



Thèse Présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'université Louis Pasteur
Strasbourg I

Discipline : **Ecologie-Epidémiologie**

Par **Samia BOUSSAA**

**Epidémiologie des leishmanioses dans la région de Marrakech,
Maroc : effet de l'urbanisation sur la répartition spatio-temporelle
des Phlébotomes et caractérisation moléculaire de leurs
populations**

Soutenue publiquement le 05 avril 2008
Membres de jury :

Directeur de Thèse : Professeur **Bernard PESSON**, Université Louis Pasteur, Strasbourg
Co-Directeur de Thèse : Professeur **Ali BOUMEZZOUGH**, Université Cadi Ayyad, Marrakech
Rapporteur Interne : Professeur **Ermanno CANDOLFI**, Université Louis Pasteur, Strasbourg
Rapporteur Externe : Professeur **Gérard DUVALLET**, Université Paul Valéry, Montpellier
Rapporteur Externe : HDR **Jérôme DEPAQUIT**, Université de Champagne-Ardenne, Reims
Examineur : Professeur **Mohammed BAAZIZ**, Université Cadi Ayyad, Marrakech
Examineur : Professeur **Montserrat GALLEGRO**, Université de Barcelone, Barcelone
Examineur : HDR **Paul READY**, Musée d'Histoire Naturelle, Londres

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR – STRASBOURG 1

RESUME DE LA THESE DE DOCTORAT

Discipline : **Sciences de la Vie et de la Santé**

Spécialité : **Ecologie-Epidémiologie**

Présentée par : **BOUSSAA Samia**

Titre :

**«Epidémiologie des leishmanioses dans la région de Marrakech,
Maroc : effet de l'urbanisation sur la répartition spatio-temporelle
des phlébotomes et caractérisation moléculaire de leurs
populations»**

Unité de Recherche : *UMR N°..*

*Nom de l'Unité : **Parasitologie***

Directeur de Thèse : **PESSON Bernard**
Professeur

Co-Directeur de Thèse : **BOUMRZZOUGH Aii**
Professeur

Localisation : **Faculté des Sciences, Marrakech, Maroc**

DEDICACES

Je dédie ce travail :

À ma mère, À mon père

À mes sœurs Jamila et Amina

À mon petit frère Bachir

&

À tous ceux qui me sont chers

REMERCIEMENTS

Avant d'exposer le résultat de mes recherches, il est nécessaire d'exprimer, avec plaisir, ma reconnaissance et mes remerciements à tous ceux qui m'ont aidé à les réaliser ou qui m'ont fait l'honneur de les juger.

Je tiens tout d'abord à remercier M. M. MARZAK, Président de l'Université Cadi Ayyad, M. A. BERETZ, Président de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg I et Mme C. FLORENZ, directrice de l'Ecole Doctorale des Sciences de la vie, pour les efforts qu'ils déploient pour l'encouragement de la recherche scientifique.

Ma profonde gratitude et mes sincères remerciements vont particulièrement à l'inspirateur de ce travail, M. Ali BOUMEZZOUGH, Professeur Directeur de l'UFR-Doctorat «Ecologie et Fonctionnement des Ecosystèmes Terrestres » et Responsable du Laboratoire d'Ecologie Animale Terrestre à la Faculté des Sciences Semlalia. Il a accepté de m'accueillir dans son Laboratoire en été 2001, juste après ma licence (bac+4), pour un stage de bibliographie sur les maladies parasitaires à transmission vectorielle, et aussitôt après, il m'a permis de préparer un DESA sous sa direction. Il m'a aisément ouvert son laboratoire pour continuer mes recherches pour la préparation de cette thèse. Au cours de ces années, il a toujours bien veillé à ce que ce travail aboutisse et il m'a toujours encouragée pour aller plus loin dans mon travail de recherche. Je le remercie pour la confiance et la compréhension qu'il a toujours manifestées à mon égard.

Je dois une reconnaissance particulière à M. le Professeur Bernard PESSON, Directeur du Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie, Strasbourg I. Il a accepté aimablement de co-diriger ce travail et il m'a permis de préparer ma thèse en co-tutelle. Il est toujours très disponible et ouvert à la discussion ce qui m'a permis de bénéficier de son grand savoir en entomologie. Je le remercie particulièrement pour sa confiance, sa générosité et sa gentillesse, ce fut très enrichissant de travailler dans son laboratoire et sous sa direction scientifique.

J'exprime mes vifs remerciements à M. le Docteur Paul READY, responsable du Laboratoire de Systématique Moléculaire du National History Museum, Londres, de m'avoir réservé un accueil chaleureux dans son Laboratoire et de m'avoir intégré à son groupe de recherche facilement. Je profite pour le remercier aussi de m'avoir invité à participer aux recherches sur le terrain dans le sud de la France dans le cadre du projet européen EDEN (Emerging Diseases in a changing European eNvironment).

Je tiens à adresser mes vifs remerciements et à exprimer ma gratitude à Mme Montserrat GALLEGRO-CULLERE, Professeur à l'Université de Barcelone, qui me fait l'honneur de juger mon travail sans oublier sa gentillesse, ses encouragements et ses conseils.

Je tiens à remercier vivement Messieurs E. CANDOLFI Professeur à la Faculté de Médecine de Strasbourg, J.E. HAFID Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech, G. DUVALLET Professeur à la Faculté des Sciences de l'Université Paul Valéry de Montpellier et J. DEPAQUIT Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Reims qui m'ont honoré en acceptant, aimablement et malgré leurs nombreuses occupations, d'être les rapporteurs de ma thèse auprès des deux Universités et de participer à mon Jury.

Mes remerciements vont aussi à M. M. HAFIDI, Professeur à la Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, qui a aimablement accepté de présider mon jury de thèse et à M. M. BAAZIZ, Professeur à la Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, qui m'a fait l'honneur de juger mon travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma sincère et profonde reconnaissance.

Ce travail a bénéficié du soutien financier de l'AUF (Agence Universitaire de la Francophonie) et de CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) du Maroc. Grâce à ces financements j'ai pu participer à des manifestations scientifiques et terminer ma thèse

dans les meilleures conditions. Je tiens à remercier ces deux entités et les féliciter pour l'effort qu'ils déploient pour encourager la recherche scientifique au Maroc et dans le Monde.

Mes remerciements vont aussi au Ministère de la Santé marocain, spécialement Mme R. HARRAK, Mme S. HILLALI, M. N. HADDOU et toute l'équipe du Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du milieu de Marrakech. Je les remercie vivement pour la collaboration, pour l'aide et pour le soutien moral.

J'ai le plaisir aussi de remercier chaleureusement, tous mes collègues du Laboratoire d'Ecologie Animale Terrestre. M. O. TOULOUN, M. L. OUHMANE et Mlle S. GUERNAOUI, pour l'aide, la gentillesse et pour les moments agréables que nous avons partagés sur le terrain et au Laboratoire d'Ecologie Animale Terrestre.

Mes sentiments les plus sincères d'amitié concernent mes amies A. BERRAHOU, B. SAFIEDDINE, Z. BOUALIOUA et H. MEJHED pour leur présence, amour et soutien pendant les périodes difficiles.

Je ne saurais remercier assez tout mes collègues et ami(e)s de Strasbourg. Mme G. ALSALEH et Mlle M. ASSOUM pour la gentillesse sans limite, amour et soutien pendant les périodes difficiles, Mme N. GLASSER pour l'aide qu'elle m'a accordée et l'intérêt qu'elle a porté à mon travail. Mes remerciements vont aussi à Mme et M. HAKKARI et Mme et M. ELADARI pour l'aide immense, l'amitié et le soutien qu'ils m'ont toujours réservés. Un sentiment particulier pour Mme O. CLAVERT pour sa gentillesse, ses encouragements, pour les discussions fructueuses et le soutien moral.

Je ne pourrais jamais remercier assez Mlle Sylvie PERROTEY, Maître de conférence à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, pour sa gentillesse illimitée, sa serviabilité, ses qualités humaines rares et son aide précieuse et diverse. Elle a été mon interlocutrice et elle m'a aidé à surmonter les barrières. Qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Mes remerciements vont particulièrement à mes ami(e)s du National History Museum de Londres. Mlle S. MAHAMDALLIE, Mme L. SMITH et M. P. PARVIZI pour la disponibilité, l'aide technique et les discussions scientifiques.

Enfin, je remercie toutes celles et tous ceux qui m'ont accompagné et soutenu durant ces années d'études, notamment mes parents, mes sœurs et mon petit frère ; sans leur appui, la réalisation de ce travail n'aurait pas été possible. Je ne saurais exprimer mes sincères sentiments de reconnaissance à toute ma famille, spécialement à mon oncle A. BELAHCEN pour sa gentillesse, ses encouragements, ses services multiples, son soutien moral continu.

RESUME

ABSTRACT

Epidémiologie des leishmanioses dans la région de Marrakech, Maroc
Effet de l'urbanisation sur la répartition spatio-temporelle des phlébotomes
et caractérisation moléculaire de leurs populations

Les phlébotomes sont les seuls vecteurs connus des leishmanioses. Au Maroc, ces infections constituent un réel problème de santé publique. Marrakech constitue une zone carrefour entre trois foyers actifs de leishmaniose du sud marocain: Ouarzazate, Azilal et Chichaoua. Nous avons étudié le risque leishmanien en milieu urbain et l'impact de la périurbanisation sur la biodiversité des phlébotomes.

L'inventaire de la faune phlébotomienne dans la ville de Marrakech montre la présence de deux vecteurs prouvés de la leishmaniose cutanée: *Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi* espèce dominante dans la région, vecteur de *Leishmania major* et *P. (Paraphlebotomus) sergenti* vecteur de *L. tropica*. Nous avons aussi découvert la présence en milieu urbain de *P. (Larrousius) longicuspis* vecteur probable de *L. infantum*. Deux espèces du genre *Sergentomyia* ont été collectées : *S. (Sergentomyia) minuta* et *S. (S.) fallax*.

L'étude de la saisonnalité de ces espèces montre deux périodes annuelles à haut risque leishmanien: octobre-novembre et mai-juin-juillet. *P. papatasi* et *P. longicuspis* ont une évolution biphasique et elle est monophasique pour *P. sergenti*. Les corrélations de l'activité avec les facteurs climatiques du milieu notamment avec la température sont étudiées. En fonction des changements de l'environnement, *P. papatasi* présente une résistance et une forte adaptation ce qui explique son abondance et son activité continue sur toute l'année.

Le typage enzymatique des populations de *P. papatasi* montre une nette structuration génétique entre les populations de l'Est (Syrie, Chypre) et celles de l'Ouest (Maroc, Espagne) méditerranéen. Par contre, aucune différence n'est détectée entre ses populations urbaine et rurale de Marrakech.

L'étude moléculaire de *P. sergenti*, deuxième vecteur rencontré à Marrakech, est effectuée par la comparaison des populations du nord et du sud marocain. Nos résultats confirment sa grande variabilité génétique intraspécifique qui peut être signe de présence d'espèces cryptiques.

L'étude du complexe *perniciosus*, montre une large distribution de la forme atypique de *P. perniciosus* dans le sud marocain. L'analyse enzymatique nous a permis d'identifier un nouveau marqueur enzymatique : l'aconitase (E.C.4.2.1.3), pour distinguer les deux espèces *P. perniciosus* et *P. longicuspis*. L'étude de l'ADN mitochondrial confirme la présence de l'espèce jumelle de *P. longicuspis* dans le sud marocain. Nos résultats nous ont permis d'ajouter de nouveaux critères de diagnose à la clé d'identification des phlébotomes du Maroc.

Mots clés : Phlébotome, *Phlebotomus papatasi*, Complexe *Perniciosus*, urbanisation, isoenzyme, Marrakech.

Epidemiology of leishmaniasis in Marrakesh area, Morocco. Effect of urbanization on sandfly distribution and molecular characterisation of these populations

Phlebotomine sandflies are the only vectors known of leishmaniasis. These diseases are a serious increasing public health problem in Morocco. Marrakesh city presents a high risk because of its position close to many cutaneous leishmaniasis foci: Ouarzazate, Azilal and recently focus of Chichaoua.

Our entomological investigations in Marrakesh area showed presence of five sandfly species. Two of them, *Phlebotomus papatasi* and *P. sergenti*, are the proven vectors of *Leishmania major* and *L. tropica*, respectively. In addition, *P. longicuspis*, suspected vector of *L. infantum* was collected and two species of the genus *Sergentomyia*: *S. minuta* and *S. fallax*.

The seasonality of the sandfly fauna in Marrakesh was examined and they were active especially during the dry season (from May to November). Two seasonal patterns were identified, mono-modal one for *P. sergenti* and bi-modal one for *P. papatasi* and *P. longicuspis*.

P. papatasi was active throughout the year in this area. Effect of urbanization in Marrakesh city favour establishment of this species and it is the most adapted sandfly species to the environmental variations. Isoenzymatic analysis showed no difference between the populations of *P. papatasi* from urban area and rural districts around Marrakesh. Genetic distances separated the populations from western Mediterranean countries (Morocco and Spain) from eastern one (Syria and Cyprus).

Molecular analysis of the second vector collected in Marrakesh, *P. sergenti*, showed a greater genetic diversity of its populations. Three mitochondrial DNA lineages were identified, and they could be markers for presence of cryptic species.

All specimens of *P. perniciosus* examined from the south of Morocco showed single-pointed aedeagi curved at their apices, indistinguishable from the atypical morph of *P. perniciosus*. Enzyme loci showed fixed alleles diagnostic for *P. perniciosus sensu lato* (aconitase) and *P. longicuspis s.l.* (aconitase and hexokinase). The comparative sequence analysis of the Cyt b fragment showed a haplotype of atypical form of *P. perniciosus* and presence of LCx, sibling species of *P. longicuspis* in southern Morocco.

Key words: sandfly, *Phlebotomus papatasi*, *Perniciosus* complex, urbanization, isoenzyme, Marrakesh.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
-----------------------------------	----------

Chapitre I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES LEISHMANIOSES.....	5
I. 1. Généralités et Historique.....	5
I. 2. Répartition géographique.....	7
I. 3. Parasite.....	9
a. Taxonomie.....	9
b. Cycle de vie et morphologie.....	11
I. 4. Réservoirs.....	15
I. 5. Vecteurs.....	19
a. Taxonomie.....	19
b. Morphologie.....	20
c. Bio-écologie et Ethologie.....	23
d. Importance médicale.....	26
II. LES LEISHMANIOSES AU MAROC.....	28
II.1. Leishmaniose cutanée zoonotique à <i>L. major</i>	30
II.2. Leishmaniose cutanée anthroponotique à <i>L. tropica</i>	31
II.3. Leishmanioses à <i>L. infantum</i>	33
III. LES PHLEBOTOMES DU MAROC.....	36

Chapitre II. PRÉSENTATION DE LA ZONE D'ÉTUDE. MATÉRIEL & MÉTHODES

I. PRÉSENTATION DE ZONE D'ÉTUDE.....	39
I.1. Cadre administratif.....	39
I.2. Cadre climatique	39
a. Température.....	40
b. Précipitations.....	41

c. Vent.....	42
d. Humidité.....	42
I.3. Cadre géologique.....	44
I.4. Végétation.....	44
I.5. Population de la région.....	45
II. ENQUETE ENTOMOLOGIQUE.....	46
II.1. Origine des phlébotomes.....	46
II.2. Technique de l'élevage.....	47
a. Maintenance d'un élevage.....	47
i. Chambre d'éclosion.....	47
ii. Nourriture des larves.....	47
iii. Cages.....	48
vi. Nourriture des adultes.....	48
b. Elevage en masse.....	48
II.3. Technique d'échantillonnage	49
a. Pièges adhésifs.....	49
b. Piège lumineux.....	50
II.4. Conservation des phlébotomes.....	53
II.5. Traitement des échantillons.....	53
a. Eclaircissement.....	54
b. Montages.....	54
i. Montage rapide dans la gomme au chloral.....	54
ii. Montage permanent dans le baume du Canada.....	55
c. Dissection des phlébotomes.....	55
d. Identification des spécimens.....	56
II.6. Etude de substrat.....	56
a. Granulométrie.....	56
b. Humidité.....	57
c. Matière organique.....	57
II.7. Autres paramètres mésologiques.....	57
III. ETUDE ENZYMATIQUE.....	57
III.1. Principe d'Isoélectrofocalisation.....	57
III.2. Préparation du gel.....	58
III.3. Préparation des extraits protéiques.....	58

III.4. Préparation des extraits témoins.....	58
III.5. Réalisation de l'électrophorèse.....	59
III.6. Coloration des Protéines étalon.....	59
III.7. Révélation des profils isoenzymatiques.....	60
III.8. Les différents systèmes enzymatiques.....	62
III.9. Interprétation des zymogrammes.....	62
III.10. Analyses des données.....	62
IV. ETUDE DE L'ADN MITOCHONDRIAL.....	66
IV.1. Principe de la technique.....	66
IV.2. Extraction de DNA.....	66
IV.3. Amplification par PCR.....	67
IV.4. Purification.....	68
IV.5. Séquençage.....	69
IV.6. Analyse des données.....	69

RESULTATS & DISCUSSION

Chapitre III. EFFET DE L'URBANISATION SUR LA REPARTITION DES PHLEBOTOMES DE MARRAKECH.

I. INTRODUCTION & OBJECTIF.....	70
II. Effet de changement du milieu sur la distribution des phlébotomes.....	73
III. Etude de l'activité des phlébotomes à Marrakech.....	93
IV. Etude du substrat de potentiels gîtes larvaire.....	105

Chapitre IV. CARACTERISATION MOLECULAIRE DES PHLEBOTOMES DE LA REGION DE MARRAKECH.

INTRODUCTION & OBJECTIF.....	107
PARTIE I. PHLEBOTOMES DU GENRE <i>PHLEBOTOMUS</i>	110
I. <i>PHLEBOTOMUS (PHLEBOTOMUS) PAPATASI</i> SCOPOLI, 1786.....	110
I.1. Introduction.....	110
I.2. Critères morphologiques d'identification.....	110
I.3. Analyse isoenzymatique.....	112
II. <i>PHLEBOTOMUS (PARAPHLEBOTOMUS) SERGENTI</i> PARROT, 1917.....	129
II.1. Introduction.....	129
II.2. Critères morphologiques d'identification.....	129
II.3. Analyse isoenzymatique.....	131
a. Origine des populations.....	131
b. Variabilité génétique.....	131
c. Equilibre de Hardy-Weinberg (HW).....	132
d. Equilibre de liaison.....	133
e. Structuration génétique.....	133
II.4. Commentaires.....	134
III. <i>PHLEBOTOMUS PERNICIOSUS</i> ET <i>P. LONGICUSPIS</i>	137
III.1. Morphologie.....	137
III.2. Répartition géographique.....	137
III.3. Complexe <i>P. perniciosus</i>	139

III.4. Analyse de l'ADN mitochondrial.....	161
PARTIE II. PHLEBOTOMES DU GENRE <i>SERGENTOMYIA</i>.....	167
I. INTRODUCTION & OBJECTIFS.....	167
II. LE GENRE <i>SERGENTOMYIA</i> A MARRAKECH.....	171
II.1. Critères morphologiques d'identifications.....	171
II.2. Inventaire faunistique.....	171
II.3. Analyse isoenzymatique.....	175
a. Origine des populations.....	175
b. Variabilité génétique.....	175
c. Equilibre de liaison.....	178
d. Distance génétique.....	179
III. <i>SERGENTOMYIA (SERGENTOMYIA) MINUTA</i> RONDANI, 1843.....	180
III.1. Critères morphologiques d'identification.....	180
III.2. Analyse isoenzymatique.....	183
a. Origine des populations.....	183
b. Variabilité génétique.....	183
c. Equilibre de Hardy-Weinberg (HW).....	185
d. Equilibre de liaison.....	187
e. Structuration génétique.....	187
III.3. Commentaires.....	188
<hr/> <hr/>	
SYNTHESE GENERALE.....	189
<hr/> <hr/>	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	199
<hr/> <hr/>	

INTRODUCTION GENERALE

Les leishmanioses sont des parasitoses dues à des parasites du genre *Leishmania* et transmises par les phlébotomes (Diptera : Psychodidae). Ce sont des maladies émergentes et étroitement liées à l'état de l'environnement (Ashford, 2000). Le complexe pathogène leishmanien (parasite, vecteur, réservoir), évolue dans une aire géographique définie par un ensemble de paramètres bioclimatiques. Les modifications environnementales se répercutent sur le fonctionnement des foyers, leur dynamique, et leur extension territoriale. Ces modifications du milieu naturel peuvent être soit d'origine anthropique, soit d'origine climatique ; ces deux types de modifications étant d'ailleurs le plus souvent étroitement intriqués. L'émergence ou re-émergence des leishmanioses est directement liée à l'augmentation de facteurs de risque qui sont essentiellement de nature anthropogène (Desjeux, 2002). Les changements climatiques contribuent de façon importante dans l'augmentation et l'extension des maladies à transmission vectorielle, notamment des leishmanioses (Rodhain, 2000). Les co-infections *Leishmania*/VIH sont un facteur de risque individuel qui favorise la dispersion de la maladie (Desjeux et Alvar, 2003). Desjeux (1999) résume les facteurs de risque en sept points:

- l'installation de population dans des zones d'endémie à cause de problème démographique ou manque de terres agricoles;
- les mouvements de populations pour raison professionnelle ou autres;
- le développement de nouveaux projets agricoles ou industriels, amenant des populations non immunisées dans des zones d'endémie, mais aussi le tourisme ou les activités militaires;
- l'urbanisation accélérée et/ou non planifiée;
- la détérioration du tissu économique et social dans les banlieues des villes, où des populations à faibles revenus s'amassent à cause d'un exode rural massif, facilitant ainsi l'apparition d'épidémies;

- les modifications de l'environnement (construction de barrages, systèmes d'irrigation, puits);
- la réduction ou l'achèvement des campagnes de pulvérisation d'insecticides pour la lutte contre le paludisme. Après le succès des plans de lutte, plusieurs pays ont fait face à de graves résurgences en raison de l'interruption du programme.

Les leishmanioses sont endémiques dans 66 pays de l'Ancien Monde et 22 du Nouveau Monde. La population à risque est estimée à 350 millions de personnes, avec une prévalence de 12 millions (Desjeux, 1996).

Au Maroc, les leishmanioses constituent un vrai problème de santé publique. Elles présentent tout un ensemble de syndromes du fait de la variété des parasites et chacun d'entre eux est lié à un vecteur et à un réservoir spécifique. La leishmaniose cutanée zoonotique à *Leishmania major* se manifeste de manière endémo-épidémique dans les zones pré-sahariennes ; la leishmaniose cutanée anthroponotique à *L. tropica* dans les foyers hypo-endémiques au centre du pays et la leishmaniose viscérale due à *L. infantum* sévit au Nord du pays sous un mode hypo-endémique dans des foyers ruraux dispersés.

Selon les rapports du Ministère de la Santé (Anon., 1997 ; 2001 et 2003), la situation épidémiologique des leishmanioses est marquée par la notification continue des cas sporadiques de la leishmaniose viscérale avec une certaine recrudescence depuis 1995, essentiellement due à l'intensification des activités de dépistage. La quasi-totalité de ces cas est originaire des foyers traditionnels du nord, où cette maladie sévit sous forme sporadique. La transmission de la leishmaniose cutanée à *L. major* persiste avec une recrudescence au cours des années 1990 et 1991, suivie d'une légère accalmie de 1992 à 1995, puis la réapparition de la maladie sous forme endémo-épidémique de 1996 à 2001. Les zones touchées sont des zones arides et péri-arides du sud allant de la province de Tata au sud à la province de Jrada à l'Est en passant par les provinces de Zagora, Ouarzazate, Errachidia et

Figuiq. Les foyers de leishmaniose cutanée à *L. tropica* évoluent sous forme hypoendémique dans les provinces du centre (Essaouira, Azilal, Taza, Zouagha Moulay Yacoub et Chichaoua).

Marrakech constitue une zone carrefour entre trois foyers actifs de leishmaniose du sud marocain: Ouarzazate, Azilal et Chichaoua. Les investigations entomologiques ont montré la co-existence à Marrakech de trois espèces vectrices des trois leishmanies responsables des foyers marocains de leishmanioses: *Phlebotomus papatasi/Leishmania major*, *P. longicuspis/L. infantum* et *P. sergenti/L. tropica* (Guernaoui, 2000 ; Boussaa, 2003) avec l'omniprésence de rongeurs et canidés réservoirs à l'état sauvage dans la région, ensemble de conditions qui révèlent un statut éco-épidémiologique à haut risque leishmanien à Marrakech. Etant parmi les plus grandes destinations des populations limitrophes, Marrakech a connu, ces dernières années, de grands changements de l'environnement en raison d'un important essor urbanistique tant à l'intérieur qu'à la périphérie de la ville. L'explosion de constructions anarchiques (habitat insalubre, bidonvilles) et la présence de plusieurs quartiers à caractère rural déjà existants à l'intérieur de la ville, tous ces facteurs favorisent la pullulation du vecteur et augmente le risque dans la région.

Dans cette optique, nous avons mené de pair, une étude écologique des vecteurs en fonction de l'urbanisation à Marrakech et ses marges et une étude génétique des variations intra et interspécifique des populations de ces vecteurs. Cette étude biochimique a pour but de caractériser les populations du milieu urbain et de résoudre des problèmes taxonomiques chez des populations sympatriques de vecteurs prouvés ou potentiels des leishmanies, sources d'erreur dans les relevés entomologiques.

Une étude spatio-temporelle des phlébotomes dans leur milieu naturel s'avère nécessaire pour l'établissement d'un plan de lutte contre les leishmanioses au Maroc.

Après une synthèse bibliographique (Chapitre I) sur les leishmanioses et les phlébotomes, une présentation de la zone d'étude et des méthodes de travail (Chapitre II) sur le terrain et au laboratoire s'imposent pour situer le sujet. Le chapitre III présente les résultats de notre travail en deux grandes parties :

- la première partie est consacrée à l'étude de la saisonnalité des espèces inventoriées en milieu urbain de Marrakech avec une étude détaillée de l'effet de l'urbanisation et des changements des conditions du milieu sur la répartition spatio-temporelle des phlébotomes à Marrakech.
- La deuxième partie présente les résultats de la caractérisation moléculaire des espèces récoltées à Marrakech en utilisant plusieurs voies d'approche (morphologique, enzymatique et analyse d'ADN) pour essayer de résoudre les problèmes posés par leur individualisation et leurs relations taxonomiques.

Ce thème de recherche sur les phlébotomes du sud marocain présente un intérêt aussi bien sur le plan bio-écologique et épidémiologique que sur le plan biomédical et la lutte contre les leishmanioses au Maroc. C'est un travail traité en alternance entre le Laboratoire d'Ecologie Animale, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech et le Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, Strasbourg. Il s'intègre dans le cadre des activités de recherches menés depuis des années aux seins des ces deux laboratoires (Benabdennbi *et al.*, 1998, 1999; Pesson *et al.*, 2004 ; Benabdennbi, 1998 ; Guernaoui *et al.*, 2005, 2006; Guernaoui, 2006) et la suite du travail entamé dans le cadre de la préparation d'un mémoire de DESA (Boussaa, 2003). Une partie de ce travail est réalisée en collaboration avec le laboratoire de Systématique Moléculaire (Natural History Museum, London) et le laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie (Grenade, Espagne).

Chapitre I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES LEISHMANIOSES

I. 1. Généralités et Historique

Les leishmanioses sont des affections cutanées ou viscérales, à transmission vectorielle, dues à des protozoaires flagellés. La population mondiale exposée au risque est évaluée à 370 millions de personnes et la prévalence globale est estimée à 12 millions de cas. Les leishmanioses sont en augmentation dans le monde et actuellement, l'estimation de l'incidence annuelle mondiale des cas de leishmanioses se situe entre 1,5 et 2 millions, se distribuant entre 1 à 1,5 millions de cas de leishmanioses cutanées et de l'ordre de 500.000 cas de leishmanioses viscérales. Mais ces chiffres officiels de l'OMS (2002) semblent largement sous-évalués car il existe un portage asymptomatique important. La distribution géographique s'étend et de nouvelles zones d'endémie apparaissent. Pour certaines régions, il s'agit d'un véritable problème de santé publique. Cette situation alarmante résulte de l'augmentation de la transmission vectorielle et pour la leishmaniose viscérale de l'augmentation du réservoir humain lié à l'infection à VIH/SIDA. Les co-infections *Leishmania infantum*-VIH sont fréquentes dans plusieurs régions surtout dans le bassin méditerranéen (Espagne, Italie, France et Portugal) et au Brésil, mais aussi de plus en plus en Afrique. Chez ces patients immunodéprimés ou développant un SIDA, les leishmanioses sont difficiles à traiter et la leishmaniose accélère le développement du SIDA et diminue l'espérance de vie des patients (Murray, 1999).

Parmi toutes les parasitoses, les leishmanioses sont une des premières décrites au moins dans leurs formes cutanées. La constatation des lésions remonte à la plus haute Antiquité aussi bien dans l'Ancien que dans le Nouveau Monde, alors que l'individualisation des formes viscérales

et la mise en évidence des agents pathogènes n'ont pu se faire qu'au XIX^{ème} siècle. Ainsi, les leishmanioses tégumentaires de l'Ancien Monde, sont des affections dermatologiques connues depuis très longtemps. Al Boukhari, médecin arabe du X^{ème} siècle décrivit cette affection cutanée, et Avicenne l'attribuait à une piqûre de moustique. La première description clinique moderne est celle de McNaught en 1882 et c'est Cunnigham en 1885 qui découvrit les parasites dans un prélèvement de bouton d'Orient (*in* Dedet, 1999).

En 1898, en Ouzbékistan, le médecin militaire Borovsky mentionna un protozoaire dans des prélèvements d'ulcère, sans en déterminer le statut taxonomique. Ce même parasite fut étudié en 1903 par Wright chez un enfant arménien vivant à Boston développant une lésion cutanée, il fut considéré comme une microsporidie et reçut le nom de *Helcosoma tropicum*. Le parasite *Leishmania* fut découvert par Sir William Leishman en 1900 dans des frottis de la rate d'un soldat mort de fièvre à Dum-Dum (l'un des anciens noms de la leishmaniose viscérale) en Inde. Alors qu'il publiait ses résultats en 1903, Charles Donovan identifia le même parasite dans une biopsie de rate (*in* Dedet, 1999).

Le parasite fut nommé *Leishmania donovani* en leur honneur et la forme amastigote du parasite est communément appelée corps de Leishman-Donovan (Roberts et Janovy, 2000). La première culture fut obtenue par Nicolle et Sicre en 1908 (Jarry, 1999), ils comparèrent les organismes de la peau avec ceux de la rate découverts en 1903, et conclurent : « La presque identité au point de vue morphologique du parasite de Leishman-Donovan et de celui de Wright n'est pas contestable ». La même année, Nicolle et Comte découvrent les mêmes protozoaires chez le chien, puis chez le cheval et le chat. Ils font ainsi de cette affection une maladie commune à l'homme et aux autres mammifères et ouvrent la voie aux recherches épidémiologiques. En 1921, les frères Sergent et leurs collaborateurs établissent le rôle de vecteurs des phlébotomes en réussissant la transmission du « bouton d'Orient » par application de broyats de ces insectes sur des scarifications cutanées. Mais la transmission par

la piqûre ne fut prouvée qu'en 1941 par Adler et Ber. Knowles *et al.*, en 1924, l'établit pour le kala-azar, Parrot *et al.*, l'ont fait pour la leishmaniose canine en 1930. De plus, l'école soviétique, avec Latyshev et Krujukova, (1941) attire l'attention sur le rôle des rongeurs en tant que réservoirs de virus sauvages des leishmanioses.

A partir de 1970, la caractérisation isoenzymatique des souches de leishmanies est devenue courante après la publication de l'OMS (1982) sur le sujet. Les premiers cas de co-infection VIH-leishmanies sont signalés à partir de 1985 (Jarry, 1999). Tous ces travaux permettent de se faire une idée de ce qu'est le cycle épidémiologique de ces parasitoses.

I. 2. Répartition géographique

Les leishmanioses, toutes formes cliniques confondues, affectent quatre continents (Asie, Amérique, Europe, et Afrique), dans les zones tropicales et subtropicales de 88 pays, dont 72 pays en développement. Les zones d'endémie sont l'Europe du sud, ainsi que de nombreux PED d'Afrique, du Moyen-Orient, d'Asie, d'Amérique centrale et d'Amérique de sud (Fig. 1). On distingue deux grandes situations géographiques : l'Ancien Monde (sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient et Asie) et le Nouveau Monde (Amériques du Nord, du Sud et Centrale). Les différentes manifestations cliniques sont observées dans les deux mondes mais elles ne sont pas causées par les mêmes espèces de *Leishmania* d'une part, et elles sont propagées par différents genres et espèces de phlébotomes selon la région d'autre part. Les pays les plus durement touchés par la leishmaniose viscérale sont le Bangladesh, le Brésil, l'Inde, le Népal et le Soudan : on y retrouve 90% des nouveaux cas annuels. Quant à la leishmaniose cutanée, 90% des nouveaux cas se situent en Afghanistan, au Brésil, en Iran, au Pérou, en Arabie Saoudite et en Syrie (OMS, 2000).

