



Institut français de recherche scientifique
pour le développement en coopération

Centre
de
Montpellier

IDENTIFICATION
DES ESPÈCES VECTRICES
DE LA MALADIE DE CHAGAS
DANS LE GENRE *RHODNIUS*

Philippe SOLANO

A 41.938 ex 1

Document ORSTOM Montpellier, 1994, n° 5

Philippe SOLANO

IDENTIFICATION DES ESPÈCES
VECTRICES DE LA MALADIE DE CHAGAS
DANS LE GENRE *RHODNIUS*



Montpellier ORSTOM 1994

52
GLOTR401
SOL

F41938

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'unité mixte de recherche CNRS-Orstom n° 9926 «Génétique moléculaire des parasites et des vecteurs» (U.R. 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 Philippe Solano du Diplôme d'Études Approfondies de Parasitologie de l'Université des sciences et techniques du Languedoc-Montpellier II, le 12 juillet 1993.

TABLE DES MATIERES

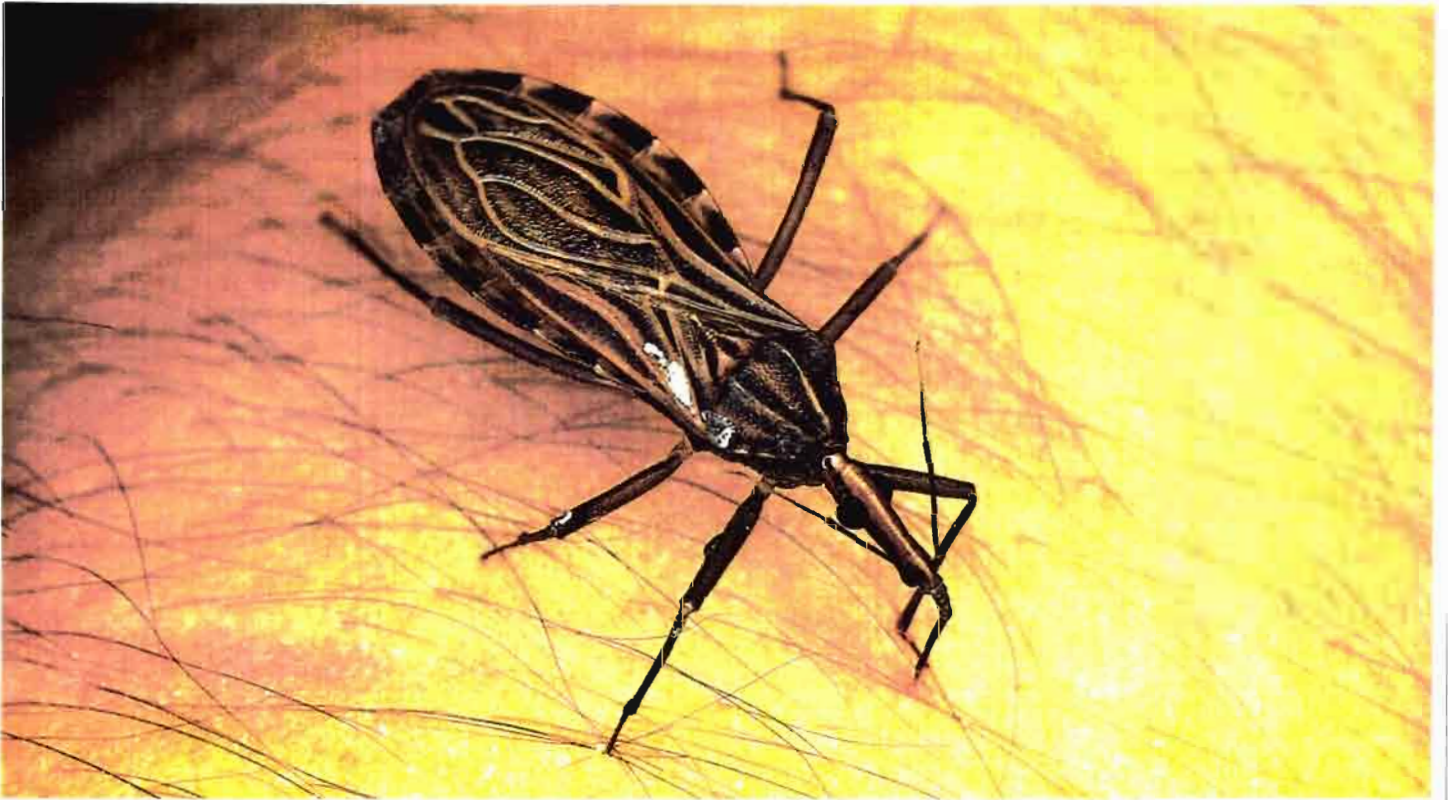
Résumé

Summary

	Pages
I. Position actuelle du problème	1
1.1. La maladie de Chagas	1
1.1.1. Historique et répartition	1
1.1.2. Le parasite et son cycle	1
1.2. Présentation des vecteurs	2
1.3. Lutte contre l'endémie	2
1.4. Le genre <i>Rhodnius</i>	4
II. Rappels sur la notion d'espèce	7
2.1. Présentation	7
2.2. Critère mixiologique, ou de l'isolement reproductif	7
2.3. Critère de la différenciation génétique	8
2.4. Application à notre étude	9
III. Matériel et Méthodes	11
3.1. Matériel biologique	11
3.1.1. Populations étudiées	11
3.2.2. Techniques d'élevage	11
3.2. Caractérisation des populations étudiées	12
3.2.1. Morphologie	12
3.2.2. Electrophorèse des isoenzymes	12
a- Préparation des spécimens	12
b- Conditions techniques	12
c- Principes d'interprétation	12
3.3. Traitement des données électrophorétiques	13
3.3.1. Fréquences alléliques et génotypiques	13
3.3.2. Taux de polymorphisme	13
3.3.3. Hétérozygotie moyenne	15
3.3.4. Comparaison entre populations	15
IV. Résultats	16
4.1. Observations morphologiques	16

4.2. Electrophorèse des isoenzymes	16
4.2.1. Aspects isoenzymatiques communs à toutes les populations	16
4.2.2. Aspects isoenzymatiques observés dans chaque population	18
4.2.3. Aspects isoenzymatiques comparés	18
4.2.4. Analyse des données isoenzymatiques	18
a- Taux de polymorphisme et hétérozygotie moyenne	19
b- Equilibre de Hardy-Weinberg	19
c- Loci diagnostiques et distances de Richardson	19
d- Distances de Nei	22
e- Réseau de Wagner	22
V. Discussion	24
5.1. Variabilité génétique	24
5.2. Equilibre de Hardy-Weinberg	26
5.3. Distances génétiques entre populations	26
5.4. Implications épidémiologiques	28
VI. Conclusion	30
VII. Projet de recherche	31
VIII. Bibliographie	33

Rhodnius prolixus



Cambridge Animal and Public Health Limited

Hauxton, Cambridge, CB2 5HU
England
Telephone (0223) 870312
Telex 81654
Telefax (0223) 872142

© 1995 Cambridge University Press

Résumé

Le genre *Rhodnius* contient douze espèces, dont trois jouent un rôle vecteur important de la maladie de Chagas dans le nord de l'Amérique Latine (Amérique du sud et Amérique Centrale). Le plus important, *Rhodnius prolixus*, présent au Vénézuéla, en Colombie, et dans quelques régions d'Amérique Centrale, est morphologiquement très proche d'autres espèces à rôle vecteur moindre comme *R. neglectus*, confinée au Brésil, et *R. robustus*, dont l'aire de répartition géographique est vaste. Des confusions sont ainsi possibles, et jettent des doutes sur la répartition géographique de *R. prolixus*, ainsi que sur son écologie.

Nous avons utilisé l'électrophorèse des isoenzymes en tant qu'outil diagnostique dans le genre *Rhodnius*, et avons observé les résultats suivants :

- Sur un échantillonnage allopatrique de *R. neglectus* et *R. prolixus*, deux espèces morphologiquement semblables, 6 loci diagnostiques ont été trouvés sur 17 analysés. Ces importantes différences génétiques confirment les résultats de croisements antérieurs qui avaient montré une stérilité complète entre ces deux espèces.
- *R. prolixus* et *R. robustus* différaient très légèrement d'un point de vue morphologique, mais ne présentent aucune différence fixée sur les 17 loci étudiés. Cette ressemblance génétique est appuyée par une fertilité importante en laboratoire. Nous proposons que dans le cadre des stratégies de lutte à mettre en place contre *R. prolixus*, on considère ces deux formes comme appartenant à une même espèce.
- Aucune des quatre espèces putatives de *Rhodnius* examinées ne présentait plus d'un ou deux loci variables sur 17. De plus, cette tendance au monomorphisme intraspécifique a été confirmée par l'étude de spécimens d'origine géographique variée, ou par des comparaisons entre des populations d'insectarium et des populations naturelles. Ce polymorphisme isoenzymatique exceptionnellement bas et cette stabilité géographique dont nous avons discuté n'ont pas trouvé d'explication satisfaisante pour le moment.

Summary

The genus *Rhodnius* contains 12 species, among which three are vectors of human Chagas disease in the Northern parts of Latin America. The most important vector, *Rhodnius prolixus*, occurring in Venezuela, Colombia and parts of Central America, is morphologically close to some other species without public health importance, like the Brazilian *R. neglectus* or the widely distributed *R. robustus*. Thus, confusion may arise, giving *R. prolixus* a doubtful geographic distribution and some uncertain ecological features.

We used isoenzyme electrophoresis as a diagnostic tool in the genus *Rhodnius*, and observed the following results:

- Fixed differences at 6 loci out of 17 were observed separating the morphologically similar, allopatric, *R. neglectus* and *R. prolixus*. These important genetic differences were confirmed by laboratory sterility between these forms.

- *R. robustus* and *R. prolixus*, two slightly different morphological forms, were not distinguishable at 17 enzymatic loci. Their genetic similarity was also attested by their complete fertility in the laboratory. Thus, we suggest that for the control strategy design against *R. prolixus* these two forms should be considered as a unique species.

- None of the four putative species of *Rhodnius* we examined presented more than one or two variable loci out of 17. Surprisingly, this tendency to monomorphism within each species was not modified by analyzing different geographical origins, or by comparing laboratory populations with natural populations. This exceptionally low isozymic polymorphism and geographical stability rest without a convincing theoretical explanation for the moment.

I . Position actuelle du problème

1. 1. La maladie de Chagas

1. 1. 1. Historique et répartition

En 1907, au Brésil, lors d'enquêtes sur le paludisme, le docteur Carlos Chagas découvre la trypanosomiase américaine (1). Il en décrira non seulement les aspects cliniques, mais aussi l'agent causal, un parasite nouveau (*Schizotrypanum cruzi*), et le vecteur, un Reduviidae (*Panstrongylus megistus*).

Depuis, on sait que cette maladie, qui se traduit par des atteintes cardiaques et digestives irréversibles, fait peser une menace constante sur près du quart de la population d'Amérique latine. Elle sévit dans toute l'étendue du sous-continent et touche entre 16 et 18 millions de personnes (2) et peut être transmise par de nombreux Reduviidae différents.

1. 1. 2. Le parasite et son cycle

Cette parasitose est due à un protozoaire flagellé de l'ordre des Kinetoplastida, *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, Chagas 1909. Ce parasite est très répandu dans la nature, où il infecte plus d'une centaine d'espèces animales (3). A côté de ce cycle sauvage très étendu, on définit un cycle domestique entretenu par quelques vecteurs bien adaptés à l'homme.

Le cycle évolutif du parasite implique en général deux hôtes successifs, un hôte vertébré réservoir et un insecte vecteur :

Le rédive vecteur se contamine en absorbant les formes infestantes du parasite chez le mammifère-hôte. Celles-ci arrivent dans l'intestin antérieur du triatominae et se transforment en amastigotes et sphaeromastigotes, évoluent rapidement (4) en épimastigotes et sont entraînés vers l'intestin moyen où ils subissent une phase de multiplication intense. Après passage dans l'intestin postérieur, ces épimastigotes vont s'accrocher à la paroi du rectum. Ils vont encore subir des divisions et certaines d'entre elles, asymétriques, donneront des trypomastigotes métacycliques infestants. Le développement chez l'insecte dure de 8 à 21 jours. Il n'existe pas de transmission transovarienne.

Lors de la piqûre d'un hôte vertébré, les formes infestantes sont évacuées d'abord par l'urine (5) puis par les déjections du vecteur sur le tégument de l'hôte. Ces métatrypanosomes pénètrent activement par le point de piqûre, une muqueuse saine, ou une blessure et dans un premier temps se localisent dans les macrophages du derme et du tissu sous-cutané. Ils passeront ensuite dans la circulation sanguine et se dissémineront dans l'organisme.

