



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTER DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

*En vue de l'obtention du diplôme de master en
Sciences de la Nature et de la Vie Filière
Sciences Biologiques
Option : Génétique et physiologie*

Thème :

*Apport de l'analyse biochimique dans l'étude du
polymorphisme génétique chez Aedes albopictus
en Algérie*

Présenté par : ALIMIRAOUSSAID Lamia

Devant le jury :

Mme .Zatra.Y	MAB	U . Blida1	Présidente
Melle . Hamzi w .	MAA.	U . Blida1	Examinatrice
Mr . Mohamed said R.	MCB	U . Blida1	Promoteur
Mme. Benikhlef R.	MA	IPA	Co-promotrice

Année Universitaire 2016 - 2017

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail

A la lumière de ma vie ma chère maman

A mon père

A mes grands parents

A mon oncle Omar, Hmed et tous Mes oncles et tantes pour leur soutien et leur aide

A ma tante Farida

Mes sincères reconnaissance a ma très chère tante zahia qui je trouve toujours a mes cotes

A mes chères frangines zahia et hayat

A mon frère et ami islam

A mon amie sonia

A tous qui m'ont aidé a réalisé ce travail de près ou de loin

Merci

REMERCIEMENTS

Au premier lieu je tien a remercie infiniment monsieur Ramdane mohamed said maitre de conférence du département de biologie et physiologie cellulaire, université Blida 1 de m'avoir encadré.

A madame Benikhlef Razika , Un remerciement reconnaissant et un grand respect de me prendre en charge, merci madame d'être plus que ma Co-promotrice merci pour votre aide professionnelle et personale.

Ma très grande considération a madame Zatra.Y, d'avoir Présidé ce jury et d'examiner ce modeste travail.

Mes vifs remerciement a mademoiselle Hamzi.W , qui a accepté d'examiner ce travail.

Je remercie monsieur Harrat zouhir d'avoir accepter de m'accueillir au sein de l'établissement de l'IPA.

A monsieur Kamal Benallal qui nous a jamais privé de son aide et de son soutien.

Un grand respect et merci a RAFIK et a tous le personelle de service éco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations de l'institut pasteur d'Alger.

Mes très grands remerciements s'adressent à tous mes professeurs qui m'ont transmis leur savoir durant mes années a l'université de SAAD DAHLEB – BLIDA.

GLOSSAIRE

Allèle : Un allèle est une forme alternative d'un gène qui est situé à une position spécifique sur un chromosome spécifique. Ces codages d'ADN déterminent des traits distincts qui peuvent être transmis des parents à la progéniture par la reproduction sexuelle.

Alloenzyme : ce sont des enzymes codées par différents allèles d'un même gène. Les alloenzymes n'ont pas la même structure (taille, charge), elles sont donc séparables par électrophorèse.

Anthropophile : une espèce animale ou végétale qui est adaptée à vivre dans le voisinage immédiat de l'homme.

Diploïde : Caractérise un organisme ou une cellule possédant un matériel génétique (chromosomes) en double, à l'exception des chromosomes sexuels quand ces derniers existent.

Exoophile : Se dit des insectes adultes hématophage qui vivent après leur repas sanguin hors de l'organisme piqué ou en dehors des habitations.

Isoenzymes : Des enzymes de même fonction, mais de structure différente ayant donc des vitesses de migration électrophorétique différente, ils sont codés par des allèles différents d'un même gène ou par deux gènes différents (rarement plus).

Mésothorax : Est le deuxième segment du thorax de l'insecte, qui porte les ailes antérieures chez tous les insectes ailés.

Métathorax : Est la troisième partie du thorax de l'insecte ; il se trouve entre le mésothorax et l'abdomen. Le métathorax porte la troisième paire de pattes, et la deuxième paire d'ailes.

Microsatellite : Élément constitutif de l'ADN des eucaryotes. Il s'agit de courtes séquences répétées d'ADN réparties dans le génome et la plupart du temps, sans fonction connue.

Prothorax : Le premier segment du thorax de l'insecte, situé juste derrière la tête. Il porte la tête et la première paire de pattes.

Polymorphisme : C'est la coexistence de plusieurs allèles pour un gène ou un locus donné, dans une population animale, végétale, fongique ou bactérienne.

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

Vecteur : Un vecteur est un arthropode hématophage qui assure la transmission biologique active d'un agent pathogène (virus, bactérie, parasite) d'un vertébré à un autre vertébré.

Résumé

L'Aedes albopictus moustique d'origine d'Asie du sud présente un corps ponctué de taches blanches, des pattes rayées et une bande blanche sur le thorax. Emancipé à travers le monde entier au cours de ces 30 dernières années, il a été détecté pour la première fois en Europe en Albanie en 1979.

Il s'agit d'un vecteur des maladies potentiellement grave à forte incidence épidémique. (Dengue, Chikunguniya et Zika), cet espèce représente une menace pour la santé publique au monde et aussi en Algérie vu ça récente détection dans deux régions (Oran et Birkhadem).

La technique de l'électrophorèse des isoenzymes nous a facilité l'étude de la variabilité génétique inter et intra population de cette espèce. L'analyse des profils enzymatiques par l'apport biochimique des 16 systèmes enzymatique (HK, GPI, PGM, PGD, GOT1, GOT2, MDH1, MDH2, ME, DIA, GLUD, NP1, NP2, ICD, MPI, FH.) a révélé 8 systèmes reproductibles (HK, GPI, PGM, PGD, GOT, MDH et ME), l'utilisation du logiciel BIOSYS 2 (Swofford et Selander 1981) montre une déviation des fréquences génotypiques observées dans les conditions de Hardy-Weinberg traduit par l'indice de fixation ($F_{is}=0.063$). Dans l'ensemble l'hétérozygotie excédentaire a été observé beaucoup plus au niveau de 4 locis : HK₃, HK₂, MDH et GOT et une très grande différenciation génétique entre les différentes populations d'*Ae. Albopictus* est caractérisé par le coefficient de consanguinité ($F_{st}=0.328$), les plus grands valeur de F_{st} ont été trouvées au niveau des locus HK₁, HK₂, HK₃, HK₄ et GOT.

Mots clés : *Aedes albopictus*, Biosys.2. diversité génétique. Hardy Weinberg, isoenzyme.

Abstract

The *Aedes albopictus* mosquito of origin of South Asia presents a body punctuated with white spots, striped legs and a white band on the thorax. emancipated throughout the world over the past 30 years, it was detected for the first time in Europe in Albania in 1979.

This is a vector of potentially serious diseases has high epidemic incidence. (Dengue, Chikunguniya and Zika), this species represents a threat to public health in the world and also in Algeria seen recent detection in two regions (Oran and Birkhadem).

The technique of isoenzyme electrophoresis has facilitated the study of the inter and intra-population genetic variability of this species. The analysis of the enzymatic profiles by the biochemical contribution of the 16 enzyme systems (HK, GPI, PGM, PGD, GOT1, GOT2, MDH1, MDH2, ME, DIA, GLUD, NP1, NP2, ICD, MPI, FH) MDH and ME) revealed 8 reproducible systems (HK, GPI, PGM, PGD, GOT, MDH and ME).

the use of the BIOSYS 2 software (Swofford and Selander 1981) shows a deviation of the genotypic frequencies observed in the Hardy-Weinberg conditions as indicated by the fixation index ($F_{is} = 0.063$) heterozygosity was observed much more at 4locis: HK3, HK2, MDH and GOT and a very large genetic differentiation between the different populations of *Ae. Albopictus* is characterized by the coefficient of consanguinity ($F_{st} = 0.328$), the largest value of F_{st} were found at the HK1, HK2, HK3, HK4 and GOT loci.

Key words: *Aedes albopictus*, Biosys.2. Genetic Diversity. Hardy Weinberg, isoenzyme.

ملخص

اصلا من جنوب اسيا. انتشرت في جميع انحاء العالم على مدى 30 عام (*Aedes albopictus*) الزاعجة المنقطة بالابيض الماضية اكتشفت لأول مرة في اوروبا في ألبانيا عام 1979.

تعتبر من ناقلات لأمراض خطيرة ك (حمى الضنك، شيكونغونيا و زيكا) هذا النوع يمثل تهديدا للصحة العامة في العالم و تحديدا في الجزائر منذ اكتشافها مؤخرا في منطقتين (وهران و بئر خادم).

سهلت تقنية الايزوانزيم دراسة التباين الوراثي بين و داخل هذا النوع، كما كشف تحليل بتقنية الكيمياء الحيوية ل16 نظام انزيمي (HK, GPI, PGM, PGD, GOT1, GOT2, MDH1, MDH2, ME, DIA, GLUD, NP1, NP2, ICD, MPI, FH) 8 انظمة الاكثر توفرا و يتعلق الامر ب (HK GPI PGM MDH ME PGD G6PD et GOT).

كما ان استعمال المبرمج Biosys-2 (Swofford et Selander 1981) اظهر اختلال التوازن Hardy-Weinberg الشيء الذي اظهره مؤشر تثبيت (Fis=0.063). فأعلى معدل من التنوع الوراثي ظهر في 4مواضع HK₃, HK₂, MDH et GOT.

واختلاف وراثي كبير سجل بين مختلف عينات الزاعجة المنقطة بالابيض الملاحظة التي ترجمها معامل زواج الاقارب . (Fst=0.328), خاصة على مستوى, GOT, HK₁, HK₂, HK₃, HK₄ et GOT.

Aedes albopictus ، Biosys.2 ، Hardy Weinberg ، التنوع الوراثي. الكلمات المفتاحية: ايزوانزيم ، التنوع الوراثي.

Listes des figures :

Figure 1 : moustique <i>Aedesalbopictus</i>	9
Figure 2 : morphologie d'un <i>Aedesalbopictus</i>	11
Figure 3 : Dimorphisme sexuelle chez l' <i>Aedesalbopictus</i>	11
Figure 4 : cycle biologique de l' <i>Aedesalbopictus</i>	12
Figure 5 : sites de reproduction d' <i>Aedesalbopictus</i>	14
Figure 6 : vue macroscopique d'œufs d' <i>Aedesalbopictus</i>	14
Figure 7 : vue macroscopique de larves d' <i>Aedesalbopictus</i>	15
Figure 8 : vue macroscopique d'une nymphe d' <i>Aedesalbopictus</i>	15
Figure 9 : carte globale de la distribution d' <i>Aedesalbopictus</i>	16
Figure 10 : lieu de capture d' <i>Aedesalbopictus</i> en Algérie.....	17
Figure 11 : structure de dengue virus.....	18
Figure 12 : structure de chikungunya virus.....	19
Figure 13 : carte montrant la répartition mondiale estimée de la dengue_ zika_ chikungunya...21	
Figure 14 : une femelle de <i>Culex pipiens</i>	24
Figure 15 : zones de captures des œufs d' <i>Aedes albopictus</i> (Birkhadem à Alger et Ain El Türk à Oran)	25
Figure 16 : les étapes de l'électrophorèse.....	31
Figure 17: les étapes de la révélation enzymatique.....	32
Figure 18 : profil électrophorétique chez les populations d' <i>Aedes albopictus</i>	36
Figure 19: profil électrophorétique chez la population de <i>Culex pipiens</i>	37
Figure 20 : Dendrogramme élaboré à partir des distances génétiques	44
Figure 21 : Dendrogramme élaboré à partir des similarités génétiques	44

Liste des tableaux

TABLEAU I : classification d' <i>Aedes albopictus</i> au sein de la règne Animal.....	8
TABLEAU II : les arbovirus transmis par l' <i>Aedes albopictus</i>	20
TABLEAU III : les générations et le nombre des spécimens utilisé dans l'étude de la variabilité génétique.....	24
TABLEAU IV : les systèmes enzymatiques révélés et leur solutions tampon adéquate...	26
TABLEAU V : Fréquences alléliques, taille des échantillons (N) et l'hétérozygotie moyenne (H^*) par locus des populations d'études	40
.	
TABLEAU VI : Paramètres de diversité intra-population chez les populations d'études (Les valeurs entre parenthèse correspondent à l'erreur standard).	41
.	
TABLEAU VII : Estimation de la variabilité génétique intra-population (F_{is}) et inter-population (F_{st}) des populations d'études.....	42
.	
TABLEAU VIII : Matrice des distances D (haut) et des identités I (bas) génétiques non biaisées de Nei (1978) entre les différentes populations estimées sur la base de 11 locis.....	43

Sommaire

INTRODUCTION.....	4
INTRODUCTION.....	4
I. GENERALITE.....	7
A. Taxonomie d' <i>Aedes albopictus</i>	7
1. Les critères de classification des <i>Aedes albopictus</i>	7
2. Caractéristique morphologique.....	7
3. Biologie et cycle de développement.....	11
4. Répartition géographique d' <i>Aedes albopictus</i>	14
B. <i>Aedes albopictus</i> et la transmission des maladies.....	16
C. Rappels.....	20
1. Génétique des populations.....	20
2. Les enzymes.....	21
II. Matériels et méthodes.....	23
A. Matériels.....	23
1. Matériels biologique.....	23
2.1. <i>Aedes albopictus</i>	23
2.2. <i>Culex pipiens</i>	23
2.3. Système enzymatique.....	24
B. Méthodologie.....	24
1. Electrophorèse sur gel épais d'amidon.....	24
1.1 Principe.....	24
2. Mode opératoire.....	25
2.1 Préparation des solutions tompan.....	25
2.1.1 Tampon gel.....	25
2.2.2 Tampon pont.....	25
2.2 Préparation du gel d'amidon.....	25
2.3 Préparation des extraits protéiques.....	26
2.4 Migration Électrophorétique.....	26
2.5 Révélation enzymatique.....	26
2.5.1 Préparation des solutions de révélation.....	27
2.5.2 La révélation des systèmes enzymatique.....	27
2.6 La lecture des zymogrammes.....	27
C. Analyse des données.....	28
III. Résultats.....	33
IV. Discussion.....	45

V. Conclusion.....	50
Références Bibliographique.....	53
Annexes.....	60

Introduction

Introduction

Aedes albopictus est une espèce originaire d'Asie du Sud-est, s'est émané à travers le monde au cours de ces 30 dernières années, s'implantant au nord, au centre et au sud des Amériques. L'Albanie été le premier pays européen colonisé par cette espèce en 1979, puis la majorité des pays européens ont été touchés. D'autres pays les plus proches comme le Maghreb n'ont pas étaient épargnés. Au Maroc, l'identification d'*Ae. albopictus* a été réalisée en 2015. En Algérie la détection de ce moustique dans trois sites de reproduction en 2010, 2014 et en 2015 indique l'installation de cette espèce dans le pays (Ahmed Tabbabi., 2017). Cette espèce, présente une grande menace pour la santé publique à cause de son rôle principale dans les épidémies récentes tel que le virus de la dengue (DENV) et le Virus Chikunguniya (CHIKV) et aussi un vecteur efficace pour un grand nombre d'arbovirus (Bonizzoni *et al.*, 2013; Izri *et al.*, 2011).

Afin de mieux comprendre la biologie d'*Ae. Albopictus*, Hawley (1988) évoque le principe de la variabilité génétique. *Aedes albopictus* peut transmettre efficacement de nombreux types d'arbovirus, mais la compétence vectorielle varie d'une population à l'autre. Cette espèce s'est adaptée tant aux régions tropicales qu'aux régions tempérées en colonisant une grande variété de gîtes larvaires principalement en extérieur mais occasionnellement en intérieur. C'est dans ce contexte que des approches d'investigations biochimiques et moléculaires ont été appliquées au cours des dernières décennies faisant appel à la génétique des populations. Cette dernière a pour objectif de comprendre l'évolution de la différenciation génétique au sein des espèces pour mieux comprendre les fluctuations génétiques auxquelles sont soumises les populations de vecteurs. Elle permet en outre d'émettre des hypothèses sur les voies d'invasion.

L'électrophorèse des iso-enzymes sur gel épais d'amidon a largement contribué dans les études de l'évaluation du polymorphisme génétique à travers l'utilisation des marqueurs biochimiques (Ward., 1981 et Pessons., 1991). Les iso-enzymes sont définies comme étant des protéines dont l'action enzymatique catalyse une même réaction au sein d'une espèce animale ou végétale mais dont les propriétés physico-chimiques et par conséquent les structures moléculaires sont différentes (Ward., 1981 et Pessons., 1991). Les marqueurs enzymatiques présentent plusieurs avantages (Murphy *et al* ; 1990) : 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. Néanmoins cette technique présente des inconvénients comme la faiblesse du nombre moyen d'allèles visualisés, la présence de mutations silencieuses et d'allèles nuls, l'expression de certaines enzymes en fonctions du stade de développement.

Plusieurs études sur la diversité génétique chez les populations d'*Aedes* ont été réalisées par l'utilisation de l'électrophorèse des iso-enzymes. Parmi elles, l'étude de la diversité génétique chez des populations d'*Aedes aegypti* et sa relation avec la transmission du virus de la dengue (Paupy, 2000). Dans cette étude, les auteurs ont montrés que le mouvement des personnes

semble être le mécanisme favorisant la propagation du virus de la dengue entre les îles polynésiennes. Ainsi les épidémies de la fièvre de la dengue sont survenues en Polynésie française à cause de la croissance du voyage aérien local et international des personnes infestées par le virus et non pas à cause de la migration des *Aedes* infectés par le virus (Paupy, 2000). Une autre étude basée sur des marqueurs iso-enzymatiques suggère que les populations issues des États-Unis et du Brésil seraient originaires du Japon (Kambhampati *et al.*, 1991). Une étude similaire, montre que des populations issues de zones tempérées (Italie, Japon et États-Unis) formaient un groupe distinct de populations issues d'Asie tropicale (Indonésie), (Urbanelli *et al.*, 2000). Une autre analyse basée sur l'étude du polymorphisme enzymatique a pu montrer que les traitements insecticides, dirigés contre les adultes d'*Aedes*, effectués lors des périodes épidémiques (saison des pluies) réduisent les densités de moustiques ainsi que leur dispersion et, par voie de conséquence, amplifient la différenciation génétique (Failloux 1999).

Dans cette optique, afin de vérifier la diversité génétique chez les populations d'*Ae. Albopictus* récemment capturés en Algérie, une électrophorèse des iso-enzymes sur un gel épais d'amidon a été utilisée. Les populations d'insectes ont été capturées dans deux étages bioclimatiques différents : la région de « Ain El Türk », située à une quinzaine de kilomètres au nord-ouest d'Oran et la région de « Birkhadem » située dans la proche banlieue Sud d'Alger.

La variabilité génétique a été évaluée aussi bien au sein de la même population (intra-population) qu'entre deux populations (inter-population).

D'autres objectifs secondaires ont été ciblés :

- Maîtriser l'utilisation de la technique de l'électrophorèse des iso-enzymes sur gel épais d'amidon.
- Déterminer les systèmes enzymatiques existants chez les populations d'*Aedes albopictus*
- Déterminer le profil électro-phorétique.
- Cibler les enzymes les plus polymorphes.
- Déterminer les marqueurs biochimiques spécifiques impliqués dans l'étude de la variabilité génétique
- Utiliser le logiciel « Biosys.2 ».

Généralité

I. Généralités

A. Taxonomie d'*Aedes albopictus*

En 1758, Linné a insaturé une nomenclature méthodique binomiale donnant le nom scientifique de chaque animal. Ce dernier se compose de deux mots latins : le premier désignant le genre, et le second indiquant l'espèce. Ainsi le moustique faisant l'objet de ce mémoire est universellement répertorié et défini en tant qu'*Aedes albopictus*. Cette espèce décrite en 1894 par Skuse à partir des spécimens originaires de Calcutta (vacus Gérard.2012)

Tableau I : classification d'*Aedes albopictus* au sein de la règne Animal (vacus Gérard.,2012)

Classification	
Règne	Animal
Embranchement	Arthropodes
Sous-embr.	Antennates / mandibulates
Classe	Insectes
Sous-classe	Prérygotes
Infra-classe	Néoptères
Super-ordre	Endoptérygotes
Ordre	Diptères
Sous-ordre	Nématocères
Infra-ordre	Culicomorphes
Famille	Culicidés
Sous-famille	Culiciniés
Tribu	Aedini
Genre	<i>Aedes</i>
Sous-genre	<i>Stegomyia</i>

1. Critères de classification

Les moustiques de la famille *Culicidae* sont distribués dans le monde entier et comprennent plus de 3500 espèces (Le Goff *et al.*, 2012).

Pour identifier l'espèce il convient de prendre en compte : le milieu -le comportement - l'alimentation et la différence morphologique.

Les critères morphologiques sont multiples : la longueur des palpes, la taille de l'abdomen et du tronc, présence de soies de topographie précise, les nervures et taches des ailes ainsi que les organes génitaux.

En Asie de sud-est *Aedes albopictus* est très proche morphologiquement d'*Aedes scutellaris malayensis*, *Aedes seatoi* et d'autres membres de même genre ; l'identification est réalisée à l'aide de la méthode de Huang.

Les adultes doivent être distingués à l'aide de la méthode de tanka ; pour distinguer les larves d'*Aedes albopictus* des autres espèces on doit se référer à la méthode de Huang et Tanaka et al. En général les caractéristiques des formes adultes sont les plus facilement identifiables que les larves des différentes espèces de stégomyia (1985) (ancienne appellation de moustique tigre). D'autres critères peuvent être utilisés dans la classification de *Aedes albopictus* ; les analyses moléculaires, la fréquence des alloenzymes et la différence physiologique qui désigne la capacité de diapause, l'aptitude à résister aux températures glaciales, et les taux de développements larvaires. (Hawley., 1988).

