CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE ET MORPHOLOGIQUE DE DEUX ESPÈCES AFFINES DE *PARAPHLEBOTOMUS*: *PHLEBOTOMUS CHABAUDI* CROSET, ABONNENC & RIOUX, 1970 ET *P. RIOUXI* DEPAQUIT, KILICK-KENDRICK & LÉGER, 1998 (DIPTERA : PSYCHODIDAE)

BOUNAMOUS A.**, BOUDABOUS R.***, JOUET D.*, AUGOT D.*, FERTÉ H.*, BABBA H.***,
BERCHI S.**** & DEPAQUIT J.*

Summary : MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISATION OF TWO CLOSELY RELATED SPECIES BELONGING TO THE SUBGENUS *PARAPHLEBOTOMUS*: *PHLEBOTOMUS CHABAUDI* CROSET, ABONNENC & RIOUX, 1970 AND *P. RIOUXI* DEPAQUIT, KILICK-KENDRICK & LÉGER, 1998 (DIPTERA, PSYCHODIDAE)

In 1998, the description of *Phlebotomus riouxi* emphasised the difficulty to differentiate the female from the closely related *P. chabaudi*, a suspected vector of *Leishmania killicki* in several foci in Tunisia. In order to be able to distinguish the females of these two species, we started a molecular study based on 37 Algerian and Tunisian specimens. The alignment of the sequences of the cytochrome b of the mitochondrial DNA and their analysis using Neighbor-joining, maximum likelihood and maximum parsimony shows the individualisation of two species including an intraspecific variability. Following a morphological approach, it is not possible to distinguish the females on the basis of their spermathecae. A new character is proposed: the presence of antero-lateral teeth of the pharyngeal armature for *P. chabaudi*, never observed in *P. riouxi*. However, a molecular typing is necessary at the present time for a sure identification of the females.

KEY WORDS : phlebotomine sandflies, Algeria, Tunisia, molecular biology, taxonomy.

Résumé :

La description en 1998 de *Phlebotomus riouxi* a posé le problème de la diagnose différentielle délicate de la femelle avec celle d'une espèce affine : *P. chabaudi*. Le rôle suspecté de *P. chabaudi* dans la transmission de *Leishmania killicki* dans certains foyers tunisiens nous a amené, à partir de 37 spécimens algériens et tunisiens, à effectuer la caractérisation moléculaire de ces deux taxons. Les séquences du gène du cytochrome b (cyt b) de l'ADN mitochondrial individualisent clairement ces taxons et mettent en évidence une variabilité intraspécifique. L'analyse morphologique ne permet pas de différencier les femelles des deux espèces sur la base des caractères génitaux. Un caractère céphalique nouveau tenant à la présence de dents latérales antérieures sur l'armature pharyngienne de *P. chabaudi*, absentes chez *P. riouxi*, est proposé, mais un recours au typage moléculaire semble nécessaire pour une identification fiable.

MOTS CLÉS : phlébotome, Algérie, Tunisie, biologie moléculaire, taxinomie.

INTRODUCTION

La description de *P. riouxi* Depaquit, Killick-Kendrick & Léger, 1998 s'appuie principalement sur la morphologie des mâles. Les auteurs soulignent la difficulté d'identifier la femelle de l'espèce affine *P. chabaudi* Croset, Abonnenc & Rioux, 1970. Ils ont proposé l'observation de l'armature de l'atrium génital, plus développée chez *P. riouxi* que chez *P. chabaudi* (Depaquit *et al.*, 1998). Alors que de nouveaux foyers à *Leishmania killicki* Rioux, Lanotte & Pratlong, 1986

sont découverts en Tunisie (Bouratbine, 2005 ; Haouas *et al.*, 2005, 2007) en Libye (Aoun *et al.*, 2006) et l'Algérie (*cf. infra*), sa transmission vectorielle reste non résolue. *P. chabaudi* serait un vecteur potentiel dans le foyer originel de Tatahouine au vu de son abondance puisque *P. cf. chabaudi* représente 32,8 % des captures (Rioux *et al.*, 1986). Dès lors, l'identification précise des femelles de *P. riouxi* et de *P. chabaudi* s'avèrait nécessaire. Deux types de caractères ont été utilisés : 1) le gène du cytochrome b (cyt b), déjà utilisé avec succès pour l'analyse de nombreuses espèces voisines (Esseghir *et al.*, 1997 ; Aransay *et al.*, 2003 ; Parvizi *et al.*, 2003 ; Pesson *et al.*, 2004 ; Perrotey *et al.*, 2005), qui a permis la caractérisation des femelles, et 2) la recherche d'un nouveau caractère morphologiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les phlébotomes étudiés proviennent d'Algérie et de Tunisie. Ils ont été capturés à l'aide de papiers huilés et de pièges CDC et conservés dans

* JE 2533-USC AFSSA "VECPAR", Faculté de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France.