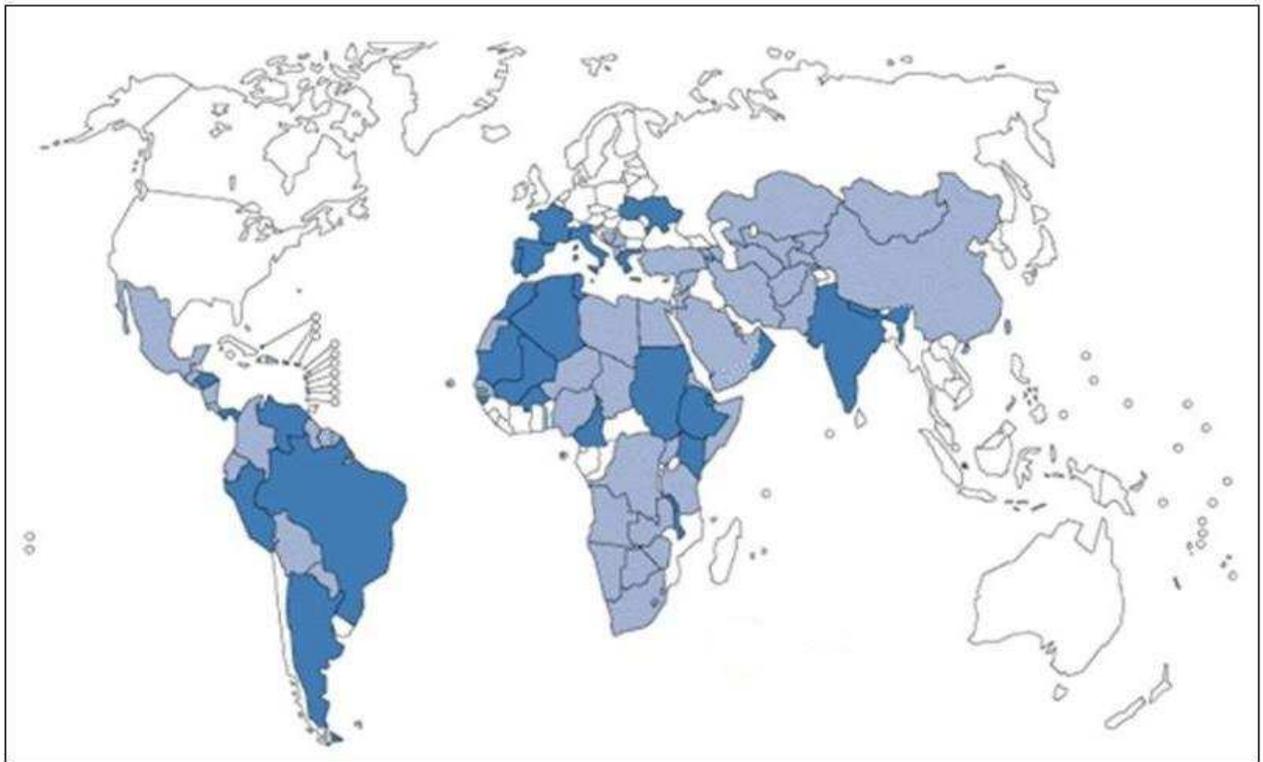


Figure 1. Distribution de la leishmaniose (gris clair) et co-infection (gris foncé)

Leishmania/VIH (OMS., 2000)

Concernant la Leishmaniose viscérale, l'aire de distribution de *Leishmania donovani stricto sensu* (s.s.), agent des leishmanioses viscérales anthroponotiques s'étend de l'Afrique de l'Est au Sud-Est Asiatique. En Inde, les premières épidémies de leishmanioses viscérales (kala-azar) et la persistance de foyers endémiques ont été et sont couplées à la présence des populations péri-domestiques et anthropophiles de l'insecte hôte et vecteur, *Phlebotomus argentipes*, l'un des rares vecteurs dont la bio-écologie est relativement bien appréhendée (Christophers *et al.*, 1925 ; Christophers *et al.*, 1926 ; Shortt *et al.*, 1932 et Keilin et Tate, 1937). Des campagnes de lutte anti-vectorielle ciblée sur les vecteurs de *Plasmodium*, l'agent du paludisme, avaient permis de diminuer la prévalence des leishmanioses viscérales : leur interruption se traduit par une recrudescence des cas de leishmanioses viscérales.

Les aires de distribution de *Leishmania infantum* s'étendent respectivement de la Chine nord orientale à la Méditerranée occidentale et du Mexique au nord de l'Argentine. Au sud de la France, la présence de *L. infantum* et de ses vecteurs (*Phlebotomus ariasi* et *P. perniciosus*) est révélée principalement par des cas de leishmaniose canine, de leishmaniose cutanée et de plus rares cas de leishmanioses viscérales humaines (Rioux *et al.*, 1980 ; Killick-Kendrick *et al.*, 1984).

En ce qui concerne les leishmanies responsables de leishmanioses cutanées, il est encore commun de les distinguer en se référant au Nouveau Monde et à l'Ancien Monde. Deux sous-genres, le sous-genre *Viannia* et le sous-genre *Leishmania* circulent sur le continent américain (Amérique Centrale et du Sud). A l'exception de *L. tropica*, les parasites du sous-genre *Leishmania* circulent essentiellement au sein de systèmes zoonotiques forestiers dominés donc par des mammifères sauvages (ordres des Didelphimorphes, Xenarthres, Rodentiens et Primates simiens). Les parasites du sous-genre *Viannia* circulent aussi essentiellement au sein de systèmes zoonotiques dominés par des mammifères sauvages, voire domestiques.

De nombreux projets agricoles ou de prospections minières, d'exploitations forestières, d'activités militaires et la pression démographique contribuent à rendre compte du caractère épidémique des leishmanioses pour des populations humaines. Ces différents facteurs de risque liés au comportement, à l'environnement ou au développement, permettent d'expliquer en partie, la répartition des foyers leishmaniens (Desjeux, 1999).

I. 3. Parasite

a. Taxonomie

Les leishmanies sont des protozoaires appartenant au genre *Leishmania* Ross, 1903 ; la place de ce genre dans la classification de Levine *et al.*, (1980) est la suivante :

Règne : Protista Haeckel, 1866

Sous-Règne : Protozoa Goldfuss, 1817 emend. Siebold, 1848.

Embranchement : Sarcomastigophora Honigberg et Balamuth, 1963

Sous- Embranchement : Mastigophora Diesing, 1866

Classe : Zoomastigophorea Calkins, 1909

Ordre : Kinetoplastida Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976

Sous-Ordre : Trypanosomatina Kent, 1880

Famille : Trypanosomatidae Doflein, 1901 emend. Grobben, 1905

Genre: *Leishmania* Ross, 1903

Une nouvelle classification est élaborée par Adl *et al.*, (2005) en se basant sur l'étude de l'ultrastructure de Levine *et al.*, (1980) ainsi que des études moléculaires phylogénétiques :

Ordre : Euglenozoa Cavalier-Smith, 1981, emend. Simpson, 1997;

Sous-ordre : Kinetoplastea Honigberg, 1963;

Famille: Metakinetoplastina Vickerman in Moreira, Lopez-Garcia, and Vickerman, 2004;

Genre: *Leishmania*

Le genre *Leishmania* est subdivisé en deux sous-genres, *Leishmania* et *Viannia*, selon que le parasite se développe dans la partie centrale ou postérieure de l'intestin du vecteur, respectivement. Le genre *Leishmania* est composé de plusieurs espèces qui, bien qu'elles soient toutes de morphologie similaire, sont à l'origine de manifestations cliniques allant d'affectations cutanées qui se résorbent d'elles-mêmes à des infections viscérales fatales en passant par des exacerbations inflammatoires causant de graves défigurations. On regroupe habituellement les espèces de *Leishmania* en complexes selon la similarité biochimique de leurs isoenzymes (Tableau 1).

Tableau 1. Espèces de *Leishmania* (d'après Roberts et Janovy, 2000 in Forget, 2004).

Sous-genre	Complexe	Espèce	Localité
<i>Leishmania</i> (Ross, 1903)	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i> (Laveran et Mesnil, 1903)	Inde, Chine, Bangladesh
		<i>L. archibaldi</i> (Castellani et Chalmers, 1919)	Soudan, Éthiopie
	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> (Nicolle, 1908)	Centre nord de l'Asie, nord-ouest de la Chine,
		<i>L. chagasi</i> (Cunha et Chagas, 1937)	Moyen-Orient, sud de l'Europe, nord-ouest de l'Afrique
	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i> (Wright, 1903)	Amérique du Sud et Centrale
		<i>L. killicki</i> (Rioux, Lanotte et Pratlong, 1986)	Milieus urbains du Moyen-Orient et de l'Inde
	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>	Tunisie
	<i>L. gerbilli</i>	<i>L. gerbilli</i> (Wang, Qu et Guan, 1973)	Afrique, Moyen-Orient, Asie soviétique
	<i>L. arabica</i>	<i>L. arabica</i> (Peters, Elbihari et Evans, 1986)	Chine, Mongolie
	<i>L. aethiopica</i>	<i>L. aethiopica</i> (Bray, Ashford et Bray, 1973)	Arabie Saoudite
	<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i> (Biagi, 1953)	Éthiopie, Kenya
		<i>L. amazonensis</i> (Lainson et Shaw, 1972)	Mexique, Belize, Guatemala, centre sud des États-Unis
		<i>L. venezuelensis</i> (Bonfante-Garrido, 1980)	Bassin Amazonien, Brésil
	<i>L. enrietti</i>	<i>L. enrietti</i> (Muniz et Medina, 1948)	Venezuela
	<i>L. heriti</i>	<i>L. heriti</i> (Herrer, 1971)	Brésil
<i>L. deanei</i> (Lainson et Shaw, 1977)		Panama, Costa Rica	
<i>Viannia</i> (Lainson et Shaw, 1987)	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> (Viannia, 1911)	Brésil
		<i>L. peruviana</i> (Velez, 1913)	Ouest des Andes
	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i> (Floch, 1954)	Guyane Française, Guyane, Surinam
		<i>L. panamensis</i> (Lainson et Shaw, 1972)	Panama, Costa Rica

b. Cycle de vie et morphologie

Le parasite *Leishmania* a un cycle de vie dimorphique qui nécessite deux hôtes, l'insecte phlébotome et un mammifère (Fig. 2). Il se présente chez leurs hôtes successifs sous deux stades morphologiques principaux : les promastigotes et les amastigotes (Fig. 3). Lorsque la femelle de phlébotome infectée prend un repas sanguin chez un hôte mammifère **1**, elle salive au site de piqûre et régurgite le sang qui se contamine au contact des parasites, sous forme promastigote, qui obstruent la valvule stomodéale. Les promastigotes sont des parasites extracellulaires mobiles vivant dans le tube digestif du phlébotome. Ils présentent un corps plus ou moins fuselé de 5 à 20 µm de longueur et de 1 à 4 µm de largeur prolongé par un flagelle qui peut atteindre jusqu'à 20 µm de longueur et qui émerge de leur pôle antérieur.

Chez l'hôte mammifère, *Leishmania* infecte ensuite un phagocyte (principalement les monocytes/macrophages) du système phagocytaire mononuclé **2** et se transforme en

amastigote ³. Les amastigotes, nichent à l'intérieur des macrophages de mammifères, au sein de vacuoles dites parasitophores.

Les amastigotes sont ovoïdes ou sphériques, de 2.5 à 5 µm de diamètre avec un très court flagelle et ne sont plus mobile. Ces amastigotes se multiplient par division binaire dans le phagolysosome du phagocyte qui est finalement lysé ⁴. Les parasites ainsi libérés sont phagocytés par des cellules avoisinantes où le processus se poursuit.

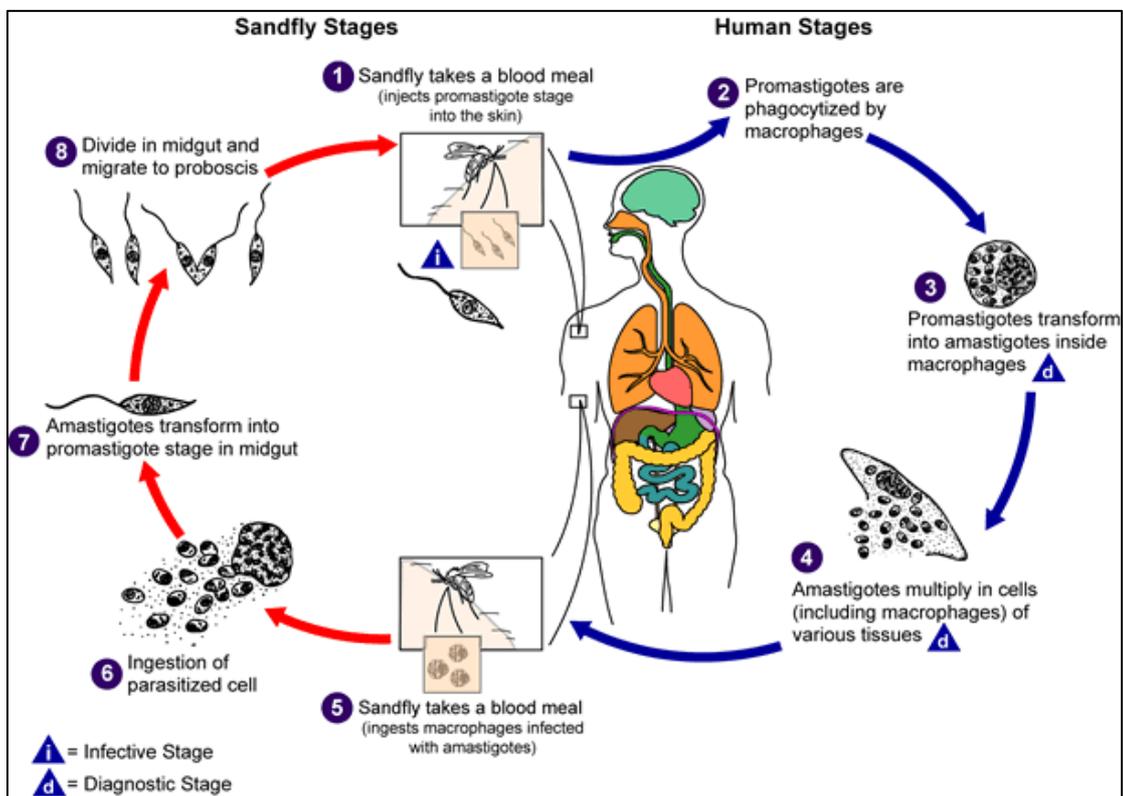
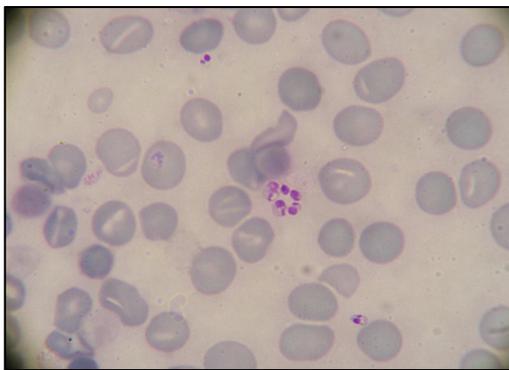


Figure 2. Cycle de vie du parasite *Leishmania* (www.dpd.cdc.gov/dpdx)

Le cycle est achevé lorsqu'une autre femelle de phlébotome prend un repas sanguin du site d'infection et prélève des phagocytes contenant *Leishmania* ⁵. Dans le tube digestif de l'arthropode ⁶, les parasites se différencient à nouveau en promastigotes après 12 à 18

heures ⁷. Ces promastigotes se multiplient et migrent vers les glandes salivaires et la trompe en attendant un nouveau repas sanguin ⁸.

Un troisième type cellulaire connu sous le terme de paramastigote, a été identifié principalement au niveau du pharynx, mais aussi au niveau de l'intestin postérieur et rarement dans l'intestin médian des phlébotomes infectés. Ces stades sont ramassés, munis d'un flagelle court et montrent un kinétoplaste juxtanucléaire.



Forme amastigote



Forme promastigote

Figure 3. Les deux principaux stades morphologiques de *Leishmania*
(Photos du Laboratoire de Parasitologie, Strasbourg)

La morphologie de ces parasites, notamment celle de leur stade promastigote, et leur métabolisme sont très sensibles aux paramètres environnementaux et à leurs variations. La température, le pH, l'osmolarité du milieu, la pression en O₂ et en CO₂ ont été décrits comme influençant la forme parasitaire et les métabolismes du glucose et de certains acides aminés. Deux paramètres subissant de grandes variations au cours du cycle, à savoir le pH et la température semblent plus particulièrement importants et pourraient commander la mise en route de programme de différenciation (Antoine *et al.*, 1999). Lorsque les *Leishmania* passent des insectes vecteurs à leurs hôtes mammaliens, elles subissent tout d'abord une augmentation de température d'environ 10°C puis, après internalisation par les macrophages, une chute du

pH externe d'environ 2 unités. Les différents stades du parasite *Leishmania* peuvent être identifiés selon leur morphologie ou leur emplacement dans le tube digestif du vecteur mais également selon les molécules qui composent leur surface. Les promastigotes sont recouverts d'un glycocalyx alors que les amastigotes en sont presque complètement dépourvus (Pimenta *et al.*, 1991). Ce manteau est constitué de composés glycosylés et de protéines ayant tous un radical de glycosylphosphatidylinositol (GPI). Chez les promastigotes, la molécule de surface la plus abondante est le lipophosphoglycan (LPG). Sa structure varie d'une espèce de *Leishmania* à l'autre. Les espèces se différencient par la présence de chaînes latérales de glycanes, ainsi que par la composition et la situation de celles-ci sur la structure de base du LPG. La deuxième molécule importante chez le promastigote est la glycoprotéine gp63. Elle est environ 10 fois moins abondante que le LPG mais tout comme lui, elle recouvre l'entière surface du parasite. Une autre classe de glycolipides est le phospholipide de glycosylinositol (GIPL). Ayant une longue demi-vie, ces molécules joueraient un rôle de protection de la surface du promastigote puisque le LPG est éliminé continuellement (Proudfoot *et al.*, 1995). Il existe également d'autres protéines de surface du parasite comme celles du complexe gp46/PSA-2. Certaines molécules peuvent être sécrétées par le parasite telles les phosphatases acides et les protéophosphoglycanes (PPG). Les phosphatases acides sont des enzymes hydrolytiques qui semblent jouer un rôle dans la résistance du parasite à son hôte de même que dans sa pathogénicité et sa nutrition. Par contre, on ne les retrouve pas chez *L. major* (Lovelace et Gottlieb, 1986 *in* Forget, 2004). Pour ce qui est des molécules retrouvées à la surface des amastigotes, on observe deux différences majeures : une diminution marquée de l'expression du LPG (McConville et Ralton, 1997) et une diminution (moindre que celle du LPG) de la gp63 (Schneider *et al.*, 1992).

I. 4. Réservoirs

A l'exception de *L. tropica* et *L. donovani* qui sont des espèces anthroponotiques, toutes les autres espèces circulent au sein d'écosystèmes zoonotiques plus ou moins stables. Les mammifères sauvages et/ou péri-domestiques se distribuent essentiellement dans un ordre, celui des Rodentia. L'agent de la leishmaniose cutanée diffuse, *L. aethiopica*, circule dans un écosystème dominé par des mammifères de l'ordre des Hyracoidea. Le réservoir de *L. infantum* est connu comme étant essentiellement canin (Nicolle et Comte, 1908). Dans toute la région méditerranéenne, le réservoir principal semble être constitué par les chiens domestiques (Bettini et Gradoni, 1986), bien qu'un réservoir selvatique soit également présent avec une prévalence de 55% chez les renards (Rioux et Golvan, 1969). Dans le sud de la France, l'abondance de *P. perniciosus*, vecteur prouvé de *L. infantum*, est favorisée par la présence d'animaux domestiques (Izri *et al.*, 1992).

Trois cas de figures peuvent se présenter (Mazelet, 2004) :

- Le réservoir sauvage et un vecteur spécifique du parasite sont dans une même « niche écologique » intégrant un réservoir secondaire péri-domestique et non l'homme par défaut d'anthropophilie de la part du vecteur; la transmission humaine ne pourra alors se faire que par l'intermédiaire d'un autre vecteur qui présentera une anthropophilie plus marquée.
- Le réservoir sauvage et le vecteur sont seuls en syntopie. L'homme ne pourra dès lors se contaminer qu'à l'occasion de contacts épisodiques avec le milieu naturel, lors d'activités de chasse, de cueillette ou professionnelles.
- Le réservoir sauvage, le vecteur et l'homme sont en syntopie au sein de la même « niche écologique ». Il existe deux cas de figure :

1. Le parasite passera du réservoir primaire à l'homme. Ces cas peuvent correspondre aux contaminations survenant à l'occasion de contacts permanents avec un milieu récemment

anthropisé, comme en périphérie des grandes villes proches des forêts primaires d'Amazonie ou dans les villages récemment implantés en zones défrichées.

2. Le cycle est amplifié par la présence d'un réservoir potentiel secondaire constitué par les animaux péri-domestiques qui peuvent assurer ainsi un rôle de relais au sein du complexe pathogène, deux sources d'infestation sont alors possibles : les réservoirs primaire et secondaire.

Seuls les mammifères ont été à ce jour trouvés porteurs de protozoaires appartenant au genre *Leishmania* pathogènes ou non pour l'homme. Ils peuvent être réservoirs ou hôtes accidentels pour le parasite, et diffèrent selon les régions. En fonction de l'hôte il est admis de distinguer des cycles primaire et secondaire, zoonotiques, dans lesquels respectivement des mammifères sauvages et domestiques interviennent en tant que réservoirs. De même, l'homme peut dans certains complexes jouer un rôle de réservoir de parasite, constituant alors avec le vecteur un cycle anthroponotique ou tertiaire (Garnham, 1965), dans ce cas l'affection humaine peut prendre un caractère endémo-épidémiologique (Fig. 4).

Dans l'Ancien Monde, Musser et Carleton ont décompté en 1993, 42 espèces de mammifères appartenant à 25 genres, 9 familles et 4 ordres (Primates, Carnivora, Hyracoidea, Rodentia) infectés par des leishmanies appartenant à huit complexes leishmaniens (*L. major*, *L. arabica*, *L. turanica*, *L. donovani*, *L. killicki*, *L. infantum*, *L. aethiopica* et *L. gerbilli*). Dans le Nouveau Monde, la situation est plus compliquée à cause des espèces de parasites (Tableau 2).

Les rongeurs de la famille des Gerbillinae sont particulièrement représentés dans la partie africaine et asiatique de la région méditerranéenne. Parmi les 6 genres et les 17 espèces qui habitent les régions arides de l'Afrique du Nord, 4 espèces ont un rôle important dans l'épidémiologie de la leishmaniose cutanée à *L. major*.

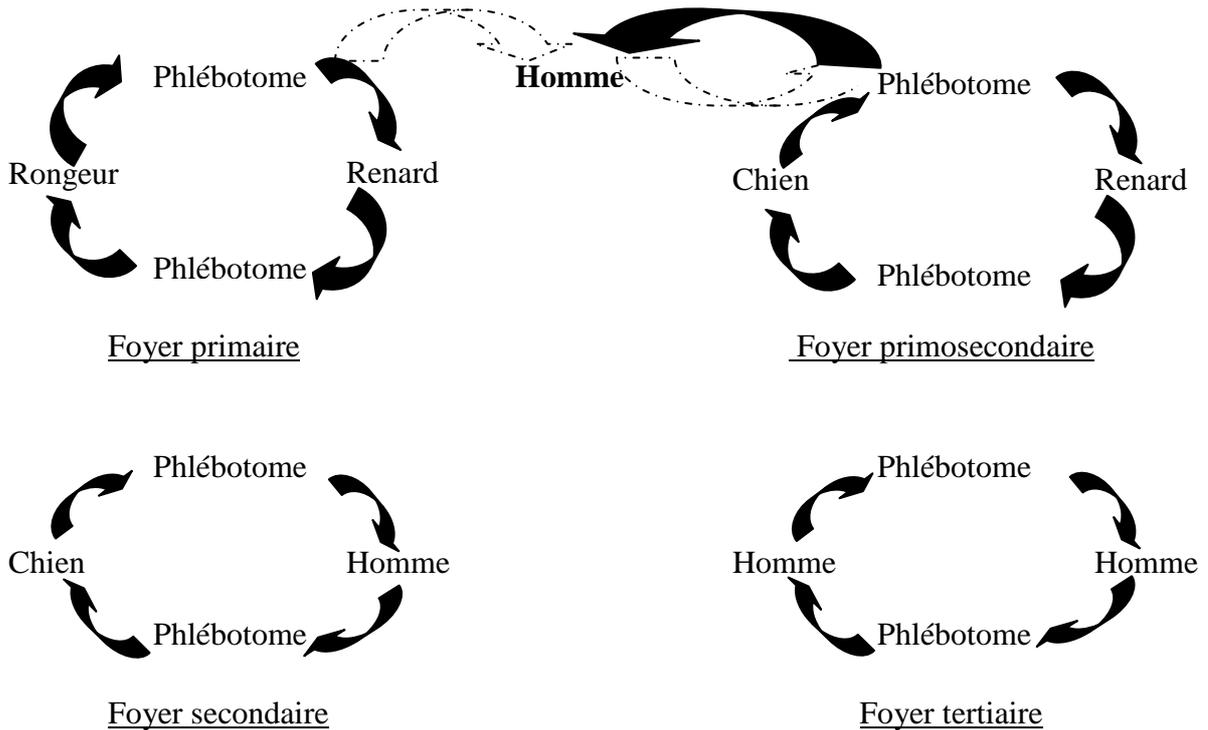


Figure 4. Phénomène d’humanisation de la leishmaniose viscérale.

Meriones shawi est le principal réservoir de parasites en Afrique du Nord (Rioux *et al.*, 1982; 1986a). *M. libycus* en Arabie saoudite, Iran, Jordanie, Libye, Tunisie et Ouzbékistan (Dejeux, 1991). *M. crassus* en Egypte et en Israël (Peters *et al.*, 1981). *Psammomys obesus* est également suspecté d’être un réservoir de parasites dans certains foyers de la leishmaniose cutanée à *L. major*, exemple d’Algérie (Belazzoug, 1983). Dans le foyer de la leishmaniose cutanée au Pérou, le hamster est considéré comme réservoir probable de *L. peruviana* (Herrer, 1982).

L’infection des chats par *Leishmania* est rapportée pour la première fois par Sergent *et al.*, 1912. Depuis, plusieurs cas ont été signalés occasionnellement et plusieurs espèces de *Leishmania* ont été impliquées (Gramiccia et Gradoni, 2005). Des cas dus à *L. infantum* ont

été décrits en France, Italie, Espagne et Brésil (Ozon *et al.*, 1998, Maroli *et al.*, 2007, Martin-Sanchez *et al.*, 2007 et San Martin Mouriz Savani *et al.*, 2004).

Tableau 2. Leishmaniose viscérale (LV), cutanée (LC) et tégumentaire américaine (LT) (OMS, 1990).

	Parasite	Réservoir	Autres animaux infectés
LV	<i>L. (L.) donovani</i> Ross, 1903	Homme	
	<i>L. (L.) infantum</i> Nicolle, 1908	Chien	Canidés sauvages
LC	<i>L. (L.) tropica</i> Wright, 1903	Homme	Chien, rat
	<i>L. (L.) killicki</i> Rioux <i>et al.</i> , 1986	Homme	
	<i>L. (L.) aethiopica</i> Bray <i>et al.</i> , 1973	Damans	
	<i>L. (L.) major</i> Yakimoff et Schokhor, 1914	Gerbillidés	
LT	<i>L. (L.) mexicana</i> Biagi, 1953	Rongeurs	
	<i>L. (L.) amazonensis</i> Lainson et Shaw, 1972	Rongeurs	
	<i>L. (L.) aristidesi</i> Lainson et Shaw, 1979	Rongeurs, Marsupiaux	
	<i>L. (L.) enriettii</i> Muniz et Médina, 1948	Cobayes	
	<i>L. (L.) deanei</i> Lainson et Shaw, 1977	Coendous	
	<i>L. (L.) hertigi</i> Herrer, 1971	Coendous	
	<i>L. (V.) braziliensis</i> Vianna, 1911	Inconnu	Rongeurs, Marsupiaux, chiens
	<i>L. (V.) guyenensis</i> Floch, 1954	Paresseux, Tamandua	
	<i>L. (V.) panamensis</i> Lainson et Shaw, 1979	Paresseux	Singes, Kinkajou
	<i>L. (V.) lainsoni</i> Silveira <i>et al.</i> , 1987	Agouti paca	
	<i>L. (V.) naiffi</i> Lainson et Shaw, 1979	Tatous	
<i>L. (V.) shawi</i> Lainson <i>et al.</i> , 1989	Singes, Carnivores, Paresseux		

I. 5. Vecteurs

Le phlébotome (Fig. 5) est le seul vecteur connu des leishmanioses. La focalisation de ces infections dépend étroitement de la distribution de ces insectes.



Figure 5. *Phlebotomus duboscqi* femelle en train de prendre son repas sanguin

(Photo du Laboratoire de Parasitologie, Strasbourg)

a. Taxonomie

Les phlébotomes appartiennent à l'embranchement des Arthropodes, classe des Insectes, Ordre des Diptères, sous-ordre des Nématocères, famille des Psychodidae Bigot, 1845 et à la sous-famille des Phlebotominae Kertész, 1904.

Selon Lewis *et al.*, (1977), la sous-famille des Phlebotominae comprend cinq genres, les genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia* dans l'Ancien Monde, et les genres *Lutzomyia*, *Warileya* et *Brumptomyia* dans le Nouveau Monde. Postérieurement, le genre *Chinius* est décrit par Leng, 1987. En 1991, Artemiev a proposé 24 genres, élevant certains sous-genres au rang de genres et en créant de nouveaux. Léger et Depaquit (1999) en retiennent 13, en se basant sur des arguments morphologiques et biogéographiques (Tableau 3).

Tableau 3. Distribution géographique des 13 genres de Phlebotominae (Léger et Depaquit, 1999).

	Espèce	Amérique	Océanie	Indomalaisie	Afrique Sud Sahara	Eurasie du Nord	Afrique
<i>Warileya</i>	6	+					
<i>Brumptomyia</i>	22	+					
<i>Lutzomyia</i>	+ 300	+					
<i>Australophlebotomus</i>	10		+				
<i>Idiophlebotomus</i>	12		+	+			(Chine et Inde)
<i>Chinius</i>	1						(Chine)
<i>Spelaeophlebotomus</i>	1				+		
<i>Parvidens</i>	4				+		
<i>Grassomyia</i>	5				+		
<i>Spelaeomyia</i>	4				+		
<i>Demeillonius</i>	1				+		
<i>Sergentomyia</i>	env. 250		+	+	+		+
<i>Phlebotomus</i>	une centaine			+	+		+

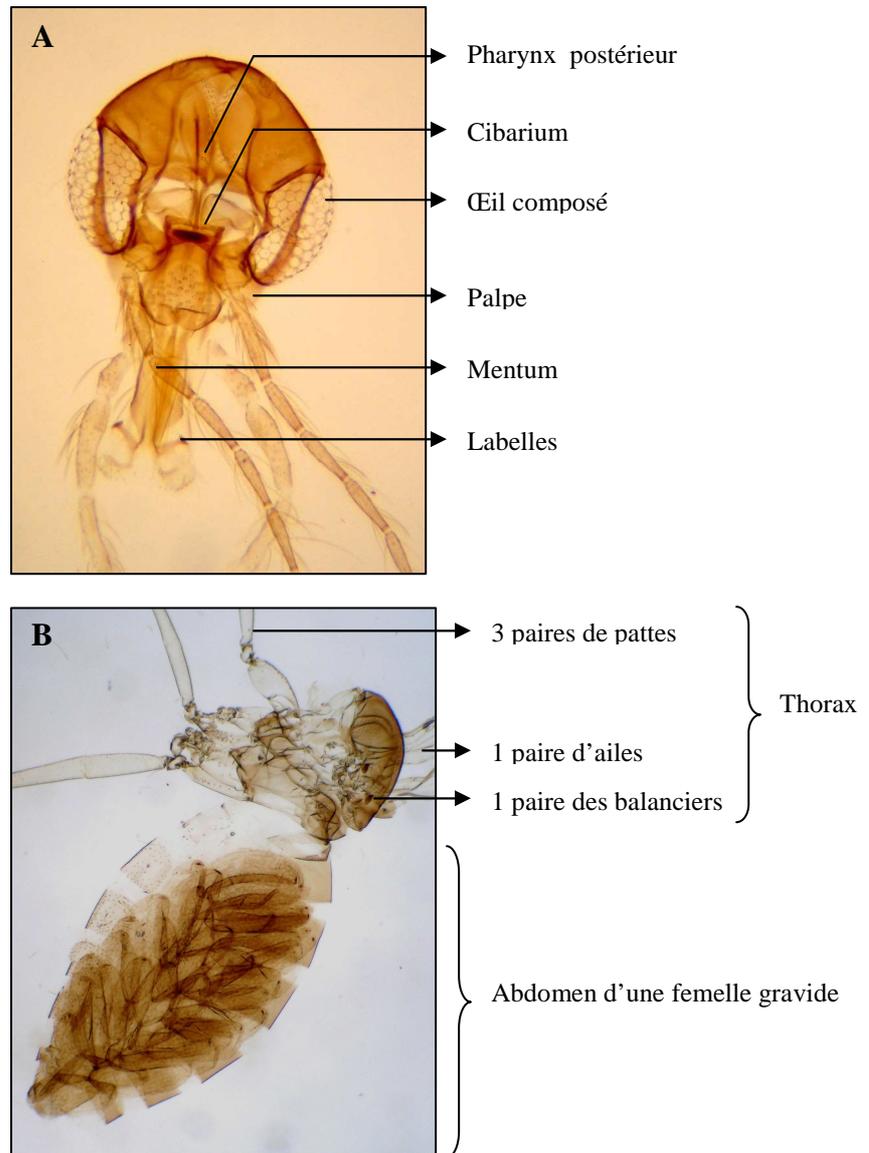
b. Morphologie

Les phlébotomes sont des diptères hématophages présentant un corps grêle et allongé de petite taille, de 1 à 3 mm de long. Le corps d'une couleur jaune terne au noir, ainsi que les ailes ont un aspect velu. La tête forme un angle de 45° avec le corps donnant à l'insecte une allure bossue.

La tête (Fig. 6A) est formée en grande partie par une capsule chitineuse (épïcrame), limitée de chaque côté par un grand œil composé. Sur la région frontale s'insèrent deux antennes formées chacune de 16 segments : deux segments basaux, et 14 segments beaucoup plus longs

et minces, constituant le *flagellum*. L'ensemble des pièces buccales forme une trompe courte. Seules les femelles portent des mandibules dentelées.

Le thorax (Fig. 6B) porte une paire d'ailes et des balanciers qui assurent l'équilibration de l'insecte pendant le vol. Les ailes sont lancéolées et comprennent sept nervures longitudinales et des nervures transverses. Sur chacun des trois segments thoraciques fusionnés est insérée une paire de pattes articulées, longues, fines et couvertes de soies.



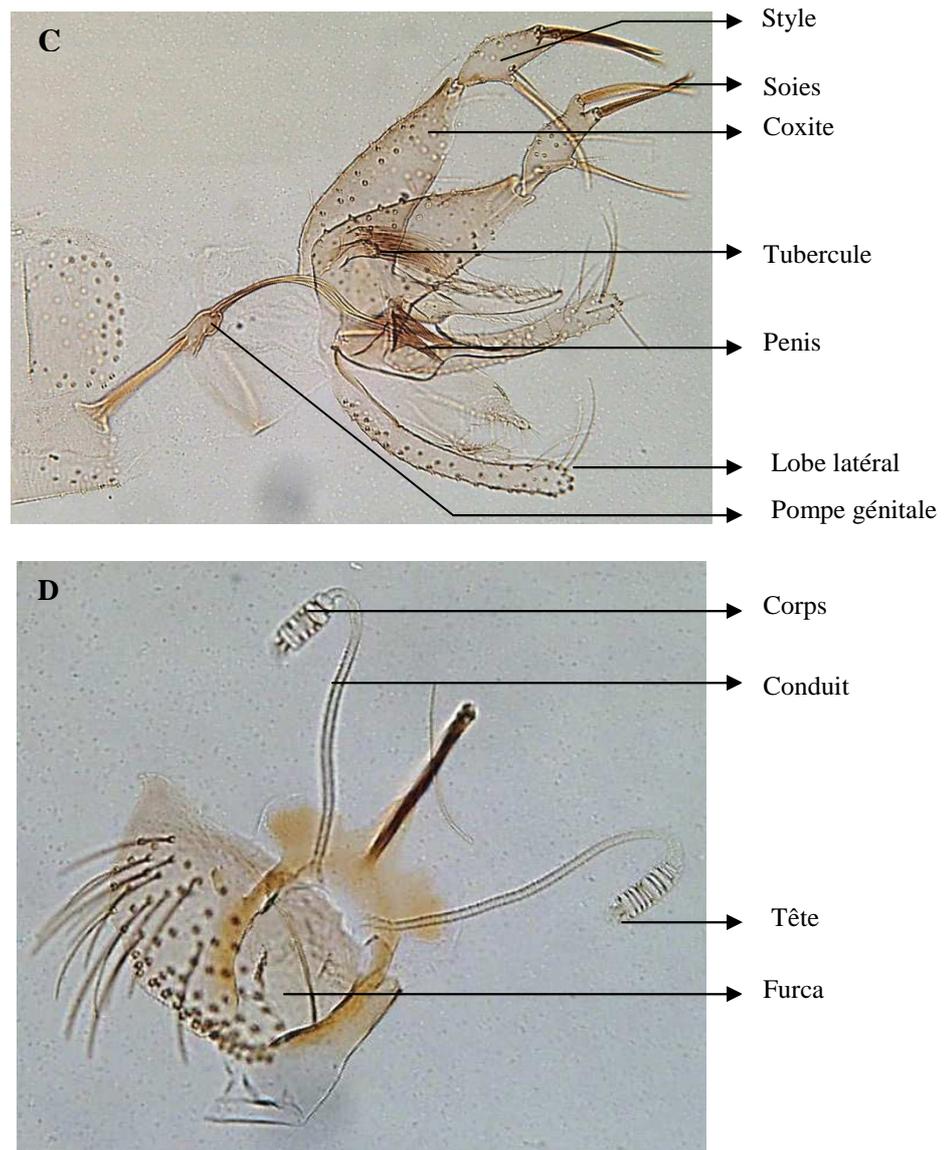


Figure 6. Morphologie d'un phlébotome adulte.