2. Caractéristique morphologique

Aedes albopictus, « moustique tigre » ou moustique tigre d'Asie, présente un corps ponctué de taches blanches, des pattes rayées et une bande blanche sur le thorax (figure 1). (Hawley, 1988). Il mesure à l'âge adulte de 5 à 10 mm de longueur. Il se distingue des moustiques du même genre par la présence d'une ligne longitudinale blanche sur son thorax noir, visible à l'œil nu. (Eritja., 2014).

Les mâles sont légèrement plus petits que les femelles mais présentent la même morphologie générale à l'exception des antennes et des pièces buccales. (Museum de Zoologie., 2014)

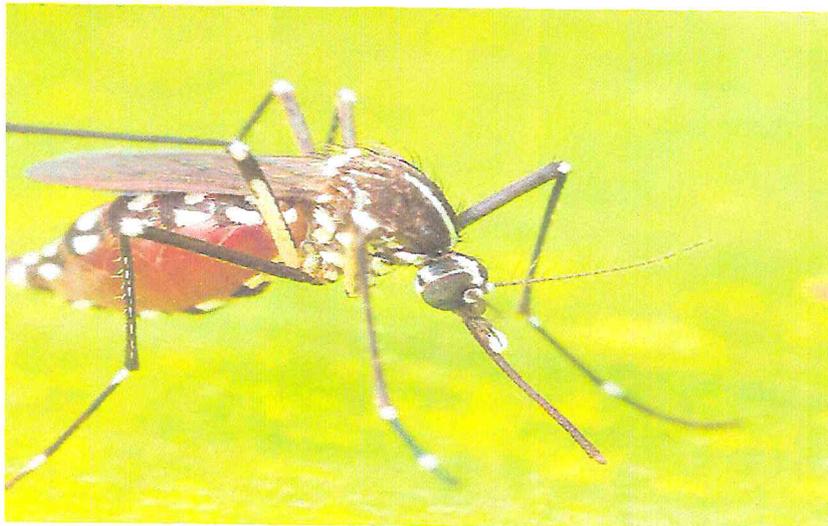


Figure 1 : Vues macroscopiques de moustiques *Aedes albopictus* femelles gorgées. La ligne blanche présente sur le thorax des *Aedes albopictus*, est caractéristique de l'espèce, (Le Gros., 2014)

Comme tous les insectes, le corps d'*Aedes albopictus* est divisé en trois parties distinctes : la tête, le thorax et l'abdomen. (GAUMONT, 1985), (figure 2)

a) Tête

Elle est globuleuse et dégagée du thorax. Elle comporte une paire d'yeux très grands, et une paire d'antennes implantées dans la région faciale formées de plusieurs segments :

- le scape.

- le torus qui renferme l'organe auditif de Johnston (plus développé chez le mâle).
- le flagellum composé d'articles en nombre variable selon le sexe (figure 3). Entre chaque article s'insèrent des soies courtes chez les femelles (antennes glabres) et très longues chez les mâles (antennes plumeuses),

La trompe est un organe impair situé dans la partie inféro-médiane. Sa structure est différente selon les sexes ; chez la femelle, hématoophage, la trompe est composée :

- de trois pièces impaires: l'épipharynx, l'hypopharynx et le labium.
- de quatre pièces paires et symétriques : deux mandibules en haut, deux maxilles en bas.

Chez les mâles qui ne se nourrissent pas de sang, mais de sucs végétaux, seuls persistent l'épipharynx et le labium (Darnis ;2012).

b) Le thorax

Est formé de 3 segments, le **mésothorax** qui prend une extension considérable en raison du grand développement des muscles alaires des ailes antérieures fixées sur ce segments, le **prothorax** et le **métathorax** s'en trouvent considérablement réduits.(Gaumont *et al.*,1985 insecte) ;(Gaumont *et al.*,1985 diptères) .

Une paire de pattes se fixe sur chacun des 3 segments, (Gaumont *et al.*,1985 diptères) ,une paire d'ailes fonctionnelles fixées au mésothorax, sont extrêmement mobile et ont un rôle sensoriel. (Gaumont *et al.* , 1985 insecte) ; elles sont écailleuses, caractérisées par la présence de nervure. (Roth *et al.*,1974).

La répartition de ces agréments joue un rôle déterminant en morphologie systématique.

c) Abdomen

C'est la partie postérieure de corps, il contient la plus part des organes de l'insecte. (Gaumont *et al.* ,1985 insecte)

Formé de dix segments dont huit sont visible, les deux derniers segments formant les appendices génitaux, le deuxième segment porte le pénis chez le mal et le cerques chez la femelle.

Le corps et recouvert d'un tégument composé de la plaque rigides appelées sclerité, Elle sont reliées par une membrane chitineuse souple qui permet leur articulation, (Legros ;2014).

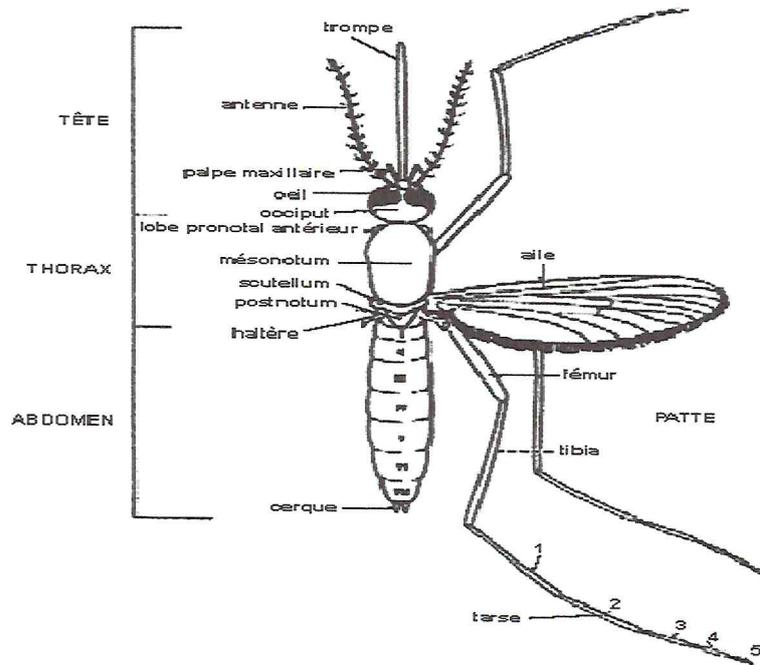


Figure 2 :Schéma de la morphologie d'un *Aedes albopictus* adulte (le gros .2014)

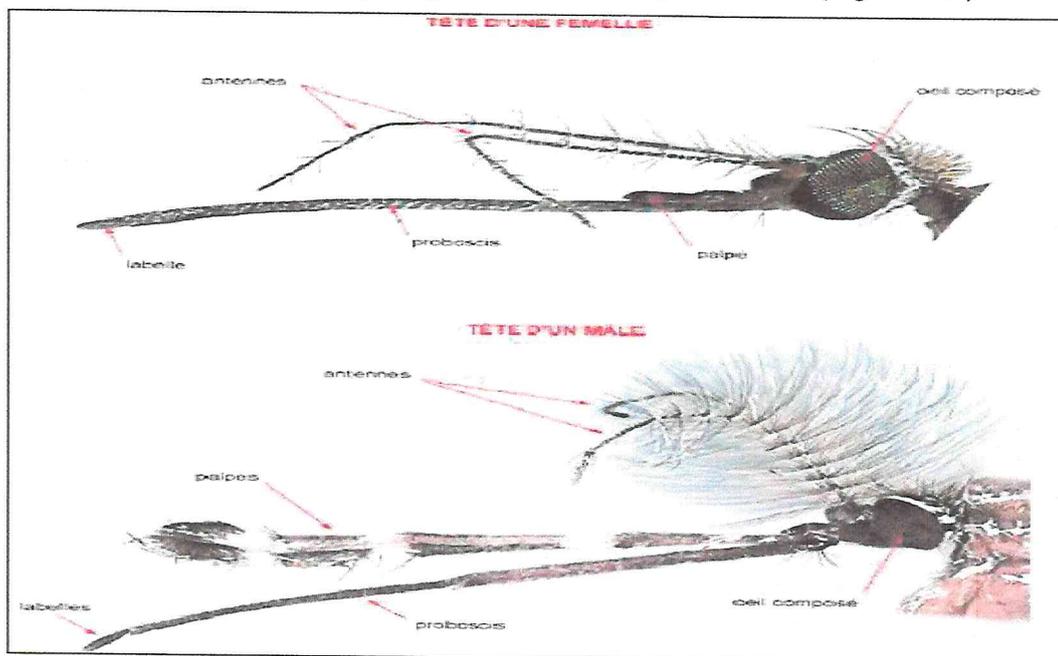


Figure 3 : Dimorphisme sexuel de la tête de moustiques mâles et femelles. Chez la femelle, les antennes sont presque glabres alors que chez le mâle, elles arborent de longues soies qui leurs donnent un aspect touffues (Institut pour la recherche et le développement), (le gros .2014)

3. Biologie et cycle de développement

Le moustique tigre asiatique, est un moustique agressif fortement anthropophile et exoophile. (Yiji Li et al ., 2014), avec un matériel diploïde qui consiste en 3 paires de chromosomes avec l'un d'elles plus courtes que les 2 autres, ces 3 chromosomes sont métacentrique, (HAWLEY.1988), La paire 1 héberge le locus Sex (Mutebi *et al.*, 1997), qui assure le déterminisme sexuel chez les *Culicinae* (Rai et Black.,1999).

Aedes albopictus présente de fortes propriétés de plasticité physiologiques et écologiques, ce qui lui permet de prospérer dans un large éventail de climats et Habitats. Connue sous le nom d'une espèce selvatique en Asie, *Aedes Albopictus* a Maintenant adapté aux environnements humains et se trouve préférentiellement dans les zones de banlieue, bien qu'il ait également été enregistré de façon dense dans les zones urbaines peuplées.(Basile Kamgang *et al.*,2011) De nombreux facteurs influent sur la répartition géographique, les voyages humains, l'urbanisation et les changements climatiques.(Lee *et al.*,2012).

Aedes albopictus, comme toutes les espèces de moustique passe par plusieurs étapes de transformation morphologique au cours de sa vie (valerie *et al* ., 2008),son cycle de vie parcourt deux milieu totalement différentes : (académie de réunion ;2006)

- une phase aérienne ou terrestre lieu de vie de moustique adulte
- une phase aquatique lieu de développement depuis la ponte jusqu'à la libération de l'imago.

Ils se développent en 4 étapes : œuf, larve, nymphe et adulte (imagos : mâles et femelles), ils effectuent cette métamorphose complète entre 5 jours et 90 jours en fonction des conditions environnementales. (figure 4)(EID ATLANTIQUE 2017).

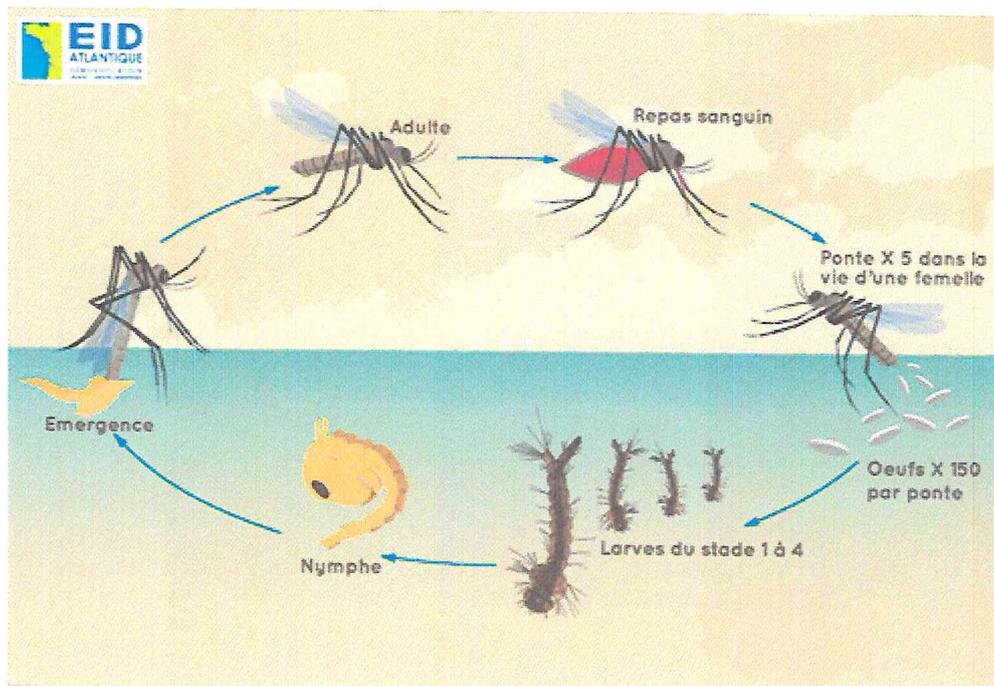


Figure4 : cycle biologique d'*Aedes albopictus* (EID ; 2017).

Les femelles ne s'accouplent qu'une seule fois au cours de leur existence. (Nuraida *et al.*, 2008). L'appareil buccal des femelles est adapté à la prise d'un repas de sang sur un hôte vertébré. Celui-ci permet au moustique tigre femelle d'obtenir les nutriments indispensables à la maturation des œufs, 48 heures après le repas de sang, les femelles fécondées pondent leurs œufs sur les parois sèches de gîtes larvaires. (Hawley., 1988), Les gîtes larvaires sont extrêmement nombreux et il en existe de deux types, les gîtes naturels (Les trous dans la terre, Le creux des arbres, Les fonds de ravines....) et les gîtes artificiels.(Gabrielle ; 2009),(figure 5) .

Les femelles peuvent faire jusqu'à 5 pontes de 150 œufs. (EID ATLANTIQUE 2017), (figure 6) les œufs sont entourés d'une épaisse coquille pourvue au pôle antérieur d'un micropyle. (Gubler *et al.* 1971), Ces œufs peuvent résister à la dessiccation pendant environ 6 mois (Hawley *et al.* , 1989). Ils éclosent alors 24 à 48 heures après la ponte en fonction des conditions météorologiques et libèrent des larves mobiles (figure 7) qui s'alimentent ou se maintiennent au repos sous la surface de l'eau.(Museum de Zoologie.,2014).

Les larves ont une croissance discontinue et subit trois mues successives. Il existe donc 4 stades post-embryonnaires (L1, L2, L3 et L4) tous aquatiques.(Robert *et al.*, 1989), qui dure de 4 à 10 jours, en fonction de la température et de la compétition intra spécifique. (Costanzo *et al.* , 2011). La larve a une taille d'environ 2 à 12 mm. Elle est mobile et respire à la surface de l'eau par l'intermédiaire d'un siphon respiratoire (Robert *et al.* , 1989)

Elles se nourrissent des débris organiques et des micro-organismes (Rodhain *et al.* , 1993). Les mâles présentent par ailleurs un temps de développement larvaire inférieur à celui des femelles,(Hawley .1988).« Au stade L4, la larve cesse de se nourrir et subit une quatrième mue donnant une nymphe. » (Darnis., 2012)., La nymphe est une puppe mobile, en forme de virgule (figure 8), vivant dans l'eau, caractérisant le stade de repos qui s'intercale entre la larve et l'adulte. La nymphe ne se nourrit pas. Elle est formée d'un abdomen et d'un céphalothorax globuleux. Ce dernier porte les ébauches des yeux et des appendices. On note aussi l'existence de deux trompes siphonothoraciques respiratoires par lesquelles la nymphe respire l'air atmosphérique ou l'air des plantes aquatiques (Lachmajer *et al.*, 1975).Elles effectuent leur mue imaginale en 24 à 48 heures et libèrent à la surface de l'eau un moustique adulte mâle ou femelle (Museum de Zoologie.,2014)

L'émergence des mâles se fait avant celle des femelles, et les accouplements ont principalement lieu dans les 5 à 10 premiers jours de l'imago, en vol et souvent à proximité des hôtes utilisés pour le repas de sang (Ali *et al.* , 1973 ; Estrada *et al.*, 1995 ; Boyer *et al.*, 2011). « Le moustique mâle est attiré par les vibrations des ailes de la femelle en vol » (Gabrielle ., 2009).Le sperme du mâle est stocké dans les spermathèques , assurant à la femelle une fécondation des œufs tout au long de sa vie. (Oliva *et al.* 2013).Durant le stade imago, le moustique se nourrit de nectar de fleurs (Hawley 1988) . Dans un climat tempéré avec une humidité relativement élevée, les femelles ont une durée de vie moyenne entre 30 et 40 jours (Museum de Zoologie., 2014).



Figure 5 : sites de reproduction pour *Aedes albopictus* . Les exemples comprennent (A) les conteneurs métalliques, (B) le terrarium, (C) les trous de pierre, (D) les récipients en céramique, (E) les récipients en plastique, (F) les gouttières, (G) les décharges de pneus usées, (H) (I) les conteneurs jetables, (J) les battements de stationnement, (K) les plateaux de pot à fleurs et (L) les conteneurs métalliques. (Mariangela Bonizzoni et al ;2013)



Figure 6: Vue macroscopique d'œufs d'*Aedes albopictus* (le gros .2014)



Figure 7 : Vue macroscopique de larves *Aedes albopictus* respirant à la surface de l'eau (le gros .2014)



Figure 8 : Vue macroscopique d'une nymphe *Aedes albopictus* respirant à la surface de l'eau (le gros .2014)

4. Répartition géographique de l'*Aedes albopictus*

a. Dans le monde

Le moustique tigre asiatique *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894) a été décrite comme l'une des 100 espèces les plus pires envahissantes dans le monde (figure 9).

Originnaire d'Asie du Sud et de l'Est, cette espèce s'est répandue dans le monde principalement depuis la seconde moitié de vingtième siècle, et on le trouve maintenant sur tous les continents, à l'exception de l'Antarctique. Les nouvelles zones colonisées par *A. albopictus* comprennent des environnements aussi disparates que l'Amérique du Sud tropicale, l'Afrique

et les régions principalement tempérées de l'Amérique du Nord et de l'Europe ;(*Goubertlet al ; 2016*).

Au cours de la dernière décennie, *Aedes albopictus* a été implanté Elle-même dans la plupart des pays au nord de la Méditerranée (Espagne, France, Italie, Grèce, Croatie, Bosnie, Albanie et Monténégro) . Cependant, la présence d'*Ae. Albopictus* n'a pas été reconnu dans les pays au sud de la Méditerranée, y- compris ceux qui forment la région du Maghreb. (*Izri et al .,2011*).

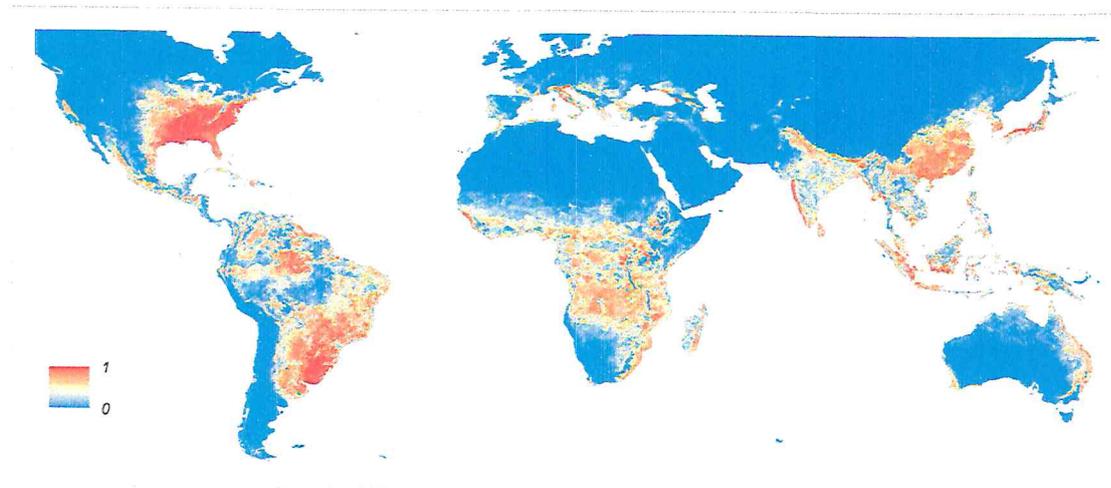


Figure 9 : Carte globale de la distribution prévue de l'Ae. Albopictus. La carte représente la probabilité d'occurrence (de 0 bleu à 1 rouge)(*Moritz UG Kraemer et al ,2015*).

b. En Algérie

En août 2010, dans la région de Larbaa-Nath-Iraten, Wilaya de Tizi-Ouzou (Algérie), une femelle *Aedes albopictus* a été piégée en vie et Partiellement engorgé, C'est le premier rapport d'*Ae. Albopictus* au Maghreb et plus particulièrement au Algérie. (*Izri et al 2011*).

Et en décembre 2015, des spécimens d'*Ae. Albopictus* (2 mâles, 3 Femelles et 3 pupae) ont été collectées. dans L'ouest de l'Algérie (oran) confirmant sa présence et son établissement en Afrique méditerranéenne (*Benallal et al ;2016*),(figure 10).

