



Institut français de recherche scientifique
pour le développement en coopération

**Centre
de
Montpellier**

L'ÉLECTROPHORÈSE DES ISOENZYMES,
OUTIL DE DÉTECTION
D'ESPÈCES JUMELLES
CHEZ LES PHLÉBOTOMES

Frédérique TARRIEU

Document ORSTOM Montpellier, 1994, n° 6

Frédérique TARRIEU

L'ÉLECTROPHORÈSE DES ISOENZYMES,
OUTIL DE DÉTECTION D'ESPÈCES JUMELLES
CHEZ LES PHLÉBOTOMES

Les opinions exprimées dans ce document
n'engagent que la responsabilité de leurs auteurs

Ce travail de recherche a été effectué au sein de l'UMR CNRS-ORSTOM n° 9926 "Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs" (UR des Maladies Infectieuses et Parasitaires; Département Eau et Santé) du Centre de Recherche ORSTOM de Montpellier sous la direction du Dr Jean-Pierre Dujardin, pour l'obtention par Frédérique Tarrieu de la Maîtrise de Biologie des Organismes et des Populations de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc-Montpellier II, le 2 Juillet 1993.

Lieu du stage :

Laboratoire de Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs,
UMR CNRS-ORSTOM 9926

Directeur du stage :

Michel Tibayrenc.

Le stage a été réalisé sous la supervision de Jean-Pierre Dujardin.

Remerciements :

Je remercie Messieurs Michel Tibayrenc et Jean-Pierre Dujardin, pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire, et permis de réaliser les expériences décrites dans ce mémoire.

Je remercie également Monsieur le Professeur Jean-Pierre Dedet et Madame le Dr. Eliane Guilvard, du Laboratoire d'Ecologie médicale et Pathologie Parasitaire (Faculté de Médecine, Montpellier), qui nous ont aimablement fourni les spécimens qui font l'objet de ce mémoire.

Je remercie également Mademoiselle Marta Cruz, pour l'aide apportée dans l'apprentissage de la technique électrophorétique et dans la réalisation de mes expériences.

Ce travail a bénéficié d'un financement communautaire (D.G. XII, C.S.I., contrat n° CI 1-CT91-0901).

Je remercie par ailleurs Mademoiselle Anne-Laure Bañuls, Monsieur Philippe Solano, Madame Brigitte Bastrenta, Françoise Mathieu-Daudé pour leurs conseils et leurs encouragements.

Table des matières

<u>1 - Introduction.</u>	1
<u>2 - Généralités sur les leishmanioses :</u>	2
2.1 - les parasites et les aspects pathologiques.	2
2.2 - les vecteurs.	3
<u>3 - Matériel et méthode :</u>	4
<u>3.1 - Matériel biologique.</u>	4
<u>3.2 - Méthode utilisée :</u>	4
- échantillonnage.	4
- préparation des extraits enzymatiques.	5
- support.	5
- migration.	5
- la révélation et la fixation.	6
- les systèmes enzymatiques.	6
<u>3.3 - Lecture des zymogrammes.</u>	6
<u>4 - Résultats :</u>	7
4.1 - Description des zymogrammes.	7
4.2 - Mesure de la variabilité génétique.	8
4.3 - Indépendance des allèles à chaque locus.	9
4.4 - Indépendance des phénotypes entre les locus.	9
<u>5 - Discussion et conclusion :</u>	9
5.1 - Variabilité isoenzymatique.	9
5.2 - Equilibre génétique.	10
5.3 - Homogénéité spécifique des lots analysés :	11
5.3.1 - <i>Phlebotomus papatasi</i> .	11
5.3.2 - <i>Lutzomyia trapidoi</i> .	11
<u>6 - Conclusions générales.</u>	12
Références bibliographiques.	14

1 - Introduction.

Les phlébotomes sont des vecteurs connus de plusieurs maladies humaines, et en particulier de la leishmaniose, dont de nombreux foyers ont été dépistés dans le monde depuis la découverte de la maladie aux Indes en 1903.

Bien qu'un médicament, le glucantime, soit le plus souvent efficace, sa toxicité, son coût et les problèmes de sa distribution vers des régions très périphériques (comme par exemple la forêt tropicale) peuvent gêner le contrôle de cette endémie.

Dans certaines situations, la connaissance du réservoir animal peut contribuer à l'élaboration de techniques de lutte efficaces. De même, l'identification de l'espèce vectrice et l'étude de son comportement sont des paramètres utiles au développement de stratégies de lutte, en particulier lorsque la transmission est domiciliaire ou péri-domiciliaire.

L'identification des espèces recensées dans un foyer se base sur des critères morphologiques. Ces derniers suffisent le plus souvent à la tâche, mais dans certains groupes des confusions sont possibles, en particulier dans le genre *Lutzomyia* (Le Pont et al., 1985 ; Ward, 1986).

Pour ces cas particuliers, l'électrophorèse des isoenzymes a volontiers été présentée comme technique de choix susceptible de suppléer aux insuffisances de la morphologie (Lutte contre les leishmanioses. Rapport d'un Comité OMS d'experts. OMS. Série de rapports techniques. N°793, 1990, pp 177). Certes, cette technique est en mesure de compléter une classification basée sur des caractères externes parfois délicats à examiner, mais dans cette application - que nous nommerons ici "identification" -, l'électrophorèse des isoenzymes n'est pas la plus performante des techniques génétiques ou biochimiques, ni la plus facile à mettre oeuvre.

A côté du rôle attribué à l'électrophorèse des isoenzymes dans l'identification des espèces, son application à l'analyse des populations à l'intérieur de chaque espèce n'a pas assez été mise en avant. Cette dernière application fait l'objet du présent travail; nous montrons en particulier comment une telle analyse peut tester l'homogénéité spécifique des espèces reconnues par ailleurs. Dans le cas où cette homogénéité est mise en défaut, l'électrophorèse des isoenzymes peut ainsi mettre à jour l'existence d'espèces insoupçonnées car "déguisées" sous un même aspect morphologique: ce sont les espèces dites "jumelles", "cryptiques" ou "isomorphes".

Ainsi que nous venons de le suggérer, l'utilisation de marqueurs

génétiqes en complément de l'examen morphologique doit donc distinguer deux objectifs : d'une part l'identification d'espèces morphologiquement proches, et d'autre part la détection d'espèces non suspectées par les caractères externes.

1. L'identification.

Cet objectif suppose que les espèces ont été correctement dénombrées, reconnues par d'autres critères, et requiert des techniques simples, rapides, applicables éventuellement sur le terrain. Peu de spécimens sont nécessaires (au moins 1 par espèce). L'outil modèle de l'identification par marqueurs génétiques est la sonde ADN (Ready et al., 1991).

2. La détection.

Cet objectif implique que l'on met en doute l'homogénéité spécifique d'une espèce morphologique (la morphologie elle-même peut susciter ce doute, quand par exemple des formes claires et sombres, ou petites et grandes, sont observées parmi les individus d'une même espèce morphologique).

Il est indispensable de se mettre alors dans les conditions qui permettront de rejeter, le cas échéant, cette homogénéité: dans ce travail, nous montrons que ces conditions résident à la fois dans le mode d'échantillonnage et dans la technique d'analyse génétique.

Pour illustrer notre propos, nous avons réalisé une étude test sur une population de laboratoire au moyen de l'électrophorèse des isoenzymes et enfin comparé ces résultats à ceux obtenus pour une population naturelle.

2 - Généralités sur les leishmanioses :

2.1 - les parasites et les aspects pathologiques :

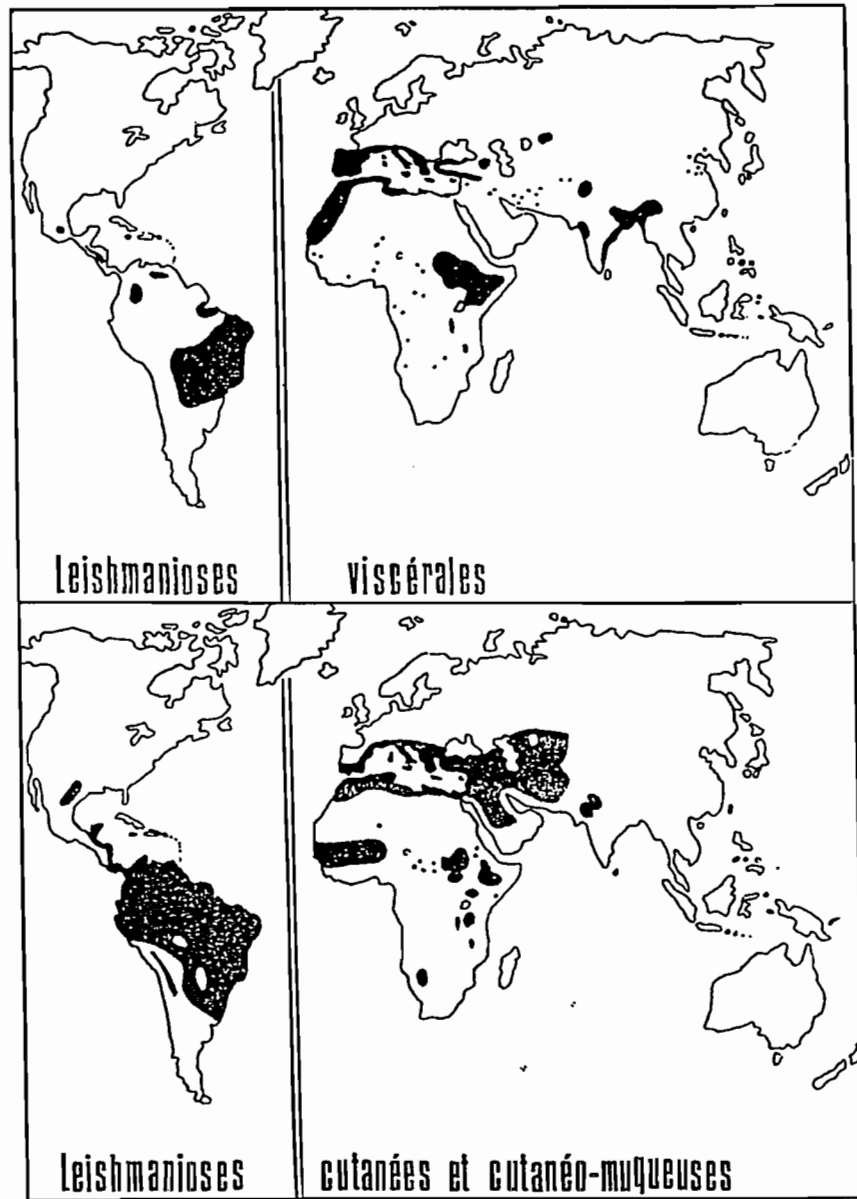
Les leishmanioses, responsables dans certains cas d'affections systémiques mortelles ou également de graves mutilations faciales, posent un problème majeur dans les pays tropicaux. D'après les statistiques de l'OMS, environ 350 millions de personnes risquent de contracter l'infection et le nombre de sujets infectés s'élève à quelque 12 millions. Les leishmanies sont difficiles à éradiquer, car elles montrent une grande diversité de cycles et de vecteurs (cf. fig. 1).