A. Tête (vue ventrale). **B.** Thorax et l'abdomen. **C.** Génitalia mâle. **D.** Spermathèques.

L'abdomen (Fig. 6B) est composé de dix segments. Les trois derniers sont modifiés pour constituer le génitalia. Chez le mâle, l'armature génitale très développée (Fig. 6C) se compose de trois paires de prolongements: une paire de coxites sur lesquels s'articulent les styles ; une paire de pièces médianes, les paramères naissant à la base des coxites ; une paire de prolongements ventraux appelés lobes latéraux et enfin, soudés à la partie interne de ces derniers, deux lames membraneuses, les lamelles sous-médianes entre lesquelles s'ouvre

l'anus. Entre les paramères, se situent les fourreaux ou gaines du pénis protégeant deux filaments génitaux. Chez la femelle, l'appareil génital interne se compose de trois organes pairs: deux ovaires, deux glandes annexes et deux spermathèques (Fig. 6D). Les spermathèques sont formées chacune d'une capsule chitineuse, de morphologie variable, suivie d'un conduit plus ou moins long, qui vient déboucher dans l'atrium génital.

L'armature génitale du mâle, les spermathèques et l'armature buccale de la femelle varient dans leur morphologie et sont utilisés dans l'identification et la classification des espèces.

c. Bio-écologie et Ethologie

Ils présentent un cycle de vie holométabole qui comprend obligatoirement l'œuf, quatre stades larvaires, une nymphe et l'imago (Fig. 7). Les phlébotomes ont une activité essentiellement nocturne et crépusculaire, mais très sensibles aux courants d'air, ils ne sortent que lorsque la soirée est calme. Durant la journée, ils se cachent dans les endroits obscurs et abrités. Dans les régions tropicales ils sont actifs toute l'année, alors que dans les régions tempérées, ils disparaissent l'hiver, la pérennité de l'espèce étant assurée par les larves hibernantes de stade IV. Leur apparition, leur densité, leur période d'activité et leur disparition varient suivant la latitude, l'altitude, la saison et l'espèce (Abonnenc, 1972). Les phlébotomes ont une activité nocturne. La majorité des informations connues sur le comportement des phlébotomes provient d'observations en laboratoire (Killick-Kendrick et Killick-Kendrick, 1999).

Pour son ovogenèse, la femelle prend un repas sanguin pour se procurer les éléments nutritifs nécessaires. Le temps entre un repas sanguin et la maturation des œufs est fonction de l'espèce, de la vitesse de digestion et de la température ambiante. Pour des colonies de laboratoire, la période varie de 4 à 8 jours (Killick-Kendrick, 1999). Le stimulus qui provoque l'oviposition est le contact avec une surface humide.

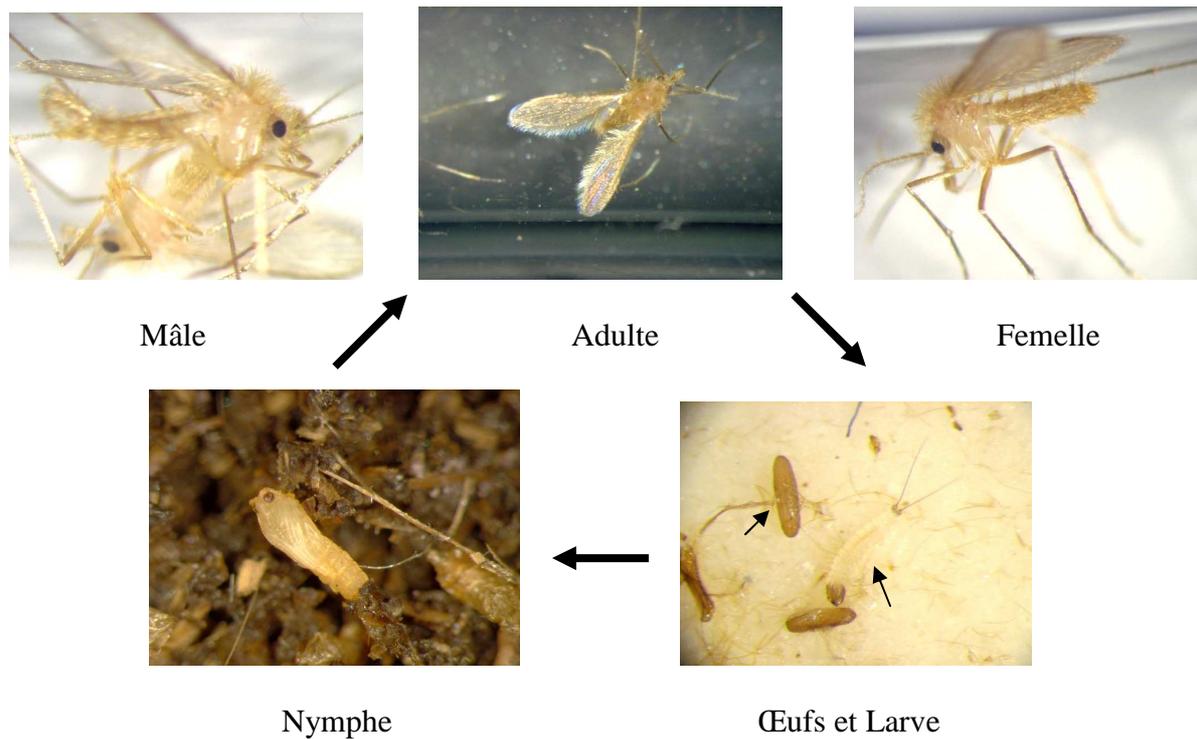


Figure 7. Cycle de vie d'un phlébotome (Elevage de *P. duboscqi*).

Les femelles gravides déposent leurs œufs (80 à 100 œufs) dans des biotopes qui garantissent les conditions optimales pour les stades pré-imaginaux. Leurs œufs se développeront en larves sur le sol, dans les terriers, les nids, la poussière des anfractuosités de rochers ou de vieux murs, les tas de débris végétaux. La nymphe entrera ensuite en état de vie ralentie et subira enfin la mue imaginale conduisant à l'adulte.

Les phlébotomes adultes séjournent durant la journée dans des endroits retirés sombres et relativement humides (terriers, étables, clapiers, niches, et même dans les maisons) ; les horaires de sortie et de rentrée varient suivant l'espèce et les conditions du milieu (étage bioclimatique, période de l'année..).

Contrairement à d'autres diptères comme les moustiques, les phlébotomes sont de mauvais voiliers. Ils se déplacent par vols courts avec des arrêts fréquents ; leur rayon maximum de déplacement, variable selon les espèces est d'environ 1km. Ils ne commencent à s'agiter qu'à la tombée du jour si la température est suffisamment élevée (19-20°C), en l'absence de vent

(vitesse limite: 1m/sec.) et si le degré hygrométrique est élevé. Une faible température ou une température trop élevée constituent autant de facteurs limitants pour l'activité des phlébotomes (Killick-Kendrick, 1999 ; Wasserberg *et al.*, 2003a). Srinivasan *et al.*, (1993) ont noté une corrélation positive entre la densité de *P. papatasi* et la pluviométrie. En Inde, Singh (1999) a montré le rôle primordial de la température dans la distribution de *P. papatasi*.

Certaines espèces sont nettement endophiles ; et d'autres préfèrent l'extérieur. Les mâles se nourrissent exclusivement de jus sucrés également indispensables aux femelles. La femelle, seule hématophage, prendra ses repas nécessaires au développement des œufs sur des mammifères, oiseaux, reptiles ou batraciens. Certaines espèces sont très éclectiques, d'autres plus ou moins spécialisées dans l'exploitation d'un ou de plusieurs hôtes.

Il faut 30 secondes à 5 minutes pour que l'estomac d'un phlébotome soit rempli. Chez l'homme, ce sont les parties découvertes qui sont exposées aux piqûres (visage, cou, mains, pieds). Chez les animaux, ce sont les zones les moins velues (museau, oreilles). L'attraction des phlébotomes vers l'humain semble dépendre de la production de CO₂ mais également de l'odeur (Pinto *et al.*, 2001).

En Inde, le repas sanguin de *P. argentipes* est testé dans un foyer de leishmaniose viscérale, pour 7 différents antisera. Il présente un large spectre de préférences trophiques, il est essentiellement zoophile (62.80%). Le choix de l'Homme comme préférence trophique vient en second rang (24.92%) après les bovins pour *P. argentipes* (Palit *et al.*, 2005).

En Turquie, l'étude des repas sanguins chez *P. sergenti* et *P. papatasi*, dans un foyer de leishmaniose cutanée montre le rôle des oiseaux (volailles) et des mammifères (rongeurs) comme préférence trophique pour ces espèces (Svobodová *et al.*, 2003).

Lorsque on pratique des analyses de contenus stomacaux, il n'est pas rare de trouver du sang de diverses origines. En effet, lorsqu'un phlébotome est dérangé au cours de son repas, il peut le compléter soit en piquant aussitôt le même hôte (ce qui explique certaines lésions multiples

de leishmanioses cutanées) soit en piquant un autre hôte. Les repas sanguins multiples sont détectés avec un taux plus élevé chez *P. argentipes* que chez *P. papatasi* (Palit *et al.*, 2005).

d. Importance médicale

L'importance médicale des phlébotomes tient au rôle vecteur de certaines espèces dans la transmission d'affections humaines et animales. Elles peuvent, à la faveur d'expositions répétées à la piqûre, provoquer des réactions allergiques mais sont plus connus pour transmettre des agents pathogènes au premier rang desquels figurent des parasites (leishmanies), des bactéries (bartonelle) et des arbovirus.

Il existe un genre prédominant dans le Nouveau Monde, *Lutzomyia* et un dans l'Ancien Monde, *Phlebotomus* qui sont responsables d'à peu près toutes les transmissions connues des *Leishmania* aux humains. Sur 81 espèces de phlébotomes, 19 ont été confirmées comme vecteurs des différentes espèces de *Leishmania* (Killick-Kendrick, 1990).

La piqûre est de type telmophage et douloureuse, mais l'intensité des réactions de l'hôte varie selon l'espèce de phlébotomes en cause (douleur, apparition d'une papule ou d'une tache hémorragique).

Bien qu'il puisse y avoir plusieurs espèces de *Leishmania* dans la niche écologique d'une espèce vectrice, celle-ci ne transmettra pas nécessairement toutes les espèces de parasites de façon aléatoire. En effet, il semble que l'association vecteurs-parasites soit spécifique (Killick-Kendrick, 1985). La susceptibilité ou la résistance d'une espèce de phlébotome donnée au développement d'un parasite en particulier semble dépendre de la capacité de celui-ci à surmonter certains obstacles tels les enzymes digestives de l'intestin médian, la membrane péritrophique entourant le repas sanguin et finalement l'excrétion du contenu de l'intestin médian suite à la digestion (Sacks, 2001).

Les différences de structure entre les lipophosphoglycanes (LPG) des différentes espèces de *Leishmania* seraient responsables de leur survie dans leurs vecteurs respectifs. Par exemple, les ramifications de résidus galactose du LPG de *L. major* permettraient son attachement dans son vecteur naturel *P. papatasi* alors que *L. donovani* ne peut s'y attacher à cause de son LPG non-ramifié (Pimenta *et al.*, 1994). À l'inverse, *L. major* et *L. donovani* ne peuvent coloniser l'intestin médian de *P. sergenti*, le vecteur naturel de *L. tropica*, dont le LPG contient beaucoup de glucose et d'arabinose (Kamhawi *et al.*, 2000a). La spécificité parasitaire dans le couple *Leishmania*/phlébotome semble être flexible et non totalement stricte. On sait d'ailleurs depuis longtemps que *Lutzomyia longipalpis* transmet *L. infantum* en Amérique et que *P. arabicus* se substitue à *P. sergenti* dans la transmission de *L. tropica* dans un foyer Proche Oriental (Jacobson *et al.*, 2003). *P. (Adlerius) halepensis* est sensible à *L. major* et *L. tropica* (Sadlova *et al.*, 2003). *P. dubosqi* et *P. papatasi* présentent le même récepteur pour *L. major* (Kamhawi *et al.*, 2005).

Lors d'un repas sanguin, la femelle de phlébotome injecte de la salive au site de piqûre, qu'elle soit infectée ou non par *Leishmania*. Plusieurs études ont démontré que des homogénats de glandes salivaires avaient un pouvoir immunomodulateur lorsque injectés de façon concomitante avec *Leishmania* et permettaient l'augmentation de la taille de la lésion et/ou de la charge parasitaire (Lima et Titus, 1996; Mbow *et al.*, 1998 ; Katz *et al.*, 2000). Par contre, la réponse de l'hôte était très différente lorsqu'on procédait à l'infection directement par une piqûre de phlébotome infectée plutôt qu'à la co-inoculation de parasites et d'homogénats de glandes salivaires (Kamhawi *et al.*, 2000b). La salive de vecteur est aussi reconnue pour conférer une immunité contre la leishmaniose (Kamhawi *et al.*, 2000b; Teixeira *et al.*, 2006). Cette protection est liée à une réponse immunitaire de type hypersensibilité retardée.

Récemment, la mise en évidence de l'ARN de virus de Toscana chez *Sergentomyia minuta* (Charrel *et al.*, 2006), espèce de phlébotome considérée comme herpétophile, a permis de soupçonner le rôle vecteur des espèces du genre *Sergentomyia*.

II. LES LEISHMANIOSES AU MAROC

Au Maroc, comme dans la plupart des pays du pourtour méditerranéen, les leishmanioses constituent un important problème de santé publique (Mahjour *et al.*, 1992). La situation est devenue préoccupante dès les années 1970 et continue à l'être jusqu'à nos jours. Avec les pratiques agro-sylvo-pastorales, les aménagements hydrauliques, la surpopulation, les migrations..., la maladie a pris beaucoup plus d'ampleur ces dernières années, et on a noté l'émergence de nouveaux foyers leishmaniens.

La leishmaniose cutanée est connue au Maroc depuis près d'un siècle. Elle était considérée comme une affection sporadique. Foley *et al.*, (1914) signale l'existence dans le sud marocain du bouton d'orient à l'état endémique. Des cas de bouton d'Orient ont été rapportés à Figuig en 1925 par Leblanc (*in* Souhail, 1994) et dans l'Atlas marocain (Colonieu, 1931). A partir de 1977 avec l'arrêt des opérations d'aspersion au DDT contre le paludisme dans le sud du pays, elle commence à se développer sur le mode épidémique. Plusieurs poussées épidémiques éclatent alors au sud de l'Atlas dans les zones subsahariennes, dues à *L. major* (Rioux *et al.*, 1986a).

La première mention de leishmaniose viscérale humaine au Maroc a été faite en 1921 par Klippel et Monier à Meknès. Les observations enregistrées par la suite démontrent une grande dispersion de l'affection dans les différentes provinces du pays. Si les régions du Nord : Tanger (Remlinger, 1921 *in* Souhail, 1994), Fès (Flys-Sainte-Marie, 1934), Casablanca (Blanc *et al.*, 1934), Azrou sont fréquemment citées, d'autres publications concernent les localités situées plus au sud : Irherm, Tata, Goulimime (Gaud, 1935).

Dès le début des années 1970, la situation des leishmanioses est devenue préoccupante au Maroc ce qui a conduit à l'élaboration d'un programme d'étude franco-marocain, sous la direction du Professeur Rioux, pour analyser les différents foyers leishmaniens. Le piégeage des phlébotomes et l'isolement des leishmanies sont mis en oeuvre. Selon Rioux *et al.*, 2001, *L. major*, *L. tropica* et *L. infantum* ont été identifiés comme étant les espèces parasites responsables des affections (Fig. 8).

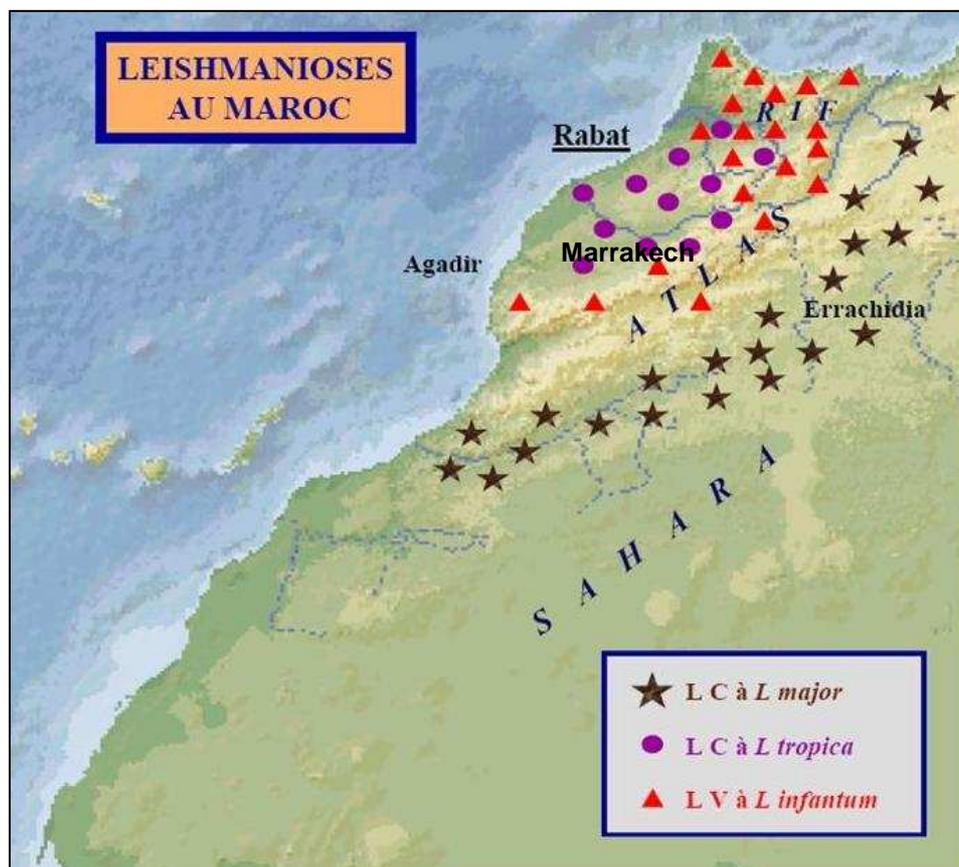


Figure 8. La répartition des leishmanioses au Maroc (Anon., 2001)

Avant 1993, l'absence d'un système de recueil de l'information épidémiologique concernant les leishmanioses fait que les données disponibles ne reflètent guère la situation épidémiologique réelle. Entre 1994 et 1999, en tenant compte des déclarations de cas faites par les provinces et préfectures durant cette période, la situation des différentes leishmanioses

peut être illustrée en trois entités épidémiologiques (Laamrani-Idrissi, 2000) : la leishmaniose cutanée zoonotique à *L. major*, leishmaniose cutanée anthroponotique à *L. tropica* et leishmanioses cutanée et viscérale à *L. infantum*.

II.1. Leishmaniose cutanée zoonotique à *L. major*

Dans le sud et l'est du Maroc, *L. major* provoque une leishmaniose cutanée zoonotique de caractère endémo-épidémique. Le premier foyer est identifié au sud de l'Anti-Atlas, dans les palmeraies de l'oued Tata où une importante épidémie de leishmaniose cutanée s'était manifestée à la fin des années 1970. Après l'épidémie de Tata, deux nouveaux foyers ont été identifiés : un à Ouarzazate et l'autre à Oujda (Rioux *et al.*, 1986a et b).

L'analyse enzymatique des isolats obtenus au tout début de l'épidémie a permis d'identifier *L. major* MON-25 (Maazoun *et al.*, 1986), seul zymodème en cause sur l'ensemble du Maghreb. L'infestation intra-vectorielle est mise en évidence dans le douar d'Akka-Ighan (Est de Tata) par l'identification d'une femelle de *P. papatasi* porteuse de promastigotes de *L. major* (Rioux *et al.*, 1986b).

L. major s'observe exclusivement dans les étages bioclimatiques aride et péri-aride. L'espèce vectrice est *P. papatasi* et sa densité croît avec l'augmentation de l'aridité. Les principaux acteurs du cycle ont pu être identifiés par l'isolement du parasite (*L. major* MON-25) chez l'homme, le vecteur et le réservoir *Meriones shawi* (Rioux *et al.*, 1982).

Actuellement, *L. major* constitue toujours un problème de santé publique. 2140 cas ont été notifiés au cours de l'année 2003 contre 310 en 2002. La province de Ouarzazate a enregistré à elle seule 2064 cas ce qui représente 96,4 % du total. Cette poussée épidémique a été noté au niveau des secteurs péri-urbain de Ait Gdif et Sidi Daoued (Anon., 2003).

Tableau 4. Répartition des cas de leishmaniose cutanée à *L. major* au Maroc entre 1997 et 2003 (Anon., 2003).

Province	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	Total
Boulemane	0	17	18	3	1	1	0	40
Errachidia	337	92	46	40	56	4	0	575
Figuig	247	96	60	65	29	26	3	526
Jrada	0	3	0	2	3	6	21	35
Ouarzazate	11	98	135	62	210	251	2064	2831
Tata	0	0	2	1	0	0	0	3
Zagora	574	244	154	161	60	22	52	1267
Total	1169	550	415	334	359	310	2140	5277

II.2. Leishmaniose cutanée anthroponotique à *L. tropica*

La leishmaniose cutanée à *L. tropica* est une anthroponose dont le vecteur prouvé est *P. sergenti* et le réservoir est l'homme (Guilvard *et al.*, 1991). En 1989, Marty *et al.*, ont localisé le premier foyer de leishmaniose cutanée à *L. tropica* à Tanant dans la région d'Azilal après le diagnostic de cette parasitose chez une fillette marocaine en déplacement à Nice. D'autres foyers, comparables à celui de Tanant, ont été identifiés à Smimou (Pratlong *et al.*, 1991) à Taza (Guessous Idrissi, 1999), Zouagha My Yacoub (Rhajaoui *et al.*, 2004) et Chichoua (Guernaoui *et al.*, 2005a, 2006a et Bacaër et Guernaoui, 2006).

P. sergenti, vecteur prouvé de *L. tropica* (Al Zahrani *et al.*, 1988), était abondant dans les foyers marocains. La preuve de son rôle de vecteur au Maroc a été faite dans le foyer Tanant (Guilvard *et al.*, 1991). La leishmaniose à *L. tropica* est toujours considérée, au Maroc, comme une anthroponose. Le chien trouvé infesté à plusieurs reprises par les zymodèmes MON-102 et MON-112, sous forme sporadique, n'est cependant pas considéré comme un "vrai réservoir" (Dereure *et al.*, 1991). Cette forme de leishmaniose sévit dans les zones semi-

arides du pays allant du plateau de Tadla à la région d'Agadir en passant par Beni Mellal, Azilal, Marrakech, Kelaa et Essaouira. Dans ces régions, la maladie s'observe dans les douars ruraux situés entre 400 et 1000 m d'altitude au voisinage de vastes forêts de thuya. Dans ce biotope commun à plusieurs régions du Maroc, la maladie évolue sous une forme hypo-endémique avec un nombre réduit de cas. Le polymorphisme enzymatique du parasite est considérable, *L. tropica* MON-102, MON-107, MON-112, MON-113, MON-122, MON-123, (Pratlong *et al.*, 1991). Récemment dans la province d'El Houcima, *L. tropica* MON-279 est identifié chez un chien présentant des symptômes de leishmaniose viscérale canine (Lemrani *et al.*, 2002).

Selon le rapport annuel du Ministère de la Santé (Anon., 2003), 1012 cas ont été notifiés en 2003 contre 1130 en 2002. Les provinces d'Al Haouz, Azilal, Chichaoua, Sefrou, Sidi Kacem, Taounate et Taza ont enregistré 896 cas, soit 88% du total.

Tableau 5. Evolution des atteintes de leishmaniose cutanée à *L. tropica* au Maroc entre 1997 et 2003 (Anon., 2003).

L'année	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	Total
Nombre de cas	27	105	156	450	1669	1130	1012	4549

L'incidence annuelle montre que le taux le plus élevé est enregistré dans la province de Chichaoua avec 16,17 cas pour 10000 habitants, suivie des provinces de Fès Médina (10 cas/10000) et de Sefrou (8,14 cas/10000). La moyenne nationale est de 4,13/10000 (Anon., 2003).

II.3. Leishmanioses à *L. infantum*

L. infantum présent sur l'ensemble du territoire marocain, s'exprime sous 2 formes cliniques ; viscérale et cutanée. Le zymodème MON-1 est isolé chez un cas de leishmaniose viscérale infantile dans la province de Taounate (Guessous Idrissi *et al.*, 1997). Le chien, réservoir habituel du zymodème MON-1, constitue un excellent indicateur nosogéographique : mieux que toute autre méthode, le dépistage de la leishmaniose viscérale canine permet de localiser les foyers d'infection et d'en estimer le niveau d'activité. Ainsi dans le Rif, l'enzootie atteint la fréquence de 32,5% alors qu'elle n'est plus que de 3,1% dans le Haut-Atlas (Rioux *et al.*, 1997) et devient sporadique dans l'Anti-Atlas (Dereure *et al.*, 1986). *L. infantum* MON-24 est un agent de la leishmaniose cutanée humaine au sud (Rioux *et al.*, 1996), et au Nord du Maroc (Laamrani *et al.*, 1999). Son cycle de transmission reste inconnu.

La leishmaniose canine est largement répandue dans la partie Nord du Maroc et les souches de *L. infantum* sont très virulentes. Les variations des titres en anticorps anti-*L. infantum* chez une cohorte de chiens naturellement infestés ont été étudiées dans les provinces de Sefrou et Zouagha Moulay Yacoub (Najjar *et al.*, 2000). Les chiens ont été divisés en 3 groupes : un groupe de chiens symptomatiques qui produisent des titres élevés en anticorps (titres ≥ 800) et développent une leishmaniose canine fatale ; un groupe de chiens qui ont montré de faibles titres en anticorps et sont restés asymptomatiques durant tout le suivi et un groupe de chiens qui sont devenus négatifs à la fin de l'étude. Les auteurs ont remarqué que les chiens adultes sont plus sensibles à la maladie que les jeunes chiens (Najjar *et al.*, 2000).

Une enquête sur la leishmaniose canine dans la province de Khemisset est menée par Natami *et al.*, (2000). Les signes cliniques ont révélé un caractère protéiforme et un manque de constance des symptômes. Les biopsies des ganglions, rate et moelle osseuse ont montré une infiltration massive par les cellules mononucléaires et une hyperplasie de macrophages avec des amastigotes dans leur cytoplasme. La recherche des anticorps anti-*Leishmania* effectuée

par la technique ELISA a révélé une séro-prévalence moyenne de 16,71 % (Natami *et al.*, 2000).

A l'instar de *L. major* et *L. tropica*, la chorologie de *L. infantum* se calque sur celle du vecteur, mais ici trois espèces au moins, appartenant au sous genre *Larroussi*, se partagent la responsabilité de la transmission : *P. ariasi*, *P. perniciosus* et *P. longicuspis* (Rioux *et al.*, 1984 ; Killick-Kendrick, 1990). Le rôle de *P. perniciosus* et *P. ariasi* a été prouvé en Espagne (Rioux *et al.*, 1986a), au nord du Maroc (Taounate) où une femelle de *P. ariasi* a été trouvée infestée (Hamdani, 1999). D'après Rioux *et al.*, (1997) les trois espèces : *P. ariasi*, *P. perniciosus* et *P. longicuspis* sont responsables de transmission, dans les stations humides et subhumides au Nord du Maroc, alors que dans le sud du pays, seul *P. longicuspis* est connu comme vecteur potentiel de *L. infantum* (Dereure *et al.*, 1986). L'association des outils morphométrique, isoenzymatique et moléculaire dans le nord du Maroc (Benabdennbi 1998 ; Benabdennbi et Pesson, 1998 ; Benabdennbi *et al.*, 1999 ; Pesson *et al.*, 2004), a montré l'existence de morphes atypiques de *P. perniciosus*, confondus avec *P. longicuspis*, et d'une introgression entre *P. perniciosus* et *P. longicuspis*. L'analyse morphologique du matériel entomologique du sous-genre *Larroussi* au centre et sud-ouest marocain (Guernaoui *et al.*, 2005b) a montré que la forme atypique de *P. perniciosus* paraît largement répandue dans ces régions.

Tableau 6. Evolution des atteintes de leishmaniose viscérale à *L. infantum* au Maroc entre 1997 et 2003 (Anon., 2003).

L'année	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	Total
Nombre de cas	76	69	105	102	116	101	115	684

Au cours de l'année 2003, 115 cas de leishmaniose viscérale ont été notifiés (Anon., 2003). C'est une tendance similaire aux années écoulées (Tableau 6). Cette situation est restée stationnaire depuis 1999 avec une centaine de cas rapportés chaque année.

L'incidence la plus élevée est enregistrée au niveau des provinces de Fés Médina, Fés Jdid, Zouagha Moulay Yacoub et Taza (Anon., 2003).

Au Maroc, les leishmanioses sont des maladies diverses et complexes pour plusieurs raisons :

- Multiplicité et complexité des cycles parasitaires : anthroponotique pour *Leishmania tropica* et zoonotique pour *L. major* et *L. infantum*.
- Diversification des réservoirs de parasites : des rongeurs pour *L. major* et des canidés pour *L. infantum*.
- Distributions géographiques différentes : *L. major* dans les régions sahariennes, *L. tropica* dans les zones semi-arides et *L. infantum* dans le nord et les régions centrales et sub-humides (Fig. 8).

Les leishmanioses sont des maladies à déclaration obligatoire au Maroc (arrêté ministériel n° 683-95 du 31 mars 1995), et constituent toujours un vrai problème de santé publique (Ministère de santé, 2001). Les deux entités cliniques observées, viscérale et cutanée, sont largement répandues sur tout le territoire.

Les leishmanioses au Maroc constituent trois entités nosogéographiques bien différenciées nécessitant des actions de lutte codifiées et adaptées à chacune d'elles. La mise en place du programme de lutte et sa généralisation ont permis d'instaurer des différentes actions de lutte. Un système d'information permet, en particulier, le suivi de la situation épidémiologique et le degré de réalisation des différentes actions de lutte. Si les activités de dépistage et de traitement des cas humains sont opérationnelles au niveau des différentes provinces

endémiques, la lutte contre le vecteur et le réservoir animal (le rongeur et le chien) reste limité et insuffisante.

III. LES PHLEBOTOMES DU MAROC

Les phlébotomes ont suscité plusieurs travaux au Maroc avant même que les leishmanioses ne soient considérées comme un problème majeur de santé publique. Après les observations et les notes de Ristorcelli (1939, 1940, 1941, 1945, 1947) sur les phlébotomes récoltés au sud et dans le Maroc oriental, Gaud (1947) a fait une première étude sur les phlébotomes du Maroc. Il a donné une synthèse générale sur la répartition régionale et la fréquence saisonnière des phlébotomes dans l'ensemble du pays (Gaud, 1954) et dans la région de Rabat (Gaud et Laurent, 1952). Des études plus détaillées sur la biologie des phlébotomes de la région de Figuig ont été faites par Parrot et Durand-Delacre (1947). Les travaux de Bailly-Choumara *et al.*, (1971) ont présenté une synthèse géographique et bioclimatique des données existantes sur les phlébotomes du Maroc et sur leurs propres recherches entre 1965 et 1970.

A partir des années 70, les travaux de Rioux, en collaboration avec les autorités marocaines ont eu pour objectif l'analyse de différents foyers (Rioux, 2001). Les missions de l'équipe de Rioux dans le nord et le sud du Maroc ont permis d'établir l'inventaire de la faune phlébotomienne (Rioux *et al.*, 1975a, 1977 et 1986c), d'étudier les corrélations vecteur-bioclimat (Rioux *et al.*, 1984) et d'envisager des prévisions de la distribution des leishmanioses en fonction des changements climatiques (Rioux *et al.*, 1997). Rioux *et al.*, (1974) rapportent *P. (Larroussius) mariae* sur l'axe de Meknès à Ouarzazate. Cette espèce est retrouvée par Lambert *et al.*, (1994) dans le Haut Atlas aux étages semi-aride et sub-humide froid. Léger *et al.*, (1974) ont mené une étude écologique et systématique des espèces du complexe *S. (Sergentomyia) antennata* du sud marocain. *P. (Paraphlebotomus) riouxi* est rapporté au Maroc par Depaquit *et al.*, (1998).

Les travaux de Guernaoui *et al.*, (2005b, 2006b et 2006c) dans le sud-ouest marocain ont permis d'actualiser les données de Rioux dans cette région et de réviser la répartition des *Larroussisus* d'après les observations de Benabdennbi *et al.*, 1999 dans le nord marocain. Des études préliminaires (Guernaoui, 2000 et Boussaa, 2003) dans la ville de Marrakech ont révélé un statut éco-épidémiologique à haut risque leishmanien par la mise en évidence de trois espèces vectrices des leishmanies : *P. papatasi*, *P. sergenti* et *P. longicuspis*. A coté des études écologiques et épidémiologiques, des analyses biochimiques ont aussi été utilisées pour caractériser les populations des phlébotomes du Maroc. Ainsi, dans le Rif marocain, l'analyse isoenzymatique a permis la mise en évidence d'un allèle diagnostique au locus de l'hexokinase entre *P. perniciosus* et *P. longicuspis* et a montré que le tri des mâles pouvait aussi se faire sur le nombre de soies médianes des coxites, plus faible chez *P. perniciosus* que chez *P. longicuspis* (Benabdennbi *et al.*, 1998).