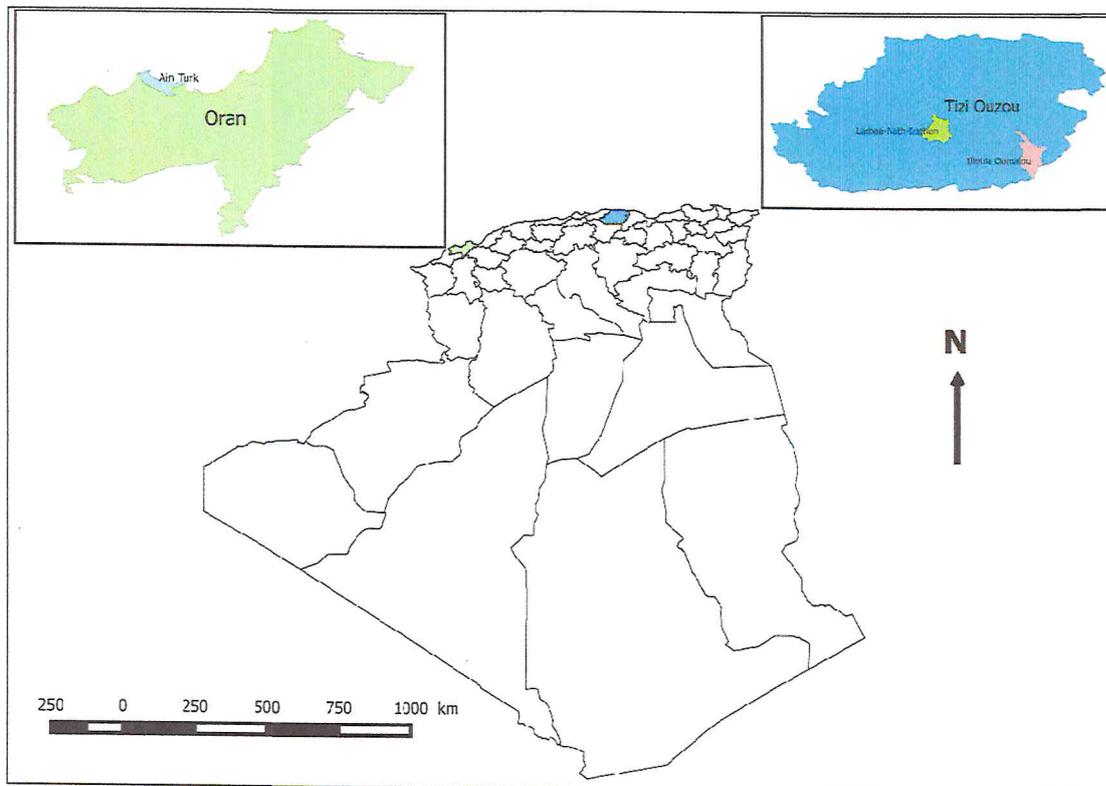


Figure10 : Lieu de capture d'*Aedes albopictus* en Algérie .,(Benallal KE *et al* 2016).

B. *L'Aedes albopictus* et la transmission des maladies

Le moustique asiatique *Stegomyia albopicta* (Skuse, 1894), est une grave nuisance et elle est responsable de la transmission des arbovirus d'importance pour la santé publique.(A. Ben nouna *et al* 2016), s'est montré capable de Transmission de 26 virus.(tableau II),(Paupy *et al.*, 2009). comme la dengue(DENV), chikungunya (CHIKV) et virus Zika, (Grard *et al.* , 2014).

La dengue et le chikungunya augmentent les préoccupations mondiales en matière de santé publique en raison de leur rapide Répartition géographique (figure 13) et augmentation de la charge de morbidité (Kraemer *et al.* , 2015)

1. La dengue

La dengue est la maladie la plus répandue des arthropodes à l'échelle mondiale. Selon l'Organisation mondiale de la santé, 2,5 milliards d'êtres humains vivant dans des régions tropicales et sous-tropicales risquent d'avoir contracté une infection à la dengue, avec environ 390 millions de cas par an (Dinu *et al.*,2014).

L'infection à la dengue est causée par la transmission aux humains de l'un des quatre sérotypes du virus de la dengue (figure 11). (DENV1, DENV2, DENV3 et DENV4) à travers la morsure des moustiques *Aedes*, Le spectre clinique de cette maladie varie de formes non adoptées ou asymptomatiques à sévères et des résultats fatals.

La maladie se caractérise par la présence de fièvre, céphalée frontale, myalgie, arthralgie et éruption cutanée, généralement limitées à une semaine.

Des infections légères ou asymptomatiques sont souvent associées à des infections primaires. Les formes sévères sont caractérisées par la présence de hémorragies, d'hypotension, de thrombocytopenie et fuite plasmatique, accompagnée également de modifications neurologiques, (Carabali *et al.*,2015).

Entre 2015 et 2016, seuls quelques cas importés de dengue ont été rapportés en Algérie (Failloux *et al*, 2017) .

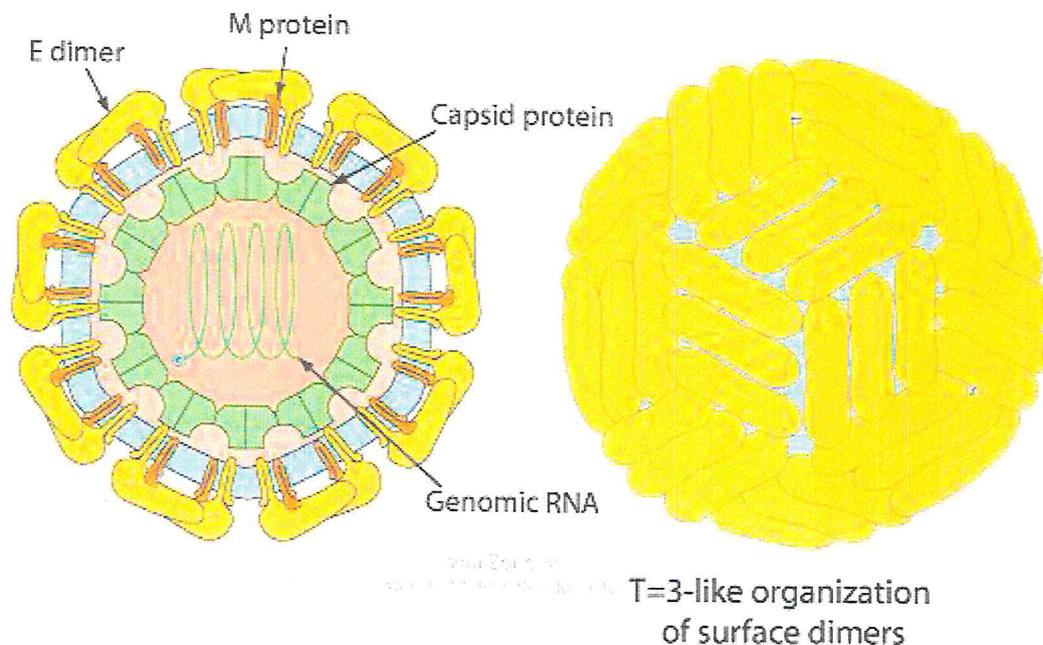


Figure 11 : la structure De dengue virus (le gros .2014)

Génome de la dengue

Le génome de DENV se présente sous la forme d'un ARN simple brin de polarité Positive et d'une longueur d'environ 10 700 paires de bases. Deux régions non-codantes situées aux extrémités 5' et 3' entourent un unique cadre de lecture codant une polyprotéine unique (back *et al* ; 2013).

Cette polyprotéine est ensuite clivée Co- et post-traditionnellement par des protéases virales et cellulaires et permet la synthèse des différentes protéines virales (Leopoldo G ; 2011).

2. La chikungunya

Un alphavirus de la famille Togaviridae, est un virus (figure12). Propagé par les moustiques qui cause une maladie fébrile Caractérisé par des arthralgies sévères.

La présentation clinique de Chikungunya est similaire À la dengue et à Zika , Cependant, contrairement à ces autres maladies, la majorité des personnes infectées par chikungunya Sont symptomatiques, La fièvre est généralement de haute qualité avec un début soudain. L'arthralgie est présente dans presque tous les cas et peut être invalidante. La douleur est généralement symétrique, pire Le matin, soulagé par un léger exercice mais aggravé Par une activité intense. Les articulations les plus communes impliquaient Sont des chevilles, des poignets et des doigts. Polyarthrite migratrice. Des effusions peuvent également se produire (Patterson *et al* 2016).

VIRION

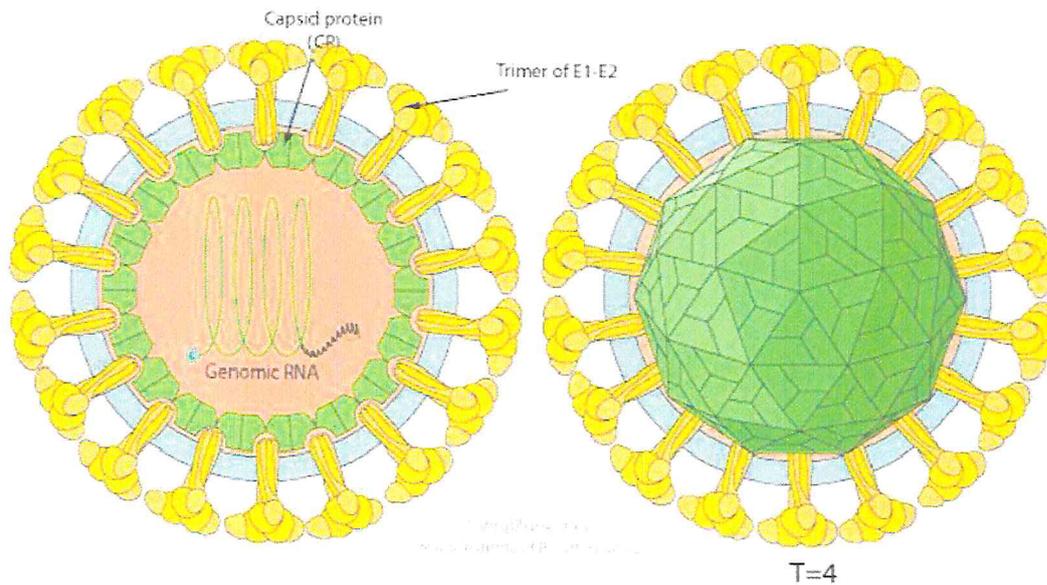


Figure 12 :la structure de la chikungunya virus(le gros .2014))

Génome de la chikungunya

Le génome de CHIKV est constitué par un ARN simple brin de polarité positive d'une longueur d'environ 11,8 kb, Il possède une coiffe et une queue polyadénylée. L'ARN du virion est infectieux et sert à la fois d'ARN génomique et d'ARN messenger, Il est traduit selon deux cadres de lecture non-chevauchants qui permettent la synthèse de poly protéines.

Le premier cadre de lecture à partir de l'extrémité 5' aboutit à la formation d'une polyprotéine nsP123 et de la protéine nsP4.

Le second cadre de lecture permet la synthèse d'une autre polyprotéine à partir d'un intermédiaire appelé ARN 26S. Celui-ci est un ARN subgénomique de polarité positive qui sert de matrice à la synthèse de la poly protéine (Sinch *et al* ., 2011).

Tableau II : les arbovirus transmis par *Aedes albopictus* (C. Paupy *et al* , 2009)

		Isolement en milieu naturel	Compétence vectorielle	
			Infection	Transmission
<i>Flaviviridae</i>				
Genre <i>Flavivirus</i>	DENV-1,2, 3,4	+	+	+
	YFV		+	+
	WNV	+	+	+
	JEV	+	+	+
	St-Louis Encephalitis V		+	+
	Usutu virus	+	?	?
<i>Togaviridae</i>				
Genre <i>Alphavirus</i>	CHIKV	+	+	+
	EEEV	+	+	+
	VEEV		+	+
	WEEV		+	+
	RRV		+	+
	Sindbis virus		+	+
	Mayaro virus		+	+
	Getah virus		+	+
<i>Bunyaviridae</i>				
Genre <i>Bunyavirus</i>				
	Groupe Bunyamwera			
	Potosi virus	+	+	+
	Cache Valley virus	+	?	?
	Tensaw virus	+	?	?
	Groupe California			
	Keystone virus	+	+	-
	San Angelo virus		+	+
	La Crosse virus	+	+	+
	Jamestown Canyon virus	+	+	+
	Trivittatus virus		+	-
	Groupe Simbu			
	Oropouche virus		+	-
Genre <i>Phlebovirus</i>	RVFV		+	+
<i>Reoviridae</i>				
Genre <i>Orbivirus</i>	Orungo virus (Afrique)		+	+
<i>Nodaviridae</i>				
Genre <i>Picornavirus</i>	Nodamura virus		+	?

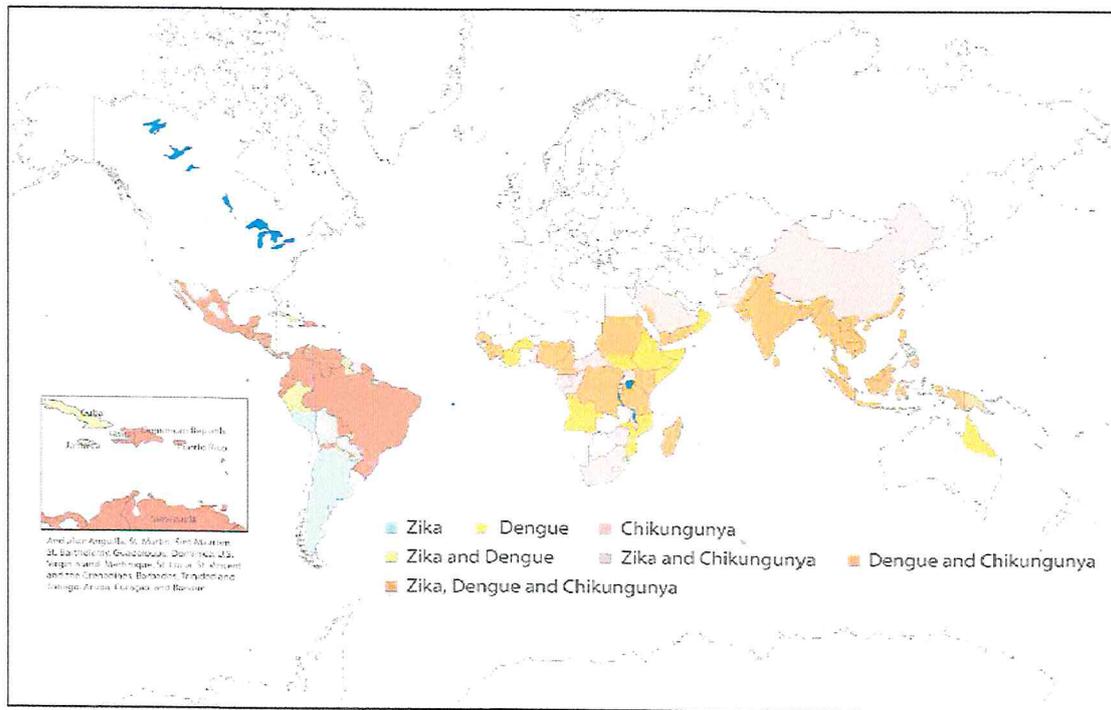


Figure 13 :Carte montrant la répartition mondiale estimée de la dengue, Zika et Chikungunya (Jessica Patterson *et al* 2016).

Cette expansion rapide d'*Aedes albopictus* peuvent être retracé grâce a la génétique des populations.

C. Rappel

1. : Génétique des populations

La génétique des populations a pour objectif l'étude de la fréquence des gènes et des génotypes, et des facteurs susceptibles de modifier ces fréquences au cours des générations successives. Certains de ces facteurs comme la sélection, les mutations, la dérive génétique et les migrations, peuvent changer la fréquence des gènes et des génotypes.

La consanguinité (union entre sujets apparentés) peut modifier la fréquence des génotypes sans influencer la fréquence des gènes.

Les relations entre les fréquences génotypiques et les fréquences alléliques est décrit par la loi de Hardy-Weinberg.

La loi de Hardy-Weinberg Propose en 1908 indépendamment par le mathématicien anglais Hardy et le médecin allemand Weinberg se définit comme suit:

Dans une population de dimension infinie, ou les unions se font au hasard (panmixie), ou il n'existe ni migration, ni sélection contre un phénotype particulier, et ou le taux de mutations est constant, **les proportions des différents génotypes restent constantes d'une génération a l'autre et la population est dites en équilibre de d'Hardy-Weinberg.**

Il est possible aussi de vérifier si à l'intérieur d'une population donnée, les croisements se font de manière aléatoire ou non, en comparant les fréquences génotypique observées a celles attendues sous l'hypothèse de l'équilibre d'Hardy-Weinberg par une statistique de type χ^2 .

La génétiques des populations recherche les variation génétique à l'intérieur d'une population et entre les populations d'une même espèce a partir des paramètres développé par Wright pour évaluer la structure génétique est le F_{st} (Wright., 1965-1978) et le F_{is} (Wright ., 1969) .

Ces variations génétique peuvent être estimée par plusieurs techniques tels que l'utilisation de l'ADN mitochondrial, les microsatellites, les RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et les régions ITS (Internal Transcribed Spacer) et les alloenzymes qui sont les plus sollicités dans l'étude de la structure génétique des insectes (failloux *et al.*, 1999).

Dans l'étude de la génétique des populations, les insectes ont été utilisés comme un modèle, ce qui a permis l'étude de la variation génétique des insectes dans des habitats naturels.

Cette variation qui peut être liée par exemple au fractionnement d'un milieu insulaire ou même à la particularité de certains biotypes (les caves, les mares...), comme elle peut être due à la disponibilité des ressources de l'habitat.

La génétique des populations chez les insectes permet ainsi de renseigner sur la capacité de dispersion du vecteur qui est un élément clé dans la lutte anti-vectorielle et la résistance aux insecticides.

La génétique des populations chez les insectes est très sollicitée pour affiner la taxinomie à un niveau infra-spécifique et la dynamique des populations, et ainsi mettre à jour des problèmes liés aux variations de capacité vectorielle, de résistance aux insecticides ou encore de suivi d'insectes transgéniques (failloux *et al.*, 1999).

2. les enzymes

Une enzyme est un catalyseur biologique, thermolabile, produit par les organismes vivants, qui agit sur la vitesse de réaction biochimique et ne modifie pas l'équilibre final.

Il agit en faible quantité et effectue la transformation d'un grand nombre de molécules.

L'activité enzymatique d'une enzyme ne s'exerce qu'un type particulier de substrat de réaction biochimique défini.

La demi-vie d'une enzyme dépend de la vitesse de sa dégradation, (Plummer *et al.*, 1989).

Les enzymes de même fonction qui migrent différemment à l'électrophorèse, sont des isoenzymes.

Un système isoenzymatique correspond à l'ensemble des bandes dont chaque bande correspond à une isoenzyme (boulanger *et al.*, 1973).

Les isoenzymes peuvent être classés en deux grands groupes : (Tibayrenc., 1979).

- 1). Isoenzymes unigéniques
- 2). Isoenzymes multigéniques

Et se distinguent par les propriétés physico-chimiques (Louisot, p ; 1983)

- _ La charge électrique.
- _ PH optimum d'action.
- _ Thermolabilité.
- _ Mobilité électrophorétique.
- _ Comportement vis-à-vis des inhibiteurs.
- _ Comportement vis-à-vis de la concentration variable de substrat.
- _ Activité en présence d'analogues de coenzymes.

L'identification de l'activité des isoenzymes dépend du comportement vis-à-vis de l'analogue de substrat

Matériels et méthodes

II. Matériels et méthodes

A. Matériel

Pour étudier la diversité génétique des populations d'*Aedes albopictus*, une électrophorèse des isoenzymes sur gel épais d'amidon a été réalisée. Un matériel biologique et non biologique était nécessaire.

1. Matériel biologique

2.1 *Aedes albopictus*

Les élevages des moustiques ont été réalisés au niveau de l'unité d'Entomologie Médicale de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA) à partir des œufs d'*Aedes albopictus* récoltés en 2015 dans la région d'Ain El Türk. Région située à une quinzaine de kilomètres au nord-ouest d'Oran. 11 descendances de la première génération (G0) avaient été obtenues et conservées à -80°C dans des tubes coniques étiquetés portant toutes les informations nécessaires à savoir : la date de la capture, la région et le numéro de la génération. Chaque génération comporte un nombre importants d'adultes d'*Aedes albopictus*. Dans cette étude seules les générations G1, G2, G3, G10 et G11 ont été étudiées (tableau II: les différents générations étudiées avec le nombre d'adultes). D'autres spécimens d'*Aedes albopictus* (24 adultes) d'une seule génération ont été également étudiés. Ses spécimens ont été capturés en 2016 dans la région de Birkhadem située dans la proche banlieue Sud d'Alger (figure 14).

2.2 *Culex pipiens*

Des spécimens de *Culex pipiens* (36 spécimens) ont été également utilisés dans cette étude (tableau III)



Figure 14 : une femelle *Culex pipiens*

Tableau III : les générations et le nombre des spécimens utilisés dans l'étude de la variabilité génétique.

