polymorphisme de <i>P. perniciosus</i> par locus dans les deux régions d'études .....	40
Tableau 9: Fréquences alléliques, taille des échantillons, test d'HW pour les populations de <i>P. perniciosus</i> .....	40
Tableau 10: Estimation de la variabilité génétique des populations de <i>P. perniciosus</i> à Blida et Batna .....	41
Tableau 11: Estimation du $F_{IS}$ , $F_{ST}$ et du $G_{ST}$ chez <i>P. perniciosus</i> dans les 2 régions d'études .....	41
Tableau 12: Taux de polymorphisme de <i>S. minuta</i> par locus dans les deux régions d'études .....	42
Tableau 13: Fréquences alléliques, taille des échantillons et test d' HW pour les populations de <i>S. minuta</i> .....	42
Tableau 14: Estimation de la variabilité génétique des populations de <i>S. minuta</i> à Blida et Batna .....	43
Tableau 15 : Estimation du $FIS$ , $FST$ et du $GST$ chez <i>S. minuta</i> dans les 2 régions d'études .....	43

# Sommaire

---

I.	Introduction.....	1
II.	Généralités .....	4
A.	Les phlébotomes .....	4
1.	Critères de classification des phlébotomes.....	4
2.	Caractéristique morphologique .....	4
3.	Biologie et cycle de développement .....	8
4.	Répartition géographique des phlébotomes .....	10
B.	Les phlébotomes et la transmission des leishmanioses.....	12
1.	Taxonomie du parasite.....	12
2.	Cycle du parasite et transmission.....	13
3.	Physiopathologie .....	13
4.	Les leishmanioses en Algérie.....	15
III.	Matériel et méthodes.....	16
A.	Matériel biologique .....	16
1.	Les phlébotomes .....	16
2.	Les systèmes enzymatiques .....	16
B.	Méthodologie .....	17
1.	Zones d'étude.....	17
2.	Capture des phlébotomes .....	18
3.	Sélection et conservation des phlébotomes .....	22
4.	Traitement des échantillons et identification morphologique .....	23
5.	Identification iso-enzymatique.....	25
IV.	Résultats .....	34
A.	Identification morphologique des phlébotomes.....	34
B.	Etude enzymatique.....	37
1.	Sélection des phlébotomes pour le typage enzymatique .....	37
2.	Mise au point de l'électrophorèse des iso-enzymes .....	37
C.	Etude de la variabilité génétique dan les deux zones d'études .....	40



1. Etude de la variabilité génétique selon le sexe .....	40
2. Etude de la variabilité génétique dans la population de <i>P. perniciosus</i> .....	40
3. Etude de la variabilité génétique dans la population de <i>S. minuta</i> .....	42
V. Discussion .....	44
VI. Conclusion .....	48
Bibliographie.....	50
Annexes .....	56
Annexe 1 : Matériel non biologique.....	56
A. Appareillage.....	56
B. Produits chimique.....	56
C. Additifs .....	57
D. Réactifs .....	57
E. Enzymes.....	57
F. Coenzymes.....	57
Annexe 2: préparation des solutions .....	58
Annexe 3: Composition des solutions de révélation enzymatique .....	59
Annexe 4: Fréquences alléliques chez <i>P. Perniciosus</i> .....	60
Annexe 5: Fréquences alléliques chez <i>S. minuta</i> .....	61

## I. Introduction

Les leishmanioses sont un groupe de maladies parasitaires dues à l'infection, de plusieurs mammifères dont l'homme, par un protozoaire flagellé appartenant au genre *Leishmania*. Ce parasite est transmis dans la nature par la piqûre infectante d'un phlébotome vecteur (Dedet, 2009).

Les leishmanioses incluent des affections viscérales, mortelles en absence de traitement, ou tégumentaires laissant des cicatrices indélébiles. Selon l'espèce de *Leishmania*, certaines formes peuvent évoluer vers une leishmaniose cutanée diffuse (LCD), une leishmaniose récidivante ou une leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM). Dans certains cas, la leishmaniose viscérale (LV) peut évoluer vers une forme cutanée connue sous le nom de leishmaniose dermique post-kala-azar (LDPK), qui nécessite un traitement long et coûteux (Dedet, 2009).

Les mesures de prévention recommandées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) sont fondées sur les mesures d'hygiène du milieu et la lutte contre les vecteurs et les réservoirs (Anonyme, 1990). Mais cette lutte est complexe, longue et nécessite l'intervention de plusieurs secteurs multidisciplinaires. Les études entomologiques sont considérées comme les disciplines fondamentales indispensables dans les programmes de lutte anti-vectorielle. Cette approche permet d'une part de connaître la distribution éco-épidémiologique temporelle et spatiales des populations de phlébotomes dans leur milieu naturel et d'identifier les espèces phlébotomiennes incriminées dans la transmission des maladies.

Pendant longtemps, la systématique des phlébotomes a reposé sur des critères morphologiques. Cette étude bien qu'elle soit très utile dans la différenciation entre populations d'une même espèce, a des limites : elle ne peut différencier deux espèces cryptiques ou atypiques. Ceci peut avoir des conséquences sur l'identification des espèces vectrices dans les foyers de leishmaniose. Ces dernières années, de nouvelles techniques plus élaborées, se basant sur des critères internes ont été introduites dans la taxonomie des phlébotomes, tels que : les études morphologiques détaillées, l'analyse des chromosomes (Dimuccio *et al.*, 2000; Depaquit *et al.*, 2000), l'élevage des stades pré-imaginaux et la morphométrie multi-variables (Abonnenc, 1972, Killick-Kendrick *et al.*, 1991).

Les travaux de Ward (1981) et Pesson *et al.* (1991), ont montré aussi que les approches biochimiques et moléculaires peuvent être également utilisées dans le but de résoudre les problèmes posés aussi bien par l'individualisation des taxons que par l'étude de leurs relations phylogénétiques et biogéographiques.

L'étude du polymorphisme enzymatique par des techniques d'électrophorèse est une référence pour les systématiciens. L'utilisation des iso-enzymes comme marqueurs génétiques s'avère bien adaptée à l'étude d'un échantillonnage important. Il s'agit d'une méthode indirecte qui s'appuie sur l'observation de la répartition des fréquences alléliques à partir desquelles la diversité génétique intra et interspécifique des populations pourra être estimée. La migration d'extraits enzymatiques sur gel puis leur révélation grâce à un substrat spécifique de l'enzyme étudié permet la mise en évidence d'isomorphes considérés comme autant d'allèles dont la fréquence peut dès lors être estimée dans les populations étudiées. La séparation des isomorphes sur gel est due à une différence de la charge globale de la protéine qui révèle une différence dans la séquence des acides aminés qui la constituent. Ainsi les marqueurs enzymatiques présentent plusieurs avantages et inconvénients (Murphy *et al.*, 1990). Au titre des avantages, ils ont un pouvoir de discrimination plus élevé que les critères morphologiques, ils sont utilisés comme marqueurs pour les gènes qui les codent, ils sont neutres et peuvent être révélés à différents stades de développement. Toutefois, la faiblesse du nombre moyen d'allèles, l'occurrence de mutations silencieuses et d'allèles nuls, l'expression de certaines enzymes en fonctions du stade de développement et la variabilité génétique limitée aux loci codants constitue des désavantages. Ces limites des marqueurs enzymatiques ont justifiés la recherche de marqueurs les plus polymorphes (Murphy *et al.*, 1990).

Dans cette optique, notre objectif principal est d'identifier morphologiquement et de contribuer à l'analyse iso-enzymatique des populations de phlébotomes capturés dans deux étages bioclimatiques différents: un étage subhumide au nord du pays dans la région de Blida, et un étage aride au niveau de la Wilaya de Batna.

D'autres objectifs secondaires plus spécifiques, ont été ciblés :

- Apprendre les techniques de captures et dissection de phlébotomes.
- Réaliser une identification morphologique sur les phlébotomes capturés.
- Mise au point de la technique de l'électrophorèse des iso-enzymes dans le typage des phlébotomes.
- Déterminer le support de gel (agarose et/ou polyacrylamide) permettant la meilleure séparation des protéines de phlébotomes.
- Déterminer le profil électro-phorétique des populations de phlébotomes dans deux régions différentes.
- Utiliser deux logiciels « GENEPOP » et « FSTAT » dans l'étude de la variabilité génétique des phlébotomes aussi bien au sein de la même population (intra-population) qu'entre deux populations de la même espèce de deux régions différentes (inter-population).

Dans la première partie de ce mémoire et après un rappel sur la morphologie, la biologie et l'analyse des facteurs éco-épidémiologiques favorisant la prolifération et la distribution de ces insectes, nous rapportons le rôle de ces moucheron dans la transmission des leishmanioses, vrai problème de santé publique dans le monde et plus particulièrement dans notre pays.

La seconde partie traitera les méthodes d'échantillonnages et de capture des phlébotomes dans les deux zones d'études Chebli (Blida) et El Hamma (Batna), ainsi que les techniques d'identification morphologique et iso-enzymatique.

Enfin les deux dernières parties présenteront les résultats des deux techniques d'identifications et l'analyse des données recueillies par les logiciels GENEPOP et FSTAT.

## II. Généralités

### A. Les phlébotomes

Les phlébotomes appartiennent à L'Embranchement des Arthropodes, Classe des Insectes, Ordre des Diptères, Sous-ordre des Nématocères, superfamille des *Psychodoidea* (Lameere, 1936), famille des *Psychodidae* (Bigot, 1854), sous-famille des *Phlebotominae* (Kertész, 1904) (Abonnenc, 1972).

#### 1. Critères de classification des phlébotomes

Près de 800 espèces de phlébotomes sont actuellement décrites. Ils retracent de nombreux travaux d'alpha taxinomie qui ont débuté au 18ème siècle par la description de *Phlebotomus papatasi* Scopoli (1786) (Bounamous, 2010).

En se basant sur la variabilité morphologique de l'armature buccale (cibarium), du pharynx et des spermathèques des femelles, Theodor en 1948 a divisé la sous famille des *Phlebotominae* en cinq genres : *Phlebotomus*, et *Sergentomyia* dans l'Ancien Monde et *Lutzomyia*, *Brumptomyia* et *Warileya* dans le Nouveau Monde (Abonnenc, 1972).

Par contre la classification au niveau des sous-genres a eu tout d'abord comme base la forme, la structure et les dimensions des génitalia mâles et, pour les deux sexes, la disposition des soies dressées ou couchées sur les tergites (Abonnenc, 1972).

En 1976, Abonnenc et Léger ont proposé une nouvelle classification, dans laquelle la famille des *Phlebotomidae* (Walker, 1848) est divisée en trois sous-familles et 10 genres.

Léger et Depaquit en 1999, se sont basés sur des arguments morphologiques et biogéographiques et ont retenu 13 genres.

En 2008, Depaquit, Léger et Robert ont créé au sein du genre *Sergentomyia* le sous-genre *Vattierromyia* (Depaquit *et al.*, 2008).

#### 2. Caractéristique morphologique

Les phlébotomes sont des insectes, diptères, nématocères, présentant un corps grêle et allongé, de 1,5 à 3,5 mm de long (figure 1). Le corps de couleur pâle est couvert d'une fine pilosité qui lui permet un vol silencieux (Abonnec, 1972). Au repos, les ailes sont inclinées à 45°conférant au phlébotome une attitude caractéristique (forme en V).

Leur identification repose sur un examen microscopique après montage minutieux entre lame et lamelle.

Les caractères d'identification d'espèces les plus utilisés sont les antennes, le pharynx et le cibarium au niveau de la tête. Les ailes et l'implantation de soies au niveau du thorax. Enfin, l'implantation des soies dorsales au niveau abdominal et les génitalia qui permettent l'identification de nombreuses espèces (Abonnenc, 1972, Léger *et al.*, 1983, Killick-Kendrick *et al.*, 1991).

#### **a) Tête**

Elle est entourée d'une capsule chitineuse (épicrâne), limitée de chaque côté par un œil composé (figure 1), elle porte deux antennes et le probocis. Les deux antennes qui s'insèrent au niveau de la région frontale sont formées chacune de 16 segments, deux segments basaux, pas plus longs que larges et de 14 segments beaucoup plus minces, constituant le flagellum (figure 1).

L'ensemble des pièces buccales forme une trompe courte. Seules les femelles portent des mandibules dentelées. Le nombre et la longueur des épines géniculées sont utilisés en systématique (Abonnenc, 1972).

#### **b) Le thorax**

Il est bien développé comme chez tous les Diptères. Il est convexe et constitué de trois segments à savoir le prothorax, le mésothorax et le métathorax.

Sur chacun des trois segments thoraciques fusionnés est insérée une paire de pattes articulées, longues, fines et couvertes de soies (figure 1). Il porte une paire d'ailes lancéolées, couvertes de longues soies et des balanciers qui assurent l'équilibre de l'insecte pendant le vol. Les ailes comprennent 9 nervures longitudinales et des nervures transversales toujours situées près de la base d'insertion. Au repos, les ailes sont ordinairement élevées sur le thorax faisant un angle de 45° environ (Abonnenc, 1972).

#### **c) L'abdomen**

Il est cylindrique, est composé de 10 segments ; le premier est rattaché au thorax. Les 7 premiers non modifiés, portent chacun une paire de stigmates respiratoires ; tandis que les trois derniers sont transformés pour constituer le génitalia (figure 1). Chez le mâle (figure 2), l'armature génitale, très développée, se compose de trois paires de prolongements: une paire de coxites sur lesquels s'articulent les styles, une paire de pièces médianes, les paramères naissant à la base des coxites, une paire de prolongements ventraux appelés lobes latéraux et enfin, soudés à la partie interne de ces derniers, deux lames membraneuses, les lamelles sous-médianes entre lesquelles s'ouvre l'anus (figure 2). Entre les paramères se situent les gaines du pénis protégeant deux filaments génitaux. Les filaments, faisant suite à la pompe génitale, qui est un organe interne, prennent naissance dans les segments postérieurs de l'abdomen (Abonnenc, 1972).

Chez la femelle (figure 2), les organes génitaux internes se composent de trois organes pairs: deux ovaires, deux glandes annexes et deux spermathèques. Chaque ovaire se continue par un court oviducte qui s'ouvre dans une chambre génitale qui est soutenue par une furca. Les

spermathèques s'ouvrent aussi dans la chambre génitale. La furca peut être utilisée pour localiser l'issue des spermathèques.

Les spermathèques (figure 2) qui sont des organes internes sont formées chacune d'une capsule chitineuse, de morphologie très variable. Elles sont au nombre de deux et communiquent avec l'extérieur par des conduits plus au moins longs qui débouchent dans l'atrium génital. L'armature génitale du mâle, les spermathèques et l'armature buccale de la femelle varient dans leur morphologie et sont utilisés dans l'identification et la classification des espèces.

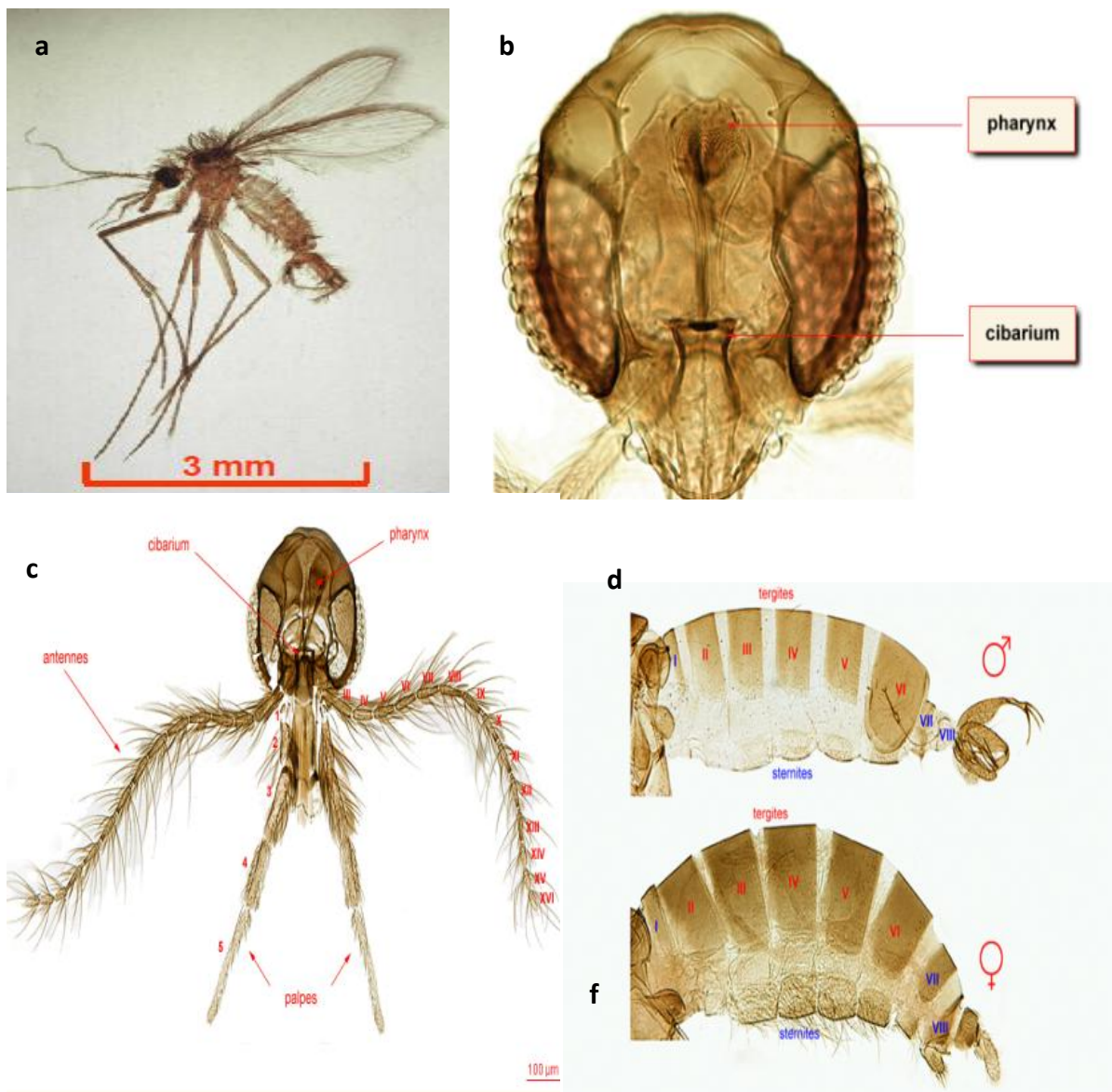


Figure 1 : Morphologie du phlébotome adulte (a : Phlébotome adulte, b : armature buccale et pharyngienne, c : tête, d : abdomen).