Actuellement, la liste des phlébotomes du Maroc contient 22 espèces, réparties en 13 espèces du genre *Phlebotomus* et 09 espèces du genre *Sergentomyia* (Anon., 1997):

G/ *Phlebotomus*

P. (Phlebotomus) bergeroti Parrot, 1943

P. (P.) papatasi Scopoli, 1786

P. (Paraphlebotomus) alexandri Sinton, 1928

P. (Para.) chabaudi Croset, Abonnenc et Rioux, 1970

P. (Para.) kazeruni Theodor et Mesghali, 1964

P. (Para.) sergenti Parrot, 1917

P. (Larroussius) ariasi Tonnoir, 1921

P. (L.) chadlii Rioux, Juminer et Gibily 1966

P. (L.) langeroni Nitzulescu, 1930

P. (L.) longicuspis Nitzulescu, 1930

P. (L.) mariae Rioux, Croset, Léger et Bailly-Choumara 1974 (femelle inconnue)

P. (L.) perfiliewi Parrot, 1930

P. (L.) perniciosus Newstead, 1911

G/ Sergentomyia

S. (Parrotomyia) africana Newstead, 1912

S. (P.) lewisi Parrot, 1948

S. (Sergentomyia) antennata Newstead, 1912

S. (S.) fallax Parrot, 1921

S. (S.) minuta Rondani, 1843

S. (S.) schwetzi Adler, Theodor and Parrot, 1929

S. (Sintonius) christophersi Sinton, 1927

S. (S.) clydei Sinton, 1928

S. (Grassomyia) dreyfussi Parrot, 1933

Chapitre II

PRESENTATION DE LA ZONE D'ETUDE

MATERIEL & METHODES

I. PRESENTATION DE ZONE D'ETUDE

I.1. Cadre administratif

La région de Marrakech Tensift Al Haouz s'étend sur une superficie de 31 160 km² et compte près de 3 millions d'habitants, soit une densité de 87 habitants au km². La superficie de la région représente 4,4% de la superficie totale du pays.

La région est limitée au Nord par la région de Chaouia-Ouardigha, au Nord Ouest par la région de Doukkala-Abda, à l'Est par la région de Tadla Azilal, au Sud par la région de Souss-Massa-Drâa et à l'Ouest par l'Océan Atlantique (Fig.9).

Elle est composée de quatre provinces: Chichaoua, Al Haouz, El Kalâa des Sraghna et Essaouira puis trois préfectures : Marrakech-Médina, Marrakech-Ménara et Sidi Youssef ben Ali. La région est subdivisée en 198 Communes Rurales et 15 Communes Urbaines. Notre zone d'étude s'étend sur les trois préfectures de Marrakech et la province d'Al Haouz. Une partie de notre étude a concerné aussi la province d'Ouarzazate.

I.2. Cadre climatique

Le climat de la région se distingue par une variabilité apparente de la température et de l'humidité ainsi que par une pluviométrie relativement faible sur toute l'année. Il reste soumis aux influences de l'Océan Atlantique et aux altitudes très élevées du Haut Atlas. Le caractère aride et semi aride domine dans toute la région. L'hygrométrie est faible, la température élevée et les écarts journaliers et saisonniers sont importants (Le Houerou, 1989).



Figure 9. Découpage administratif de la région de Marrakech Tensift Al Haouz

a. Température

Les températures estivales sont très élevées, moyenne des maxima 37.7°C et hivernales basses, moyennes des minima 4.9°C . A Marrakech, les températures mensuelles moyennes, enregistrées entre 1998 et 1999, varient de 10°C en février à 26°C en juillet (Tableau 7). A Tizi n'Test (2092 m), dans le Haut Atlas, la température varie de 6°C en janvier à 24°C en août. La moyenne annuelle d'ensoleillement est de plus de 8 heures par jour à Marrakech. Le maximum du rayonnement net enregistré entre décembre 1998 et décembre 1999 est de $776,61 \text{ Kw/m}^2/\text{j}$ en avril (Tableau 7).

Le diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gaussen, 1957 établi pour la ville de Marrakech par Le Houérou, 1989 (Fig.10) montre l'importance de la période biologiquement

sèche qui s'étale sur 7 à 8 mois, située généralement entre mars-avril et octobre-novembre (Le Houerou, 1989). Par contre dans le Haut-Atlas, cette période est moins longue seulement 4 mois à Tizi n'Test.

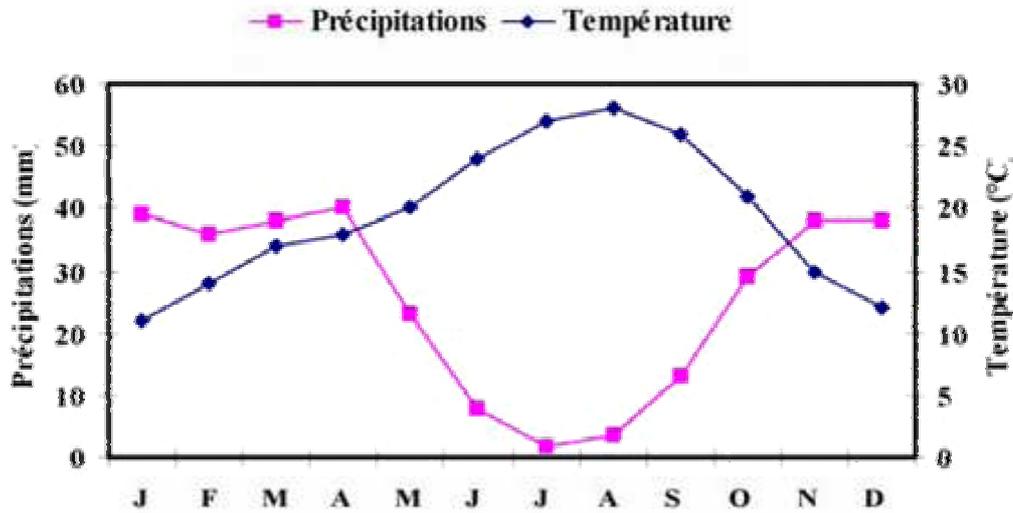


Figure 10. Diagramme Ombrothermique de la ville de Marrakech (Le Houerou, 1989)

b. Précipitations

La pluviométrie est faible, irrégulière et présente deux maxima, l'un en automne (novembre-décembre), et l'autre au printemps (mars- avril), la moitié de la superficie régionale présente des précipitations inférieures à 300mm/an en moyenne. Dans la chaîne atlasique les basses températures permettent des précipitations de neige à partir de 2500m. Les pluies sont très rares voire absentes en période estivale. Les mois de juin, juillet et août totalisent moins de 5% de la pluviométrie moyenne annuelle, essentiellement sous forme d'orages. A Marrakech la moyenne annuelle calculée entre Décembre 1998 et Décembre 1999 est de 18.08 mm (Tableau 7).

c. Vent

Dans la région, sont connus deux vents chauds et secs à caractère continental d'origine saharienne: le Chergui souffle de l'est et dure en moyenne 18 jours par an et le Sirocco qui souffle du sud-ouest et dure en moyenne 21 jours par an. A Marrakech la vitesse moyenne annuelle du vent est de 5,87m/s, elle est maximale entre mois de juillet et août ce qui favorise l'évapo-transpiration pendant cette période (Tableau 7).

d. Humidité

L'humidité relative moyenne calculée sur une période de 1949 à 1991, oscille entre 67.72 % en janvier et 45.37 % en juillet. Elle peut atteindre 0% en été et par le temps de Chergui ou Sirocco. Les données enregistrées à Marrakech entre décembre 1998 et décembre 1999, montrent un maximum de 76.88 % en décembre 1999 et un minimum de 50.31 % en juillet (Tableau 7).

Tableau 7. Données météorologiques en moyenne mensuelle, enregistrées dans la station de SAADA, Marrakech (Direction de la Météorologie Nationale)

MOIS	Température (°C)			Humidité relative %			Vitesse du vent (m/s)		Rayonnement net Kw/m2/j	Evapo-transpiration ETo en mm/j	Précipitation totale mm/mois
	max	min	moy	max	min	moy	max	moyenne			
Décembre 1998	19,43	2,98	10,69	90,59	30,77	63,84	4,85	1,26	680,08	60,36	14,80
Janvier 1999	18,49	4,28	10,76	97,98	37,44	75,63	4,89	1,27	550,81	48,50	49,10
Février 1999	17,93	2,90	10,20	96,85	34,20	69,88	4,94	1,26	578,33	47,86	30,90
Mars 1999	20,96	7,60	14,10	98,64	39,38	74,66	6,09	1,51	708,54	68,04	28,10
Avril 1999	27,73	9,65	18,80	89,70	20,99	54,68	6,11	1,51	776,61	92,38	0,60
Mai 1999	30,53	12,78	21,61	88,86	23,28	55,21	6,51	1,72	578,08	93,98	5,10
Juin 1999	33,59	15,67	24,08	86,19	21,15	53,32	6,53	1,71	629,06	101,06	1,00
Juillet 1999	36,75	18,05	26,89	83,68	19,16	50,31	6,80	1,76	564,11	110,32	0,00
Août 1999	35,80	18,97	26,84	84,68	24,25	54,07	6,80	1,63	519,93	94,49	0,70
Septembre 1999	31,06	16,26	23,36	88,10	30,57	59,30	6,15	1,62	483,71	76,04	0,1
Octobre 1999	26,00	14,48	19,70	97,33	44,91	76,35	6,15	1,40	409,57	51,99	68
Novembre 1999	21,67	6,68	13,63	98,37	36,69	75,00	4,58	1,11	463,45	45,31	17,9
Décembre 1999	19,68	4,56	11,29	98,97	40,61	76,88	4,71	1,21	385,95	38,30	18,8
Moyenne	26,66	10,86	18,39	91,75	30,23	63,52	5,87	1,48	581,39	890,32	18,08

I.3. Cadre géologique

Le cadre géographique de la région se compose de 5 zones naturelles :

- a. La zone de plateaux de Rehamna et de la Bahira. Elle présente une topographie collineuse d'altitude modérée.
- b. La zone des plaines : le Haouz central, Rehamna puis Tassaout amont et aval. La majeure partie des terres agricoles de la région se trouve localisée dans cette zone.
- c. Les bassins : Le bassin hydraulique du Tensift s'étend sur une superficie de 24.800 Km². Il s'agit du bassin d'Essaouira-Chichaoua et du bassin d'Ourika. Le bassin du Tensift comprend plusieurs sous-bassins versants qui drainent le versant nord du Haut-Atlas avec des apports pluvio-niveaux. Les eaux issues des oueds sont captées à la sortie de la montagne par un réseau de saguias traditionnelles qui drainent annuellement 443mm³. La partie orientale de la région est drainée par le système hydrographique des oueds Tessaout-Lakhdar.
- d. La chaîne de Jbilet: c'est une zone de montagne d'altitude modérée qui constitue une part négligeable du territoire régional.
- e. La zone de montagne qui englobe une bonne partie de montagnes du Haut Atlas et demeure caractérisée par des altitudes fortes et moyennes et par la présence du point culminant du royaume à savoir Jbel Toubkal dont l'altitude atteint 4165 m. Cette zone concentre des potentiels importants en eau.

I.4. Végétation

Le milieu naturel de la région est très diversifié. La montagne constitue une importante composante du relief et le domaine forestier du territoire s'étend sur une superficie de 701 000 ha.

La végétation naturelle est le résultat d'un processus de désertification complexe. Les formations végétales naturelles dominantes sont :

- l'étage de végétation méditerranéen aride climacique, considéré comme l'état d'équilibre final en fonction des conditions de sol et de climat en l'absence de modifications humaines.

Dans la plaine d'Al Haouz, la végétation est dominée par les formations steppiques constituées essentiellement de jujubier (*Zizyphus lotus*), retame (*Retama monosperma*), pistachier (*Pistacia atlantica*), gommier (*Acacia gummifera*) et de Chénopodiacées (*Salicornia arabica*, *Atriplex sp.*, *Haloxylon scoparium...*). On ne retrouve plus cette végétation naturelle que de place en place, celle-ci ayant été arrachée pour les besoins de l'agriculture et des activités humaines. En haute montagne, seuls les xérophytes épineux persistent.

- l'étage de végétation semi-aride avec le palmier nain.

- Les formations forestières à base de chêne vert (*Quercus ilex*), d'arganier (*Argania spinosa*), de thuya (*Tetraclinis articulata*) et de genévriers (*Juniperus phoenicea* L., *J. oxycedrus*) représentent près de 75% de la superficie forestière totale. Les essences secondaires couvrent environ 16% de l'étendue forestière. Toutes ces forêts sont domaniales à l'exception de 39790 ha dont 6870 ha de plantations fruitières réalisées sur terrains privés et collectifs.

- les bas-fonds marécageux: joncs, peupliers et tamaris. L'extension du drainage de la nappe par les khattaras a réduit considérablement les marais à l'Est et au Nord de Marrakech.

I.5. Population de la région

En 2002, la population de la région a été estimée à 3.100.000 habitants, soit 10,3 % de la population totale du Royaume. D'autre part, les trois derniers recensements ont montré que cette population a évolué de 1.800.000 habitants en 1971 à 2.240.000 habitants en 1982 et 2.724.000 habitants en 1994, soit un accroissement moyen de plus de 2 % par an.

En 2002, la population de la région était répartie comme suit :

- Près du tiers des habitants (34,5 %) vivait dans l'aire urbaine de Marrakech contre 31% en 1994
- 24,6 % des habitants vivaient dans la province d'El Kalaâ des Sraghna
- 15,4 % des habitants dans la province d'Al Haouz
- 14,6 % des habitants dans la province d'Essaouira
- 10,9 % des habitants dans la province de Chichaoua.

La densité moyenne de population de 87 habitants au kilomètre carré ne doit pas occulter les disparités au sein de la région, à savoir entre la préfecture de Marrakech- Médina (29,600 habitants/Km²) et la province de Chichaoua (150 habitants/ Km²) et entre les périmètres irrigués (150 habitants / Km²) et les zones Bour (20 habitants / Km²).

Le taux d'urbanisation de la région est passé de 34,9 % en 1994 à 38,9 % en 2000, et à 40,3 % en 2002. L'analyse de la pyramide des âges montre que 38 % de la population a moins de quinze ans, et seulement 8% a plus de 60 ans.

II. ENQUETE ENTOMOLOGIQUE

II.1. Origine des phlébotomes

Durant ce travail, nous avons étudié et analysé :

- des populations naturelles que nous avons récoltées dans la région de Marrakech,
- des échantillons des populations conservées dans l'azote liquide (du nord marocain : Taounate, Chefchaouene et Ouezzane et du bassin méditerranéen : Espagne, France, Chypre, Portugal et Syrie)
- des souches de référence de l'élevage que nous avons entretenu avec nos soins (*Phlebotomus dubosqi* et *P. perniciosus*)

II.2. Technique de l'élevage

Les dispositifs imaginés par les auteurs tentent de recréer les conditions du milieu naturel favorables à tous les stades de développement. Trois facteurs sont indispensables : une humidité assez importante et constante, une température variant de 25 à 30°C et une obscurité presque complète. Les différentes étapes du développement propres à l'espèce pourront ainsi être suivies précisément : moment de l'accouplement, temps écoulé entre le repas de sang et la ponte, le nombre d'œufs pondus, le délai d'éclosion pour les larves, le temps entre les différents stades larvaires, la nymphose et l'émergence des adultes (Abonnenc, 1972).

a. Maintenance d'un élevage

i. Chambre d'éclosion :

Les œufs sont placés à éclore dans des pots de polystyrène (200 ml) tapissés sur quelques cm de plâtre de Paris humide. Au fond 5 à 6 trous permettent le passage de l'humidité. Les pots sont préparés à l'avance, mis à sécher 48h et conservés à l'abri de la poussière, contaminants et acariens jusqu'à utilisation. Lorsque le pot contient des pontes, il est alors recouvert d'une voile de nylon et placé en une chambre humide dans l'incubateur. Le développement de tous les stades préimaginaux a lieu dans ces pots qui sont examinés quotidiennement afin d'assurer la nourriture et l'humidité. Lorsque les adultes commencent à apparaître, ils sont lâchés dans une cage.

ii. Nourriture des larves :

La technique de préparation de la nourriture est dérivée de celle de Young *et al.*, (1981). Il s'agit d'un mélange en quantité égale de crottes de lapin séchées et de nourriture de rongeurs de laboratoire. Ce mélange est étendu en couche de quelques cm d'épaisseur au fond d'un bac de plastique. Ce mélange humidifié est laissé à vieillir à température ambiante jusqu'à sa

totale déshydratation. Il est ensuite pulvérisé et stérilisé à l'autoclave (Molina, 1991). Dès les premières éclosions de larves, les pots sont saupoudrés quotidiennement de petites quantités de cette nourriture.

iii. Cages :

Les cages utilisées pour l'élevage sont des cubes de tulle (d'au moins 10 dm³) suspendus par les coins à l'intérieur d'une armature rigide. L'ouverture consiste en une manche de tissu fermée par un cordon. La cage contenant les phlébotomes adultes est placée dans un sac plastique transparent à l'intérieur duquel on place également un récipient contenant un coton imprégné d'eau qui apporte l'humidité indispensable. Le tout est placé dans l'incubateur comme précédemment. La nourriture et l'humidité sont vérifiées quotidiennement.

vi. Nourriture des adultes :

Dans la cage, la nourriture des adultes est constituée d'une solution de saccharose à 30 % imbibant un coton placé dans une boîte de pétri. Pour le repas sanguin des femelles, un hamster anesthésié, selon la sensibilité individuelle, est introduit dans la cage et laissé en place 30 minutes, temps minimum nécessaire au gorgement d'un maximum de femelles. Les femelles se gorgent en présence des mâles et sont laissées avec eux 24h après le repas sanguin pour s'accoupler. Les femelles gorgées sont capturées et utilisées pour l'élevage en masse.

b. Elevage en masse

Toutes les femelles gorgées sont transférées dans les chambres d'éclosion, en présence de sucre. Après l'ovogenèse (6 jours), elles pondent rapidement et meurent. On obtient ainsi des larves synchrones en grand nombre. Avec une telle méthode d'élevage (Modi et Tash, 1983),

on peut considérer réunir deux conditions importantes de la panmixie, à savoir : même environnement pour tous les individus et générations non chevauchantes.

II.3. Technique d'échantillonnage

Afin de disposer d'un matériel représentatif, différentes méthodes d'échantillonnage ont été employées.

Nous avons utilisé d'une part une technique ne fournissant que des exemplaires morts. Cette méthode rentable, peu sélective nécessite la mise en œuvre de pièges adhésifs.

D'autres techniques offrent la possibilité de travailler sur du matériel vivant et permettent son stockage dans l'azote liquide pour des études biochimiques. Les pièges lumineux et les captures manuelles nocturnes ont été retenus dans ce but.

a. Pièges adhésifs

Connue depuis les importants travaux des épidémiologistes russes Vlazov (1932) et Petscheva (1935) *in* Croset *et al.*, 1974, la technique des pièges adhésifs est sans doute la mieux adaptée à l'inventaire qualitatif et quantitatif des phlébotomes en région méditerranéenne.

Les pièges sont constitués de feuilles de papier blanc mat de format A4 (Fig. 11) largement imbibées d'huile de ricin qui présente les avantages de ne pas être répulsive, d'être très visqueuse et enfin d'être soluble dans l'alcool ce qui facilite la récupération ultérieure des insectes.



Figure 11. Pièges adhésifs installés dans différents biotopes

Les feuilles de papier dont la transparence indique une bonne imprégnation huileuse sont placées dans différents biotopes (barbacanes, fissures des murs, terriers, végétations...) pouvant servir de gîtes de repos et de lieux de ponte aux phlébotomes.

La durée de piégeage dépend de l'objectif de l'étude et des conditions climatiques (vent, pluies...). Généralement une nuit, (de 18h à 08h), est suffisante pour estimer la densité en nombre de spécimens par nuit et par unité de surface. Dans la région de Marrakech, au-delà d'une nuit, les pièges deviennent sales et les phlébotomes commencent à se décoller à cause de la poussière surtout dans la période d'été.

Deux couleurs de papier ont été utilisées pour étudier le phototropisme des phlébotomes: le blanc classique et le jaune.

b. Piège lumineux

Cette méthode est adaptée à la capture des espèces photophiles. Contrairement à de nombreux autres insectes, les phlébotomes demeurent rarement prisonniers du flux lumineux. Ils

semblent même le fuir à partir d'une certaine intensité. C'est pourquoi certains pièges utilisés pour d'autres insectes (moustiques notamment) n'ont que de très faibles rendements en ce qui concerne les phlébotomes. On distingue deux types de pièges lumineux (OMS, 1975):

- Le « New Jersey Mosquito Trap » : ce piège est constitué d'un cylindre métallique monté sur trois pieds. Il est muni d'un ventilateur et d'une ampoule électrique alimentée sur secteur ou par un groupe électrogène.
- Le « C. D. C. miniature Light Trap » : le piège comporte (Fig. 12):
 - un moteur assurant le fonctionnement d'un petit ventilateur destiné à entretenir une aspiration continue de faible intensité. Au dessus du ventilateur se trouve une petite ampoule de 0,3 ampère. Le tout est alimenté par quatre piles rondes de 1,5 volt qui sont suffisantes pour assurer un fonctionnement efficace pendant la totalité de la nuit et prévenir ainsi la fuite des phlébotomes capturés en maintenant la ventilation. L'ensemble moteur-ventilateur-lampe se trouve à l'intérieur d'un cylindre transparent en matière plastique dont la partie supérieure est couverte d'un grillage métallique évitant la pénétration des insectes de grande taille et dont la partie inférieure est creusée d'une gorge destinée à l'ajustement de la cage de recueil.
 - Une cage recouverte d'un tissu à mailles très serrées dont la partie supérieure vient s'adapter à l'aide d'un élastique à la partie inférieure du cylindre.
 - Un couvercle métallique très aplati qui couvre le tout et protège l'appareil de la pluie et des projections.



Figure 12. Pièges CDC installés en milieu rural (A) et en milieu urbain (B).

Les pièges sont installés avant le coucher du soleil et restent fonctionnels toute la nuit jusqu'au lendemain matin. En prenant soin d'éviter la fuite des insectes piégés, la partie supérieure est refermée et mise au réfrigérateur pendant une vingtaine de minutes afin d'immobiliser les phlébotomes. Immédiatement après la sortie du réfrigérateur, la cage est ouverte et les phlébotomes prélevés à l'aide d'un petit capteur ou d'un pinceau trempé dans l'alcool.

Le repérage des phlébotomes à l'intérieur de la cage est assez délicat, d'une part ceux-ci s'y trouvent mélangés à de nombreux autres insectes, d'autre part ils redeviennent actifs après quelques minutes à la température ambiante ce qui impose un nouveau séjour à 0°C.

Quand les phlébotomes doivent être maintenus vivants, notamment au cours d'un long trajet, la cage doit être placée dans un sac en plastique avec un tampon de coton modérément imbibé d'eau qui sert à maintenir une humidité relative dans le sac, empêchant la dessiccation des insectes.

II.4. Conservation des phlébotomes

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

- soit dans l'alcool à 70° pour les spécimens récoltés morts sur les pièges adhésifs.
- soit dans l'alcool absolu ou à 95° pour les spécimens qui sont récoltés vivants et destinés à des études moléculaires (analyse de l'ADN).
- soit dans l'azote liquide (-196°C), ou dans le congélateur à - 80°C, pour les spécimens à traiter par des méthodes enzymatiques.

II.5. Traitement des échantillons

Un traitement préalable des spécimens est obligatoire, il dépend du milieu de montage choisi.

Les réactifs utilisés sont :

- mélange en proportion égale d'alcool-ether
- solution aqueuse de potasse à 10%
- liquide de Marc-André (d'après Abonnenc, 1972) :
 - eau distillée 30 ml
 - hydrate de chloral 40 g
 - acide acétique cristallisable 30 ml
- gomme au chloral (d'après Madulo-Leblond, 1983)
 - eau distillée 10 ml
 - hydrate de chloral 74 g
 - gomme arabique pulvérisée 8 g
 - sirop de glucose à 98% 5 g
 - acide acétique cristallisable 3 ml
- solution aqueuse de fuchsine acide à 1 pour mille
- éthanol à 70° et 95°

- créosote du hêtre
- baume du Canada
- Xylène

a. Eclaircissement

Les phlébotomes sont versés dans une coupelle de cristal munie d'un couvercle dans laquelle s'effectueront toutes les manipulations.

L'alcool est soutiré à l'aide d'une pipette Pasteur munie d'une poire en caoutchouc, en prenant bien soin de ne pas aspirer les phlébotomes. Les bains successifs suivants sont ensuite effectués :

- 3 minutes dans l'alcool-éther (uniquement pour les phlébotomes capturés sur papiers huilés lorsque l'huile de ricin est mal solubilisée)
- 4 à 8 heures dans la solution de potasse à 10%
- 6 bains, de 20 minutes chacun, dans l'eau
- 1 heure minimum dans le liquide de Marc-André. Une conservation prolongée des spécimens dans ce liquide ne présente pas d'inconvénient.

b. Montages

Deux types de montage sont possibles :

i. Montage rapide dans la gomme au chloral

Ce milieu favorise la visualisation des spermathèques qui apparaissent très réfringentes et permet une bonne observation microscopique en contraste de phases. Cependant, la gomme au chloral a tendance à se rétracter après un certain temps ; les structures internes tendent à s'effacer et à la longue l'ensemble de la préparation devient inobservable. Par conséquent, ce type de montage est à déconseiller pour une conservation de longue durée.

Après éclaircissement les phlébotomes sont montés directement dans une goutte de gomme au chloral suivant la technique détaillée plus bas.

ii. Montage permanent dans le baume du Canada

Les spécimens déjà conservés dans le Marc-André subissent les bains suivants :

- 15 minutes dans une solution de fuchsine à 1 pour mille
- 2 minutes dans l'alcool à 70°
- 3 bains de 20 minutes dans l'alcool à 95°
- 1 heure au moins dans la créosote.

Les spécimens qui sont alors complètement déshydratés, sont montés sous la loupe binoculaire dans une goutte de baume du Canada diluée dans du xylène jusqu'à consistance fluide. Cette technique, qui permet d'obtenir des conservations de longue durée, est fortement recommandée pour la mise en collection des espèces.

c. Dissection des phlébotomes

Le phlébotome est déposé en position latérale dans l'un ou l'autre des deux milieux de montage. La tête est détachée du reste du corps à l'aide de fines aiguilles. Elle est ensuite orientée face ventrale en position supérieure (*Sergentomyia*) ou en position inférieure (*Phlebotomus*) afin de rendre plus aisée l'observation des armatures cibariale et pharyngienne.

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

Quand il s'agit d'un spécimen mâle, l'armature génitale est disposée selon son orientation chez l'insecte vivant en prenant soin de mettre en évidence les différents éléments nécessaires à la diagnose spécifique : édéage, coxite, style,...

Quand il s'agit d'un spécimen femelle, la dissection du génitalia est parfois nécessaire pour montrer certaines structures internes utilisées pour la diagnose spécifique comme dans le cas

des *Larrousius* (Léger *et al.*, 1983). Cette dissection se fait dans le milieu de montage sous la loupe binoculaire. Une fois la tête coupée, on maintient le thorax à l'aide d'une fine aiguille et on coupe l'abdomen au niveau de l'avant dernier segment. On isole alors, en se débarrassant des téguments et des tissus qui l'entourent, la furca avec les spermathèques.

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

d. Identification des spécimens

Chaque échantillon est identifié d'après les critères habituels, en se basant sur la clé de détermination des phlébotomes du Maroc (Anon., 1997).

- pour les phlébotomes mâles : morphologie externe de l'appareil génital et, si nécessaire, anatomie de l'armature cibariale (*Sergentomyia*) ou pharyngienne (*Phlebotomus*).
- Pour les phlébotomes femelles : anatomie des spermathèques, de l'armature cibariale et pharyngienne.

II.6. Etude de substrat

Des prélèvements de sol sont effectués au niveau de différents sites pour l'étude des paramètres écologiques suivants :

a. Granulométrie

Le but de cette étude est de déterminer les différentes classes granulométriques de la fraction minérale d'un sol, donc une préparation de l'échantillon est nécessaire afin de supprimer les agrégats (destruction de la matière organique et défloculation des argiles). Le classement des particules se fait en utilisant la relation de STOKES qui donne la vitesse de sédimentation en

fonction du rayon r d'une particule sphérique : $v = k r^2$

b. Humidité

Pour déterminer l'humidité du sol, on utilise la méthode gravimétrique qui consiste à déterminer le poids d'eau contenu dans un échantillon de sol. L'échantillon est pesé humide (ph) puis sec après passage à l'étuve à 105°C (ps) : $H = (ph - ps) 100 / ps$

c. Matière organique

Dosage de la matière organique (m.o) se fait soit par le dosage du carbone organique (C.o) totale selon la méthode Anne (Aubert, 1978) soit par extraction et dosage de la matière humique dans les sols : $m.o \% = C. o \% \times 1.724$

II.7. Autres paramètres mésologiques

En plus de l'étude du substrat et dans le but d'étudier l'impact des conditions météorologiques locales sur la répartition des phlébotomes, nous avons enregistré, en parallèle des prélèvements entomologiques, la température ambiante (°C) ponctuelle à l'aide d'un thermomètre, les variations continues de la température à l'aide des puces spécifiques (Smartbutton^R), l'humidité relative (%) à l'aide d'un hygromètre et la vitesse du vent (m/sec) à l'aide d'un anémomètre.

III. ETUDE ENZYMATIQUE

III.1. Principe d'Isoélectrofocalisation

L'isoélectrofocalisation (IEF) est une technique électrophorétique qui fait intervenir en plus du volume moléculaire et de la charge électrique des protéines, leur pH isoélectrique (pHi). Un gradient de pH croissant progressivement de l'anode à la cathode est établi par électrophorèse d'ampholytes incorporés dans le gel. Les protéines s'immobilisent à leur pHi. Le pouvoir de résolution de cette technique est élevé. L'IEF a été réalisée en gel d'agarose ultra-mince.

III.2. Préparation du gel

Le gel est coulé dans un moule constitué d'une plaque de verre sur laquelle est appliqué un support plastique recouvert d'une pellicule hydrophile (Fig. 13). Une deuxième plaque de verre munie de joints espaceurs (500 μ m d'épaisseur) lui est superposée. Ce système est maintenu par deux pinces et préchauffé 15 minutes à l'étuve (55 °C).

200 mg d'agarose et 2,4 g de sorbitol sont dissous dans 18 ml d'eau distillée au bain-marie sous agitation permanente. Un dégazage rapide est effectué lorsque la température de la solution atteint +75°C. 0.9ml d'ampholyte de pHi connu est ensuite ajouté au milieu réactionnel. La solution est immédiatement coulée dans le moule. La polymérisation se fait alors en 15 minutes à température ambiante. Le gel est ensuite démoulé avec son support et entreposé dans une chambre humide à + 4°C pendant une heure au minimum. La dimension finale du gel est de 11 cm sur 23 cm.

III.3. Préparation des extraits protéiques

Les extraits sont préparés en prélevant chaque phlébotome dans le tube de cryoconservation. L'insecte est par la suite placé dans une alvéole d'une palette de porcelaine conservée au congélateur entre les manipulations. Après prélèvement des parties permettant l'identification, le reste de l'insecte est broyé dans l'eau distillée et déposé sur des applicateurs à 52 puits. Ces applicateurs permettent d'étudier simultanément 3 enzymes chez 17 individus. La préparation des échantillons s'effectue le plus rapidement possible pour éviter une dénaturation des enzymes.

III.4. Préparation des extraits témoins

Les extraits témoins des phlébotomes de l'élevage ont été utilisés comme témoin lors de chaque migration. Ainsi, des extraits de *P. dubosqi* et *P. perniciosus* de l'élevage ont été

préparés avec une concentration d'un phlébotome par 10 μ l d'eau distillée et conservé à -80°C ou dans l'azote liquide.

III.5. Réalisation de l'électrophorèse

Le gel d'agarose est placé sur la cuve de migration réfrigérée (Fig. 13). Deux mèches de papiers découpées aux dimensions du gel sont imbibées de solution d'électrodes. Après essorage sur papier filtre, elles sont placées à 0,5 cm du bord des grands côtés du gel. Les électrodes sont placées sur les mèches et reliées à un générateur réglé initialement à un courant et une puissance électrique maximaux et pour un débit de 500 V. On réalise dans un premier temps une préfocalisation de 15 min afin de stabiliser le gradient d'ampholyte. L'isoélectrofocalisation commence après répartition dans les puits de l'applicateur des extraits protéiques et un témoin de protéines-étalon de pHi connu qui est déposé dans le premier puit de l'applicateur. L'IEF démarre à 500V et la migration dure 60 min, temps nécessaire au passage à 1200 Volt/heure. Le gel est ensuite rincé à l'eau distillée découpé et coloré.

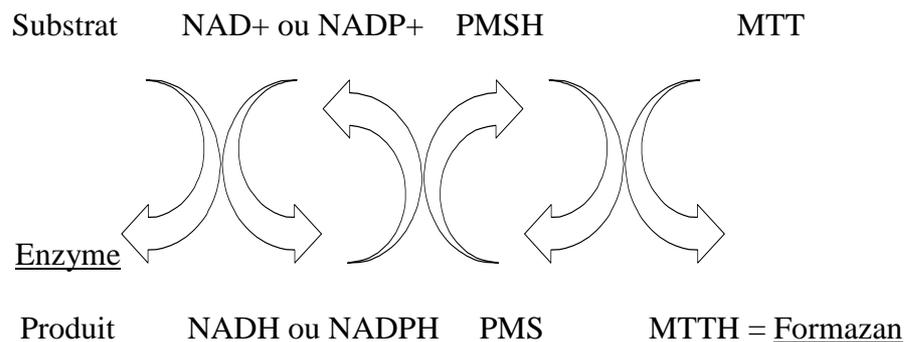
III.6. Coloration des Protéines étalon

La bande de gel (Fig. 13) portant les protéines-étalon est immergée pendant 10 minutes dans une solution aqueuse de fixation constituée d'acide trichloroacétique (10%) et d'acide sulfosalicylique (1%). Le gel est ensuite séché à l'air chaud avant d'être coloré par le bleu de Coomassie G 250 (0,2%) pendant 10 min. L'excès de colorant est éliminé par rinçage du gel dans une solution aqueuse de décoloration (éthanol 35%, acide acétique 10%). Le gel est séché une dernière fois à température ambiante, les bandes protéiques apparaissent alors colorées en bleu foncé. Les pHi connus des protéines-étalon permettent de repérer et de déterminer les pHi des isoenzymes révélées.

III.7. Révélation des profils isoenzymatiques

Les solutions de révélations (Tableau 8) spécifiques des différents systèmes enzymatiques ont été adaptées d'après Pasteur *et al.*, (1987) et Kassem *et al.*, (1990). Le principe est celui d'une réaction chromogène : en présence de son substrat, l'enzyme catalyse une réaction biochimique, réaction mise à profit pour transformer différents composés qui donneront en produit final un précipité insoluble coloré à l'endroit où a migré l'isoenzyme.

Dans la plupart des cas, c'est la production de NADH ou NADPH qui est utilisée pour réduire un sel de tétrazolium jaune, le méthyl-thiazol-tétrazolium MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide) en formazan bleu foncé, en présence de phénazine méthosulfate ou PMS, selon la réaction suivante :



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

Tableau 8. Composition des solutions de révélation enzymatique.