Il existe trois grands types de leishmanioses :

- leishmaniose viscérale : elle se développe dans les organes profonds

Fig 1 :

Répartition géographique des leishmanioses
humaines
(d'après le rapport du Comité d'experts de l'O.M.S. - 1984)



comme la rate, les viscères, essentiellement dans les pays asiatiques (Kala-azar : *L. donovania* ; *L. chagasi* ; *L. infantum*).

- leishmaniose cutanée : elle se développe dans les téguments (*L. tropica*; *L. major* ; *L. aethiopica* ; *L. mexicana*).

- leishmaniose mixte : des affections se développent à la fois dans les téguments et les muqueuses. C'est la leishmanie muco-cutanée que l'on trouve dans le nouveau monde.

Au cours de son cycle évolutif, le parasite doit obligatoirement passer chez le phlébotome qui s'infeste lors du repas sanguin. Alors que chez les vertébrés, la leishmanie se développe sous forme amastigote dans les cellules du système réticulo-hystocytaire (SRH) et plus particulièrement dans les macrophages (cf. fig. 2), elle se développe sous forme promastigote dans le tube digestif de l'insecte.

2.2 - les vecteurs :

Les phlébotomes sont des Diptères nématocères de la famille des *Psychodidae*, parmi lesquels on peut distinguer six genres : *Lutzomyia*, *Brumptomyia*, *Warileyia* dans le Nouveau Monde, *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Chinius* dans l'Ancien Monde. Les uniques vecteurs démontrés des leishmanies sont des espèces des genres *Phlebotomus* et *Lutzomyia* (Lutte contre les leishmanioses. Rapport d'un Comité OMS d'experts. OMS. Série de rapports techniques. N°793, 1990, pp 177).

Les adultes mesurent moins de 3 mm (cf. fig. 3). Ils sont très pâles, velus et bossus, avec des ailes allongées et lancéolées ou ovales relevées à 45° au repos. Leur aspect est gracile. Leur vol est saccadé et lorsqu'ils se déplacent autour d'une lampe, ils le font par petits bonds. Ils sont crépusculaires ou nocturnes, comme *Phlebotomus papatasi*, mais en forêt dense, au niveau de la canopée certains peuvent être diurnes.

Les individus fréquentent les lieux obscurs à l'intérieur, mais aussi autour des habitations, comme les clapiers, porcheries, étables, écuries, poulailliers, etc... ainsi que les terriers. Certaines espèces se rencontrent dans les cavernes et les grottes. En régions sèches et arides, ils s'abritent dans les crevasses du sol et les terriers. En forêts tropicales, ils se reposent dans les anfractuosités des arbres et à l'entrée des terriers.

Les larves vivent en général dans les sables meubles, riches en matières organiques au voisinage et dans les habitations, près des latrines, et au voisinage des terriers d'animaux. Des larves sont également observées dans les craquelures du sol, sous des pierres et à la base de vieux murs. En Amérique latine, les larves se retrouvent essentiellement à la base des arbres, dans la partie abritée entre les arcs-boutants. La larve est vermiforme, eucéphale, couverte de petits tubercules ornés chacun d'une soie d'aspect épineux. Au dernier stade de développement, elle atteint

Vecteur diptère
Phlebotomus sp.
Hôte intermédiaire

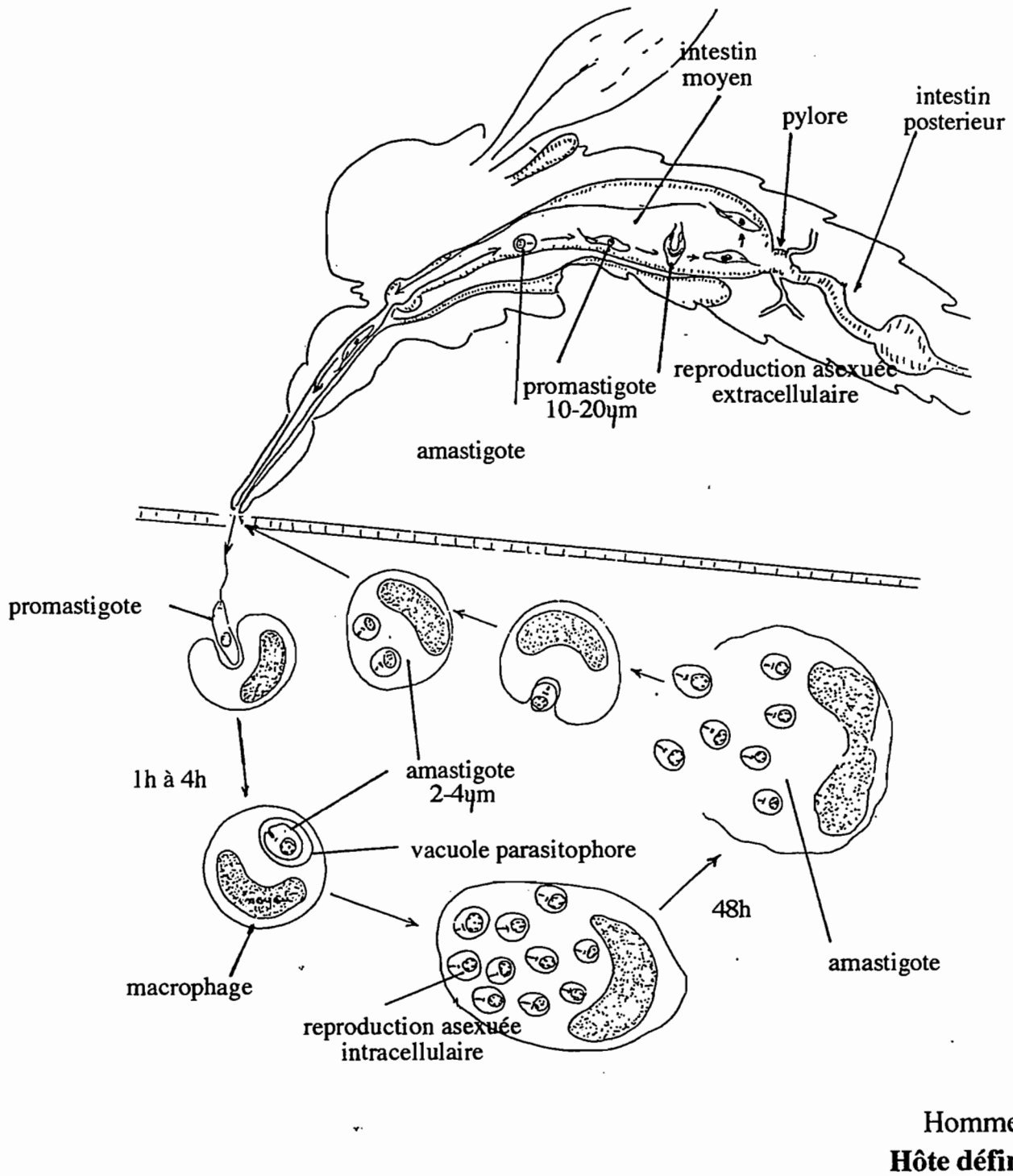


Fig 2 : Cycle biologique de *Leishmania*

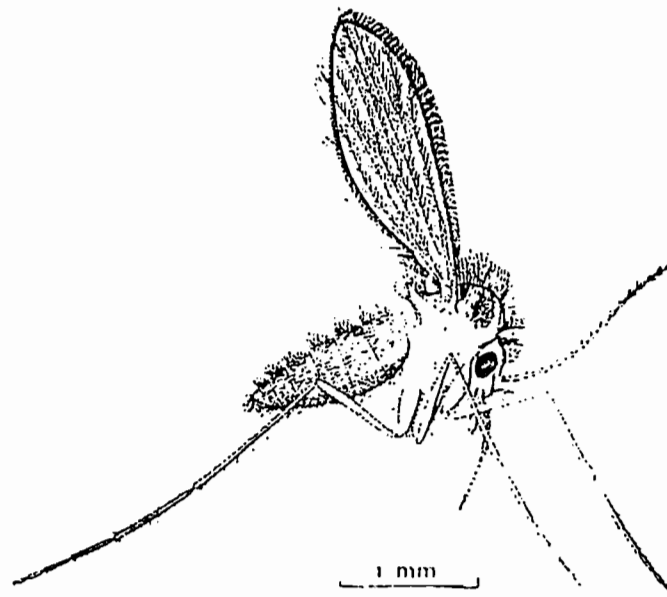


Fig 3 : Adulte femelle de *Phlebotomus papatasi*

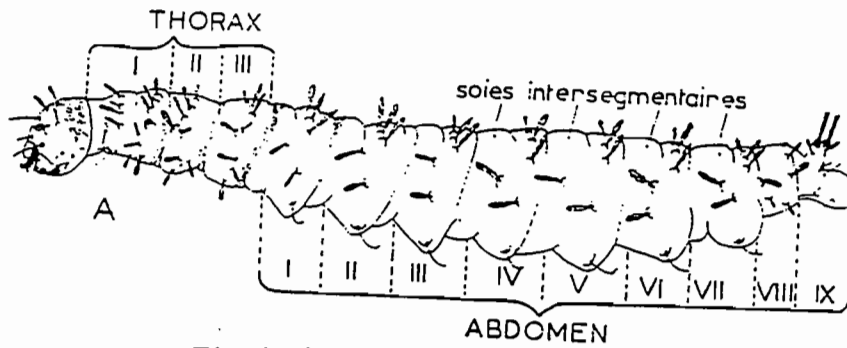


Fig 4 : Larve de *Phlebotomus sp.*

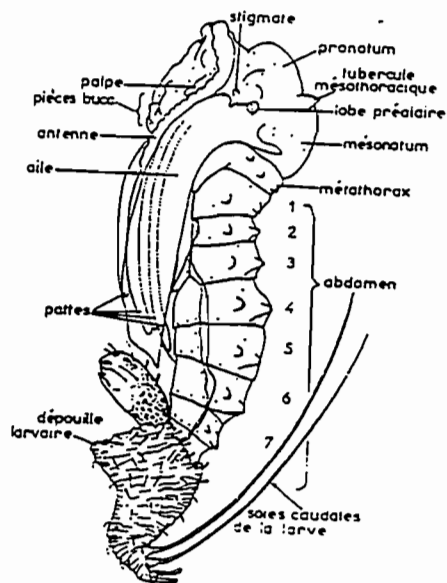


Fig 5 : Nymphe de *Phlebotomus sp.*

entre 6 et 8 mm. L'abdomen est terminé par 4, rarement 2, très grandes soies fortes et sombres (cf. fig. 4).