D'un point de vue clinique, on distingue :

- une phase aigüe, faisant suite à l'infection, et pouvant être asymptomatique ou grave (elle peut entraîner la mort par myocardite aigüe ou méningoencéphalite, surtout chez les jeunes enfants); elle

n'est diagnostiquée que dans 1 à 2% des cas.

- Une phase indéterminée lui faisant suite, asymptomatique.
- Et une phase chronique avec dans 30 à 40% des cas, des atteintes cardiaques, digestives, ou nerveuses.

L'homme s'infecte le plus souvent par le contact avec les déjections d'un vecteur domestique, mais d'autres modes de transmission sont décrits, dont les plus importants sont la transfusion de sang et la transmission congénitale. Certains modes exceptionnels ont été également décrits : l'infection accidentelle de laboratoire, la greffe d'organe, et même l'ingestion *per os*.

1. 2. Présentation des vecteurs

La transmission de *T. cruzi* à l'homme est assurée principalement par une punaise américaine, gros insecte hématophage capable de vivre aux dépens de l'homme et de ses animaux domestiques. Rappelons qu'un vecteur est "un arthropode hématophage qui assure la transmission biologique (ou mécanique) active d'un agent infectieux d'un vertébré à un autre vertébré " (6). Les vecteurs de la maladie de Chagas trouvent refuge dans l'habitat même de l'homme, à l'intérieur des fissures dans les murs, le toit ou le sol, et peuvent y développer des colonies considérables : ils sont dits "domestiques", par opposition aux vecteurs "sauvages" ou "exanthropiques" qui vivent généralement loin de l'homme, associés à des animaux sauvages. Ils appartiennent tous à la sous-famille des Triatominae (Hemiptera : Réduviidae).

Les Triatominae, comme tous les Hémiptères, sont des insectes exoptérygotes hétérométaboles dont les larves ressemblent déjà aux adultes (elles ne sont cependant pas ailées) et ont un mode de vie semblable à celui de l'adulte. Dans la famille des Reduviidae, on trouve beaucoup de prédateurs d'autres insectes, et seule la sous-famille des Triatominae présente une trompe fine capable de se redresser grâce à la présence d'une membrane articulaire entre le deuxième et le troisième segment (7), preuve de l'adaptation à l'hématophagie. Dans cette sous-famille, tous les stades et les deux sexes sont hématophages stricts.

On reconnaît actuellement 117 espèces de Triatominae, regroupées en 5 tribus et 14 genres.

1. 3. Lutte contre l'endémie

Il est illusoire de vouloir s'attaquer au réservoir animal du parasite puisque plus d'une centaine d'espèces différentes hébergent ce trypanosome (la plupart sont de petits mammifères; les oiseaux, hôtes fréquents des triatomes, sont réfractaires à *Trypanosoma cruzi*).

A ce jour, en l'absence d'un vaccin ou d'un traitement efficace, la seule action envisageable à court terme contre cette endémie est de faire obstacle à la transmission en luttant contre les vecteurs, domestiques. Trois genres sont impliqués dans la transmission à l'homme : *Panstrongylus*, *Triatoma*, et *Rhodnius*. Plus de 66 espèces de Triatominae ont été trouvées naturellement infectées par *Trypanosoma cruzi* (8). Parmi ces espèces une quarantaine se

rencontrent dans des écotopes proches de l'homme, mais une douzaine seulement occupent l'habitat domestique et représentent un problème de santé publique. Ces quelques espèces sont les "vecteurs domestiques" mentionnés plus haut (au paragraphe 1.2): elles sont responsables de la grande majorité des infections humaines, quoique de façon très inégale.

Chez les Triatominae, pour qu'un rédive infecté soit un vecteur efficace, quelques caractéristiques sont requises (7) : adaptation à l'homme, délai bref entre la prise de nourriture et la défécation, et extension géographique importante.

Ainsi, actuellement, trois espèces sont considérées comme les vecteurs les plus importants : *Triatoma infestans* au sud de l'Amazonie (le sud du Pérou, et les six pays du "Cono Sur"), *T. dimidiata* en Amérique centrale, en Equateur, et au nord du Pérou, et *Rhodnius prolixus* au Vénézuéla, en Colombie, et dans certains pays d'Amérique Centrale. Dans le genre *Rhodnius*, outre *R. prolixus*, deux espèces jouent un rôle local : l'un, *R. ecuadoriensis* assure la transmission en milieu domestique en Equateur et au Pérou, et l'autre, *R. pallescens* transmet au Panama et dans le nord de la Colombie. *R. prolixus* est connu en tant que vecteur principal ("susceptible d'assurer à lui seul le maintien d'une endémie", (6)) dans la plupart des régions situées au nord de l'Amazonie. C'est par ailleurs l'espèce qui détient le record de rapidité entre la prise de sang et la défécation (3).

La lutte contre un vecteur strictement domestique (*T. infestans*) a déjà été menée dans plusieurs pays, notamment au Brésil (9). Dans le cas de cette espèce, les critères morphologiques, isoenzymatiques et cytogénétiques concordent pour la distinguer sans équivoque des autres espèces, et par conséquent son écologie et sa distribution géographique sont bien connues. Les experts sont donc confiants quand ils annoncent que l'élimination des populations domestiques de *T. infestans* est une tâche techniquement et financièrement envisageable (OPS, 1991).

Ce n'est pas le cas de *R. prolixus* dont on connaît mal l'écologie (est-ce une espèce strictement domestique ou non ? (10)) et la distribution géographique (11; 12), faute d'une identification morphologique fiable.

Le but de ce travail est de vérifier si l'électrophorèse des isoenzymes peut contribuer à identifier correctement les espèces vectrices dans le genre *Rhodnius*.

Nous allons donc dans un premier temps recenser les problèmes que les vecteurs du genre *Rhodnius* posent actuellement; nous aborderons ensuite une notion fondamentale à la compréhension de cette étude, qui est celle du concept de l'espèce en biologie, et nous définirons les conditions techniques de nos analyses. Enfin nous présenterons les résultats obtenus et discuterons de leurs implications épidémiologiques.

1. 4. Le genre *Rhodnius*

Le genre *Rhodnius* créé par Stal (1859) contenait deux espèces, *R. prolixus* et *R. nasutus*, distinguées des autres Triatominae principalement par la longueur de la tête et l'insertion apicale des antennes. Actuellement, ce genre compte 12 espèces et une treizième, *R. pratai*, est en cours de description (Jurberg, in prep. ; Schofield, comm. pers.).

Les espèces de ce genre présentent toutes des convergences morphologiques, dues sans doute à leur habitat généralement arboricole. Aussi, sur la base de ces arguments morphologiques et écologiques, ce genre est actuellement considéré comme un groupe monophylétique (13).

Les espèces de *Rhodnius* ont une large distribution géographique depuis le sud du Mexique jusqu'en Bolivie, et dans le sud du Brésil. Certaines ne sont répertoriées qu'en habitat sylvatique tandis que d'autres envahissent les maisons ou les poulaillers jouxtant celles-ci (voir tableau 1). Des membres de ce genre se restreignent aux zones arides (*R. neivai*, *R. nasutus*, *R. ecuadoriensis*), alors que d'autres occupent des régions très humides (*R. brethesi*, *R. paraensis*) ou humides (*R. domesticus*, *R. pallescens*, *R. neglectus*); certaines enfin couvrent des zones d'écologie très variée (*R. prolixus*, *R. pictipes*, *R. robustus*).

Parmi ces douze espèces, trois sont bien connues en habitat domestique où elles jouent un rôle vecteur important : il s'agit de *R. pallescens* au Panama et au nord de la Colombie, *R. ecuadoriensis* en Equateur et au nord du Pérou, et *R. prolixus* au Vénézuéla, en Colombie et dans quelques endroits en Amérique Centrale. La répartition géographique de cette dernière, discontinue en Amérique Centrale (elle est absente au Panama) est attribuée à ses hôtes aviaires (notamment la cigogne migratrice *Mycteria americana*) dans les plumes desquels l'insecte pond ses oeufs par paquets englués (15). Toutefois, la ressemblance entre le vecteur principal, *R. prolixus*, et d'autres espèces peu importantes pour l'homme, en particulier *R. nasutus*, *R. neglectus* (espèces sylvestres confinées au Brésil) et *R. robustus*, dont la distribution géographique couvrirait sept pays, conduit à des confusions. Dans leur révision des Triatominae, Lent & Wygodzinsky, 1979, proposent une clé de détermination morphologique susceptible de distinguer sans confusion possible toutes les espèces de *Rhodnius* (7). Quelques espèces, comme *R. ecuadoriensis*, *R. paraensis*, *R. domesticus*, sont assez faciles à reconnaître sur la base de critères morphologiques. Toutefois, les auteurs précisent que dans leur étude, ils n'ont utilisé que cinq individus par espèce. Ils reconnaissent par exemple que les "petits robustus" seront difficilement distinguables des "grands prolixus". Cette possibilité de confusion nuit évidemment à la connaissance de l'écologie de ces espèces, en particulier il devient difficile de cerner leurs adaptations respectives à l'homme. Par ailleurs, la ressemblance de *R. prolixus* et de *R. robustus* avec d'autres espèces, comme *R. neglectus*, peut également remettre en question leurs distributions géographiques.

(a) Distribution géographique : les rapports mentionnant l'existence de *R. prolixus* au Brésil, publiés (11) ou non, avaient été considérés comme le résultat de confusions avec *R. neglectus*. Toutefois, les récentes réinfestations de poulaillers dans le centre du Brésil par "*R. neglectus*" (16) ont été attribuées ensuite à *R. prolixus* (12).

Tableau 1 : Biologie et Ecologie des espèces du genre *Rhodnius*

ESPECES	AUTEURS	DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE	HABITAT
<i>R. brethesi</i>	Matta, 1919	Brésil (Amazonas, Para), Colombie, Vénézuéla.	tropical humide sylvatique (palmiers)
<i>R. dalessandroi</i>	Carcavallo et Barretto, 1976	Colombie	sylvatique
* <i>R. domesticus</i>	Neiva & Pinto, 1923	Brésil (Bahia, Esperito Santo, Rio de Janeiro, Parana, Santa Catarina, Sao Paulo)	sylvatique (Broméliacées ou terriers)
* <i>R. ecuadoriensis</i>	Lent & Leon, 1958	Equateur, Pérou	climat aride sylvatique (palmiers), péridomestique et domestique
* <i>R. nasutus</i>	Stal, 1859	Nord Est Brésil (Ceara, Piaui, Rio Grande do Norte)	climat aride sylvatique, péridomestique et domestique
* <i>R. neglectus</i>	Lent, 1954	Brésil (Bahia, Goias, Mato Grosso, Minas Gerais, Parana, Sao Paulo)	sylvatique (palmiers), péridomestique et domestique (7)
<i>R. neivai</i>	Lent, 1953	Colombie, Vénézuéla	climat aride sylvatique (palmiers)
* <i>R. pallenscens</i>	Barber, 1932	Panama, Belize, Colombie	climat humide sylvatique (palmiers), péridomestique et domestique
* <i>R. paracensis</i>	Sherlock & al, 1977	Brésil (Para)	climat tropical humide sylvatique (terriers)
* <i>R. pictipes</i>	Stal, 1872	Brésil (Amazonas, Goias, Mato Grosso, Para, Rondonia) Colombie, Equateur, Guyane Française, Guyana, Pérou, Surinam, Trinité, Vénézuéla	sylvatique (palmiers) péridomestique et domestique
* <i>R. prolixus</i>	Stal, 1859	Bolivie (7), Brésil (Amazonas, Goias, Para) (7, 11), Colombie, Costa Rica, Guyane Française, Guatemala, Guyana, Honduras, Mexico, Nicaragua, El Salvador, Vénézuéla	sylvatique (palmiers) (15) péridomestique et domestique
* <i>R. robustus</i>	Larrousse, 1927	Bolivie (7), Brésil (Amazonas, Para (7), Rondonia (14)), Colombie, Equateur, Guyane Française, Pérou, Vénézuéla	sylvatique (palmiers, Broméliacées)

* : infection naturelle à *T. cruzi* reportée

Les chiffres entre parenthèses se rapportent aux références suivantes :

- (7) : Lent & Wygodzinsky, 1979
- (11) : Diotaiuti, 1984
- (14) : Miles, Arias, De Souza, 1983
- (15) : Gamboa, 1963

(b) Ecologie : des campagnes de traitement ont déjà été réalisées contre *R. prolixus*, et ont connu un certain succès dans les années 1960, malgré un petit foyer de résistance à la dieldrine vite circonvenu. Les réinvasions observées ces dix dernières années ne reçoivent pas d'explication satisfaisante: trouvent-elles leur origine dans un ou plusieurs foyers domestiques mal traités, ou sont-elles le résultat de l'invasion progressive des constructions domestiques par une population sylvestre dont l'importance avait été sous-estimée ? L'état des connaissances concernant ce vecteur est le suivant :

- Avant 1960, *R. prolixus* était connu uniquement en tant qu'espèce domestique, tandis que *R. robustus* était considérée comme une espèce strictement sylvatique.