** Laboratoire de pharmacologie et phytochimie, Faculté des Sciences de Jijel, Algérie.

*** Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, code 99UR/08-05, Faculté de Pharmacie, Département de Biologie Clinique B, 1, Rue Avicenne, 5000 Monastir Tunisie.

**** Laboratoire de Biosystématique et Ecologie des Arthropodes, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri, 25000 Constantine, Algérie.

Correspondance : Jérôme Depaquit, JE 2533-USC AFSSA "VECPAR", Faculté de Pharmacie, 51, rue Cognacq-Jay, F-51096 Reims Cedex. Tél.: + 33 (0)3 26 91 37 23 – Fax: + 33 (0)3 26 91 35 97.

E-mail : jerome.depaquit@univ-reims.fr

l'éthanol à 96 %. L'échantillonnage est détaillé dans le tableau I.

La tête et le génitalia sont prélevés, éclaircis au Marc-André à chaud directement sur la lame et montés extemporanément dans la gomme au chloral. Le reste du corps est broyé dans un microtube stérile à l'aide d'un piston pellet (Treff, Suisse) dans le tampon de lyse ATL contenu dans le kit QIAmp DNA mini kit (Qiagen, Allemagne) utilisé pour l'extraction d'ADN. L'élution finale est réalisée dans 200 µl de tampon AE. L'amplification par PCR du gène *cyt b* est réalisé avec les sondes N1N-PDR et CB3-PDR dans les conditions décrites par Essegghir *et al.* (1997) en utilisant la *Taq* polymérase (5 prime, Allemagne) à une température d'activité de 68° C. Le séquençage direct double sens est réalisé à l'aide des mêmes amorces. Les séquences ont été corrigées à l'aide des logiciels Pregap et Gap (Bonfield &

Staden, 1996). Leur alignement et leur analyse par les méthodes de Neighbor-Joining, parcimonie et maximum de vraisemblance sont réalisés à l'aide du logiciel MEGA (Tamura *et al.*, 2007). Nous avons sélectionné deux extra-groupes au sein du sous-genre *Paraphlebotomus* : 1) *P. sergenti* qui, dans une étude à l'échantillonnage restreint, apparaît comme le groupe-frère de *P. chabaudi* (Essegghir *et al.*, 2000), et 2) *P. alexandri*, espèce dont la divergence est précoce au sein du sous-genre (Depaquit *et al.*, 2000).

RÉSULTATS

Les sondes utilisées amplifient 490 paires de bases. L'alignement des séquences fait ressortir 57 sites variables et 19 haplotypes, à savoir 12 chez *P. riouxi*

Espèce	Pays	Région	Localité	Mode de piégeage	Date de capture	Sexe	Spécimen
<i>P. chabaudi</i>	Algérie	Aurès	Menaâ	PA	31/08/06	♂	CB2
				CDC	26/09/07	♂	CB3
				CDC	26/09/07	♂	CB572
			Ain-Zaatout	CDC	20/09/07	♂	CB573
				CDC	20/09/07	♀	CBZAT583
		Tunisie	Mahdia	CDC	22/09/04	♀	SMA279
				CDC	22/09/04	♀	SMA215
			Sayada	PA	04/10/05	♀	SMO419
				CDC	04/10/05	♂	SMO436
				PA	04/10/05	♂	SMO437
			Skane	CDC	22/09/05	♀	SMO10
				PA	28/09/05	♀	SMO310
				CDC	28/09/05	♀	SMO882
			Teboulba	PA	04/10/05	♀	SMO548
				PA	04/10/05	♂	SMO562
			Sidi Ameur	CDC	29/09/05	♂	SMO631
				CDC	29/09/05	♂	SMO626
				CDC	29/09/05	♂	SMO629
				CDC	29/09/05	♀	SMO635
			M. Kamel	PA	03/10/05	♀	SMO759
			Benbla	CDC	29/09/05	♀	SMO798
			Moknine	CDC	30/09/05	♂	SMO122
				CDC	30/09/05	♀	SMO445
				CDC	30/09/05	♀	SMO112
<i>P. riouxi</i>	Algérie	Ghardaïa	Ghardaïa	PA	20/09/06	♂	RX1
				PA	20/09/06	♂	RX2
				PA	20/09/06	♂	RX3
			Metlili	PA	19/09/06	♂	RX4
				PA	19/09/06	♂	RX5
				PA	19/09/06	♂	RX6
				PA	19/09/06	♂	RX7
				PA	19/09/06	♂	RX8
				PA	19/09/06	♂	RX9
		Tataouine	Ghomrassen : Ksar Hadada	CDC	16/10/07	♀	TAT23
				PA	15/10/07	♂	TAT63
			Ghomrassen : Om Sefri	PA	15/10/07	♂	TAT74
				PA	15/10/07	♂	TAT74
			Ghomrassen : Bokhtit	CDC	15/10/07	♀	TAT24