La nymphe, longue d'environ 3 mm, est fixée verticalement avec l'extrémité de l'abdomen emprisonnée dans la dépouille larvaire, elle-même fixée au substrat où s'est développée la larve (cf. fig. 5).

La leishmanie était, à l'origine, probablement parasite d'insectes pour devenir au cours de l'évolution parasite de mammifères; ceci implique que les phlébotomes infectés étaient les hôtes primaires et par commodité, ils seraient devenus des vecteurs (Peters W. et Killick-Kendrick R., 1987).

3 - Matériel et méthode :

3.1 - Matériel biologique.

Nous avons travaillé sur *Phlebotomus papatasi*, élevé en insectarium au Laboratoire d'Ecologie Médicale et Pathologie Parasitaire (Faculté de Médecine, Montpellier). Ce matériel nous a été aimablement fourni par Madame le Dr. E. Guilvard. Il s'agit d'une souche originaire d'Inde, et entretenue isolée en laboratoire depuis de nombreuses années.

En collaboration avec Mademoiselle Martha Cruz, nous avons également travaillé sur *Lutzomyia traidoi* provenant du nord de l'Equateur (Amérique du Sud), La Tablada, localité proche du littoral où le climat est relativement sec et la forêt dégradée.

3.2 - Méthode utilisée :

- Echantillonnage :

Trente-trois spécimens de *Phlebotomus papatasi* ont été collectés dans la cage de l'insectarium à l'aide d'un aspirateur buccal, et plongés ensuite à moins 80 degrés centigrades.

107 individus de *Lutzomyia traidoi* proviennent d'une capture sur appât humain réalisée dans la canopée à La Tablada, capture organisée par F. Le Pont le 2 avril 1992. Avant d'être plongés dans l'azote liquide, ces spécimens ont été disséqués pour permettre une identification morphologique correcte, en particulier pour les distinguer de *L. ylephiletor* ou *L. edentula* morphologiquement proches. Les caractères morphologiques utilisés pour cette distinction, faite sur le terrain par l'entomologiste (F. Le Pont), ont été la couleur de la tête (noire chez *L. ylephiletor*) et celle du pronotum (noir chez *L. edentula*).

- Préparation des extraits enzymatiques :

Les phlébotomes, conservés à -80 °C, sont introduits dans un tube conique à 4°C. Le broyage de l'échantillon est réalisé au fond du tube avec un piston ajusté en présence de 16 µl d'un mélange dit "stabilisateur d'enzymes", solution hypotonique à égales concentrations de dithiothreitol, d'acide epsilon-amino-caproïque et d'éthylène-diamine-tétra-acétate (E.D.T.A.).

- Le support :

Les électrophorèses sont réalisées sur gels d'acétate de cellulose. Les protéines adsorbées sur le gel migrent selon le pH de la solution du tampon de migration le long du champ électrique appliqué. Ce support présente plusieurs avantages :

- le gel est commercialisé prêt à l'emploi et se conserve après fixation et séchage sans aucun traitement particulier ;
- les temps de migration sont très courts (entre 15 et 30 minutes selon les enzymes) et la quantité d'extrait déposée est très faible (environ 1 µl par système enzymatique).

- La migration :

La cuve contient dans les deux compartiments 50 ml de tampon de migration. La liste des différents tampons utilisés dans ce travail et leur composition est donnée dans le tableau 1. Le gel d'acétate de cellulose est imbibé dans le tampon de migration (plus ou moins dilué, selon le système enzymatique étudié) durant 15 à 20 minutes. Les échantillons (12) sont d'abord déposés sur un portoir portant le nombre correspondant de puits, dont ils sont extraits ensuite à l'aide de l'applicateur (le "peigne") qui permet de les déposer en ligne sur le gel. En général, 1, 2 ou 3 applications par plaque d'acétate sont nécessaires selon les systèmes enzymatiques recherchés. Le gel est ensuite placé dans la cuve, les extrémités posées au contact de bandelettes de papier filtre qui plongent dans le tampon de migration, autorisant ainsi le passage du courant à travers le gel. Les compartiments centraux de la cuve contiennent soit de l'eau froide, soit des éponges spéciales réfrigérées. En effet, certaines enzymes sont sensibles à l'élévation de température qui se produit pendant la migration des protéines. Enfin, une plaque de verre est posée sur le gel pour assurer un contact ferme entre le gel et le papier filtre (les ponts). Toutes les conditions de migration (tampon, dilution, voltage, refroidissement et durée) figurent au tableau 2.

Tableau 1

Tampon de migration :

Tampon	Composition
A	I Shaw = Tris 16,35 g/l, acide citrique 9,04 g/l, ajuster à pH = 7.
B	Kreutzer = Tris 12,22 g/l, acide maléique 11,62 g/l, EDTA 2,92 g/l, MgCl ₂ 2,03 g/l, ajuster à pH = 7,4.
C	HR : Electre HR Buffer 10x18, eau distillée 2000 ml, MgCl ₂ 1M 1 ml, ajuster à pH = 9.

Tableau 2

Conditions électrophorétiques utilisées :

Syst. enz.	Tampon	Dilut. imb.	Dilut. migr.	Voltage	Temps	Refr.
GPI	A	1 : 7	pur	200	30	**
PGM	B	1 : 14	pur	200	15	**
PEP	C	1 : 2	pur	200	20	**
GPD	A	1 : 7	pur	200	20	**
ICD	A	1 : 7	pur	200	25	**

Syst. enz. = système enzymatique.

Tampon = tampon électrophorétique (cf. code tableau 1).

Dilut. imb. = dilution du tampon pour l'imbibition des plaques.

Dilut. migr. = dilution du tampon dans la cuve de migration.

Voltage = voltage en volts.

Temps = durée de la migration en minutes.

Refr. = refroidissement pendant la migration : glace (*) + éponges réfrigérées dans la cuve (**).

- La révélation et la fixation:

La révélation s'effectue en milieu solide. A la solution de révélation spécifique (tableaux 3 et 4) d'un volume de 10 ml, est ajouté un volume identique d'agarose à 2 % préalablement porté à ébullition, puis refroidi à 60°C. Le mélange est coulé dans une boîte de pétri circulaire en plastique de 12 cm de diamètre, puis disposé à l'obscurité. A la fin de la migration, la plaque d'acétate est appliquée (côté acétate) sur l'agarose refroidie et l'ensemble est installé dans une étuve à 37°C. Quand la coloration est suffisamment intense, la révélation enzymatique est stoppée par immersion de la plaque d'acétate dans une solution d'acide acétique à 5 % durant 10 minutes. Après rinçage, la plaque est séchée sur du papier absorbant.

- Les systèmes enzymatiques :

Les systèmes enzymatiques utilisés sont des enzymes classiques du métabolisme (glycolyse, cycle de Krebs, ...).

Les 5 systèmes enzymatiques étudiés sont : G6PD, GPI, ICD, PEP, PGM. Les noms et les codes officiels de ces enzymes sont donnés dans le tableau 5.

3.3 - Lecture des zymogrammes :

Les zymogrammes sont lus locus par locus. Deux cas sont distingués selon qu'une interprétation allélique semble possible ou non.

- Quand la composition allélique d'un locus paraît déchiffrable (c'est le cas lorsque les images sont typiques d'individus hétérozygotes), les allèles sont numérotés : de "1" pour l'allèle présentant la migration la plus rapide, à "n" pour le plus lent (avec $n = 2, 3$, ou davantage selon le nombre de niveaux isoenzymatiques différents). Dans le cas d'un locus diallélique, "1/1" représente le génotype unilocus homozygote pour l'allèle le plus rapide, "n/n" le génotype unilocus homozygote pour l'allèle le plus lent et "1/n" l'hétérozygote pour ces deux allèles.

- Certains loci (dans notre cas ceux de la PEP) ne permettent pas une interprétation en terme d'allèles. Dans ce cas, une lecture phénotypique globale est tentée, c'est-à-dire qu'un profil isoenzymatique distinct et reproductible, reconnaissable sans ambiguïté, est assimilé à un phénotype particulier. Si l'on choisit de nommer ce phénotype par le chiffre romain "I", les autres phénotypes sont alors codés "non I". Bien sûr, la composition allélique de tels phénotypes est inconnue, de même que le nombre de locus responsables de leur variation, mais cette codification permet néanmoins d'inclure de tels loci dans les tests statistiques

Tableau 3

Recette des colorations spécifiques :

Syst. enz.	T réaction	Solution de révélation
GPI	1 (2,5 ml)	Fructose 6 phosphate 10 mg, Glc 6 phosphate déshydrogénase 8 UI, Mg Cl ₂ 500 μ l, NBT 100 μ l, PMS 100 μ l.
PGM	2 (2,5 ml)	Glc 1 phosphate 50 mg, Glc 6 phosphate déshydrogénase 8 UI, MgCl ₂ 250 μ l, NADP 100 μ l, NBT 100 μ l, PMS 100 μ l.
PEP	2 (10 ml)	L leucyl-L-alanine 50 mg, L-aminoacide oxydase 250 μ l, peroxydase 250 μ l, MnCl ₂ 150 μ l, 3-amino 9 éthylcarbazole 10 mg.
GPD	2 (10 ml)	Alpha glycerol phosphate déshydrogénase 50mg, NADP 200 μ l, NBT 100 μ l, PMS 100 μ l.
ICD	2 (10 ml)	D L-acide isocitrique 50 mg, MgCl ₂ 250 μ l, NADP 100 μ l, NBT 100 μ l, PMS 100 μ l.

Syst. enz. = système enzymatique.

T réaction = tampon de réaction (cf. code tableau 4) et son volume indiqué entre parenthèses.

NBT = Nitro Blue de Tetrazolium (colorant).

PMS = phenazine methosulfate (colorant).

NADP = β -Nicotinamide Adénine-Dinucléotide phosphate (coenzyme).