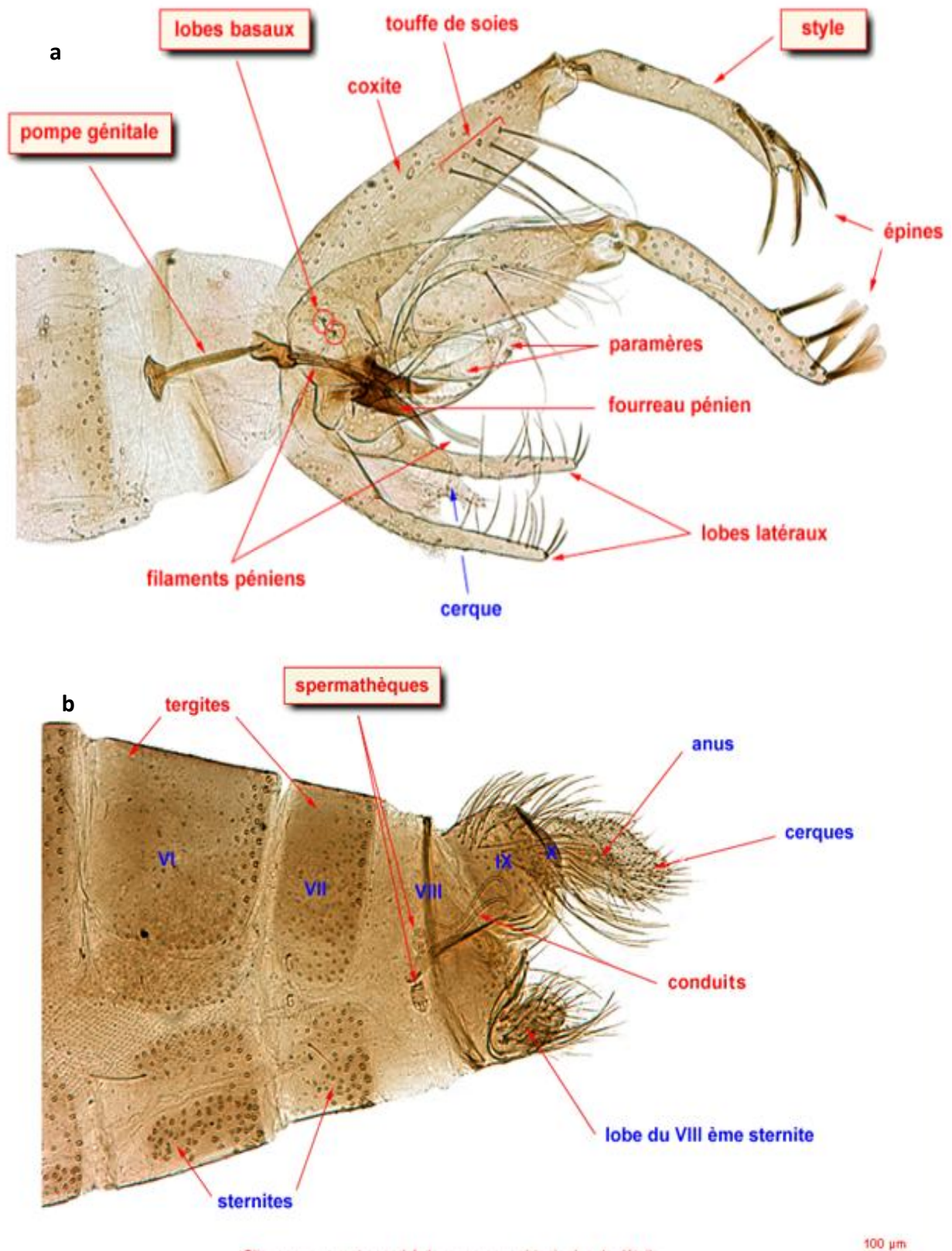


Figure 2: Morphologie de l'appareil génital du phlébotome (a : appareil génital mâle, b : appareil génital femelle (Niang *et al.*, 2000)) .



### 3. Biologie et cycle de développement

Les phlébotomes se trouvent sur tous les continents mais leur apparition, leur densité, leur période d'activité et leur disparition varient suivant la latitude, l'altitude, la saison et l'espèce (Abonnenc, 1972). Durant la journée, ils se cachent dans les endroits obscurs et abrités. Dans les régions tropicales ils sont actifs toute l'année, alors que dans les régions tempérées, ils sont en pause hivernale malgré une activité méditerranéenne démontrée récemment (Naucke et *al.*, 2008). La pérennité de l'espèce est assurée par les larves hibernantes de stade IV.

Il s'agit d'un cycle de vie holométabole qui comprend obligatoirement l'œuf, quatre stades larvaires, une nymphe et l'imago (figure 3). La femelle prend un repas sanguin pour se procurer les éléments nutritifs nécessaires à la maturation de ses œufs. Le temps entre un repas sanguin et la maturation des œufs dépend de l'espèce, de la vitesse de digestion et de la température ambiante. Les femelles déposent leurs œufs (80 à 100 œufs) dans des biotopes qui garantissent les conditions optimales pour les stades pré-imaginaux. Ils sont pondus un à un dans des substrats de toutes sortes mais surtout dans des endroits humides et de la matière organique qui constituent les gîtes larvaires (Killick-Kendrick, 1999). En effet, la survie et le développement des œufs dépendent des conditions d'humidité et de température appropriées (26-30°). L'éclosion des œufs se fait après quatre à dix sept jours suivant la température (Abonnenc, 1972). Les larves sont terricoles, sédentaires, saprophages et phytophages, leurs gîtes varient selon les espèces et peuvent être les fissures du sol, les terriers de micromammifères, nids d'oiseaux, creux d'arbres, fentes des murs, sols des habitations et des étables. Ces derniers constituent des micro-habitats caractérisés par des conditions constantes : lieux calmes abrités de courants d'air, humides et sombres. Le développement de leurs larves terricoles, exige une température relativement constante, une obscurité, un milieu nutritif formé de déchets organiques animal ou végétal, un calme absolu et un degré d'humidité voisin de la saturation (Abonnenc, 1972).

La nymphe est fixée en position verticale par son extrémité postérieure et se rencontre au niveau des mêmes gîtes que ceux de la larve. Elle ne se nourrit pas et la durée du seul stade nymphal serait de six à quinze jours. Elle est plus grande que la larve et est adaptée à un milieu aérien sec. Tout comme les œufs, elle a besoin de protection contre l'insolation et d'autres facteurs météorologiques agissant de manière brutale. La nymphe entre alors en état de vie ralentie pour subir enfin, la mue imaginale conduisant à l'adulte.

Les phlébotomes adultes sont caractérisés par le calme et la tranquillité du gîte de repos, l'existence de gîtes de ponte propices à la vie des larves et la proximité d'hôtes vertébrés nécessaires au repas de sang de la femelle. Ils séjournent dans des endroits retirés sombres et relativement humides (terriers, étables, clapiers, niches et même dans les maisons). Très sensibles aux courants d'air, ils ne se déplacent que par temps absolument calmes, par des vols courts et silencieux avec des arrêts fréquents. Le vol s'effectue par des bonds rapides sur des parois verticales de bas en haut lorsqu'ils sont dérangés, leur rayon maximum de

déplacement est variable selon les espèces, soit à peu près un kilomètre. Ils ont une activité nocturne qui commence au crépuscule à condition que la température soit suffisante (19-20°C) et qu'il n'y ait pas de vent (vitesse limite: 1m/sec). Une température faible ou trop élevée constitue autant de facteurs limitant l'activité des phlébotomes (Killick-Kendrick, 1999, Wasserberg et al., 2003). Certaines espèces sont attirées par la lumière, le plus souvent de faible intensité, alors que d'autres sont endophiles et pénètrent volontiers dans les maisons, les étables..., par contre certaines sont exophiles (Léger et Depaquit, 2001). La femelle, seule hématophage (Léger et Depaquit, 2001), se nourrit de sang des vertébrés (oiseaux, reptiles, batraciens et mammifères dont l'Homme), à chaque cycle gonadotrophique en dehors desquels elle se nourrit de sucs végétaux et de jus sucrés dont le mâle se nourrit exclusivement. La durée de vie des adultes est fonction de la température (plus celle-ci est basse, plus la durée de vie est élevée) et de l'humidité (plus l'hygrométrie est élevée, plus la durée de vie est élevée). Les femelles vivent en moyenne deux semaines à deux mois et prennent généralement plusieurs repas sanguins, alors que les mâles ont une durée de vie plus courte. Les pontes interviennent une semaine après le repas sanguin. L'attraction des phlébotomes pour l'être humain semble dépendre de la production de gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) mais également de l'odeur (Pinto et al., 2001).

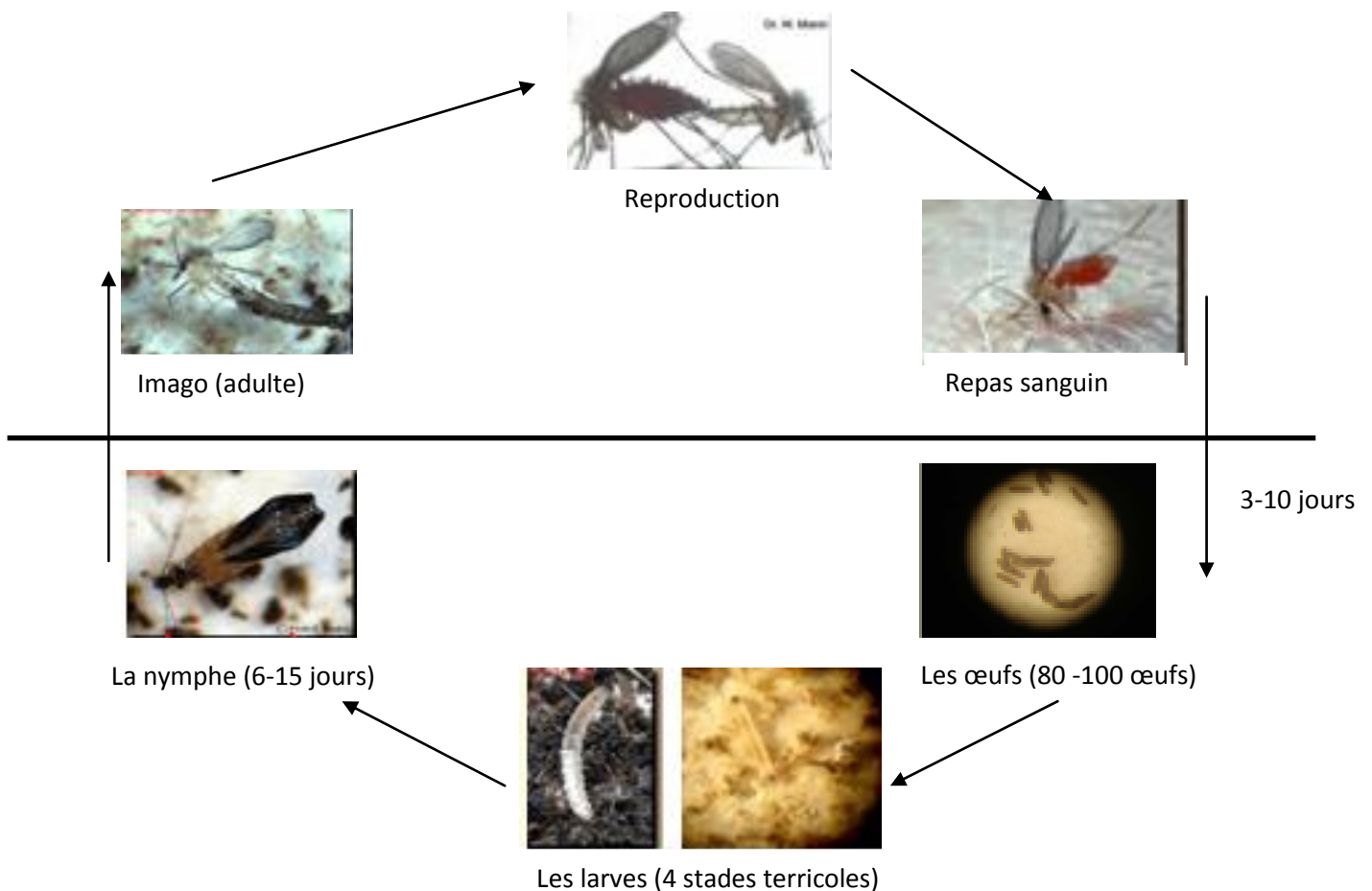


Figure 3: Cycle biologique des phlébotomes (Niang et al., 2000 avec modification).

## 4. Répartition géographique des phlébotomes

### a) Dans le monde

L'aire de répartition des phlébotomes dans le monde est très vaste et se rencontrent sur tous les continents, mais ne dépassent pas certaines latitudes. Ils n'ont pas été signalés dans les pays nordiques, très rares en Amérique du Nord, peu abondants en Australie, abondants dans les zones tropicales et équatoriales de l'Afrique, de l'Amérique orientale et de la province malaise (Léger et Depaquit, 2002). Les phlébotomes sont également fréquents dans le bassin méditerranéen et en Afrique du Nord (Dedet *et al.*, 1984).

### b) En Algérie

La présence des phlébotomes a été rapportée pour la première fois en Algérie en 1912 par Foley et Leduc et plus tard par Parrot et Sergent de 1917 à 1960 (Dedet *et al.*, 1984). Aujourd'hui 24 espèces sont connues en Algérie : 14 appartiennent au genre *Phlebotomus* et 10 au genre *Sergentomyia* (tableau 1).

Tableau 1 : Liste des espèces de phlébotomes existantes en Algérie (Belazzoug, 1991)

Sous-famille <i>Phlebotominae</i>	
Genre <i>Phlebotomus</i>	Genre <i>Sergentomyia</i>
<i>Phlebotomus (phlebotomus) papatasi</i> (Scopoli, 1786)	<i>Sergentomyia (Sergentomyia) minuta</i> (Adler et Theodor, 1927)
<i>Phlebotomus (Phlebotomus) bergeroti</i> (Parrot, 1934)(*)	<i>Sergentomyia (Sergentomyia) fallax</i> (Parrot, 1921)
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti</i> (Parrot, 1917)	<i>Sergentomyia (Sergentomyia) antennata</i> (Newstead, 1912)
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) alexandri</i> (Sinton, 1928)	<i>Sergentomyia (Sergentomyia) schwetzi</i> (Adler, Theodor et Parrot, 1929) (*)
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) chabaudi</i> (Croset, Abonnenc et Rioux, 1970)	<i>Sergetomyia (Parrotomyia) africana</i> (Newstead, 1912)
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) kazeruni</i> (Theodor et Mesghali, 1964) (**)	<i>Sergetomyia (Parrotomyia) eremitis</i> (Parrot et de Jolinier, 1945) (*)
<i>Phlebotomus (Larroussius) ariasi</i> (Tonnoir, 1921)	<i>Sergentomyia (Grassomyia) dreyfussi</i> (Parrot, 1933)
<i>Phlebotomus (Larroussius) chadlii</i> (Rioux, Juminer et Gibily 1966)	<i>Sergentomyia (Sintonius) clydei</i> (Sinton, 1928)
<i>Phlebotomus (Larroussius) perniciosus</i> (Newstead, 1911)	<i>Sergentomyia (Sintonius) christophersi</i> (Sinton, 1927)
<i>Phlebotomus (Larroussius) longicuspis</i> (Nitzulescu, 1911)	
<i>Phlebotomus (Larroussius) langeroni</i> (Nitzulescu, 1930)	
<i>Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi</i> (Parrot, 1930)	
<i>Phlebotomus (Transphlebotomus) mascitii</i> (Grassi, 1908) (***)	

(\*) Espèces exclusivement localisées au Sahara central.

(\*\*) Un spécimen rapporté de Mila (Nord-est Algérien) par Berchi et al, (1986) et de Tamanrasset (Extrême sud Algérien) par Benallal et al, (2013)

(\*\*\*) Un spécimen rapporté de la Kabylie (Nord Algérien) par Berdjane et al, (2011)

Les différentes espèces de phlébotomes sont réparties sur tout le territoire Algérien, de l'étage humide jusqu'à l'étage saharien selon l'étage l'environnement et l'étage bioclimatique (Dedet, 1984). Cependant certaines espèces comme *Phlebotomus perniciosus* et *Sergentomyia minuta* se rencontrent aussi bien dans des étages humides, subhumides que dans des étages arides, semi arides voir même saharien (figure 4).

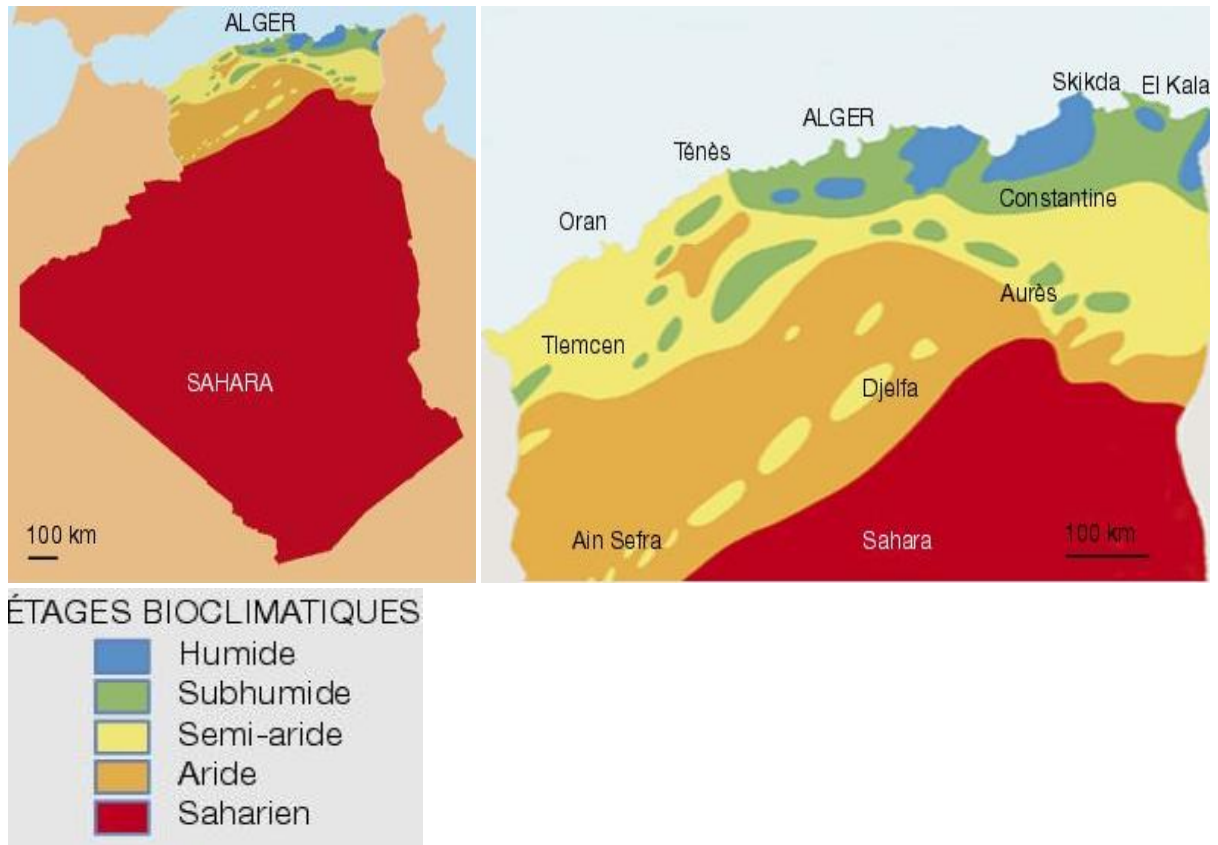


Figure 4 : Les différents étages bioclimatiques en Algérie

## B. Les phlébotomes et la transmission des leishmanioses

Les phlébotomes sont des insectes hématophages qui, par piqûre, transmettent à l'homme et à l'animal des maladies graves. Ils sont considérés comme des vecteurs de maladies étiologiquement différentes comme des arboviroses (fièvre à papatasi, virus Toscana), la maladie de Carrion (bartonellose causée par une bactérie: *Bartonella bacilliformis*) et plus particulièrement les leishmanioses provoquées par des protozoaires appartenant au genre *Leishmania* (Dolmatova et Demina, 1971).

### 1. Taxonomie du parasite

Les leishmanies sont des protozoaires appartenant au genre *Leishmania* Ross, 1903 (figure 5).

La place de ce genre dans la classification de Levine (Levine *et al.*, 1980) est la suivante :

- Règne: *Protista* (Haeckel, 1866)
- Sous-Règne: *Protozoa* (Goldfuss, 1817 Emend. Siebold, 1848).
- Embranchement: *Sarcomastigophora* (Honigberg et Balamuth, 1963).
- Sous- Embranchement: *Mastigophora* (Diesing, 1866).
- Classe: *Zoomastigophorea* (Calkins, 1909).
- Ordre: *Kinetoplastida* (Honigberg, 1963 Emend. Vickerman, 1976).
- Sous-Ordre: *Trypanosomatina* (Kent, 1880).
- Famille: *Trypanosomatidae* (Doflein, 1901 Emend. Grobben, 1905).
- Genre: *Leishmania* (Ross, 1903).