- Puis Gamboa (15;17) a trouvé des spécimens qu'il a identifiés comme *R. prolixus* dans des palmiers voisins des maisons dans la région des Llanos au Vénézuéla, ainsi que des oeufs et des petites larves dans les plumes des cigognes; on en a conclu que cette espèce possédait probablement des foyers sylvatiques et que le Vénézuéla devait constituer son foyer d'expansion géographique.

- L'importance de ces foyers sylvestres n'a pas pu être clairement établie en raison des confusions possibles avec *R. robustus*.

- Harry (10;18) a étudié plusieurs populations domestiques de *R. prolixus* ainsi qu'une population (sylvestre) de *R. robustus*. Malgré de légères, mais constantes différences morphologiques, les données morphométriques, éthologiques et isoenzymatiques n'ont pas permis de distinguer ces deux espèces. Cette étude a contribué à mettre en doute que *R. prolixus* et *R. robustus* constitueraient deux espèces différentes.

Les réponses à ces questions auront d'importants retentissements sur les stratégies de lutte anti-vectorielle :

- s'il s'avère que cette espèce est hautement adaptée à l'habitat domestique, son éradication peut être envisagée selon les mêmes principes que ceux qui sont appliqués pour *T. infestans* dans les pays du Cône Sud (19).

- mais si des foyers sylvatiques importants existent, capables de réalimenter l'habitat domestique, les stratégies de contrôle deviennent très différentes et plus coûteuses; il faudra en effet établir un inventaire complet de toutes les populations domestiques et sauvages de l'espèce, avec leur répartition géographique exacte, avant de pouvoir entamer de véritables campagnes d'assainissement.

On comprend donc que l'introduction de méthodes complémentaires à l'analyse morphologique est devenue indispensable, et d'un intérêt majeur pour les programmes de santé publique.

II. Rappels sur la notion d'espèce

2. 1. Présentation

Jusqu'au début du vingtième siècle, le concept morphologique de l'espèce a dominé la taxonomie, et une grande partie de la pensée contemporaine sur l'espèce repose encore sur lui. En effet, les premiers naturalistes, tels Linné, qui découvraient de nouvelles formes et avaient le souci de les classer, se basaient sur des différences observables pour les décrire. Avec le développement de nouvelles techniques, ces observations ont pu devenir de plus en plus fines et les classifications meilleures. Le premier but, lors de ces descriptions, était de présenter la diversité du monde vivant de façon ordonnée: les taxons avaient valeur d'unités de classement.

Cependant, une unité de classement ne recouvre pas toujours une même réalité biologique. Un exemple spectaculaire est celui des espèces "jumelles": il s'agit de populations naturelles sexuellement isolées mais indistinguables morphologiquement ("sibling species" (20)).

Le fondement biologique de l'espèce a donné lieu à plusieurs concepts. Nous en retiendrons ici deux parmi les plus importants: le concept "biologique", basé sur le critère mixiologique, et le concept évolutif, qui fait appel au critère de différenciation génétique.

2. 2 Critère mixiologique ou de l'isolement reproductif

Il est à la base du concept "biologique" de l'espèce, et correspond à une idée familière à la plupart des taxonomistes : même ceux qui défendent le concept morphologique fondent leur décision, quand c'est possible, sur l'argument biologique d'interfécondité (20).

Mayr (1974) définit une espèce comme étant "un groupe de populations naturelles capables d'intercroisement et qui est reproductivement isolé d'autres groupes semblables". L'espèce constitue donc une communauté reproductrice, une unité génétique indépendante des autres espèces.

Dans cette acception de l'espèce, le processus de spéciation serait un appauvrissement ou une interruption d'origine biologique du flux génique entre populations. Dobzhansky (21) a classé les mécanismes biologiques responsables de l'isolement reproductif, parmi lesquels l'isolement géographique n'est pas retenu : l'isolement physique dû à l'éloignement géographique peut exister entre populations locales d'une même espèce .

Précisons que cette définition ne se prête à des démonstrations statistiques qu'en sympatrie et, bien entendu, pour des organismes à reproduction sexuée. Certaines démonstrations restent cependant possibles également en allopatrie, si des croisements expérimentaux sont réalisables.

Sur la base du critère mixiologique, en sympatrie, le problème de la reconnaissance d'espèces

jumelles semble pouvoir se résoudre de manière assez simple en pratique grâce à l'électrophorèse des isoenzymes : en effet, un seul allèle alterne suffit à démontrer que deux populations n'échangent pas de gènes. Cette démonstration est même possible sur de très petits échantillons (5 ou 6 individus, voir plus loin).

En allopatrie, les différences révélées par l'électrophorèse des isoenzymes ne sont pas directement interprétables en fonction du critère mixiologique : on ne peut prétendre mettre en évidence des échanges de gènes qui ne peuvent évidemment pas se produire, vu la séparation géographique des populations étudiées. Si les populations peuvent être élevées en captivité, on peut tenter des croisements en laboratoire. Seule l'obtention d'hybrides stériles fera conclure à un isolement reproductif authentique; en effet, d'autres résultats (croisements non réalisés, fertilité plus ou moins complète) ne sont pas interprétables car entre la nature et le laboratoire, toutes les barrières d'isolement prézygotiques sont éliminées, et d'autres barrières ont pu être introduites.

Si l'obtention d'hybrides stériles n'a pu être démontrée entre populations allopatriques, ou si un élevage en insectarium n'est pas possible, le critère mixiologique n'est plus utilisable.

2. 3. Critère de la différenciation génétique

Ce critère est utilisé dans le concept évolutif de l'espèce, dans lequel les espèces sont des populations qui ont connu, et connaissent encore, une "histoire" évolutive indépendante. Cette idée se base sur le fait que généralement deux espèces sont séparées depuis plus de temps et de façon plus drastique que ne le sont des populations locales d'une même espèce. Avec le temps, des espèces développent des adaptations différentes à divers environnements, elles accumulent de nombreuses mutations qui les différencient, et connaissent chacune un destin évolutif propre. Sur la base de cette hypothèse, on peut s'attendre à rencontrer des différences génétiques plus importantes entre espèces qu'entre populations conspécifiques. A travers ce concept, on comprend mieux les enjeux d'une estimation correcte des différences génétiques, et l'importance d'une utilisation adéquate de ces différences dans la classification des organismes étudiés (*).

Ce concept n'est pas incompatible avec le précédent, car souvent l'interstérilité des formes explique le maintien des espèces dans des directions évolutives différentes. Mais d'autres causes que l'interfécondité peuvent assurer une cohésion des espèces en unités évolutives, comme par exemple des contraintes écologiques.

() La distance de Nei est une mesure qui se prête bien à l'examen de l'espèce selon le concept évolutif, puisque sa valeur augmente de façon à peu près linéaire avec le temps (22). Toutefois, cette distance n'est pas recommandée dans l'élaboration d'arbres phylogénétiques, car sa transformation logarithmique ($D = \ln I$) exacerbe les différences, et peut même atteindre l'infini. La théorie nécessaire pour maîtriser les techniques phylogénétiques requiert un niveau élevé de spécialisation. Pour notre part, nous nous contenterons d'apprécier grossièrement si les distances obtenues restent compatibles avec celles que l'on rencontre habituellement entre populations locales d'une même espèce.*

Les avantages de ce point de vue sont intéressants : non seulement il est applicable à des organismes à reproduction uniparentale, car il ne dépend plus du mode de reproduction de l'espèce, mais encore il permet de s'affranchir des limites spatiales du précédent et ce concept reste valable autant en allopatrie qu'en sympatrie.

Le principal inconvénient est de déterminer à partir de quelle distance génétique on est en présence de deux espèces différentes : inévitablement un degré d'arbitraire important entre alors en jeu.

2. 4. Application à notre étude

A propos des *Triatominae*, Usinger & al. (23) concluent, sur la base de nombreuses expériences de croisement en laboratoire, que la définition biologique de l'espèce définie par Mayr est applicable aux *Triatominae*.

Toutefois, ces mêmes auteurs, et d'autres aussi, nous mettent en garde contre certaines simplifications:

1/ Dans le genre *Triatoma*, Usinger & al. (23) soulignent l'absence de concordance entre les ressemblances morphologiques et le degré d'isolement reproductif entre espèces. Dans le genre *Rhodnius*, des observations comparables ont été faites. Dans un groupe d'espèces morphologiquement très proches au point de donner lieu à des confusions, certaines d'entre elles manifestent une stérilité complète en laboratoire (24;12), alors que d'autres sont parfaitement fertiles (10;7).

2/ Barrett (25) fait observer que certaines populations géographiques d'une même espèce de *Rhodnius* seraient stériles, ou partiellement stériles en laboratoire. Cette observation contredit la définition biologique de l'espèce, ou suggère d'éventuelles confusions dans l'identification de l'espèce en question.

3/ Le même auteur met en évidence de nettes gradations dans l'isolement reproductif observé entre espèces du genre *Rhodnius*.

Dans l'étude de ce genre, il nous faut donc nous protéger de deux sources d'erreur : l'une qui consisterait à ne pas mettre en doute le critère morphologique, et l'autre qui accorderait trop d'importance à la fertilité entre deux formes. Cette précaution justifie le choix de la technique utilisée, l'électrophorèse des isoenzymes : comme on l'a vu, cette technique détecte des espèces jumelles de manière simple et élégante, et convient par ailleurs très bien à la mesure des différences génétiques entre populations.

Ici, nous avons étudié quatre populations d'insectarium, identifiées comme appartenant aux espèces *R. prolixus*, *R. robustus*, et *R. neglectus* pour deux d'entre elles, une population issue de

croisements entre des *R. prolixus* et des *R. robustus* fournie par l'IMT d'Anvers, et une population sylvestre de *R. ecuadoriensis*. On considèrera donc qu'on est en présence d'un échantillonnage allopatrique.

En dépit des tentatives qui se sont succédées (voir page 4), il semble bien que la morphologie se révèle insuffisante pour séparer ces quatre premières populations (malgré les "étiquettes" sur les bocaux). Les croisements réalisés auparavant (26) ont montré que l'une d'entre elles seulement (*Rhodnius neglectus*) est isolée reproductivement des autres : la fécondation a lieu, la ponte également, mais les œufs n'éclosent pas.

Nous tentons dans ce travail d'évaluer l'importance des différences génétiques entre les lignées étudiées grâce à la technique d'électrophorèse des isoenzymes sur la base d'un échantillon de 14 systèmes enzymatiques (17 loci), et de vérifier leur cohérence avec les différences morphologiques et le degré d'isolement reproductif.

Dans le même temps, nous identifions les loci enzymatiques susceptibles de servir dans l'identification des espèces de *Rhodnius*, et nous mettons en place les grandes lignes stratégiques à suivre pour améliorer la classification spécifique de ce genre important.

III. Matériel et méthodes

3. 1. Matériel biologique

3. 1. 1. Populations étudiées

Nous avons analysé en électrophorèse des isoenzymes six populations appartenant au genre *Rhodnius* et un échantillon de *T. infestans* dont la provenance et l'identité supposées sont les suivantes :

1. Une population de *R. prolixus* en insectarium depuis 1974, fournie par le Dr. M. Harry, et collectée au Vénézuéla dans l'état de Cojedes en habitat domestique. Le Vénézuéla étant supposé être le foyer de dissémination de *R. prolixus*, cette origine géographique en fait une population type de l'espèce dont elle présente d'ailleurs la morphologie. On la nommera RPH.

2. Une population de *R. robustus* fournie et identifiée morphologiquement par le Pr J. Jurberg, en insectarium depuis plusieurs années, mais dont on ne connaît pas l'origine géographique précise. On l'appellera RRJ.

3. Une population de *R. neglectus* de la même source et que le Pr. J. Jurberg a aussi identifié morphologiquement. On ne connaît pas au Brésil son origine géographique exacte (probablement l'Etat de Goias). Elle sera désignée par RNgJ.

4. Une population de *R. neglectus* identifiée et fournie par le Dr. T. Barrett (Manaus, Brésil) en insectarium depuis plusieurs années, récoltée dans les états de Bahia et Sao Paulo au Brésil. On l'appellera RNgB.

5. Un échantillon d'individus issus de croisements entre des *R. prolixus* et des *R. robustus* fourni par l'IMT d'Anvers, dont nous avons prélevé 6 individus issus de la troisième génération. Il est appelé PRK.