Tableau 4 :

Tampon de réaction :

Tampon	Composition
1	Tris-HCl 1M pH = 7,0.
2	Tris-HCl 0,1M pH = 8,0.

Tableau 5 :

Noms, sigles et codes d'identification des 5 systèmes enzymatiques étudiés :

Nom	Sigle	Code
Alpha glycerol phosphate déshydrogénase	GDP	E.C. 1.1.1.49
Glc phosphate isomérase	GPI	E.C. 5.3.1.9
Isocitrate déshydrogénase	ICD	E.C. 1.1.1.42
Peptidase (L-leucyl-L-alanine)	PEP	E.C. 3.4.11 ou 13
Phosphoglucomutase	PGM	E.C. 2.7.5.1

E.C. = Enzyme Commission.

d'indépendance de la distribution des phénotypes entre loci.

4 - Résultats :

4.1 - Description des zymogrammes :

P. papatasi

PGM : Nous distinguons trois niveaux possibles de révélation que nous attribuons à trois allèles différents (cf. fig. 6), avec des homozygotes 1/1 (individu 1) et 3/3 (individus 2, 5, 8, 9 et 10), et des hétérozygotes 1/2 (individus 7 et 11), 1/3 (individu 4) et 2/3 (individus 3, 6 et 12).

GPI : Trois niveaux de révélation sous l'aspect d'une bande unique sont possibles, que nous attribuons à trois allèles différents. En effet, nous observons des homozygotes 1/1 (individu 5) et 2/2 (individus 2, 3, 4, 6, 9, 11 et 12), et des hétérozygotes 1/2 (individus 1, 8 et 10) constitués de trois bandes (cf. fig. 7). Cette image d'hétérozygotie est typique d'une enzyme dimérique, car en général la bande centrale est plus intense que les bandes périphériques.

ICD : Nous observons deux zones de révélation bien séparées l'une de l'autre, que nous attribuons à deux locus différents. En effet, la zone de révélation la plus lente montre un polymorphisme typique d'un locus diallélique pour une enzyme dimérique: on observe des homozygotes 1/1 (ex : individu 6), 2/2 (ex : individu 7), et des hétérozygotes 1/2 (ex : individu 8) (cf. fig. 8). Nos résultats concordent avec ceux de Hala A. Kassem et al. (1990) qui observent deux loci pour cette enzyme, que Ward, Pasteur et Rioux (1981) n'avaient pu révéler de façon satisfaisante. Le locus le plus lent montre un polymorphisme et l'image de l'hétérozygote correspond dans notre échantillon à une enzyme dimérique. Hala A. Kassem et al. (1990) observent quant à eux pour le locus le plus lent une image d'hétérozygotie typique d'une enzyme monomérique.

GPD : Chaque individu présente une bande de même intensité (cf. fig. 9). Nous ne tenons pas compte de l'ombre observée au-dessus de chaque bande : cela ne peut pas être un hétérozygote, car la GPD est une enzyme dimérique et nous observerions trois bandes. L'image de l'enzyme observée par Hala A. Kassem et al. (1990) est très différente, chaque individu présentant plusieurs bandes constantes et de même intensité au lieu d'une seule. Cette différence est remarquable puisque le support électrophorétique est le même : rappelons que les spécimens étudiés par ces auteurs proviennent d'Égypte, tandis que les nôtres proviennent de l'Inde.

PEP: Cette enzyme présentent quatre zones d'activité bien séparées, certaines d'entre elles présentant un polymorphisme. Nous pensons que ces zones correspondent à quatre locus distinct. Malgré l'évidence d'une variation génétique à deux locus, nous ne pouvons pas interpréter les

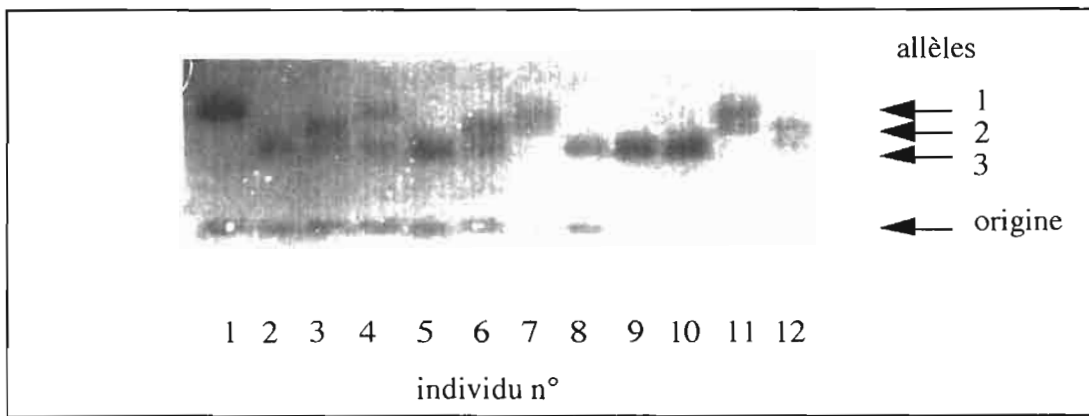


Fig 6 :
Zymogramme révélant les isoformes alléliques de la PGM
(phosphoglucomutase) chez divers individus de P.papatasi.

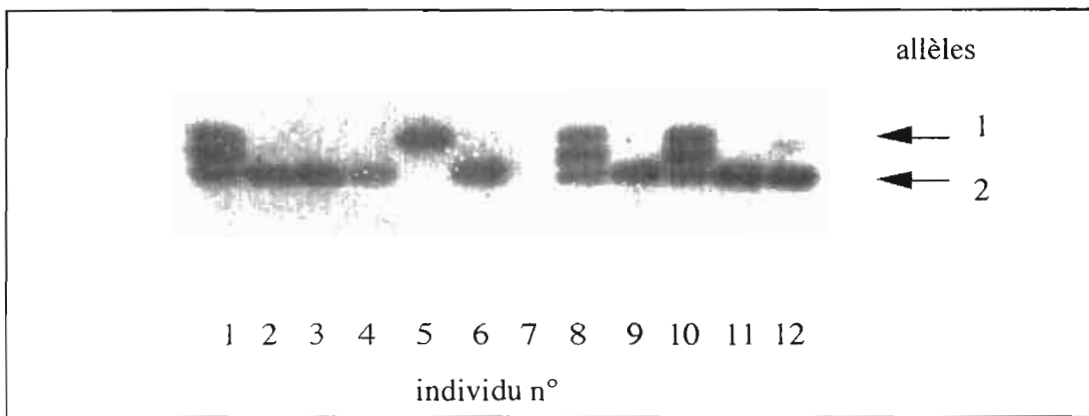


Fig 7 :
Zymogramme révélant les isoformes alléliques de la GPI (glucose
phosphate isomérase) chez divers individus de P.papatasi.

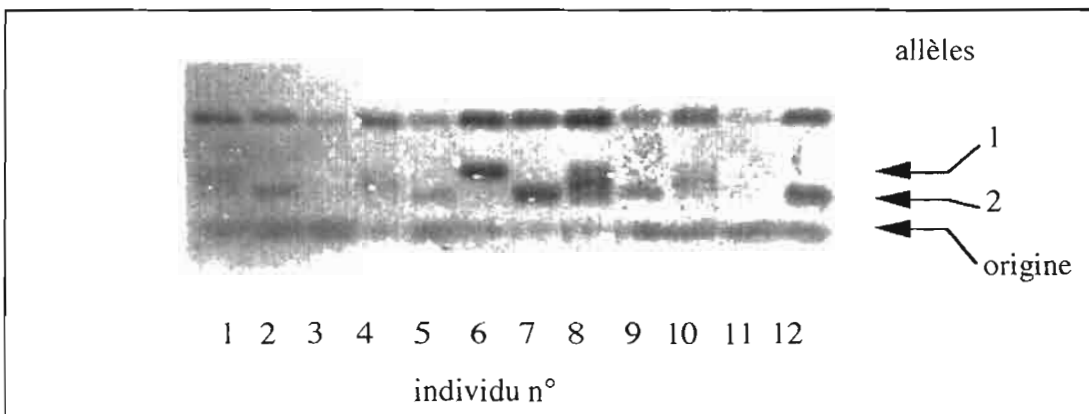


Fig 8 :
Zymogramme révélant les isoformes alléliques de la ICD (isocitrate
déshydrogénase) chez divers individus de P.papatasi.

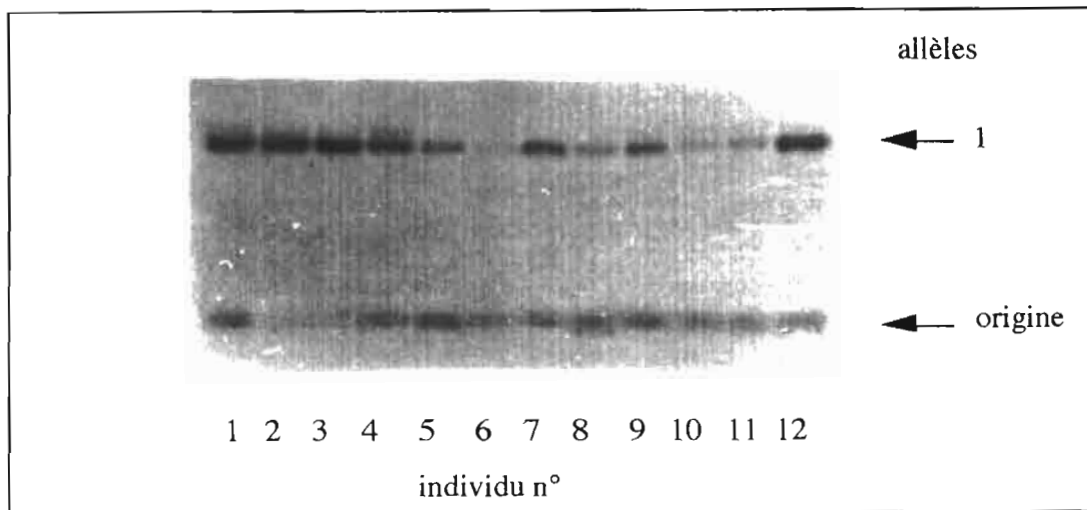


Fig 9 :
Zymogramme révélant les isoformes alléliques de la GPD (α glucose 6 phosphate déshydrogénase) chez divers individus de *P.papatasi*.