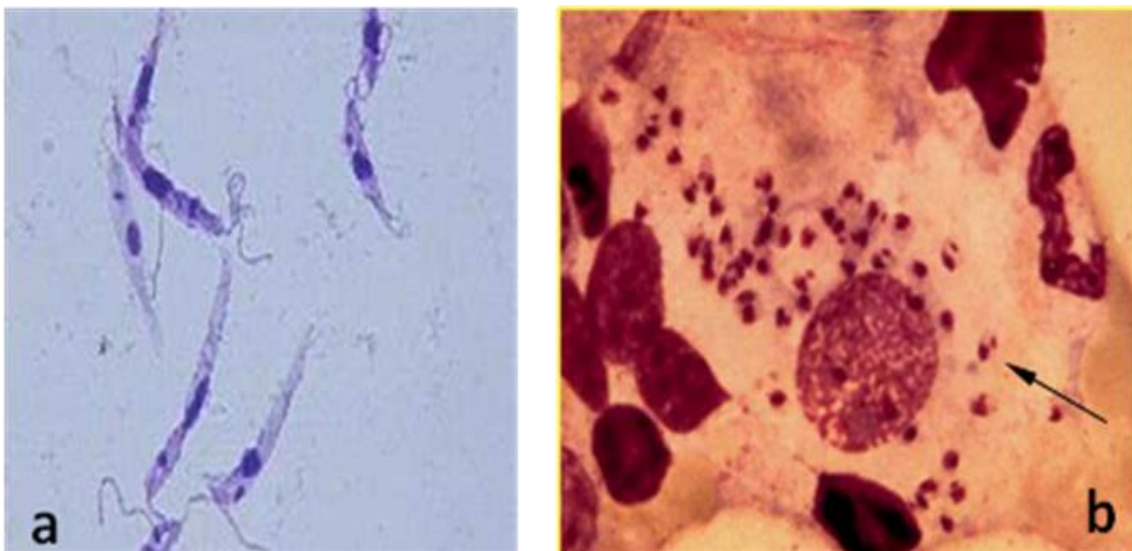


Figure 5 : Formes de *Leishmania* (a : forme promastigote, b : forme amastigote (Microscope photonique, Grx100)) (photos originales).

## 2. Cycle du parasite et transmission

Suite à un repas sanguin sur des mammifères infectés par *Leishmania*, les phlébotomes femelles sont contaminés par ces parasites (figure 6). Les interactions hôtes invertébrés-*Leishmania* qui régissent le développement de stades parasitaires infectieux sont le plus souvent très spécifiques. Chaque espèce de *Leishmania* étant inféodée à une seule ou à quelques espèces seulement de phlébotomes (Léger et Depaquit, 2001).

Très rapidement après ingestion du sang par les diptères, celui-ci coagule dans leur intestin moyen (mésenteron). Vingt quatre heures sont nécessaires pour qu'il soit circonscrit par une membrane dite péritrophique synthétisée par les cellules épithéliales du tube digestif et composée de chitine et de glycoprotéines. C'est dans ce bol alimentaire que les amastigotes ingérés se différencient en promastigotes. Ceux-ci se divisent activement tout d'abord sous une forme trapue dite procyclique (24-48 heures après l'infection) puis ils vont se transformer en formes très fuselées, appelées nectomonades. Vers le 3<sup>ème</sup> jour, la membrane péritrophique commence à se fragmenter et les résidus du repas sanguin sont partiellement excrétés de l'intestin médian. Les nectomonades qui s'échappent de l'enveloppe défectueuse vont alors se fixer via leur flagelle sur les microvillosités de l'intestin médian abdominal. Cette liaison évite leur élimination lors du transit intestinal. A des temps plus tardifs (4-5 jours), les nectomonades migrent vers l'intestin médian thoracique et se transforment en promastigotes dits métacycliques, très infectieux pour les hôtes mammaliens. Ces parasites, qui ne sont plus capables de se diviser, présentent un corps cellulaire très fuselé mais relativement court et un très grand flagelle. Ils sont doués par ailleurs d'une très grande motilité et vont s'accumuler entre 7 et 10 jours après l'infection au niveau de la valve stomodéale qui sépare le tube digestif médian du tube digestif antérieur. Les parasites à ce niveau pourraient constituer un bouchon et faciliter ainsi le reflux des promastigotes métacycliques libres lors du pompage sanguin (Antoine *et al*, 1999).

Au cours de cette opération, 10 à 100 promastigotes métacycliques sont inoculés dans le derme d'un mammifère lors d'une prochaine piqûre. Les substances pharmacologiques actives contenues dans la salive de l'insecte provoquent une vasodilatation et une immunodépression locales favorables à l'installation du parasite (Antoine *et al*, 1999).

## 3. Physiopathologie

Les promastigotes métacycliques inoculés dans la peau au moment de la piqûre infectante (figure 6) sont phagocytés par des cellules hôtes (macrophages, monocytes, neutrophiles, cellules dendritiques).

L'interaction des leishmanies et des cellules repose sur la reconnaissance, à la face externe du parasite, de molécules de liaison par divers récepteurs présents sur la membrane cellulaire. Parmi les molécules de liaison, le lipophosphoglycane apparaît de plus en plus comme la molécule clé de la virulence des *Leishmania* (Antoine *et al*, 1999).

À l'intérieur des cellules macrophagiques, les amastigotes sont localisés dans une vacuole parasitophore de pH très acide, dans laquelle ils survivent à la digestion par les hydrolases lysosomales. Le parasitisme entraîne dans le macrophage une baisse des capacités de production de dérivés oxygénés et nitrogénés, complétant ainsi les mécanismes d'échappement des *Leishmania* à la digestion cellulaire (Antoine *et al*, 1999).

Après multiplication intracellulaire et éclatement de la cellule hôte, les amastigotes infectent localement de nouvelles cellules phagocytaires et éventuellement migrent vers d'autres tissus. Chez les sujets susceptibles, la maladie se déclare après plusieurs semaines, ou quelques mois d'incubation. En effet, les leishmanioses se distinguent cliniquement en leishmaniose viscérale (LV), dans lesquelles les parasites s'étendent à tous les organes du système des phagocytes mononucléés, et leishmanioses tégumentaires, dans lesquelles la multiplication intracellulaire des amastigotes reste localisée aux macrophages et aux cellules dendritiques de la peau ; leishmaniose cutanée (LC) et des muqueuses ; leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM). Pourtant, même dans les cas de LC, les parasites peuvent également être transportés aux ganglions lymphatiques drainants et diffuser à d'autres sites cutanés comme dans la leishmaniose cutanée diffuse (LCD), ou aux muqueuses de la face comme dans la LCM. Mais ces formes cliniques sont elles-mêmes différenciées suivant des facteurs liés à l'hôte, et tout spécialement sa réponse immunitaire (Dedet, 2009).

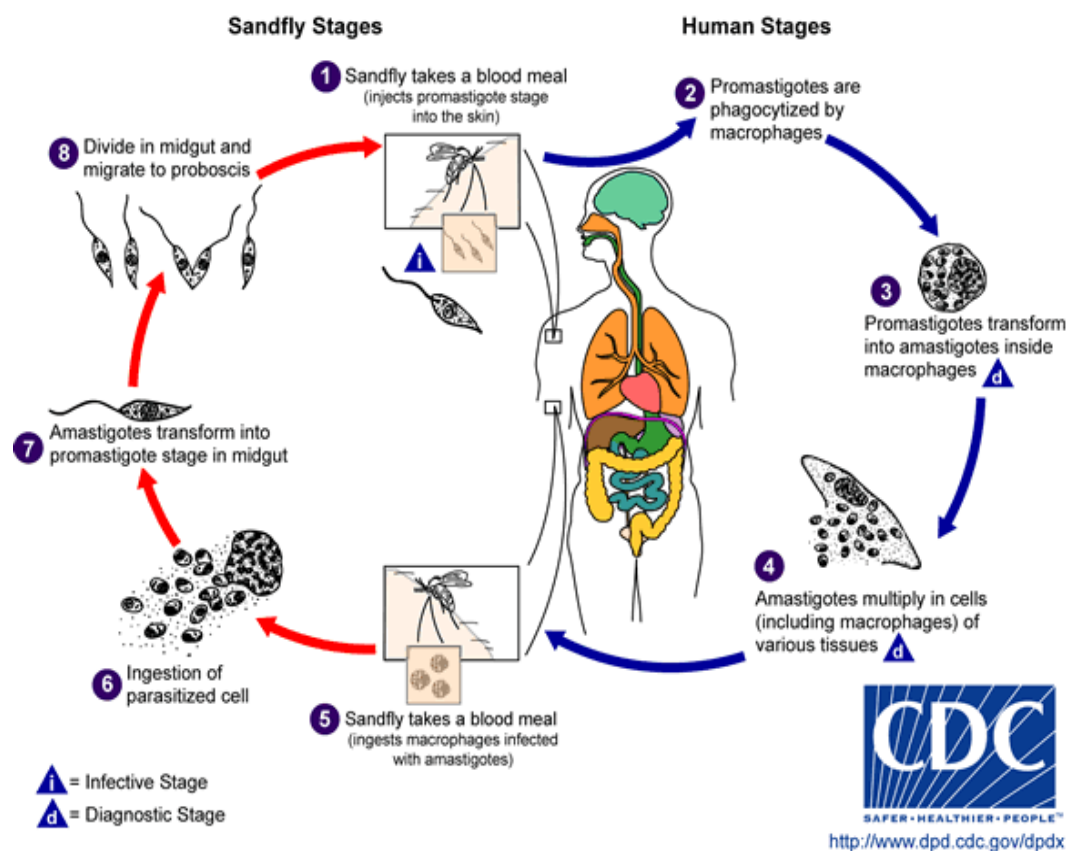


Figure6 : Cycle et transmission du parasite (source : [http://www. Dpd. Gov/dpdx](http://www.Dpd.Gov/dpdx))

#### 4. Les leishmanioses en Algérie

En Algérie, la leishmaniose se déploie sur des dizaines de foyers infectieux, répertoriés au Nord comme au Sud. Quatre formes cliniques de leishmanioses sévissent à l'état endémique, elles se répartissent en trois formes cutanées (LC): la LC du sud à *Leishmania major*, qui a pour réservoir les rongeurs sauvages : *Psammomys obesus* et *Meriones shawi* (Bellazoug, 1986a) et comme vecteur *Phlebotomus papatasi* (Izri *et al.*, 1992). L'aire de distribution géographique de la LC comprend les zones arides du nord du Sahara. Cependant Cette forme connaît dernièrement une propagation alarmante vers le nord du pays, avec plus de 8000 cas/an en moyenne (Harrat, 2010). La LC du nord (sporadique), à *Leishmania infantum* (Bellazoug, 1985) qui a pour réservoir le chien domestique (Benikhlef *et al.*, 2004, Benikhlef *et al.*, 2009) et comme vecteur *Phlebotomus perfiliewi* (Izri, 1993), affecte environ 400 personnes par an. Cette forme est présente le long du littoral algérien. Enfin, la LC à *Leishmania killicki* (*Leishmania tropica*), signalée pour la première fois en 2005 à Ghardaïa (sud algérien) (Harrat *et al.*, 2009), elle est transmise par *Phlebotomus sergenti* (Boubidi *et al.*, 2011). Le réservoir suspecté est *Massouteira Mzabi*, rongeur appartenant au genre *Ctenodactylus gundi*. Ce rongeur a été retrouvé naturellement infesté par *Leishmania tropica* MON-8 en Tunisie (Jaouadi *et al.*, 2011). Quant à la forme viscérale (LV), dont le pronostic reste grave, elle sévit particulièrement au nord du pays avec quelque cas reporté récemment dans l'extrême sud à Tamanrasset et à Illizi (Benallal *et al.*, 2013 a et b). Le parasite de la maladie a pour réservoir le chien domestique et le chacal (Bellazoug, 1986 b; Bessad *et al.*, 2012) et comme vecteur principal *Phlebotomus perniciosus* (Izri *et al.*, 1990). Cette forme touche surtout les enfants en raison de leur faible immunité (Dedet, 2009). Le taux de létalité de la LV est de l'ordre de 6 % (Harrat, 2010).

Les retombées socio économiques des leishmanioses sont importantes : fardeau financier pour le secteur de la santé, pertes des récoltes de céréales et des cultures maraîchères engendrées par les rongeurs, baisse de fréquentation touristique dans les zones à risque, absentéisme, préjudice esthétique dus aux cicatrices indélébiles.

Étant donné qu'aucun vaccin n'est encore disponible, le traitement de la leishmaniose reste limité à quelques médicaments, assez toxiques et coûteux.

Les mesures de prévention recommandées par l'Organisation Mondiale de la Santé sont fondées sur les mesures d'hygiène du milieu et la lutte contre les vecteurs et les réservoirs (Anonyme, 2008). Mais cette lutte est complexe, longue et nécessite l'intervention de plusieurs secteurs. Ces mesures ne s'appliquent pas de façon systématique et nécessite des adaptations selon les pays et les régions (Anonyme, 1993).



### **III. Matériel et méthodes**

Pour l'identification biochimique des phlébotomes certains systèmes enzymatiques ont été ciblés, nécessitant l'utilisation d'un matériel non biologique spécifique et non spécifique (annexe 1).

#### **A. Matériel biologique**

##### **1. Les phlébotomes**

Durant ce travail, nous avons étudié et analysé des populations naturelles de phlébotomes que nous avons récoltées dans deux régions différentes d'Algérie, Blida au nord et Batna au Sud Est du pays. Une fois les phlébotomes capturés, ils ont été immédiatement conservés dans de l'azote liquide à -196°C puis transférés au Centre de Référence National de *Leishmania* du Service d'Eco-épidémiologie Parasitaires et Génétiques des Populations de l'Institut Pasteur d'Algérie.

##### **2. Les systèmes enzymatiques**

Huit systèmes enzymatiques ont été testés pour la mise au point de l'électrophorèse des iso-enzymes. Certains enzymes interviennent dans le cycle de krebs (FUM, MDH et ME), et d'autres dans le cycle des pentoses (PGM, PGI, PGD, G6PD, HK). Les enzymes étudiées sont :

- Phosphoglucomutase (PGM) EC 5.4.2.2
- Phosphoglucose Isomerase (PGI) EC 5.3.1.9
- Phosphoglucose Déshydrogénase (PGD) EC 1.1.1.44
- Glucose-6-phosphate Déshydrogénase (G6PD) EC 1.1.1.49
- Fumarase hydratase (FUM) EC 4.2.1.2
- Malate déshydrogénase (MDH) EC 1.1.1.37
- Enzyme malique (ME) EC 1.1.1.40
- Hexokinase (HK) EC 2.7.1.1

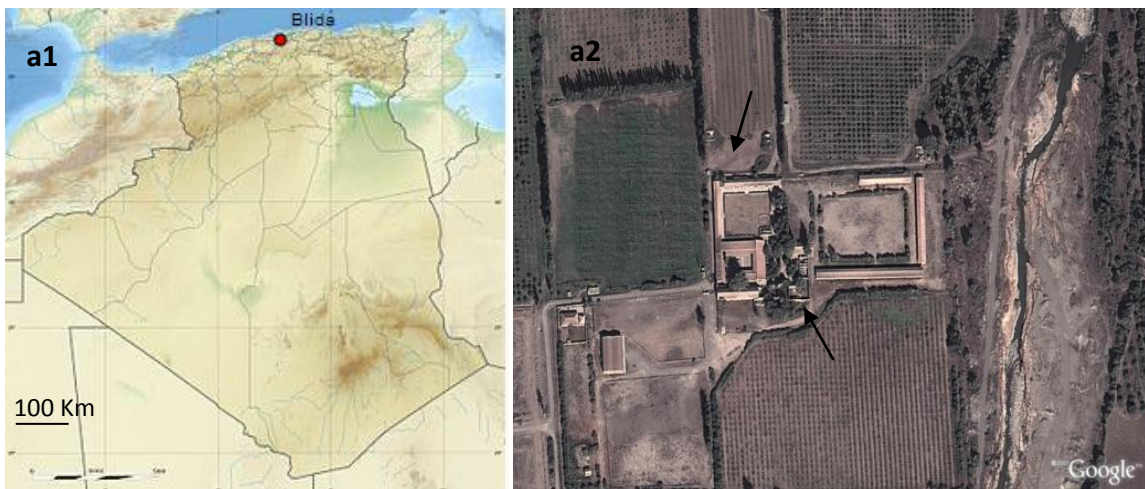
Il est à noter que le Comité International de Biochimie a donné un code d'identification pour chaque enzyme, comprenant deux lettres «EC», indiquant «Enzyme Commission». Ces deux lettres précèdent quatre nombres séparés par des points. Chaque nombre désigne une division ou subdivision du classement, basée sur le mode d'action de l'enzyme.

## B. Méthodologie

### 1. Zones d'étude

Les deux sites d'étude ont été choisis en raison de la différence du biotope et du climat (étages bioclimatiques différents) des zones de capture mais aussi pour des raisons pratiques (accessibilité et facilité de travail).

- a) **Le site de Chebli (Blida)** : La commune de Chebli (figure 7) est située à environ 23km au nord-est de Blida et à environ 29km au sud d'Alger (32° nord et 3° Ouest). Elle comptait 29660 habitants en 2008. La ville est à 57mètres d'altitude au dessus de la mer. L'Atlas tellien protège la ville des vents secs du sud en provenance des Hauts Plateaux. Cette protection permet à la région de bénéficier d'un climat méditerranéen humide propice à l'agriculture avec une pluviométrie qui varie selon les années. Les hivers sont froids, les températures deviennent négatives à partir de janvier avec des chutes de neige sur les reliefs au dessus de 1000m d'altitude et plus rarement à partir de 500m. Les étés sont chauds et les températures dépassent les 40°C et atteignent 45°C en juillet (Anonyme, 2013 a).



Figures 7: Localisation de la région de Chebli et du site de piégeage des phlébotomes (a1: (Anonyme, 2013 a) ; a2: google earth: 36° 33' 20.51'' N ; 3° 3' 18.98'' E).

- b) **La région de Gosbat (El Hamma, Batna)**: Le territoire de la commune de Gosbat (figure 8) est situé au nord-ouest de la wilaya de Batna. La ville de Batna est considérée historiquement comme étant la « capitale » des Aurès. Située à 1058 mètres d'altitude, elle est la 5ème plus importante ville du pays avec 375 000 habitants et la plus haute agglomération d'Algérie bien qu'elle a été construite dans une cuvette entourée de montagnes. Le Climat de Batna est de type aride, avec quatre saisons bien distinctes. Les températures moyennes varient de 4°C en janvier à 35°C en juillet (Anonyme, 2013 b).



Figure 8: Localisation de la région d'Elhamma et du site du piégeage des phlébotomes (photo originale).

## 2. Capture des phlébotomes

Durant la période Aout-Octobre 2012, plusieurs sorties sur le terrain ont été réalisées aussi bien au nord du pays dans la ville de Blida, que dans la région de Batna.

Il est à noter que la collecte des phlébotomes dans la région de Blida a été réalisée dans une jumenterie (figure 7 a2), alors que dans la région de Batna, les différentes captures ont été effectuées aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur des maisons (figure 9). Les maisons dans cette zone sont éparses dans les champs, bâties dans un style assez traditionnel (grande cour intérieure entourée de pièces habitables et des abris pour animaux domestiques).



Figures 9 : Vue d'ensemble des sites de captures de phlébotomes à Batna (photos originales)

### a) Prospection entomologique

Dans une première étape, et pour vérifier l'existence et la densité des phlébotomes (vue d'œil), nous avons effectué une prospection entomologique à l'aide des pièges adhésifs (figures 10).

La technique des pièges adhésifs est sans doute la mieux adaptée à l'inventaire qualitatif et quantitatif des phlébotomes (Croset *et al.*, 1974). Les pièges sont constitués de feuilles de papier blanc mat de format A4 largement imbibées d'huile de ricin. L'huile de ricin présente

l'avantage de ne pas être répulsive, d'être très visqueuse et enfin d'être soluble dans l'alcool ce qui facilite la récupération ultérieure des insectes.

Les feuilles de papier, dont la transparence indique une bonne imprégnation huileuse, sont placées dans différents endroits tels que les fissures des murs, terriers de rongeurs et végétations, pouvant servir de gîtes de repos et de lieux de ponte aux phlébotomes.

Les pièges sont déposés le soir avant le coucher du soleil et récupérer tôt le matin.



Figure 10 : Emplacement des pièges adhésifs dans la région de Batna, (photos originales).

## **b) Captures manuelles et par pièges lumineux des phlébotomes**

Pour l'étude biochimique, d'autres techniques de captures ont été utilisées, notamment des pièges lumineux (Anonyme, 1975) et les captures manuelles à l'aide d'aspirateur à bouche. Elles offrent la possibilité de capturer les phlébotomes vivants permettant d'obtenir des extraits protéiques étape indispensable dans l'identification enzymatique.

### **1. Capture par le piège lumineux (CDC)**

Cette méthode est adaptée pour la capture des espèces photophiles. Contrairement à de nombreux autres insectes, les phlébotomes demeurent rarement prisonniers du flux lumineux. Ils semblent même le fuir à partir d'une certaine intensité.