6. Un échantillon de 5 individus de *R. ecuadoriensis* capturés sur un palmier en Equateur en 1993 par les Drs. C. Romaña et C. Schofield; c'est donc une population sauvage, notée REC.

7. Une population de *T. infestans* d'origine uruguayenne (TIU) en insectarium depuis 1989, et dont nous avons analysé 6 individus pour nous servir de référence.

3. 2. 2. Technique d'élevage

Ces populations sont maintenues dans des boîtes cylindriques transparentes (diamètre 10 cm, hauteur 20 cm) dont le couvercle a été remplacé par de la toile de polyamide. Des bandes de papier pliées en accordéon servent de support de déplacement et de ponte. Les insectes sont nourris tous les quinze jours sur un lapin : celui-ci est maintenu immobile dans une cage, et les boîtes sont renversées et fixées sur ses oreilles; la toile fine servant de couvercle permet aux triatomes de piquer le lapin. Ce protocole dure entre vingt et trente minutes et se déroule à l'obscurité.

Les boîtes d'élevage sont placées dans une chambre thermorégulée à 24°C et 70%HR. .

Précisons qu'en laboratoire, le cycle de développement d'un insecte dure environ six mois; les individus analysés ont été collectés entre le mois de janvier et le mois de mai.

3. 2. Caractérisation des populations étudiées

3. 2. 1. Morphologie

Nous avons prélevé quelques individus de quatrième et cinquième stade larvaire des populations RRJ et RPH afin de vérifier un critère morphologique de distinction entre *R. prolixus* et *R. robustus* (coloration des tibias).

3. 2. 2. Electrophorèse des isoenzymes

3. 2. 2. a- Préparation des spécimens

Les spécimens étudiés en électrophorèse sont retirés de leurs boîtes d'élevage, et immédiatement plongés à -70°C , après s'être assuré qu'ils n'ont pas été nourris depuis une semaine au moins pour éviter les interférences avec les enzymes du sang ingéré. Après une à deux heures au froid, on les prépare comme suit : l'abdomen et la tête sont séparés du thorax, qui est la seule partie dont on se servira ici (pour les adultes). Après avoir fendu longitudinalement celui-ci, on prélève uniquement les muscles afin d'avoir des échantillons propres, dépourvus de tout corps solide (morceaux de cuticule par exemple). Cette préparation se réalise sur une plaque de porcelaine posée sur la glace et servant de support. Puis ces muscles sont écrasés à l'aide d'un pilon en polypropylène et homogénéisés dans 100 μl de liquide stabilisateur d'enzyme (dithiothreitol 2mM; acide aminocaproïque 2mM; EDTA 2mM). Les échantillons seront ensuite conservés à -70°C . Les larves elles, sont broyées entièrement dans le stabilisateur d'enzyme à cause de leur petite taille ; elles ne sont donc pas disséquées comme les adultes.

3. 2. 2. b- Conditions techniques

Les électrophorèses sont conduites en acétate de cellulose. Les techniques de révélation sont inspirées de Dujardin & Tibayrenc (27) chez *T. infestans* avec quelques modifications (voir tableau 2).

3. 2. 2. c- Principes d'interprétation

L'électrophorèse des isoenzymes présente l'avantage d'être une technique de lecture indirecte du génome d'un organisme (28). En effet, le dogme de colinéarité entre la séquence d'acides aminés des protéines et la séquence de l'ADN codant pour leur synthèse implique que si deux

Tableau 2 : Conditions techniques d'électrophorèse

Enzyme	Code	Nom de l'enzyme	Tampon de réaction	Substrat	Tampon d'Imbibition	Tampon de Migration	Temps en min
ACON	E.C.4.2.1.3	aconitase	Tris HCl 0,2 M pH 8	Cis Aconitic acid 14 mg	A 1 : 0	A	20
alpha GPD	E.C.1.1.1.8	alpha-glycerophosphate déshydrogénase	Tris HCl 0,1M pH 8	DL-aglycerophosphate 30 mg	B 1 : 3,5	B	30
DIA	E.C.1.6.2.2	diaphorase	Tris HCl 0,1 M pH 8		D 1 : 1,5	D	20
G6PDH	E.C.1.1.1.4.9	glucose 6 phosphate déshydrogénase	Tris HCl 0,5 M pH 7	D-Glucose 6 phosphate 8 mg	C 1 : 0	D	20
GAPD	E.C.1.2.1.12	glyceraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase	Tris HCl 0,25 M pH 7	Fructose-1,-6 diphosphate 12,5 mg	B 1 : 3,5	B	20
GPI	E.C.5.3.1.9	glucose phosphate isomérase	Tris HCl 0,1 M pH 8	Fructose 6 phosphate 5 mg	B 1 : 7	B	15
IDH	E.C.1.1.1.42	isocitrate déshydrogénase	Tris HCl 0,1M pH 8	Isocitric acid 20 mg	B 1 : 3,5	B	20
LAP	E.C.3.4.11	leucine aminopeptidase	Tris maléique 0,2 M pH6	L-Leucine βnaphtylamide 10 mg	A 1 : 9	A	20
MDH	E.C.1.1.1.37	malate déshydrogénase	Tris HCl 0,3 M pH 8	Ac. malique; solution 1M pH 7 0,9 ml	A 1 : 0	A	35
ME	E.C.1.1.1.40	enzyme malique	Tris HCl 1 M pH7	Ac. malique; solution 1M pH7 0,6 ml	A 1 : 2	A	20
PEP 1	E.C.3.4.11	peptidase	Tris HCl 0,1 M pH 8	Leucylleucylleucine 10 mg	A 1 : 2	A	20
PEP 2	E.C.3.4.13	peptidase	Tris HCl 0,1 M pH 8	L-leucine L-alanine 10 mg	A 1 : 2	A	20
PGM	E.C.2.7.5.1	phosphoglucomutase	Tris HCL 0,25 M pH 8	D-Glucose 1 phosphate 40 mg	C 1 : 14	C	20
6PGDH	E.C.1.1.1.4.4	6 phosphogluconate déshydrogénase	Tris HCl 0,25 M pH 8	phosphogluconic acid 30 mg	B 1 : 3,5	B	30

1. Toutes les migrations sont effectuées à 200 V

2. Tampons d'imbibition :

A : tampon HR de Helena

B : tampon 1 de Shaw et Prasad, 1970

C : tampon tris maléique de Kreuzer, 1977

3. Les tampons de migration sont les mêmes que les tampons d'imbibition, mais ils sont utilisés purs.

4. Pour les tampons d'imbibition, le premier chiffre indique le volume de tampon et le deuxième le volume d'eau ajouté.

individus sont différents pour un acide aminé, leur séquence d'ADN diffère par au moins une paire de bases. Si ce changement se traduit par une différence de charge électrique (ce qui se produit en moyenne dans 40% des cas), on pourra visualiser des isoenzymes différents en électrophorèse. Rappelons que le terme d'isoenzymes fut inventé par Markert & Moller (1959) et regroupe "des enzymes de même fonction, migrant différemment à l'électrophorèse. "

L'activité enzymatique révélée sur le gel se présente sous l'aspect d'une ou plusieurs bandes colorées dont l'ensemble est appelé le zymogramme. Ces zymogrammes peuvent être identiques pour une enzyme dans toutes les populations étudiées, on dira alors que celle-ci est monomorphe, par opposition aux enzymes polymorphes qui présentent des bandes d'activité migrant à des niveaux différents selon les individus ou les populations. Ce polymorphisme peut refléter des différences entre populations ("hétérogénéité" génétique, selon G. Pasteur (29)) ou bien montrer des différences alléliques entre individus à l'intérieur d'une population avec d'éventuelles images d'hétérozygotie ("variabilité" génétique).

Pour les enzymes présentant plusieurs bandes, on notera les niveaux par ordre croissant du plus rapide au plus lent pour toutes les populations prises ensemble. On déterminera si ces bandes sont le reflet de l'activité d'un ou plusieurs loci, et pour un locus les images d'hétérozygotie nous permettront de connaître la structure quaternaire de la protéine.

3. 3 Traitement des données électrophorétiques

3. 3. 1. Fréquences alléliques et génotypiques

D'après les phénotypes observés sur les gels, les fréquences des allèles responsables de la synthèse des isoenzymes peuvent être calculées. Si l'on admet les conditions d'application de la loi de Hardy-Weinberg, les fréquences théoriques des différents génotypes peuvent être estimées à partir de ces fréquences alléliques. Puis on pourra tester la conformité de la structure génétique de la population étudiée à l'équilibre de Hardy-Weinberg par l'intermédiaire d'un χ^2 . Si l'hypothèse nulle ne peut pas être rejetée (χ^2 non significatif), la population est dite en équilibre de Hardy-Weinberg.

3. 3. 2. Taux de polymorphisme

Ce taux P représente la proportion de loci polymorphes parmi tous les loci analysés. Par convention, un locus est monomorphe si la fréquence allélique de l'allèle le plus commun est supérieure ou égale à 0, 99.

3. 3. 3. Hétérozygotie théorique moyenne

C'est l'indice de diversité génique h, dont la formule, inspirée de la loi d'Hardy-Weinberg, a

été proposée par Nei (30). Pour un locus donné,

$h = 1 - \sum q_i^2$ où q_i représente la fréquence du $i^{\text{ème}}$ allèle.

Cette valeur est calculée pour chaque locus, et l'indice moyen est alors calculé.

3. 3. 4. Comparaison entre populations

Il existe de nombreux traitements statistiques possibles de données électrophorétiques. Nous nous limiterons ici au calcul de deux indices de distances, la distance proposée par Richardson (D_R) et la distance de Nei (D_S). Nous construirons aussi un réseau de Wagner à partir des différents génotypes multiloci obtenus.

* D_R (31) :

Cette distance est basée sur la notion de "différence fixée" : on dit que deux populations possèdent un locus diagnostique lorsqu'elles ont des allèles différents fixés (aucune bande commune) à ce locus. D_R est défini par le rapport entre le nombre de loci diagnostiques entre deux populations et le nombre total de loci. On le traduit en pourcentage de loci diagnostiques.

Ce pourcentage pourra donc varier de 0 (populations partageant les mêmes allèles à tous les loci) à 100 (populations n'ayant aucun allèle commun pour tous les loci analysés).

* D_S (22;30) :

La distance standard de Nei (D_S) est basée sur la probabilité d'identité de deux allèles pris au hasard chacun dans une des deux populations comparées : D_S représente le nombre moyen de codons différents par gène entre deux génomes. En admettant l'hypothèse de l'horloge moléculaire, cette distance est proportionnelle au temps écoulé.

Les distances pourront varier de 0 pour des populations identiques à $+\infty$ pour des populations sans aucun allèle en commun.

* Dendrogramme

C'est un arbre non enraciné qui va nous permettre de visualiser le degré de différenciation évolutive existant entre les différents génotypes constitués par l'ensemble des loci enzymatiques (génotypes multiloci). Le tableau d'entrée est donc constitué par les vingt génotypes multiloci différents rencontrés à travers les sept différentes lignées étudiées, mais l'effectif de ces différents génotypes n'a pas été introduit. Sur l'arbre obtenu (figure 1), il est possible de vérifier le nombre de pas évolutifs entre les génotypes, et leur dispersion peut être appréciée en vérifiant si elle concorde avec les espèces étudiées. La construction de cet arbre non enraciné, appelé "réseau de Wagner", est basée sur le principe de parcimonie. Nos données ont été traitées par l'algorithme MIX du programme PHYLIP distribué par Felsenstein (32).

IV. Résultats

4. 1 Observations morphologiques

Peu de larves de quatrième et cinquième stade larvaire étant présentes dans les boîtes d'élevage lorsque nous avons entrepris ces observations, nous ne prétendons pas présenter ici des résultats définitifs. Néanmoins, sur neuf larves de la population RRJ examinées, le caractère spécifique de l'espèce *R. robustus* ("tibia clair") ne nous est pas apparu constant (six larves sur neuf, soit 67%), alors qu'il est conforme aux prévisions ("tibia sombre") pour la lignée RPH appartenant à l'espèce *R. prolixus*.

4. 2 Electrophorèse des isoenzymes

Les travaux antérieurs portant sur des comparaisons interspécifiques en électrophorèse des isoenzymes chez le genre *Rhodnius* ont porté sur 10 loci (33), ou 7 loci (12) en acétate de cellulose et 16 loci en gel d'amidon (18). Dans ce travail, nous analysons sept populations différentes pour 14 systèmes enzymatiques (voir tableau 2), soit 17 loci tous interprétables de manière allélique.

En acétate de cellulose, deux enzymes, la 6PGDH et la LAP, qui étaient déjà révélables chez *T. infestans* de manière satisfaisante (27;34), ne l'étaient pas pour *Rhodnius spp.*. Nous avons donc adapté les techniques pour permettre une révélation chez *Rhodnius spp.* également, et nous avons mis au point deux enzymes supplémentaires : la DIA et la GAPD .