Enzyme (Abréviation)	Tampon de réaction	Substrats et cofacteurs	Enzymes et colorants (au dernier moment)	Gel (pHi)
OXYDO-REDUCTASES				
• MALATE DESHYDROGENASE (MDH) EC 1.1.1.37 • ENZYME MALIQUE (ME) EC 1.1.1.40	Tampon Tris- HCl 0,03M pH8 (15ml)	L-malate de Na (100mg), β-NAD 1% (500μl), ajuster à pH 7,5 avec Tris 1M.	PMS 1% (500μl), MTT 1% (500μl) Après apparition des bandes MDH, rajouter dans la solution β- NADP 1% (500μl) et MgCl ₂ 10% (300μl) pour révélation de ME	3-10
• ISOCITRATE DESHYDROGENASE (ICD) EC 1.1.1.42	Tampon Tris- HCl 0,03M pH8 (15ml)	β-NADP (500μl), MgCl ₂ 10 % (300μl), acide D.L.isocitrique (100mg)	PMS 1% (500μl) MTT 1% (500μl)	3-10
• GLYCEROL-3-PHOSPHATE DESHYDROGENASE (α GPDH) EC 1.1.1.8	Tampon Tris- HCl 0.03M pH8 (15ml)	α-D-L-glycérophosphate (20mg), β-NAD 10mg/ml (500μl)	PMS 1% (500μl) MTT 1% (500μl)	3-10
• GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE (6PGD) EC 1.1.1.44	Tampon Tris- HCl 0.03M pH8 (15ml)	6-phospho-D-gluconate (10mg) MgCl ₂ 10 % (200μl), β- NADP 10% (500μl)	PMS 1% (500μl) MTT 1% (500μl)	3-10
TRANSFERASES				
• HEXOKINASE (HK) EC 2.7.1.1	Tampon Tris- HCl 0,03M pH8 (15ml)	ATP (20mg), D(+)- glucose (25mg), β-NADP 1% (500μl), MgCl ₂ 10% (200μl)	Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) (10 unités) 3μl PMS 1% (500μl) MTT 1% (500μl)	4-6,5
• PHOSPHOGLUCOMUTASE (PGM) EC 5.4.2.2	Tampon Tris- HCl 0,03M pH8 (15ml)	α-D-glucose-1-P (100mg), MgCl ₂ 10% (500μl) β-NADP 1% (500μl), ajuster à pH 8,6 avec du tampon Tris-HCl 1M	G6PDH (10 unités) 3μl PMS 1% (500μl) MTT 1% (500μl)	4-6,5
HYDROLASES				
• TREHALASE (TREH) EC 3.2.1.28	Tampon Tris- HCl 0,03M pH7 (15ml)	ATP (10mg), MgCl ₂ 10% (300μl), αα-tréhalose (50mg), β- NADP 1% (500μl)	MTT 1% (500μl), PMS 1% (500μl) hexokinase 10μl, G6PD 4μl	3-10
LYASES				
• FUMARASE (FUM) EC 4.2.1.2	Tampon phosphate Na/Na ₂ 0,05M pH7 (15ml)	Fumarate de K (250mg), β-NAD 1% (700μl), ajuster à pH 7,0 avec NaOH 10N	MDH (100 unités) 20μl MTT 1% (500μl), PMS 1% (500μl)	3-10
ISOMERASES				
• PHOSPHOGLUCOSE ISOMERASE (PGI) EC 5.3.1.9	Tampon Tris- HCl 0,03M pH8 (15ml)	Fructose-6-phosphate (10mg), MgCl ₂ 10% (500μl), β-NADP 1% (500μl)	G6PDH (10 unités) 3μl PMS 1% (500μl), MTT 1% (500μl)	4-6,5
• ACONITASE (ACO) EC 4.2.1.3	Tampon Tris- HCl 0,03M pH8 (15ml)	Acide cis aconitique (100mg), MgCl ₂ 10% (500μl), β-NADP 1% (500μl)	IDH (10μl) PMS 1% (500μl), MTT 1% (500μl)	3-10

III.8. Les différents systèmes enzymatiques

Onze systèmes enzymatiques ont été testés : Glucosephosphate isomerase (GPI, EC.5.3.1.9), Phosphoglucomutase (PGM, EC.5.4.2.2), Hexokinase (HK, EC.2.7.1.1), Fumarate hydratase (FUM, EC.4.2.1.2), Malate dehydrogenase (MDH, EC.1.1.1.37), Malic enzyme (ME, EC.1.1.1.40), 6 phosphogluconate dehydrogenase (6PGD, EC.1.1.1.44), Glycerophosphate dehydrogenase (α GPDH, EC.1.1.1.8), Isocitrate dehydrogenase (ICD, EC.1.1.1.42), Trehalase (TREH, EC.3.2.1.28) et Aconitase (ACO, EC.4.2.1.3).

III.9. Interprétation des zymogrammes

Les gels sont séchés puis interprétés. La migration électrophorétique des protéines enzymatiques reflète des différences dans la nature des acides aminés composant la protéine. La variabilité des enzymes donnant accès à la variabilité des allèles des gènes correspondants, ainsi, l'analyse des phénotypes permet de préciser le type structural de l'enzyme et de définir le nombre de locus codant pour cette enzyme.

III.10. Analyses des données

Les données ont été analysées par les logiciels BIOSYS-2 (Swofford et Selander, 1981), GENEPOP (Raymond et Rousset, 1995) et PHYLIP version 3.6a2 (Felsenstein, 1989).

- la variabilité génétique: elle est évaluée par les fréquences alléliques, le taux de polymorphisme, les degrés d'hétérozygotie (H_o : hétérozygotie observée, H_e : hétérozygotie théorique) et le nombre moyen d'allèles par locus.
- les fréquences alléliques sont calculées par comptage direct des allèles (Biosys-2). Le taux de polymorphisme correspond au rapport entre le nombre de locus polymorphes et le nombre total de locus étudiés. Un locus est considéré polymorphe lorsque l'allèle majoritaire a une fréquence inférieure à 99%. Le taux d'hétérozygotie théorique (H_e)

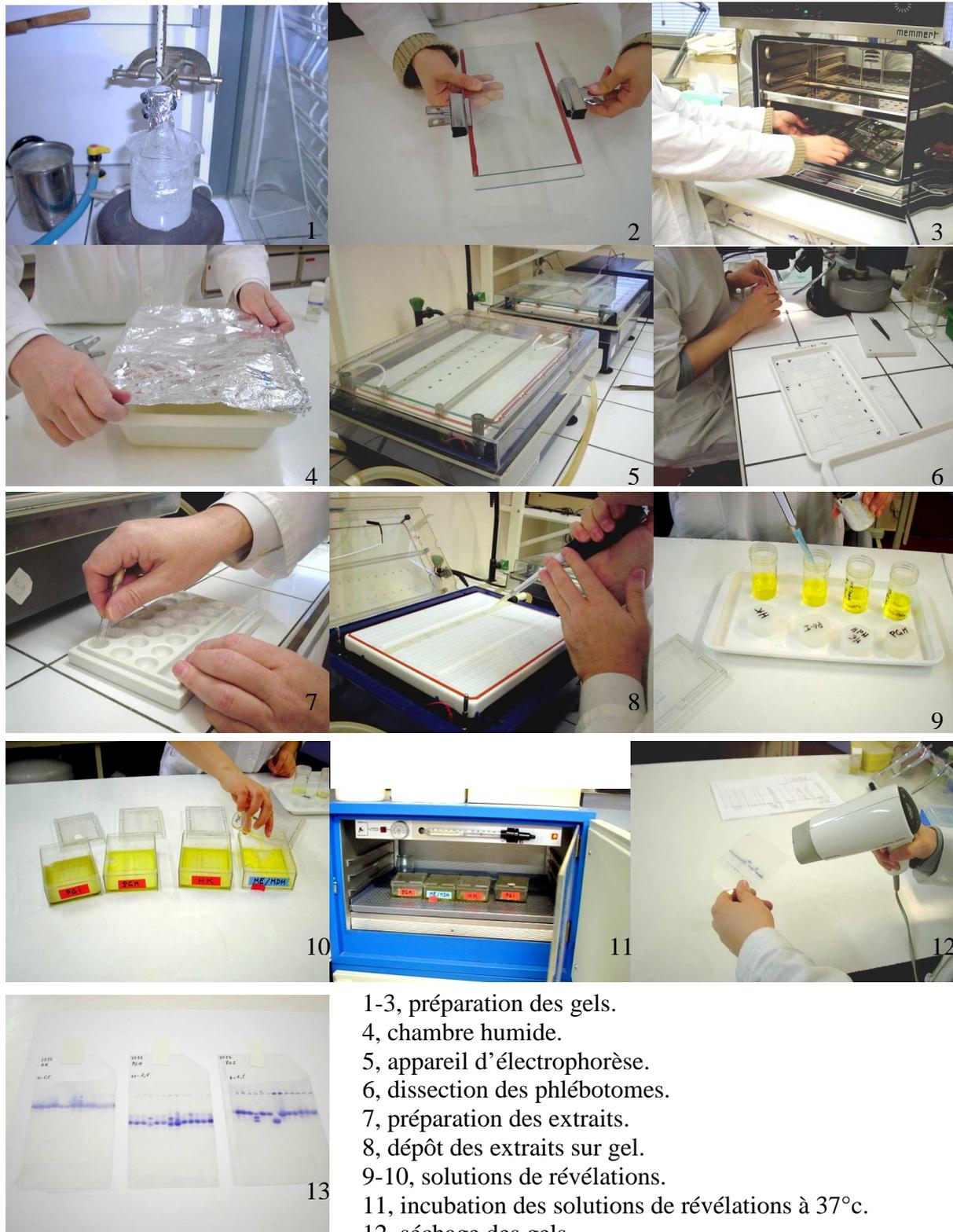
mesure la fréquence moyenne théorique des individus hétérozygotes dans la population, mesure estimée à partir des fréquences alléliques observées. Dans le cas d'une population à l'équilibre de Hardy-Weinberg, les taux d'hétérozygoties théoriques et observés ne sont pas significativement différents.

- l'équilibre génétique : l'équilibre de Hardy-Weinberg et l'absence de déséquilibre de liaison sont estimés. Ces tests ne sont possibles que si le (ou les) locus comparé(s) sont polymorphes à 95%, ce qui permet une comparaison plus juste entre des populations de tailles variables.

a) L'équilibre de Hardy-Weinberg est vérifié par le test exact de Fisher. L'hypothèse nulle testée est la panmixie: c'est à dire l'indépendance de la distribution allélique à chaque locus. Le programme de Louis et Dempster (1987) est utilisé pour les locus ayant de deux à quatre allèles et, pour ceux comportant cinq allèles et plus, la méthode décrite par Guo et Thompson (1992).

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

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



- 1-3, préparation des gels.
- 4, chambre humide.
- 5, appareil d'électrophorèse.
- 6, dissection des phlébotomes.
- 7, préparation des extraits.
- 8, dépôt des extraits sur gel.
- 9-10, solutions de révélations.
- 11, incubation des solutions de révélations à 37°C.
- 12, séchage des gels
- 13, gels prêts pour l'interprétation.

Figure 13. Résumé des principales étapes de la technique enzymatique.

b) L'étude du déséquilibre de liaison, par la méthode décrite par Weir, (1990) permet de détecter les associations gamétiques pour toutes les paires d'allèles à deux locus et dans chaque population. L'hypothèse nulle testée est l'indépendance entre les génotypes de chaque locus.

- la structure génétique des populations: les analyses suivantes ont été pratiquées:

a) La différenciation interpopulationnelle a été évaluée pour chaque paire de populations étudiées au niveau génotypique grâce à une approximation du test exact de Fisher corrigé par Raymond et Rousset (1995). L'hypothèse nulle testée est l'identité de la distribution allélique ou génotypique à chaque locus.

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

- $0 < F_{st} < 0,05$: faible différenciation génétique
- $0,05 < F_{st} < 0,15$: différenciation génétique modérée
- de $0,15 < F_{st} < 0,25$: grande différenciation génétique
- $F_{st} > 0,25$: très grande différenciation génétique.

c) l'indice de distance de Nei (Nei, 1978) mesure également la différenciation génétique. Le dendrogramme utilisant la matrice de distances de Nei est construit d'après la moyenne arithmétique des distances: UPGMA ("unweighted pair group method arithmetical", Sneath et Sokal, 1973).

d) l'indice de distance de Rogers (Rogers, 1972) permet la construction d'arbre phylogénétique selon la méthode d'analyse de Wagner.

IV. ETUDE DE L'ADN MITOCHONDRIAL

Cette partie du travail est réalisée dans le laboratoire de Systématique Moléculaire (Natural History Museum, London).

IV.1. Principe de la technique :

Le principe de la méthode d'amplification de l'ADN in vitro consiste à hybrider un ADN dénaturé à deux amorces oligonucléotidiques qui permettront la copie d'un brin d'ADN qu'ils encadrent (Chuchana, 1992). Chaque couple d'amorce est composé d'un oligomère complémentaire de l'extrémité 3' du monobrin d'ADN à amplifier et d'un autre oligonucléotide complémentaire de l'extrémité 3' du brin antiparallèle. La polymérisation est réalisée en présence de désoxynucléotides triphosphates et d'ADN polymérase. Les brins néosynthétisés servent ensuite eux-mêmes de matrice pour initier l'étape de polymérisation du cycle suivant. La répétition des trois étapes : dénaturation, hybridation et polymérisation ou élongation (Fig. 14), aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible.

IV.2. Extraction de DNA

Les réactifs utilisés sont :

- Saccharose à 10%
- Grinding mix
- SDS mix
- 8M KOAc
- Ethanol à 75%
- 1x TE tampon

Après avoir disséqué le phlébotome, la tête et le génitalia sont montés pour l'identification morphologique et le reste de l'insecte est congelé pour l'étude moléculaire. La partie congelée, thorax et abdomen ou parfois l'abdomen seulement, est écrasée au fond du tube avec 100 μ l de Grinding mix et 10 μ l de SDS mix. Après une incubation de 30 min à 65°C, on ajoute 30 μ l de 8MKOAc sont ajoutés et l'échantillon plongé dans la glace pendant 45 min. On ajoute ensuite 350 μ l d'éthanol (96-100%) sur chaque tube de surnagent et on laisse toute une nuit à -20°C.

Le lendemain, le tube est centrifugé pendant 30 min à 14000 rpm. Le précipité lavé 3 fois dans 50 μ l d'Ethanol à 75%, et centrifugé 4 fois avec un volume équivalent du tampon TE avant de conserver les extraits à -20°C.

IV.3. Amplification par PCR

Pour l'amplification d'un fragment de cytochrome b de 360 bp, nous avons utilisé les amorces CB3-FC/CB-R06 (Parvizi et Ready, 2006). Le protocole de l'amplification suivi est décrit par Essaghir *et al.*, (1997 et 2000).

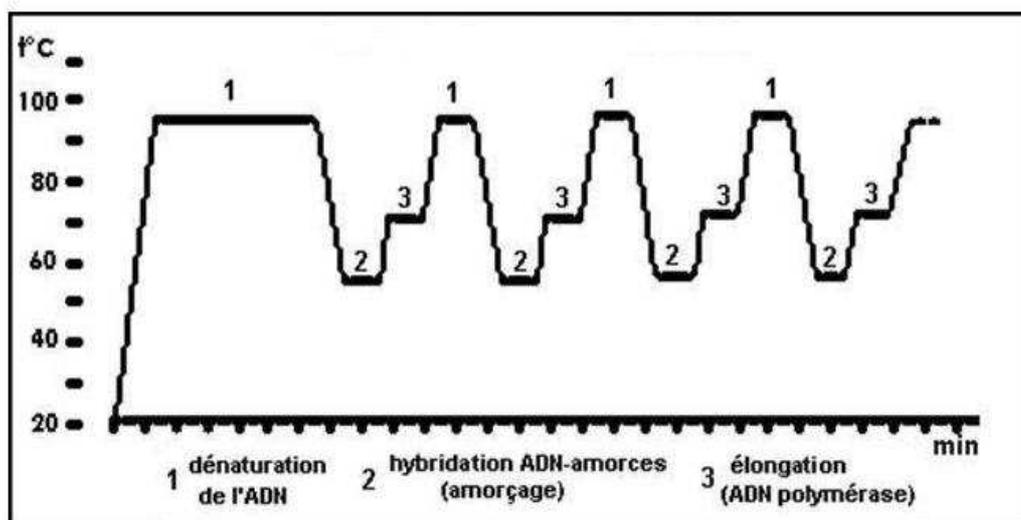


Figure 14. Les cycles thermiques de la PCR

Le tube contenant les réactifs avec l'extrait des échantillons est soumis au programme d'amplification (Fig. 14) suivant : un cycle de 3 min à 94°C pour la dénaturation des deux brins d'ADN, ensuite, cinq cycles de dénaturation à 94°C pendant 30s, l'hybridation à 40°C pendant 30s et l'extension à 72°C pour 90s. Le même cycle de dénaturation, hybridation et extension est répété 35 fois, en changeant seulement la température d'hybridation en 44°C. À la fin, une étape d'extension de 10 min à 72°C est nécessaire. Une acclimatation à 80°C « hot start » avant de lancer le programme est recommandée.

La migration du produit de l'amplification est réalisée sur un gel d'agarose à 1.5% pendant une heure à 60V. Des marqueurs de poids moléculaires connus sont déposés et migrent parallèlement à l'ADN de l'échantillon. Un témoin négatif est toujours ajouté pour contrôler la contamination pendant la manipulation. Une image des bandes sur le gel est prise en l'exposant aux UV dans la chambre noire. En comparant la taille de ces bandes avec celle du marqueur, on peut estimer la concentration de l'ADN des spécimens.

Après avoir eu la photo du gel, découper les bandes et les conserver à -20°C dans un tube bien étiqueté pour une purification ultérieure.

IV.4. Purification

Les bandes de l'ADN isolées sont purifiées en utilisant Glassmilk (Gene CleanII Spin Kit). Centrifuger (13.2Krpm, 0.5min), aspirer le surnageant et laver le culot par 500µl d'éthanol. Agiter et centrifuger, aspirer bien la solution et laisser les tubes sécher à l'air libre pendant 10 min. Ajouter l'eau distillée et laisser incuber 10 min à 55°C. Centrifuger 13.2 Krpm pour une minute et récupérer le surnageant soigneusement dans de nouveaux tubes bien étiquetés. La lecture de la quantité exacte d'ADN se fait par le Nanodrop avec l'eau distillée comme témoin (Blank). Conserver les tubes à -20°C pour le séquençage.

IV.5. Séquençage

Les deux mélanges correspondant aux deux amorces sont utilisées dans un volume final de 5 μ l chacun: 1 μ l d'amorce, 1 μ l de Big Dye (Terminator Reaction Mix version 1.1 ou 3.1) et 3 μ l de tampon. Après centrifugation, on ajoute 5 μ l de l'ADN à séquencer dans chaque tube, en séparant toujours les deux amorces. Pour chaque échantillon, deux tubes correspondent aux deux types d'amorce. Le programme de séquençage se déroule comme suit: un cycle de 96°C pendant 5min, suivi par 25 cycles de 96°C pour 10s, 50°C pendant 5s et 60°C pendant 4min avec une phase finale de conservation à 4°C.

IV.6. Analyse des données

La lecture et les corrections des séquences ont été faites à l'aide des logiciels Sequencher software et BioEdit. L'analyse des données est effectuée par PAUP* (Swofford, 2002).

Chapitre III

EFFET DE L'URBANISATION ET CHANGEMENT DES CONDITIONS DU MILIEU SUR LA REPARTITION DES PHLEBOTOMES : CAS DE MARRAKECH

I. INTRODUCTION & OBJECTIF

L'émergence, la ré-émergence ou l'extension de certaines maladies humaines et animales à transmission vectorielle montrent l'importance des changements globaux sur les communautés d'arthropodes vecteurs. Parmi ces changements, le développement des transports transcontinentaux, les changements de pratiques et d'usage des terres, le développement urbain et le changement climatique semblent jouer un rôle important. La leishmaniose est une maladie associée au développement et aux modifications de l'environnement qui accroissent l'exposition aux phlébotomes vecteurs.

Les études réalisées au Maroc par Rioux *et al.*, 1984, 1986 et 1997 ont permis de cerner le risque leishmanien selon trois modalités :

- Zones à risque : délimitées à partir de la densité vectorielle et exprimées par étage bioclimatique.
- Périodes à risque : annuelle et saisonnière.
- Population à risque : définie par un état de réceptivité (enfants, profession à risque....)

L'objectif de cette partie du travail est d'étudier le risque leishmanien en milieu urbain et l'impact de la périurbanisation sur la biodiversité des phlébotomes. Un transect allant du centre urbain dense de Marrakech au milieu naturel en passant par les différentes zones périurbaines est réalisé et les populations de phlébotomes suivies pendant leur période d'activité. Ce travail associant les sciences sociales et l'écologie dans l'étude d'un phénomène important à l'échelle régionale permettra d'appréhender les conséquences d'une perturbation

anthropique sur la transmission vectorielle d'une zoonose. Ainsi, les trois modalités qui définissent le risque leishmanien seront discutées dans ce chapitre.

Le choix de la ville de Marrakech comme zone d'étude est fondé d'abord sur sa position entre les foyers leishmaniens du sud marocain à savoir le foyer de leishmaniose cutanée zoonotique de Ouarzazate (Rioux *et al.*, 1986) et les foyers de leishmaniose cutanée anthroponotique d'Azilal (Pratlong *et al.*, 1991) et de Chichaoua (Guernaoui *et al.*, 2005). Selon les rapports du Ministère de la santé, des cas importés de leishmaniose cutanée sont enregistrés à Marrakech depuis 1998. Des données récentes de 2004 rapportent officiellement 23 cas de la leishmaniose cutanée et 7 cas de leishmaniose viscérale à la préfecture de Marrakech (Tableau 9). Tous ont été définis comme des cas importés du foyer de Ouarzazate essentiellement, puis des foyers d'Azilal et Chichaoua (Anon., 2004). La répartition de ces données épidémiologiques selon l'âge montre que la tranche d'âge entre 15 et 49 ans est la plus touchée par la leishmaniose cutanée, suivi par la tranche d'âge de 5 au 9 ans.

Tableau 9 : Répartition des cas de leishmaniose cutanée (LC) et de leishmaniose viscérale (LV) selon l'âge et sexe dans la préfecture de Marrakech en 2004.

Age		- 1 an	1-4	5-9	10-14	15-49	50+	Total
LC	M	0	3	3	2	3	0	11
	F	0	1	3	1	4	3	12
LV	M	0	4	1	0	0	0	5
	F	0	2	0	0	0	0	2

La forme viscérale est toujours infantile au Maroc et ne touche que des enfants d'âge compris entre 1 et 4 ans. Selon le sexe, on remarque que la forme cutanée cible surtout le sexe féminin tandis que la forme viscérale touche le sexe masculin.

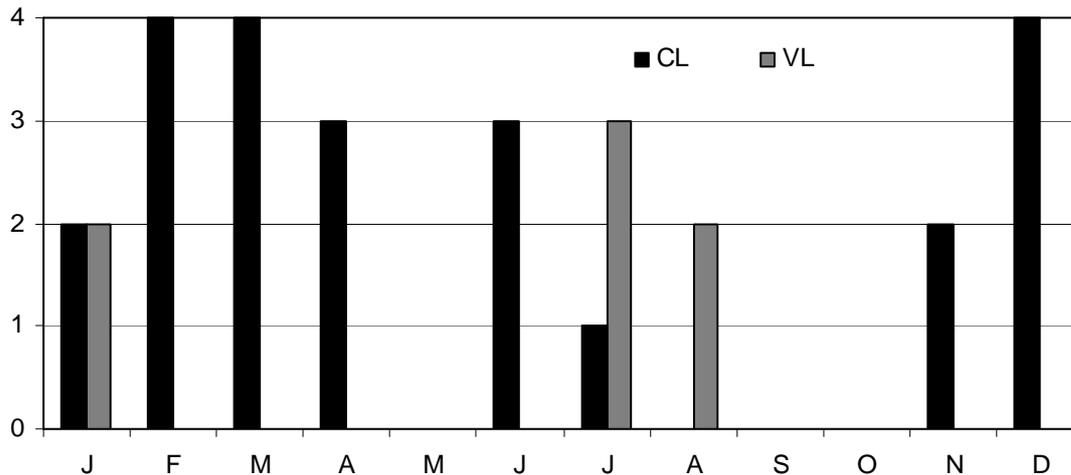


Figure 15. Répartition des cas importés de leishmaniose cutanée (CL) et de la leishmaniose viscérale (VL) dans la préfecture de Marrakech selon les mois (Anon., 2004).

L'enregistrement des cas de la Leishmaniose cutanée est sur presque toute l'année tandis que la leishmaniose viscérale est enregistrée pendant deux périodes : le mois de janvier et les mois de juillet-août (Fig. 15).

Sachant que les réservoirs, rongeurs et canidés, sont omniprésents (Laamrani-Idrissi, 2000), l'enregistrement des cas importés de leishmaniose dans la ville de Marrakech est une condition suffisante pour étudier la faune phlébotomienne dans cette zone et évaluer le risque leishmanien à Marrakech.

Le présent chapitre est divisé en deux parties :

- la première partie traitera d'une façon synthétique l'effet de l'urbanisation et des changements anthropiques de l'environnement sur la distribution et la répartition des phlébotomes à Marrakech ;
- la seconde partie sera consacrée à l'inventaire et à l'étude détaillée de la saisonnalité des espèces collectées dans le milieu urbain de Marrakech ainsi que les facteurs biotiques et abiotiques déterminants cette activité.

II. EFFET DE CHANGEMENT DU MILIEU SUR LA DISTRIBUTION DES PHLEBOTOMES

L'un des principaux facteurs de risque leishmanien est l'urbanisation, phénomène mondial étroitement associé à la forte intensification des migrations (OMS, 2002).

La ville de Marrakech est parmi les grandes agglomérations urbaines du Maroc qui ont été concernées par une réforme visant le retour à l'unité de la ville et la création des conseils d'arrondissements. La réalisation des monographies locales de l'environnement de villes marocaines est associée à une stratégie globale nationale, qui vise à mettre en place un plan national d'actions environnementales. Cette stratégie est menée par l'Observatoire National de l'Environnement du Maroc (ONEM) et appuyée par le Programme des Nations Unies pour le Développement (PNUD), l'UNESCO et Cités Unies Développement (Anon., 1993 ; 1994 et 1995).

L'agglomération urbaine de Marrakech fait partie de la Wilaya de Marrakech, elle-même incluse dans la région économique du Marrakech-Tensift-Al Haouz. Les cinq communes urbaines composant cette agglomération, et qui font l'objet de la monographie de l'environnement sont les suivantes :

- préfecture de Marrakech Médina : Marrakech-Médina,
- préfecture de Marrakech Ménara : Méchouar-Kasbah, Ménara-Guéliz,
- préfecture de Sidi Youssef Ben Ali : Sidi Youssef Ben Ali et Annakhil.

L'agglomération urbaine de Marrakech compte en 1994 environ 672.503 habitants concentrés dans les communes de Marrakech-Médina, Ménara-Guéliz et Sidi Youssef Ben Ali auxquelles il convient d'ajouter la commune Annakhil qui compte 38 626 habitants. La densité de population est de 31,6 hab/ha. Elle varie selon les communes urbaines : très faible à Annakhil,

ancienne commune rurale où l'urbanisation est diffuse, et forte à Marrakech-Médina et Sidi Youssef Ben Ali (Tableau 11).

Marrakech concentre à elle seule plus de 78% de la population urbaine de la région de Marrakech-Tansift-Al Haouz. Entre les deux derniers recensements, la population urbaine régionale a connu un accroissement important, la municipalité de Ménara-Gueliz a enregistré un taux de 5,09%.

Tableau 11. Répartition de la population sur les cinq communes urbaines de Marrakech

Commune urbaine	Superficie (km²)	Population (1994)	Densité (hab/km²)
Annakhil	67	38.626	6
Marrakech-Médina	6,4	189.367	201
Méchouar-Kasbah	12,7	28.959	23
Ménara-Guéliz	91,8	296.781	32
Sidi Youssef Ben Ali	3,1	157.396	508

Source: Wilaya de Marrakech

Ainsi, la croissance démographique a entraîné la construction d'habitats précaires et de douars en périphérie de Marrakech et à l'intérieur du tissu urbain. La ville s'agrandit en périphérie notamment à l'Ouest avec l'apparition de nouveaux quartiers résidentiels comme pour la région de Targa, Massira ou l'extension de l'avenue Mohammed VI. L'afflux des ruraux en quête de travail en rapport avec les besoins de main-d'oeuvre liés aux travaux d'équipement et à la création d'une nouvelle zone industrielle de 20 ha à Sidi Ghanem d'une part, le refoulement des citadins au revenu modeste consécutif à la flambée des prix des terrains et des loyers à l'intérieur même de la Médina d'autre part, ont entraîné l'apparition d'un nombre important de douars et d'habitats spontanés.

Ces douars et habitats spontanés sont situés, en périphérie de la ville et parfois à l'intérieur du tissu urbain:

- L'habitat spontané: il s'agit d'habitats insalubres de type urbain, caractérisé par l'absence d'équipements. On le rencontre à Sidi Youssef Ben Ali et à Douar Iziki.
- Les douars urbains et péri-urbains: ce sont des noyaux d'habitations précaires de type rural, intégrés dans Marrakech ou en périphérie immédiate, et installés sur des terrains non équipés. Les constructions sont en général en pisé ou en dur. On en dénombre une cinquantaine totalisant 76.000 habitants environ et dont la densité d'habitants est élevée: 420 hab/ha.

Afin de palier ces problèmes, une politique urbaine d'ensemble a été mise en place, ayant pour buts, la lutte contre l'habitat précaire, la recherche de modèles d'habitat adaptés au contexte marocain et la réalisation d'un habitat social économique destiné à rallier les couches moyennes de la population. Cette politique s'est concrétisée par une série d'opérations ou de projets d'urbanisme réalisés sous l'impulsion de l'état et des promoteurs privés.

Ces projets d'urbanisme entraînent des modifications rapides de l'environnement à Marrakech. Pour étudier l'effet de cette urbanisation sur la répartition spatio-temporelle des phlébotomes, les spécimens sont collectés pendant leur période d'activité, déterminée dans la première partie de ce travail, avec trois objectifs:

- Comparaison de la densité et la richesse spécifique des phlébotomes dans les différents types d'habitats humains.
- Suivi et comparaison de la densité des phlébotomes dans deux types d'habitat humain : un douar et un quartier résidentiel riche.
- Suivre l'évolution de la population des phlébotomes dans un site avant et après les travaux d'aménagements.

La qualité du logement est un facteur significatif pour la santé. Des études de cas dans de nombreuses grandes villes du monde en développement montrent que de 30 % à 60 % de la

population urbaine vit dans des logements précaires. La qualité du logement ne se limite pas à la disponibilité de l'eau ou à la présence de sanitaires. De nombreux autres risques à la santé qui caractérisent les logements inférieurs à la norme contribuent eux aussi à la situation : surpeuplement, humidité, infestation par des parasites, bruit, poussière, drainage déficient, et aération insuffisante. Femmes et enfants, qui passent souvent une partie considérable de la journée à la maison, sont les plus susceptibles à ces dangers.



Figure 16. Photos de différents types d'habitats humains à Marrakech.

Des quartiers bien organisés (a, b, c) ; des quartiers propres à côté des Douars (d, e) et des Douars en milieu urbain (f, g, h).

Les piégeages ont été effectués dans 17 stations de la ville de Marrakech entre 2002 et 2006. Ces stations ont été classées selon le degré croissant d'urbanisation, d'insalubrité de l'habitat, des douars péri-urbains aux villas des quartiers riches en passant par les quartiers modernes constitués d'immeubles et de maisons bien organisées (Fig. 16). D'autres sites ont été piégés à savoir, la décharge publique de Marrakech et la zone d'épandage des eaux usées d'El Azzouzia. Les cinq espèces de phlébotomes de Marrakech y ont été collectées : *P. papatasi* (47.4%), *S. minuta* (16.6%), *S. fallax* (16.1%), *P. sergenti* (12.8%) et *P. longicuspis* (7.1%). *P. sergenti* est l'espèce la plus anthropophile, seuls *P. papatasi* et *S. minuta* ont été collectés dans les différents types d'habitat.

L'étude de la répartition de la population des phlébotomes dans la station Akioud avant et après les travaux d'aménagement (Fig. 17), montre l'effet de l'urbanisation dans la diminution de l'effectif et de la richesse spécifique des populations de phlébotomes après les aménagements. *P. papatasi* montre une forte adaptation et une résistance aux modifications du milieu ce qui explique son abondance et son activité continue sur toute l'année dans la région de Marrakech.



Figure 17. Photos de Douar Akioud avant (a) et après (b) les travaux d'aménagement

Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of Marrakech city, Morocco

S. BOUSSAA, B. PESSON, A. BOUMEZZOUGH

Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 2007, Vol. 101, n° 8, Pages 715–724

Pages 79-92 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1179/136485907X241398>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

III. ETUDE DE L'ACTIVITE DES PHLEBOTOMES A MARRAKECH

L'inventaire de la faune phlébotomienne dans la ville de Marrakech et ses marges (Guernaoui, 2000 ; Boussaa, 2003) a montré la présence en milieu urbain de deux vecteurs prouvés de leishmaniose cutanée: *Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi* vecteur de *Leishmania major* et *Phlebotomus (Paraphlebotmus) sergenti* vecteur de *L. tropica* en plus de la présence de *Phlebotomus (Larroussius) longicuspis* vecteur probable de *L. infantum*. Deux espèces du genre *Sergentomyia* ont été collectés : *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta* et *S. (S.) fallax*.

Dans ce contexte, l'étude de la saisonnalité et l'activité de ces trois vecteurs à Marrakech est nécessaire afin de déterminer les périodes à risque. Ainsi, un suivi de l'activité des phlébotomes au centre de la ville de Marrakech est effectué sur une année d'étude avec des prélèvements journaliers.

Durant ce suivi, nous avons récolté 3277 spécimens appartenant aux trois espèces du genre *Phlebotomus* (68.7%) et aux deux espèces de genre *Sergentomyia* (31.3%). *P. papatasi* l'espèce dominante et constitue 54.6% des espèces inventoriées, suivi par *S. minuta* (20%), *S. fallax* (11.3%), *P. sergenti* (10.3%) et *P. longicuspis* (3.8%). A l'exception de *P. sergenti*, le sex-ratio est en faveur des mâles pour toutes les autres espèces.

L'analyse des résultats globaux montre deux périodes annuelles à haut risque leishmanien à Marrakech: octobre-novembre et mai- juin- juillet. Ces deux périodes sont marquées par une densité totale élevée qui peut atteindre jusqu'à 62.5 (spécimens par m² de piège par nuit) au mois de novembre et 70.4 (spécimens par m² de piège par nuit) au mois de mai.

L'analyse des résultats par espèce montre une activité monophasique pour *P. sergenti*, par contre les autres espèces montrent une activité biphasique. Puisqu'il est l'espèce dominante, *P. papatasi* présente deux pics de densité qui correspondent bien aux deux pics de densité totale. Le premier pic de 98 (spécimens par m² de piège par nuit) en automne et le deuxième est de 95.8 (spécimens par m² de piège par nuit) en été. Durant ce suivi nous avons noté, en

plus de la prédominance de *P. papatasi* dans toutes les récoltes, son activité continue sur toute l'année.