Durant notre capture, nous avons utilisé le « CDC miniature Light Trap ». Ce piège comporte:

- Un moteur assurant le fonctionnement d'un petit ventilateur destiné à entretenir une aspiration continue de faible intensité. Au dessus du ventilateur se trouve une petite ampoule de 0,3 ampère. Le tout est alimenté par une batterie de 6 volts suffisante pour assurer un fonctionnement pendant toute une nuit et prévenir ainsi la fuite des phlébotomes capturés en maintenant la ventilation.

L'ensemble moteur-ventilateur-lampe se trouve à l'intérieur d'un cylindre transparent en matière plastique dont la partie supérieure est couverte d'un grillage métallique évitant la pénétration des insectes de grande taille et dont la partie inférieure est creusée d'une gorge destinée à l'ajustement de la cage de recueil.

- Une cage recouverte d'un tissu à mailles très serrées dont la partie supérieure vient s'adapter à l'aide d'un élastique à la partie inférieure du cylindre.

Les pièges sont tendus dans les abris d'animaux domestiques, à l'intérieur et/ou à l'extérieur des maisons, près des terriers jugés abrités ces insectes (figure 11). Les pièges sont placés en fin de journée et récupérés tôt le matin. Les phlébotomes sont anesthésiés par le froid, puis à l'aide d'une petite pince les moucheron sont récupérés et conservés dans des cryotubes soigneusement étiquetés et mis à -80°C ou dans de l'azote liquide.



Figures 11: Emplacement des pièges CDC dans la région de Batna, (photos originales).

## 2. Capture manuelle nocturne sur paroi verticale

Cette méthode, moins encombrante et plus pratique offre toutefois des résultats, dont la fiabilité, dépend largement de l'habileté de chaque prospecteur.

Les captures commencent au crépuscule et se poursuivent pendant la nuit ce qui correspond au maximum d'activité des phlébotomes (Rioux *et al.*, 1984). Pour que ce type de piégeage soit rentable, il faut que les conditions atmosphériques soient favorables à la sortie des phlébotomes: température extérieure au minimum 19°C, absence totale de vent et de pluie (figures 12).

Ce piège comporte :

- Un capteur à bouche ou tube à aspiration en verre épais (3 mm), de 15 cm de long et de 4 cm de diamètre. L'extrémité distale du tube se termine en forme de masse dont l'ouverture interne a un diamètre de 5 mm. Le segment interne se prolonge à l'intérieur du tube sur 2 cm. L'extrémité proximale est obturée par un bouchon en caoutchouc, traversé par un tube de verre de 5 mm de diamètre. L'extrémité du bouchon se trouvant à l'intérieur du capteur est recouverte d'un morceau de tissu élastique à mailles serrées (bas de nylon épais). Sur l'extrémité libre s'adapte un tuyau de caoutchouc souple, long de 50 cm destiné à l'aspiration.
- Une torche électrique de poche: elle est choisie en fonction de sa luminosité (suffisante sans être agressive) et de sa maniabilité, équipée d'une pile de 4,5 volts et d'une ampoule de 0,3 ampères.



Figures 12 : Capture manuelle des phlébotomes vivants sur paroi verticale dans la région de Batna (photos originales).

### 3. Sélection et conservation des phlébotomes

Le repérage des phlébotomes est assez délicat, d'une part ceux-ci s'y trouvent mélangés à de nombreux autres insectes (figures 13), d'autre part ils redeviennent actifs après quelques minutes à la température ambiante.

Selon le mode de récolte et l'utilisation prévue, les phlébotomes sont conservés :

- Soit dans l'alcool à 70° pour les spécimens récoltés morts sur les pièges adhésifs.
- Soit dans de l'azote liquide (-196°C), ou dans le congélateur à -80°C, pour les phlébotomes à traiter par des méthodes enzymatiques.



Figures 13 : Sélection et conservation des phlébotomes, (photos originales).

#### 4. Traitement des échantillons et identification morphologique

L'identification morphologique des phlébotomes nécessite un traitement préalable puis un montage temporaire ou définitif selon l'objectif de l'étude.

##### a) Eclaircissement et montage des phlébotomes capturés par piège adhésif

- **Eclaircissement** : Les phlébotomes sont versés dans une coupelle de cristal munie d'un couvercle dans laquelle s'effectueront toutes les manipulations (figures 14).

L'alcool est soutiré à l'aide d'une poire graduée munie d'un morceau de tissu filtrant, afin d'éviter l'aspiration des phlébotomes. Plusieurs bains sont ensuite effectués (Abonnenc, 1972) :

- Un bain dans la solution de potasse (KOH) à 20% pendant 2 heures.
- 03 bains de 15 minutes chacun, dans de l'eau de robinet.
- Un bain dans la solution de Marc-André (annexe 2) durant 1 heure de temps au minimum (ou une nuit).

- **Montage** : Le montage des phlébotomes est réalisé sous loupe binoculaire. Après éclaircissement, chaque phlébotome est monté directement entre lame et lamelle, dans une goutte de Marc-André à l'aide de deux aiguilles (figures 14).

Il est à noter que d'autres types de montage peuvent être aussi utilisés comme le montage rapide dans la gomme au chloral, polyvényl alcool (PVA) (annexe 2) et le montage permanent dans le baume du Canada. Cette dernière est recommandée pour la mise en collection des espèces.

Le phlébotome est déposé en position latérale dans une goutte du milieu de montage. La tête est détachée du reste du corps à l'aide de fines aiguilles. Elle est ensuite orientée face ventrale afin de rendre plus aisée l'observation des armatures cibariale et pharyngienne.

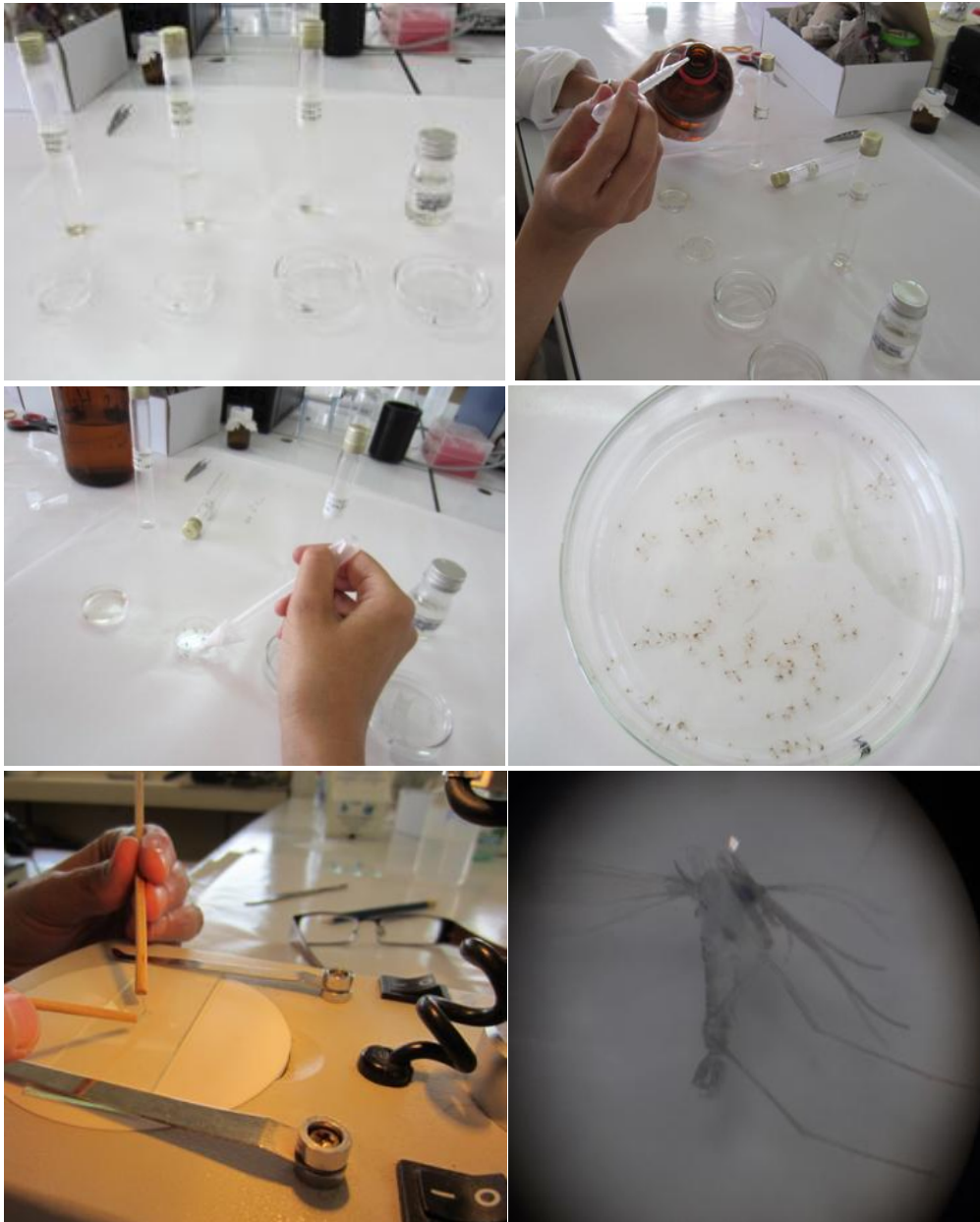
Les pattes sont soigneusement étalées du côté ventral et les ailes du côté dorsal.

Pour les mâles, l'armature génitale est disposée selon son orientation, pour les femelles la dissection du génitalia est parfois nécessaire pour dégager certaines structures internes utilisées pour la diagnose spécifique (Léger *et al.*, 1983). Cette dissection se fait dans le milieu de montage sous la loupe binoculaire. Une fois la tête coupée, on maintient le thorax à l'aide d'une fine aiguille et on coupe l'abdomen au niveau de l'avant dernier segment. On isole alors, en se débarrassant des téguments et des tissus qui l'entourent, la furca avec les spermathèques.

La préparation est ensuite recouverte d'une lamelle. Une légère pression permet de mettre les tissus à observer à plat, position la plus favorable à l'observation microscopique.



- **Identification des spécimens** : Chaque spécimen est identifié d'après les critères d'identification habituels (Abonnenc, 1972) et de Dedet (1984).
  - Pour les phlébotomes mâles : morphologie externe de l'appareil génital et si nécessaire, anatomie de l'armature cibariale (*Sergentomyia*) ou pharyngienne (*Phlebotomus*).
  - Pour les phlébotomes femelles : anatomie des spermathèques, de l'armature cibariale et pharyngienne.



Figures 14: Eclaircissement et montage des phlébotomes capturés par pièges huileux (photos originales).

## b) Montage et dissection des phlébotomes collectés par CDC

Le montage des phlébotomes fraîchement collectés est aussi réalisé sous loupe binoculaire, cependant chaque phlébotome est placé sur une lame au dessus d'une pochette de glace pour éviter toute dénaturation des protéines (figures 15). La dissection est aussi réalisée à l'aide de deux aiguilles. Les spermathèques des femelles et les organes génitaux externes des mâles sont extraits et placés entre lame et lamelle dans une goutte de PVA puis identifiés sous microscope. Le reste de l'insecte est immédiatement remis dans son cryotube et placé dans l'azote liquide pour une meilleure conservation jusqu'au jour de l'identification enzymatique.



Figures 15 : Dissection, montage et identification morphologique des phlébotomes capturés par CDC (1: Génitalia, 2: Tête, 3: Reste du corps, (photos originales)).

## 5. Identification iso-enzymatique

### a) Principe de l'Isoélectrofocalisation (IEF)

L'isoélectrofocalisation (IEF) est une technique électrophorétique permettant la séparation des protéines selon leurs points isoélectriques (pI).

Le principe de base de l'IEF est de créer un gradient de pH dans lequel se déplacent les protéines soumises au champ électrique. Les protéines migrent et une fois arrivées au pH correspondant à leur pI, elles s'immobilisent (Boyer, 1993; Vesterberg, 1971). La création d'un tel gradient de pH se fait avec des polyélectrolytes portant un certain nombre de groupes ionisables positivement ou négativement (amines carboxyles ou sulfates) et possédant un certain pouvoir tampon (Dryer *et al.*, 1989). Ces molécules sont appelées ampholytes. Si les ampholytes sont soumis à un champ électrique borné par une solution d'un acide fort à l'anode et par une solution d'une base forte à la cathode, ils migrent et se

distribuent par ordre de pI. Leurs capacités tampon aident à maintenir autour d'elles une petite zone de pH égal à leur pI. Une série d'ampholytes ayant donc chacun un pI couvrant une certaine gamme de pH crée un gradient continu de pH.

Le pouvoir de résolution de cette technique est élevé. L'IEF peut se réaliser sur plusieurs matrices (supports) de polymères baignant dans un tampon conducteur. Deux polymères sont principalement utilisés : le polyacrylamide et l'agarose.

La concentration de polymère ainsi que son taux de réticulation pouvant varier par rapport à celle du tampon, plus le polymère est concentré et réticulé, et plus la taille des pores du gel sera petite. Les propriétés du gel peuvent ainsi être adaptées à la taille des molécules à analyser.

- **L'agarose:** est utilisé à des concentrations de 0,5% à 2% (poids/volume), il permet de séparer des molécules de très grande taille: les grosses protéines, l'ADN ou de l'ARN.
- **Le polyacrylamide:** est utilisé à des concentrations de 4% à 20% (poids/volume), il permet de séparer des molécules plus petites: protéines, peptides et des fragments d'acides nucléiques. La réticulation (taux de ramification) lors de la polymérisation peut également être modulée pour modifier les paramètres de séparation.

Pour les deux types de polymères, le gel peut se faire en conditions natives ou en conditions dénaturantes. Dans notre cas, la séparation des protéines se fait dans des conditions non dénaturantes.

## **b) Préparation des gels**

Afin de choisir le support le plus pratique, nous avons préparé les deux types de gels.

### **- Préparation du gel de polyacrylamide**

Durant l'optimisation de cette technique, des concentrations de 4% d'acrylamide ont été utilisées. Cette concentration offre au gel une porosité qui ne ralentira pas les grosses molécules et permettra ainsi la migration de la totalité des protéines (Gennady, 2003).

Les gels de polyacrylamide sont formés par la polymérisation entre des monomères d'acrylamide, formant de longues chaînes et un co-monomère bifonctionnel, le N,N'-méthylène bis acrylamide, formant des ponts inter-chaînes en présence du persulfate d'ammonium et d'un catalyseur tel que le N N N' N'tétraméthyl-éthylène diamine (TEMED).

Pour la réaction du gradient de pH, deux gammes d'ampholytes ont été testées:

- Petites gammes de pH (4-6,5 et 5-8) permettant la séparation très fine pour mesurer précisément le pHi de l'enzyme.

- Grandes gammes de pH (3-10) permettant l'analyse d'un grand nombre de protéines.

Le gel est coulé dans un moule constitué d'une plaque de verre sur laquelle est appliqué un support en plastique recouvert d'une pellicule hydrophile. Une deuxième plaque de verre munie de joints (1mm d'épaisseur) lui est superposée. Ce système est maintenu par des pinces jusqu'à polymérisation du gel, environ 10-15 minutes à température ambiante. La dimension finale du gel est de 11 cm sur 23 cm.

#### - **Préparation du gel d'agarose**

Le gel d'agarose est préparé à une concentration de 1%, en présence de sorbitol à 10%. Ce dernier offre une élasticité et une hydratation au gel durant la migration. Une fois le mélange est dissous dans un four micro-onde, un dégazage rapide est effectué lorsque la température de la solution atteint +75°C. Une quantité d'ampholyte de pHi est ensuite ajoutée au milieu réactionnel (Bousaa, 2008a).

La solution est immédiatement coulée dans le moule (même opération que le gel d'acrylamide). La polymérisation se fait alors en 15 minutes à température ambiante. Le gel est ensuite démoulé avec son support puis entreposé dans une chambre humide à + 4°C pendant une heure au minimum. La dimension finale du gel est de 11 cm sur 23 cm (figures 16).

#### **c) Préparation des extraits protéiques**

Une fois disséqué, les restes du phlébotome (thorax, abdomen pattes et ailes) sont broyés dans 10 µl d'eau distillée sur une pochette de glace pour éviter la dénaturation des enzymes (figures 16). La quantité de l'extrait permet d'étudier 3 systèmes enzymatiques par individu (Bousaa, 2008a).

#### **d) Migration électrophorétique**

Une fois le gel polymérisé, il est démoulé et placé sur la cuve de migration réfrigérée (+4°C). Deux mèches de papiers découpées aux dimensions du gel sont imbibées de solution d'électrodes et sont placées à 0,5 cm du bord du gel (Figure 16). Les électrodes sont placées sur les mèches et reliées à un générateur réglé initialement à un courant et une puissance électrique maximaux.

Une pré-focalisation de 15 min est réalisée en premier temps afin de créer un gradient de pH (Bousaa, 2008a).

L'isoélectrofocalisation commence après répartition des extraits protéiques dans du papier whatman N°1, et un témoin de protéines-étalon de pHi connu est déposé dans le premier dépôt.

Les paramètres de migration à savoir l'ampérage, voltage et la puissance ont été modifiés plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une meilleure séparation avec 50mA/30W/ 1200V pour le gel d'acrylamide et 20 mA/10W/ 500V pour le gel d'agarose.

Après migration, le gel est rincé à l'eau distillée découpé et coloré avec des solutions de révélations appropriées (Bousaa, 2008a).

### e) Coloration des Protéines étalon

La bande de gel portant les protéines-étalon est immergée dans du bleu de Coomassie G 250 (annexe 2) jusqu'à apparition des bandes (Bousaa, 2008a). L'excès de colorant est éliminé par rinçage du gel dans une solution aqueuse de décoloration (Annexe 2). Le gel est séché à température ambiante, les bandes protéiques apparaissent alors colorées en bleu foncé. Le pHi connus des protéines-étalon permet de repérer et de déterminer le pHi des iso-enzymes révélées.

### f) Révélation enzymatiques

#### - Principe

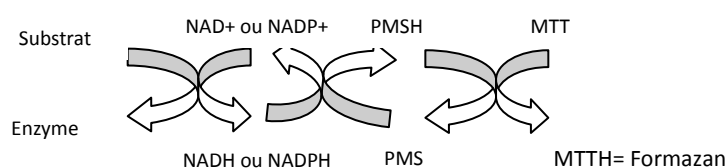
Le terme «iso-enzyme» a été créé par Markeat et Moller (1959), pour désigner toute bande apparaissant au sein d'un système enzymatique donné sur un gel.

La majorité des iso-enzymes solubles sont incolores, la visualisation de leur emplacement sur le gel après électrophorèse, se fait par des procédés histochimiques spécifiques qui permettent soit de colorer les produits de dénaturation de la protéine ou un corps chimique qui lui est associé, soit d'obtenir un précipité coloré à l'emplacement de cette protéine en utilisant ses propriétés catalytiques (Gennady et Manchenko., 2003).

Le gel est traité par une solution de révélation qui contient :

- Un substrat spécifique de l'enzyme à analyser.
- Des co-facteurs: co-enzymes, ions et autres corps chimiques éventuellement nécessaires à l'activité de l'enzyme en cause.
- Un sel coloré, susceptible de réagir avec le produit de la réaction catalysée.

Donc, il y aura une réaction biochimique à l'endroit où l'enzyme spécifique a migré (Pasteur *et al.*, 1987).



## - Préparation des solutions de révélation

Il existe pour chaque système enzymatique étudié une fiche technique (Annexe 3), adaptée selon la méthode de Rioux *et al.* (1990).

La préparation de la solution de révélation comprend deux étapes:

1. Préparation d'une première solution qui est incubée à l'étuve (37°C) pendant 30 min avant l'arrêt de la migration.
2. Après incubation, d'autres produits sont additionnés avant de verser la solution de révélation sur le gel.

Les colorations ont lieu à 37°C, à l'abri de la lumière (car le PMS et le MTT sont réduits à la lumière). Les bandes (ou zymogrammes) apparaissent en moins d'une heure (figures 16).

### **g) Lecture des zymogrammes**

Le terme zymogramme, désigne l'ensemble des bandes colorées apparaissant sur le gel. Chaque bande correspond à une protéine distincte codée par un, deux ou plusieurs gènes. Les phénotypes enzymatiques observés sur les zymogrammes peuvent donc être traduits en termes de génotypes, de gènes et d'allèles. Ainsi, l'analyse des phénotypes permet de préciser le type structural de l'enzyme et de définir le nombre de locus codant cette enzyme.