Au total, 89 individus ont été analysés pour tous les systèmes enzymatiques parmi lesquels 28 mâles, 29 femelles, et 26 larves de quatrième et cinquième stade (les six individus issus de croisements sont de sexe inconnu). Aucune différence d'activité enzymatique n'a été mise en évidence selon le sexe, le stade de développement, ou le mode de préparation des individus. Précisons que nous n'avons pas pris de larves de stade inférieur car leur taille trop petite restreint le nombre de manipulations possibles.

4. 2. 1 Aspects isoenzymatiques communs à l'ensemble des populations analysées

Une seule zone d'activité a été observée sur les zymogrammes de 8 enzymes (ACON, GPD, GAPD, GPI, G6PDH, LAP, PGM, 6PGDH). La ME, l'IDH, et la MDH présentent deux niveaux d'activité, cependant nous ne prendrons en compte qu'une seule zone pour les deux premières, car elle est constante. La DIA en présente trois, sur lesquelles nous n'en retiendrons qu'une, pour la même raison. Enfin, les PEP montrent quatre zones d'activité, toutes analysables.

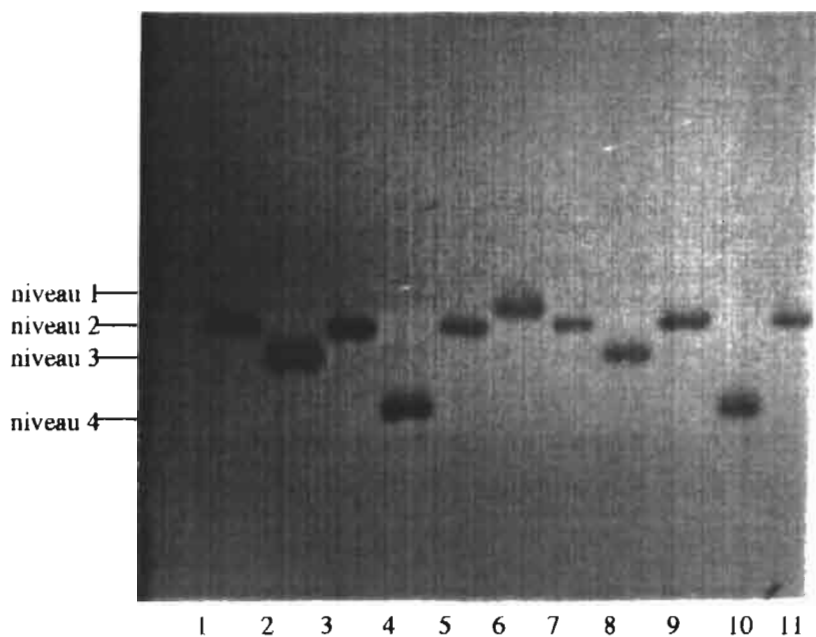


Figure 1 : Zymogramme de la GPI.

Niveau 1 : *T. infestans* (position 6) - Niveau 2 : *R. ecuadoriensis* (positions 1, 3, 5, 7, 9, 11) -
 Niveau 3 : *R. prolixus* (positions 2,8) - Niveau 4 : *R. neglectus* (positions 4, 10)

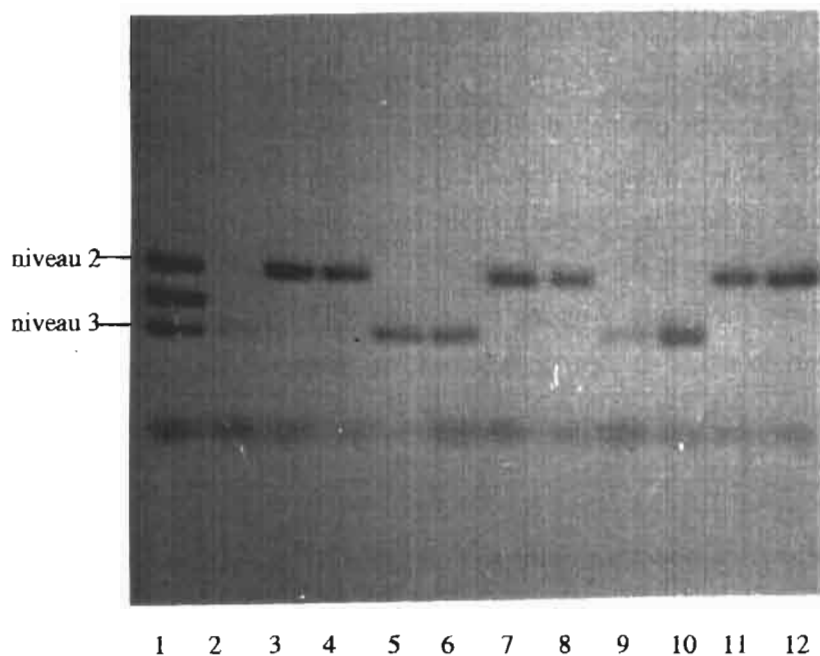


Figure 2 : Zymogramme de la GPD.

R. robustus se trouve au niveau 2 (positions 3, 4, 7, 8, 11, 12)

R. neglectus se trouve au niveau 3 (positions 2, 5, 6, 9, 10), sauf l'individu 1 qui est hétérozygote 2/3. Il ne représente pas un hybride entre les deux espèces.

Deux enzymes sur les 14 analysées (ACON et G6PDH) sont complètement monomorphes et ne présentent qu'un niveau de migration, commun à toutes les populations de *Rhodnius* et à celle de *T. infestans*.

Les enzymes polymorphes sont au nombre de trois pour l'ensemble des populations : les images d'hétérozygotie à trois bandes obtenues pour les systèmes enzymatiques GPD (voir photo figure 2) et MDH-1 suggèrent une structure dimérique, tandis que les deux bandes visualisées chez les hétérozygotes de la PGM indiquent que cette enzyme est monomérique.

4. 2. 2 Aspects isoenzymatiques observés dans chaque population

1. - TIU : Une étude de génétique des populations sur cet important vecteur de la maladie de Chagas avait été réalisée par Dujardin (26) sur les territoires Boliviens et Péruviens de la distribution de cette espèce, et avait montré 3 loci polymorphes sur 19 étudiés. Les six spécimens d'Uruguay analysés ici ne montrent aucune enzyme polymorphe.

2. - RPH, RNgJ, et REC présentent une seule enzyme où un polymorphisme est observé au niveau de la zone d'activité la plus rapide: MDH-1.

- RRJ et PRK, en plus de cette dernière, ont aussi la PGM qui est polymorphe.

- RNGB présente aussi deux enzymes polymorphes : MDH-1 et GPD.

4. 2. 3 Aspects isoenzymatiques comparés entre populations

Le nombre d'individus analysés par population est le suivant :

Population	Nbre d'individus
TIU	6
RPH	16
RRJ	23
PRK	6
RNGB	16
RNgJ	16
REC	5
<hr/>	
Total	89

Précisons que pour l'analyse inter-populations, les niveaux d'activité enzymatique sont numérotés sur l'ensemble de toutes les populations. Par exemple, si TIU et RPH présentent dans une zone d'activité le niveau le plus rapide, puis RNGB un niveau moins rapide et RNgJ le niveau le plus lent, on notera : bande 1 pour TIU et RPH, bande 2 pour RNGB, et bande 3 pour RNgJ.

4. 2. 4 Analyse des données isoenzymatiques

En fonction des aspects isoenzymatiques observés, nous comptons 17 loci interprétables de manière allélique correspondant aux 14 systèmes enzymatiques révélés.

4. 2. 4. a. Taux de polymorphisme et hétérozygotie moyenne

Pour TIU : $P = 0\%$ et $h = 0\%$.

Pour RPH, RNgJ, et REC, $P = 1/17 = 5,9\%$, et h est égal respectivement à 0,026; 0,007; et 0,030.

Pour RNGB, PRK, et RRJ : $P = 2/17 = 11,76\%$, et h est égal respectivement à 0,040; 0,043; et 0,02.

En moyenne, pour les populations du genre *Rhodnius*, $P = 8,9\%$ et $h = 0,028$.

4. 2. 4. b. - Equilibre de Hardy-Weinberg

Pour les trois loci polymorphes, aucune déviation à l'équilibre d'Hardy-Weinberg n'a été mise en évidence (voir tableau 3).

4. 2. 4. c. - Loci diagnostiques et distances de Richardson

Pour les 15 loci présentant des différences entre populations, nous avons obtenu les résultats suivants (se reporter au tableau 6 et aux figures 1 et 2) :

- 4 loci distinguent TIU des autres lignées, et présentent des niveaux communs à toutes les souches étudiées du genre *Rhodnius* : *Dia*, *Lap*, *Pep-1*, *Pep-2*.

- 3 loci présentent trois niveaux différents pour l'ensemble de l'échantillon : *Mdh-2*, *Pep-3* et *6pgdh*. On observe 1 niveau pour TIU, 1 pour REC et 1 pour l'ensemble des souches RPH, RRJ, PRK, RNGB, et RNgJ.

- Le locus *Pep-4* distingue RNGB et RNgJ (niveau 1) des autres souches qui migrent toutes au niveau 2.

- Le locus *Gpd* différencie bien RNGB et RNgJ (niveau 2) de l'ensemble RPH, RRJ, PRK (niveau 3), mais REC se trouve également au niveau 2, tandis que TIU occupe le niveau le plus rapide (1).

- La *Gpd* est polymorphe pour la seule population RNGB (niveaux 2 et 3). Le niveau 2 regroupe aussi REC, RRJ, PRK, et RPH, tandis que RNgJ se trouve au niveau 3 et TIU au niveau 1.

- Le locus *Mdh-1* est le seul locus polymorphe pour toutes les populations de *Rhodnius* étudiées, tandis qu'il est monomorphe pour *T. infestans*. On distingue quatre niveaux : 1 et 2 recouvrent RRJ, RPH, PRK, RNGB, RNgJ, (et TIU au seul niveau 2), tandis que 3 et 4 distinguent REC.

- Enfin, 4 loci (*Gpi*, *Idh*, *Me*, *Pgm*) séparent de manière très nette quatre groupes de populations: (a) TIU, (b) REC, (c) RNGB et RNgJ et (d) RPH, RRJ, et PRK.

Tableau 3 : Fréquences alléliques et tests de conformité à l'équilibre de Hardy-Weinberg pour les enzymes polymorphes.
Ces tests n'ont pas été réalisés pour les populations PRK et REC car leurs effectifs sont trop petits.

	MDH-1	MDH-1	X2	GPD	GPD	X2	PGM	PGM	X2
	1	2		2	3		1	2	
RNgB	0,27	0,73	<u>2,32 n.s</u>	0,18	0,82	<u>0,095 n.s</u>	0	0	
RNgJ	0,06	0,94	<u>1,08 n.s</u>	0	1		0	0	
RRJ	0,05	0,95	<u>1,09 n.s</u>	1	0		0,84	0,16	<u>2,01 n.s</u>
RPH	0,33	0,67	<u>0,96 n.s</u>	1	0		1	0	

Tableau 4 : Distances de Richardson entre populations (en pourcentage)

	TIU	REC	RNgB	RNgJ	RPH	RRJ	PRK
TIU							
REC	76,5						
RNgB	76,5	52,9					
RNgJ	76,5	58,9	0				
RPH	76,5	52,9	35,3	41,2			
RRJ	70,6	52,9	35,3	41,2	0		
PRK	70,6	52,9	35,3	41,2	0	0	

Tableau 5 : Distances de Nei entre populations

	TIU	REC	RNgB	RNgJ	RPH	RRJ	PRK
TIU							
REC	1,430						
RNgB	1,490	0,690					
RNgJ	1,460	0,790	<u>0,005</u>				
RPH	1,490	0,750	0,480	0,510			
RRJ	1,380	0,730	0,460	0,480	0,006		
PRK	1,370	0,700	0,440	0,520	0,007	0,003	

Tableau 6 : Aspects isoenzymatiques observés dans chaque population pour les 15 loci susceptibles de les différencier. Les 2 loci restant (ACON et G6PDH) ne figurent pas ici, car ils présentent un niveau de migration commun à toutes les populations.

loci	niveaux	TIU	REC	RNgB	RNgJ	RRJ	PRK	RPH
Gpd	1	+						
Gpd	2		+	+		+	+	+
Gpd	3			+	+			
Dia	1		+	+	+	+	+	+
Dia	2	+						
Gapd	1	+						
Gapd	2		+	+	+			
Gapd	3					+	+	+
Gpi	1	+						
Gpi	2		+					
Gpi	3					+	+	+
Gpi	4			+	+			
Idh	1					+	+	+
Idh	2			+	+			
Idh	3		+					
Idh	4	+						
Lap	1		+	+	+	+	+	+
Lap	2	+						
Mdh-1	1				+	+	+	+
Mdh-1	2	+		+	+	+	+	+
Mdh-1	3		+					
Mdh-1	4		+					
Mdh-2	1			+	+	+	+	+
Mdh-2	2		+					
Mdh-2	3	+						
Me	1			+	+			
Me	2					+	+	+
Me	3	+						
Me	4		+					
Pep-1	1		+	+	+	+	+	+
Pep-1	2	+						
Pep-2	1		+	+	+	+	+	+
Pep-2	2	+						
Pep-3	1	+						
Pep-3	2			+	+	+	+	+
Pep-3	3		+					
Pep-4	1			+	+			
Pep-4	2	+	+			+	+	+
Pgm	1					+	+	+
Pgm	2	+				+	+	
Pgm	3		+					
Pgm	4			+	+			
6pgdh	1	+						
6pgdh	2		+					
6pgdh	3			+	+	+	+	+

- Ainsi, nous avons recensé un minimum de 12 loci diagnostiques entre TIU et toutes les populations de *Rhodnius*, soit une $D_r = 12/17 = 70,6\%$ entre les deux genres (cf tableau 4).