Tableau I. – Échantillonnage. PA = pièges adhésifs. CDC = piège lumineux.

CB2-CB3-CB572-CB573	AAAATTAATGAGACGAGGGGTTCTGATCGGACACGGAAGTGGTTAACTGGGATAAAA
CB583ZAT	GCC..
SMA279-CB	G.....C...G...A.....A..T.T...G...C.....A...CG
SMO112-CB	G.....C...G...A.....A..T.T...G.....A.....G
SMO548-CB	G...A..C...G...A.....A..T.T...G...C.....A.....G
SMO562-CB	G.....C...G...A.....A..T.T...G...C.....A...C.G
Autres <i>P. chabaudi</i> (n=15)	G.....C...G...A.....A..T.T...G...C.....A.....G
RX1	.GGG..G.....TAGAAAAACA.AAGC.AA.TGTT.GGACAAA.T.T.AT....G..
RX2-RX7	.GGG..G.....TAGAAAAACA.AAGC.AA.TGTT.GGACAAA.T.T.AT....G.G
RX3	.GGGC.G.....TAGAAAAACA.AAGC.AA.TGTC.GGACAAA.T.T.AT....G.G
RX4	.GGG..G.....TAGAAAAACA.AAGC.AA.TGTT.GGACAAA.T.T.ATA...G.G
RX5	.G.G..G.....TAGAAAA.ATAAGC.AA.TGTTAGGACAAA.T.T.AT....G.G
RX6	.GGG..G.....TAGAAA.CA.AAGC.AA.TGTT.GGA.AAA.T.T.AT....G.G
RX8	.GGG..G.....TAGAAAA.A.AAGC.AA.TGTT.GGACAAA.T.T.AT....G.G
RX9	.GGG..G.....TAGAAA.CA.AAGCTAA.TGTT.GGACAAA.T.T.AT....G.G
TAT23-RX	...G...G.AGA.TAG.AAA.A.AAGC.AA.T.TTAG.AC AAA.TGT.A.AG....
TAT24-RX	..GG...G.AGA.TAG.AAA.A.AAGC.A.GT.TT.G.AC.AACCGT.ATA.....
TAT63-RX	...G...G.AGA.TAG.AAA.A.AAGC.A..T.TTAG.AC.AA.TGT.A.AG....
TAT74-RX	...G...G.AGA.TAG.AAA.A.AAGC.A..T.TTA..AC.AA.TGTCA.AG....

Fig. 1. – Position des 57 sites variables obtenus après alignement des séquences du cytochrome b chez 37 *P. chabaudi* et *P. riouxi* d'Algérie et de Tunisie.

(dont quatre en Tunisie et huit en Algérie) et sept chez *P. chabaudi* (dont deux en Algérie et cinq en Tunisie) (figure 1).

L'analyse des séquences par les méthodes de Neighbor-Joining, de parcimonie et de maximum de vraisemblance fournissent la même topologie (figure 2). Les deux espèces *P. riouxi* et *P. chabaudi* sont nettement individualisées. La variabilité est comparable au sein de *P. chabaudi* et de *P. riouxi*. Une dizaine de sites variables individualisent les populations algériennes et tunisiennes de chaque espèce. Cependant, il existe un plus grand nombre d'haplotypes chez *P. riouxi* que chez *P. chabaudi* (figure 1).

Les séquences sont disponibles dans Genbank sous les numéros EU935791 à EU935827.