Moustiques	Génération						
	G1	G2	G3	G10	G11	G [*] _{BK}	C ^{**} _x
<i>Aedes albopictus</i> (Oran)	24	24	24	30	24	24	12
<i>Aedes albopictus</i> (birkhadem)	24	24	24	24	24	24	12
<i>Culex pipiens</i> (Alger)	12	12	12	12	12	12	12

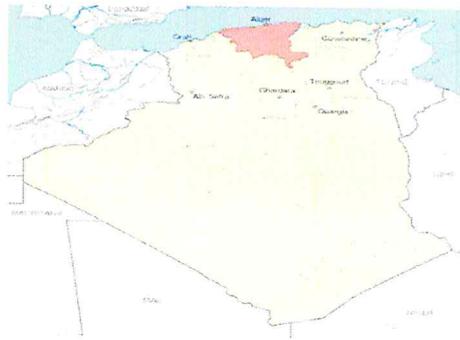


Figure 15 : zones de captures des œufs d'*Aedes albopictus* (Birkhadem à Alger et Ain El Türk à Oran).

2.3 Systèmes enzymatiques

16 systèmes enzymatiques ont été testés durant ce travail ou 8 systèmes ont été reproductibles. Certaines des ces enzymes interviennent dans le cycle de Krebs, d'autres dans le cycle de pentose et dans le métabolisme du glucose (annexe4). Il s'agit de :

- Diaphorase (DIA) EC.1.6.2.2
- Enzyme malique (ME) EC.1.1.1.40
- Fumarate déshydrogénase (FH) EC.4.2.2.2
- Glucose 6-phospho-déshydrogénase (G6PD) EC.1.1.1.49
- Glucose phospho-isomérase (GPI) EC.5.3.1.9
- Glutamate déshydrogénase (GLUD) EC.1.4.1.3
- Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT1 ,GOT2) EC.2.6.1.1
- Hexokinase (HK) EC 2.7.1.1
- Isocitrate déshydrogénase (ICD) EC.1.1.1.42
- Malate déshydrogénase (MDH) EC .1.1.37
- Mannose phosphate Isomerase (MPI) EC.5.3.1.8
- Nucleotide purine phosphorylase (NP2) EC.2.4.2.*
- Nucleotide purine phosphorylase (NP1) EC.2.4.2.1
- Phosphogluconate déshydrogénase (PGD) EC.1.1.1.44
- Phosphoglucomutase (PGM) EC.2.7.5.1

B. Méthodologie

1. Electrophorèse sur gel épais d'amidon

1.1Principe

La migration électrophorétique se fait en gel d'amidon, milieu poreux qui permet la progression des protéines vers l'un ou l'autre pôle selon que la charge électrique nette est positive (migration vers la cathode) ou négative (migration anodique). La vitesse de migration et par conséquent, la distance parcourue dans ce gel d'amidon dépendent surtout de l'intensité de cette charge électrique nette, mais aussi du poids moléculaire de la protéine et de l'orientation spatiale de cette molécule; cette migration est également influencée par la force ionique, la viscosité et les propriétés chimiques des tampons utilisés ainsi que par la force du champ électrique et la durée d'application de ce champ. (Didier Gauthier.,2009)

2. Mode opératoire

2.1 Préparation des solutions tampon

Les solutions tampon sont des solutions ionisantes des protéines permettant leur migration sur le gel. Le système tampon comprend :

2.1.1 Le tampon du gel : c'est le tampon utilisé pour la préparation du gel, son pH et sa composition dépendent du système enzymatique à révéler.

2.1.2 Le tampon de migration (tampon pont): est un tampon qui sert à relier les électrodes avec le gel, il est de même pH que le tampon gel.

Quatre solutions tampon sont préparées permettant de révéler des systèmes enzymatiques spécifiques (tableau III):

- TRIS MALEATE EDTA pH 7.4 (TME 7.4)
- TRIS MALEATE pH 7.4 (TM 7.4)
- TRIS CITRATE EDTA pH 9.5 (TCE 9.5)
- TRIS CITRATE pH 8.6 (TC 8.6)

Tableau IV: les systèmes enzymatiques révélés et leur solutions tampon adéquate.

Solution tampon gel	Systèmes enzymatiques révélés
TME 7.4 + NADP	G6PD, PGD, GOT1
TME 7.4 + NAD	GPI, PGM, HK
TME 7.4	FH
TC 8.6 + NADP	NP1, NP2, MPI, GOT1, GOT1, GLUD, DIA
TC 8.6 + NADP + MnCl ₂	ICD
TC 9.5 + NADP	MDH, ME

2.2 Préparation du gel d'amidon

La préparation du gel d'amidon s'effectue l'après-midi (sauf pour la MDH qui se fait le matin). 40 g de la poudre d'amidon sont dilués dans 400 ml de la solution du tampon gel adéquate (tableau IV). Ce mélange est porté à une température précédant immédiatement l'ébullition (apparition des premières bulles), dégazé (à l'aide d'une pompe à vide) et coulé dans un moule en plexiglas (aux dimensions intérieures de 20 cm X 20 cm x 1cm) en évitant la formation des bulles d'air qui pourraient gêner la migration protéique. Le gel est alors laissé une nuit polymérisé à température ambiante et ensuite couvert d'un film en cellophane afin d'empêcher la déshydratation du gel.

2.3 Introduction des extraits protéiques dans le gel

Le lendemain matin, ce gel est mis à 4°C pendant une demi-heure afin d'éviter la dénaturation des protéines. Durant cette demi-heure, le matériel à analyser est préparé (Figure.15). Chaque spécimens est broyé dans 30ul d'eau distillée stérile puis lysé dans de l'azote liquide et centrifuger à 12000 tr durant 5 mn. Le gel est par la suite creusé à l'aide d'un peigne en acier de 12 dents (puits). Le surnageant récupéré après centrifugation contenant les protéines est imbibé avec du papier Whatman n° 3 (de 8 x 8 mm) et introduit dans le puit du gel d'amidon à l'aide d'une pince fine (figure15).

Pour suivre l'évolution de la migration les dents du peigne sont imprégnées avec une solution de Bleu de Bromophénol qui indique l'évolution de la migration.

Le gel est placer par la suite entre deux bacs remplis avec du tampon pont (adéquat). Deux éponges plates sont mises dans les bacs d'électrophorèse qui servent de pont entre le tampon pont et le gel. Le système est placé dans une chambre froide durant la migration pour éviter la dénaturation des protéines.

2.4 La migration électrophorétique

Une fois le système prêt, les électrodes sont branchées correctement au générateur. Ce dernier est maintenue à environ 90V, l'ampérage se fixera au alentour de 55-65mA.

Le temps de migration est variable, généralement il dure 6 à 8 heures sauf pour la MDH ou la migration est laissée toute la nuit.

2.5 La révélation enzymatique

2.5.1 Principe

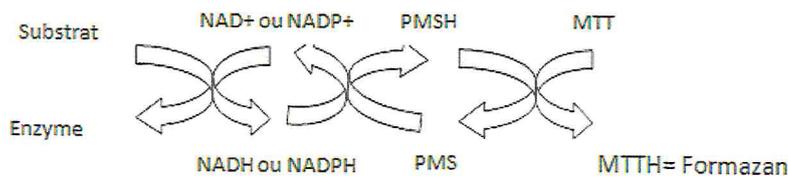
Le terme «iso-enzyme» a été crée par Markeat et Moller (1959), pour désigner toute bande apparaissant au sein d'un système enzymatique donné sur un gel.

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 (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).



2.5.2 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).

Les solutions de révélation sont préparées 30 min avant la fin de la migration.

2.5.3 La révélation

Lorsque le front de migration atteint 8cm, le courant est débranché. Les papiers wattman sont ôtés des puits, et le gel est coupé de façon à obtenir une tranche rectangulaire. Le coin supérieur droit du gel est coupé pour marquer l'ordre des extraits déposés. Le gel est ensuite transféré sur une plaque à découper (figure 17).

Le gel est coupé ensuite horizontalement en 3 tranches de 2mm d'épaisseur chacune. Les tranches de gels sont placées dans des bacs de coloration.

La solution de révélation est par la suite versée sur la surface du gel délicatement et laissée à 37°C à l'obscurité jusqu'à l'apparition des bandes bleues.

Dès que les bandes apparaissent, la réaction est bloquée avec une solution de fixation pour éviter la diffusion des bandes.

2.6 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 électrophorogramme (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'électrophorèse sont illustrées dans les (figures 16).

C. Analyse des données

Une analyse de la variabilité génétique des données à été réalisé par l'utilisation de logiciel Biosys (Swofford et Selander 1981) :

Ce logiciel permis d'analyser plusieurs paramètres permettant d'étudier la variabilité génétique au sein de la région (intra population). qu'entre deux à plusieurs régions (inter population). Les paramètres calculés sont :

le coefficient de différenciation génique (G_{st}), la valeur de coefficient de consanguinité (F_{is}) et la variance standardisée de Wright (F_{ST})(Goudet.,1995).

le taux du polymorphisme, les fréquences alléliques, tester l'écart des fréquences génotypiques dans les conditions de Hardy-Weinberg, calculer les F statistiques, effectuer une analyse chi-carré d'hétérogénéité, calculer les indices de coefficients de distance et de similarité. Il permet aussi de construire les dendrogrammes à l'aide de l'analyse en grappe. (Nicole Philip ;2011).

- La proportion de locus polymorphes, encore appelée taux de polymorphisme ou plus simplement polymorphisme (**P**), rend compte de la proportion de protéines variables par rapport à l'ensemble des protéines étudiées. Une population sera dite polymorphe pour un locus donné, si la fréquence allélique de l'allèle le plus fréquent est inférieure à **0,95**.
- Le nombre moyen d'allèles par locus (**A**), appelé également taux d'allélisme ou richesse allélique, est défini pour **n_i** allèles au locus **i** et pour **L** loci comme :

$$A = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L n_i$$

- 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 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 polymorphe à 95%.

Le paramètre F_{is} de Wright, dénommé aussi indice de fixation et appelé Auparavant coefficient de consanguinité (Wright, 1969). Il reflète la différenciation des individus à l'intérieur des populations ($F_{IS} = 1$ signifie fixation complète (cas d'autofécondation), F_{IS} inférieur à 1 : hétérozygotie excédentaire, $F_{IS} = 0$: population en équilibre de Hardy-Weinberg. $F_{IS} < 0$: hétérozygotie excédentaire.

La valeur du coefficient de consanguinité F_{is} (Weir et Cockerham, 1984) représente le déficit en hétérozygotes par population sur chaque locus. Six mécanismes différents peuvent expliquer un déficit en hétérozygotes:

- la présence de nombreux allèles nuls;
- un mélange de populations génétiquement différentes ("effet Wahlund");
- une sélection favorisant les homozygotes;
- une homogamie génétique,
- une sélection de l'habitat par des génotypes différents.

L'index de fixation F_{st} de Wright, (1969) mesure le déficit en hétérozygotes entre les populations et reflète la différenciation génétique. Wright, (1978) propose les critères suivants pour une interprétation qualitative de F_{st}

- Wright (1965-1978) a défini l'indice F_{ST} (variance standardisée) comme

L'hétérogénéité des fréquences alléliques entre subdivisions d'une population. Il représente la corrélation entre allèles à l'intérieur d'une sous-population par rapport à l'ensemble des sous populations.

D'après Wright, 1978 :

$0 < F_{ST} < 0,05$: différenciation faible

$0,05 < F_{ST} < 0,15$: différenciation modérée

$0,15 < F_{ST} < 0,25$: différenciation importante

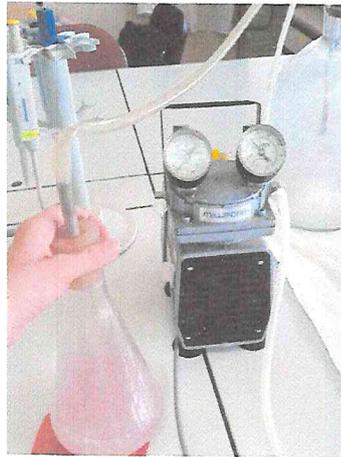
$F_{ST} > 0,25$: différenciation très importante

- Le coefficient (F_{it}) traduit le déficit global d'hétérozygotes dans l'ensemble des populations.
- **l'indice de distance de Nei** (Nei, 1978) mesure également la différenciation génétique. Le dendrogramme utilisant la matrice de distances de Nei est construit d'après la moyenne arithmétique des distances: UPGMA ("unweighted pair group method arithmetical", Sneath et Sokal, 1973).
- **l'indice de distance de Rogers** (Rogers, 1972) permet la construction d'arbre phylogénétique selon la méthode d'analyse de Wagner.

Dans ce travail L'hypothèse nulle H_0 tester : population en panmixie (en équilibre de HW).



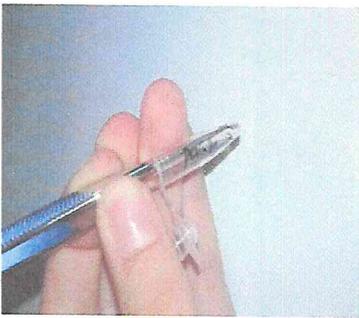
Préparation de gel



dégazage de gel



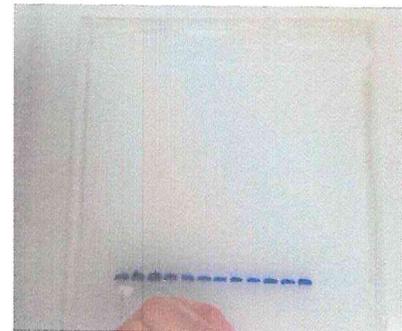
coulage de gel



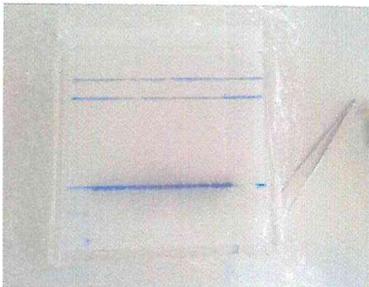
Broyage des spécimens



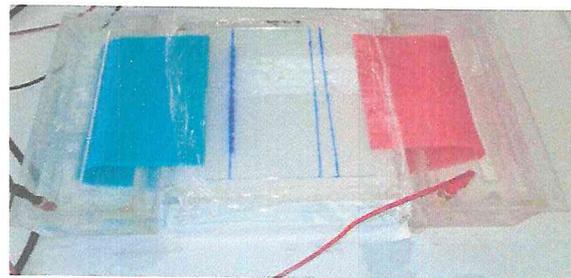
creusé le gel avec une peigne



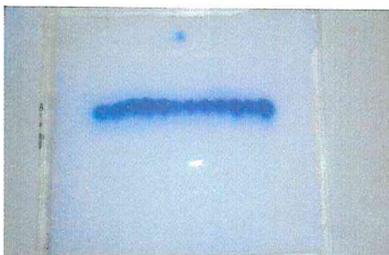
dépôt des échantillons



Une plaque de vert tracé déposé sur le gel



lancement de l'électrophorèse

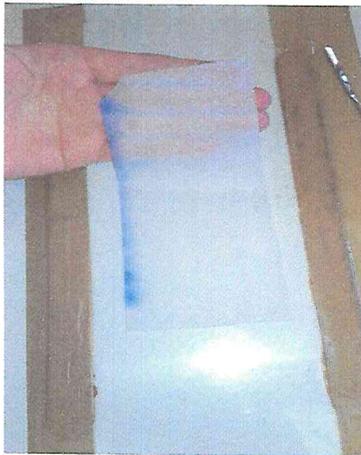


l'arrêt de l'électrophorèse



découpage de gel

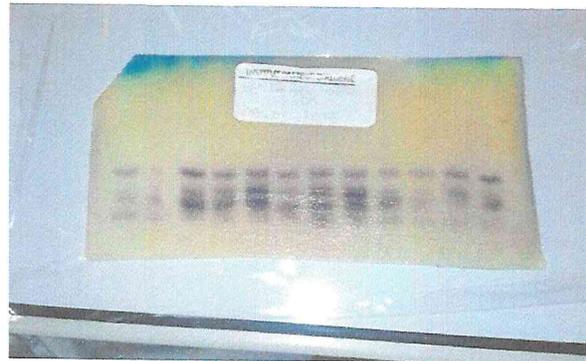
Figure 16 : les étapes de l'électrophorèse



Les tranches obtenues après le découpage



Révélation de système enzymatique



résultats de la révélation

Figure 17 : Les étapes de la révélation

Résultats

III. Résultats

Nous présentons ici, les résultats de la première caractérisation isoenzymatique des populations d'*Ae. albopictus*. Nous avons utilisé l'outil enzymatique pour comparer d'une part, les populations naturelles du nord (Birkhadem) et celle de l'ouest algérien (population d'Oran). D'autre part nous avons effectué une comparaison avec une population naturelle externe (out-groupe) de *Culex pipiens* du nord d'Alger.

A. Analyse iso-enzymatique

L'étude de la variabilité génétique des iso-enzymes des 450 spécimens de 6^e Génération d'*Aedes albopictus* et 12 spécimens de *Culex pipiens* a été réalisée sur un gel épais d'amidon pour les loci les plus reproductibles (HK, GPI, PGM, PGD, G6PD, MDH). Le profil isoenzymatique a montré une caractérisation de 4 locus pour l'enzyme HK. Il s'agit de HK₁, HK₂, HK₃, HK₄, avec des distances de migration bien distinctes représentées chacune par une seule bande occupant ainsi 4 niveaux de migration (figure 18 ; A₁). La plus anodique est commune à tous les spécimens des différentes populations (Birkhadem et Oran). Les résultats de l'analyse ont montré que la structure des enzymes chez l'*Aedes albopictus* des deux zones est monomérique, une seule bande pour HK₁, HK₃ et HK₄ et 2 bandes pour HK₂ (figure 18 ; A₁).

Deux isoenzymes pour la GOT ont été trouvées chez les *Aedes* dans la présente étude. Ceux-ci peuvent être notés GOT-1 et GOT-2 (figure 18 ; D₁). Le locus GOT₁ code une isoenzyme à mobilité électrophorétique vers l'anode (+) qui manifeste une coloration intense en forme de tache (bandes). Toutes les populations de l'*Aedes* étudiées ont présenté le même phénotype à une seule bande (GOT₁). Le locus GOT-2 code une isoenzyme isoélectrique : la bande est au niveau du dépôt d'insertion (à l'endroit où le morceau de papier-filtre imbibé de l'homogénéat du moustique a été inséré). La lecture de cette bande et son interprétation sont délicates (il ne sont pas pris en compte dans cette étude). La même constatation a été observée pour la MDH présentant deux isoenzymes (MDH₁ et MDH₂). Seule la MDH₁ de structure monomérique chez tous les spécimens est analysée vu que la MDH₂ migre vers la cathode (-), (figure 18.B₁).

Ainsi les spécimens d'*Aedes* montrent des GOT₁ et MDH₁ monomériques mais migrent à des vitesses différentes.

L'enzyme ME est monomérique chez tous les spécimens étudiés avec des distances de migration différentes (figure 18, C₁).

L'enzyme GPI et ME montrent 2 loci apparemment monomorphes. Pour la ME, l'isoenzyme le plus lent est parfois moins intense. Cependant l'enzyme GPI montre une bande nette de faible distance de migration surmontée plus haut d'une bande de coloration plus intense (figure 18, F₁).

La structure tétramérique celle-ci est observée au niveau des enzymes (G6PD, PGM et PGD) (figures 17(E₁, G₁, H₁), la PGM un exemple d'un profil enzymatique ou on a pu observer l'hétérozygotie (figure 18, G₁).

Les profils enzymatiques pour la population de *Culex pipiens* sont proches de celle de *Ae. albopictus* pour l'ensemble des enzymes (HK₁, HK₂, HK₃, HK₄, GPI, PGD, MDH et ME).

Cependant nous avons constaté l'apparition d'un seul locus (GOT1) chez les spécimens de *Culex* contrairement à *Ae. Albopictus* qui a montré les deux locus de l'enzyme GOT.

Trois bandes ont été détectées pour PGM chez les *Culex pipiens* alors qu'on a observé la présence de 4 bandes chez *Ae. albopictus* (figure 19).

Une comparaison peut être ainsi maintenue entre les mêmes enzymes de deux régions (Oran et Birkhadem) par exemple pour l'ensemble des loci HK, la présence des cinq allèles (A, B, C, D, E) chez les populations d'Oran, mais chez la population de Birkhadem l'absence de l'allèle B s'est remarquée. Comme chez la GPI de la population de Birkhadem sauf 4 allèles (D, E, J, K) sont détectés. Cependant des points de similarité existent entre les enzymes de deux régions comme la présence d'homozygotie (MDH) (figure 18, B1) et l'hétérozygotie (PGM) (figure 18, G1).