- La population REC se sépare bien des autres populations de *Rhodnius* avec un minimum de 9 loci diagnostiques ($D_r = 53\%$).

- Par contre RRJ, RPH, et PRK partagent des bandes communes à tous les loci et ne se distinguent donc pas du tout entre eux sur la base de la distance D_r ; l'allèle *Pgm2* est absent chez RPH, de sorte que la distance D_s n'est pas nulle.

- De même, RNGB et RNJ ne présentent aucun locus diagnostique ($D_r = 0\%$).

- Entre le groupe RRJ-RPH-PRK et RNGB-RNJ, on relève une distance minimale $D_r = 35,3\%$.

4. 2. 4. d. - Distances de Nei

Elles sont estimées à partir des loci variables et des loci non variables.

Elles sont présentées dans le tableau 5 et varient de 0,003 entre RRJ et PRK à 1,49 au maximum entre TIU et RPH (ou TIU et RNGB).

4. 2. 4. e. - Réseau de Wagner

Cet arbre non enraciné est présenté sur la figure 3. Entre chaque intersection est indiquée la distance patristique, ou nombre de pas évolutifs, permettant de quantifier les divergences évolutives entre les populations.

On observe quatre groupes différents sur cet arbre :

- TIU (*T. infestans*) est séparé des *Rhodnius* par un minimum de 28 pas évolutifs.

- Les trois génotypes multiloci de *R. ecuadoriensis* (REC) s'individualisent nettement et sont éloignés d'une distance supérieure à 19 pas des autres groupes de *Rhodnius*.

- Le troisième groupe est constitué par les cinq génotypes multiloci des deux populations identifiées "*R. neglectus*" : RNJ et RNGB.

- Enfin le dernier ensemble est représenté par les populations RRJ, PRK, et RPH, c'est-à-dire par un "mélange" de deux espèces : *R. prolixus* et *R. robustus*.

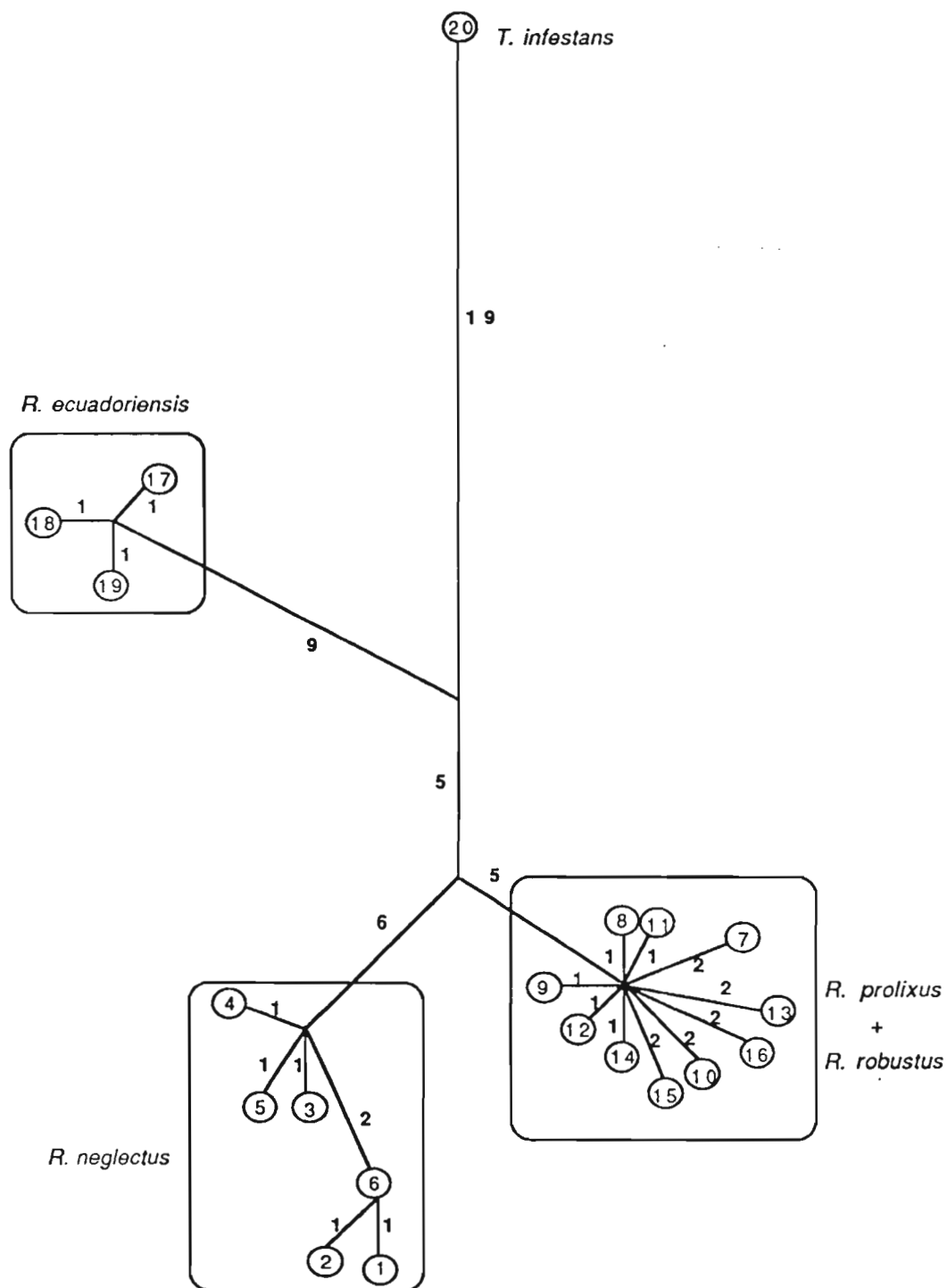


Figure 3 : Réseau de Wagner reliant les 20 génotypes multiloci des sept populations étudiées. Les chiffres en gras le long des branches indiquent les distances patristiques entre les populations. Les chiffres entourés correspondent aux génotypes multiloci : (1-4 : RNgB ; 5-6 : RNgJ ; 7-10 : PRK ; 11-13 : RRJ ; 14-16 : RPH ; 17-19 : REC ; 20 : TIU).

V. Discussion

5. 1. Variabilité génétique

Nos résultats suggèrent une très faible variabilité génétique au sein de nos échantillons. En effet, le taux de polymorphisme varie de 0% (TIU) à 12% au maximum (pour RNGB, RRJ et PRK), tandis qu'on observe une hétérozygotie moyenne d'environ 3%.

Ces valeurs ne sont pas imputables à l'insuffisance de la technique, puisqu'avec les mêmes méthodes, on trouve une variabilité très importante chez d'autres invertébrés, où l'on parle communément de 50% de loci polymorphes (35). Elles ne peuvent pas non plus être attribuées aux petits effectifs de notre échantillon, car d'autres auteurs font la même observation que nous sur de plus grands effectifs (33;10; Pereira *et al.*, en prep.).

Cette tendance au monomorphisme ouvre un débat dont nous présentons ici les deux argumentations, l'une faisant appel à la sélection par l'environnement, l'autre se basant sur le concept de la dérive génique :

1. Chez certaines catégories d'insectes, notamment les insectes "spécialistes" (36), la variabilité génétique pourrait diminuer en raison de leurs conditions de vie dans un milieu homogène. Cette hypothèse reflète la théorie de la niche écologique, qui suggère que le taux de variabilité génétique peut être considéré comme une stratégie adaptative. Dans le cas des Triatominae, Schofield (37) a montré que les populations domestiques évoluent dans un environnement stable par rapport à celle de l'habitat sylvatique, et a avancé cette observation comme hypothèse (13) expliquant la tendance au monomorphisme constatée dans les populations domestiques de *T. infestans* ($P = 16\%$, $h = 0,04$ (27;34)). Cependant, les espèces sylvestres examinées à ce jour ne montrent pas de tendance évidente à une plus grande variabilité génétique. En effet, Dujardin *et al.* (38) ont étudié des populations sylvatiques de *T. infestans*, et ont trouvé un taux de polymorphisme de 12%, les loci polymorphes étant les mêmes que ceux des populations domestiques (*Pgm*, *6pgdh.*). Pereira *et al.* (en prep.) ont étudié des populations d'insectarium et des populations sauvages de *T. delpontei* provenant d'Argentine et d'Uruguay, et n'ont trouvé qu'un locus variable (*Lap*) sur vingt trois, le même dans les deux échantillons. Les mêmes auteurs font des observations comparables sur des populations naturelles de *T. platensis* provenant d'Uruguay et du Brésil. Dans le genre *Rhodnius*, Dujardin (26) ne révélait qu'un locus variable (*Pgm*) sur 10 dans un échantillon de *R. pictipes* capturés en conditions sylvestres en Bolivie; Harry (10) a observé des taux variant de 5 à 21% pour des populations domestiques de *R. prolixus*, mais un taux comparable, 15,8%, pour une population sylvestre de *R. robustus*. Notons qu'encore une fois, dans les deux espèces, les mêmes loci sont variables. Nos résultats aboutissent à un taux moyen de polymorphisme de 8,9% pour les populations du genre *Rhodnius*. Il est remarquable de constater que notre population sauvage de *R. ecuadoriensis* ne présente qu'un polymorphisme de 5,8%. Enfin, nous avons aussi analysé un individu de cette espèce mais provenant du Pérou et nous l'avons trouvé identique à ceux d'Equateur.

Il semble donc bien difficile de soutenir que l'hétérogénéité du milieu sylvatique ait une répercussion évidente sur la variabilité de ces populations.

2. A côté de l'argument d'une adaptation à un milieu uniforme, un autre argument évoqué pour expliquer la faible variabilité est la dérive génique, un processus évolutif génétique qui dépend de la taille efficace de la population (nombre d'individus qui se reproduisent) et dont le produit final est l'absence de variabilité génétique. Un événement naturel provoquant de la dérive génique est la fondation d'une population par un petit nombre d'individus ("effet fondateur"). Cet effet fondateur a été invoqué pour expliquer la tendance au monomorphisme rencontrée successivement chez *T. infestans* (27) et chez *R. prolixus* (10). Mais nos résultats et ceux d'autres auteurs nous conduisent à multiplier l'hypothèse de l'effet fondateur pour des espèces très diverses, dont certaines n'ont pas d'historique connu corroborant de telles suppositions. D'autre part, la dérive génique n'est pas censée éliminer les mêmes allèles partout : au contraire, de par son caractère aléatoire, elle accroît en général les différences géographiques. Nous observons au contraire que les individus d'une même espèce restent identiques même s'ils proviennent de régions géographiques très éloignées. C'est le cas par exemple pour *R. ecuadoriensis*.

Nous ne sommes donc pas en mesure d'expliquer ce monomorphisme important, qui apparaît d'ores et déjà comme un phénomène fréquent chez les *Triatominae*.

Cette situation réduit la possibilité d'appliquer l'électrophorèse des isoenzymes à des études intraspécifiques. De telles études, par exemple celles qui prétendent mesurer l'isolement entre populations géographiques d'une même espèce, requièrent en effet un nombre de loci variables au moins égal à trois (38).

Toutefois, cette tendance au monomorphisme va nous servir considérablement pour nous aider à comprendre le genre *Rhodnius*, c'est-à-dire en connaître le nombre d'espèces et leur distribution géographique.