Sur chaque électrophorègramme (gel), le nombre de bandes ainsi que la distance parcourue ont été calculés pour chaque échantillon, ensuite un code est attribué pour chaque allèle selon les deux paramètres décrits ci-dessus (nombre de bandes et distance). Les différentes étapes de la réalisation de l'IEF sont illustrées dans les figures suivantes:



Figures 16: Les grandes étapes de l'isoélectrofocalisation, D : distance parcourue, (photos originales).

## **h) Analyse des données**

Cette analyse nécessite la définition de certaines notions spécifiques utilisées en génétique des populations. Dans cette discipline, la population est vue comme un "pool de gènes" dont la composition est susceptible d'évoluer, les individus n'étant que les porteurs transitoires de ces gènes (Simard, 1999).

### **- Principe de la génétique des populations**

La génétique des populations est l'étude de la répartition de la variabilité génétique entre et au sein de populations naturelles et des forces génétiques, écologiques ou environnementales qui la gouvernent. Ces forces, nombreuses et interactives, sont notamment la mutation, la recombinaison, la sélection, la migration, la distance géographique entre individus et le système de reproduction (Simard, 1999). Reconnaître et quantifier ces facteurs est essentiel pour déterminer ou prédire l'évolution des populations et des espèces.

En effet, chez la plupart des espèces, il existe des variations environnementales qui se manifestent tant au niveau morphologique qu'au niveau des fréquences de certains gènes. L'analyse des structures génétiques permettant la mise en évidence de ces variations nécessite le recours à des modèles mathématiques (Simard, 1999). Le modèle d'Hardy-Weinberg (HW) est le modèle mathématique le plus simple, qui sert de base à la génétique des populations. Il a été publié par G.R. Hardy et par W. Weinberg en 1908. Ce modèle décrit les relations entre fréquences alléliques et génotypiques dans une population idéale dont:

- Les gamètes s'associent au hasard par rapport aux gènes considérés (panmixie),
- La population est de taille infinie,
- La fréquence des gènes n'est pas modifiée d'une génération à l'autre par la mutation, la sélection ou la migration (apport extérieur de nouveaux gènes).

Dans ces conditions, les fréquences alléliques restent stables au cours des générations et la population est dite en équilibre d'Hardy-Weinberg.

Ainsi, il est possible de vérifier si, à l'intérieur d'une population donnée, les croisements se font de manière aléatoire ou non, en comparant les fréquences génotypiques observées à celles attendues sous l'hypothèse de l'équilibre d'Hardy Weinberg par une statistique de type  $\chi^2$ .



## - Analyse

Sur la base des 8 systèmes enzymatiques testés par l'IEF, trois enzymes polymorphes (c'est-à-dire qu'ils existent sous la forme de deux ou plusieurs allèles) les plus reproductibles ont été retenues pour l'analyse de la variabilité génétique. Il s'agit de : GPI, PGM et HK.

Les traitements des données sont faits à l'aide des logiciels FSTAT et GENEPOP. Le pourcentage de loci polymorphes (P), le nombre moyen d'allèles par locus (A), l'hétérozygotie observée ( $H_o$ ) et l'hétérozygotie attendue ( $H_e$ ) ont été obtenus avec GENEPOP (Raymond et Rousset., 1995). La valeur du coefficient de consanguinité ( $F_{IS}$ ), la variance standardisée de Wright ( $F_{ST}$ ) ainsi que le coefficient de différenciation génique ( $G_{ST}$ ) ont été obtenus avec le logiciel FSTAT (ver. 2.9.3.2. (Goudet, 1995):

- Les fréquences alléliques et le nombre moyen d'allèles par locus (appelé également taux d'allélisme ou richesse allélique), ont été calculés par comptage direct des allèles par le logiciel.
- Le taux de polymorphisme correspond au rapport entre le nombre d'allèles polymorphes et le nombre total de locus étudiés. Un locus est considéré polymorphe lorsque l'allèle majoritaire a une fréquence inférieure à 95%.
- Le degré d'hétérozygotie a été calculé à partir des fréquences moyennes théoriques des individus hétérozygotes ( $H_e$ ) et des fréquences alléliques observées ( $H_o$ ) de la population. Dans le cas d'une population en équilibre de Hardy-Weinberg, les taux d'hétérozygoties théoriques et observés ne sont pas significativement différents. L'équilibre génétique de Hardy-Weinberg ne peut être estimé que si les locus comparés sont polymorphes à 95%. L'équilibre de Hardy-Weinberg est vérifié par le test exact de Fisher (pour des populations de petite taille). L'hypothèse nulle testée est la panmixie: c'est à dire l'indépendance de la distribution allélique à chaque locus.
- Le coefficient de consanguinité  $F_{IS}$  (Weir et Cockerham, 1984), dénommé aussi indice de fixation, reflète la différenciation des individus à l'intérieur des populations et sa valeur estime le déficit en hétérozygotes par population sur chaque locus ( $F_{IS} = 0$  : population en équilibre de Hardy-Weinberg).
- La diversité génétique au niveau inter-population a été évaluée par la variance standardisée total de Wright  $F_{ST}$  (Wright., 1969, Wright., 1978). Ce dernier mesure le déficit en hétérozygotes entre les populations et reflète la différenciation génétique. L'hypothèse nulle testée est l'identité de la distribution allélique ou génotypique à chaque locus dans les deux régions.

Wright, (1978) propose les critères suivants pour une interprétation qualitative de  $F_{ST}$ :

- $0 < F_{ST} < 0,05$  : différenciation faible
- $0,05 < F_{ST} < 0,15$  : différenciation modérée
- $0,15 < F_{ST} < 0,25$  : différenciation importante
- $F_{ST} > 0,25$  : différenciation très importante

- Le coefficient de différenciation génique ( $G_{ST}$ ) traduit la proportion de la diversité génétique totale due à la variabilité inter-population (Crossa *et al.*, 1993).

Dans un premier lieu une étude comparative du polymorphisme enzymatique selon le sexe a été réalisée au sein de chaque population. L'hypothèse nulle testée est l'identité de la distribution allélique ou génotypique pour chaque locus chez les deux sexes dans la même région.

Par la suite la variabilité génétique intra-population et inter-population a été évaluée.

## IV. Résultats

### A. Identification morphologique des phlébotomes

L'utilisation des différentes techniques de piégeages nous a permis de capturer 298 phlébotomes, dont 228 spécimens dans la région de Batna et 70 dans la région de Blida. L'identification morphologique a révélé la présence de cinq espèces. Il s'agit de *Phlebotomus perniciosus* et *P.longicuspis* appartenant au sous genre *Larroussius*, *P. papatasi* du sous genre *Phlebotomus*, *P. sergenti* du sous genre *Paraphlebotomus* et de *Sergentomyia minuta* du sous genre *Sergentomyia* (figure 17). Les résultats détaillés des captures et identifications effectuées dans les deux régions sont rapportés dans les tableaux 2 (Batna) et 3 (Blida).

Tableau 2 : Distribution des phlébotomes capturés par piège CDC et par pièges adhésifs dans la région de Batna durant la période Août-Septembre 2012 :

Espèce/sexe		Phlébotomes capturés par pièges (CDC)			Phlébotomes capturés par pièges adhésifs			TOTAL
		M	F	s/total 1	M	F	s/total 2	
Sous genre <i>Larroussius</i>	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	17	14	31	63	10	73	104
	<i>Phlebotomus longicuspis</i>	01	01	02	01	08	09	11
Sous genre <i>Paraphlebotomus</i>	<i>Phlebotomus sergenti</i>	00	01	01	07	04	11	12
Sous genre <i>Phlebotomus</i>	<i>Phlebotomus papatasi</i>	02	00	02	08	00	09	11
Sous genre <i>Sergentomyia</i>	<i>Sergentomyia minuta</i>	25	21	46	36	08	44	90
<b>Total des effectifs</b>		45	36	81	115	30	146	<b>228</b>

Tableau 3 : Distribution des phlébotomes capturés par piège CDC et par pièges adhésifs dans la région de Blida durant la période Septembre-Octobre 2012 :

Espèce/Sexe		Phlébotomes capturés vivants		Total
		Mâle	Femelle	
Sous genre <i>Larroussius</i>	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	30	30	60
	<i>Phlebotomus longicuspis</i>	00	02	02
Sous genre <i>Paraphlebotomus</i>	<i>Phlebotomus sergenti</i>	00	00	00
Sous genre <i>Phlebotomus</i>	<i>Phlebotomus papatasi</i>	01	00	01
Sous genre <i>Sergentomyia</i>	<i>Sergentomyia minuta</i>	04	03	07
<b>Total des effectifs</b>		35	35	<b>70</b>

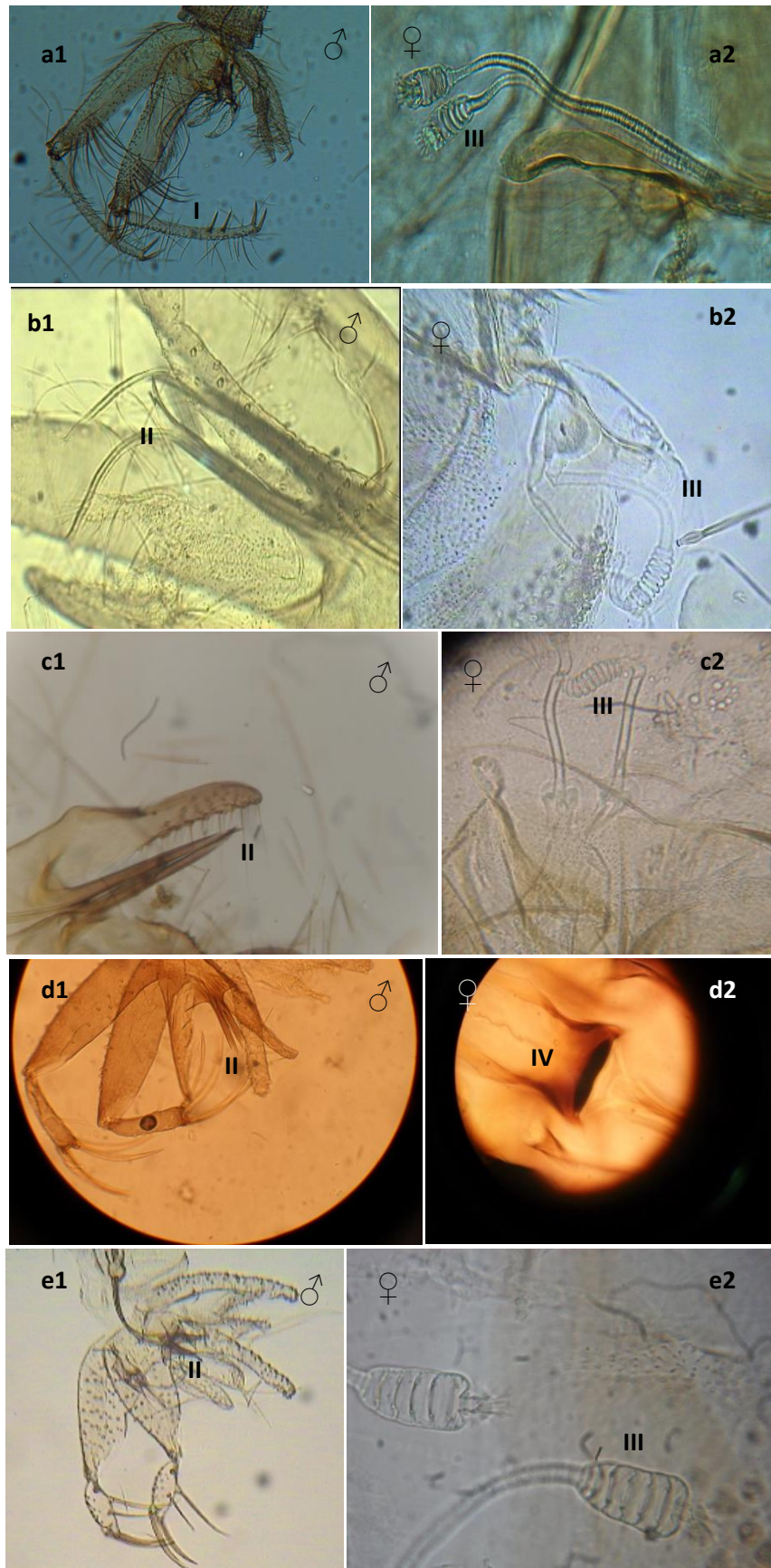


Figure 17: Critères de bases de l'identification des spécimens capturés : (a1, a2) *P. papatasi* ; (b1, b2) *P. longicuspis* ; (c1, c2) *P. perniciosus* ; (d1, d2) *S. minuta* ; (e1, e2) *P. sergenti* (Gr X40 : Photos originales). (I : style, II : fourreau pénien, III : spermathèque, IV : cibarium)

Sur les 05 espèces capturées, *Phlebotomus perniciosus* et *Sergentomyia minuta* sont les plus dominantes (figure 18). De nos résultats, il ressort que la présence de *Phlebotomus perniciosus* est plus importante à Blida (85,71%) qu'à Batna (38,27%). Cependant, le contraire a été constaté pour *Sergentomyia minuta* où elle est plus présente à Batna (56,79%) qu'à Blida (10 %).

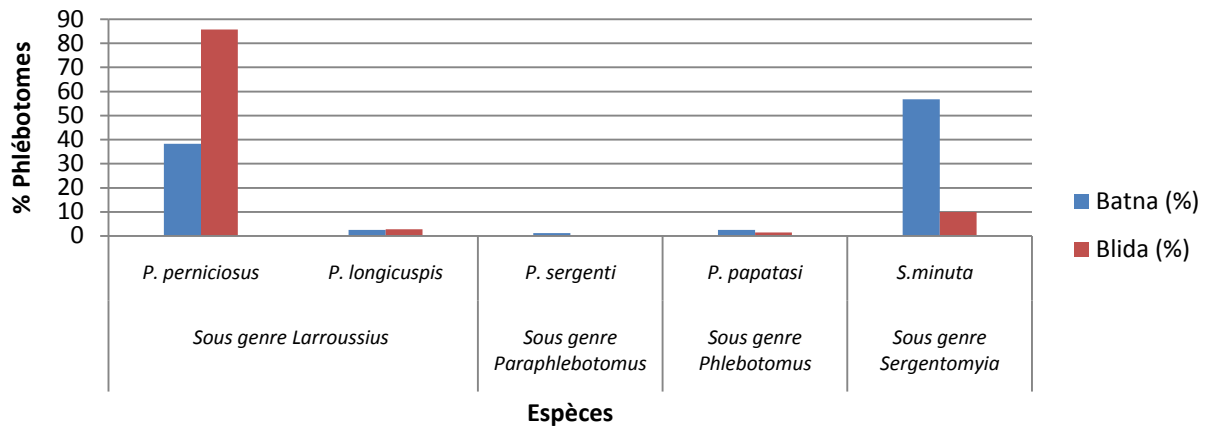


Figure 18: Distribution des différentes espèces de phlébotomes dans les deux zones d'études.

### Sexe Ratio

A travers ces résultats, on remarque que dans la région de Batna le sexe ration est en faveur des mâles (2,42) et que les captures avec les pièges adhésifs (64%) sont plus importantes que celles obtenus par les pièges CDC (36%). La distribution des phlébotomes selon le sexe et le type de piège est représentée dans les figures suivantes:

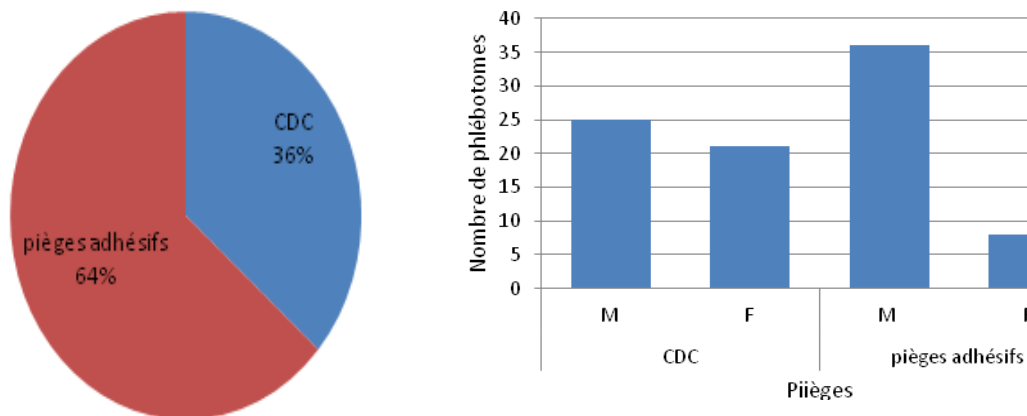


Figure 19: Distribution des phlébotomes selon le sexe et le type de piégeage dans la région de Batna.

## B. Etude enzymatique

### 1. Sélection des phlébotomes pour le typage enzymatique

Pour l'analyse biochimique, les espèces les plus abondantes et les plus représentatives (*Phlebotomus perniciosus* et *Sergentomyia minuta*) ont été sélectionnées (tableau 4). Cependant seulement 7 spécimens de *S. minuta* ont été identifiés dans la région de Blida.

Tableau 4: Distribution des espèces sélectionnées pour le typage isoenzymatique dans les deux zones d'études.

	<i>Phlebotomus perniciosus</i>			<i>Sergentomyia minuta</i>			Total
	M	F	S/total1	M	F	S/total2	
Batna	17	14	<b>31</b>	25	21	<b>46</b>	77
Blida	30	30	<b>60</b>	04	03	<b>07</b>	67
Total	47	44	91	39	11	53	144

### 2. Mise au point de l'électrophorèse des iso-enzymes

Afin de déterminer le support permettant la meilleure séparation des protéines, plus de 40 gels d'agarose et d'acrylamide ont été testés. Ainsi, en dehors des extraits protéiques préparés à partir des phlébotomes sélectionnés pour la caractérisation enzymatique, d'autres spécimens ont été pris au hasard de la population de Blida (200 phlébotomes). L'identification morphologique de ces derniers pour la mise au point de la technique n'était pas indispensable.

Les résultats de la révélation enzymatique selon les différents paramètres testés sont regroupés dans les tableaux 5 et 6.

Tableau 5: Résultat du typage enzymatique sur gel de polyacrylamide selon les différents paramètres testés (+: positif, -: négatif).

Paramètres	Quantité de l'extrait (µl)	1	1	2	3	Nombre de bande
	Ampérage (mA)		70	50	50	
Puissance (W)		25	25	25	20	
Voltage (V)	Début	300	300	300	300	
	Fin	1200	800	800	800	
Enzymes						
	GPI	+	+	+	+	1-3
	PGM	-	+	+	+	1-2
	HK	-	-	+	+	1
	FH	-	-	+	+	1
	MDH	-	-	-	+	1
	ME	-	-	-	+	1
	G6PD	-	-	-	-	-
PGD	-	-	-	-	-	

Tableau 6: Résultat du typage enzymatique sur gel d'agarose selon les différents paramètres testés (+: positif, -: négatif).