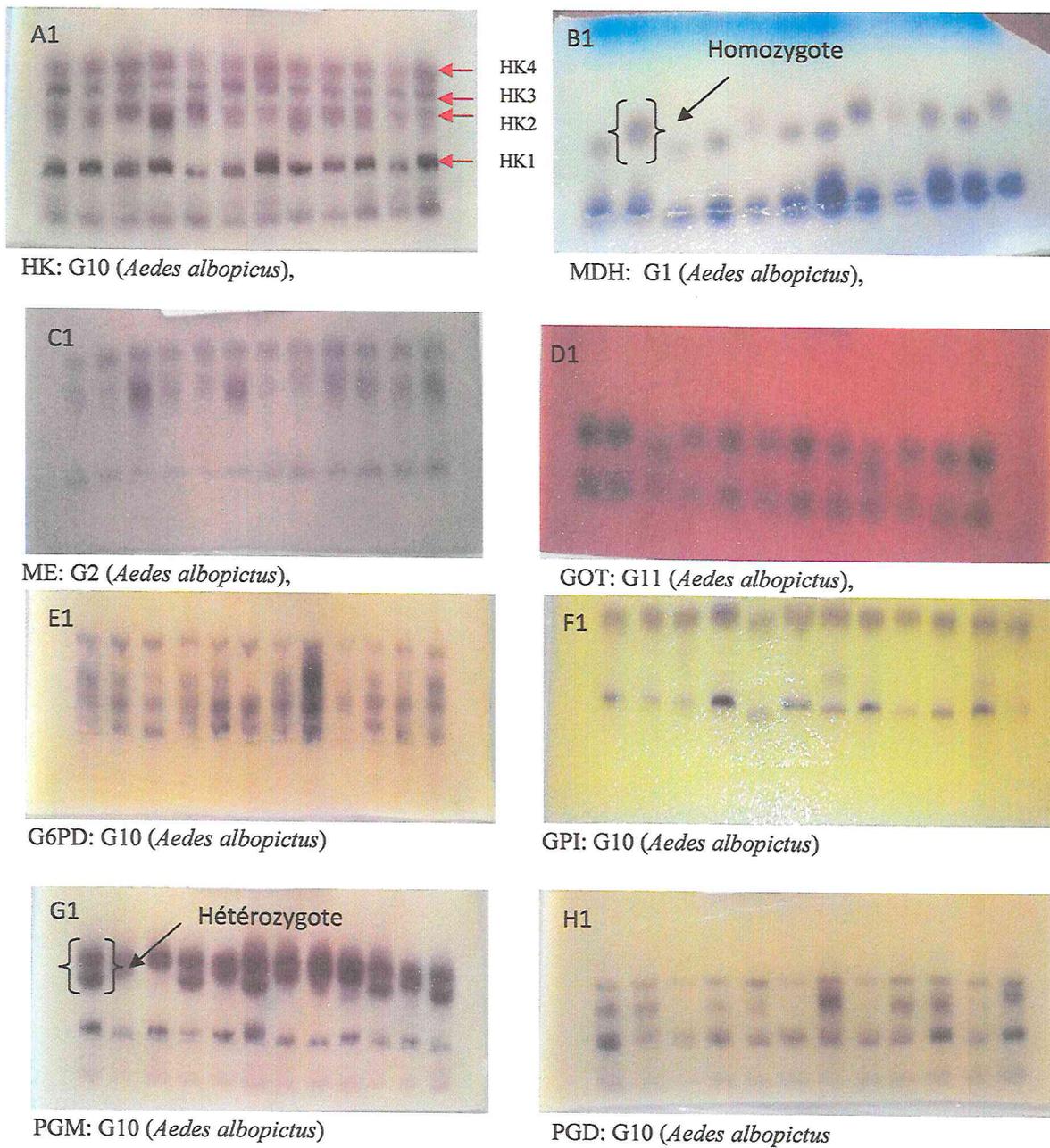
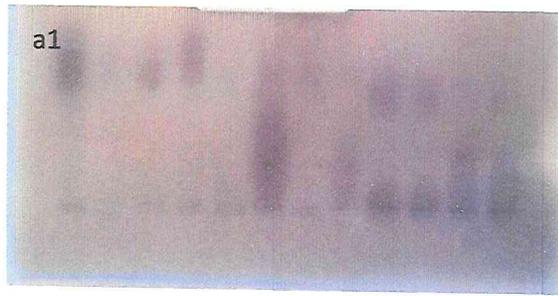
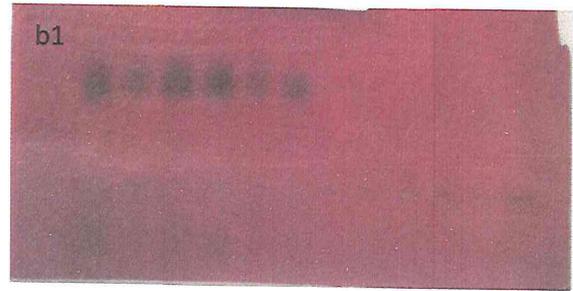


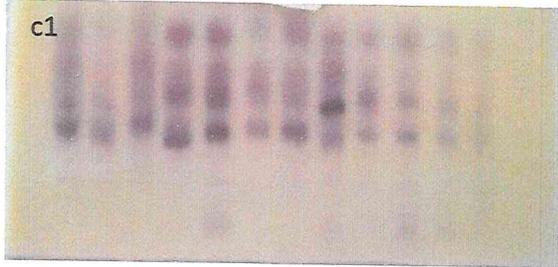
Figure 18: Profil électrophorétique des enzymes étudiés chez *Ae. Albopictus* dans deux régions (A₁: HK , B₁: MDH , C₁ : ME , D₁ : GOT, E₁ : G6PD, F₁ :GPI, G₁ : PGM , H₁ : PDG)



MDH : *Culex pipiens*,.



GOT : *Culex pipiens*,



HK : *Culex pipiens* ,



PGM : *Culex pipiens* ,



PGD : *Culex pipiens* .

Figure 19 : Profil électrophorétique des enzymes étudiées chez *Culex pipiens* (a₁ :MDH, b₁ : GOT , c₁ :HK, d₁ :PGM, e₁ PGD,f₁ : GPI)

B. Analyse de la diversité génétique

le logiciel Biosys-2 nous a permis d'analyser la diversité génétique par les différents paramètres : les fréquences alléliques, le taux de polymorphisme, l'équilibre génétique de Hardy-Weinberg, les degrés d'hétérozygotie, Les valeurs du coefficient de consanguinité, ainsi que les indices de diversité génétique de Nei (1978).

C. Les fréquences alléliques

Le test exact de Fisher a permis de vérifier l'équilibre de Hardy –Weinberg ou l'hypothèse nulle testée est l'indépendance de la distribution allélique dans chaque locus.

Le tableau V montre les fréquences alléliques pour chaque locus des populations des deux régions (Oran et Birkhadem), qui varie entre 0 et 1.ainsi l'hétérozygotie attendue H^* pour chaque générations.

Selon les résultats obtenus (tableau IV) dans les 5 générations d'Oran un équilibre de HW a été observé pour la HK_1 au niveau des générations (1,2,10 et 11) , dans la génération(3 et 11) pour le loci HK_2 , la HK_3 un équilibre est montré dans la génération (1,2 et 11) ainsi pour la GOT dans la génération 2 , mais aucun équilibre de HW dans les autres locis (HK_4 ,GPI, PGM, PGD, MDH, ME, et G_6PD) , un équilibre est remarqué dans les 4 locus de HK pour la population de Birkhadem.

Tableau V : Fréquences alléliques, taille des échantillons (N) et l'hétérozygotie moyenne (H^*) par locus des populations d'études.

population		<i>Ae. albopictus</i>					<i>Cx. pipiens</i>	
		Oran		Birkhadem			Alger	
Locus		G ₁	G ₂	G ₃	G ₁₀	G ₁₁		
HK1	(N)	1	1	20	12	9	19	4
A		1.000	1.000	0.150	1.000	1.000	0.000	0.000
B		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C		0.000	0.000	0.850	0.000	0.000	0.000	1.000
D		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
H*		0.000	0.000	0.262	0.000	0.000	0.000	0.000
HK2	(N)	24	23	15	36	24	24	3
A		0.688	0.609	0.000	0.778	0.000	0.000	0.000
B		0.042	0.261	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000
C		0.271	0.130	1.000	0.222	0.000	1.000	1.000
H*		0.462	0.557	0.000	0.351	0.000	0.000	0.000
HK3	(N)	24	24	24	36	22	1	4
A		1.000	1.000	0.542	0.667	1.000	1.000	1.000
B		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C		0.000	0.000	0.458	0.333	0.000	0.000	0.000
H*		0.000	0.000	0.507	0.451	0.000	0.000	0.000

HK4								
(N)	24	24	12	24	12	24	12	
A	0.500	0.250	0.958	0.500	0.500	0.000	0.500	
B	0.000	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
D	0.500	0.250	0.042	0.500	0.500	1.000	0.000	
E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	
H*	0.511	0.638	0.083	0.511	0.522	0.000	0.522	

GPI								
(N)	24	24	24	35	24	24	11	
A	0.062	0.042	0.000	0.386	0.292	0.188	0.000	
B	0.083	0.396	0.271	0.000	0.188	0.250	0.000	
C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
D	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.045	
E	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000	0.000	0.409	
F	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000	
G	0.000	0.000	0.208	0.171	0.333	0.000	0.000	
H	0.312	0.083	0.042	0.000	0.000	0.083	0.000	
I	0.479	0.438	0.208	0.171	0.000	0.396	0.000	
J	0.062	0.042	0.188	0.100	0.188	0.083	0.227	
K	0.000	0.000	0.000	0.171	0.000	0.000	0.318	
H*	0.672	0.655	0.816	0.764	0.749	0.747	0.710	

PGM								
(N)	23	24	24	36	20	24	12	
A	0.000	0.000	0.250	0.306	0.275	0.292	0.000	
B	0.000	0.250	0.000	0.194	0.200	0.271	0.000	
C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
D	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
F	0.000	0.000	0.000	0.167	0.000	0.000	0.333	
G	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.250	
H	0.087	0.000	0.000	0.028	0.300	0.167	0.083	
I	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
J	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.333	
K	0.717	0.417	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
L	0.174	0.083	0.250	0.139	0.000	0.000	0.000	
M	0.000	0.250	0.000	0.167	0.200	0.271	0.000	
N	0.000	0.000	0.292	0.000	0.000	0.000	0.000	
O	0.000	0.000	0.188	0.000	0.000	0.000	0.000	
P	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	
H*	0.457	0.709	0.770	0.804	0.773	0.756	0.739	

GOT								
(N)	23	24	23	36	23	23	6	
A	0.261	0.000	0.000	0.153	0.000	0.304	0.000	
B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.109	0.674	0.000	
C	0.196	1.000	1.000	0.847	0.413	0.000	0.000	
D	0.543	0.000	0.000	0.000	0.478	0.022	0.000	
E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	
H*	0.612	0.000	0.000	0.263	0.602	0.463	0.000	

G ₆ PD								
(N)	10	12	24	36	24	23	1	
A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	
B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
C	0.000	0.000	0.000	0.167	0.000	0.000	0.000	
D	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.000	
E	0.000	0.000	0.000	0.167	0.000	0.000	0.000	
F	0.500	0.500	0.500	0.167	0.500	0.000	0.000	
G	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.000	
H	0.000	0.000	0.000	0.167	0.000	0.000	0.000	
I	0.500	0.500	0.500	0.167	0.500	0.000	0.000	
J	0.000	0.000	0.000	0.125	0.000	0.000	0.000	
K	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000	0.000	

H*	0.526	0.522	0.511	0.856	0.511	0.511	0.000
PGD							
(N)	24	24	23	35	24	24	12
A	0.000	0.000	0.022	0.171	0.000	0.000	0.000
B	0.000	0.250	0.239	0.257	0.292	0.000	0.000
C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.542	0.500
D	0.500	0.000	0.239	0.000	0.208	0.000	0.000
E	0.000	0.042	0.000	0.071	0.000	0.000	0.000
F	0.000	0.083	0.000	0.014	0.000	0.458	0.000
G	0.000	0.083	0.000	0.000	0.250	0.000	0.000
H	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
I	0.000	0.000	0.261	0.000	0.000	0.000	0.000
J	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
K	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
L	0.083	0.250	0.065	0.014	0.250	0.000	0.000
M	0.000	0.000	0.174	0.314	0.000	0.000	0.000
N	0.417	0.000	0.000	0.157	0.000	0.000	0.500
O	0.000	0.188	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
P	0.000	0.104	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
H*	0.582	0.831	0.800	0.787	0.762	0.507	0.522
MDH							
(N)	23	24	23	23	24	23	9
A	0.087	0.042	0.435	0.000	0.000	0.000	0.000
B	0.130	0.458	0.043	0.000	0.083	0.000	0.000
C	0.174	0.458	0.000	0.217	0.333	0.000	0.000
D	0.087	0.042	0.130	0.174	0.167	0.000	0.333
E	0.130	0.000	0.130	0.217	0.333	0.000	0.222
F	0.000	0.000	0.174	0.130	0.083	0.522	0.444
G	0.391	0.000	0.043	0.174	0.000	0.478	0.000
H	0.000	0.000	0.043	0.043	0.000	0.000	0.000
I	0.000	0.000	0.000	0.043	0.000	0.000	0.000
H*	0.785	0.589	0.757	0.843	0.752	0.510	0.680
ME							
(N)	24	24	24	15	18	24	3
A	0.000	0.000	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000
B	0.146	0.000	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000
C	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
D	0.042	0.500	0.167	0.200	0.083	0.000	0.000
E	0.000	0.000	0.333	0.000	0.111	0.000	0.000
F	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	0.208	0.000
G	0.167	0.000	0.000	0.000	0.361	0.000	0.000
H	0.292	0.271	0.000	0.200	0.056	0.000	0.333
I	0.000	0.229	0.021	0.233	0.083	0.000	0.000
J	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.229	0.667
K	0.021	0.000	0.188	0.133	0.306	0.000	0.000
L	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.292	0.000
M	0.271	0.000	0.042	0.100	0.000	0.000	0.000
N	0.000	0.000	0.000	0.133	0.000	0.271	0.000
H*	0.805	0.637	0.806	0.848	0.768	0.762	0.533

D. Estimation de la diversité génétique intra-population

Les indices de polymorphisme (pourcentage de loci polymorphe, nombre moyen d'allèle par locus, hétérozygotie observée (H_0) et l'hétérozygotie attendue (H_e)) sont déterminés pour les populations dans les deux zones d'études (tableau VI).

L'ensemble des 11 locis analysés dans les populations d'études (*Aedes albopictus* (Oran ; 5 générations ; une population de Birkhadem et la pop externe) et la génération de *Culex pipiens*, sont polymorphes vu leur fréquence allélique qui est inférieure à 95% (tableau VI).

Le taux de polymorphisme moyen de la population d'*Ae. albopictus* de la région d'Oran (78.2%) et plus élevée vu celui de la population de Birkhadem (63.6%) et La génération 10 d'Oran montre un taux de polymorphisme le plus élevée (90.9%) contrairement à la génération 2 et 3 qui présentent un taux de polymorphisme faible (72.7%).

Pour la population de *Culex pipiens* le taux de polymorphisme est estimé à 54.5%.

L'hétérozygotie observée (H_o) et l'hétérozygotie attendue (H_e) sont caractérisées par une forte hétérozygotie malgré un faible moyen d'allèle par locus (3 allèles).

L'hétérozygotie moyenne observée chez les populations d'*Aedes albopictus* ($H_o = 0.432 \pm 0.138$) est très proche de l'hétérozygotie attendue ($H_e = 0.446 \pm 0.095$) ce qui suggère la présence d'un léger déficit en hétérozygotie traduisant ainsi un déséquilibre de HW.

Pour la population d'Oran la génération 11 est la plus d'hétérozygote ($H_o=0.556$), et la génération 1 présente le taux d'hétérozygotie le plus faible ($H_o=0.341$).annexe 4

Tableau VI: Paramètres de diversité intra-population chez les populations d'études. (Les valeurs entre parenthèse correspondent à l'erreur standard).

Population	Mean sample size per Locus	Mean no. of alleles per locus	Percentage of loci polymorphic*	Mean heterozygosity	
				Direct-count	HdyWbg expected**
1. ORAN, G1	20.4 (2.3)	3.5 (0.7)	81.8	0.341 (0.128)	0.492 (0.081)
2. ORAN, G2	20.7 (2.2)	3.1 (0.6)	72.7	0.451 (0.134)	0.467 (0.094)
3. ORAN, G3	21.5 (1.3)	3.8 (0.8)	72.7	0.393 (0.131)	0.483 (0.102)
4. Oran, G10	29.5 (2.8)	4.3 (0.7)	90.9	0.517 (0.140)	0.589 (0.088)
5. Oran, G11	20.4 (1.6)	3.1 (0.5)	72.7	0.556 (0.149)	0.494 (0.100)
Mean (Oran)	22.5 (2.0)	3.5 (0.6)	78.2	0.452 (0.136)	0.505 (0.093)
BirK, bk	21.2 (2.1)	2.4 (0.4)	63.6	0.413 (0.141)	0.387 (0.098)
Mean	21.8 (2.0)	2.95 (0.5)	70.9	0.432 (0.138)	0.446 (0.095)
Alger, Cx	7.0 (1.3)	2.0 (0.4)	54.5	0.386 (0.137)	0.337 (0.100)

E. Structuration génétique

Les valeurs du coefficient de consanguinité à l'intérieur des populations *d'Ae. Albopictus* et *culex pipiens*, (l'indice de fixation) montre une valeur de ($F_{IS} = 0.063$) qui signifie une différence très importante.

Tous les locis présentent un déficit en hétérozygotes sauf pour la (HK₃, $F_{IS}=1$) qui est en équilibre de HW et la GPD, HK₄, GPI, PGD et ME qui présente un excès d'hétérozygotes (GPD, $F_{IS} = -0.6780$, HK₄, $F_{IS} = -0.1740$, PGD, $F_{IS} = -0.4190$, GPI, $F_{IS} = -0.0306$, ME, $F_{IS} = -0.216$).

L'indice de diversité F_{ST} Wright (1978) traduit une différenciation importante entre les populations étudiées ($F_{ST}=0.3285$; ($F_{ST}>0.25$)). L'indice de diversité F_{ST} le plus élevé est observé pour les enzymes KH1, HK2 et GOT, alors que la valeur la plus faible sont observés pour la GPI (tableau VII).

Tableau VII: Estimation de la variabilité génétique intra-population (F_{IS}) et inter-population (F_{ST}) des populations d'études.

Locus	F (IS)	F (ST)	F (IT)
HK1	0.2157	0.8830	0.9083
HK2	0.4696	0.6262	0.8017
HK3	1.0000	0.2685	1.0000
HK4	-0.1740	0.3603	0.2490
GPI	-0.0306	0.1446	0.1185
PGM	0.0344	0.1943	0.2220
GOT	0.8299	0.5147	0.9175
GPD	-0.6780	0.2396	-0.2761
PGD	-0.4190	0.2304	-0.0920
MDH	0.9805	0.1958	0.9843
ME-	-0.2167	0.1827	0.0056
Mean	0.0638	0.3285	0.3714

F. Divergence génétique

Les indices de diversité génétique de Nei ont été estimés pour l'ensemble des 11 locis (tableau VII). Les valeurs des distances (D) et des identités (I) génétiques obtenues entre les populations étudiées, prises deux à deux, sont présentées dans le tableau VII.

Au niveau des générations de la population d'Oran, la génération 10 et 2 présente la plus grande similarité des 5 générations. La similarité est estimée à 0.780.

Et une identité de (0.378) est présentée entre La génération de Birkhadem et la génération 1 d'Oran. le groupe externe de *culex pipiens* marque une affinité de (0.478) avec la génération 2 d'Oran.

La distance génétique entre les populations est également calculée. La valeur la plus élevée est observée entre la population de BK d'Alger et la population d'Oran (1.226). Par contre la distance génétique la plus faible est entre. le groupe externe *culex pipiens* présente une distance de (1.440) avec la génération 11 d'Oran.

Tableau VIII : Matrice des distances D (haut) et des identités I (bas) génétiques non biaisées de Nei (1978) entre les différentes populations estimées sur la base de 11 locis.

Population	G1	G2	G3	G10	G11	bk	Cx
1 ORAN, G1	*****	0.294	0.775	0.338	0.385	0.973	1.209
2 ORAN, G2	0.745	*****	0.651	0.249	0.344	1.226	1.564
3 ORAN, G3	0.461	0.521	*****	0.569	0.749	1.162	0.738
4 Oran, G10	0.713	0.780	0.566	*****	0.392	1.031	1.289
5 Oran, G11	0.680	0.709	0.473	0.675	*****	1.128	1.440
6 BirK, bk	0.378	0.293	0.313	0.357	0.324	*****	0.959
7 Alger, Cx	0.298	0.209	0.478	0.276	0.237	0.383	*****

G. Arbre phylogénétique

A partir des indices de distance et de similarité, deux arbres phylogénétique ont étaient construis (figure 19 et 20).

la figure 19, montre l'arbre phylogénétique selon les distances génétiques entre les populations. 4 grands clusters sont observés. La population de Birkhadem et *Culex pipiens* se distingue de l'ensemble des 5 générations d'Oran. La G3 est la génération la plus variable de la population d'Oran. Cependant, elle reste apparentée avec les autres générations de la même région. ils ont entre eux une distance de (0.52). La génération 11 forme un cluster avec les générations 1,2 et 10 d'une distance de (0.42). La génération 10 clustérise avec la génération 2 et forme une distance de (0.35). Une distance de (0.39) entre la première génération et le cluster de la génération (2 et 10).

L'arbre phylogénétique construit à partir des indices de similarités montre aussi que la population de Birkhadem et *Culex pipiens* ne clustérisent pas avec les 5 générations d'Oran.

la génération 3 présente une similarité de 52% avec le cluster formé par les générations (1, 2,10 et 11) forme un quatrième cluster avec Les 2 cluster de la générations (11et 1 ; 2 et10).