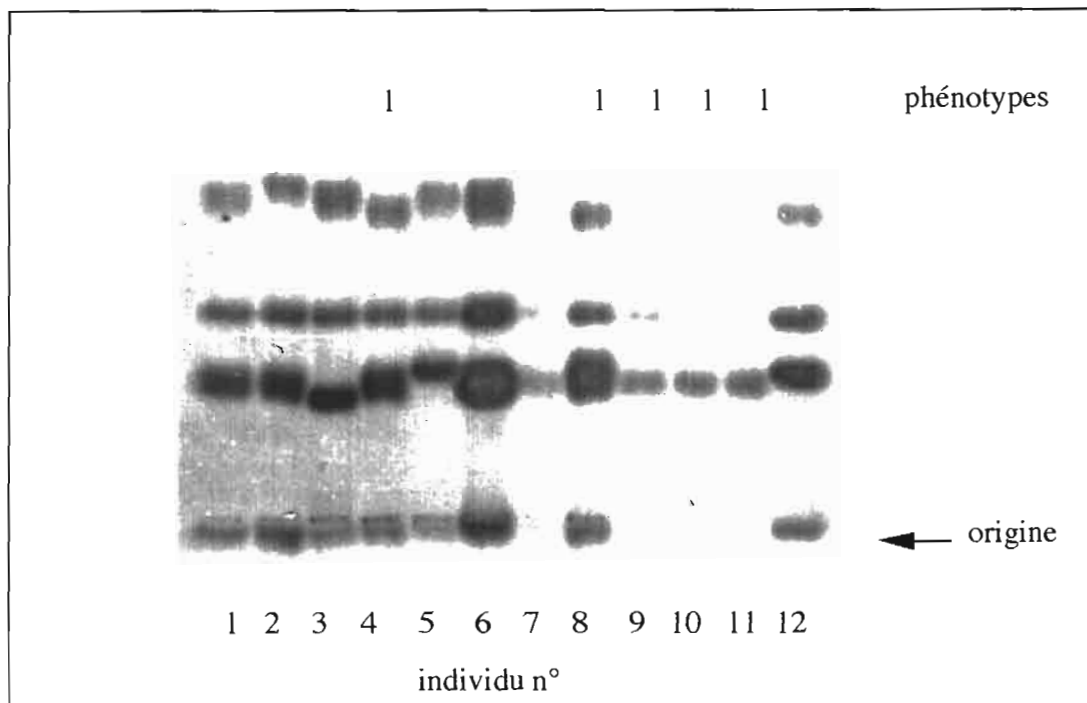


Fig 10 :
Zymogramme révélant les isoformes alléliques de la PEP (peptidase (L-leucyl-L-alanine)) chez divers individus de *P.papatasi*.

images en termes alléliques. Nous observons cependant les phénotypes "1" (individus 4, 8, 9, 10, 11 et 12) et les phénotypes "non 1" (tous les autres individus) (cf. fig. 10).

L. trapedoi

PGM : Nous distinguons quatre niveaux possibles de révélation que nous attribuons à quatre allèles différents. La figure 11 en montre trois; nous observons des homozygotes 2/2 (individus 2, 3, 4, 6, 7 et 8) et des hétérozygotes 1/2 (individus 5 et 9) et 2/3 (individus 10 et 12).

GPI : Nous distinguons quatre niveaux possibles de révélation que nous attribuons à quatre allèles différents. La figure 12 en montre deux; nous observons des homozygotes 1/1 (individus 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11 et 12) et des hétérozygotes 1/2 (individus 6 et 8) (cf. fig. 12).

ICD : Contrairement au cas de *P. papatasi*, nous n'observons chez *L. trapedoi* qu'une zone d'activité, correspondant à un locus dont la variation montre des images d'hétérozygotie évoquant une enzyme dimérique. Quatre allèles sont ainsi identifiés. Dans la figure 13, nous distinguons des homozygotes 1/1 (individu 10) et 2/2 (individus 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 11 et 12), et des hétérozygotes 1/2 (individus 5 et 8).

GPD : Deux niveaux de migration sont observés, assez proches mais nettement distincts, et que nous attribuons à deux allèles différents (cf. fig. 14).

PEP : le nombre apparent de loci est nettement inférieur à celui rencontré dans le genre *Phlebotomus* (cf. fig. 15), mais il est difficile d'en compter un seul ou deux. Une interprétation phénotypique est donc appliquée ici, reconnaissant un phénotype "I" (individus 3 et 9 de la figure 15) et un phénotype "non I" regroupant tous les autres (fig. 15).

4.2 - Mesure de la variabilité génétique :

Deux estimations sont proposées :

(1) Taux de polymorphisme (P): P est le nombre de locus variables divisé par le nombre total de locus. C'est une estimation simple de la variabilité génétique, dans laquelle une interprétation allélique correcte des enzymes variables n'est pas indispensable.

$$\begin{array}{ll} P. papatasi & P = 5 / 9 = 0,56 \\ L. trapedoi & P = 5 / 7 = 0,71 \end{array}$$

(2) Diversité génique (h): La diversité génique, h, a été calculée selon la formule proposée par Nei (1987), inspirée de l'équation d'équilibre de Hardy-Weinberg:

$$h = 1 - \sum x^2$$

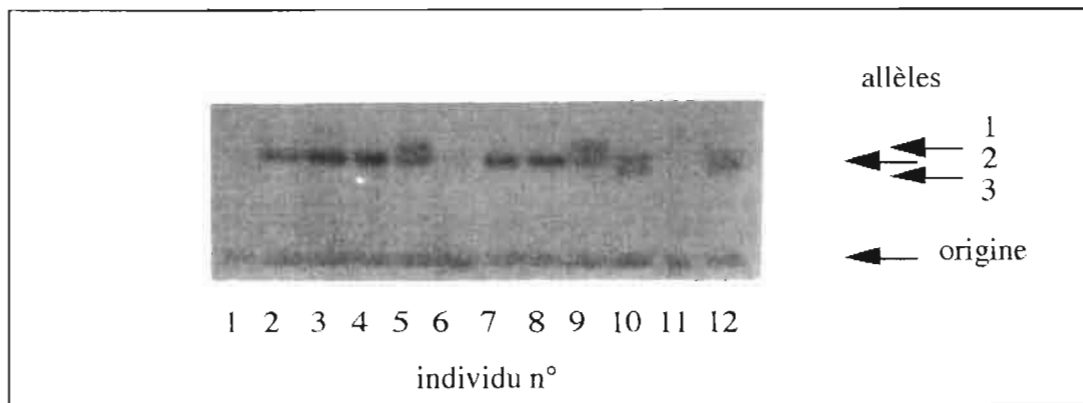


Fig 11 :
Zymogramme révélant les isoformes alléliques de la PGM (phosphoglucomutase) chez divers individus de *L.trapidoi*.

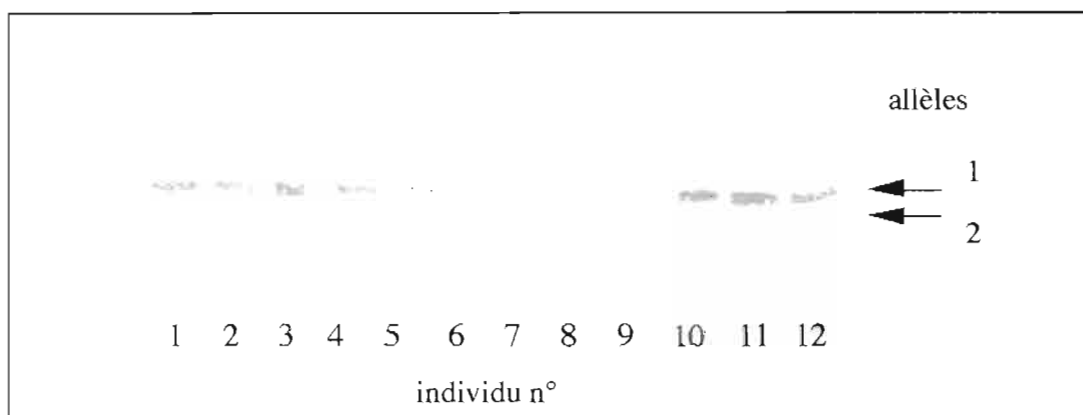


Fig 12 :
Zymogramme révélant les isoformes alléliques de la GPI (glucose phosphate isomérase) chez divers individus de *L.trapidoi*.

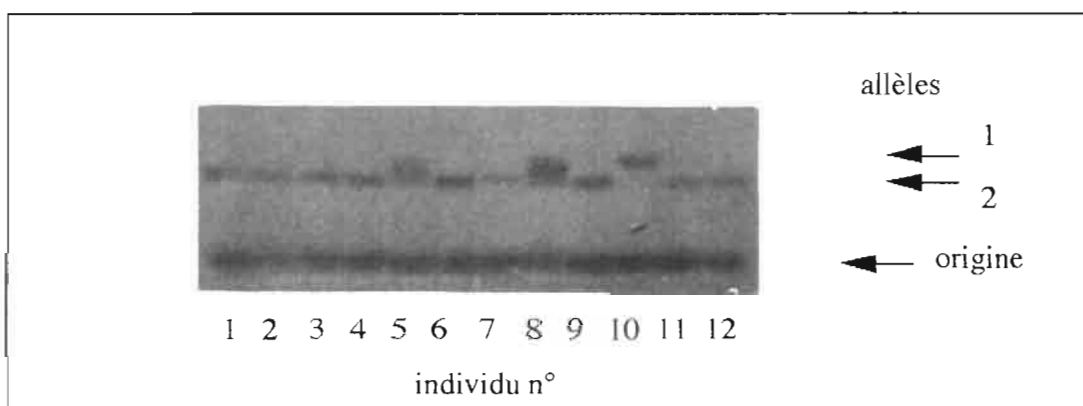


Fig 13 :
Zymogramme révélant les isoformes alléliques de la ICD (phosphoglucomutase) chez divers individus de *L.trapidoi*.