En effet :

(1) Nous constatons que le profil isoenzymatique d'une espèce reste inchangé d'un pays à l'autre (*R. ecuadoriensis*) ou d'une région à l'autre (*R. neglectus*, *R. prolixus*, *R. robustus*). Cette grande stabilité géotypique dans l'espace simplifie notre tâche, en particulier celle de vérifier l'extension géographique de ces espèces. Non seulement les géotypes seront facilement identifiables, mais encore le nombre d'enzymes nécessaires pourra être réduit. La mise au point d'une clé biochimique basée sur un petit nombre d'enzyme paraît d'ores et déjà possible (voir tableau 6).

(2) Pour les espèces de *Rhodnius* étudiées ici, nous constatons que la majorité des enzymes est monomorphe. Ce faible taux de polymorphisme nous permet de travailler sur un très petit nombre d'individus. A l'extrême, si aucun locus n'était variable, un seul individu serait représentatif de la population. Si nous acceptons comme correctes les mesures de variabilité que nous avons réalisées

dans le genre *Rhodnius*, en moyenne 91% des loci sont monomorphes. Donc un seul individu est représentatif de la population entière pour 91% en moyenne des caractères électrophorétiques. Pour les 9% de loci qui restent et sont variables, un seul individu sera encore assez représentatif de la population. Par exemple, pour un locus à deux allèles avec des fréquences de $p=0,8$ et $q=0,2$, il y a 96% de chances (soit p^2+2pq) pour qu'un individu porte au moins une copie de l'allèle le plus commun . . .

Par conséquent, notre échantillon le plus petit (5 individus REC issus d'un palmier) est déjà utilisable pour apprécier de façon fiable les distances génétiques entre cette espèce et d'autres espèces, putatives ou non.

5. 2. Equilibre de Hardy-Weinberg

Certains loci variables nous ont permis d'apprécier l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Des individus issus d'un même bocal ou d'un même palmier sont supposés en équilibre s'ils appartiennent à la même espèce, et nous n'avons relevé aucun cas de déséquilibre statistiquement significatif.

Il pourrait paraître surprenant que sur des échantillons aussi petits que 5, on puisse être en mesure de réaliser des tests. Pourtant, la présence d'espèces jumelles apparentes (absence d'hétérozygotes) peut être testée même dans un échantillon très petit. En effet, la probabilité d'une absence complète d'hétérozygotes dans un tel échantillon peut être estimée par

$$(1-2pq)^n$$

avec p et q la fréquence des allèles alternes, et n l'effectif de l'échantillon (31).

Ainsi, il est remarquable de constater que 5 à 6 individus par espèces suffisent d'une part à détecter des espèces jumelles éventuelles, et d'autre part, comme on vient de le voir dans le paragraphe précédent, peuvent convenir pour apprécier la variabilité génétique de l'espèce.

5. 3. Distances génétiques entre populations

Nos populations constituent un échantillonnage allopatrique, et comme indiqué antérieurement, notre interprétation se fera de manière comparative : elle visera à savoir si les distances rencontrées sont de l'ordre de celles qui sont habituellement relevées entre populations locales d'une même espèce.

Selon Richardson et al. (31), parmi les vertébrés, deux populations locales d'une espèce ont

moins de 14% de différences fixées ($D_r < 14\%$). D'autre part, selon Avise (39), deux populations locales d'une même espèce chez les insectes, présentent d'ordinaire plus de 80% des allèles en commun, soit une distance de Nei d'environ 0,22 ($D_s < 0,22$).

Dans notre échantillon, nous voyons que les deux genres *Triatoma* et *Rhodnius* sont séparés par les plus grandes distances ($D_r > 70\%$ et $D_s > 1,35$).

- A l'intérieur du genre *Rhodnius*, l'espèce *R. ecuadoriensis* présente avec les autres populations les distances les plus importantes ($D_r > 52\%$ et $D_s > 0,6$); cette espèce s'individualise nettement sur le réseau de Wagner (fig 1). Nous mettons en évidence ici un parallèle entre les différences morphologiques et génétiques, car cette espèce est morphologiquement bien différenciée.

- Les populations RNgB et RNgJ n'ont aucun locus diagnostique entre elles ($D_r = 0$) et ont des distances de Nei très faibles, de l'ordre de celles existant entre populations locales conspécifiques (seul un allèle, *gpd-2*, les différencie). Nous n'avons pas d'argument pour prétendre que ces populations appartiendraient à des espèces différentes. Ces conclusions sont aussi celles de la morphologie qui les classe dans l'espèce *R. neglectus*.

- Une interprétation tout-à-fait comparable peut être avancée pour les trois populations PRK, RRJ, et RPH. Sur l'arbre, les différents génotypes multiloci de ces trois groupes sont "mélangés". Ces résultats confirment ceux de M. Harry, mais avec une population différente de *R. robustus* (tandis que RPH fait partie des populations qu'elle a caractérisée). Toutefois, notre population de *R. robustus* (RRJ) ne présentait pas de façon constante cette légère différence de coloration au niveau des tibias de larves IV et V. Dans l'état actuel des choses, nous sommes incapables d'attribuer ces populations à des espèces différentes, autant sur la base du critère d'isolement reproductif (PRK est une population issue du croisement entre *R. prolixus* et *R. robustus*) que sur celle du concept évolutif de l'espèce ($D_r=0\%$; $D_s < 0,010$). Dans ce cas de figure, les critères morphologiques, génétiques et éthologiques se rejoignent dans une même impuissance à distinguer *R. robustus* de *R. prolixus*.

- Entre ce groupe "prolixus-robustus" (RRJ, RPH, PRK) et le groupe "neglectus" (RNgB et RNgJ), bien que les différences morphologiques soient insignifiantes et très difficiles à observer, des divergences génétiques importantes apparaissent ($D_r > 35\%$, tandis que D_s varie de 0,44 à 0,51). Ces distances sont incompatibles avec celles que l'on rencontre habituellement entre populations d'une même espèce. L'appartenance de ces deux groupes à des espèces différentes ne fait donc presque pas de doute. Elle est confirmée par la stérilité des formes vérifiées en laboratoire (26). Ici, au contraire de *R. ecuadoriensis*, les différences génétiques s'écartent nettement du diagnostic morphologique qui fait de *R. neglectus* une espèce "proche" de *R. prolixus*.

5. 4. Implications épidémiologiques

Notre propos est de pouvoir identifier un vecteur principal de la maladie de Chagas (*R. prolixus*) parmi des espèces morphologiquement très proches mais jouant un rôle négligeable dans la transmission.

- Les deux populations de *R. neglectus* d'insectarium (RNGB et RNgJ) sont très difficiles à distinguer morphologiquement de *R. prolixus* (RPH) et de *R. robustus* (RRJ), mais elles présentent six loci diagnostiques en électrophorèse des isoenzymes, et leur distinction par cette technique ne pose pas de problèmes. Nous proposons donc cette méthode pour les cas où des confusions ont pu apparaître, notamment au Brésil : en effet, des réduves colonisant les poulaillers ont été recensées dans l'état de Goiás par Garcia-Zapata (16) et cet auteur les a attribués à l'espèce *R. neglectus*. Cette observation a servi de base à la description par les mêmes auteurs d'une écologie nouvelle pour cette espèce, puisque *R. neglectus* n'avait jamais été recensé dans des poulaillers. Cependant des observations morphologiques réalisées par d'autres spécialistes sur les mêmes spécimens n'ont pas confirmé cette identification. Dujardin (33; 12) a réalisé des croisements en laboratoire et a trouvé une stérilité complète entre ces individus capturés dans les poulaillers et des *R. neglectus* d'élevage. Par contre, une fertilité importante est observée avec des *R. prolixus* d'élevage. Enfin, une comparaison électrophorétique faite sur 15 loci par ce même auteur (33) ne révélait aucune différence fixée entre ces deux lignées, alors qu'il avait mis en évidence 4 loci diagnostiques sur 10 entre des populations d'insectarium appartenant à ces deux espèces.

En résumé, ces analyses ne permettaient pas de rejeter l'hypothèse préoccupante selon laquelle c'est bien *R. prolixus*, redoutable vecteur, et non *R. neglectus*, qui envahit les poulaillers au Brésil; rappelons que ce vecteur, *R. prolixus*, malgré des rapports contradictoires à ce sujet (7; 40; 11), est considéré comme absent de ce pays (!).

- Entre *R. prolixus* et *R. robustus*, aucune différence fixée n'a été mise en évidence, et nos résultats, sauf pour la constance de la couleur des tibias, confirment ceux de Harry (18). Dans l'état actuel des connaissances, il est préférable de considérer, jusqu'à preuve du contraire, que *R. robustus* est la même espèce que *R. prolixus*. Par conséquent, les campagnes de luttés contre ce vecteur doivent revoir leur stratégie pour au moins deux aspects:

(1) la distribution géographique de *R. prolixus* doit être revue; elle engloberait déjà tous les pays où *R. robustus* a été décrit.

(2) l'écologie de *R. prolixus* doit être revue également; elle serait celle d'une espèce sylvestre attirée par l'habitat de l'homme. Par conséquent, les réinfestations actuelles ont eu pour origine probable les foyers sylvatiques de *R. prolixus*. Cette hypothèse n'avait jamais reçu de soutien dans la mesure où l'espèce sylvestre la plus abondante, *R. robustus*, était censée se cantonner dans la forêt, tandis qu'on ne prêtait à *R. prolixus* qu'une présence accidentelle, peu durable, dans les foyers sylvestres.

La "preuve du contraire" ne pourra être apportée que par une étude sur le terrain. Cette étude devrait envisager un matériel collecté dans les deux habitats en sympatrie (par exemple les maisons d'un village et les palmiers voisins). Comme nous l'avons vu, sur un petit échantillon, l'électrophorèse des isoenzymes pourrait détecter un mélange d'espèces.

En résumé, nous montrons dans ce travail que l'électrophorèse des isoenzymes semble constituer une méthode bien adaptée à l'étude des problèmes rencontrés dans le genre *Rhodnius*.

Sur de très petits échantillons :

- (1) l'électrophorèse des isoenzymes permet de rejeter l'hypothèse d'un mélange d'espèces (espèces jumelles éventuelles),
- (2) sur la base d'un petit nombre d'enzymes, cette technique permet de distinguer les espèces entre elles,
- (3) en utilisant toutes les enzymes disponibles, elle permet d'estimer valablement les différences génétiques entre espèces,
- (4) et enfin elle apparaît comme un outil simple capable d'assurer une estimation objective de la distribution géographique des espèces importantes.

VII. Conclusions

Ce travail illustre les possibilités d'une technique, l'électrophorèse des isoenzymes, dans l'identification d'espèces indiscernables morphologiquement. Il souligne certains désaccords entre différents critères d'identification de l'espèce (morphologie et différenciation génétique), et suggère quelques directions de recherche d'intérêt épidémiologique.

L'électrophorèse des isoenzymes n'est pas appliquée ici dans le cadre d'une étude de génétique des populations visant à étudier les populations locales d'une même espèce; en effet, le peu de variabilité observé en général chez les populations de *Triatominae*, et en particulier ici pour le genre *Rhodnius*, limiterait ce type d'études. Mais l'intérêt principal de cette technique dans notre travail réside précisément dans cette constatation : les espèces de *Rhodnius* qui nous intéressent affichent une tendance au monomorphisme très prononcée. Les individus se ressemblent entre eux non seulement dans un même localité, mais également d'une région géographique à l'autre, même si elles sont très éloignées. Ces caractéristiques font de l'électrophorèse des isoenzymes un outil d'identification particulièrement performant : peu d'enzymes sont nécessaires pour reconnaître une espèce, et peu d'individus sont requis pour étudier leurs divergences.

On sera donc en mesure de résoudre les problèmes qui se sont posés par exemple au Brésil, et on pourra localiser précisément les foyers de *R. prolixus*, sans confusion avec des espèces proches. Le but à moyen terme de ces études est de généraliser ces solutions pour le genre *Rhodnius*, en déterminant précisément le nombre d'espèces du genre, leur rôle vecteur, et leur distribution géographique exactes. Ces connaissances sont requises au moment de choisir les stratégies les plus adaptées à l'espèce cible d'un programme de lutte antivectorielle.

Nous proposons dans ce travail de considérer *R. prolixus* et *R. robustus* comme une même espèce, jusqu'à preuve du contraire. Nous suggérons que cette preuve peut être apportée par l'analyse isoenzymatique, dans des conditions choisies d'échantillonnage. Il est prudent cependant de prévoir pour cette tâche le développement d'un marqueur révélant plus de variabilité intraspécifique, comme par exemple le récent "RAPD" ("Random Amplified Polymorphic DNA", ou polymorphisme de l'ADN amplifié par des amorces arbitraires, (41)), déjà au point sur le genre *Triatoma* (Pereira, comm. pers.).

VII. Projet de Recherche

Directeur de thèse: Michel Tibayrenc

Responsable: Jean-Pierre Dujardin

Titre du projet: Génétique des populations des *Triatominae* péridomestiques, vecteurs secondaires de la maladie de Chagas en Bolivie.