D'autre part la génération 11 forme un cluster d'une similarité de 42% avec les cluster de la génération (1, 2 et 10) , se cluster apparenté avec le cluster formé par la génération 10 et 2 et 1d'une similarité de 0.39%.

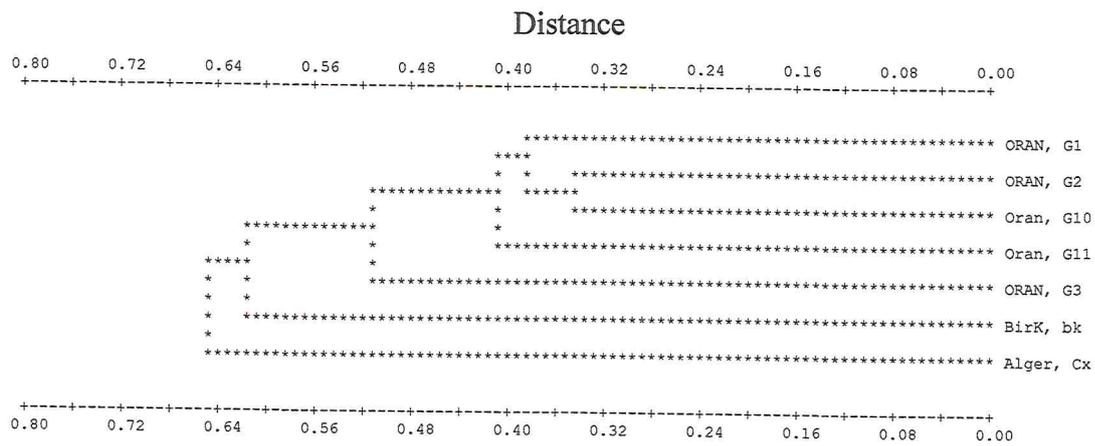


Figure20 : Dendrogramme élaboré à partir des distances génétiques

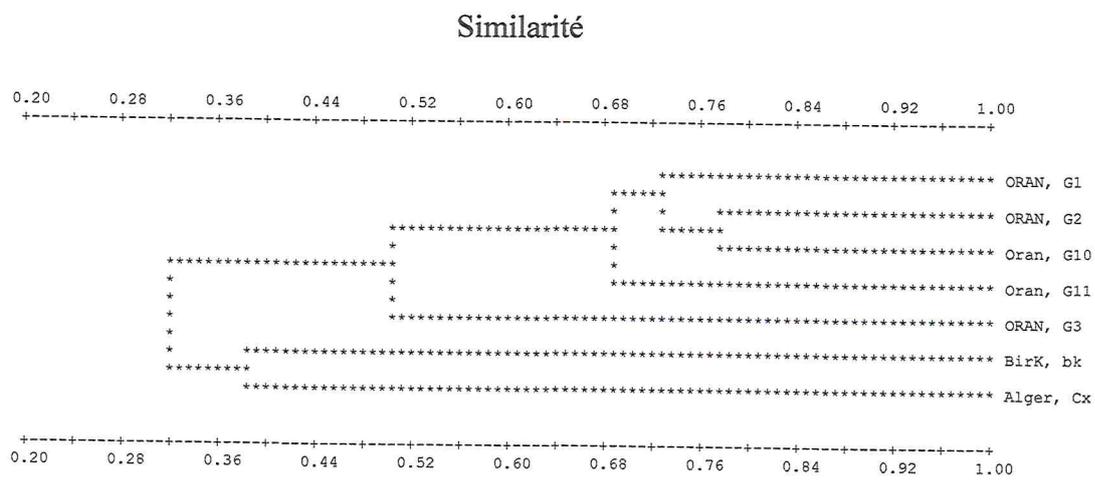


Figure21 : Dendrogramme élaboré à partir des similarités génétiques

Discussion

IV. Discussion

Nos résultats ont permis de vérifier le polymorphisme génétique de 10 locis sur 19 étudiés. L'enzyme HK a montré des fluctuations dans le polymorphisme des 4 locis (voir tableau fréquence allélique). HK₁ est polymorphe dans une seule génération (G3 D'Oran) ; HK₃ est polymorphe dans 2 générations (G3 et G10 d'Oran) ; HK₂ est polymorphe dans 3 générations (G1, G2 et G11 d'Oran) et HK₄ est polymorphe dans les 5 générations d'Oran. Dans la population d'*Aedes* de la région de Birkhadem, cette enzyme est monomorphe. Urbanelli et al. (2000) ont signalé que seule le locus HK₁ est polymorphe chez les populations d'*Aedes albopictus*, alors que Paupy. (2000) trouve que le locus HK₂ est plus polymorphe chez les populations d'*Aedes Aegypti*. Failloux en 2002 a constaté que les enzymes HK₁, HK₂ et HK₃ sont monomorphes pour les mêmes allèles.

Le locus qui gouverne l'activité de la Glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) est dimérique. Les profils obtenus pour la GOT montrent deux zones d'activité représentée chacune par une seule bande occupant deux niveaux de migration. La plus anodique est relativement commune aux différents spécimens d'*Aedes*; la seconde de mobilité plus faible, n'est pas prise en considération dans cette étude. Nos résultats concordent avec ce qui a été signalés par Pasteur et al. (1977). Dans son étude il a remarqué aussi que la GOT₂ migre très peu vers la partie anodique du gel, les bandes électrophorétiques s'avèrent très difficiles à distinguer et le PH de migration est à 7.4. L'utilisation d'un PH plus faible (PH 6) a permis à Brutus et al. (1994) de visualiser au moins 3 allèles codominant pour ce locus. On peut en déduire que le point isoélectrique de la GOT₂ se situe entre 6 et 7,4. La présence de 2 locis codant la GOT semble une caractéristique des espèces d'*Aedes* étant donnée que les spécimens de *Culex* ne présentent pas la GOT₂. Nos résultats sont conformes à la plus part des travaux (Paupy 2000), mais différent de ceux décrits chez les espèces d'*Ae. aegypti* où la GOT est contrôlée par un locus polymorphe (Magda *et al.*, 2006). Selon ces résultats, la GOT est une enzyme particulièrement intéressante qui peut être utilisée comme marqueurs biochimique d'identification et qui nécessite des études plus approfondies.

Comme pour la GOT, le locus de MDH est dimérique et contrôlée par deux locis MDH₁ et MDH₂. MDH₁ est généralement polyalléliques (tableau fréquence allélique). La MDH peut aussi être un bon marqueur enzymatique d'identification d'espèce.

ME et GPI sont des enzymes monomériques chez tous les spécimens étudiés avec des distances de migrations différentes (figure 18, H₁) montrant 2 locis apparemment monomorphes. Pour la ME, l'isoenzyme le plus lent est parfois moins intense. Cependant L'enzyme GPI montre une bande nette de faible distance de migration surmontée plus haut, d'une bande de coloration plus intense (figure 18, F₁). Concernant la structure tétramérique. Celle-ci est observée au niveau des enzymes G6PD, PGD, et PGM. Pour ce dernier nos résultats ont permis de visualiser l'aspect de l'hétérozygotie chez les populations étudiés. Des études antérieures ont constatés que ses enzymes sont très polymorphes chez les populations d'*Ae. Albopictus* et *Ae. aegypti* (Magda 2006, Urbanelli 2000) ce qui concorde avec nos résultats. Ces enzymes ont eu un profil d'une à quatre bandes. Thierry (2012), rapporte qu'une enzyme dont la structure est tétramérique présente quatre à cinq bandes.

Ainsi le taux moyen de polymorphisme de l'espèce étudiée dans les deux zones d'études est élevé (71%). La population d'*Ae. albopictus* de la région d'Oran montre un taux de polymorphisme moyen plus élevé (0.78) que la population d'*Ae. Albopictus* de BK (0.63). Les taux de polymorphisme des locus analysés de la pop d'Oran ne sont pas très différents d'une génération à l'autre. Ils varient de 0.72 (G2, G3 et G11) et 0.91 (G10). Un taux moyen de polymorphisme égal à 0.73 a été également estimé par Urbanelli (2000) chez les populations d'*Aedes* en provenance de l'Indonésie. Par contre des taux plus faible ont été signalés dans la même étude chez la même espèce dans d'autres pays : USA (0.43) ; Italie (0.51) et Japan (0.58).

A travers notre étude, nous avons détecté aussi que le nombre moyen d'allèle par locus est de 2.9. Le nombre moyen d'allèles par locus est relativement élevé chez les populations d'*Ae. Albopictus* d'Oran (3.5) par rapport à la population d'*Ae. Albopictus* de BK (2.4). Le nombre d'allèles le plus élevé caractérise la G₁₀ (4.3± 0.7). Urbanelli. (2000) a constaté aussi que le nombre moyen d'allèle par locus est plus faible dans les populations d'*Aedes* de l'Italie, les Etats unis et le Japan (1.8), alors qu'il est plus élevé dans la population d'*Aedes albopictus* de l'Indonésie (2.2). Les études de Kambhampati. (1991) sur *Aedes* ont montré aussi une concordance avec nos résultats. Il a trouvé que le nombre moyen d'allèle par locus calculé varie entre 1.8±0.3 et 3.0±0.3. Une moyenne allélique très élevée a été aussi observé dans une étude de la structure génétique d'*Aedes albopictus* réalisé par Basile *et al.*, 2011.

L'hétérozygotie moyenne observée chez *Ae. albopictus* de la région d'Oran (H_0 : 0.453) est légèrement inférieur de l'hétérozygotie moyenne attendue (H_e : 0.505), alors que l'hétérozygotie observée chez *Ae. albopictus* de la région de BK (H_0 : 0.413) est légèrement plus élevée de l'hétérozygotie attendue (H_e : 0.387). Ainsi la valeur de l'hétérozygotie moyenne observée par population ($H_0 = 0.432$) est très proche de l'hétérozygotie moyenne attendue dans les conditions de Hardy-Weinberg ($H_e = 0.44$). Cette légère différence est peut être dû à une déficience de l'hétérozygotie au niveau de certains allèles au niveau des 11 locis étudiés ($P < 0.05$) ou par la présence des allèles nuls. L'équilibre de HW c'est-à-dire la reproduction panmixtique a été constaté seulement au niveau des locis HK₁ (G3) ; HK₂, HK₄ (G2, G3) ; GPI (G10, GBK, GCX) ; PGM (G2, G11, GBK, GCX) ; PGD (G2) et ME (G1, G10, G11, GBK).

Ces taux d'hétérozygotie observés chez les populations d'*Aedes* se révèlent, plus élevés en comparaison avec les valeurs trouvées dans d'autres régions du monde. Urbanelli, 2000 signale à travers son étude que le taux d'hétérozygotie varie entre 0.14 (USA) à 0.18 (Japan et Italie). Cependant des valeurs légèrement supérieures ont été trouvées dans la région de l'Indonésie ($H_0=0.245$) dans la même étude.

A travers notre étude la valeur du coefficient de consanguinité des spécimens de l'ensemble des populations est relativement élevé ($F_{it} = 0.371$), alors que la valeur moyenne du coefficient de consanguinité des spécimens étudiés à l'intérieur des populations est plutôt faible ($F_{IS} = 0.06$) ce qui traduit une déviation des fréquences génotypiques observées dans les conditions de Hardy-Weinberg. Dans l'ensemble, l'hétérozygotie excédentaire a été

observé beaucoup plus au niveau de 4 locis : HK3 (Fis=1), MDH (Fis=+0.98), GOT (fis=+0.83) et KH2 (Fis=+0.46).

La divergence génétique entre les populations (inter-population) a été évaluée par l'indice de fixation standardisé total (F_{st}). Elle est en moyenne de 0.328. Ce qui signifie qu'il existe une très grande différenciation génétique entre les différentes populations d'*Aedes* étudiées. Les plus grandes valeurs de F_{st} ont été trouvées au niveau des locus HK₁ (0.88), HK₂ (0.62), GOT (0.51), HK₄ (0.36) et HK₃ (0.26). Les 6 autres locis présentaient de valeurs légèrement faibles F_{st} ($0.14 < F_{st} < 0.23$). L'intérêt de l'étude de l'enzyme KH a bien été déterminé par plusieurs auteurs. Tabanick en 1978 a étudié l'impact des programmes de lutte antivectorielle à Bangkok sur la structure génétique de *Aedes aegypti* au cours des différents stades de développement. L'étude de la variabilité génétique de l'enzyme HK a montré la présence des 4 locis et que le locus HK₁ est beaucoup moins actif que les autres loci. L'analyse électrophorétique de différents stades de développement a montré que HK₃ est le seul locus d'hexokinase actif à tous les stades du cycle de vie (Tabanick, 1978).

Dans notre étude, les valeurs de F_{ST} se révèlent plus élevées en comparaison avec les valeurs trouvées dans d'autres études chez la même espèce. Kambhampati *et al.* (1991), en analysant 8 loci enzymatiques ont estimé une hétérozygotie observée qui varie de 0.162 et 0.35 chez les populations d'*Aedes* capturés à proximité les uns des autres et celles des populations séparées par de grandes distances. Ils ont montré aussi que les populations étaient génétiquement différenciées les unes des autres à l'intérieur et entre populations. Ces différences pourraient être causées par des phénomènes génétiques de dérive et / ou de consanguinité, probablement associés à des différences dans la taille de la population (Falconer, 1981).

Les études de la diversité génétique sur les populations d'*Aedes aegypti* ont montré des valeurs F_{ST} encore plus faibles. Elles varient entre 0.099 (Tahiti) à 0.067 (Mooréa) (Paupy *et al.*, 2000) et entre 0.020 (Rio de Janeiro) et 0.059 (Magda *et al.*, 2006). L'influence de la densité de la population humaine sur la différenciation génétique d'*Aedes aegypti* dans l'île de Tahiti (Polynésie française) était étudiée (Failloux, 1991). Des valeurs élevées de F_{ST} ont été estimées (+0.118). Dans cette étude les auteurs ont montré une différenciation importante entre les moustiques issus du centre ville alors que ceux de la banlieue sont plus homogènes. Ils ont déduit que les traitements insecticides, dirigés contre les adultes, effectués lors des périodes épidémiques (saison des pluies) réduisent les densités de moustiques ainsi que leur dispersion et, par voie de conséquence, amplifient la différenciation génétique.

La population analysée d'*Aedes albopictus* d'Oran se différencie des *Aedes* de la région de Birkhadem, non seulement par la présence d'allèles spécifiques, mais aussi par des distances génétiques très élevées. L'indice de similarité est de l'ordre de 31%, ce qui suppose que se sont 2 populations issues de zones différentes.

Au sein de la population d'Oran (de l'élevage), une divergence de la G3 de celle de la première génération a été remarquée ($D=0.775$, $I=50\%$). Par ailleurs nous avons constaté que

la G10 et G1 sont génétiquement les plus proches ($D=0.249$, $I=78\%$). Les indices de similarité d'une génération à l'autre varient entre 52.1% et 74.5%. Des études plus approfondie portant sur les marqueurs moléculaires peuvent aider dans la compréhension de cette divergence. Ces techniques ont été utilisées pour estimer les variations génétiques en se basant sur le principe de l'amplification génique par PCR. Parmi elles, quatre techniques sont amplement utilisées dans l'étude de la structure génétique: les microsatellites (Daibin *et al.*.,2013, Basile *et al.*.,2011 et Nurul adilah *et al.*,2016), les RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et les régions ITS (Internal Transcribed Spacer).

Conclusion

V. Conclusion

La dengue et la chikunguniya .maladies potentiellement grave, connu par leur grandes impacte sur la santé public vu leur morbidité et leur expansion dans le monde entier du a l'expansion rapide de leur vecteur ;«*Aedes albopictus* » . Moustique tigre, est un vecteur efficace dans la transmission des arbovirus de ces maladies et plus de 24 autres.

L'*Aedes albopictus* une espèce parmi les 100 espèces les plus envahissante au monde a cause de déplacement passifs et le commerce international, mais aussi grâce a sa biologie et sa plasticité qui lui permis de coloniser des milieux très différentes de son milieu original .

Le moustique tigre est aujourd'hui un modèle biologique suscitant l'intérêt d'un grand Nombre de chercheurs dans des disciplines aussi variées que l'épidémiologie, l'écologie, la génomique ou encore l'évolution des interactions symbiotiques.

L'intérêt de notre travail est d'évaluer la diversité génétique de l'insecte *Aedes albopictus* en Algérie par l'utilisation de l'approche biochimique « **électrophorèse des isoenzymes sur gel épais d'amidon** ». Il s'agit d'une première approche qui peut contribuer dans la distribution des arbovirus a travers la répartition géographique des populations d'*Ae. Albopictus*.

Les marqueurs iso-enzymatique sont assez simple et pragmatique et moins chères a metre en travail. sur 16 systèmes enzymatiques (HK , GPI, PGM ,PGD, G6PD, COT₁, COT₂, MDH, ME, FH, MPI, NP₁, NP₂, GLUD et DIA) ,8 systèmes ont étaient sélectionnés. Il s'agit de : MDH, ME, GPI, PGM , HK ,PGD, G6PD et GOT .

Sur le plan intra-population, la valeur du coefficient de consanguinité des spécimens de l'ensemble des populations est relativement élevé ($F_{it}=0.371$), alors que la valeur moyenne du coefficient de consanguinité des spécimens étudié a l'intérieur des populations est plutôt faible ($F_{is}=0.06$) ce qui traduit une déviation des fréquences génotypiques observées dans les conditions de Hardy-Weinberg. Dans l'ensemble l'hétérozygotie excédentaire a était observé beaucoup plus au niveau de 4locis :HK₃, HK₂, MDH et GOT

Sur le plan inter-population, cette étude a révélé une très grande différenciation génétique entre les différentes populations d'*Ae. Albopictus*. la valeur de l'indice de fixation standardisé total est élevé ($F_{st}=32.8\%$).les plus grands valeur de F_{st} ont étaient trouvées au niveau des locus HK₁, HK₂,HK₃ ,HK₄ et GOT.

Ces résultats préliminaires, ouvrent la voie vers d'autres études plus approfondie faisant appel aux approches moléculaires qui peuvent non seulement étudier la diversité génétique de l'insecte au stade adulte, mais aussi différents stades de développement de cette espèce.

Les variations génétiques et les flux géniques entre populations reflètent les discontinuités rencontrées dans les habitats naturels des populations d'insectes .les variation temporelles de la disponibilité des ressources de l'habitat peuvent également affecter la structure des populations. Les flux de gènes renseignent sur les capacité de dispersion du vecteur (distance, direction et taux) qui sont un élément clé a considérer dans une campagne de lutte anti-vectorielle.

Il est par conséquent hasardeux de généraliser des données de la biologie d'*Ae. Albopictus* obtenues localement à l'ensemble des populations présentes dans l'aire de répartition géographique de l'espèce. c'est pourquoi des collaborations étroites avec autorités algériennes de la santé doivent être mises en place pour déterminer la distribution de l'*Ae. Albopictus*, afin d'évaluer le risque et planifie des mesures de surveillance efficace pour contrôler cette espèce dans le cadre de la lutte anti-vectorielle.

Références
Bibliographiques

Référence Bibliographique

- Ahmed Tabbabi(2017)Recent Expansion of *Aedes albopictus* and Factors Influencing its Beginning Invasion in North Africa: A Review. *The Journal of Middle East and North Africa Sciences*; 3 (6).
- Ali.S. R., and Rozeboom. L.E.(1973)*Comparative laboratory observations on selective mating of Aedes (Stegomyia) albopictus Skuse and A. (S.) polynesiensis Marks*. *Mosquito News*, 33 (1):23–28.
- Amraoui.F.,(2012).le moustique culex pipiens vecteur potentiel des virus West Nile et fièvre de la vallée du Maghreb, virologie –entomologie. Rabat. Faculté des science.119p.
- Anonyme.(2017) . Localisation de la région de barkhane et la region d’Oran <https://www.google.com/maps/place/Birkhadem>
- Anonyme(2017).<http://www.todayonline.com/singapore/more-seeking-pest-control-services-amid-dengue-epidemic>
- Anonyme(2017).<http://previews.agefotostock.com/previewimage/bajaage/f84a71213eabff01c61d2ce0948176f5/195-637171.jpg>.
- Anonyme (2016): [//www.ac-reunion.fr/hygieneetsecurite/chik/pdf/bio-mous.pdf](http://www.ac-reunion.fr/hygieneetsecurite/chik/pdf/bio-mous.pdf)
- Anonyme(2014).Museum de Zoologie. *Animal Diversity Web* [en ligne]. Disponible à l’adresse :http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Aedes_albopictus/
- Anonyme.<http://biochimej.univangers.fr/Page2/COURS/Zsuite/6BiochMetabSUITE/1PentosePhosphate/1PentoePhosphate.htm> .
- BÄCK.,Anne Tuiskunen et LUNDKVIST, Ake. Dengue viruses - an overview. *Infection Ecology &Epidemiology*. 2013. Vol. 3.
- Benallal K, Allal-Ikhlef K, Benhamouda F.,Schaffner Z., Harrat.(2016). First report of *Aedes (Stegomyia) albopictus*(Diptera: Culicidae) in Oran, West of Algeria.*Acta Tropica*. 09.027
- Bennouna.A, T.Balenchien, H.El rhaffouli,F.Schaffner ,c.Garros,L.Gardes.Y.Lhor,S.Hammoumi,G.Chlyeh and O.Fassi Fihri.(2016). The Royal Entomological Society, *Medical and Veterinary Entomology*, doi: 10.1111/mve.12194.
- Benedict .M.,Levine.R.,Hawley. W.,louibos.L.P.(2007).spread of the tigre ,Global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus* .vector borne zoonotic Dis 7(1):76-85.