L'activité des phlébotomes est conditionnée par les facteurs du milieu notamment les facteurs climatiques. La corrélation de diagramme de l'activité des phlébotomes à Marrakech avec le diagramme ombrothermique établi pour la ville (Le Houérou, 1989), montre que la période d'activité importante coïncide bien avec la période sèche. Pendant ces périodes de forte activité, la température maximale oscille entre 23 et 36°C, la température minimale oscille entre 11 et 19°C, alors que la pluviométrie enregistre entre 35 et 50 mm. Les pics de la densité sont enregistrés pendant les mois les plus humides de la période sèche (novembre et mai). La richesse spécifique est maximale au mois de mai où la température journalière varie de 15 à 32°C et la pluviométrie est de 35 mm.

La température peut constituer un facteur limitant pour la faune en général et pour les phlébotomes dans la région de Marrakech. Un suivi de la densité de *P. papatasi* en fonction des variations de température montre que la température optimale pour l'activité de *P. papatasi* dans cette région est entre 32 et 36°C. Par contre l'activité diminue avec la diminution de la température (entre 11 et 20°C) comme avec une température élevée (entre 37 et 40°C). Les mâles de *P. papatasi* sont plus sensibles aux variations de la température que les femelles.

Seasonal fluctuations of phlebotomine sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the urban area of Marrakech, Morocco

S. Boussaa, S. Guernaoui, B. Pesson , A. Boumezzougha

Acta Tropica, 2005, Vol. 95, N° 2, Pages 86–91

Pages 95-104 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.05.002>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

IV. ETUDE DU SUBSTRAT DE POTENTIELS GITES LARVAIRES

On se basant sur la forme du génitalia mâle, deux stations semblent contenir des gîtes larvaires à Marrakech. Il s'agit de la station d'Akioud pour les deux espèces de *Sergentomyia* et de la zone de Semlalia pour *P. sergenti* (Boussaa, 2003).

Une étude du substrat de ces deux stations est nécessaire pour confirmer ces hypothèses. L'échantillonnage du sol est effectué dans les endroits où les mâles avec génitalia non tordu ont été collectés. La recherche active des œufs et des formes larvaires est effectuée par examen direct des échantillons sous la loupe et par la méthode Berlèse. Aucun résultat positif n'est noté.

Le mois de juin constitue une phase d'émergence dans les deux stations. Ainsi, les prélèvements synchroniques durant ce mois avaient pour but de calculer le taux d'humidité, le pourcentage de matière organique (m.o) et la granulométrie du sol (Tableau 10).

Tableau 10 : Caractérisation des substrats dans les deux gîtes larvaires. Sg (sables grossiers) ; Sf (sables fins) ; Arg (argiles) ; Lg (limons grossiers) ; Lf (limons fins).

	Granulométrie %					Humidité %	m.o %
	Sg	Sf	Arg	Lg	Lf		
Akioud	28,6	29,4	10	12	20	54,6	3,24
Semlalia	61,5	17	10	11,5	0	5	12,67

En juin 2004, le probable gîte larvaire des *Sergentomyia* présente un taux d'humidité 10 fois plus important que celui de *P. sergenti*. Par contre, le taux de matière organique est élevé dans la station Semlalia.

La comparaison de la granulométrie des deux substrats montre dans le sol de Semlalia une richesse en sables grossiers (61,5%) avec une absence totale de limons fins (0%). A Akioud, les cinq fractions du sol sont présentes avec un taux plus au moins équilibré.

Ces résultats préliminaires nous renseignent sur l'exigence de chacune des trois espèces : *P. sergenti*, *S. minuta* et *S. fallax*. Les *Sergentomyia* exigent un taux d'humidité élevé. *P. sergenti* a besoin d'un taux important de matière organique pour son développement larvaire. D'après l'OMS (2002), l'augmentation des cas de leishmaniose cutanée anthroponotique dans le sud de l'Anatolie est due essentiellement à la présence de matière organique d'origine animale, tel l'excrément de vaches, offrant des conditions nécessaires au développement des œufs de phlébotomes.

Une étude approfondie du substrat avec un suivi des variations de ses éléments est nécessaire pour déduire l'effet de la nature du substrat sur la répartition et le développement des phlébotomes.

Chapitre IV

CARACTERISATION MOLECULAIRE

DES PHLEBOTOMES DE LA REGION DE MARRAKECH

INTRODUCTION & OBJECTIF

Longtemps la taxonomie des phlébotomes a reposé sur des descriptions morphologiques externes puis internes. Cette étude morphologique a ses limites : elle ne peut différencier deux espèces jumelles et à l'opposé, elle met en évidence des différences entre populations d'une même espèce. Ceci peut avoir des conséquences sur l'identification des espèces vectrices dans les foyers de leishmaniose.

De nouvelles approches biochimiques et moléculaires dont les données se prêtent à l'analyse informatique, se sont développées dans le but de résoudre les problèmes posés aussi bien par l'individualisation des taxons que par l'étude de leurs relations phylogénétiques et biogéographiques.

Depuis une vingtaine d'années, l'étude du polymorphisme enzymatique par des techniques d'électrophorèse est une référence pour les systématiciens. L'utilisation des isoenzymes comme marqueurs génétiques s'avère bien adaptée à l'étude d'un échantillonnage important.

Elle permet, d'une part, l'analyse de caractères à déterminisme génétique simple (de type mendélien), à partir desquelles la diversité génétique intra et interspécifique pourra être estimée, et d'autre part, l'étude comparée de populations issues de milieux très variés, puisque les caractères analysés ne sont que faiblement sensibles à l'action des facteurs environnementaux.

Plus récemment, un nouveau moyen d'analyser la variabilité génétique repose sur l'étude du polymorphisme de l'ADN mitochondrial (ADNmt) par amplification et séquençage. L'ADNmt est utile aussi bien dans la caractérisation des espèces et des populations de

phlébotomes (Ready *et al.*, 1997) que dans la mise en évidence de phénomènes d'introgession (Marcondes *et al.*, 1997). Il se prête également aux reconstitutions phylogénétiques (Esseghir *et al.*, 1997). Comme le polymorphisme moléculaire se rapproche d'avantage des spécificités génétiques de l'individu que ses caractères phénotypiques, son usage permet une étude taxonomique plus précise, ce qui justifie à l'heure actuelle la complémentarité des approches morphologique et moléculaire.

L'identification précise des espèces de phlébotomes constitue encore un problème au Maroc. Certaines espèces sont décrites en se basant seulement sur la morphologie du mâle et la femelle reste inconnue (*P. mariae*). L'existence de formes atypiques et d'espèces cryptiques ainsi que des phénomènes d'introgession ont été récemment mis en évidence (Pesson *et al.*, 2004 ; Yahia *et al.*, 2004).

Notre objectif est de contribuer à la résolution de ces problèmes d'identification en caractérisant des populations de phlébotomes capturées dans le sud marocain. Nous présentons les résultats d'une approche combinée des études morphologiques, isoenzymatiques et de l'ADNmt. Ces approches ont été appliquées à l'étude des trois espèces de *Phlebotomus* identifiées à Marrakech : *P. papatasi*, *P. sergenti* et *P. longicuspis*. Ces espèces sont des vecteurs prouvés ou suspectés de leishmanies au Maroc. Nous avons en outre appliqué cette analyse aux *Sergentomyia* de la région. Ce chapitre est ainsi subdivisé en quatre parties :

- La première, s'intéresse à la caractérisation des populations de *P. papatasi* provenant de milieux urbains et ruraux. Cette espèce est la plus abondante à Marrakech et elle se caractérise par une adaptation rapide aux modifications du milieu.
- La seconde partie est consacrée à *P. sergenti* et à la comparaison des populations du nord et du sud du Maroc

- La troisième partie complète les données génétiques et précise la situation sur le complexe *perniciosus* dans le sud marocain.
- La dernière partie sur les *Sergentomyia* de Marrakech dresse l'inventaire des espèces et leur répartition en fonction des changements du milieu. L'analyse isoenzymatique est utilisée pour la recherche de marqueurs d'espèces dont la diagnose morphologique est difficile.

PARTIE I

PHLEBOTOMES DU GENRE *PHLEBOTOMUS*

DE LA REGION DE MARRAKECH

I. *PHLEBOTOMUS (PHLEBOTOMUS) PAPATASI* SCOPOLI, 1786

I.1. Introduction

P. papatasi figure parmi les espèces les plus étudiées à cause de sa fréquence et de l'importance de son aire de distribution géographique (Lewis, 1982). Le premier travail connu sur l'anatomie des phlébotomes est celui de Grassi (1907) qui décrit les organes internes et externes du mâle et de la femelle de *P. papatasi* et donne la première description détaillée de l'oeuf, de la larve et de l'imago de la même espèce. Les études les plus complètes sont celles de Perfiliev (1928) sur l'anatomie de l'adulte et de la larve de premier stade de *P. papatasi*.

P. papatasi est un vecteur confirmé de *L. major* (Killick-Kendrick, 1990). L'isolement et le typage du parasite chez ce vecteur a confirmé son rôle épidémiologique dans plusieurs pays: en Arabie Saoudite (Killick-Kendrick *et al.*, 1985), en Tunisie (Ben Ismail *et al.*, 1987) et en Iran (Yaghoobi-Ershadi *et al.*, 1995).

P. papatasi est décrit pour la première fois au Maroc par Delanoë (1916). Cette espèce est récoltée dans tout le pays où elle compte parmi les espèces les plus abondantes (Bailly-Choumara *et al.*, 1971; Rioux *et al.*, 1984; Rioux *et al.*, 1997). Son rôle vecteur est confirmé au Maroc (Rioux *et al.*, 1986).

I.2. Critères morphologiques d'identification

P. papatasi est un phlébotome d'assez grande taille (jusqu'à 2,60 mm). Chez le mâle (Fig. 18a), le génitalia est bien développé. Le style, long et grêle, porte cinq épines trapues ; trois apicales et deux sub-terminales. Le coxite, présente à sa base un petit lobe garni de quelques

soies courtes et dans sa partie subterminale une douzaine de soies longues bien différenciées.

Le paramère est trilobé. Il comporte :

- un lobe ventral court portant à son extrémité distale une petite épine,
- un lobe médian, digitiforme, plus court que le lobe ventral,
- un lobe dorsal, le plus long, nettement arqué et hérissé de soies sur sa concavité.

Le lobe latéral porte à son extrémité distale deux épines spatulées.

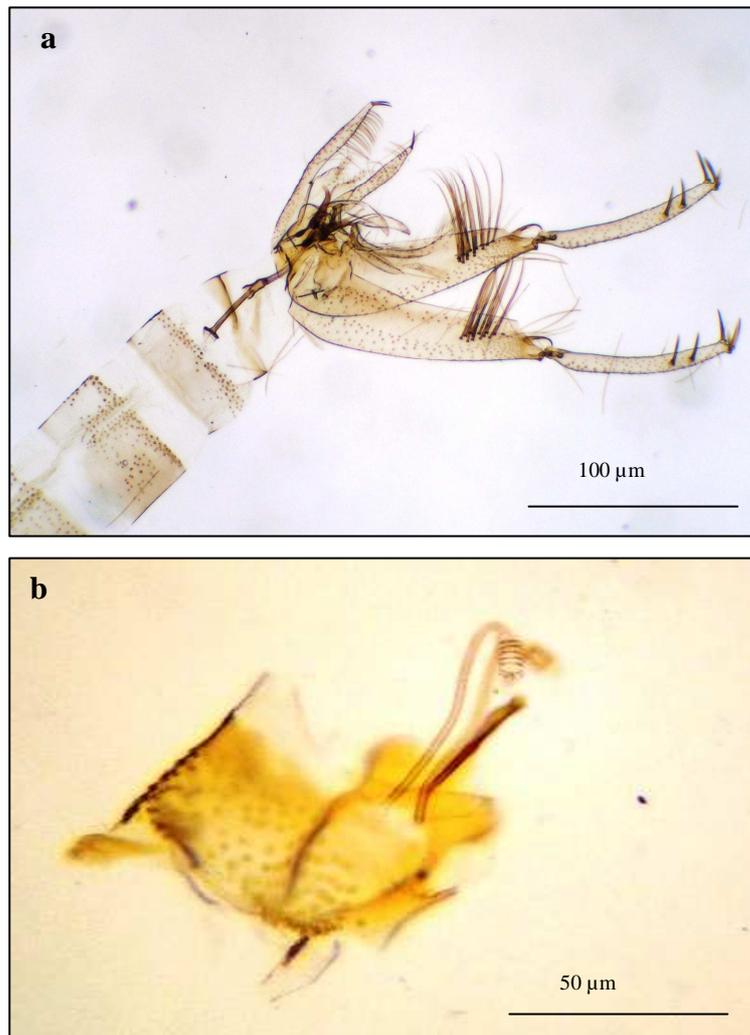


Figure 18. Génitalia mâle (a) et spermathèques de la femelle (b) *P. papatasi*.

Chez la femelle, les corps des spermathèques (Fig. 18b) sont annelés, sans col. Ils comportent six à dix annulations dont la dernière est de même taille que les précédentes. Le pharynx de *P. papatasi* femelle est orné de denticules larges sur les bords et plus petits au milieu. Le pharynx postérieur est armé d'une plage de dents écailleuses irrégulières dans leur forme et leur implantation.

Des malformations portant sur les épines insérées sur les lobes latéraux des mâles ont été mentionnées par Guernaoui *et al.*, (2006c) à partir des exemplaires collectés dans le sud-ouest marocain : une ou deux épines surnuméraires, ou une seule épine, sur un ou sur les deux lobes latéraux. Les mêmes malformations ont été signalées par Dedet *et al.*, (1984) en Algérie et par Adhami (1991) en Albanie. En Egypte, 30% les adultes mâles de *P. papatasi* examinés par Kassem *et al.*, (1988), présentaient des génitalia anormaux.

Des anomalies morphologiques détectées chez des phlébotomes ont déjà été associées à des caractères génétiques propres à certains individus. C'est le cas de *P. (Paraphlebotomus) caucasicus* en Iran (Moin-Vaziri *et al.*, 2007) et de *P. (Larroussius) perniciosus* dans le nord du Maroc (Benabdennbi *et al.*, 1999 ; Pesson *et al.*, 2004).

I.3. Analyse isoenzymatique

Nous présentons ici, les résultats de la première caractérisation isoenzymatique des populations de *P. papatasi* de Marrakech. Nous avons utilisé l'outil enzymatique pour comparer d'une part, les populations urbaine (Marrakech ville) et rurale (Souihla, Ourika et Rhmate) de la région de Marrakech, et d'autre part les populations marocaines de *P. papatasi* avec d'autres populations naturelles du bassin méditerranéen : Espagne, Chypre et Syrie.

L'étude morphologique nous a permis de détecter des malformations chez 5.3 % des *P. papatasi* mâles de Marrakech : une épine surnuméraire, ou une seule épine, sur un ou sur les

deux lobes latéraux (Fig. 19). Aucune malformation n'est trouvée chez les femelles ni chez les mâles des autres populations.

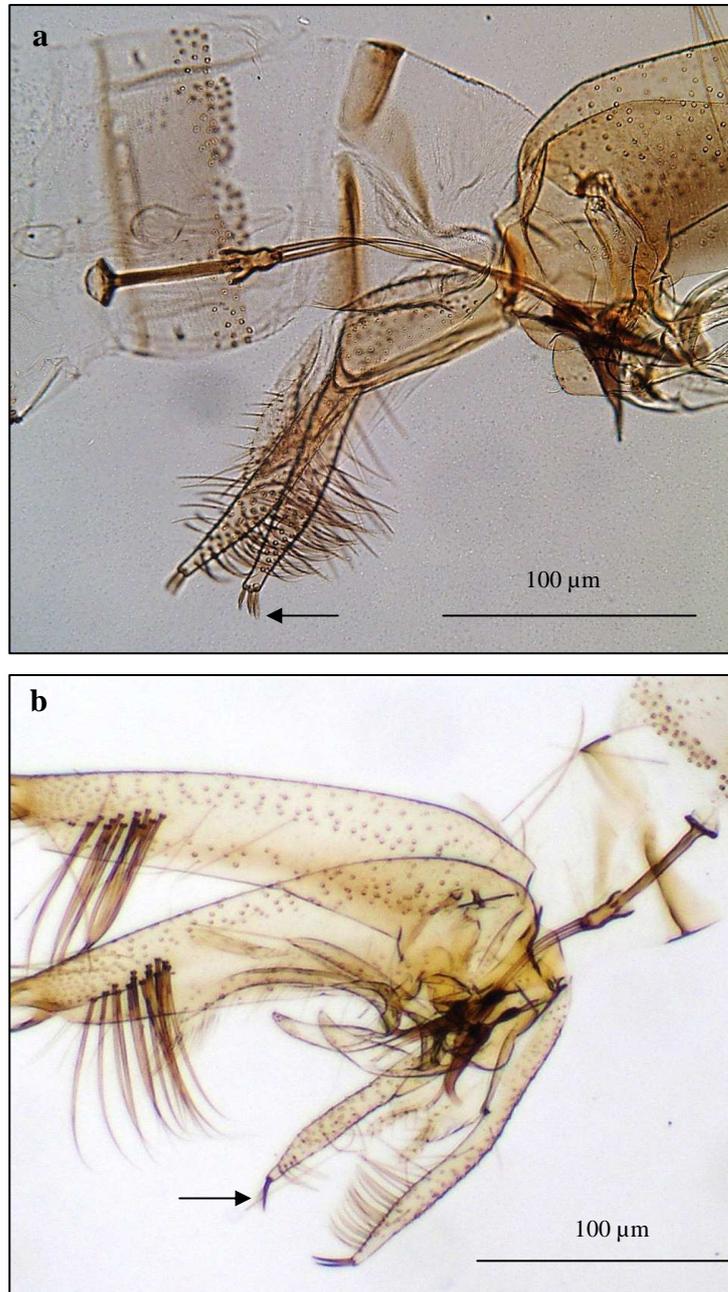


Figure 19. Malformations chez les *P. papatasi* de Marrakech.
(a) une épine surnuméraire (b) une seule épine sur le lobe latéral.

L'analyse isoenzymatique de 12 systèmes révèle neuf systèmes enzymatiques polymorphes (Un locus est considéré polymorphe lorsque l'allèle majoritaire a une fréquence inférieure à 99%). Chez les populations de *P. papatasi* (HK, PGM, PGI, 6PGD, MDH1, MDH2, ICD2, FUM et ACO) et trois enzymes monomorphes (ME, ICD1 et α GPDH). Aucune association n'est trouvée entre les anomalies de *P. papatasi* de Marrakech et les fréquences alléliques.

Le sous-genre *Phlebotomus* est considéré comme un groupe ancestral du genre *Phlebotomus* (Rispaïl et Léger 1998a). Il ne regroupe que quatre espèces avec de faibles différences morphologiques: *P. papatasi*, *P. bergeroti*, *P. duboscqi* et *P. salehi*. Leurs aires de répartition se chevauchent, *P. bergeroti* occupe le Sahara Central, mais se retrouve également en Ethiopie, à Djibouti et au Yemen où il est mêlé à *P. duboscqi*. On l'a recueilli aussi en Haute-Volta en zone sahélienne. *P. papatasi* et *P. bergeroti* sont sympatriques au Maroc, Algérie, Egypte, Soudan, Ethiopie et dans la péninsule arabique. L'aire de *P. duboscqi* s'étend au Nord de l'équateur jusqu'au 20^{ème} parallèle en Mauritanie. *P. papatasi* est une espèce paléarctique qui s'étend sur la région méditerranéenne et sur l'Ouest de l'Asie. En Afrique, elle pousse une pointe vers le Sud en suivant la vallée du Nil et atteint la région éthiopienne au niveau de la République du Soudan, où elle dépasse le 10^{ème} parallèle. *P. salehi* se limite à la région asiatique dans l'Inde, Iran, Afghanistan et Pakistan.

Des expériences de croisement ont été rapportées entre *P. papatasi* et *P. bergeroti* (Fryauff et Hanafi 1991) et entre *P. papatasi* et *P. duboscqi* (Ghosh *et al.*, 1999).

Chez des populations d'élevage de *P. papatasi*, on observe une faible variabilité génétique des isoenzymes (Kassem *et al.*, 1993 ; Belen *et al.*, 2004). La même constatation est faite par Esseghir *et al.* (1997), en séquençant le Cytochrome b de l'ADNmt de plusieurs populations du bassin méditerranéen. Ces auteurs concluent à l'absence de vicariance entre les populations de *P. papatasi*. Un seul haplotype est partagé par les populations du bassin méditerranéen (Syrie, Chypre, Egypte, Italie et Maroc).

Aucune structuration des populations (mises en élevage) n'est trouvée en fonction de l'altitude (Belen *et al.*, 2004) et seulement une faible variabilité génétique est détectée entre des populations naturelles en fonction des biotopes où elles sont capturées (Parvizi *et al.*, 2003).

Récemment, Hamarsheh *et al.* (2006) caractérisent 5 microsatellites chez *P. papatasi* originaire de l'est-méditerranéen qui présentent un taux de polymorphisme très élevé. Dans ces travaux, encore préliminaires, ces auteurs suggèrent l'utilisation de ces microsatellites pour étudier et comparer les populations de *P. papatasi*. En 2007, ces mêmes auteurs mettent en évidence une structuration génétique des populations de *P. papatasi* de l'est-méditerranéen (Syrie, Turquie, Palestine, Israël, Jordanie et Egypte) mais en utilisant encore le séquençage de l'ADNmt (Hamarsheh *et al.*, 2007).

Nos résultats de l'analyse isoenzymatique sur des populations naturelles de *P. papatasi* montre l'absence de structuration génétique locale entre les populations de Marrakech ni en fonction des biotopes (zone urbaine et zone rurale) ni avec l'altitude (de 383 m à 846 m). Par contre, une nette séparation entre les populations de l'Est (Chypre et Syrie) et celles de l'Ouest méditerranéen (Espagne et Maroc) est trouvée. Cette divergence est supportée par deux enzymes : 6PGD et HK.

La caractérisation génétique des populations sauvages et domestiques de *P. papatasi*, dans les foyers de *L. major*, serait un outil utile pour comprendre la dynamique de transmission et mieux diriger la lutte antivectorielle.

Isoenzymatic Characterization of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) of the Marrakech Area, Morocco

S. Boussaa, S. Perrotey, A. Boumezzough, R.Harrak, S.Hilali, B. Pesson

Journal of Medical Entomology, 2008, Vol. 45, N° 3, Pages 370-374

Pages 116-128 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://esa.publisher.ingentaconnect.com/content/esa/jme>

ou

<http://www.entsoc.org/Pubs/Periodicals/JME/index.htm>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

II. PHLEBOTOMUS (PARAPHLEBOTOMUS) SERGENTI PARROT, 1917

II.1. Introduction

P. sergenti est un vecteur prouvé de *L. tropica* (Killick-Kendrick, 1990). Il a une forte susceptibilité à *L. tropica* au laboratoire (Killick-Kendrick *et al.*, 1995) et *in natura* (Volf *et al.*, 2002; Svobodova et Votypka 2003).

Il possède une aire de répartition très étendue débordant largement celle du parasite mais la question de l'unicité du taxon est toujours posée (Depaquit *et al.*, 1998). Le mâle est décrit d'Algérie (Parrot, 1917), la femelle est décrite du Portugal (França, 1918). *P. sergenti* est présent dans le sud et l'ouest du bassin méditerranéen et il est remplacé dans le nord-est de cette région par *P. (Paraphlebotomus) similis* (Depaquit *et al.*, 2000). En région afro-tropicale, il est signalé dans de rares stations d'altitude (Abonnenc, 1972). Des études moléculaires ont mis en évidence une variabilité intraspécifique marquée chez *P. sergenti* avec de possibles conséquences sur la transmission du parasite (Depaquit *et al.*, 2002).

Au Maroc, *P. sergenti* est signalé comme une espèce largement répandue dans tout le pays (Gaud 1947; Bailly-Choumara *et al.*, 1971; Rioux *et al.*, 1984) et présente une diversité génétique considérable (Yahia *et al.*, 2004). Son rôle vecteur a été prouvé au Maroc (Guilvard *et al.*, 1991).

L'objectif principal de ce travail est de caractériser les populations de *P. sergenti* du sud marocain et les comparer avec celles du nord marocain.

II.2. Critères morphologiques d'identification

Dans cette étude, nous nous sommes d'abord basés sur des critères morphologiques d'identification. Chez le mâle (Fig. 20a), le génitalia présente un style court et trapu, armé de quatre épines dont une terminale et trois autres insérées à des niveaux différents. Le lobe basal du coxite, étroit et court, porte des soies relativement courtes ; le lobe latéral est plus long que

le coxite. Les valves péniennes sont en cône court à extrémité mousse et légèrement recourbée.

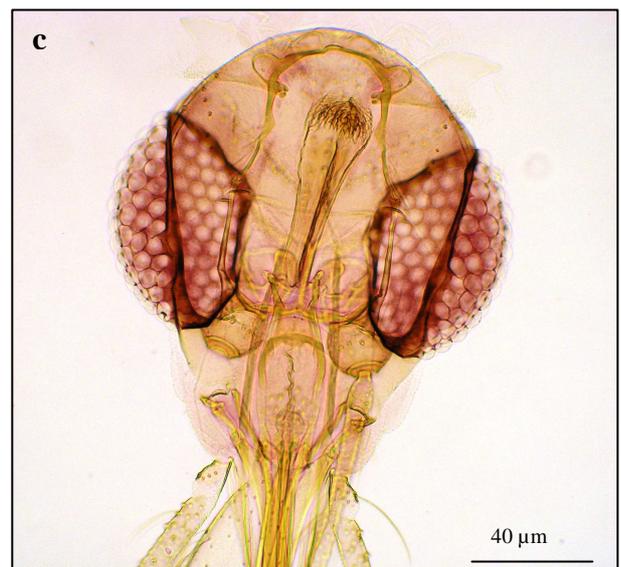


Figure 20. Génitalia mâle (a), spermathèques (b) et la tête (c) de la femelle *P. sergenti*.

La femelle est munie de spermathèques dont le corps est annelé (Fig. 20b), présentant de trois à sept anneaux. Le segment terminal est dilaté. Les conduits sont striés sur toute leur longueur. Le pharynx (Fig. 20c) postérieur présente une armature occupant moins du quart de la surface pharyngienne et formée de fortes écailles.

II.3. Analyse isoenzymatique

a. Origine des populations

Pour cette étude, sept populations de *P. sergenti* du Maroc ont été choisies. Trois populations du nord : Taounate (TA. 34°36'N, 4°40'W ; 500 m), Chefchaouene (CH. 35°12'N, 5°15'W ; 600 m) et Ouezzane (OU. 34°52'N, 5°36'W ; 350 m) et quatre populations du sud : Touama (TO. 31°31'N, 7°28'W ; 1088 m), Rhmate (RH. 31°25'N, 7°52'W ; 759 m), Ourika (OK. 31°22'N, 7°51'W ; 846 m) et Marrakech (MA. 31°36'N, 8°02'W ; 471 m).

Dix systèmes enzymatiques (PGI, PGM, HK, FUM, MDH, ME, 6PGD, ICD, α GPDH et ACO) ont été testés sur les sept populations. Seuls les enzymes polymorphes (PGI, PGM, HK, FUM, MDH1, ME, 6PGD, ICD2 et ACO) ont été analysées.

b. Variabilité génétique

Les fréquences alléliques et le nombre d'individus analysés par locus sont présentés dans le Tableau 12. Le polymorphisme observé pour chaque population est relativement élevé, seules les populations de Ouezzane (OU) et Ourika (OK) présentent un polymorphisme inférieur à 50% (Tableau 13). La population de Taounate (TA) présente le taux de polymorphisme le plus élevé (88.9%).

Tableau 12. Fréquences alléliques et taille des échantillons des populations de *P. sergenti* (N).

	TA	CH	OU	TO	RH	MA	OK
PGI							
(N)	61	30	4	84	74	18	106
5.69	.852	.967	.875	.887	.736	.778	.821
5.85	.000	.000	.000	.000	.027	.000	.000
5.43	.131	.033	.125	.060	.000	.000	.000
6.19	.000	.000	.000	.054	.128	.167	.165
5.56	.016	.000	.000	.000	.020	.000	.000
5.97	.000	.000	.000	.000	.074	.056	.000
6.51	.000	.000	.000	.000	.014	.000	.014
<i>P</i>	.601	1.000	1.000	.008	.245	.529	1.000
PGM							
(N)	56	25	2	60	34	14	94
5.32	.643	.880	.500	.717	.221	.429	.165

5.41	.241	.100	.500	.250	.662	.393	.766
5.59	.063	.020	.000	.033	.103	.179	.064
5.70	.054	.000	.000	.000	.015	.000	.005
<i>P</i>	.000	.000	.333	.010	.002	.621	.000
HK							
(N)	72	39	5	86	78	17	124
5.28	.993	.974	1.000	1.000	.968	1.000	1.000
5.36	.000	.013	.000	.000	.000	.000	.000
5.49	.007	.000	.000	.000	.000	.000	.000
5.39	.000	.013	.000	.000	.026	.000	.000
5.24	.000	.000	.000	.000	.006	.000	.000
<i>P</i>	1.000	.013			.001		
FUM							
(N)	22	23	25	71	42	17	68
6.45	.000	.000	.040	.000	.000	.059	.000
5.85	1.000	1.000	.960	1.000	1.000	.941	1.000
<i>P</i>			.020			.030	
MDH1							
(N)	33	11	8	68	34	11	66
5.20	.939	1.000	1.000	.926	.956	.909	1.000
5.52	.061	.000	.000	.015	.044	.091	.000
4.85	.000	.000	.000	.059	.000	.000	.000
<i>P</i>	1.000			.032	1.000	1.000	
ME							
(N)	32	7	3	8	15	1	7
4.55	.609	1.000	1.000	1.000	.967	1.000	1.000
4.85	.391	.000	.000	.000	.033	.000	.000
<i>P</i>	.000				1.000		
6PGD							
(N)	74	37	27	102	69	23	109
5.88	.682	.500	.537	.613	.514	.674	.679
5.85	.264	.162	.352	.044	.167	.043	.000
5.94	.054	.311	.111	.319	.319	.261	.271
5.91	.000	.014	.000	.025	.000	.022	.050
6.00	.000	.014	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P</i>	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
ICD2							
(N)	36	1	18	9	10	6	13
6.95	.972	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
7.87	.028	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P</i>	1.000						
ACO							
(N)	22	27	22	14	37	9	60
8.30	.977	.981	1.000	.964	.892	.944	.950
8.15	.000	.019	.000	.000	.095	.056	.050
8.60	.000	.000	.000	.000	.014	.000	.000
8.37	.023	.000	.000	.036	.000	.000	.000
<i>P</i>	1.000	1.000		1.000	.344	1.000	.003

c. Equilibre de Hardy-Weinberg (HW)

Le test de l'équilibre de HW est donné dans le Tableau 12. Aucune population n'est en équilibre de HW pour la 6PGD, ce déséquilibre est dû à un déficit en hétérozygotes (TA : Fis = +0.737 ; CH : Fis = + 0.828 ; OU : Fis = + 0.807 ; TO : Fis = + 0.736 ; RH : Fis = +0.617 ;

MA : $F_{is} = + 0.817$; OK : $F_{is} = + 0.723$). Touama est la seule population en déséquilibre de HW pour la PGI ($F_{is} = + 0.310$).

Tableau 13. Estimation de la variabilité génétique des populations nord et sud de *P. sergenti*

Population	Taille moyenne de l'échantillon	Nombre moyen d'allèle par locus	% de locus polymorphe	Ho	He
TA	45.3 (6.9)	2.3 (0.3)	88.9	0.104 (0.036)	0.218 (0.073)
CH	22.2 (4.4)	2.1 (0.5)	55.6	0.031 (0.012)	0.112 (0.069)
OU	12.7 (3.4)	1.6 (0.2)	44.4	0.040 (0.029)	0.176 (0.090)
TO	55.8 (12.1)	2.1 (0.4)	55.6	0.080 (0.032)	0.152 (0.066)
RH	43.7 (8.3)	2.8 (0.5)	77.8	0.134 (0.045)	0.219 (0.079)
MA	12.9 (2.3)	2.1 (0.4)	66.7	0.139 (0.060)	0.212 (0.079)
OK	71.9 (13.8)	1.9 (0.4)	44.4	0.078 (0.039)	0.138 (0.064)

d. Equilibre de liaison

Le déséquilibre de liaison a été recherché pour tous les couples d'allèles possibles entre deux locus et pour chaque population. Les locus : PGM-ME ; PGM-HK ; PGI-PGM ; PGI-HK et PGM-6PGD sont significativement liés chez les populations de : Taounate ($P=0.00007$); Chefchaouene ($P=0.04$); Rhmate ($P=0.005$) ; Rhmate ($P=0.007$) et Ourika ($P=0.001$).

e. Structuration génétique

La distance génétique de Nei et l'index de fixation sont présentés dans le Tableau 14. La figure 21 représente le phénogramme établi à partir de la matrice de distance de Nei avec les valeurs de bootstrap correspondant à 100 répliques. L'arbre n'indique pas d'isolement entre les populations de *P. sergenti* du nord (Taounate, Chefchaouene et Ouezzane) et du sud

(Touame, Rhmate, Ourika et Marrakech) marocain. Il s'agit bien d'une seule espèce : *P. sergenti sergenti* (distance génétique inférieur à 0.07). Les populations de Rhmate et d'Ourika sont identiques (distance génétique inférieur à 0.009) ce qui est confirmé par la faible distance géographique entre ces deux localités. Seule la séparation de la population de Marrakech des deux populations (Rhmate et Ourika) a une valeur de bootstrap supérieure à 50%.

Tableau 14. Matrice de distance génétique de Nei (haut) et des index de fixation Fst (bas).

Population	TA	CH	OU	TO	RH	MA	OK
TA	*****	.034	.030	.031	.058	.040	.068
CH	.0803	*****	.026	.006	.057	.029	.070
OU	.0079	.0401	*****	.018	.019	.018	.027
TO	.0618	.0174	.0766	*****	.034	.012	.041
RH	.1245	.1538	.0266	.0955	*****	.013	.006
MA	.0477	.0987	.0357	.0270	.0163	*****	.016
OK	.1959	.2673	.1096	.1618	.0256	.0501	*****

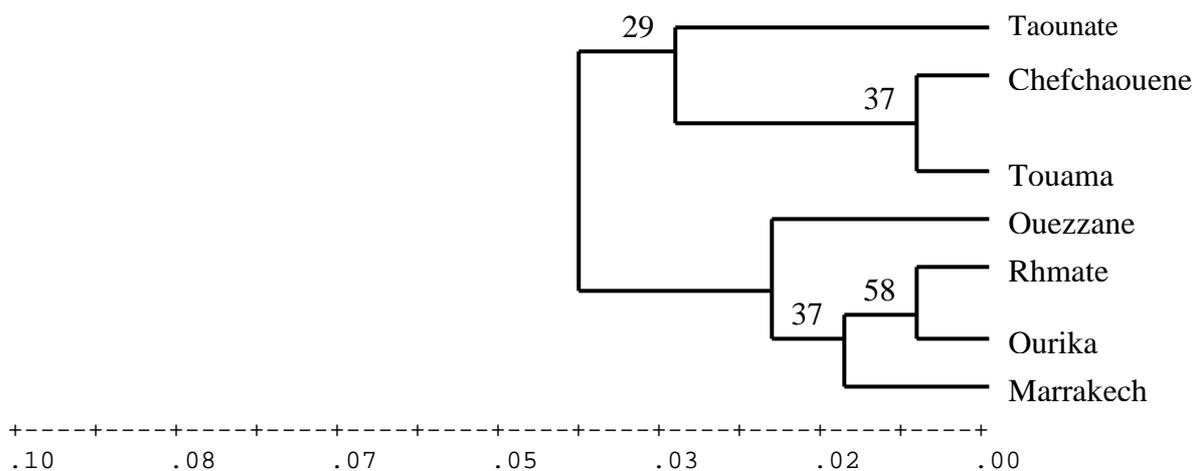


Figure 21. Phénogramme établi à partir de la matrice de distance de Nei. Les nombres correspondent aux valeurs de bootstrap obtenues après 100 répliques.