Le sujet du DEA et celui de la thèse sont en continuité directe: le DEA constitue réellement la première année de la recherche expérimentale dont la thèse verra l'aboutissement.

Etat actuel des connaissances

L'élimination du vecteur domestique de la maladie de Chagas, *T. infestans*, est considérée par l'ensemble des experts comme une tâche techniquement et financièrement envisageable, mais le maintien des résultats acquis nécessitera de faire face à d'autres espèces, candidats vecteurs qui s'approchent actuellement de l'habitat. Au moins deux espèces en Bolivie sont considérées comme vecteurs secondaires: *Triatoma sordida* et *Rhodnius pictipes*. *T. sordida*, espèce au comportement invasif dans la région de Sao Paulo (Brésil), est considérée en Bolivie comme le second vecteur de la maladie de Chagas après *T. infestans*: Dans certaines régions, cette espèce serait même l'unique vecteur domestique. *R. pictipes* est signalée dans le Béni comme le vecteur de la maladie de Chagas (42), mais l'identification de cette espèce repose uniquement sur la morphologie externe, et sa tendance invasive est mal documentée. *R. prolixus*, ainsi que *R. robustus*, ont également été signalés en Bolivie (7).

Objectif général: Etude des risques de recrudescence de la transmission vectorielle représentés par les espèces sylvestres et péridomestiques en Bolivie, en particulier celles susceptibles d'envahir l'habitat de l'homme après élimination du vecteur domestique.

Objectifs précis Une approche génétique présente le double intérêt de (1) définir objectivement les taxons identifiés (38) et (2) de comprendre en même temps la structure des populations de l'espèce étudiée (34).

Deux objectifs spécifiques peuvent donc être poursuivis:

(1) Vérifier le statut taxonomique des spécimens sylvestres collectés dans des structures domestiques ou péridomestiques en Bolivie. Cette tâche est particulièrement indiquée pour toutes les populations de *Rhodnius* qui seront collectées, genre pour lequel ce DEA fournit les premiers éléments d'une "clé biochimique" d'identification.

(2) Sur un échantillon collecté dans des conditions rigoureuses de sympatrie, on peut détecter un éventuel mélange d'espèces avec un seul locus variable sur un nombre réduit d'individus. On est aussi en mesure d'évaluer l'importance des migrations entre les foyers domestiques et sylvestres des espèces présentant ces deux types d'habitats par une approche classique de génétique des populations.

Techniques

- Electrophorèse des isoenzymes (27). Notre travail met en évidence son utilité dans la distinction des espèces. Toutefois, le monomorphisme isoenzymatique intraspécifique nous conduit à préconiser le développement d'autres marqueurs, plus variables, comme le "RAPD".

- Analyse de l'ADN par amorces aléatoires, ou "RAPD" (41). Notre équipe a mis au point cette technique pour la caractérisation génétique des triatomes du genre *Triatoma* (Pereira et al., en préparation).

Collaborations locales et internationales

Outre l'infrastructure et le support technique des laboratoires de l'IBBA, toutes les collaborations sont possibles (appui logistique sur le terrain, matériel de récolte) avec les participants de trois programmes CEE-STD-3 (voir plus loin), qui apportent les fonds nécessaires pour le fonctionnement du présent projet.

Echéancier: La première année (DEA) nous a permis de faire l'acquisition des techniques (élevage de réduves, isoenzymes, RAPDs) et des bases théoriques (génétique des populations) nécessaires à la conduite du programme. Il est prévu par la suite que dans le cadre de la thèse, nous serons affectés à l'IBBA de La Paz, en même temps que le responsable scientifique du travail, le Dr Jean-Pierre Dujardin.

Financement: Programmes communautaires STD3

(A) "Evaluation du danger de réinfestation à partir de foyers sylvestres de *Triatoma infestans* dans l'aire-cible d'éradication du vecteur domestique des pays du cône sud". Partenaires: (a) UMSS de Cochabamba (Bolivie); (b) Instituto Oswaldo Cruz (Rio De Janeiro); (c) Universidad de la Republica (Montevideo, Uruguay); (d) IBBA de La Paz (Bolivie).

(B) "A survey of Chagas cycles in Uruguay by use of genetic markers with special emphasis on reinfestation hazards of domestic structures by sylvatic cycles. Partenaires: (a) Universidad de la Republica (Montevideo, Uruguay); (b) UAM (Madrid, Espagne).

(C) "Biosystematics and adaptative trends in the genus *Rhodnius*". Partenaires: (a) British Museum; (b) Instituto Oswaldo Cruz (Rio De Janeiro); (c) Universidad de la Republica (Montevideo, Uruguay); (d) IBBA de La Paz (Bolivie).

BIBLIOGRAPHIE

(1) Chagas C., 1909 : Nova trypanozomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1 : 159-218.

(2) Zeledon R., 1974 : Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' disease. In Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease. *Ciba Foundation Symp.*, 20 : 51-77.

(3) OMS, 1991 : La lutte contre la maladie de Chagas. Rapport d'un comité d'experts.

(4) Schaub G. A. & Losch P., 1988 : *Trypanosoma cruzi* : origin of metacyclic trypomastigotes in the urine of the vector *Triatoma infestans*. *Experimental Parasitology*, 65 : 174-186.

(5) Schaub G. A., 1989 : *Trypanosoma cruzi* : Quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. *Exp. parasitol.*, 68 : 260-273.

(6) Rodhain F. & Perez C., 1985 : Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Notions d'épidémiologie des maladies à vecteurs. *Ed. Maloine, Paris*.

(7) Lent H. & Wygodzinsky P., 1979 : Revision of the *triatominae* (Hemiptera : Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. of Amer. Mus. of Natur. Hist.*, 163 (3): 123-520.

(8) Zeledon R. & Rabinovitch J. E., 1981 : Chagas'disease : An ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Ann. Rev. Entomol.*, 26 : 101-133.

(9) Garcia-Zapata M. T. & Mardsen P. D., 1992 : Control of the transmission of Chagas' disease in Mambai, Goias, Brazil (1980-1988). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 46 (4) : 440-443.

(10) Harry M., 1992 : Variabilité génétique de populations vénézuéliennes de *Rhodnius spp*, vectrices de *Trypanosoma cruzi*, parasite responsable de la maladie de Chagas. *Thèse de doctorat de l'université Paris VI*.

(11) Diotaiuti L., Silveira A. C. & Elias M., 1984 : Sobre o encontro de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, em Macauberias. *Rev. Bras. de Mariol. e doenças trop.*, 36 : 11-14.

(12) Dujardin J. P., Garcia-Zapata M. T., Jurberg J., Roelants P., Cardozo L., Panzera F., Dias J. C. P. & Schofield C. J., 1991 : Which species of *Rhodnius* is invading houses in Brazil ? *Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg*, 85 : 679-680.

(13) Schofield C. J., 1988 : Biosystematics of Triatominae, in Biosystematics of haematophagous insects. *Systematics Association Special Volume* , 37 : 285-312.

(14) Miles M. A., Arias J. R. & De Souza A. A., 1983 : Chagas' Disease in the Amazon basin : V. Periurban palms as habitats of *Rhodnius robustus* and *Rhodnius pictipes*- Triatomine vectors of Chagas'disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 78 (4) : 391-398.

(15) Gamboa J., 1963 : Comprobacion de *Rhodnius prolixus* extradomicilario en Venezuela.

Bol. Oficina San. Panam., **54** : 18-25.

(16) Garcia-Zapata M. T., Virgens D., Soares V. A., Bosworth A., Marsden P. D., 1985 : House invasion by secondary triatomine species in Mambai, Goias-Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **18** (3) : 199-201.

(17) Gamboa J., 1973b : La poblacion silvestre de *Rhodnius prolixus* en Venezuela. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasit. Med.*, **5** : 321-351.

(18) Harry M., Galindez I. & Cariou M. L., 1992 : Isozyme variability and differentiation between *Rhodnius prolixus*, *R. robustus*, and *R. pictipes*, vectors of Chagas' disease in Venezuela. *Med. and Veter. Entom.*, **6** : 37-43.

(19) Dujardin J. P., 1992 : La lutte contre les vecteurs de la maladie de Chagas. *Bull. Soc. Franç. de Parasitol.* **10** (2) : 249-254.

(20) Mayr E., 1974 : Populations, espèces et évolution. *Ed. Hermann, 293, rue Lecourbe, 75015 Paris.*

(21) Dobzhansky Th., 1970 : Genetics of the evolutionary process. *Ed. Columbia University Press, New York.*

(22) Nei M., 1972 : Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, **106** (949) : 283-292.

(23) Usinger R. L., Wygodzinsky P. & Ryckman R. E., 1966 : The Biosystematics of Triatominae. *Ann. Rev. Entomol.*, **11** : 3089-3309.

(24) Carneiro J. R. & Barretto M. P., 1976 : Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LX - Tentativas de cruzamento de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 com *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (*Hemiptera, Reduviidae*). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **18** (1): 17-23.

(25) Barrett T. V., 1988 : Current research on Amazonian Triatominae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz., Rio de Janeiro, Suppl. I*, **83** : 441-447.

(26) Dujardin J. P., 1990 : Intérêt de la Génétique des Populations dans l'étude des vecteurs de la trypanosomiase américaine. *Thèse de Doctorat en Sciences Biomédicales Expérimentales de l'Université de Liège.*

(27) Dujardin J. P. & Tibayrenc M., 1985a : Etude de onze enzymes et données de génétique formelle pour dix-neuf loci enzymatiques chez *Triatoma infestans*. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* **65**, 271-280.

(28) Tibayrenc M., 1979 : Les isoenzymes et l'entomologie médicale. *Cah. O. R. S. T. O.M., sér. Ent. Méd. & Parasitol.*, **XVII**(4) : 249-256.

(29) Pasteur G., 1985 : Les paramètres statistiques communément utilisés dans l'exploitation des résultats de l'électrophorèse des protéines et leur avenir en systématique. *In Electrophorèse et taxinomie (M. Goyffon et J. L. d'Hondt dir.) Société Zoologique de France, Paris.*

(30) Nei M., 1973 : Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70** (12), Part I : 3321-3323.

(31) Richardson B. J., Baverstock P. R. & Adams M., 1986 : Allozyme electrophoresis a handbook for animal systematics and population studies. *Academic press Inc. (London).*

- (32) Felsenstein J., 1978 : The number of evolutionary trees. *System. Zool.*, **27** : 27-33.
- (33) Dujardin J. P., Le Pont F., Garcia-Zapata M. T., Cardozo L., Bermudez H., Tibayrenc M. & Schofield C. J., 1988e : *Rhodnius prolixus*, *R. neglectus*, *R. pictipes* and *Triatoma infestans* : an electrophoretic comparison. *V Reuniao sobre esquisa aplicada em doenca de Chagas, Araxa, 03 a 05/11/88*, p 83.
- (34) Dujardin J. P. & Tibayrenc M., 1985b : Etudes isoenzymatiques du vecteur principal de la maladie de Chagas : *Triatoma infestans* (Hemiptera : Reduviidae). *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* **65**, suppl. 1, 165-169.
- (35) Ferguson, 1980 : Biochemical Systematics and Evolution. *Blackie, Glasgow & London.*
- (36) Nevo, 1990 : Molecular evolutionary Genetics of isozymes : Pattern, Theory, and Application. *Isozymes : Structure, Function, and Use in Biology and Medicine* : 701-742.
- (37) Schofield, 1985 : Control of Chagas'disease vectors. *British Med. Bull.*, **41** : 187-194.
- (38) Dujardin J. P., Tibayrenc M., Venegas E., Maldonado L., Desjeux P. & Ayala F., 1987: Isoenzyme evidence of lack of speciation between wild and domestic *Triatoma infestans* (Hemiptera : Reduviidae) in Bolivia. *J. Med. Entomol. Vol. 24*, **1**, 40-45.
- (39) Avise J. C., 1975 : Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.*, **23** : 465-481.
- (40) Carcavallo U. & Tonn J., 1985 : *Rhodnius prolixus*, Stal. *Factores biologicos y ecologicos en la enfermedad de Chagas. I* : 209-217.
- (41) Williams J. G. K., Kubelick A. R., Kenneth J. L., Rafalski J. A. & Tingey S. V., 1990 : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Research*, **18** (22) : 6531-6535.
- (42) Tibayrenc M. & Le Pont F., 1984 : Etudes isoenzymatiques d'isolats boliviens de *Trypanosoma cruzi* pratiqués chez *Rhodnius pictipes*. Données préliminaires sur la transmission de la maladie de Chagas dans l'Alto Beni bolivien. *Cah. O. R. S. T. O. M, sér. Entom. Méd. Parasit.*, **XXII** (1) : 55-57.