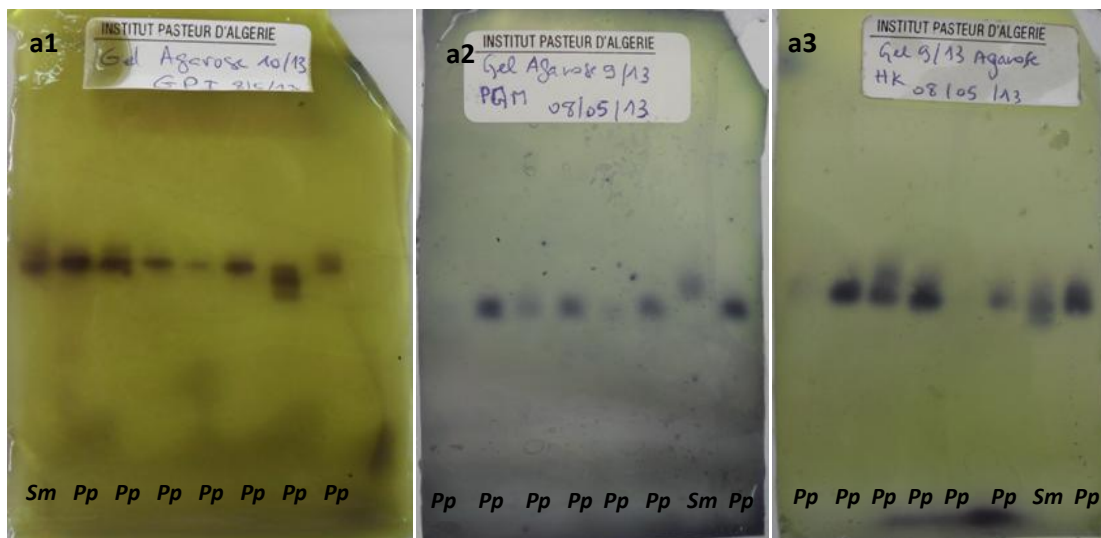
Paramètres	Quantité de l'extrait (µl)	1	1	1	1	1	2	3	Nombre de bandes
	Ampérage (mA)	50	20	18	18	15	15	15	
	Puissance (W)	25	25	25	10	10	10	10	
	Voltage (V)	Début	200	200	200	200	200	200	
Fin		500	500	500	500	500	500	500	
Enzymes		-	-	-	+	+	+	+	1-3
	GPI	-	-	-	-	-	+	+	1-2
	PGM	-	-	-	+	+	+	+	1-2
	HK	-	-	-	+	+	+	+	1-2
	FH	-	-	-	-	-	-	+	1-2
	MDH	-	-	-	-	-	-	-	-
	ME	-	-	-	-	-	-	-	-
	G6PD	-	-	-	-	-	-	-	-
PGD	-	-	-	-	-	-	-	-	

A la lumière de ces résultats, on constate que 6 enzymes (GPI, PGM, HK, FH, MDH, ME, G6PD et PGD) sur 8 testés étaient reproductibles et exploitables, et que la quantité de l'extrait déposée dans les 2 gels permettant la révélation du maximum des protéines est de l'ordre de 3 µl. Cependant le gel qui a permis la meilleure séparation des protéines (observation de plusieurs allèles) est le gel d'agarose avec les paramètres suivants: 15mA/10W/500V, pour une durée d'une heure. Ainsi, l'étude de la variabilité génétique des iso-enzymes des 144 phlébotomes sélectionnés a été réalisée sur le gel d'agarose (pH: 4-6,5). Parmi les 6 systèmes enzymatiques exploitables, trois ont été choisis et testés, à savoir la GPI, PGM et la HK (figure 20 et 21).

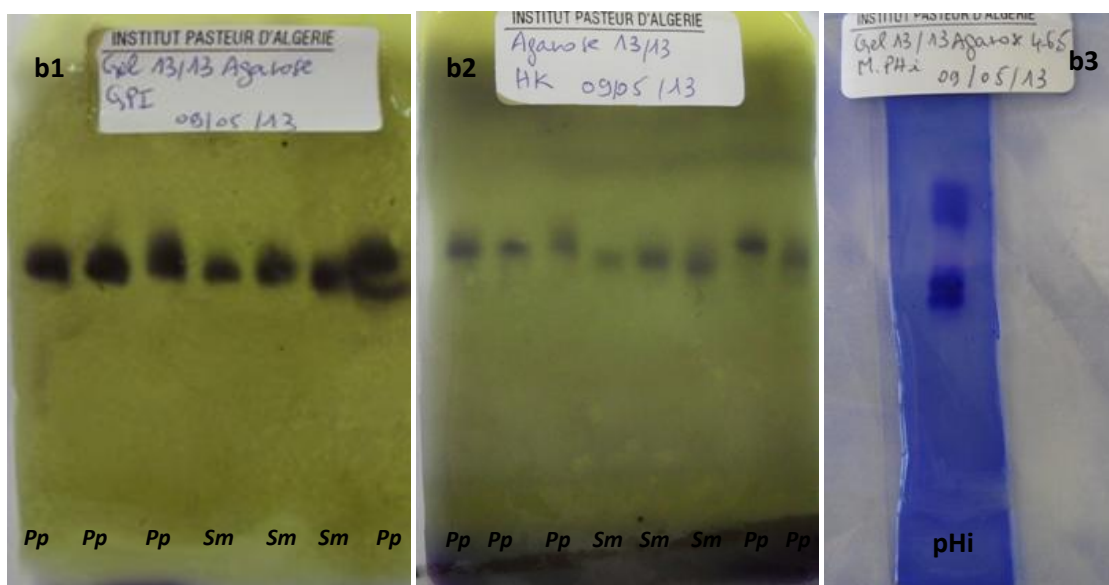
A cause du problème de migration des marqueurs de pHi, la lecture des zymogrammes a été réalisée en prenant comme référentiel la distance de migration parcourue par les échantillons sur le gel. Le tableau suivant résume les résultats de la lecture des zymogrammes.

Tableau 7: Codage des allèles selon leurs distances de migration.

Distance (mm)	N° allèle	Distance (mm)	N° allèle
18	01	58	10
42	02	60	11
46	03	62	12
48	04	64	13
50	05	68	14
51	06	32	15
52	07	35	16
54	08	38	17
55	09	44	18



Figures 20 : Profil électrophorétique des enzymes étudiées chez *P. perniciosus* (Pp) et *S. minuta* (Sm) dans la région de Blida (a1 : GPI, a2 : PGM, a3 : HK) (photos originales).



Figures 21: Profil électrophorétique des enzymes étudiées chez *P. perniciosus* (Pp) et *S. minuta* (Sm) dans la région de Batna (b1: GPI, b2: HK, b3: Marqueur de pHi) (photos originales).



## C. Etude de la variabilité génétique dan les deux zones d'études

### 1. Etude de la variabilité génétique selon le sexe

Le résultat du test de  $\chi^2$  à montré qu'il n'existe pas de différence significative dans la distribution allélique ou génotypique pour chaque locus entre les deux sexes et dans les deux populations étudiées ( $p > 0,05$ ).

### 2. Etude de la variabilité génétique dans la population de *P. perniciosus*

A travers les résultats obtenus par les logiciels FSTAT et GENEPOP, l'ensemble des loci dans les deux populations sont polymorphes puisqu'ils ont une fréquence allélique inférieure à 95% (tableau 8). Pour la région de Batna, l'enzyme PGM montre un taux de polymorphisme le plus élevé (89,9%), alors qu'à Blida c'est l'enzyme HK qui est la plus polymorphe (85,3%).

Tableau 8: Taux de polymorphisme de *P. perniciosus* par locus dans les deux régions d'études.

Locus enzymatique	Blida (%)	Batna (%)
GPI	80,7	81,8
PGM	81,5	89,9
HK	85,3	84,3

L'équilibre de Hardy-Weinberg a été vérifié par le test exact de Fisher où l'hypothèse nulle testée est l'indépendance de la distribution allélique à chaque locus. Les résultats obtenus (tableau 9), montrent qu'aucune population n'est en équilibre de HW ( $P \lll 0.05$ ). Ce déséquilibre est dû probablement à un déficit en hétérozygotes.

Tableau 9: Fréquences alléliques, taille des échantillons (N) test de l'équilibre de Hardy-Weinberg (P) pour les populations de *P. perniciosus*.

GPI (N)	Blida 48	Batna 25	PGM (N)	Blida 41	Batna 18	HK (N)	Blida 50	Batna 14
1	0.021	0.000	2	0.000	0.056	2	0.000	0.179
2	0.010	0.000	3	0.037	0.194	3	0.040	0.286
3	0.000	0.180	4	0.207	0.222	4	0.220	0.000
4	0.229	0.260	5	0.232	0.111	5	0.110	0.143
5	0.177	0.300	7	0.280	0.056	7	0.250	0.000
7	0.281	0.040	8	0.049	0.000	8	0.100	0.000
9	0.188	0.080	9	0.134	0.000	9	0.140	0.000
10	0.083	0.060	10	0.061	0.167	10	0.020	0.000
14	0.010	0.000	11	0.000	0.000	11	0.020	0.000
18	0.000	0.080	17	0.000	0.056	12	0.060	0.214
			18	0.000	0.083	13	0.040	0.071
						17	0.000	0.107
<b>P</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>P</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>P</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>

A partir des fréquences alléliques, les indices de polymorphisme intra-population ont été déterminés pour les deux populations. Le tableau 10 regroupe les paramètres de diversité génétique de chaque population de phlébotomes étudiés. Les indices de polymorphisme (Pourcentage de loci polymorphe, Nombre moyen d'allèle par locus, hétérozygotie observée ( $H_o$ ) et l'hétérozygotie attendue ( $H_e$ )) sont caractérisés par une faible hétérogénéité malgré le nombre moyen élevé d'allèles par locus (8 allèles) chez les populations analysées, d'autres part, l'hétérozygotie moyenne observée ( $H_o = 0,321 \pm (0,134)$ ) est faible et inférieure à l'hétérozygotie moyenne attendue par population ( $H_e = 0,813 \pm (0,024)$ ).

Tableau 10: Estimation de la variabilité génétique des populations de *P. perniciosus* à Blida et Batna (\*écart type).

Population	Taille moyenne de l'échantillon	Nombre moyen d'allèles par locus	% de loci polymorphe	$H_o$ (hétérozygotie observée)	$H_e$ (hétérozygotie attendue)
Blida	46,30	8,30	82,50	$0,344 \pm (0,029)^*$	$0,810 \pm 0,026$
Batna	19,00	7,30	85,33	$0,298 \pm (0,240)^*$	$0,816 \pm 0,023$
Moyenne	32,65	7,8	83,91	$0,321 \pm (0,134)$	$0,813 \pm (0,024)$

Les valeurs du coefficient de consanguinité à l'intérieur des deux populations ( $F_{IS}=0,58$  et  $0,59$ ) traduisent aussi le déséquilibre de HW (tableaux 11). Une différenciation modérée de la variabilité entre les deux populations étudiées est également remarqué en utilisant l'indice de diversité de  $F_{ST}$  de Wright ( $0,071$ ). Le coefficient de différenciation entre les populations ( $G_{ST}$ ) traduit cette modération avec une proportion de 3,6% de la variabilité génétique inter-population (tableau 11).

Tableau 11: Estimation du  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  et du  $G_{ST}$  chez *P. perniciosus* dans les 2 régions d'études.

Locus enzymatique	$F_{IS}$		$F_{ST}$	$G_{ST}$
	Blida	Batna		
GPI	0,534	0,609	0,051	0,026
PGM	0,611	0,814	0,046	0,023
HK	0,601	0,322	0,110	0,036
Moyenne	<b>0,592</b>	<b>0,585</b>	<b>0,071</b>	<b>0,036</b>

### 3. Etude de la variabilité génétique dans la population de *S. minuta*

A travers les résultats obtenus par les logiciels FSTAT et GENEPOP, l'ensemble des loci dans les deux populations sont polymorphes puisqu'ils ont une fréquence allélique inférieure à 95% (tableau 12). Pour la région de Blida, l'enzyme GPI montre un taux de polymorphisme le plus élevé (93,3%), alors qu'à Batna c'est l'enzyme HK qui est la plus polymorphe (83,8%).

Tableau 12: Taux de polymorphisme de *S. minuta* par locus dans les deux régions d'études.

Enzyme	Région	Batna (%)	Blida (%)
GPI		82,2	93,3
PGM		79,9	83,3
HK		83,8	88,3

L'équilibre de Hardy-Weinberg a été vérifié par le test exact de Fisher où l'hypothèse nulle testée est l'indépendance de la distribution allélique à chaque locus. Les résultats obtenus (tableau 13), montrent que la PGM et GPI sont en équilibre de HW ( $P > 0,05$ ). Par contre dans la population de Batna, les trois loci sont en déséquilibre de HW ( $P < 0,05$ ).

Tableau 13: Fréquences alléliques, taille des échantillons (N) et le test de l'équilibre de Hardy-Weinberg (P) pour les populations de *S. minuta*.

GPI (N)	Batna	Blida	PGM (N)	Batna	Blida	HK (N)	Batna	Blida
	42	5		12	2		26	5
2	0.190	0.000	3	0.125	0.000	2	0.269	0.000
3	0.286	0.100	4	0.375	0.250	3	0.173	0.000
4	0.143	0.100	5	0.250	0.000	5	0.115	0.000
5	0.179	0.200	6	0.000	0.250	7	0.000	0.400
6	0.000	0.200	7	0.125	0.250	8	0.000	0.100
7	0.131	0.200	9	0.125	0.000	10	0.038	0.300
9	0.024	0.100	10	0.000	0.250	11	0.096	0.100
10	0.000	0.100				12	0.019	0.100
18	0.048	0.000				16	0.038	0.000
						17	0.231	0.000
						18	0.019	0.000
<b>P</b>	0.000	<b>0.096</b>	<b>P</b>	0.005	0.592	<b>P</b>	0.013	0.027

A partir des fréquences alléliques, les indices de polymorphisme intra-population ont été déterminés pour les deux populations. Le tableau 14 regroupe les paramètres de diversité génétique de chaque population de phlébotomes étudiés. Les indices de polymorphisme (Pourcentage de loci polymorphe, Nombre moyen d'allèle par locus, hétérozygotie observée ( $H_o$ ) et l'hétérozygotie attendue ( $H_e$ )) sont caractérisés par une hétérogénéité plus au moins proche dans la population de Blida, alors qu'elle est relativement différente à Batna avec un nombre moyen élevé d'allèles par locus (6 allèles) chez les deux populations. Contrairement à ce qui a été remarqué chez *P. perniciosus*, l'hétérozygotie moyenne observée chez

*S. minuta* ( $H_o = 0,583 \pm (0,109)$ ) est plus élevée mais plutôt proche de l'hétérozygotie moyenne attendue ( $H_e = 0,775 \pm (0,061)$ ).

Tableau 14: Estimation de la variabilité génétique des populations Blida et Batna de *S. minuta* (\*écart type).

Population	Taille moyenne de l'échantillon	Nombre moyen d'allèles par locus	% de locus polymorphe	$H_o$ (hétérozygotie observée)	$H_e$ (hétérozygotie attendue)
Blida	4,00	5,33	92,50	0,611± (0.096)	0.759±(0.085)
Batna	26,66	7,00	81,96	0,555±(0.123)	0.792±(0.037)
Moyenne	15,33	6,16	87,23	0,583± (0,109)	0,775±(0,061)

Les valeurs du coefficient de consanguinité à l'intérieur des deux populations ( $F_{IS}=0,306$  et  $0,324$ ) appuient aussi le déséquilibre de HW (tableaux 15). Une différenciation modérée de la variabilité entre les deux populations étudiées est également remarqué en utilisant l'indice de diversité de  $F_{ST}$  de Wright ( $0,071$ ). Le coefficient de différenciation entre les populations ( $G_{ST}$ ) traduit cette modération avec une proportion de 3,4% de la variabilité génétique inter-population (tableau 15).

Tableau 15 : Estimation du  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  et du  $G_{ST}$  chez *S. minuta* dans les 2 régions d'études ( $0,05 < F_{ST} < 0,15$  : différenciation modérée).

Locus enzymatique	$F_{IS}$		$F_{ST}$	$G_{ST}$
	Blida	Batna		
GPI	0.285	0.276	-0.011	-0.007
PGM	0.200	0.478	0.098	0.054
HK	0.434	0.219	0.106	0.053
Moyenne	0.306	0.324	0.071	0.034

## V. Discussion

L'existence de formes atypiques et d'espèces cryptiques ainsi que les phénomènes d'introgression ont rendu difficile l'identification et la différenciation des espèces cryptiques des phlébotomes en se basant seulement sur leur morphologie (Pesson *et al.*, 2004 ; Yahia *et al.*, 2004). D'autres parts, certaines espèces sont décrites en se basant seulement sur la morphologie du mâle (Boussaa, 2008a).

La complémentarité d'autres approches génétiques et biochimiques basées sur l'utilisation de marqueurs moléculaires et enzymatiques se sont avérées indispensables pour une étude taxonomique plus précise des espèces de phlébotomes (Lane, 1986).

C'est dans ce contexte que nous avons effectué un travail préliminaire sur l'apport des iso-enzymes dans l'analyse de la variabilité génétique des populations naturelles de phlébotomes de deux régions différentes d'Algérie: Blida au nord et Batna au Sud Est.

Les différentes techniques de piégeage ont permis de donner de manière non exhaustive un inventaire des espèces de phlébotomes dans ces deux régions. Ainsi 298 spécimens ont fait l'objet d'une caractérisation morphologique et/ou iso-enzymatique (144 phlébotomes).

L'étude morphologique (298 phlébotomes) a révélée la présence de 5 espèces aussi bien dans la région de Blida que dans la région de Batna. Ces espèces ont été déjà décrites dans différentes régions du pays (Dedet, 1984). Parmi elles, trois ont un intérêt médical: *Phlebotomus perniciosus* vecteur incriminé dans la transmission de la leishmaniose canine et viscérale humaine à *L. infantum* (Parrot *et al.*, 1941 ; Bettini *et al.*, 1986; Izri *et al.*, 1990 ; Martín-Sánchez *et al.*, 1994), *P. papatasi* principal vecteur de la leishmaniose cutanée zoonotique à *L. major* (Sergent *et al.*, 1921 ; Ben Ismail *et al.*, 1987 ; Izri A *et al.*, 1992) et *P. sergenti* vecteur de la leishmaniose cutanée à *L. tropica* et à *L. killicki* (Parrot, 1917; Boubidi *et al.*, 2011).

*P. papatasi* une espèce anthropophile et endophile (Belazzoug *et al.*, 1986b), elle est retrouvée avec des proportions très faibles (5% à Batna et 1,5% à Blida). Dedet (1984) a rapporté que *P. papatasi* se localise préférentiellement dans les zones steppiques nord-saharienne avec des fréquences élevée (56,5%). Cependant des fréquences faibles ont été reportées dans les régions semi-arides (12 %) et exceptionnellement dans les régions sub-humides (3,5 %), ce qui concorde avec nos résultats.

En ce qui concerne *P. sergenti*, il a été capturé seulement dans la région de Batna également avec une proportion faible (5%). Ce faible pourcentage est peut être dû au fait que nous n'avons pas piégés dans leur biotope naturel, étant donné que Dedet, (1984) signale la présence de cette espèce aussi bien au sud du pays dans les contreforts de l'Atlas saharien et les steppes présahariennes que dans les régions telliennes, avec une prédominance dans les étage bioclimatiques saharien.

Concernant le sous genre *Sergentomyia*, une seule espèce à été capturée *S. minuta* avec une proportion beaucoup plus élevée à Batna (56,79%) qu'à Blida (10%), ce qui est conforme aux données bibliographiques sur les inventaires faunistiques effectuées en région méditerranéenne (Belazzoug *et al.*, 1982). Dans la région de M'sila et Bousaada, Belazzoug *et al.* (1986b) signalent la présence de cette espèce avec une proportion de 39,75% de l'ensemble de ses captures. En Algérie cette espèce s'étend sur les bordures méridionales de la région méditerranéenne et sa limite sud coïncide avec le Sahara (Abonnenc, 1972). Il s'agit d'une espèce herpetophile, qui se nourrit exclusivement des reptiles (Lane, 1993), impliquée dans la transmission de *Sauroleishmania*, *Trypanosomatidae* de reptiles dans l'Ancien Monde. Elle ne présente pas de risque de transmission de leishmanioses pour l'Homme (Lane, 1993). Cependant, l'isolement de l'ARN de virus humains chez les espèces du genre *Sergentomyia*, a permis de soupçonner leur rôle vecteur (Charrel *et al.*, 2006).

*Phlebotomus perniciosus*, est l'espèce la plus abondante de nos récoltes à Blida (85,71%) et l'est un peu moins à Batna (38,27%). Elle est connue comme étant l'une des espèces qui occupe un très vaste territoire géographique dans tout le bassin méditerranéen, notamment dans les régions humides à sub-humides (Rioux *et al.*, 1967). En Algérie, cette espèce a été identifiée dans les étages bioclimatiques humides, sub-humides et semi-arides (Dedet *et al.*, 1984) de plusieurs localités. En dehors de ces régions, l'aire de distribution de *P. perniciosus*, s'étend au sud (Aurès, Steppe pré-Saharienne), en bioclimat aride voir Saharien mais en très faible pourcentage (Dedet *et al.*, 1984).

La présence en grand nombre de *Phlebotomus perniciosus* à Blida, confirme sa répartition au nord du pays, ce qui présente un risque potentiel de transmission de la leishmaniose viscérale humaine et canine.