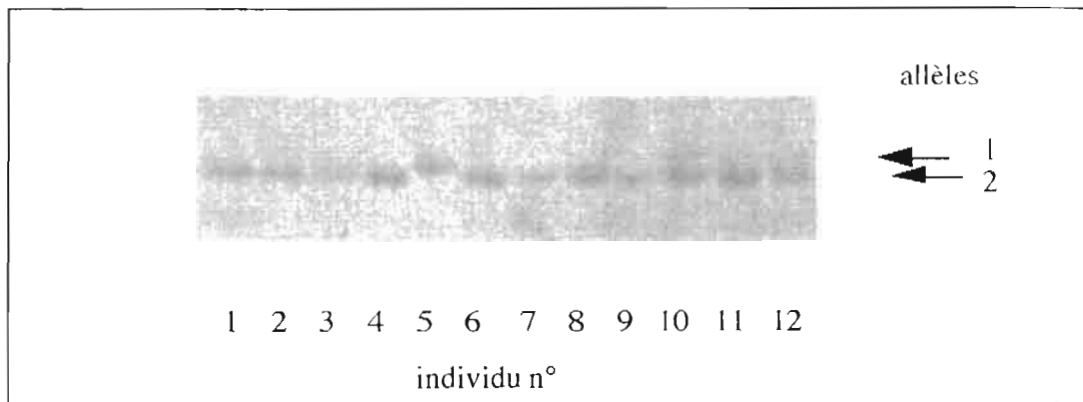


Fig 14 :
Zymogramme révélant les isoformes alléliques de la GPD (α glucose 6 phosphate déshydrogénase) chez divers individus de *L.trapedoi*.

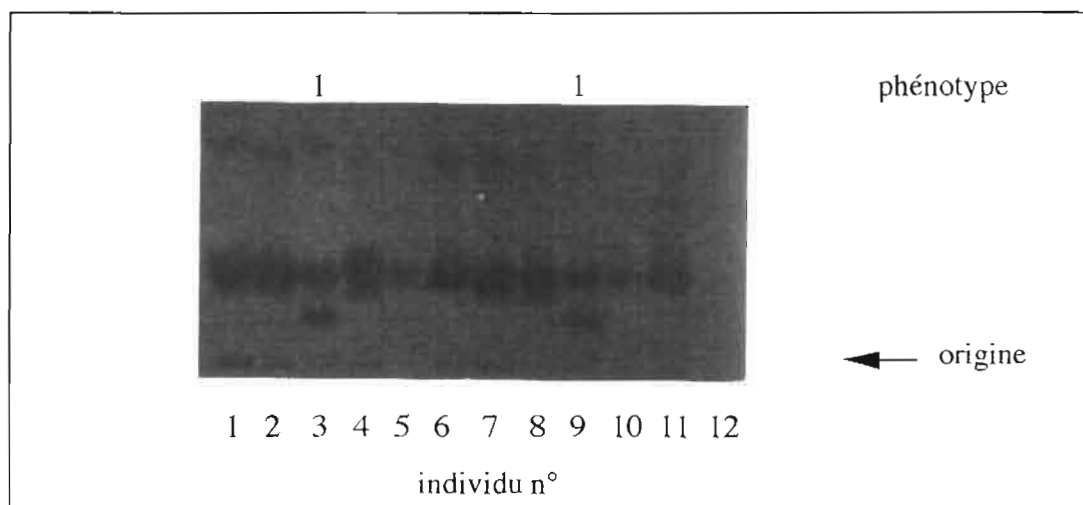


Fig 15 :
Zymogramme révélant les isoformes alléliques de la PEP (peptidase (L-leucyl-L-alanine)) chez divers individus de *L.trapedoi*.

avec x = la fréquence d'un allèle à un locus donné (cf. Tableaux 6a à 7d);

Cette mesure implique donc qu'une interprétation allélique ait été possible. La somme des fréquences alléliques élevées au carré est calculée pour chaque locus, puis son complément à 1, et la moyenne de ces valeurs est estimée sur le total des locus, y compris les locus non variables.

pour <i>P. papatasi</i>	$h = 0,281$
pour <i>L. trapidoi</i>	$h = 0,314$

4.3 - Indépendance des allèles à chaque locus :

Les résultats sont repris dans les tableaux de 6a à 7d.

Pour *P. papatasi*, aucun déséquilibre de Hardy-Weinberg n'est détecté.

Pour *L. trapidoi*, il existe un déséquilibre de Hardy-Weinberg très important à deux locus: l'*ICD* et la *GPD*.

4.4 - Indépendance des phénotypes entre les locus :

Les résultats sont repris dans les tableaux de 8a à 9b.

Pour *P. papatasi*, aucun déséquilibre d'association n'est détecté.

Pour *L. trapidoi*, il existe un déséquilibre très important qui lie entre eux certains phénotypes des locus *ICD*, *GPD* et *PEP*.

5 - Discussion et conclusion :

5.1 - Variabilité isoenzymatique :

D'après les résultats qui précèdent, on note chez *P. papatasi* une variabilité génétique importante, à peu près comparable à celle d'une population naturelle de *L. trapidoi*. Le taux de polymorphisme (P) de *L. trapidoi* paraît plus élevé (0,71), mais le nombre total de loci examinés n'est que de sept. La diversité génique (h) de *L. trapidoi* n'est que légèrement plus élevée que celle de *P. papatasi*.

Les valeurs estimées pour *P. papatasi* ont été obtenues à partir d'un effectif restreint (*ICD*, 17 individus; *GPD*, 33 individus; *GPI*, 33 individus; *PGM*, 33 individus et *PEP*, 33 individus), et sur un nombre réduit de loci. Il se pourrait que, pour de simples raisons statistiques d'échantillonnage, notre estimation de la variabilité soit exagérée, et que l'examen d'un plus grand nombre de locus réduirait les valeurs actuelles élevées.

Si néanmoins nous nous fions à ces résultats, nous devons souligner

leur caractère inattendu. Une population d'élevage, de petite taille par définition, isolée, et entretenue depuis de nombreuses générations (au moins 25 années), est supposée perdre progressivement sa variabilité : les fréquences géniques dérivant vers 1 ("fixation") ou 0 ("perte"), les génotypes individuels se ressemblent de plus en plus. Hala A. Kassem et al. (1990) ont étudié la variabilité d'une population d'élevage de *Phlebotomus papatasi* à 25 loci (18 enzymes) : ces auteurs observent néanmoins un taux de polymorphisme du même ordre, soit $P = 0,56$ (14 loci variables sur 25). Les auteurs s'interrogent sur cette variabilité importante rencontrée dans une population d'élevage, d'autant plus surprenante que le nombre d'individus fondateurs, dans le cas de leur matériel d'étude, est "faible" ("*few progenitors*"). Hala A. Kassem et al. (1990) n'apportent pas de réponse satisfaisante à cette observation.

Nous pouvons quant à nous tenter de comprendre une variabilité importante en proposant deux explications, dont la première au moins est facilement réfutable :

1. Les populations naturelles de *P. papatasi* sont encore beaucoup plus variables, et la dérive n'a pas achevé son oeuvre. Cette explication pourrait être avancée en particulier pour l'élevage analysé par Hala A. Kassem et al. (1990), qui est nettement plus "jeune" que l'élevage de Montpellier. Un examen de certaines populations naturelles originaires de l'Inde pourrait confirmer ou infirmer cette intuition : à notre connaissance une telle étude n'a pas été réalisée. Le seul travail sur la variabilité isoenzymatique de populations naturelles de diverses espèces de phlébotomes, dont *P. papatasi*, n'a impliqué que trois spécimens de *P. papatasi* de Tunisie, ce qui ne permet pas de tirer de conclusions (Ward, Pasteur et Rioux, 1981).

2. La dérive génique est contrecarrée par des facteurs sélectifs, peut-être propres aux conditions de l'élevage à Montpellier, favorisant les hétérozygotes aux locus étudiés. Dans cette hypothèse, ces facteurs étaient présents également dans l'élevage de Ain Shams Research and Training Center on Vectors of Diseases (Le Caire, Egypte) étudié par Hala A. Kassem et al. (1990).

5.2 - Equilibre génétique :

L'équilibre attendu en cas de panmixie a été testé à l'aide de l'épreuve du CHI-DEUX vérifiant l'indépendance de la distribution allélique à chaque locus (on cherche à détecter un déséquilibre de Hardy-Weinberg), ou celle de la distribution génotypique entre les loci (on cherche à détecter un déséquilibre de liaison).

- (a) Indépendance des allèles à chaque locus (équilibre de Hardy-Weinberg). Les résultats négatifs pour *P. papatasi* correspondent à ce qu'on attend d'une population panmictique, et l'on était en droit d'attendre la même chose pour le lot de *L. trapidoi*. Or, les tests dans ce groupe révèlent des déséquilibres très importants aux locus de l'*ICD* et surtout de la *GPD*. Dans les deux cas, ces déséquilibres sont dus à un déficit d'hétérozygotes, ce qui suggère un défaut de panmixie.

- (b) Indépendance des phénotypes entre les locus. Ce test ne porte pas directement sur l'indépendance allélique d'un locus à l'autre: il s'agit plutôt d'un test de libre association entre phénotypes issus de locus différents: ce test peut rester négatif alors que certains allèles sont pourtant significativement liés entre deux loci. Toutefois, quand il est positif, le déséquilibre de liaison allélique est alors très significatif: le déséquilibre noté chez *L. trapidoi* est donc très important.

5.3 - Homogénéité spécifique des lots analysés :

5.3.1 - *P. papatasi* :

Nous montrons que dans l'enceinte d'un élevage, assurant dans un environnement homogène toutes les conditions de sympatrie, les allèles sont distribués au hasard à chaque locus, et les phénotypes isoenzymatiques sont distribués au hasard entre les locus. Ce résultat est conforme aux prévisions théoriques applicables dans le cas d'une population panmictique. L'homogénéité spécifique du lot de spécimens reçus n'est donc pas mise en doute.

5.3.2 - *L. trapidoi* :

Afin de tester les mêmes prévisions théoriques sur des populations naturelles, nous avons d'abord réfléchi au problème d'un échantillonnage correct, ensuite nous avons fait un choix technique.

(1) Problème d'échantillonnage : comment collecter un ou plusieurs échantillons susceptibles de partager les caractéristiques de sympatrie et d'homogénéité environnementale, à l'instar d'une population de laboratoire ?

Nous avons choisi de capturer des individus sur appât humain, en un endroit donné, en l'espace d'une heure ou deux.

En effet :

(a) les individus qui s'approchent d'un homme pour se nourrir sur lui

démontrent qu'ils sont capables d'entrer en contact les uns avec les autres près d'un hôte. Il s'agit donc d'une population potentiellement panmictique.

(b) le rayon de dispersion active d'un phlébotome est de l'ordre du kilomètre, il est donc raisonnable de penser que les individus capturés sur un hôte ne proviennent pas de régions très différentes par le climat ou la végétation. Un environnement uniforme est probable. Cela ne signifie pas que les phlébotomes ainsi capturés aient connu un environnement constant comme dans un insectarium, mais qu'ils ont tous été sous l'influence des mêmes variations.

(2) Choix technique : comment reconnaître des individus issus du croisement entre deux génotypes différents (comment reconnaître des individus hétérozygotes) ?