La population de Touama est plus proche de celles du nord marocain (Fig. 21). L'analyse de l'ADNmt (Cytb) et de l'ADNr (ITS2) de cette population a permis l'identification de trois haplotypes de *P. sergenti* dans cette localité (Baron *et al.*, soumis). L'existence de multiples haplotypes de *P. sergenti* explique en partie le déséquilibre de HW observé pour toutes les populations étudiées notamment pour la 6PGD.

II.4. Commentaires

Au Maroc, *L. tropica* est apparue initialement dans le centre et le sud, à Azilal et Essaouira (Pratlong *et al.*, 1991) sous forme d'anthroponose transmise par *P. sergenti* (Guilvard *et al.*, 1991). Un nouveau foyer de *L. tropica* est décrit en 1995 dans la zone urbaine de Taza (au nord) sans aucune infection naturelle de *P. sergenti* (Hamdani, 2001).

Récemment, un foyer émergent à Chichoua est identifié (Guernaoui *et al.*, 2005a) et des cas de leishmaniose cutanée à *L. tropica* sont décrits à Ourika et Rhmate (Anon, 2003 ; 2004). *P. sergenti* est identifié morphologiquement sur des spécimens originaires de trois foyers marocains à *L. tropica* : Azilal, Essaouira et Taza (Yahia *et al.*, 2004). Trois lignées mitochondriales de *P. sergenti* sont identifiées, ces trois lignées pouvant correspondre à des espèces cryptiques (Yahia *et al.*, 2004).

En tant qu'anthroponose, l'établissement et la propagation de leishmaniose cutanée à *L. tropica* dans la région de Marrakech est relativement plus facile. Les mouvements des patients venant des foyers proches (Chichaoua, Azilal et Essaouira) et l'identification du vecteur sont deux facteurs qui pourraient provoquer une épidémie à Marrakech. Or, la capacité vectorielle de *P. sergenti* (Depaquit *et al.*, 2002) ainsi que le mécanisme de transmission vectorielle (Yahia *et al.*, 2004) peuvent être liés à l'existence de races ou d'espèces cryptiques.

En Iran, l'analyse morphologique et moléculaire (DNAm) des populations de *P. sergenti* a permis de mettre en évidence trois lignées de *P. sergenti* en fonction de la distribution

géographique (Moin-Vaziri *et al.*, 2007). L'étude de la répartition de ces 3 lignées en fonction des foyers de leishmaniose cutanée ne met pas en évidence de capacité vectorielle supérieure d'une des lignées. Au Maroc, *P. sergenti* constituerait un complexe d'espèces émergentes selon Yahia *et al.*, (2007). L'analyse moléculaire des spécimens, le long du transect Azilal-Khenifra-Midelt-Missour-Guercif-Taza, a permis de mettre en évidence une divergence des populations marocaines de *P. sergenti* qui suggère une spéciation entre -2 et -0.6 millions d'années (Yahia *et al.*, 2007).

Nos résultats semblent confirmer l'existence de différentes lignées de *P. sergenti* dans le sud comme dans le nord marocain. Phénomène qui se traduit par le déséquilibre de HW pour la plupart des enzymes testés et par l'absence de robustesse des nœuds du phénogramme.

Le regroupement, dans ce phénogramme, de populations du nord et du sud marocain est peut être expliqué par la co-existence de ces différentes lignées dans tout le Maroc.

Contrairement à *P. papatasi*, *P. sergenti* présente une grande diversité génétique aussi bien sur le plan géographique (Depaquit *et al.*, 2002) que sur le plan régional (Yahia *et al.*, 2004 ; Moin-Vaziri *et al.*, 2007).

III. *PHLEBOTOMUS PERNICIOSUS* ET *P. LONGICUSPIS*

III.1. Morphologie

Les *Larroussius* constituent un sous-genre bien individualisé au sein du genre *Phlebotomus* tant par leur morphologie que par leur rôle épidémiologique.

Les phlébotomes du sous-genre *Larroussius* sont incriminés dans la transmission de *L. infantum*. Ils sont aussi vecteurs d'arbovirus. Dans le groupe des Phlebovirus (Famille des Bunyaviridae), Toscana virus et l'Arbia virus sont isolés chez *P. perniciosus* (Verani *et al.*, 1991 et 1995). Dans le groupe des Vesiculovirus (Famille des Rhabdoviridae), Radi virus, également isolé chez *P. perniciosus* (Comer et Tesh, 1991). L'étude des *Larroussius* est donc essentielle pour optimiser les connaissances de leur rôle pathogène. Les principaux caractères morphologiques qui permettent de définir le sous-genre *Larroussius* sont :

Chez le mâle :

- la présence de cinq longues épines (deux terminales et trois médianes) sur le style.
- un groupe de longues soies sur la face interne du coxite,
- des lobes latéraux non armés,
- des filaments génitaux relativement courts,
- un aedéage long en baguette ou en lame aplatie.

Chez la femelle :

- la structure très caractéristique des spermathèques avec un réservoir annelé et une petite tête arrondie portée par un long cou,
- un pharynx armé de dents punctiformes.

L'inventaire faunistique montre la présence de sept espèces du sous-genre *Larrousius* au Maroc :

1. *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921
2. *P. chadlii* Rioux, Juminer et Gibily 1966
3. *P. langeroni* Nitzulescu, 1930
4. *P. longicuspis* Nitzulescu, 1930
5. *P. mariae* Rioux, Croset, Léger et Bailly-Choumara 1974 (femelle inconnue)
6. *P. perfiliewi* Parrot, 1930
7. *P. perniciosus* Newstead, 1911

Phlebotomus perniciosus est l'espèce la plus étudiée de cette liste mais sa diagnose reste difficile particulièrement dans les régions où elle se trouve en sympatrie avec l'espèce affine *Phlebotomus longicuspis*.

III.2. Répartition géographique

Phlebotomus longicuspis et *P. perniciosus* vivent dans la partie occidentale du bassin méditerranéen. Leur zone de répartition s'étend de la limite nord du Sahara au sud de la péninsule ibérique pour la première, et du Maghreb à la France et la Croatie pour la deuxième. Ces deux espèces vivent donc en sympatrie sur la presque-totalité de la zone de distribution de *Phlebotomus longicuspis*. Cependant en 1991, Morillas Marquez *et al.*, signalent la présence de morphes intermédiaires dans le sud de l'Espagne et posent la question de la validité du taxon *P. longicuspis*. Récemment, Depaquit *et al.*, (2005) identifient pour la première fois des *P. longicuspis* au sud du Sahara (à Ouagadougou).

Au Maroc, Gaud et Laurent (1952) trouvent exceptionnellement *P. perniciosus* dans les alentours de Rabat. Bailly-Choumara *et al.*, (1971) entre 1965 et 1970 capturent *P. perniciosus* dans diverses régions naturelles : plaines et collines Nord-Atlantique (Rabat),

plateau central, plaines moyennes intérieures, Haut-Atlas (Tizi-n-Test), Anti-Atlas (Tafraout) et Maroc oriental. La plupart des stations sont localisées dans le Nord du Maroc et en étage semi-aride. Les trois stations trouvées plus au sud sont en altitude: Itzer (1650m), Tafraout (1050m) et Tizi-n-Test (2100m). *P. perniciosus* a toujours été récolté seul, non associé aux autres espèces et en petit nombre. En 1973 et 1975, Rioux *et al.*, attirent l'attention sur la rareté des captures de *P. perniciosus*. Ce phénomène pourrait expliquer l'absence de leishmaniose viscérale dans ces régions.

Ristorcelli (1939) signale pour la première fois la présence de *P. langeroni* var. *longicuspis* au sud du Maroc dans la localité de Taghjicht. A Rabat, Gaud et Laurent (1952) retrouvent *P. longicuspis* associé à *P. perniciosus*, mais tous les deux en petit nombre. Les travaux de Bailly-Choumara *et al.*, (1971) font état de la présence de *P. longicuspis* qui se répartit dans les différents étages bioclimatiques (humide, semi-aride, aride et saharien) ainsi que dans la totalité des régions géographiques (Rif, plaines et collines nord-atlantiques, plateau central, plaines et plateaux moyen-atlantiques, plaines moyennes intérieures, Moyen-Atlas, Haut-Atlas, Anti-Atlas, Maroc oriental, Sud Atlantique et sud intérieur), lors de ces captures, *P. longicuspis* n'est jamais signalé comme associé à *P. perniciosus*.

Ces deux espèces ont des préférences bioclimatiques bien définies. Rioux *et al.*, montrent en 1984, une distribution différente selon l'étage climatique. Ainsi *P. perniciosus* se rencontre à l'étage sub-humide et *P. longicuspis* à l'étage sub-humide à semi-aride. De même, l'altitude semble avoir une influence sur leur abondance. Dans une étude sur les phlébotomes de l'Atlas marocain faite en 2006, Guernaoui *et al.*, montrent que *P. longicuspis* vit préférentiellement entre 600 et 800 m d'altitude alors que *P. perniciosus* se trouve majoritairement entre 1000 et 1200 m.

III.3. Le complexe *P. perniciosus* au Maroc

P. perniciosus est une espèce décrite par Newstead en 1911. Il distingue les mâles de manière morphologique, par l'extrémité bifurquée de leur valve copulatrice (avec occasionnellement une petite dent surnuméraire). Parrot démontre en 1936, en comparant des individus de France, d'Algérie et d'Espagne que cette fourche reste très polymorphe. Ces variations morphologiques deviennent à l'origine de nombreuses sous-espèces élevées par la suite au rang d'espèce. C'est le cas de *P. longicuspis* que Nitzulescu décrit en 1930, en considérant les variants morphologiques de *P. perniciosus* tunisiens sur lesquels il travaille comme une nouvelle variété. La fourche chez les mâles de *P. longicuspis* n'existe plus : ils se distinguent par une valve copulatrice qui se termine en pointe unique et longue (Fig.22).

Les femelles quant à elles, n'ont pu être différenciées que dans les années 80 (Léger *et al.*, 1983). L'aspect de la région distale des spermathèques sépare les femelles de *P. perniciosus* de celles de *P. longicuspis* (Fig.23).

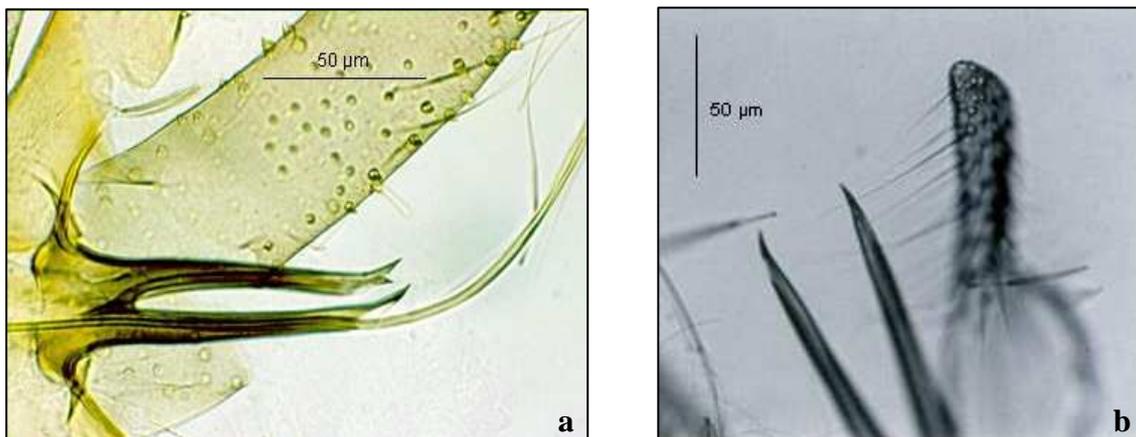


Figure 22 : Valves copulatrices d'un mâle: *P. perniciosus* (a) et *P. longicuspis* (b)

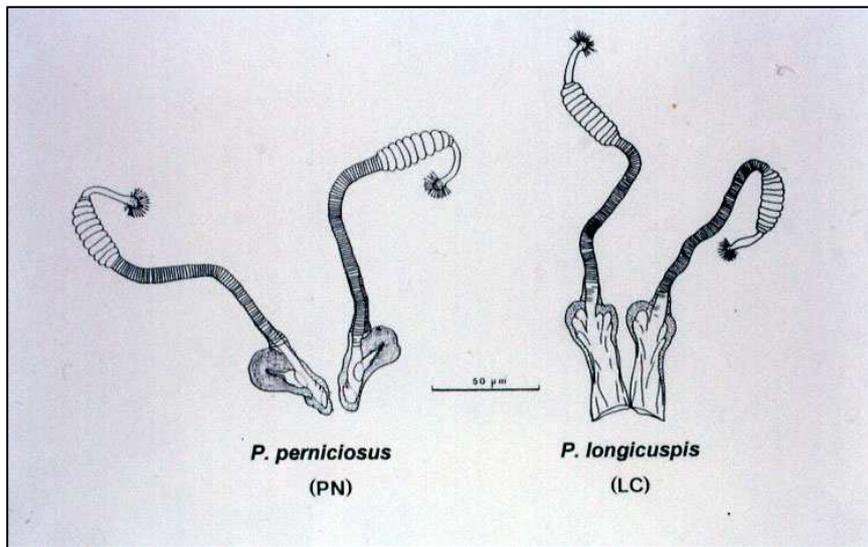


Figure 23 : Schéma des spermathèques de *P. perniciosus* et *P. longicuspis*

En 1991, Morillas-Marquez *et al.*, notent la présence de morphes intermédiaires entre *P. perniciosus* et *P. longicuspis* dans le sud de l'Espagne. En 1999, Benabdennbi *et al.*, montrent qu'il existe dans le Nord du Maroc, des populations où les mâles possèdent des valves à pointe unique qui peuvent être confondues avec celles de *P. longicuspis*. En effet, lors de prélèvements dans la localité de Chefchaouene, Benabdennbi *et al.*, (1999) observent des femelles des deux espèces, alors que seuls des mâles à valves à pointes uniques sont capturés (Fig. 24). Ils tentent donc d'identifier les mâles en dénombrant les soies médianes des coxites et les comparent à d'autres échantillons de *P. perniciosus* et de *P. longicuspis* prélevés autour du bassin méditerranéen (Benabdennbi *et al.*, 1999). Ce caractère avait permis à Rioux *et al.*, de distinguer, en 1975, les mâles *P. ariasi* et *P. chadlii*, et à Léger et Pesson de distinguer en 1987 les mâles *P. neglectus* et *P. syriacus*.

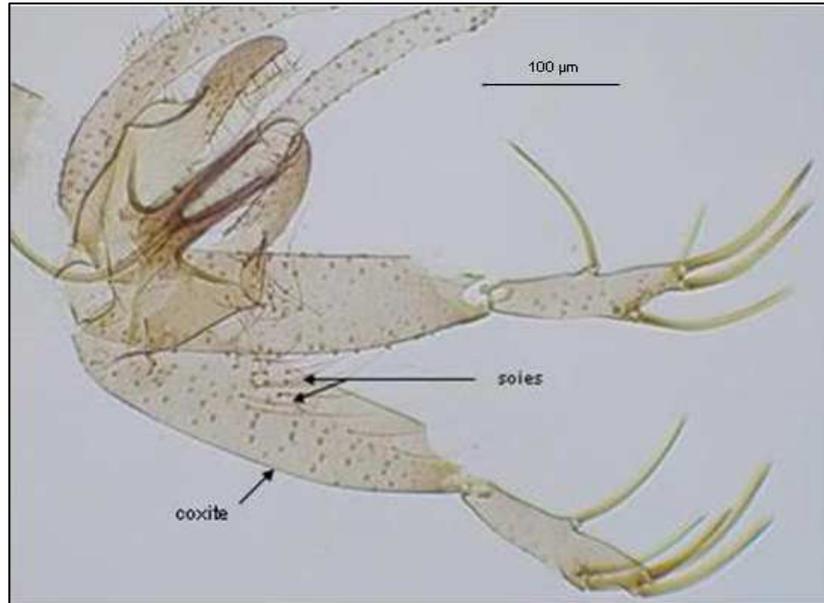


Figure 24: Génitalia d'un *P. perniciosus* mâle

En se basant sur l'analyse qualitative des zymogrammes de MDH, HK, PGM, FUM et GPI, Benabdennbi *et al.*, (1999) concluent que les mâles à pointes uniques courbées pourraient être ceux manquant de la population *P. perniciosus*. Cette analyse révèle des allèles distincts pour les loci de 3 systèmes enzymatiques (HK, PGM, PGI).

En 1999, Benabdennbi *et al.*, isolent aussi, après éclosion de pontes de femelles *P. perniciosus*, des mâles présentant des valves bifurquées mais également des valves à pointe unique et courbée (Fig. 25). Ce résultat confirme que cette nouvelle population de *P. perniciosus* identifiée n'est pas une espèce à part entière, mais un morphotype *perniciosus* caractéristique chez les mâles.

Ainsi, dans la mesure où au Maroc des populations de *P. perniciosus* vivent en sympatrie avec celles de *P. longicuspis* alors que le caractère habituel qui différencie les mâles n'existe plus, il est important de rechercher d'autres caractères diagnostiques.



Figure 25: Valves copulatrices pointues et droites de *P. longicuspis* (a) et pointues et courbées de *P. perniciosus* (b)

Pesson *et al.*, (2004) comparent les individus capturés à Chefchaouene avec ceux venant de populations du Rif et du pourtour méditerranéen. Les individus sont caractérisés par examen morphologique du génitalia, par les méthodes d'isoélectrophorèse enzymatique; et par analyse haplotypique de l'extrémité 3' du gène du cytochrome b de l'ADN mitochondrial (mt). Ce marqueur a été utilisé par Esseghir *et al.*, (1997, 2000) et Esseghir (1998) pour comparer des populations géographiques de plusieurs espèces de *Larrousius* dans la subrégion méditerranéenne, dont *P. perniciosus* et *P. longicuspis*.

Les résultats apportent des explications supplémentaires. Pesson *et al.*, (2004) indiquent qu'il existe trois espèces phylogénétiques dans le rif marocain: l'espèce *P. perniciosus*, caractérisée par un profil d'isoenzyme distinct et par deux lignées d'ADN-mt correspondant pour la première au morphotype des mâles et femelles typiques de *P. perniciosus* (PN), et pour la deuxième à celui dont les mâles peuvent être confondus avec les individus *P. longicuspis* (PNA) (Benabdenni *et al.*, 1999); la lignée des *P. longicuspis sensu stricto* (lignée mtDNA-lcus), incluant les formes typiques de la Tunisie et une espèce cryptique de *P.*

longicuspis (lignée mtDNA-LCx) qui partage, avec la lignée *P. longicuspis sensu stricto*, les mêmes caractères morphologiques diagnostiques connus.

Dans le but de déterminer la limite sud de cette forme atypique de *P. perniciosus* et de l'espèce jumelle de *P. longicuspis*, nous avons associé trois approches : une étude morphologique appuyée par une analyse statistique, une étude isoenzymatique et une analyse de l'ADNmt. Des populations de 29 localités du centre et sud marocain et trois populations du nord marocain ont été analysées. Deux types de piégeage ont été utilisés : les papiers huilés pour l'étude morphologique et les pièges lumineux (CDC) pour l'analyse moléculaire.

L'examen morphologique des mâles montre une large distribution de la forme atypique de *P. perniciosus* (PNA) dans le sud marocain. 99,99% des *P. perniciosus* du sud marocain présentent un génitalia atypique. L'analyse enzymatique nous a permis d'identifier, en plus de l'hexokinase, un nouveau marqueur enzymatique: l'aconitase. Il permet de distinguer les deux espèces *P. perniciosus* et *P. longicuspis sensu lato*. L'allèle 01 de cette enzyme caractérise les populations de *P. perniciosus* (forme typique et atypique) alors que l'allèle 04 caractérise les populations de *P. longicuspis s.l.*

L'allèle 05 de la PGM est un marqueur non fixé de l'espèce jumelle de *P. longicuspis* LCx (Pesson *et al.*, 2004). Nous avons trouvé cet allèle dans le sud marocain. L'étude de l'ADNmt confirme la présence de l'espèce jumelle (LCx) de *P. longicuspis* dans le sud marocain. L'association de l'examen morphologique et l'analyse moléculaire confirme la valeur diagnostique des soies du coxite. Nous avons retrouvé chez un individu mâle l'haplotype LCx dans le sud marocain associé à l'allèle 05 de la PGM et portant 21 soies sur le coxite.

Morphological and isoenzymatic differentiation of *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus longicuspis* (Diptera: Psychodidae) in Southern Morocco

S. Boussaaa, A. Boumezzougha, P.E. Remy, N. Glasser, B. Pesson

Acta Tropica, 2008, Vol.106, n° 3, Pages 184–189

Pages 145-160 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.03.011>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

III.4. Analyse de l'ADN mitochondrial chez les populations de *P. perniciosus* et *P. longicuspis* du sud marocain

En parallèle de l'étude enzymatique, une analyse de l'ADN mitochondrial (cytochrome b) est effectuée sur les mêmes spécimens de Rhmate et Ourika.

Le phlébotome, mâle ou femelle, est disséqué : le génitalia pour l'identification morphologique, la tête et le thorax pour l'étude isoenzymatique et l'abdomen pour le séquençage moléculaire. Les résultats sont présentés dans le Tableau 15.

Tableau 15. Séquences du Cytb chez les populations de *P. perniciosus* et *P. longicuspis* du sud marocain.

	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2	RHMATE	OURIKA
	1 2 4 5 5 5 7 7 7 7 0 0 2 3 4 4 6 6 6 7 8 8 0 4 5 5		
	6 9 5 7 9 1 4 8 2 3 5 8 5 7 3 3 5 7 2 5 8 1 1 3 1 6 2 8	Sidi Bouyahya	Ait Belabass Amkhlij
lcus03 LC	CAATCACCCATTTTTGGTTACTGCATCA		* *
lcus04 LC	CGATCATCCATTTTTGGCTACTGCGTCA		*
lcus05 LC	CAATCACCCATTTGTGGTTACTGCATCA		*
LCx12 LC	TAACCATCTGTTATCGACCACAGTATTA		*
pern06 PNA	TAAATATTTATCTTTGACTGTCGCATTG	*	

Les résultats montrent la présence d'un seul haplotype de *P. perniciosus* dans le sud marocain (pern 06). C'est un haplotype caractéristique de la forme atypique (PNA). Ce même haplotype est trouvé au Nord du Maroc par Pesson *et al.*, (2004).

Pour *P. longicuspis*, différents haplotypes ont été identifiés: lcus03, lcus04 et lcus05. Un nouvel haplotype LCx12 correspondant à l'espèce jumelle de *P. longicuspis* est trouvé à Ourika (Tableau 15).

La Figure 26 présente l'arbre phylogénétique des haplotypes du Cytb des espèces du complexe *perniciosus* du sud marocain comparés avec d'autres populations du Rif. Les 11 haplotypes de LCx ont été identifiés au Nord Marocain (Pesson *et al.*, 2004).

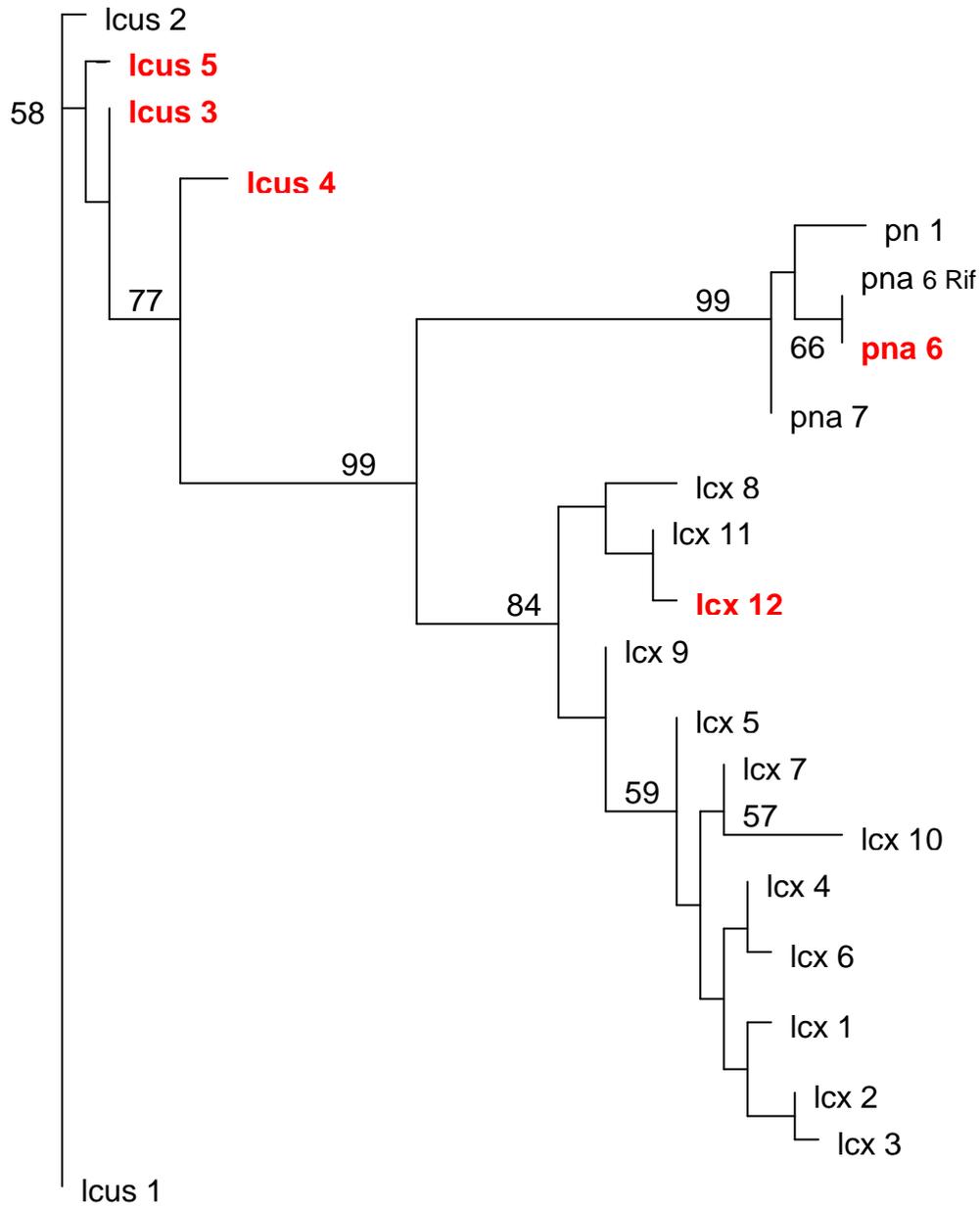


Figure 26. Arbre phylogénétique des haplotypes du Cytb des espèces du complexe *perniciosus* du sud marocain (en rouge) comparés avec d'autres populations du Rif.

L'association des analyses morphologique et moléculaires (isoenzyme + ADNmt) montre que le nombre de soies du coxite chez le seul spécimen LCx12 de Ourika est de 21. Ce spécimen est aussi le seul qui présente l'allèle 05 de la PGM dans le sud marocain. Ces éléments nous renseignent sur la valeur diagnostique de l'enzyme PGM ainsi que sur celle du nombre de soies du coxite chez les espèces du complexe de *perniciosus* au Maroc.

Concernant les femelles, nous n'avons observé aucune variation morphologique ou aspect intermédiaire pour distinguer les femelles *P. longicuspis s.s* et LCx.

Nous notons aussi la présence d'une séquence mixte, composée de lcus04 et pern06, chez un mâle de Rhmate. Ce cas peut être expliqué par le phénomène d'introgession. Pesson *et al.*, (2004) ont discuté la présence d'hybrides de *P. perniciosus* et de *P. longicuspis* dans le nord marocain.

A la lumière des résultats concernant le complexe *perniciosus* dans le nord (Benabdennbi et Pesson, 1998 ; Benabdennbi *et al.*, 1999 et Pesson *et al.*, 2004) et de ceux du présent travail dans le sud marocain, nous proposons des modifications dans la clé d'identification des phlébotomes du Maroc établie par le Ministère de la Santé (Anon., 1997). Ces modifications ne concernent que les espèces *P. perniciosus*, *P. longicuspis s.l* et consistent à ajouter des critères morphologiques qui permettent de mieux identifier et distinguer entre ces deux espèces au Maroc. A l'occasion, nous proposons d'élever LCx au rang d'espèce et décrire une nouvelle espèce du sous-genre *Larroussius* au Maroc.

CLE D'IDENTIFICATION DES PHLEBOTOMES DU MAROC

(Ministère de la Santé Publique, 1997 ; **modifié dans le présent travail**)

DETERMINATION DU GENRE

- Cibarium inerme, soies des tergites abdominaux II à VI dressées ; chez le mâle, style porteur de 4 ou 5 épines insérées à des niveaux différents.....*Phlebotomus*
- Cibarium armé, soies des tergites abdominaux II à VI couchées ; chez le mâle, style porteur de 4 épines terminales.....*Sergentomyia*

DETERMINATION DES ESPECES DU GENRE *PHLEBOTOMUS* MALES

- 1- Style à 4 épines.....2
- Style à 5 épines.....5
- 2- Apex du pénis effilée en forme de dogue.....*P. chabaudi*
- Apex mousse en forme de bec de corbin.....3
- 3- Tubercule de la base des coxites aussi long que large, pourvu de soies (~25)... *P. alexandri*
- Tubercule aussi long que large, digitiforme et à soies peu nombreuses (~15)4
- 4- Style enflé, au plus de trois fois plus long que large.....*P. sergenti*
- Style élancé, plus de trois fois plus long que large..... *P. kazeruni*
- 5- Paramère trifide à appendice supérieur arciforme abondamment pourvu de soies, un petit tubercule porteur de soies à la base du coxite.....6
- Paramère simple, pas de tubercule sur le coxite.....7
- 6- Style élancé, 10 à 14 fois plus long que large, face interne du coxite pourvue dans sa partie supérieure d'un placard ayant en moyen 11 soies (7 à 14).....*P. papatasi*
- Style seulement 6 à 8 plus long que large, face interne du coxite pourvue d'un placard de 5 soies.....*P. bergeroti*

7- Valves bifurquées ou valves à pointe unique et courbée, nombre de soie sur la coxite est inférieur ou égal à 18	<i>P. perniciosus</i>
- Valves à point unique non courbée	8
8- Extrémité du pénis denticulée sur son bord supérieur.....	<i>P. perfiliewi</i>
- Extrémité du pénis dépourvue de denticulations.....	9
9- Pénis effilé.....	10
- Pénis à extrémité mousse.....	11
10- Extrémité du pénis régulièrement rétrécie avec un nombre de soie sur la coxite supérieur ou égal 22.....	<i>P. longicuspis sensu stricto</i>
- Extrémité du pénis régulièrement rétrécie avec un nombre de soie sur la coxite entre 19 et 21.....	Espèce cryptique de <i>P. longicuspis LCx</i>
- Extrémité du pénis biseautée.....	<i>P. langeroni</i>
11- Coxite pourvu d'une plage interne de 60 à 80 soies.....	<i>P. chadlii</i>
- Coxite pourvu d'une plage interne de 20 à 40 soies.....	12
12- Pénis en battant de cloche.....	<i>P. ariasi</i>
- Pénis en baguette de tambour.....	<i>P. mariae</i>

DETERMINATION DES ESPECES DU GENRE *PHLEBOTOMUS* FEMELLES

1- Tête de la spermathèque sessile.....	2
- Tête pédonculée.....	7
2- Réservoir ne comportant que 2 segments.....	<i>P. kazeruni</i>
- Réservoir ayant plus de trois segments.....	3
3- Dernier segment de la spermathèque en forme d'entonnoir, relié au précédent par un pédoncule long et grêle.....	<i>P. chabaudi</i>
- Dernier segment largement accolé au précédent.....	4

- 4- Ecailles de l'armature pharyngienne formant des cellules à paroi épaisse, les antérieures généralement fermées et s'ordonnant en réseau transversal.....***P. alexandri***
- Ecailles de l'armature pharyngienne formant des cellules à paroi mince, les antérieures allongées d'avant en arrière et généralement ouvertes.....5
- 5- Ecailles postero-médianes du pharynx denticulées.....***P. papatasi***
- Toutes les écailles pharyngiennes dépourvues de denticulations.....6
- 6- Ecailles pharyngiennes arrondies régulièrement réparties, dernier segment de la spermathèque réduit à une collerette latérale, tête large et subsphérique..... ***P. bergeroti***
- Ecaille pharyngienne polymorphes très irrégulièrement réparties, dernière segment de la spermathèque globuleux, tête étroite et subovale.....***P. sergenti***
- 7- Conduit de la spermathèque présentant une dilatation progressive à son extrémité distale..8
- Conduite de calibre uniforme, une ampoule terminale ou latérale à son extrémité distale.... 9
- 8- Conduit dilaté sur la moitié de sa longueur, col relativement court et épais par rapport au réservoir (moitié), tête de la spermathèque peu différenciée.....***P. ariasi***
- Conduit dilaté sur le 1/3 de sa longueur, col long et mince par rapport au réservoir (2/3), tête de la spermathèque bien différenciée.....***P. langeroni***
- 9- Un caecum à paroi très épaisse et à lumière droite, en dérivation à la base du conduit de la spermathèque, limite antérieure de l'armature pharyngienne imprécis.....***P. perniciosus***
- Une dilatation irrégulière ou un caecum différent à la base du conduit, limite antérieure de l'armature pharyngienne nette, sub-rectiligne.....10
- 10- Conduit de la spermathèque se terminant dans une poche asymétrique, aux parois fripées (ceci n'est pas bien visible que sur un exemplaire disséqué).....***P. perfiliewi***
- Un caecum latéral bilobé, s'abouchant largement à la base du conduit (même remarque).....***P. longicuspis***

PARTIE II

PHLEBOTOMES DU GENRE *SERGENTOMYIA*

DE LA REGION DE MARRAKECH

I. INTRODUCTION & OBJECTIFS

Les phlébotomes du genre *Sergentomyia* sont connus depuis longtemps comme se nourrissant généralement sur les reptiles. Ils sont impliqués dans la transmission de *Sauroleishmania*, Trypanosomatidés de reptiles dans l'Ancien Monde. Ils ne présentent donc pas de risque épidémiologique pour l'Homme (Lane, 1993) bien que certaines espèces puissent se nourrir sur l'Homme (Hoogstraal *et al.*, 1962). Plusieurs virus ont été isolés des phlébotomes du genre *Sergentomyia* comme le virus Saboya (Ba *et al.*, 1999) et les virus ArD 95737 et ArD 111740 (Charrel *et al.*, 2006). Récemment, l'isolement de l'ARN de virus humains chez les espèces du genre *Sergentomyia*, a permis de soupçonner leur rôle vecteur (Geevarchese *et al.*, 2005 ; Charrel *et al.*, 2006).