DISCUSSION

L'approche moléculaire des espèces affines *P. chabaudi* et *P. riouxi* menée sur les séquences du gène cytochrome b est pertinente. La nette individualisation des deux espèces, soutenue par de fortes valeurs de bootstrap, nous a permis d'associer les femelles aux mâles chez *P. chabaudi* et chez *P. riouxi*. Cette caractérisation des femelles est le préalable nécessaire à leur étude morphologique. Cette dernière laisse apparaître que les caractères génitaux ne permettent pas de différencier *P. chabaudi* et *P. riouxi* (figure 3). L'armature de l'atrium génital, paraissant plus développée chez *P. riouxi* que chez *P. chabaudi* (Depaquit *et al.*, 1998), était considérée comme un caractère dis-

criminant. Outre la difficulté d'observation de ce caractère pour lequel le montage est souvent délicat, le présent travail ne confirme pas ces différences (figure 3). Par contre, l'examen de l'armature pharyngienne fait apparaître chez *P. chabaudi* une ligne de dents latérales antérieures, ligne absente chez *P. riouxi*. Dès lors, ce caractère pourrait différencier les deux espèces.

Si en 1998, Depaquit *et al.* ont recensé quelques rares stations où les deux espèces sont en sympatrie, notamment au Maroc, ce n'est pas le cas dans la présente étude où les deux espèces sont géographiquement séparées tant en Algérie qu'en Tunisie. En Algérie, on rencontre *P. chabaudi* dans la région des Aurès tandis que *P. riouxi* est, pour l'instant, seul présent à Ghardaïa où les captures avaient été rapportées à *P. cf chabaudi* antérieurement à la description princeps de *P. riouxi* (Rioux *et al.*, 1970). En Tunisie, *P. chabaudi* est présent dans les régions de Mahdia et de Monastir. Dans la région de Tatahouine, cette espèce n'a pas été identifiée dans nos captures qui ne comportent que *P. riouxi*. Par contre, elle est mentionnée dans cette même zone par Ghrab *et al.* (2006) qui, à l'inverse, n'ont pas observé de *P. riouxi*. Les deux espèces pourraient donc être impliquées dans la transmission de *L. killicki* Rioux, Lanotte et Pratlong, 1986. Avant de conclure, de nouvelles prospections, réalisées sur l'ensemble de la zone et assorties de la mise en évidence du parasite, seraient donc nécessaires. En Algérie, la première mention de leishmaniose à *L. killicki* dans la région de Ghardaïa (Harrat *et al.*) peut être rapprochée à la présence de *P. riouxi* dans cette région.

Fig. 2. – Arbre obtenu par la méthode de Neighbor-Joining. La topologie est similaire par la méthode de parcimonie en utilisant *P. sergenti* et *P. alexandri* comme extra-groupes. Les valeurs de bootstrap obtenues après 1000 répliquats sont mentionnées aux nœuds considérés.

Fig. 3. – Spermathèques, furcas et armatures de l'atrium génital chez *P. chabaudi* (CBZAT583 & SMO310) et chez *P. riouxi* (TAT74 & TAT23). Barres = 50 μ m.

Fig. 4. – Pharynx de femelles de *P. chabaudi* (SMA215 & SMO436) et de *P. riouxi* (TAT74). Noter la présence de dents latérales antérieures chez *P. chabaudi* (désignées par les flèches), absentes chez *P. riouxi* et la variabilité de l'importance de l'armature pharyngienne chez *P. chabaudi*.

En définitive, le séquençage du gène cyt b est recommandé pour la distinction des femelles de *P. chabaudi* et de *P. riouxi*, en particulier lors d'études épidémiologiques visant à dépister le vecteur de *L. killicki*.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient N. Léger et J.A. Rioux pour leur aide et leurs conseils toujours pertinents.