Il est à noter que *Phlebotomus longicuspis* est une espèce sympatrique avec *Phlebotomus perniciosus*. Elle est présente avec des proportions relativement faibles dans nos captures (15% à Blida et 9% à Batna). Il s'agit d'une espèce incriminée dans la transmission de la leishmaniose viscérale depuis longtemps (Parrot *et al.*, 1941). *P. longicuspis* est endémique en Afrique du Nord. Il est très largement répandu en Algérie, mais beaucoup moins fréquent que *P. perniciosus*. Cette espèce est sensiblement plus abondante sur les hauts plateaux, et à l'ouest du pays (Croset *et al.*, 1978). Au Maroc, ce phlébotome occupe l'ensemble du pays, alors qu'en Tunisie il est rare, du moins à l'est du pays (Croset *et al.*, 1978).

La distinction entre *P. perniciosus* et *P. longicuspis* est difficile à cause de l'existence d'espèces typiques et atypiques (Pesson, 2004 ; Benabdennbi *et al.*, 1999). Nos résultats de l'identification morphologique de ces deux espèces basée sur des clés dichotomiques (Dedet, 1984) n'ont pas révélé de formes atypiques et par conséquent aucune confusion entre ces deux espèces affines n'est à signaler. La même constatation a été rapportée par Berchi en 2007 dans la région de Mila.

Sur le plan biochimique, sur huit enzymes testées, trois sont régulièrement révélées et reproductibles chez les espèces étudiées (144 phlébotomes). Il s'agit de la HK, PGM et GPI. Pesson (1991) a pu comparer des populations insulaires à des populations continentales des mêmes espèces ainsi qu'à d'autres espèces des sous genres *Larroussius*, *Phlebotomus* et *Paraphlebotomus* en se basant seulement sur ces trois enzymes, vu leur degré élevé de polymorphisme génétique.

A travers notre étude, la caractérisation iso-enzymatique des deux espèces étudiées a révélé également un taux de polymorphisme très élevé et aucune différence significative n'a été observée entre les mâles et les femelles au sein de chaque population. Ce résultat a été aussi rapporté par d'autres auteurs chez les populations de *Phlebotomus sergenti* et *S. minuta* Parroti du Maroc et de la Grèce (Remy-Kristensen, 1996 ; Bousaa, 2008a). Cependant Mery (1983) signale une distinction entre les mâles et les femelles de *Sergentomyia magna* du Congo au niveau du locus de la GPI seulement.

Dans l'ensemble, l'étude électrophorétique de ces trois enzymes a montré que les deux enzymes (HK, PGM) présentent un profil d'une à deux bandes, alors que la GPI présente un profil d'une à trois bandes pour certains spécimens. Ce qui suppose que la structure de ces enzymes est monomérique chez HK et PGM et dimérique chez GPI. Pesson (1991) rapporte qu'une enzyme dont la structure est monomérique présente un profil enzymatique à une bande chez les individus homozygotes et de deux bandes chez les hétérozygotes. Cependant, dans le sous genre *Phlebotomus*, la PGM est codée par deux locus (Pesson, 1991). Dans la même étude réalisée par Pesson (1991), il a aussi mis en évidence des zymogrammes ayant jusqu'à 6 bandes selon les espèces pour l'enzyme GPI. Il a souligné que cette enzyme est de structure dimérique et est codée par un locus chez les *Larroussius* et deux dans le sous genre *Phlebotomus*.

Les fréquences alléliques et les tests statistiques réalisés sur les populations de *Phlebotomus perniciosus* ont montré un déséquilibre de HW sur la totalité des loci, qui est dû probablement à des reproductions non panmictique (reproduction ne se fait pas au hasard) puisque l'indice de fixation (Fis) est différent de zéro (0,592 à Blida et 0,585 à Batna). L'estimation de l'hétérozygotie moyenne a également confirmé ce déséquilibre et a mis en évidence un déficit en hétérozygotie ( $H_o = 0,321 \pm 0,134$  et  $H_e = 0,813 \pm 0,024$ ).

Les trois loci semblent séparer légèrement les deux populations au niveau de quelques allèles. Ainsi, l'allèle 3 de la PGI est présent chez les spécimens de Batna, alors qu'il n'existe pas chez les phlébotomes de Blida. Les allèles 2, 17 et 18 de la PGM sont présents chez les espèces de Batna et absents chez les spécimens de Blida, alors que les allèles 8 et 9 de la même enzyme sont présents chez les phlébotomes de Blida et absents dans la population de Batna. Concernant la HK, les allèles 7, 8 et 9 sont présents chez les phlébotomes de Blida alors qu'ils n'existent pas chez la même population de Batna (annexe 4). Dans l'ensemble,

les 3 marqueurs enzymatiques présentent une moyennes alléliques de 8 allèles dont 5 sont communs dans les deux régions. Le taux faible de la variabilité inter-population est exprimé par le coefficient de différenciation entre les populations ( $G_{ST}$ ) et l'indice de variance standardisé de Wright respectivement ( $G_{ST}=3,6\%$ ;  $F_{ST}=0,071$ ) est dû probablement à leur répartition géographique. Ward (1981) a rapporté le même constat sur les populations de *P. perniciosus* provenant du sud de la France et de la Tunisie sur la base de trois enzymes LDH<sub>2</sub><sup>100</sup> HK<sup>110</sup> et MDH<sup>130</sup>.

Chez *S. minuta*, deux enzymes (PGM et GPI) sont en équilibre de HW chez les phlébotomes de Blida, probablement dû au faible effectif testé ou à des particularités génétiques de ces populations. Cependant, le déséquilibre de HW a été observé dans la totalité des loci de la population de Batna ( $F_{IS} = 0,324$ ) avec une hétérozygotie moyenne observée plus élevée que celle obtenue chez *P. perniciosus* ( $H_o = 0,583 \pm 0,109$  et  $H_e = 0,775 \pm 0,061$ ) probablement dû à des reproductions non panmictique.

L'ensemble des 3 marqueurs enzymatiques présentent une moyenne allélique de 6 allèles dont trois sont commun dans les deux populations des deux régions (annexe 5). Malgré l'égalité entre les allèles commun et les allèles différents, la variabilité inter-population est très proche de ce qui a été constaté chez *P. perniciosus* ( $G_{ST}=3,4\%$ ;  $F_{ST}=0,071$ ).

Ainsi, notre étude a révélé une variabilité génétique modérée aussi bien chez les populations de *P. perniciosus* que chez *S. minuta* qui n'est pas dû au polymorphisme important des loci, bien qu'on dénombre jusqu'à 8 allèles dans la première population (*P. perniciosus*) et 6 allèles dans la deuxième population (*S. minuta*), contrairement à ce qui été rapporté dans la littérature (Pesson, 2004; Boussaa, 2008b). Cette modération suppose que l'effet de la séparation géographique agit de la même manière sur les populations locales de phlébotomes quelques soit le sous genre, par contre elle est plus marquée entre deux pays différents (Lane, 1986; Ward *et al.*, 1981).



## VI. Conclusion

Les leishmanioses constituent un problème majeur de santé publique, occupant la première place des maladies parasitaires à déclaration obligatoire en Algérie. En raison du poids de cette maladie en terme de morbidité et de prise en charge médicale, l'accent est mis sur la réduction des populations de phlébotomes. La réussite de cette dernière, nécessite une connaissance préalable et approfondie de leur distribution éco-épidémiologique et spatio-temporelle dans leur milieu naturel et une identification précise des espèces incriminées dans la transmission des maladies.

Les espèces vectrices varient d'un foyer à l'autre et d'une région à l'autre et leur identification morphologique est souvent difficile surtout pour les espèces atypiques et les espèces jumelles. Ainsi, la recherche de caractères moléculaires et biochimiques, toujours associée à l'étude morphologique, s'avère utile non seulement pour résoudre les difficultés d'identification, mais aussi pour vérifier la variabilité inter- et intra-spécifiques.

C'est dans cette optique, que nous avons mené de pair, une étude morphologique et iso-enzymatique sur des populations naturelles de phlébotomes capturés dans deux étages bioclimatiques différents: un étage subhumide au nord du pays dans la région de Blida, et un étage semi-aride au niveau de la Wilaya de Batna. Cette étude nous a permis d'une part d'inventorier les populations de phlébotomes existants dans ces deux zones d'études et de d'autre part d'étudier la diversité intra et inter-population des espèces les plus abondantes.

Malgré la courte période de piégeage, 05 espèces ont été capturées: *Phlebotomus perniciosus*, *P. papatasi*, *P. sergenti*, *P. longicuspis* et *Sergentomyia minuta*. Sur l'ensemble de ces espèces, deux sont les plus abondantes (*P. perniciosus* et *S. minuta*) et 3 sont incriminées dans la transmission des leishmanioses existants dans notre pays (*P. Perniciosus*, *P. papatasi* et *P. sergenti*).

Pour des insectes de petite taille comme les phlébotomes, la technique iso-électrophorétique sur gel ultramine est particulièrement précieuse, puisqu'un seul spécimen autorise la révélation d'au moins 3 enzymes. Sur les 8 systèmes testés, six enzymes ont été mise en évidence. L'étude de la variabilité génétique a été réalisée chez les populations de *P. perniciosus* et *S. minuta* sur la base des 3 enzymes les plus polymorphes (HK, GPI et PGM).

Sur le plan intra-population, le déséquilibre de HW observé chez *P. perniciosus* est dû à une déficience en hétérozygotie dans les deux régions d'études, alors que le contraire a été remarqué à Blida chez *S. minuta*. L'étude de la variabilité génétique avec un échantillonnage plus important chez cette population permettra de vérifier l'hypothèse de la reproduction panmictique.

Sur le plan inter-population, cette étude a révélé une variabilité génétique modérée aussi bien chez les populations de *P. perniciosus* que chez *S. minuta*. En effet, la contribution de la diversité génétique inter-population est en moyenne de 3,5% chez les deux populations d'études.

A travers ces résultats, d'autres études plus poussées doivent être réalisées :

- Application de l'électrophorèse des isoenzymes dans l'identification des phlébotomes en incriminant tous les systèmes enzymatiques connus (monomorphes et polymorphes).
- Application de cette technique dans l'identification des espèces cryptiques (*P. perniciosus*/*P. longicuspis*, *P. papatasi* /*P. bergeroti*, *P. sergenti*/*P. riouxi*) et atypiques sur l'ensemble du territoire Algérien pour rechercher les marqueurs enzymatiques spécifiques et établir l'écologie de ces espèces. Ces investigations devraient s'accompagner aussi de la recherche d'autres caractères morphologiques à valeur diagnostique en particulier chez les femelles. L'ensemble de ces études permettent d'établir des clés d'identifications plus précises.
- Etudier l'effet de la variabilité génétique des phlébotomes vecteurs et de certaines espèces du genre *Sergentomyia* sur la variabilité génétique du parasite en typant vecteur et leishmanie.
- Etudier l'effet des variations environnementales et l'éloignement géographiques sur la diversité génétique des populations de phlébotomes.

## Bibliographie

1. Abonnenc E. (1972). *Les Phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera: Psychodidae)*. O.R.S.T.O.M, Ser. Ent. Med. Parasitol. 289p.
2. Abonnenc E., Leger N. (1976). Sur une classification rationnelle des Diptères Phlebotomidae. *O.R.S.T.O.M, Ser. Ent. Med. Parasitol.* 14, 69-78.
3. Antoine J.C., Lang T., Prina E. (1999). Biologie cellulaire de *Leishmania*. In: Dedet J.P, Ed. Les Leishmanioses. Ellipses, Paris, p. 41-62.
4. Anonyme, (1975). The WHO division of malaria and other parasitic diseases. Manual on practical entomology in malaria. OMS. Part II, 15-39.
5. Anonyme. (1990). Lutte contre les leishmanioses. Série de Rapport techniques de l'OMS. OMS, n° 793, 178p.
6. Anonyme. (1993). La lutte contre les Maladies tropicales. *Les leishmanioses*. OMS, 20p.
7. Anonyme. (2008). Manuel technique à l'usage des personnels de santé. « Contrôle des vecteurs de leishmanioses » : Institut National de Santé Publique en Algérie (INSP).
8. Anonyme. (2013 a). Localisation de la région de Chebli (Blida). <http://fr.wikipedia.org/wiki/Chebli>.
9. Anonyme. (2013 b). ). Localisation de la région d'Elhamma (Batna). <http://fr.wikipedia.org/wiki/Gosbat>.
10. Belezoug S., Mahzoul D., Addadi K. & Dedet J.P. (1982). *Sergentomyia minuta* parroti (Adler et Theodor, 1927) en Algérie (Diptera: Psychodidae). Systématique infraspécifique et répartition géographique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 57, 621-630.
11. Bellazoug S., Lannote G., Maazoun R., Pratlong F & Rioux J.A. (1985). Un nouveau variant enzymatique de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908. Agent de la leishmaniose cutanée du Nord de l'Algérie. *Ann. Parasit. Hum. Comp.* 60, (6), 1-3.
12. Bellazoug S. (1986a). Découverte d'un *Meriones shawi* (Rongeurs Gerbilibidé) naturellement infesté par *Leishmania* dans le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de Ksar chellala (Algérie). *Bull. Soc. Path. Ex.* 79, 630-633.
13. Bellazoug S. (1986b). Les leishmanioses en Algérie; A propos de l'identification enzymatique de 32 souches d'origine humaine et animale. In : *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. (Coll. Int. CNRS. INSERM, 1984). Ed by Rioux J.A. Montpellier: IMEEE, 1986, 397-400.
14. Bellazoug S. (1991). The sandflies of Algeria. *Parasitologia.* 33 (Suppl), 85- 87.
15. Bessad A., Mouloua K., Kerrachi I., Benbetka S., Benikhlef R., Mezai G., Harrat Z. (2012). *Leishmania infantum* MON-1 isolé d'un chacal doré (*Canis aureus*) en Grande Kabylie (Algérie). *Bull. Soc. Path. Exo.* 105, 5-7.
16. Benabdennbi I., Pesson B., Cadi-soussi M. & Morillas Marquez F. (1999). Morphological and isoenzymatic differentiation of sympatric populations of *P. perniciosus* and *P. Longicuspis* (Diptera: Psychodidae) in northern Morocco. *J. Med. Entomol.* 36, 116-120.

17. Benallal K, Gassen B, Bouiba L, Depaquit J, Harrat Z (2013 a). Entomological investigation following the resurgence of human visceral leishmaniasis in southern Algeria. *Acta Trop.* doi:p11: S0001-706X(13)00197-6. 10.1016/j.actatropica.
18. Benallal K., Dib Y., Boubidi S.C., Harrat Z. (2013 b). Nouvelles stations de *Sergentomyia schwetzi* (Adler, Theodor & Parrot ; 1929) dans le Tassili N'Ajjer. *Arch. Institut. Pasteur.* (sous presse).
19. Benikhlef R., Harrat Z., Toudjine M., Djerbouh A., Bendali-Braham S., Belkaid M. (2004). Présence de *Leishmania infantum* MON-24 chez le chien. *Méd. Trop.* 64, 381 – 383.
20. Benikhlef R., Aoun K., Bedoui K., Harrat Z., Bouratbine A. (2009). Premières identifications de *Leishmania infantum* MON-80 chez le chien en Algérie et en Tunisie. *Rev. Méd. Vét.* 65, 151-152.
21. Ben Ismail R., Gramiccia M., Gradoni L., Helal H., Ben Rachid M.S. (1987). Isolation of *Leishmania major* from *Phlebotomus papatasi* in Tunisia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, (5), 749.
22. Berchi S., Rioux J.A., Belmonte A., Russo J. (1986). Un Phlébotome nouveau pour l'Algérie, *Phlébotomus (Praphlébotomus) kazeruni* Theodor et Mesghali, 1964. *Ann. Parasit. Hum. Comp.* 61(4), 507-508.
23. Berchi S., Bounamous A., Louadi K. & Pesson B. (2007). Différenciation morphologique de deux espèces sympatriques: *Phlebotomus perniciosus* Newstead 1911 et *P. longicuspis* Nitzulescu 1930 (Diptera: Psychodidae). *Ann. Soc. Entomol. Fr.* 43, 201-203.
24. Berdjane-Brouk Z., CharreL R.N., Bitam I., Hamrioui B. & Izri A. (2011). Record of *Phlebotomus (transphlebotomus) mascittii grassi*, 1908 and *Phlebotomus (larrousius) chadlii* rioux, juminer & gibily, 1966 female in Algeria. *Parasite.* 18, 337-339.
25. Bettini S, Gramiccia M, Gradoni L, Atzeni MC. (1986). Leishmaniasis in Sardinia: II. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, in the province of Cagliari. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80(3), 458-459.
26. Boubidi S.C., Benallal K., Boudrissa A., Bouiba L., Bouchareb B., Garni R., Bouratbine A., Ravel C., Pestova J., Dvorak V., Votypka J., Volf P & Harrat Z. (2011). *Phlebotomus sergenti* (Parrot, 1917) identified as *Leishmania killicki* hosts in Ghardaïa, south Algeria. *Journal. Microb. Infect.* 13, 691-696.
27. Bounamous A. (2010). *Biosystématique et caractérisation par la biologie moléculaire des phlébotomes de l'est algérien* thèse. Thèse de Doctorat en Biologie Animale, option Entomologie. Université Mentouri de Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biologie Animale, 302p..
28. Boussaa S. (2008a). *Epidémiologie des leishmanioses dans la région de Marrakech, Maroc : effet de l'urbanisation sur la répartition spatio-temporelle des Phlébotomes et caractérisation moléculaire de leurs populations*, Thèse de Doctorat de l'université Louis Pasteur, Strasbourg I, Discipline : Ecologie-Epidémiologie, 181p.
29. Boussaa S, Boumezzough A, Remy PE, Glasser N, Pesson B. (2008b). Morphological and isoenzymatic differentiation of *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus longicuspis* (Diptera: Psychodidae) in Southern Morocco. *Acta Trop.* 106(3):184.

30. Boyer R.F. (1993). *Modern experimental biochemistry*. Addison-Wesley Publishing Company (2<sup>e</sup> Ed), Reading (USA), pp: 132-135.
31. Charrel R.N., Izri A., Temmam S., Lamballerie X. & Parola P. (2006). Toscana Virus RNA in *Sergentomyia minuta* Flies. *Emerging Infectious Diseases*. [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid). 12, 8.
32. Croset H., Rioux J.A., Léger N., Houin R., Cadi Soussi M., Benmansour N. & Maistre M. (1974). Les méthodes d'échantillonnage des populations de phlébotomes en région méditerranéenne. In: Rioux, J.A, Ed. *Ecologie des leishmanioses*. CNRS, Paris, pp : 139-151.
33. Croset H., Rioux J.A., Maistre M., & Bayar N. (1978). Les phlébotomes de Tunisie (Diptera: Psychodidae). Mise au point systématique, chorologique et éthologique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 53, 711-749.
34. Crossa J., Hernandez CM., Bretting P., Eberhart SA., Taba S. (1993). Statistical genetic considerations for maintaining germ plasm collections. *Theor. Appl. Genet.* 86, 673–678.
35. Dedet J.P., Addadi K. & Belazzoug S. (1984). Les phlébotomes (Diptera: Psychodidae) d'Algérie. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Paradol.* XXI-I, 2, 99-127.
36. Dedet J.P. (2009). Leishmanies, leishmanioses: Biologie, Clinique et thérapeutique. *EMC*. 1-14.
37. Depaquit J, Ferte H, Léger N, Killick-Kendrick R., Rioux J.A., Killick-Kendrick M., Hanafi H.A., Gobert S. (2000). Molecular systematics of the phlebotomine sandflies of the subgenus *Paraphlebotomus* (Diptera, Psychodidae, Phlebotomus) based on ITS2 rDNA sequences. Hypotheses of dispersion and speciation. *Insect. Mol. Biol.* 9, 293-300.
38. Depaquit J., Léger N., Robert V. (2008). Les Phlébotomes de Madagascar (Diptera: Psychodidae).VI- Un sous-genre nouveau (*Vattieromyia*) avec trois espèces nouvelles: *Sergentomyia* (V.) *sclerosiphon*, S. (V.) *namo* et S. (V.) *anka*. *Parasite.* 15, 15-26.
39. Di Muccio T., Marinucci M., Frusteri L., Maroli M., Pesson B., Gramiccia M. (2000). Phylogenetic analysis of Phlebotomus species belonging to the subgenus *Larrousius* (Diptera, Psychodidae) by ITS2 rDNA sequences. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 30, 387-93.
40. Dolmatova A.V., Demina N.A. (1971). *Les Phlébotomes et les maladies qu'ils transmettent*. O.R.S.T.O.M ed, 168 p.
41. Dryer RL., Dryer GF. (1989) *Experimental biochemistry*, Oxford Univesity Press, Oxford, p.130-5.
42. Gennady P. Manchenko (2003). *Handbook of detection of enzymes on Electrophoretic gels*. Second edition. Institut of Marine Biology, Russian Academy of Science; Vladivostok, Russia. 553p.
43. Goudet J. (1995). Fstat (ver 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86, 485–486.
44. Harrat Z, Boubidi SC, Pratlong F, Benikhlef R, Bensalah S, Dedet J P, Ravel C, Belkaid M. (2009). Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte & Pratlong 1986) in Algeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 716- 720.
45. Harrat Z. (2010). Epidémiologie des leishmanioses : Etat actuel. Journée Fronco-Tunisienne de Parasitologie. Institut Pasteur de Tunis, 11-12 Novembre.