Si nous basons la notion d'espèce sur le critère mixiologique, la technique d'analyse utilisée doit être en mesure de reconnaître les individus qui "manquent" en cas d'isolement reproductif. L'électrophorèse des isoenzymes fournit souvent des images claires d'hétérozygotes, et convient donc très bien à notre objectif. L'absence ou le déficit d'individus hétérozygotes se voit alors "en négatif" par la présence exclusive ou quasi exclusive d'allèles "alternes" (les individus homozygotes qui ne se croisent pas), encore appelés allèles "diagnostic".

Malgré l'assurance que l'échantillonnage de *L. trapidoi* correspondait assez bien à des conditions de sympatrie et d'environnement uniforme, d'importants déséquilibres ont été détectés, qui ont permis de rejeter l'hypothèse nulle de panmixie.

Deux populations naturelles sexuellement isolées en sympatrie correspondent à la définition biologique (ou mixiologique) de l'espèce: "les espèces sont des groupes de populations naturelles capables d'intercroisement et qui sont reproductivement isolées d'autres groupes semblables" (Mayr, 1974).

Il est donc justifié de prétendre à l'existence de deux espèces jumelles, c'est-à-dire des espèces différentes mais, à ce jour, non distinguables morphologiquement au sein du taxon *L. trapidoi*.

6 - Conclusions générales

Nous indiquons dans ce travail que pour étudier l'homogénéité spécifique des populations naturelles de phlébotomes, le type d'échantillonnage est très important, car de lui dépend la validité de

l'hypothèse nulle qui sera testée: la panmixie. Les individus de l'échantillon doivent provenir d'un lieu le plus petit possible, qui garantit à la fois la possibilité de croisements au hasard et celle d'un environnement probablement semblable pour tous.

Ces conditions sont rencontrées en principe dans une population de laboratoire. L'exemple de *P. papatasi* détaillé ici illustre que dans une telle population, aucun déséquilibre génétique n'est détecté.

Quand ces conditions sont censées être retrouvées dans un échantillon prélevé dans la nature, la structure génétique devrait rejoindre celle qui est décrite pour une population de laboratoire. Dans le cas contraire, on est en droit de mettre en doute l'homogénéité spécifique du taxon étudié.

C'est ainsi que pour le lot de *L. trapidoi* capturé à La Tablada (Ecuador), l'hypothèse d'une seule espèce répondant à cette morphologie est rejetée.

Dans ce travail, nous insistons sur l'adéquation de l'outil électrophorétique à la solution de ce genre de problème, que nous appelons détection d'espèce par opposition à l'identification, et nous montrons de quelle façon il doit être abordé.

Tableau 6a Locus de la PGM chez *Phlebotomus papatasi* :

Génotypes observés					
PGM 11	PGM 12	PGM 13	PGM 22	PGM 23	PGM 33
Effectifs observés dans chaque génotype					
2	6	7	0	8	10
Fréquences alléliques					
PGM 1	0,257				
PGM 2	0,212				
PGM 3	0,53				
Effectifs attendus dans chaque génotype					
2,189	3,606	9,015	1,484	7,424	9,28
Valeur du chi-deux, après regroupement des effectifs théoriques inférieurs à 5 :					
X ² = 1,44 (P > 0.50) ; ddl = 3.					

Tableau 6b Locus de la GPI chez *Phlebotomus papatasi* :

Génotypes observés		
GPI 11	GPI 12	GPI 22
Effectifs observés dans chaque génotype		
3	11	19
Fréquences alléliques		
GPI 1	0,257	
GPI 2	0,742	
Effectifs attendus dans chaque génotype		
2,189	12,621	18,189
Valeur du chi-deux, après regroupement des effectifs théoriques inférieurs à 5 :		
X ² = 0,34 (P > 0.50) ; ddl = 1.		

Tableau 6c Locus de la ICD chez *Phlebotomus papatasi* :

Génotypes observés			
ICD 11	ICD 12	ICD 22	
Effectifs observés dans chaque génotype			
0	10	7	Total = 17
Fréquences alléliques			
ICD 1	0,29		
ICD 2	0,71		
Effectifs attendus dans chaque génotype			
1,47	7,06	8,47	Total = 17
Valeur du chi-deux, après regroupement des effectifs théoriques inférieurs à 5 :			
X ² = 2,09 (P > 0,05) ; ddl = 1.			

Tableau 7a Locus de la PGM chez *Lutzomyia trapidoi* :

Génotypes observés									
PGM 11	PGM 12	PGM 13	PGM 14	PGM 22	PGM 23	PGM 24	PGM 33	PGM 34	PGM 44
Effectifs observés dans chaque génotype									
0	8	1	0	60	16	3	5	2	0
Fréquences alléliques									
PGM 1	0,043								
PGM 2	0,774								
PGM 3	0,156								
PGM 4	0,027								
Effectifs attendus dans chaque génotype									
0,17	6,19	1,25	0,22	55,74	22,45	3,87	2,26	0,78	0,07
Valeur du chi-deux, après regroupement des effectifs théoriques inférieurs à 5 :									
X ² = 1,818 (P>0,10) ; ddl = 1.									

Tableau 7b Locus de la GPI chez *Lutzomyia trapidoi* :

Génotypes observés					
GPI 11	GPI 12	GPI 13	GPI 22	GPI 23	GPI 33
Effectifs observés dans chaque génotype					
0	3	0	96	6	0
Fréquences alléliques					
GPI 1	0,014				
GPI 2	0,957				
GPI 3	0,029				
Effectifs attendus dans chaque génotype					
0,02	2,87	0,09	96,19	5,74	0,09
Valeur du chi-deux, après regroupement des effectifs théoriques inférieurs à 5 :					
X ² = 0,018 (P>0,75) ; ddl = 1.					

Tableau 7c Locus de la ICD chez *Lutzomyia trapidoi* :

Génotypes observés									
ICD 11	ICD 12	ICD 13	ICD 14	ICD 22	ICD 23	ICD 24	ICD 33	ICD 34	ICD 44
Effectifs observés dans chaque génotype									
8	12	1	0	3	4	0	60	2	0
Fréquences alléliques									
ICD 1	0,161								
ICD 2	0,122								
ICD 3	0,706								
ICD 4	0,011								
Effectifs attendus dans chaque génotype									
2,34	3,54	20,46	0,32	1,34	15,52	0,24	44,8	1,41	0,01
Valeur du chi-deux, après regroupement des effectifs théoriques inférieurs à 5 :									
X ² = 42,27 (P<0,000) ; ddl = 1.									

Tableau 7a Locus de la PGM chez *Lutzomyia trapidoi* :

Génotypes observés									
PGM 11	PGM 12	PGM 13	PGM 14	PGM 22	PGM 23	PGM 24	PGM 33	PGM 34	PGM 44
Effectifs observés dans chaque génotype									
0	8	1	0	60	16	3	5	2	0
Fréquences alléliques									
PGM 1	0,043								
PGM 2	0,774								
PGM 3	0,156								
PGM 4	0,027								
Effectifs attendus dans chaque génotype									
0,17	6,19	1,25	0,22	55,74	22,45	3,87	2,26	0,78	0,07
Valeur du chi-deux, après regroupement des effectifs théoriques inférieurs à 5 :									
X ² = 1,818 (P>0,50) ; ddl = 1.									

Tableau 7b Locus de la GPI chez *Lutzomyia trapidoi* :

Génotypes observés					
GPI 11	GPI 12	GPI 13	GPI 22	GPI 23	GPI 33
Effectifs observés dans chaque génotype					
0	3	0	96	6	0
Fréquences alléliques					
GPI 1	0,014				
GPI 2	0,957				
GPI 3	0,029				
Effectifs attendus dans chaque génotype					
0,02	2,87	0,09	96,19	5,74	0,09
Valeur du chi-deux, après regroupement des effectifs théoriques inférieurs à 5 :					
X ² = 0,018 (P>0,50) ; ddl = 1.					

Tableau 7c Locus de la ICD chez *Lutzomyia trapidoi* :

Génotypes observés									
ICD 11	ICD 12	ICD 13	ICD 14	ICD 22	ICD 23	ICD 24	ICD 33	ICD 34	ICD 44
Effectifs observés dans chaque génotype									
8	12	1	0	3	4	0	60	2	0
Fréquences alléliques									
ICD 1	0,161								
ICD 2	0,122								
ICD 3	0,706								
ICD 4	0,011								
Effectifs attendus dans chaque génotype									
2,34	3,54	20,46	0,32	1,34	15,52	0,24	44,8	1,41	0,01
Valeur du chi-deux, après regroupement des effectifs théoriques inférieurs à 5 :									
X ² = 42,27 (P<0,000) ; ddl = 1.									

Tableau 7d Locus de la *GPD* chez *Lutzomyia trapidoi* :

Génotypes observés		
<i>GPD 11</i>	<i>GPD 12</i>	<i>GPD 22</i>
Effectifs observés dans chaque génotype		
23	0	83
Fréquences alléliques		
<i>GPD 1</i>	0,217	
<i>GPD 2</i>	0,783	
Effectifs attendus dans chaque génotype		
4,99	36,02	64,99
Valeur du chi-deux, après regroupement des effectifs théoriques inférieurs à 5 :		
$X^2 = 106$ ($P < 0,000$) ; $ddl = 1$.		

Tableau 8a : *Phlebotomus papatasi*

Comparaison des effectifs bilocus observés et des effectifs bilocus attendus en cas d'équilibre de Hardy-Weinberg à chaque locus (produit des fréquences unilocus elle-mêmes estimées à partir des fréquences alléliques).

GPI	PGM	attendus	obs
11	12	0,239	2
11	33	0,616	1
12	13	3,448	3
12	33	3,549	5
12	12	1,379	2
12	23	2,839	1
22	11	1,207	2
22	12	1,988	2
22	13	4,969	4
22	23	4,092	7
22	33	5,115	4

Valeur du chi-deux, après regroupement des effectifs théoriques inférieurs à 5 :

$X^2 = 1,94$ ($P > 0,50$) ; ddl = 3.

Tableau 8b : *Phlebotomus papatasi*

Comparaison des effectifs bilocus observés et des effectifs bilocus attendus selon le produit des fréquences unilocus observées.

GPI	PGM	att	obs
11	12	0,545	2
11	33	0,909	1
12	13	2,333	3
12	33	3,333	5
12	12	2	2
12	23	2,666	1
22	11	1,151	2
22	12	3,454	2
22	13	4,03	4
22	23	4,606	7
22	33	5,757	4

Valeur du chi-deux, après regroupement des effectifs théoriques inférieurs à 5 :

$X^2 = 0,09$ ($P > 0,95$) ; ddl = 2.