RÉFÉRENCES

- AOUN K., BOUSSLIMI N., HAOUAS N., BABBA H., EL-BUNI A. & BOURATBINE A. First report of *Leishmania* (*L.*) *killicki* Rioux, Lanotte & Pratlong, 1986 in Libya. *Parasite*, 2006, 13, 87-88.
- ARANSAY A.M., READY P.D. & MORILLAS-MARQUEZ F. Population differentiation of *Phlebotomus perniciosus* in Spain following postglacial dispersal. *Heredity*, 2003, 90, 316-325.
- BONFIELD J.K. & STADEN R. Experiment files and their application during large-scale sequencing projects. *DNA Seq*, 1996, 6, 109-117.
- BOURATBINE A., AOUN K., GHRAB J., HARRAT Z., EZZEDINI M.S. & ETLJANI S. Spread of *Leishmania killicki* to Central and South-West Tunisia. *Parasite*, 2005, 12, 59-63.
- DEPAQUIT J., KILICK-KENDRICK R. & LÉGER N. Description de *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *riouxi* n. sp. d'Afrique du Nord. *Parasite*, 1998, 5, 151-158.
- DEPAQUIT J., FERTÉ H., LÉGER N., KILICK-KENDRICK R., RIOUX J.A., KILICK-KENDRICK M., HANAFI H.A. & GOBERT S. Molecular systematics of the Phlebotomine sandflies of the subgenus *Paraphlebotomus* (Psychodidae, Diptera, *Phlebotomus*) based on ITS 2 rDNA sequences. Hypotheses of dispersion and speciation. *Insect Molecular Biology*, 2000, 9, 293-300.
- ESSEGHIR S., READY P.D., KILICK-KENDRICK R. & BEN-ISMAIL R. Mitochondrial haplotypes and geographical vicariance of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. *Insect Molecular Biology*, 1997, 6, 211-225.
- ESSEGHIR S., READY P.D. & BEN-ISMAIL R. Speciation of *Phlebotomus* sandflies of the subgenus *Larrousius* cyt bncided with the late Miocene-Pliocene aridification of the Mediterranean subregion. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2000, 70, 189-219.
- GHRAB J., RHAÏM A., BACH-HAMBA D., CHAHED M.K., AOUN K., NOUIRA S. & BOURATBINE A. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of human leishmaniosis sites in Tunisia. *Parasite*, 2006, 13, 23-33.
- HAOUAS N., CHARGUI N., CHAKER E., BEN SAÏD M., BABBA H., BELHADJ S., KALLEL K., PRATLONG F., DEDET J.P., MEZHOUD H. & AZAÏEZ R. Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Tunisia: presence of *Leishmania killicki* outside its original focus of Tataouine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2005, 99, 499-501.
- HAOUAS N., GORCII M., CHARGUI N., AOUN K., BOURATBINE A., MESSAADI AKROUT F., MASMOUDI A., ZILI J., BEN SAÏD M., PRATLONG F., DEDET J.P., MEZHOUD H., AZAÏEZ R. & BABBA H. Leishmaniasis in central and southern Tunisia: current geographical distribution of zymodemes. *Parasite*, 2007, 14, 239-246.
- HARRAT Z. et al. Première description de *Leishmania killicki* en Algérie. Communication aux Premières Journées Algéro-Françaises de Parasitologie-Mycologie, Alger, 15-16 novembre 2006.
- PARVIZI P., BENLARBI M. & READY P.D. Mitochondrial and *Wolbachia* markers for the sandfly *Phlebotomus papatasi*:

- little population differentiation between peridomestic sites and gerbil burrows in Isfahan province, Iran. *Medical and Veterinary Entomology*, 2003, 17, 351-362.
- PERROTEY S., MAHAMDALLIE S.S., PESSON B., RICHARDSON K.J., GÁLLEGO M. & READY P.D. Postglacial dispersal of *Phlebotomus perniciosus* into France. *Parasite*, 2005, 12, 283-291.
- PESSON B., READY J.S., BENABDENNB I., MARTIN-SÁNCHEZ J., ESSEGHIR S., CADI-SOUSSI M., MORILLAS-MARQUEZ F. & READY P.D. Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif. *Medical and Veterinary Entomology*, 2004, 8, 25-37.
- RIOUX J.A., CROSET H. & GUY Y. Présence de *Phlebotomus (Paraphlebotomus) chabaudi* Croset, Abonnenc et Rioux, 1970 en Algérie. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 1970, 45, 875-880.
- RIOUX J.A., LANOTTE G., PETTER F., DEREURE J., AKALAY O., PRATLONG F., VELEZ I.D., FIKRI N.B., MAZOUN R., DENIAL M., JARRY M.D., ZAHAF A., ASHFORD R.W., CADI-SOUSSI M., KILLICK-KENDRICK R., BEN MANSOUR N., MORENO G., PERIERES J., GUILVARD E., ZRIBI M., KENNOU M.F., RISPAIL P., KNECHTLI R. & SERRES E. Les leishmanioses cutanées du bassin Méditerranéen occidental. De l'identification enzymatique à l'analyse éco-épidémiologique. Exemple de trois "foyers" tunisien, marocain et français, in : *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques (Coll. Int. CNRS/INSERM), 1986, IMEEE, Montpellier, pp. 365-395.
- TAMURA K., DUDLEY J., NEI M. & KUMAR S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24, 1596-1599.

Reçu le 22 mai 2008

Accepté le 26 août 2008