- Bonizzoni, M., Gasperi, G., Chen, X., James, A.A., 2013. The invasive mosquito species *Aedes albopictus* : current knowledge and future perspectives. Trends. Parasitol. 29(9), 460–7.
- Boulanger.P., polonovsky, J., Ayeau, f, mandel, p& Biserte,G.(1973).biochimie Médicale : enzyme et métabolisme, 2EME 2DITION .ISBN : 2-225-37345-0
- Boyer, S., Gilles, J., Merancienne, D., Lemperiere, G., and Fontenille, D. *Sexual performance of male mosquito Aedes albopictus*. Medical and veterinary entomology, 25(4):454–9,December 2011. doi: 10.1111/j.1365-2915.2011.00962.x.
- Carabali.M., Milena Hernandez.L., Arauz.Mj., Villar .L.A., Ridde.V., (2015). Why are people with dengue dying? A scoping review of determinants for dengue mortality. Carabali et al. BMC Infectious Diseases.. 15:301
- COSTANZO KS, MUTURI ES.LAMPMAN RLALTO BW (2011). The effects of resource type and ratio en competition with *Aedes albopictus* and *culex pipiens* (Diptera : culicidae).J Med entomol 48(1):29-38
- David,T, plummer.(1989).introduction au technique de biochimie .3éme edition.ISBN:2-7042-1202-3
- Didier F., Christophe P., A- Failloux) du livre : Duvallet G., Fontenille D., Robert V., eds, 2017. Entomologie médicale et vétérinaire. Marseille-Versailles, IRD Editions-Quae, 650 pp.
- Didier Gauthier(2009) Protein electrophoresis - serum ;applications cliniques de l'électrophorèse des protéines sériques.
- Delatte .H.,Paupy.C.,Dehecq.J .S.Thiria.,Failloux,A.B.,Fontenille.(2008).Aedes albopictus,vecteur des virus du Chikunguniya et de la dengue a la réunion :biologie et contrôle,parasite,15.3-13.
- EID ATLANTIQUE 2017.disponible en ligne: <https://www.eidatlantique.eu/page.php?P=144>
- ELODIE.D.(2012). Aedes albopictus reprente t- un risque pour les animaux domestiques ou sauvages en France ?.P.97
- ERITJA R. *Global Invasive Species Database* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?fr=1&si=109> Consulté le 21/08/2014
- Estrada-Franco, J. G. and Graig, G. B. (1995).*Biology, disease relationships, and control of Aedes albopictus*. Pan American Health Organization.
- Fauna europaea mise a jour de juillet 2012 Accueil fauna europaea,<http://www.faenaeur.org/>

- Failloux.A.B.,Bouttour. A., Faraj.C., Cunay.F.,Haddad .,Harrat.Z.,Jancheska.E.,Kanani.K., Kenawy.M. A.,Kota.M .,Pajovic.I.,Paronyan.L., Petric.D., Sarih .M .,Sawalha.S.,Shaibi. T.,Sherifi. K., Sulexo.T.,Velo.E., Gaayeb.L ., Vietoir.K.,Robert.V.(2017). Surveillance of Arthropod-Borne Viruses and Their Vectors in the Mediterranean and Black Sea Regions Within the MediLabSecure Network. *Curr Trop Med Rep.* 4:27–39
- Failloux .A.B.,fouque.F.,Vazeille.m.,Rodhain.F .(2002).Isoenzyme differentiation og *Aedes albopictus* population in french Guiana.medical and veterinary entomology.16.456-460.
- Failloux.A.B.,Vazeille-Falcoz.,Mousson.L.,Rodhain.F.(1999).la compétence vectorielle des moustiques du genre *Aedes*:journée de génétique et maladie infectieuse dans l’environnement tropical.institut pasteur a paris ,13 octobre.
- GAUMONT (R)-1985.Déptères ,IN: Encyclopeadia universalis.corpus9.261-268
- GAUMONT (R)-1985.insectes IN: Encyclopeadia universalis.corpus9.1195-1210
- Gennady P.Manchenko (2003).Handbook of detection of enzymes on Electrophoritic gels.Second edition .institut of marine biology , Russain Academy of Science ;Vladivostok,Russia.553p.
- Goff.G., Boussès.P., Julienne.S., Brengues.C., Rahola.N., Rocamora G., and Vincent Robert1 (2012). The mosquitoes (Diptera: Culidae) of Seychelles:taxonomy, ecology, vectorial importance, and identification keys. *Parasites & Vectors.* 5:207
- Grard.G., Caron.M., Manfred.Mombo.I., Dieudonne.N., Mboui.Ondo .S.,Jiolle.D., Fontenille.D., Paupy.C., Leroy. E.M.(2014). PLOS Neglected Tropical Diseases. 8 ,2 , e2681
- Goubert,C.G Minard, C Vieira1 and M Boulesteix.(2016). Population genetics of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*, an invasive vector of human diseases. *Population genetics of Aedes albopictus.* 117, 125–134
- GUBLER DJ (1971).studies on coparative ovipostion behavior of *Aedes* (stegomyia) *albopictus* and *Aedes* (stegomyia) *polynesiensis* Marks.*J Med Entomol* 8(6):675-68
- HAWLEY WA (1988). The biology of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc Suppl* 1: 1-39
- Izri.A.,I.Bitam and R., N., Charrel.(2011). First entomological documentation of *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* (Skuse, 1894) in Algeria. *Clinical Microbiology and Infection.*17,7
- Kambhampati., William.C.,Black .I.,Karamjit.S., Rai.(1991).geographic origine of the US and Brazilian *Aedes albopictus* inferred from alloenzyme analysis variation in *Aedes albopictus* .67.85-94.

- Kamgang. B., Brengues. C., Fontenille.D., Njiokou .F., Simard.F., Paupy.C. .(2011). Genetic Structure of the Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Cameroon (Central Africa). *Population Genetic of Aedes albopictus in Cameroon*. 6, 5, e20257.
- LACHMAJER JHIEN DS (1975).effect of the environmental conitions on eggs and water living stages of *Aedes aegypti* (linn). And *Aedes albopictus* (skuse), vector of dengue ,haemorrhagic fever in VIET-NAM.*Bull inst marit trop Med Gdynia* .26(3-4) :353-367
- Legros, Vincent. *Etude dynamique et protéomique de l'interaction entre Aedes albopictus et les virus émergents de la dengue et du chikungunya*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2014, 133 p.
- Leopoldo G. Gebhard, Claudia V. Filomatori and Andrea V. Gamarnik.(2011).Functional RNA Elements in the Dengue Virus Genome. *Viruses*. 3, 1739-1756
- Louisot,P,(1983).biochimie générale et médical :structure métabolique et sémiologique ISBN :285334-216-6
- Markert C.,Moller L.F.(1959). Multiple formes of enzymes : tissus, ontogenetic,and species specific patterns. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the USA*.45, 753-763.
- Michel TIBAYRENC.(1979).les isoenzymes et l'entomologie médicale.*Entomogiste médical ORSTOM*.249-256
- Mutebi, J.-P., Black, W. C., Bosio, C. F., Sweeney, W. P., and Craig, G. B. *Linkage*.(1997). *Map for the Asian Tiger Mosquito [Aedes (Stegomyia) albopictus] Based on SSCP Analysis of RAPD Markers*. *Journal of Heredity*, 88(6):489–494, doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a023142.
- Magda,C., Oliveira,R Anna-Bella Failloux.(2006). Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro, *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 101(8): 917-921.
- Mery .A.,Trouillet.J.,Vattier Bernard G.PASTEUR (1982).polymorphisme enzymatique et differenciation génétique chez quatre espèces du genre sergentomiya de la république du congo.*biochem.syst.Ecol*,10,83-90.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 83:583-590.
- NUR AIDA H, ABU HASSAN ANURITA AT (2008). Population analysis of *Aedes albopictus* (Skuse) (*Diptera:Culicidae*) under uncontrolled laboratory conditions. *Trop Biomed* 25(2): 117-125

- Oliva, Clelia F., DAMIENS, David, VREYSEN, Marc J. B., LEMPERIÈRE, Guy et GILLES, Jérémie. Reproductive strategies of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and implications for the sterile insect technique. *PloS One*... 8, 11, e78884.
- Pasteur N., Bonhome F., catalan J., Britton Davidation J. (1987). manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines.
- Patterson J., Sammon M., Garg M. (2016). Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *Western Journal of Emergency Medicine*. XVII, 6
- Paupy C, H. Delatte, L. Bagny, V. Corbel, D. Fontenille. (2009). *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes and Infection*. 11 1177e1185.
- Paupy C., VazEeille-falcoz M., Mousson L., Rodhain F., Failloux A-B. (2000). *Aedes albopictus* in tahiti and moorea (French polynesia): isoenzyme differentiation in the mosquito population according to human population. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 62(2), 2000, pp. 217–224.
- Pesson B., Ready J.S., Benabdenbi I., Martin-Sanchez J., Esseghir S., Cadi Soussi M., Floer M.T., kristensen A.R. (1991). Isoenzymatic studies of Mediterranean population of sandflies of the *phlebotomus perniciosus* complex . mitochondrial introgression and a New sibling species of *P. longicuspis* in moroccan Rif . *Med .vet .entomol* 18, 25-35.
- Pratlong F., Lefebvre M., Lami P. (1997). cryoconservation , preparation des extraits protéiques, identification enzymatique et ses application. p326.
- Rai, K. S., and Black, W. C. (1999) *Mosquito genomes: structure, organization, and evolution*. *Advances in genetics*, 41:1–33,.
- Rioux J.A., Lanotte G., Serres E. (1990). Taxonomy of leishmania. Usa of isoenzymes suggestions for a new classification . *Ann. Parasitol . Hum .Comp*. 65, 111-125.
- Rogers, J. S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genetics, Univ. Texas Publ.* 7213:145-153.
- Raymond M & ROUSSET F. (1995). genpop version 1.2: population genetic software for exact test ecumenicism. *J. Hered.* 86.248-249
- Robert DJ (1971). studies on the comparative oviposition behavior of *Aedes albopictus* from texas to commonly used adulticide *J Am Mosq control assoc* 5(2): 251-253.
- Rodhain F (1993). *Aedes albopictus* in Europe a real threat . *bull soc pathol EXOT* 86(1):3
- Reproductive strategies of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and implications for the sterile insect technique. *PloS One*. 2013. Vol. 8, n° 11, pp. e78884.

- Roth(M).1974 ordre des Diptères In :initiation a la morphologie ,la systématique et la biologie des insecte,éd.par ROTH.(M).ORSTOM. paris.1980.125-139
- serge ,J & lucotte ,G. (1981).la pratique de l'électrophorésés appliquée a la detection des polymorphisme humaine.ISBN 2-225-69-542-3
- Schaffner.S., J. M. Medlock and W. Van Bortel.(2013).The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives.Trends in Parasitology.29,9
- Scott Justis.vhttp(2010).://bugguide.net/node/view/445573/bgpape.
- Sinch., Sunit .K et UNNI., S.K. Chikungunya virus: host pathogen interaction. *Reviews in Medical Virology*. mars 2011. Vol. 21, n° 2, pp. 78- 88. Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy. W. H.Freeman, San Francisco.
- Swofford, D. L. 1981 On the utility of the distance Wagner procedure. In V. A. Funk and D. R. Brooks (eds.), *Advances in Cladistics: Proceedings of the First Meeting of the Willie Hennig Society*, pp.xxx-xxx. New York Botanical Garden, Bronx, New York.
- Thierry De Meeûs. Initiation à la génétique des populations naturelles, INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT,2012,p338.
- Tibayrenc.M.(1979).les isoenzymes et l'entomologie médicale.cah.O.R.S.T.O.M ,sér,Ent méd et parasitol.XVII.4.249-256.
- Urbanelli.S., Bellinia. R.,Carrieria. M.,Sallicandro.P.,CELLI.G. (2000). Population structure of *Aedes albopictus*. (Skuse): the mosquito which is colonizing Mediterranean countries. *The Genetical Society of Great Britain, Heredity*, 84, 331±337.
- Vacus.G. *Expansion géographique d'Aedes albopictus : Quel risque de maladies émergentes en France métropolitaine* [en ligne]. Disponible à l'adresse :http://www.inma.fr/files/file/diplome/dip_mem/dip_mem_2012_26_vacus.pdf
- Vermillard.G.le chikungunya :un virus ,une maladie-A propos de l'épidimie 2005-2006 A l'île de la reunion .pharmacie .université HANRI POINCARE _NANCY I.164 P
- Vernon J. Lee*, Angela Chow¹, Xiaohui Zheng, Luis R. Carrasco^{3,4}, Alex R. Cook^{2,3,5}, David C. Lye, Lee-Ching Ng⁷, Yee-Sin Leo⁶.(2012). Simple Clinical and Laboratory Predictors of Chikungunya versus Dengue Infections in Adults. *Predictors of Chikungunya versus Dengue*. 6.9 e1786
- VIRALZONE. *Alphavirus* [en ligne]. Disponible à l'adresse :http://viralzone.expasy.org/all_by_species/625.html

- 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.
- Weir, B. S. and C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38:1358-1370.
- Walter J Tabachnick.(1978)identification, and linkage relationships of three hexokinase genes in Aedes albopictus. biochemical genetics.16,516.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution 19:395-420.
- Wright S.(1969).Evolution and the genetics of population , vol 2.the theory of gene frequencies.University of Chicago press,Chicago.
- Wright S.(1978). Evolution and the genetics of population,vol 4.variability within and among natural population . University of Chicago press,Chicago.
- Yiji. L., Fatmata. K., Guofa. Z., Santhosh. P., Chunyuan. L., Yanxia. L.Yanhe .Z., Lijie. Y., Guiyun.Y., Xiao-Guang .C.(2014). Urbanization and Aedes albopictus Ecology. 8 ,11 , e3301.
- Zhong,D., Lo,E., Hu,R., Metzger,M., Cummings,M., Bonizzoni,M., Fujioka,K., Sorvillo,T., Klueh,S., Healy,S., Fredregill,C., Kramer,v., Chen,X., Yan,Y.(2013). Genetic Analysis of Invasive Aedes albopictus Populations in Los Angeles County, California and Its Potential Public Health Impact. Aedes albopictus, Los Angeles County, California. 8 ,7 ,e68586.

Annexes

Annexes

Annexe1

A. Appareillage

- Agitateur magnétique vortex
- Appareil d'électrophorèse horizontal et accessoire
- Balance à précision
- Chambre froide
- Congélateur -20°C
- Etuve à 37°C et étuve de 24°C
- Réfrigérateur
- Générateur de courant
- Micropipettes de 100,
- pH mètre.
- Ultracentrifugeuse 10000 tours/mn

B. Produit chimiques

- Acide acétique : CH_3COOH
- Acide chlorhydrique HCL
- Alcool 95°
- Amidon
- Azote liquide
- Bleue de bromothymol
- Citrate : $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- Hydroxyde de sodium NaOH
- Glycérol $\text{C}_3 \text{H}_8\text{O}_3$

C. Additifs

- Agar noble
- Carbone de sodium anhydre Na_2CO
- Chlorure de magnésium $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- DICIP : 2-6 dichlorophénol 60istillé e60 Na salt grade I
- EDTA: Acide ethylene diaminetetracétique $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Fast blue BB : 4-bbenzoylamino_5diethoxyzenenediazonium chloride salt $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{NOCL}_1/2\text{Zn CL}_2$
- MTT (4-5diméthylthiazol 2)-2,5diphényl tétrazoluim bromide : thiazolul blue
- Natriumdihydrogénophosphate-1-hydrate NaH_2PO_4
- NBT (nitro blue tétrazolium) $\text{C}_{40}\text{H}_0\text{CL}_2\text{N}_{10}\text{O}_6$
- PMS(phénésine méthosulfate) N-méthyl dibenzopyrazine methy sulfate $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2 \cdot \text{CHSO}_4$
- Tris hydroxyméthyl aminomethane $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}$

D. Réactifs

- Acide aspartique C₄H₇NO₄
- Acide fumarique sel monosodique C₄H₂O₄Na₂
- Acide fumarique disodique C₄H₂O₄Na₂
- Acide L glutamique monosodique C₅H₈NO₄
- Acide isocitrique C₄H₆O₇Na
- Acide malique disodique C₄H₄O₅
- Acide -6- phosphogluconique ri sodique C₆H₁₀O₁₀Pna , 2H₂O
- Alpha ketoglutarate C₅H₅O₅K
- Fructose-6- phosphate C₆H₁₁O₉PNA₂
- Glucose-1-phosphate C₆H₁₁O₉PK₂ ,2H₂O
- Glucose-6-phosphate C₆H₁₁O₉PNA
- Inosine C₁₀H₁₂N₄O₅
- Pyruvique sel monosodique CHONa

E. enzymes

- G6PD : glucose-6- phosphate déshydrogénase
- MDH : Acide malique déshydrogénase
- PGI : phosphoglucose isomérase
- XOD : xanthine oxydase
- Mannose -6- phosphatase sel de BA

F. COENZYMES

- B NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit C₂₁H₂₇N₇O₁₄P₂Na 2
- NAD :Nicotinamide adénine dinucléotide grade I C₂₁H₂₇N₇O₁₄P₂
- NADP : Bicotinamide adénine dinucléotide phosphate C₂₁H₂₆N₇O₁₇Pna 2

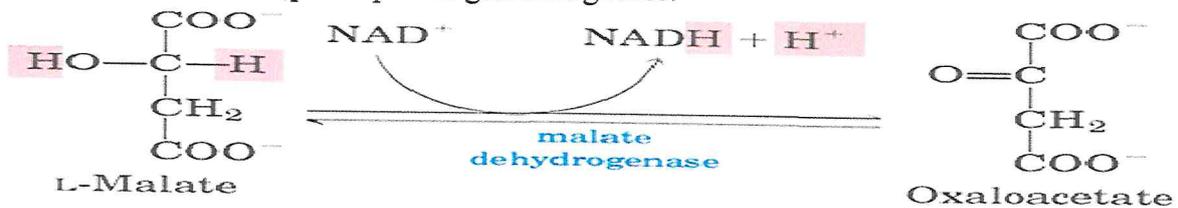
Annexe2 : Les systèmes enzymatiques

L'Union Internationale de Biochimie a codifié la nomenclature et la classification des enzymes sous une nomenclature dite officielle. Toutes les enzymes actuellement connues sont répertoriées sous un numéro portant 4 nombres séparés par des points et précédés de EC soit (EC x1.x2.x3.x4), dont :

- _ X1 : Le premier nombre pouvant varier de 1 à 6 indique le type de réactions
- _ X2 : Le deuxième désigne la sous-classe de l'enzyme qui est définie suivant son mécanisme d'action.
- _ X3 : Le 3e nombre désigne la nature de la molécule qui sert d'accepteur, lorsqu'il s'agit d'un transfert d'électrons.
- _ X4 : Le 4e nombre est un numéro d'ordre dans le groupe et dans le sous-groupe.

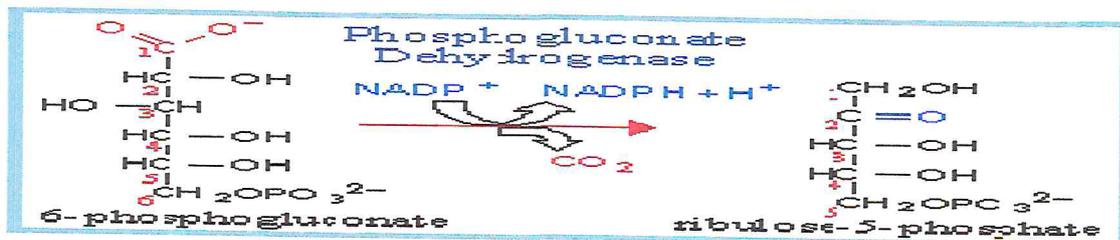
1) Malate déshydrogénase :(MDH) EC .1.1.37

La malate déshydrogénase (MDH) est une enzyme qu'on trouve dans toutes les cellules, participe à la gluconéogénèse.



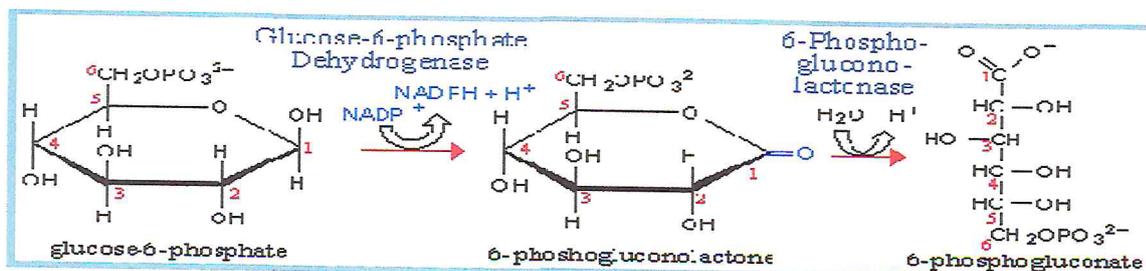
2) Phosphogluconate déshydrogénase :(PGD)E.C.1.1.1.44

Implique dans la voie des pentoses.