46. Izri A., Belazzoug S., Boudjebba Y., Dereure J., Pratlong F., Delalbre-Belmonte A., Rioux J.A. (1990). *Leishmania infantum* MON-1, isolée de *Phlebotomus perniciosus* en Kabylie, Algérie. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 65, 151-152.
47. Izri A., Belazzoug S., Pratlong F., Rioux J.A. (1992). Isolement de *Leishmania major* MON-25 de *Phlebotomus papatasi* à Biskra, Algérie. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 67, 31-32.
48. Izri M.A. & Belazzoug S. (1993). *Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi* naturally infected with dermatropic *Leishmania infantum* at Tenes, Algeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87, 399.
49. Izri A., Depaquit J., Parola. (2006). Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes autour du bassin méditerranéen. *Med Trop.* 66, 429-435.
50. Jaouadi K., Haouas N., Chaara D., Gorcii M., Chargui N., Augot D., Pratlong F., Dedet J.P., Ettlijani S., Mezhoud H & Babba H. (2011). First detection of *Leishmania killicki* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in *Ctenodactylus gundi* (Rodentia, Ctenodactylidae), a possible reservoir of human cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Parasites & Vector.* 4, 159.
51. Killick-Kendrick R. (1990). Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.* 4, 1-24.
52. Killick-Kendrick R., Tang Y., Killick-Kendrick M., Sang D.K., Sirdar M.K., Ke L., Ashford W., Schorscher J., Johnson R.H. (1991). The identification of female sandflies of the subgenus *Larroussius* by the morphology of the spermathecal ducts. *Parasitologia.* 33, 335-347.
53. Killick-Kendrick R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17, 279-289.
54. Lane R.P. (1986). Recent advances in the systematics of phlebotomine sandflies. *Insect. Sci. Applic.* 7 (2), 225-230.
55. Lane R.P. (1993). Sand flies. In: *Medical Insects and Arachnids* (ed. by R. P. Lane & R. W. Crosskey). Chapman and Hall, London. 78-119.
56. Léger N., Pesson B., Madulo-Leblond G., Abonnenc E. (1983). Sur la différenciation des femelles du sous-genre *Larroussius Nitzulescu*, 1931 (Diptera, Phlebotomidae) de la région méditerranéenne. *Ann. Parasitol. Hum. Com.* 58, 611-23.
57. Léger N., Depaquit J. (1999). Les phlébotomes. In: Dedet J.P, Ed. Les Leishmanioses. Ellipses, Paris, pp, 90-108.
58. Léger N., Depaquit J. (2001). Les phlébotomes et leur rôle dans la transmission des leishmanioses. *Rev. Fr. labo.* 338, 41-48.
59. Léger N., Depaquit J. (2002). Systématique et Biogéographie des phlébotomes (Diptera : Psychodidae). *Ann. Soc. Entomol.* 38 (1-2), 163-175.
60. Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.F.G., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J. & Wallace F. G. (1980). A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.* 27, 37-58.

61. Markert C., Moller L.F. (1959). Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 45, 753-763.
62. Martín-Sánchez J, Guilvard E, Acedo-Sánchez C, Wolf-Echeverri M, Sanchiz-Marín MC, Morillas-Márquez F. (1994). *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, infection by various zymodemes of the *Leishmania infantum* complex in the Granada province (Southern Spain). *Int. J Parasitol.* 24(3), 405-408.
63. Mery A., Trouillet J., Vattier-Bernard G. & Pasteur N. (1982). Polymorphisme enzymatique et différenciation génétique chez quatre espèces du genre *Sergentomyia* de la République du Congo. *Biochem. Syst. Ecol.* 10, 83-90.
64. Murphy R.W., Sites J.W., Buth J.R., Buth D.G., Haufler C.H. (1990). Proteins I: Isozyme electrophoresis. In Hillis DM., Moritz C. (Eds). *Molecular systematics*. Sunderland, Massachusetts USA: Sinauer Associates, p. 45–126.
65. Naucke T.J., Menn B., Massberg D., Lorentz S. (2008). Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol. Res.* ,103 (Suppl 1), 65-68.
66. Niang A.A., Geoffroy B., Angel G., Trouillet J., Killik-Kendrick R., Hervy J.P., Brunhes J. (2000). Les phlébotomes de l'Afrique de l'Ouest. Logiciel d'identification et d'enseignement, IRD édition.
67. Parrot L. (1917). Sur un nouveau Phlébotome algérien, *Phlebotomus sergenti* sp. *Bull. Soc. Path. exot.* 10, 564-567.
68. Parrot L, Donatien A, Plantureux E. (1941). Sur l'infection naturelle des Phlébotomes par la leishmaniose générale du chien et de l'homme en Algérie. *Arch. Inst. Pasteur. Alg.* 14, 209-218.
69. Pasteur N., Bonhome F., Catalan J., Britton Davidion J. (1987). Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines.
70. Pesson B., Wallon M., Floer M.T., Kristensen A.R. (1991). Isoenzymatic studies of Mediterranean populations of sandflies of the subgenus Laroussius. *Parassitologia*, 33, 471-476.
71. Pesson B., Ready J.S., Benabdennbi I., Martin-Sanchez J., Esseghir S., Cadi Soussi M., Morillas-Marquez F. & Ready P.D. (2004). Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif. *Med. Vet. Entomol.* 18, 25–37.
72. Pinto M.C, Campbell-Lendrum D.H, Lozovei A.L, Teodoro U et Davies C.R. (2001). Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Med.Vet. Entomol.*, 15, 132-139.
73. Raymond. M & Rousset. F. (1995). GENEPOP Version 1.2: population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Hered.* 86, 248–249.
74. Remy-Kristensen A., Perrotey S., Pesson B., Garcia-Stoeckel M, Ferte H., Morillas-Marquez F & Leger N. (1996). *Phlebotomus sergenti*; Parrot, 1917: morphological and isoenzymatic comparisons of two natural populations from Tenerife (Canary Islands, Spain) and Crete (Greece). *Parasitol. Res.* 82, 48-51.

75. Rioux, J.A., Golvan Y.J., Croset H., Houin R., Juminer B., Bain O., Tour S. (1967). Ecologie des leishmanioses dans le Sud de France. Echantillonnage. Ethologie. *Ann. Paras. Humm. Comp.* 42, 561-603.
76. Rioux J.A., Rispail P., Lanotte G. & Lepart J. (1984). Relations phlébotomes-bioclimats en écologie des leishmanioses. Corollaires épidémiologiques. L'exemple du Maroc. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 131, 549-557.
77. Rioux J.A., Lanotte G., Serres E. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 65, 111-125.
78. Sergent E.D., Sergent E.T., Lombard J. & Quilichini M. (1912). La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. *Bull. Soc. Path. Exot.* 5, 93-98.
79. Sergent E.D., Parrot I, Donatien A & Beguet M. (1921). Transmission du clou de Biskra par le phlébotome *Phlebotomus papatasi* (Scop.) *CRA cad Sci.* 173, 1030-1032.
80. Sergent E.D., Parrot I, Donatien A & Beguet M. (1926). Observation et iconographie d'un clou de Biskra transmis par *Phlebotomus papatasi* (Scop.). Etude expérimentale du virus. *Arch. Inst. Past. Algérie.* 4, 1-19.
81. Simard F. (1999). Variabilité génétique et flux de gènes chez les moustiques *Anopheles arabiensis* et *Anopheles gambiae*, vecteurs du paludisme en Afrique. Apport des loci microsatellites. Université Henri Poincaré - NANCY I. Faculté des Sciences. U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques. Ecole Doctorale Biologie et Santé. 272p.
82. Theodor O. (1948). Classification of the old world species of the subfamily *Phlebotominae* (Diptera, Psychodidae). *Bull. Em. Res.* 39, 85-115.
83. Vesterberg O. (1971). Isoelectric focusing of proteins, *Meth. Enzymol.* 22: 389-412.
84. Ward R. D. (1981). Electrophoretic studies on genetic polymorphism and differentiation of phlebotomine sandflies (Diptera : Psychodidae) from France and Tunisia. *Reprinted from Annals of tropical Medicine and Parasitology.* 75, 2, 235- 245.
85. Wasserberg G., Yarom I., Warburg A. (2003). Seasonal abundance patterns of the sand fly *Phlebotomus papatasi* in climatically distinct foci of cutaneous leishmaniasis in Israeli deserts. *Med. Vet. Ent.* 17, 452-456.
86. Weir B.S. & Cockerham C.C. (1984). Estimating F-statistics for analysis of population. *Structure. Evolution.* 38, 1358-1370.
87. Wright S. (1969). Evolution and the genetics of populations, Vol 2. The theory of gene frequencies. University of Chicago Press, Chicago.
88. Wright S. (1978). Evolution and the genetics of populations, Vol 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago.
89. Yahia H., Ready P.D., Hamdani A., Testa J.M. & Guessous Idrissi N. (2004). Regional genetic differentiation of *Phlebotomus sergenti* in three Moroccan foci of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*. *Parasite.* 11, 189-199.



# Annexes

## Annexe 1 : Matériel non biologique

### A. Appareillage

- Appareil d'électrophorèse horizontal et accessoire
- Agitateur magnétique vortex
- Balance de précision
- Congélateur -20°C
- Etuve à 37°C
- Réfrigérateur
- Générateur de courant
- Microscope optique
- Loupe
- Micropipettes de 10, 100, 1000
- pH mètre.
- Pompe à vide

Outils de manipulation : Aiguille, Bac à gel, Baro-magnétique, Bandelettes d'électrodes, Ciseau, Embouts, Film gel bond PAG, Lame, Lamelle, Marqueur Nalgène, Papier Wattman N°1, Plaque à gel, Plaque en verre, Pinces, Pipette de pasteur, Seringue, Spatule, petit tube eppendorf.

### B. Produits chimique

- Acide acétique:  $\text{CH}_3\text{COOH}$
- Acide chlorhydrique HCL
- Acrylamide  $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$
- Agarose
- Alcool 95°
- Ampholine
- Azote liquide
- Bleu de bromophénol
- Bisacrylamide : NN' méthylène bis acrylamide
- Hydroxyde de sodium NaOH
- Glycérol  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$
- Persulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
- potasse à 10% (KOH)
- TEMED NNNN tetra-méthylethylenediamine  $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$

### **C. Additifs**

- Agar noble
- Carbonate de sodium anhydre  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- Chlorure de magnésium  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- EDTA : Acide éthylène diaminetétracétique  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
- MTT : 3 – (4-5 diméthylthiazol 2)-2,5 diphényl tétrazolium bromide thiazolyl blue
- NBT : Nitro blue tétrazolium  $\text{C}_{40}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_6$
- PMS : Phénasine méthosulfate  $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2 \cdot \text{CH}_3\text{SO}_4$
- Tris base  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$

### **D. Réactifs**

- Acide fumarique disodique  $\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_4\text{Na}_2$
- L acide malique  $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_5$
- Fructose 6- phosphate  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_9\text{PNa}_2$
- Glucose 1 phosphate  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_9\text{PK}_2$  ,  $2\text{H}_2\text{O}$
- Glucose 6 phosphate  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_9\text{PNa}$
- D mannose 6 phosphate di Barium ou disodique  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_9\text{PBa}_2$
- Pyruvate sel monosodique  $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3\text{Na}$ .

### **E. Enzymes**

- G6PD : glucose –6- phosphate déshydrogénase
- MDH : malique déshydrogénase
- PGI : phosphoglucose isomerase
- Mannose: 6-phosphatase sel de BA

### **F. Coenzymes**

- NAD : nicotinamide adénine dinucléotide  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2$
- NADP : bi cotinamide adénine dinucléotide phosphate  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3\text{Na}_2$

## Annexe 2: préparation des solutions

### Solution de Marc André (d'après Abonnenc, 1972)

- Eau distillée.....30 ml
- Hydrate de chloral .....40 gr
- Acide acétique cristallisable.....30 ml

### Alcool polyvinylique (P.V.A) (d'après Abonnenc, 1972)

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

### Bleu de coomassie G250

- Bleu de coomassie G250.....415mg
- Méthanol.....250ml
- Acide acétique glaciale.....50ml
- Eau distillée.....250ml

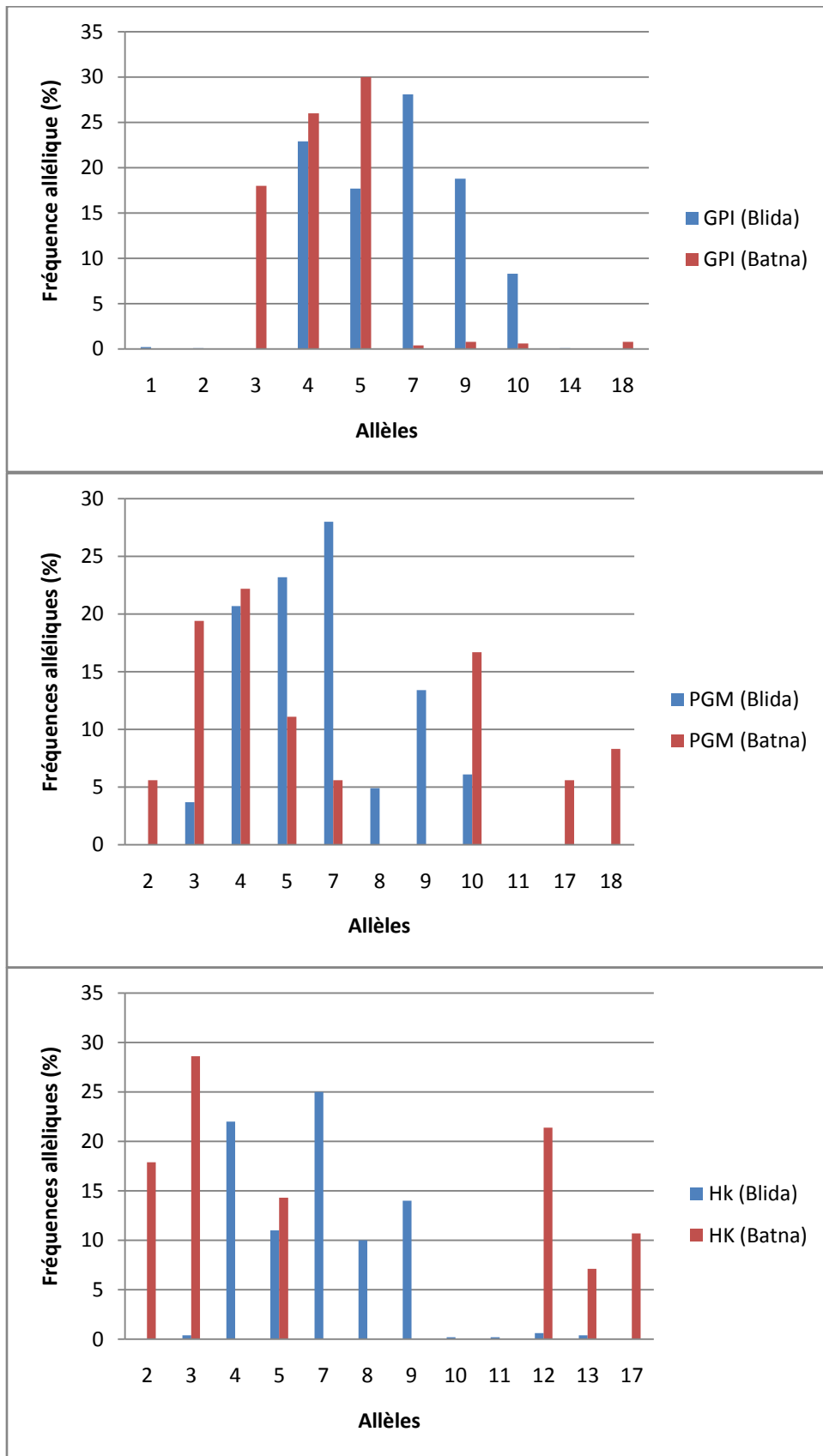
### Solution de décoloration

- Méthanol.....250ml
- Acide acétique glaciale.....50ml
- Eau distillée.....250ml

### Annexe 3: Composition des solutions de révélation enzymatique

Enzyme (Abbréviation)		Tampon de reaction	Substrats et cofacteurs	Enzymes et colorants (au dernier moment)	Gel (phi)
<b>OXYDO- REDUCTASES</b>	ENZYME MALIQUE (ME) EC 1.1.1.40  MALATE DESHYDROGENASE (MDH) EC 1.1.1.37	Tampon Tris- HCl 0,02M pH8 (15ml)	MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O 0,2M (1ml), β-NADP 1% (1ml), <b>solution A (5ml) :</b> - Ac malic (3,35 g), - Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ((3,10 g) - H <sub>2</sub> O (25ml) ajuster à pH 7 avec Tris 1M.	PMS 1% (1ml), MTT 1% (0,5ml)  <b>Révélation de MDH :</b> Après apparition des bandes ME, rajouté dans la solution : β-NAD 1% (1 ml),	3-10
	GLUCOSE -6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE (G6PD) EC 1.1.1.49	Tampon Tris- HCl 0,2M pH8 (15ml)	Glucose 6-phosphate (20mg), EDTA (10mg) β-NADP 1% (1 ml),	PMS 1% (0,5ml), MTT 1% (0,5ml)	3-10
	6-PHOSPHOGLUCONATE DESHYDROGENASE (PGD) EC 1.1.1.44	Tampon Tris-HCl 0,2M pH8 (15ml)	Gluconate 6-phosphate (40mg) MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O 0,5M (1ml), β-NADP 1% (1 ml),	PMS 1% (1ml), MTT 1% (0,5ml)	3-10
<b>LYASES</b>	FUMARASE (FUM) EC 4.2.1.2	Tampon Tris-HCl 0,2M pH8 (15ml)	Acid Fumaric (580mg), β-NAD 1% («3ml), Acid pyruvic (20mg)	MDH (100 unités) 200µl PMS 1% (0,5ml), MTT 1% (0,5ml)	3-10
<b>TRANSFERASES</b>	HEXOKINASE (HK) EC 2.7.1.1	Tampon Tris- HCl 0,2M pH8 (15ml)	ATP (20mg), D(+)-glucose (25mg), MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O 0,5M (1ml), β-NADP 1% (0,5 ml), β-NAD 1% (1 ml)	G6PDH (10 unités) 50 µl, PMS 1% (0,5ml), MTT 1% (0,5ml)	4-6,5
	PHOSPHOGLUCOMUTASE (PGM) EC 5.4.2.2	Tampon Tris- HCl 0,2M pH8 (15ml)	α-D-glucose-1-P (100mg), MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O 0,5M (1ml), β-NADP 1% (0,5 ml), β-NAD 1% (1 ml),	G6PDH (10 unités) 50 µl, PMS 1% (0,5ml), MTT 1% (0,5ml)	4-6,5
<b>ISOMERASES</b>	PHOSPHOGLUCOSE ISOMERASE (PGI) EC 5.3.1.9	Tampon Tris-HCl 0,2M pH8 (15ml)	Fructose-6-phosphate (10mg), MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O 0,5M (1ml), β-NADP 1% (0,5 ml), β-NAD 1% (1 ml),	G6PDH (10 unités) 50 µl, PMS 1% (0,5ml), MTT 1% (0,5ml)	4-6,5

#### Annexe 4: Fréquences alléliques chez *P. Perniciosus*



## Annexe 5: Fréquences alléliques chez *S. minuta*