Tableau 8a : *Phlebotomus papatasi*

Comparaison des effectifs bilocus observés et des effectifs bilocus attendus en cas d'équilibre de Hardy-Weinberg à chaque locus (produit des fréquences unilocus elle-mêmes estimées à partir des fréquences alléliques).

GPI	PGM	attendus	obs
11	12	0,239	2
11	33	0,616	1
12	13	3,448	3
12	33	3,549	5
12	12	1,379	2
12	23	2,839	2
22	11	1,207	4
22	12	1,988	7
22	13	4,969	4
22	23	4,092	2
22	33	5,115	1

Valeur du chi-deux, après regroupement des effectifs théoriques inférieurs à 5 :

$X^2 = 13,37$ ($P < 0.005$) ; ddl = 3.

Tableau 8b : *Phlebotomus papatasi*

Comparaison des effectifs bilocus observés et des effectifs bilocus attendus selon le produit des fréquences unilocus observées.

GPI	PGM	att	obs
11	12	0,545	2
11	33	0,909	1
12	13	2,333	3
12	33	3,333	5
12	12	2	2
12	23	2,666	2
22	11	1,151	4
22	12	3,454	7
22	13	4,03	4
22	23	4,606	2
22	33	5,757	1

Valeur du chi-deux, après regroupement des effectifs théoriques inférieurs à 5 :

$X^2 = 9,99$ ($P < 0.025$) ; ddl = 2.

Tableau 8c : *Phlebotomus papatasi*

Comparaison des effectifs trilocus observés et des effectifs trilocus attendus selon le produit des fréquences unilocus observées ; les phénotypes de la PEP sont classés en phénotypes "1", et phénotypes "non 1" (voir figure).

PEP	GPI	PGM	att	obs
1	11	12	0,165	1
1	11	33	0,275	1
1	12	13	0,707	3
1	12	33	1,01	2
1	22	11	0,348	2
1	22	12	1,046	1
1	22	13	1,221	1
1	22	23	1,395	3
1	22	33	1,744	2
2	11	12	0,327	1
2	12	12	1,2	2
2	12	23	1,6	1
2	12	33	2	3
2	22	12	2,072	1
2	22	13	2,418	3
2	22	23	2,763	4
2	22	33	3,454	2

Valeur du chi-deux, après regroupement des effectifs théoriques inférieurs à 5 :

$X^2 = 3,24$ ($P > 0,10$) ; ddl = 2.

Tableau 8c : Phlebotomus papatasi

Comparaison des effectifs trilocus observés et des effectifs trilocus attendus selon le produit des fréquences unilocus observées ; les phénotypes de la PEP sont classés en phénotypes "1", et phénotypes "non 1" (voir figure).

PEP	GPI	PGM	att	obs
1	11	12	0,165	1
1	11	33	0,275	1
1	12	13	0,707	3
1	12	33	1,01	2
1	22	11	0,348	2
1	22	12	1,046	1
1	22	13	1,221	1
1	22	23	1,395	3
1	22	33	1,744	2
2	11	12	0,327	1
2	12	12	1,2	2
2	12	23	1,6	1
2	12	33	2	3
2	22	12	2,072	1
2	22	13	2,418	3
2	22	23	2,763	4
2	22	33	3,454	2

Valeur du chi-deux, après regroupement des effectifs théoriques inférieurs à 5 :

$X^2 = 16,56$ ($P < 0.005$) ; ddl = 3.

Tableau 9a : *Lutzomyia trapidoi*

Comparaison des effectifs bilocus observés et des effectifs bilocus attendus en cas d'équilibre de Hardy-Weinberg à chaque locus (produit des fréquences unilocus elles-mêmes estimées à partir des fréquences alléliques).

ICD	GPD	att	obs
11	11	2,09	8
12	11	3,13	10
13	11	0,26	0
22	11	0,52	2
23	11	1,04	3
33	11	15,4	0
34	11	0,52	0
44	11	0	0
11	22	5,90	0
12	22	8,86	2
13	22	0,73	1
22	22	1,47	0
23	22	2,95	1
33	22	43,57	59
34	22	1,47	2
44	22	0	0

Valeur du chi-deux, après regroupement des effectifs théoriques inférieurs à 5 :
 $\chi^2 = 53,95$ ($P < 0,005$) ; ddl = 4.

Tableau 9b : *Lutzomyia trapidoi*

Comparaison des effectifs bilocus observés et des effectifs bilocus attendus en cas d'équilibre de Hardy-Weinberg à chaque locus (produit des fréquences unilocus elles-mêmes estimées à partir des fréquences alléliques).

PEP	GPD	att	obs
2-4	11	4,39	18
2-4	22	16,6	3
non 2-4	11	18,6	5
non 2-4	22	70,3	84

Valeur du chi-deux, après regroupement des effectifs théoriques inférieurs à 5 :
 $\chi^2 = 12,61$ ($P < 0,005$) ; ddl = 1.

A D D E N D U M

Nous nous devons d'apporter quelques précisions sur l'emploi du mot phénotype à la page 6. Dans nos test d'indépendance entre loci, chaque zymogramme distinct et reproductible pour un système enzymatique donné est assimilé à un génotype distinct. La fréquence théorique des génotypes multilocus (caractérisés pour la totalité des systèmes enzymatiques donnés) est le produit de la fréquence des génotypes élémentaires qui le composent. Cette fréquence peut être la fréquence attendue si une interprétation allélique est possible à chaque locus, dans le cas contraire, seule la fréquence observée peut être utilisée. Dans le premier cas, le test est plus sensible: un léger déséquilibre de liaison entre allèles peut être détecté. Dans le second cas, le test vérifie l'indépendance d'une distribution observée, qui est celle des formes isoenzymatiques entre les différentes enzymes: il est préférable d'appeler ces formes des génotypes plutôt que des phénotypes, car c'est bien le déséquilibre de liaison allélique qui est testé, mais de façon indirecte. Ceci permet d'utiliser ces tests de déséquilibre de liaison si l'organisme est haploïde, ou si sa ploïdie est inconnue, ou même s'il est impossible d'identifier les allèles qui composent les zymogrammes (Tibayrenc, Kjellberg & Ayala, 1990; Tibayrenc & Ayala, 1991).

BIBLIOGRAPHIE

S. Bonnefoy, M. Tibayrenc, F. Le Pont, J.P. Dujardin, P. Desjeux and F.J. Ayala. 1986. An isozymic study of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera : Psychodidae), the vector of visceral leishmaniasis in the "Yungas" (Bolivia). Cah. O.R.S.T.O.M. Sér. Entomol. Méd. Parasitol. 24 : pp. 213-217.

E. Guilvard, T.J. Wilkes, R. Killick-Kendrick and J.A. Rioux. 1980. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 15. Déroulement des cycles gonotrophiques chez *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus mascittii* Grassi, 1908 en Cévennes. Corollaire épidémiologique. Annales de parasitologie humaine et comparée 55, pp. 659-664.

Hala A. Kassem, David J. Fryauff, Bahira M. El Sawaf, Magdi G. Shehata, and Nagat F. Shoumar. 1990. Electrophoretic comparison of the Leishmania vectors *Phlebotomus papatasi* and *P. langeroni* (Diptera : Psychodidae). J. Med. Entomol. 27(4) : pp. 592-601.

R. Killick-Kendrick, J.A. Rioux, M. Bailly, M.W. Guy, T.J. Wilkes, F.M. Guy, I. Davidson, R. Knechtli, R.D. Ward, E. Guilvard, J. Périères and H. Dubois. 1984. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes. Annales de parasitologie humaine et comparée 59, pp. 555-572.

R.D. Kreutzer, M.T. Palau, A. Morales, C. Ferro, D. Felicianceli and D.G. Young. 1990. Genetic relationships among phlebotomine sandflies (Diptera : Psychodidae) in the verrucarum species group. Journal of Medical Entomology, Vol. 27, No 1, pp. 1-8.

F. Le Pont, T. Caillard, M. Tibayrenc, J.P. Dujardin et P. Desjeux. 1985. Distinction par les isoenzymes entre deux espèces cryptiques au sein du taxon *Psychodopygus carrerai* (Diptera, Psychodidae). C.R. Acad. Sc. Paris, t. 300, Série III, n° 13, pp. 479-481.

E. Mayr. 1974. Populations, espèces et évolution. Hermann. Paris.

M. Miles and R.D. Ward. 1978. Preliminary isoenzyme studies on phlebotomine sandflies (Diptera : Psychodidae). Reprinted from Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Vol. 72, No 4, pp. 398-400.

M. Nei. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press (512 pages).

Organisation mondiale de la santé (O.M.S.). 1990. Lutte contre les leishmanioses. Rapport d'un comité O.M.S. d'experts. Série de rapports techniques, No 793 (177 pages).

W. Peters and R. Killick-Kendrick. 1987. The Leishmaniasis in biology and medicine. Biology and epidemiology, volume 1.

P.D. Ready, R. Lainson, J.J. Shaw and A.A. Souza. 1991. DNA probes for distinguishing *Psychodopygus wellcomei* from *Psychodopygus complexus* (Diptera : Psychodidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 86 (1) : pp. 41-49.

J. Trouillet and G. Vattier-Bernard. 1979. Cycle annuel de *Sergentomyia hamoni* (Abonnenc, 1958) (Diptera, Phlebotomidae) en République populaire du Congo. Annales de parasitologie humaine et comparée 54, pp. 665-672.

R. D. Ward. 1986. Genetic diversity in phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae). Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. int. CNRS/INSERM, 1984). IMEEE, Montpellier, pp. 325-329.

R.D. Ward, N. Pasteur and J.A. Rioux. 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, Vol. 75, No 2, pp. 235-245.

R.D. Ward, A. Phillips, B. Burnet and C.B. Marcondes. 1988. Biosystematics of Haematophagous Insects (ed. M.W. Service), Systematics Association Special Volume No 37, pp. 257-269. Clarendon press, Oxford.

R E S U M E

Ce travail veut illustrer les principes dont s'inspire la détection d'espèce à l'aide d'une technique : l'électrophorèse des isoenzymes.

Il montre que les conditions idéales d'échantillonnage permettant la détection d'espèces insoupçonnées, dont un exemple est trouvé chez *L. trapidoi*, doivent être proches des conditions rencontrées dans une population de laboratoire, dont un exemple est trouvé chez *P. papatasi*.