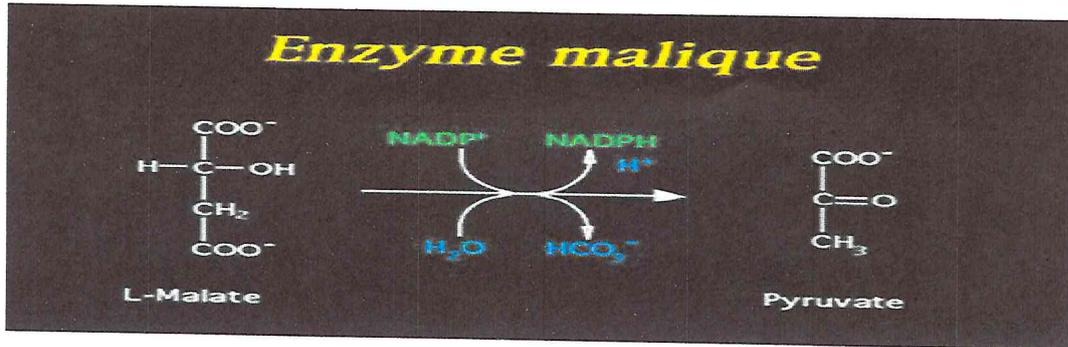


3) Glucose 6-phospho-déshydrogénase : (G6PD)E.C. 1.1.1.49

Cette enzyme est la première de la voie des pentoses.

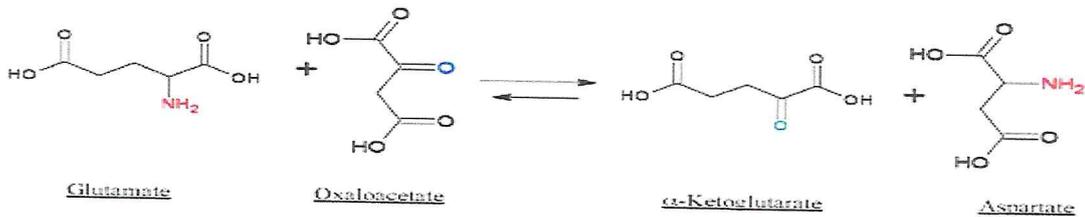


- 4) **Enzyme malique (ME) E.C.1.1.1.40**
Intervient dans le cycle de krebs.

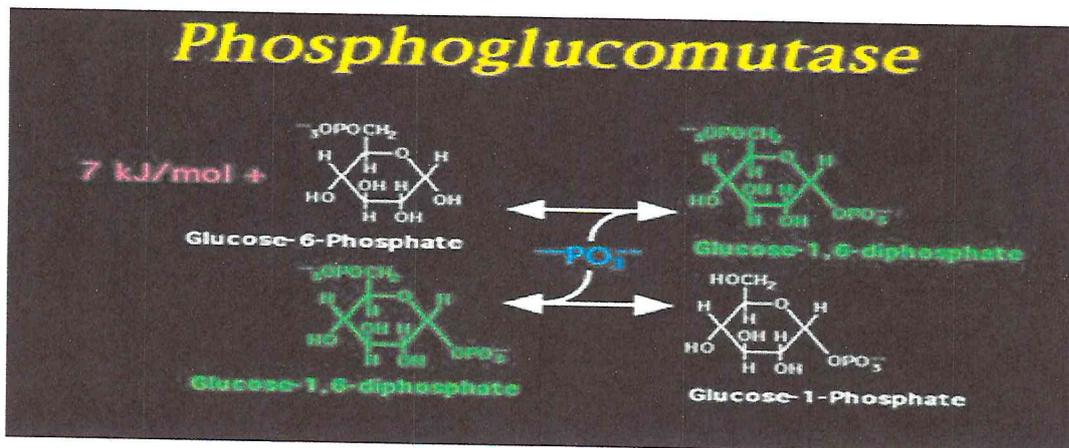


❖ **Transférase :**

- 1) **Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) E.C.2.6.1.1**
- 2) **Glutamate oxaloacetate transaminase (E.C.2.6.1.1)**

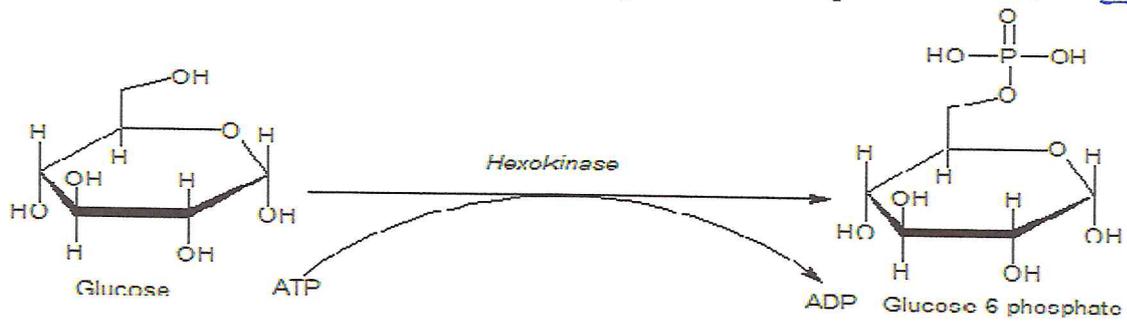


- 3) **Phosphoglucumutase (PGM) E.C.2.7.5.1**
Intervient dans le cycle des pentoses



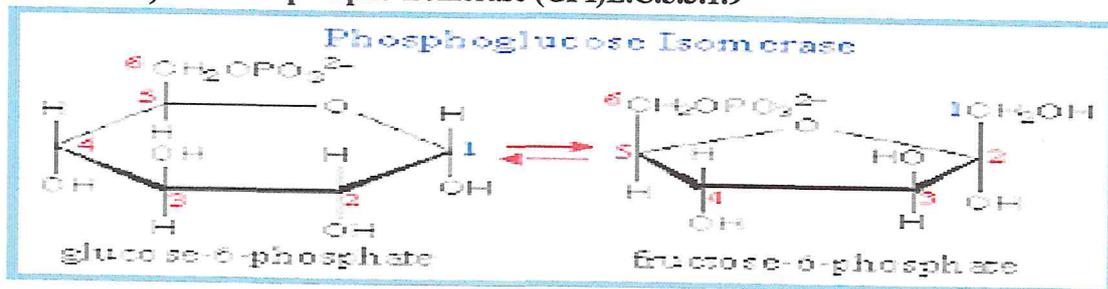
1) Hexokinase(HK)EC 2.7.1.1

Interviennr dans la première étape de la [glycolyse](#)



❖ ISOMERASE:

1) Glucose phospho-isomérase (GPI)E.C.5.3.1.9



ANNEXE 3 : composition des solutions de révélation enzymatiques

	enzymes	Tampon de reaction	Substrats et cofacteurs	Enzyme et colorants
Les Déshydrogénase	Isocitrate déshydrogénase (ICD) EC.1.1.1.42	Tampon tric-HCL0.02M (8ml)	<ul style="list-style-type: none"> - MgCL₂ .6H₂O(0.25m)..1ml - Acide isocitrique (0.1M) (0.1032g dans 4ml d'eau distillée) 4ml - NADP1%.....1ml - NBT1%.....1ml <p>Incubation a 37°C pendant30 minutes</p>	PMS1%.....0.5 ml AGAR2%.....5ml Révélation a 37°C
	Enzyme malique (ME) EC.1.1.1.40	Tris HCL (0.2M)PH8 (8ml)	<ul style="list-style-type: none"> - SolutionA.....5ml - NAD 1%.....1ml - NBT 1%.....1ml - NaH₂PO₄.....10mg <p>Incubation a 37°C pendant30 minutes</p>	PMS1%.....0.5 ml AGAR2%.....5ml Révélation a 37°C Après la revelation de bande ME ajouté dans la solution B-NAD 1%(1ml)
	Malate déshydrogénase (MDH) EC .1.1.37			
	Phosphogluconate Déshydrogénase (PGD)	Tris HCL (0.2M)PH8 (10m)	<ul style="list-style-type: none"> - Acide-6-phosphogluconique . 40mg - MgCL₂ .6H₂O(0.5M).....1ml - NADP1%.....1ml - NBT1%.....1ml <p>Incubation a 37°C pendant30 minutes</p>	PMS1%.....1 ml AGAR2%.....5ml Révélation a 37°C
	Glutamate déshydrogénase (GLUD) E.C.1.4.1.3	Tris HCL(0.2M) PH8(avec de L'acide citrique). (8ml)	<ul style="list-style-type: none"> - Lglutamic acid sel monosodique (845mg dans 5ml H₂O)....5ml - NADP1%.....2.5ml - NBT1%.....2ml <p>Incubation a 37°C pendant30 minutes</p>	PMS1%.....1ml AGAR2%.....10ml Revelation a37°C
	Glucose-6-phosphate Déshydrogénase (G6PD) EC.1.1.1.49	Tris HCL (0.2M)PH8 (10m)	<ul style="list-style-type: none"> - Glucose-6-phosphate.....20mg - EDTA.....10mg - NADP1%.....1ml - NBT1%.....1ml <p>Incubation a 37°C pendant30 minutes</p>	PMS1%.....0.5 ml AGAR2%.....5ml Révélation a 37°C

	NADH Diaphorase (DIA) E.C.1.6.2.2	Tris HCL (0.2M)PH8 (8ml)	<ul style="list-style-type: none"> - B NADH.....10mg <p>Incubation a 37°C pendant30 minutes</p> <ul style="list-style-type: none"> - MTT.....10mg - 2O distillée.....2ml <p>Bien agiter au vortex (dissolution longue)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ajouter tris HCL (0.2M)PH 8 2ml - DICIP solution (1mg/1ml de tris PH8).....0.5ml 	Ajouter les solutions 1+2+3+1+10ml AGAR 2% Révélation a température ambiante Et a l'obscurité
LYASE	Fumarate déshydrogénase (FH) EC.4.2.2.2	Tris HCL(0.2M)PH8... (8ml)	<ul style="list-style-type: none"> - Fumaric acid sel disodique 580mg - NAD 1%.....3ml <p>Pyruvique sel</p>	Malic déshydrogénase...200ul PMS1%.....0.5 ml AGAR2%.....5ml

			monosodique 20mg - NBT1%.....3ml Incubation a 37°C pendant30 minutes	Révélation a 37°C
Transférerase	Purine nucléoside phosphorylase (NP) E.C.2.4.2.1	Tris HCL(0.2M) PH8...16ml	- Inosine.....40mg - NBT1%.....2ml Incubation a 37°C pendant30 minutes	Xanthine oxydase.....100ul PMS1%.....1ml AGAR2%.....10ml Revelation a37°C
	Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) E.C.2.6.1.1	Tris HCL(0.2M) PH8 75ml	- Tris HCL(0.2M)PH8.....75ml - Alpha kétoglutarate.....150mg - Acide aspartique.....300mg - Pyridoxal-5- phosphate.....15mg	Fast blue BB.....225mg Tris HCL(0.2M)PH 8.....75ml Révélation a température ambiante.
	Phosphpglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1	Tris HCL (0.2M)PH8 .10ml	- MgCL2 ,6H2O(0.5M).....1ml - NADP1%.....0.5ml - NAD1%.....1ml - NBT1%.....1ml - Clucose-1- phosphate.....300mg Incubation a 37°C pendant30 minutes	Glucose-6-phosphate déshydrogénase 50ul PMS1%.....0.5 ml AGAR2%.....5ml Révélation a 37°C

	Hexokinase (HK) EC 2.7.1.1	Tris HCL (0.2M) PH8 15ml	- MgCL2 ,6H2O(0.2M).....1ml - NADP1%.....1ml - Solution A.....5ml Incubation a 37°C pendant30 minutes	PMS1%.....0.5 ml AGAR2%.....5ml Révélation a 37°C
ISOMERASE	Glucose phosphate isom (GPI)	Tris HCL (0.2M)PH8. .10ml	- MgCL2 ,6H2O(0.5M).....1ml - NADP1%.....0.5ml - NAD1%.....1ml - NBT1%.....1ml - Fructose -6- phosphate ...10mg Incubation a 37°C pendant30 minutes	Glucose-6-phosphate déshydrogénase 50ul PMS1%.....0.5 ml AGAR2%.....5ml Révélation a +4°C
	Mannose phosphate Isomerase (MPI) EC.5.3.1.8	Tris HCL (0.2M)PH8. .8ml	- MANNOSE -6-phosphate sel De Ba ou sel de Na.....10mg - MgCL2 ,6H2O(0.2M).....1ml - NADP1%.....1ml	Phosphoglucose isomérase...50ul Glucose -6-phosphate Déshydrogénase.....100ul PMS1%.....1ml AGAR2%.....10ml

ANNEXE 4 : cycle de Krebs et cycle de vois de pentose

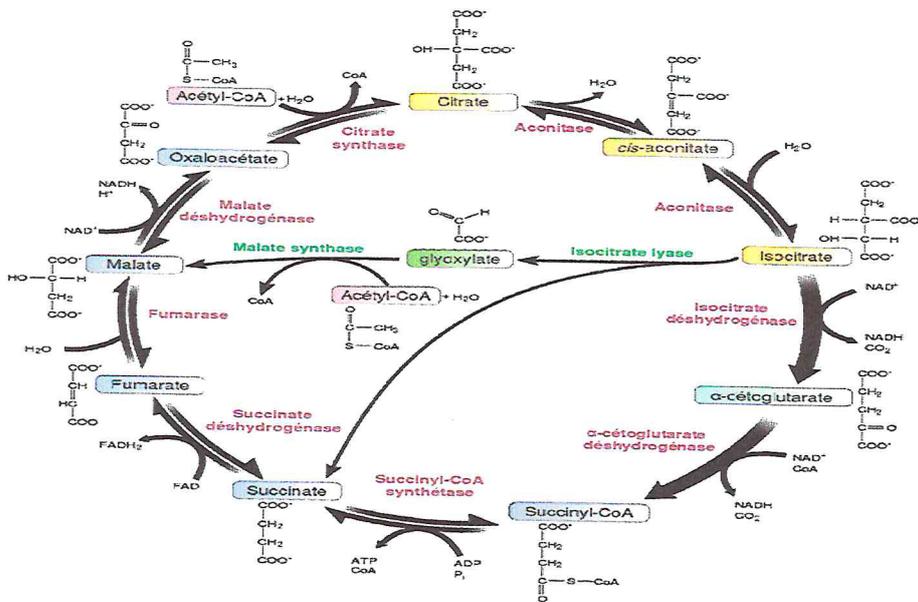
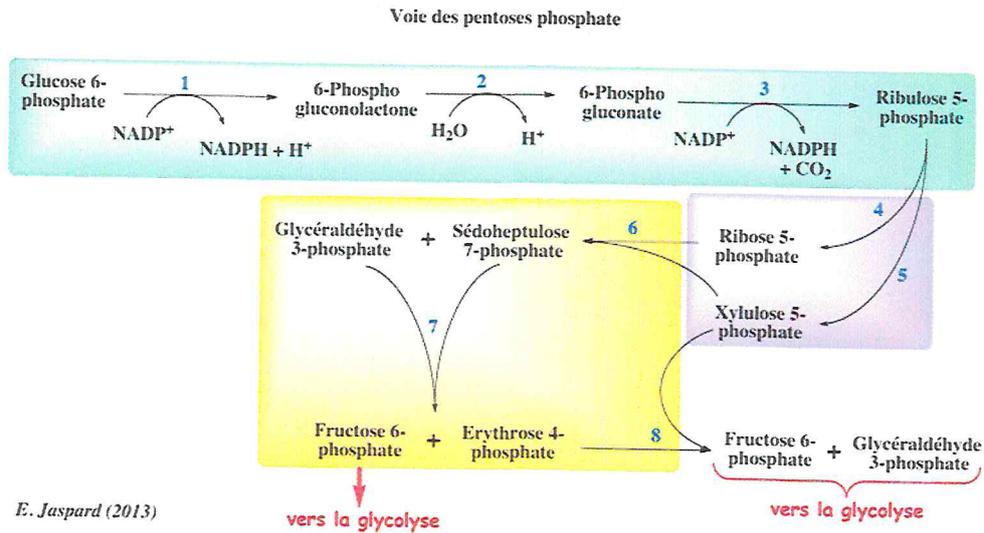


Figure1:cycle de Krebs https://fr.wikipedia.org/wiki/Cycle_de_Krebs



E. Jaspard (2013)

Figure 2: voie des pentose phosphate <http://biochimej.univangers.fr/Page2/COURS/Zsuite/6BiochMetabSUITE/1PentosePhosphate/1PentoePhosphate.htm>

Annexe 5

Coefficients de déficience ou excès en hétérozygote

Population: ORAN, G1

Locus	Heterozygotes Observed	Expected	Fixation index (F)	D	Chi- square	P
HK2	11	11.085	-0.013	-0.008	0.00	0.9651
HK4	0	12.255	1.000	-1.000	25.03	0.0000
GPI	8	16.128	0.493	-0.504	15.66	0.0001
PGM	1	10.511	0.903	-0.905	36.29	0.0000
GOT	1	14.067	0.927	-0.929	38.76	0.0000
GPD	10	5.263	-1.000	0.900	8.98	0.0027
PGD	24	13.957	-0.756	0.720	19.09	0.0000
MDH	0	18.044	1.000	-1.000	97.82	0.0000
ME-	21	19.319	-0.110	0.087	0.78	0.3781

Population: ORAN, G2

Locus	Heterozygotes Observed	Expected	Fixation index (F)	D	Chi- square	P
HK2	0	12.800	1.000	-1.000	41.39	0.0000
HK4	12	15.319	0.200	-0.217	2.26	0.1328
GPI	21	15.723	-0.364	0.336	5.98	0.0145
PGM	14	17.021	0.160	-0.177	2.00	0.1578
GPD	12	6.261	-1.000	0.917	10.98	0.0009
PGD	22	19.936	-0.127	0.104	1.26	0.2620
MDH	2	14.128	0.855	-0.858	28.16	0.0000
ME-	24	15.298	-0.602	0.569	15.52	0.0001

Population: ORAN, G3

Locus	Heterozygotes Observed	Expected	Fixation index (F)	D	Chi- square	P
HK1	4	5.231	0.216	-0.235	1.16	0.2805
HK3	0	12.170	1.000	-1.000	25.03	0.0000
HK4	1	1.000	-0.043	0.000	0.00	1.0000
GPI	12	19.596	0.375	-0.388	15.90	0.0001
PGM	13	18.489	0.282	-0.297	6.95	0.0084
GPD	24	12.255	-1.000	0.958	22.99	0.0000
PGD	23	18.400	-0.278	0.250	5.63	0.0176
MDH	0	17.422	1.000	-1.000	93.08	0.0000

ME-	24	19.340	-0.267	0.241	6.10	0.0135
-----	----	--------	--------	-------	------	--------

Population: Oran, G10

Locus	Heterozygotes		Fixation index (F)	D	Chi-square	P
	Observed	Expected				
HK2	8	12.620	0.357	-0.366	4.96	0.0259
HK3	0	16.225	1.000	-1.000	37.02	0.0000
HK4	24	12.255	-1.000	0.958	22.99	0.0000
GPI	27	26.739	-0.024	0.010	0.01	0.9125
PGM	36	28.958	-0.261	0.243	8.95	0.0028
GOT	1	9.451	0.893	-0.894	29.60	0.0000
GPD	36	30.803	-0.185	0.169	5.76	0.0164
PGD	35	27.536	-0.289	0.271	9.93	0.0016
MDH	0	19.378	1.000	-1.000	116.77	0.0000
ME-	10	12.724	0.187	-0.214	3.45	0.0634

Population: Oran, G11

Locus	Heterozygotes		Fixation index (F)	D	Chi-square	P
	Observed	Expected				
HK4	12	6.261	-1.000	0.917	10.98	0.0009
GPI	24	17.979	-0.363	0.335	8.06	0.0045
PGM	19	15.462	-0.260	0.229	3.49	0.0617
GOT	5	13.844	0.631	-0.639	15.61	0.0001
GPD	24	12.255	-1.000	0.958	22.99	0.0000
PGD	24	18.298	-0.340	0.312	7.22	0.0072
MDH	0	18.043	1.000	-1.000	78.04	0.0000
ME-	17	13.829	-0.264	0.229	3.48	0.0621

Population: BirK, bk

Locus	Heterozygotes		Fixation index (F)	D	Chi-square	P
	Observed	Expected				
GPI	21	17.936	-0.196	0.171	2.31	0.1286
PGM	20	18.149	-0.125	0.102	0.76	0.3842
GOT	1	10.644	0.904	-0.906	22.69	0.0000
GPD	23	11.756	-1.000	0.957	21.99	0.0000
PGD	22	12.170	-0.846	0.808	16.33	0.0001
MDH	0	11.733	1.000	-1.000	24.03	0.0000
ME-	21	18.277	-0.173	0.149	1.65	0.1992

Population: Alger, Cx

Locus	Heterozygotes		Fixation index (F)	D	Chi- square	P
	Observed	Expected				
HK4	12	6.261	-1.000	0.917	10.98	0.0009
GPI	10	7.810	-0.341	0.280	2.17	0.1409
PGM	8	8.870	0.059	-0.098	0.32	0.5709
PGD	12	6.261	-1.000	0.917	10.98	0.0009
MDH	0	6.118	1.000	-1.000	19.38	0.0000
ME-	2	1.600	-0.500	0.250	0.27	0.6033