De nombreuses espèces et sous-espèces de *Sergentomyia* ont été décrites. Leur statut comme leur regroupement en sous-genres et groupes demeurent source de controverse (Benabdenni *et al.*, 1996).

D'après le ministère de la santé du Maroc (Anon., 1997), neuf espèces du genre *Sergentomyia* sont identifiées au Maroc (voir clé d'identification des *Sergentomyia* du Maroc). Malgré cette richesse spécifique, seules des études morphologiques ont été menées sur les espèces de ce genre au Maroc et aucune caractérisation moléculaire n'est rapportée.

L'étude des espèces du genre *Sergentomyia* de Marrakech a pour objectifs :

- d'établir l'inventaire des espèces et de comparer leurs répartitions entre le milieu urbain et rural.

- de souligner les différences morphologiques et proposer une clé d'identification locale.
- de caractériser ces espèces en cherchant d'éventuels marqueurs enzymatiques.
- d'étudier différentes populations de *Sergentomyia minuta*, l'espèce la plus abondante du genre *Sergentomyia* afin d'apporter de nouveaux éléments à la comparaison de ses deux sous espèces.

CLE D'IDENTIFICATION DES PHLEBOTOMES DU MAROC (suite)**G/Sergentomyia****DETERMINATION DES ESPECES DU GENRE *SERGENTOMYIA* MALES**

- 1- Pompe génitale dépourvue de pavillon.....*S. lewisi*
 - Pompe génitale pourvue de pavillon.....2
- 2- Pénis à extrémité mousse.....3
 - Pénis à extrémité acérée.....7
- 3- Style 5 à 7 fois plus long que large..... *S. fallax*
 - Style 3 à 4 fois plus long que large4
- 4- Extrémité du pénis pourvue d'un renflement déjeté dorsalement.....5
 - Extrémité du pénis pourvue d'une telle protubérance..... 6
- 5- Pénis 8 à 9 fois plus long que large.....*S. antennata*
 - Pénis 4 à 6 fois plus long que large*S. schwetzi*
- 6- Soie non caduque insérée au voisinage immédiat de l'apex du style, fémur antérieur armé d'épine.....*S. dreyfussi*
 - Soie non caduque insérée à l'union du tiers moyen et du tiers distal, fémur antérieur dépourvu d'épines.....*S. minuta*
- 7- Longueur de la partie libre du pénis plus grande (1,5 à 2,5 fois) que celle de sa base d'insertion (racine supérieure).....*S. africana*
 - Longueur de la partie libre du pénis égale à celle de sa base d'insertion8
- 8- Longueur des filaments génitaux égale à 3 fois la longueur du coxite, 10 à 12 dents cibariales principales.....*S. clydei*
 - Longueur des filaments inférieur ou égale à 2 fois la longueur du coxite, 2 à 5 dents cibariales principales.....*S. christophersi*

DETERMINATION DES ESPECES DU GENRE *SERGENTOMYIA* FEMELLES

- 1- Spermathèque tubulaire, sans conduit ni réservoir différenciés.....2
 - Spermathèque avec conduit et réservoir différenciés.....5
- 2- Dents cibariales au nombre de 60 à 85, formant une palissade rectiligne.....*S. minuta*
 - Dents cibariales entre 13 et 20, disposées sur une ligne courbe et formant un feston.....3
- 3- Armature pharyngienne peu différenciée, située dans la partie postérieure rétrécie du pharynx et formée d'écaillés finement denticulées..... *S. schwetzi*
 - Armature pharyngienne puissante, située dans la partie postérieure renflée du pharynx et formée d'épines plus au moins puissantes4
- 4- Armature pharyngienne cordiforme, comportant deux types d'épines, les antérieures longues et acérées, les postérieures ponctiformes, tache cibariale ovale, sans prolongement antérieur.....*S. fallax*
 - Armature pharyngienne discrètement échancrée, comportant un seul type d'épine, longues et acérées, tache cibariale pourvue d'un prolongement antérieur.....*S. antennata*
- 5- Réservoir de la spermathèque annelé, armature cibariale constituée de deux types de dents, grandes et petites6
 - Réservoir non annelé, dents cibariales d'un seul type.....7
- 6- Grandes dents cibariales (12-13) jointes, tache cibariale avec un prolongement antérieur..... *S. clydei*
 - Grandes dents cibariales (4-5) indépendantes, tache cibariale ovale, sans prolongement.....*S. christophersi*
- 7- Réservoir de la spermathèque orné d'une bande équatoriale constituée de ponctuations, fémur antérieur armé d'épines.....*S. dreyfussi*
 - Réservoir dépourvu d'une bande équatoriale, fémur antérieur inerme..... 8
- 8- Réservoir de la spermathèque de forme ovale allongée, dents cibariales (40-50) insérées sur une ligne concave.....*S. africana*
 - Réservoir sub-sphérique, dents cibariales (15-20) implantées sur une ligne droite.....*S. lewisi*

II. LE GENRE *SERGENTOMYIA* A MARRAKECH

II.1. Critères morphologiques d'identifications

Le genre *Sergentomyia* regroupe jusqu'à 12 sous-genres (Artemiev, 1991). La diagnose de ce genre repose sur les critères morphologiques suivants :

- soies des segments 2-6 abdominaux inclinées.
- ascoïdes des segments antennaires pairs chez les femelles et simples chez les mâles.
- présence d'un cibarium armé et d'une plage pigmentée.
- appareil génital mâle formé d'un style portant quatre épines terminales et une courte soie ventrale. Les lobes latéraux inermes.
- appareil génital femelle interne composé de deux spermathèques non segmentées (sauf chez le sous genre *Sintonius*) dont les conduits sont partiellement réunis.

II.2. Inventaire faunistique

A l'aide des pièges adhésifs, nous avons collecté 137 spécimens du genre *Sergentomyia* dans la ville de Marrakech (31°36'N, 8°02'W; 471 m) et dans des villages de la région: Souihla (31°40'N, 8°11'W; 383 m), Rhmate (31°25'N, 7°52'W; 759 m) et Ourika(31°22'19N; 7°51'31W, 846 m).

En se basant sur les critères morphologiques, nous avons identifié quatre espèces appartenant à trois sous-genres : *Parrotomyia* (43.1 %), *Sergentomyia* (36.5 %) et *Grassomyia* (20.4 %). *Sergentomyia (Parrotomyia) africana* Newstead (43.1 %) est l'espèce la plus abondante, suivie par *S. (Grassomyia) dreyfussi* Parrot (20.4 %), *S. (Sergentomyia) fallax* Parrot (19.7 %) et *S. (S.) minuta* Rondani (16.8 %) (Tableau 16). Abonnenc et Léger (1976) ont proposé d'élever au rang générique les *Grassomyia* mais la classification des phlébotomes établie par Rispaill et Léger (1998b) considère les *Grassomyia* comme un sous-genre du genre *Sergentomyia*.

En utilisant le même type de piégeage (papier huilé), le sex-ratio est en faveur des mâles pour *S. africana* et *S. minuta* et il est en faveur des femelles pour les espèces *S. dreyfussi* et *S. fallax*. Aucune anomalie morphologique n'est détectée chez les quatre espèces.

Tableau 16. Inventaire des quatre espèces du genre *Sergentomyia* collectées.

	<i>S. africana</i>		<i>S. dreyfussi</i>		<i>S. fallax</i>		<i>S. minuta</i>	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Marrakech						1	2	
Souihla	45	14	2	6	5		4	6
Rhmate			6	13	1	8	2	3
Ourika				1	2	10	4	2
Total	45	14	8	20	8	19	12	11
%	43.1		20.4		19.7		16.8	

Il faut noter une différence dans la répartition de ces espèces en fonction des habitats. La richesse spécifique est plus importante en milieu rural dans les villages: Souihla, Rhmate et Ourika, tandis que seules les espèces *S. fallax* et *S. minuta* sont collectées en milieu urbain (la ville de Marrakech) et avec une faible densité. *S. africana* est collecté seulement à Souihla avec un effectif élevé et associé avec les autres espèces du genre *Sergentomyia*.

On se basant sur les critères morphologiques, nous proposons une clé d'identification simplifiée pour les *Sergentomyia* de la région de Marrakech :

Pour les mâles :

1. Style long, soie non caduque grêle, courte, insérée tout près des épines apicales. Valves péniennes digitiformes et légèrement renflées vers l'extrémité distale (Fig. 27a).....*S. fallax*
2. Style court et trapu.....3

3. Soie non caduque insérée tout près des épines sub-terminales. Valves péniennes régulièrement effilées à l'apex (Fig. 27b).....*S. dreyfussi*
4. Soie non caduque loin des épines sub-terminales5
5. Soie non caduque insérée au niveau du tiers apical. Valves péniennes sont épaisses, digitiformes et arrondies à l'apex (Fig. 27c).....*S. minuta*
6. Soie non caduque insérée au niveau du tiers distal (Fig. 27d).....*S. africana*

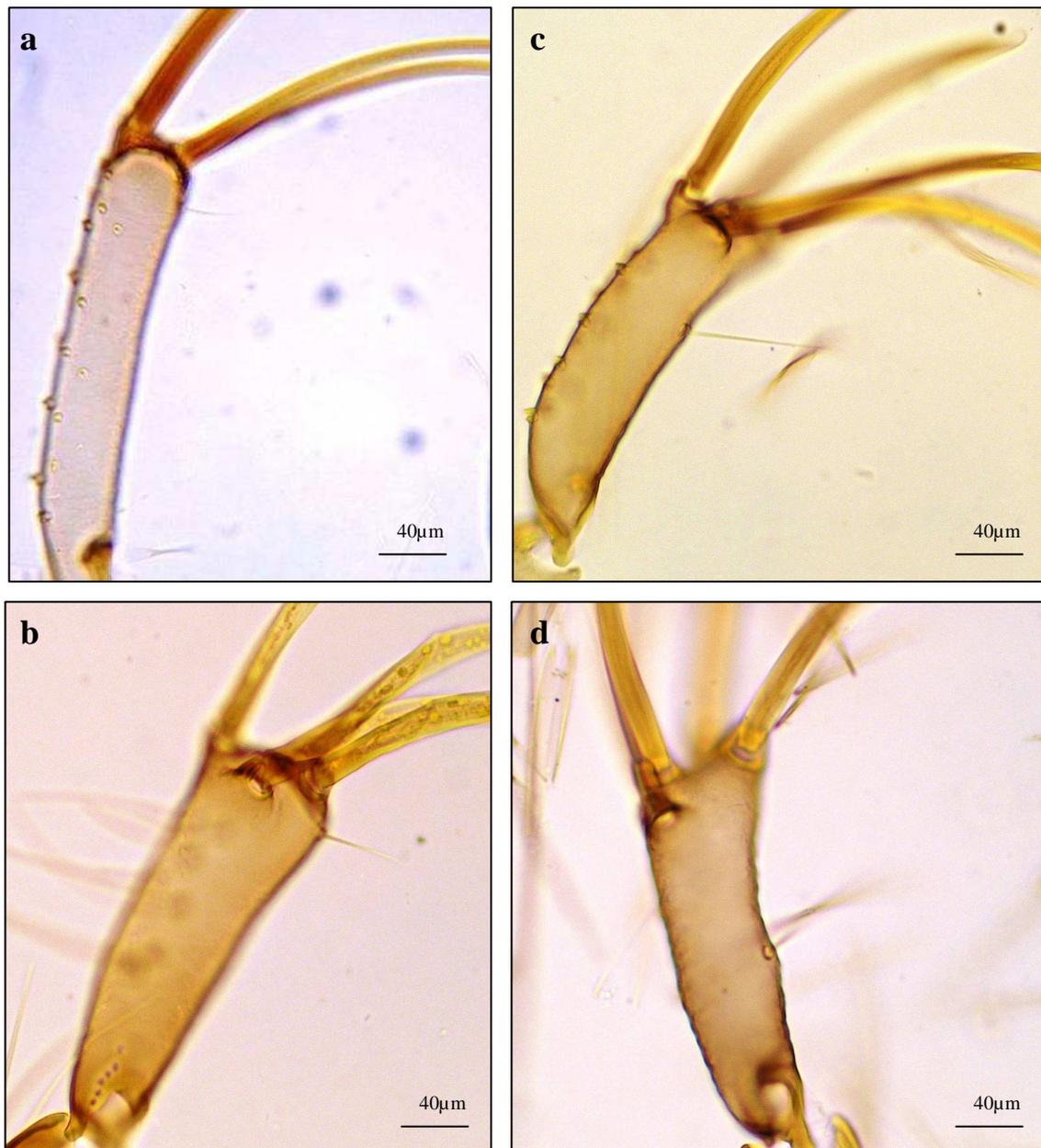


Figure 27. Style avec soie non caduque chez les quatre espèces de *Sergentomyia*
a. *S. fallax*, **b.** *S. dreyfussi*, **c.** *S. minuta* et **d.** *S. africana*

Pour les femelles :

1. Spermathèques avec réservoir capsulaire orné d'un anneau de fins spicules (Fig. 28c).....*S. dreyfussi*
2. Spermathèques sans réservoir capsulaire3
3. Spermathèques en capsule allongée (Fig. 28d)..... *S. africana*
4. Spermathèques tubulaires non différenciés.....5
5. Armature cibariale en rangée transversale, régulière de 70 à 100 dents (Fig. 28a).....*S. minuta*
6. Pharynx cordiforme. Cibarium porte 16 à 18 dents (Fig. 28b)..... *S. fallax*

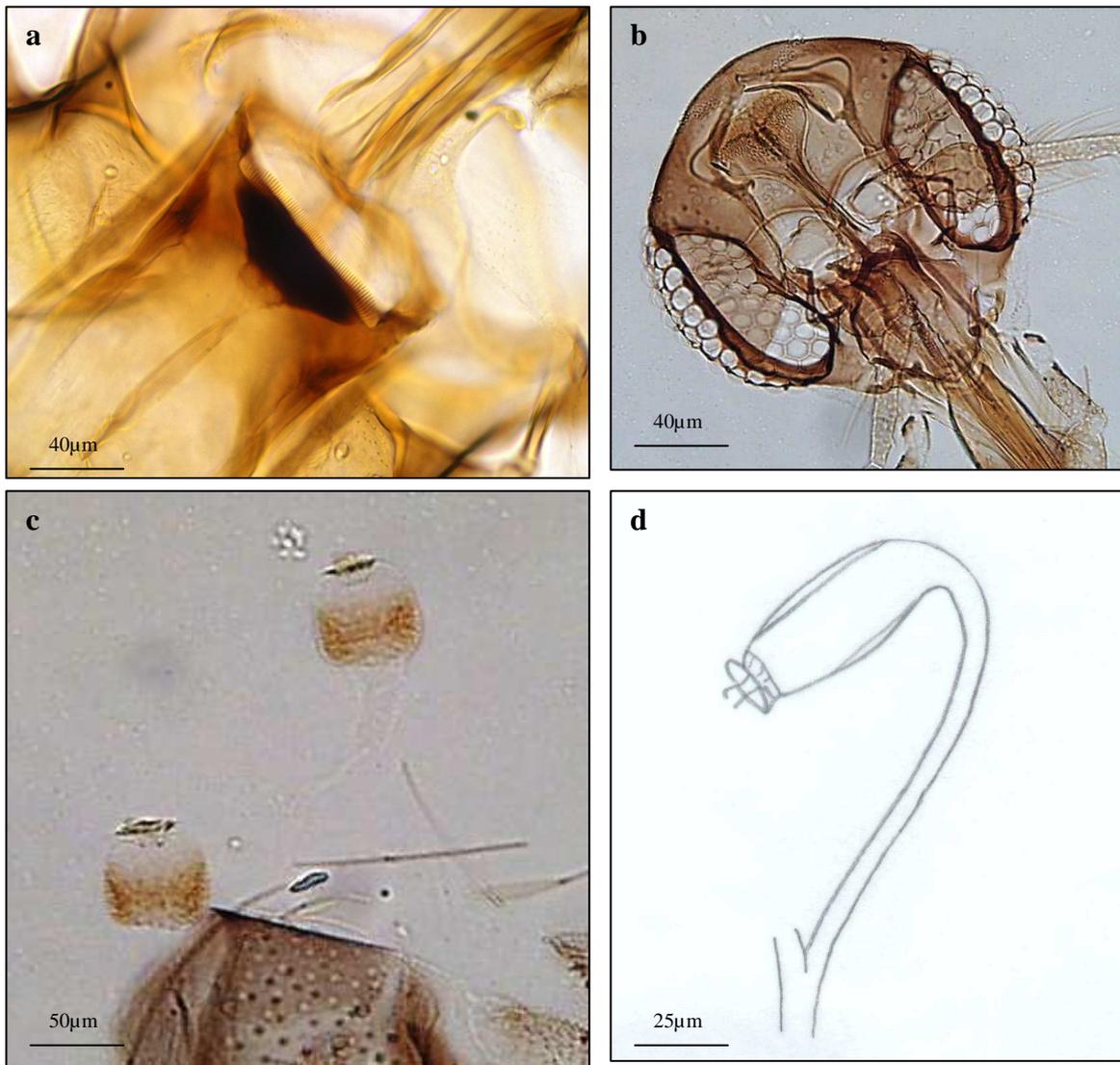


Figure 28. Critères de différenciation des femelles de *Sergentomyia* de Marrakech.

a. Cibarium de *S. minuta* ; b. Pharynx de *S. fallax* ; c. Spermathèques de *S. dreyfussi* ; d. Spermathèques de *S. africana*

II. 3. Analyse isoenzymatique

a. Origine des populations

Les mêmes populations de *Sergentomyia* de Marrakech ont été caractérisées grâce à l'analyse isoenzymatique: Marrakech ville, Souihla, Rhmate et Ourika. A cause du faible effectif, nous avons regroupé les populations de même espèce.

Treize systèmes enzymatiques ont été testés : GPI, PGM, HK, FUM, MDH1, MDH2, ME, 6PGD, α GPDH, ICD1, ICD2, TREH et ACO. Les traitements des données sont faites à l'aide des logiciels BIOSYS-2 (Swofford et Selander, 1981) et GENEPOP (Raymond et Rousset, 1995). L'analyse enzymatique a permis l'identification de huit enzymes polymorphes (HK, PGM, PGI, 6PGD, MDH1, MDH2, FUM et ACO) et cinq monomorphes (ME, α GPDH, ICD1, ICD2 et TR1).

b. Variabilité génétique

Seuls les locus présentant plus d'un seul allèle sont étudiés. Les fréquences alléliques et le nombre d'individus analysés par locus sont présentés dans le Tableau 17. Le polymorphisme observé pour chaque espèce est relativement élevé (plus de 70% de locus polymorphe par espèce) (Tableau 18).

Tableau 17. Fréquences alléliques des *Sergentomyia* de Marrakech avec la taille des échantillons (N).

	<i>S. minuta</i>	<i>S. fallax</i>	<i>S. africana</i>	<i>S. dreyfussi</i>
PGI	21	10	22	8
2	.024	.000	.000	.875
3	.000	.000	.795	.063
4	.643	.500	.023	.063
5	.048	.000	.159	.000
6	.190	.500	.000	.000
9	.095	.000	.023	.000
PGM	13	6	26	10
1	.077	.667	.058	.000

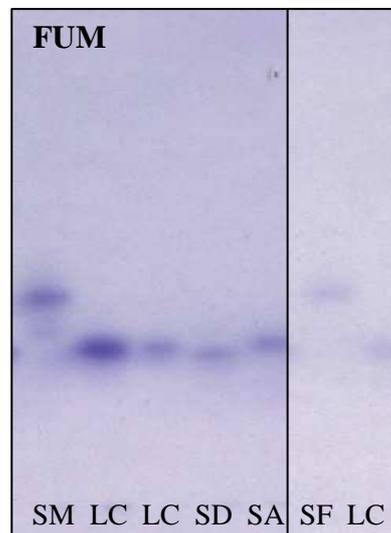
2	.538	.000	.096	.000
3	.231	.000	.538	.000
4	.115	.333	.019	.000
5	.000	.000	.000	.950
6	.038	.000	.288	.000
7	.000	.000	.000	.050
HK	28	8	29	10
1	.018	.000	.000	.000
2	.804	.000	1.000	.100
3	.125	1.000	.000	.000
4	.054	.000	.000	.000
5	.000	.000	.000	.100
9	.000	.000	.000	.800
FUM	14	3	27	6
1	.821	.667	.000	.000
2	.000	.000	.981	.000
3	.036	.000	.000	.000
4	.000	.000	.019	.000
5	.000	.000	.000	.917
6	.143	.333	.000	.000
7	.000	.000	.000	.000
8	.000	.000	.000	.083
MDH1	16	5	12	1
1	.750	.700	.833	1.000
2	.000	.000	.167	.000
3	.000	.100	.000	.000
4	.250	.200	.000	.000
MDH2	21	6	18	3
1	.929	.583	.000	.000
2	.000	.083	.917	1.000
3	.048	.333	.056	.000
4	.000	.000	.028	.000
5	.024	.000	.000	.000
6PGD	25	6	37	9
1	.900	1.000	.027	.000
2	.020	.000	.000	.611
3	.080	.000	.000	.000
4	.000	.000	.973	.389
ACO	5	4	16	4
1	1.000	.000	.063	.000
2	.000	.000	.813	.250
3	.000	.000	.000	.000
4	.000	.750	.125	.250
5	.000	.000	.000	.500
6	.000	.250	.000	.000

Tableau 18. Estimation de la variabilité génétique des quatre espèces de *Sergentomyia*

Espèce	Taille moyenne de l'échantillon	Nombre moyen d'allèle par locus	% de locus polymorphe	Ho	He
<i>S. minuta</i>	17.9 (2.6)	3.3 (.5)	87.5	.100 (.035)	.323 (.077)
<i>S. fallax</i>	6.0 (.8)	2.0 (.3)	75.0	.046 (.030)	.384 (.085)
<i>S. africana</i>	23.4 (2.8)	2.8 (.5)	87.5	.078 (.044)	.231 (.074)
<i>S. dreyfussi</i>	6.4 (1.2)	2.1 (.3)	75.0	.156 (.056)	.260 (.089)

Quatre marqueurs enzymatiques pour les trois sous-genres ou les quatre espèces ont été identifiés (Tableau 19).

- FUM sépare les trois sous-genres (Fig. 29): les allèles 01 et 06 sont présents chez les *Sergentomyia* (*S. fallax*, *S. minuta*); les allèles 02 et 04 chez le *Parrotomyia* et les allèles 05 et 08 caractérisent le sous-genre *Grassomyia*.

**Figure 29.** Profil enzymatique de la Fumarase.

SM. *S. minuta*, LC. *P. longicuspis*, SD. *S. dreyfussi*, SA. *S. africana*, SF. *S. fallax*

- ACO sépare les deux espèces du sous-genre *Sergentomyia*: l'allèle 01 caractérise *S. minuta* tandis que l'allèle 04 caractérise *S. fallax*.
- Les enzymes PGI et MDH2 présentent des allèles pouvant différencier *S. minuta* et *S. africana* (Fig. 30).

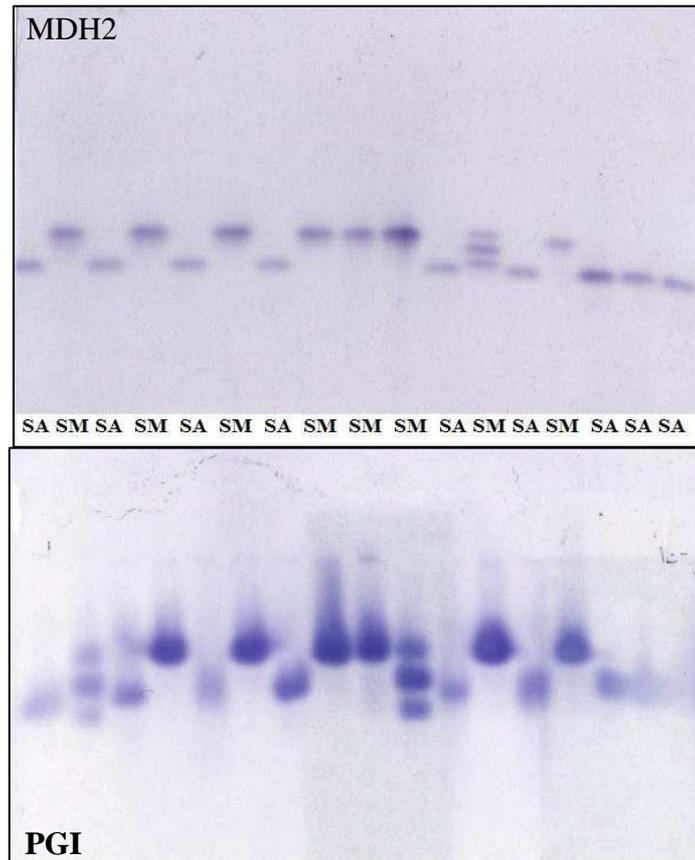


Figure 30. Profil enzymatique de deux systèmes MDH2 et PGI pour les espèces *S. minuta*(SM) et *S. africana* (SA).

Tableau 19. Allèles marqueurs des quatre espèces inventoriées.

Espèce	Les allèles marqueurs			
	FUM	ACO	PGI	MDH2
<i>S. minuta</i>	(01)*, (06)	(01)*	(02), (06)	(01)*, (05)
<i>S. fallax</i>	(01)*, (06)	(04)*		
<i>S. africana</i>	(02)*, (04)		(03)*	(02)*, (04)
<i>S. dreyfussi</i>	(05)*, (08)			

* l'allèle le plus fréquent

c. Equilibre de liaison

Le déséquilibre de liaison a été recherché pour tous les couples d'allèles possibles entre deux locus et pour les quatre espèces. Aucune association entre génotypes n'a été décelée.

Tableau 20. Matrice de distance génétique de Nei (haut) et des index de fixation Fst (bas).

Population	<i>S. minuta</i>	<i>S. fallax</i>	<i>S. africana</i>	<i>S. dreyfussi</i>
<i>S. minuta</i>	*****	0.498	1.213	1.856
<i>S. fallax</i>	0.3666	*****	1.896	1.728
<i>S. africana</i>	0.6520	0.6945	*****	0.894
<i>S. dreyfussi</i>	0.6379	0.6318	0.6924	*****

d. Distance génétique

La distance génétique de Nei et l'index de fixation sont présentés dans le Tableau 20. Le phénogramme (UPGMA) obtenu (Fig. 31) à partir des distances de Nei indique une nette séparation entre les trois sous-genres. La distance génétique qui sépare les espèces du même sous-genre (*S. minuta* et *S. fallax*) est inférieure à 0.6. Les quatre espèces se séparent sur une distance génétique inférieure à 1.6. Les valeurs de bootstrap obtenues après 100 répliques, montrent la robustesse de l'arbre obtenu (la valeur de bootstrap est supérieure à 80%).

III. *SERGENTOMYIA (SERGENTOMYIA) MINUTA* RONDANI, 1843

III.1. Critères morphologiques d'identification

Les spécimens de *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta* Rondani, 1843, du nord et du sud marocain se caractérisent par :

Chez le mâle, le style (Fig. 27c) est court, trapu et porte quatre épines terminales groupées et une soie non caduque insérée au niveau du tiers apical. Les valves pénienues sont épaisses, digitiformes et arrondies à l'apex.



Figure 32. Spermathèques de la femelle de *S. minuta*

Chez la femelle, les spermathèques (Fig. 32) sont lisses et sans réservoir différencié. Le pharynx (Fig. 33) porte de très fins denticules acérés. L'armature cibariale (Fig. 28c) est très développée. Elle est sous forme d'une rangée transversale, régulière de 70 à 90 dents (Tableau 21) quadrangulaires sur lesquelles se surimpose une plaque pigmentée ovulaire à grand axe transversal.

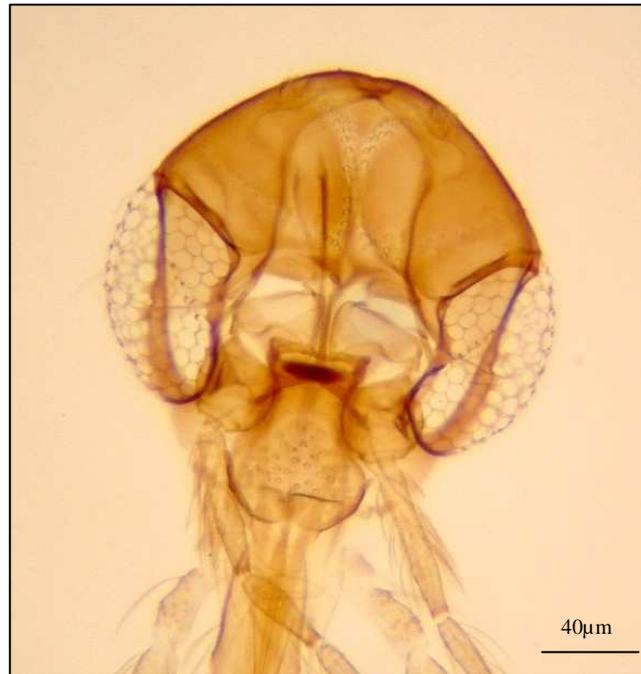


Figure 33. Tête de la femelle de *S. minuta*

Les résultats du Tableau 21 nous ont permis de compléter la carte (Fig. 34) qui donne les valeurs moyennes du nombre de dents cibariales de *S. minuta* relevés autour du bassin méditerranéen (Benabdennbi, 1994). Seules les populations à un effectif supérieure à 5 individus sont considérées. Nous avons trouvé la même valeur moyenne (83) dans le nord (Chefchaouene) comme dans le sud (Marrakech, Souihla) marocain.

Tableau 21. Nombre de dents cibariales enregistré chez des populations marocaines de *S. minuta*

Localité	nbr de femelles examinées	nbr de dents cibariales enregistré
Chefchaouene	7	entre 80 et 85
Marrakech ville	17	entre 75 et 90
Ourika	2	entre 80 et 82
Rhmate	3	entre 79 et 85
Souihla	9	entre 80 et 85

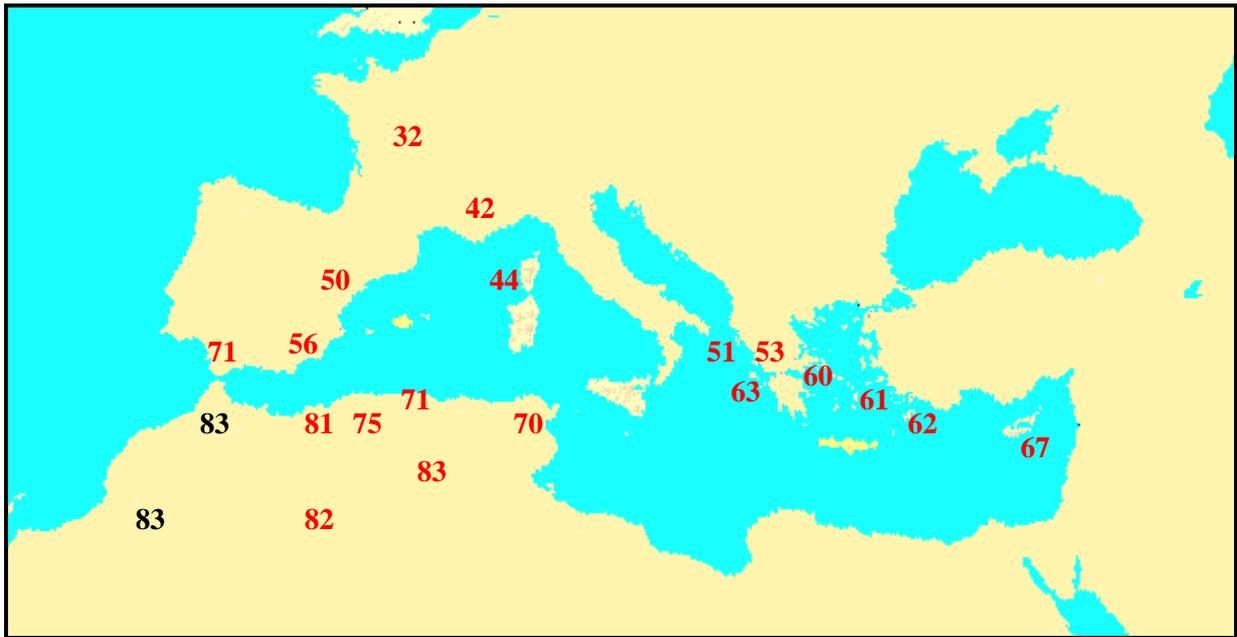


Figure 34. Carte représentant les valeurs moyennes du nombre de dents cibariales de *S. minuta* dans différentes régions du bassin méditerranéen

Il s'agit de *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta parroti* Adler et Theodor, 1927, une sous-espèce nord-africaine de *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta* Rondani, 1843.

Le critère morphologique retenu pour créer cette subdivision est le nombre de dents cibariales des femelles : 40 en moyenne pour *S. m. minuta* à localisation européenne et 70 pour *S. m. parroti* en Afrique du nord (Fig. 34).

Des études systématiques réalisées sur un grand nombre de populations montrent qu'ils s'agit d'une variation continue du caractère qui constituerait un cline nord-sud (Rioux *et al.*, 1975b ; Léger *et al.*, 1979 ; Belezoug *et al.*, 1982 ; Pesson *et al.*, 1984) ce qui remet en cause la séparation des deux sous-espèces.

III.2. Analyse isoenzymatique

a. Origine des populations

Afin de vérifier l'hypothèse de la séparation nord-sud méditerranéenne, nous avons évalué la distance génétique entre nos populations marocaines et des populations européennes. Ainsi, 10 populations ont été testées (Tableau 22).

Tableau 22. Populations de *S. minuta* testées.

Pays	Région	Localité	Code
France	Alpes-Maritimes	banlieu nord de Nice	FBN
France	Alpes-Maritimes	Beaulieu-sur-Mer	FBM
France	Hérault	Roquebrun	FHR
Espagne	Catalogne	Torroja	ECT
Portugal	Alto Douro	Cheires	PAC
Maroc	Nord	Taounate	MNT
Maroc	Nord	Chefchaouene	MNC
Maroc	Sud	Rhmate	MSR
Maroc	Sud	Souihla	MSS
Maroc	Sud	Touama	MST

b. Variabilité génétique

Neuf systèmes enzymatiques (PGI, PGM, HK, FUM, MDH1, ME, 6PGD, ICD1, ICD2) ont été testés sur les dix populations. Les fréquences alléliques et le nombre d'individus analysés par locus sont présentés dans le Tableau 23. Seul le locus ICD1 est monomorphe. Une

estimation de la variabilité génétique des dix populations est présentée dans le Tableau 24. La population de Cheires (PAC) présente le taux de polymorphisme le plus élevé (88.9%).

Tableau 23. Fréquences alléliques, taille des échantillons (N) et test de l'équilibre de Hardy-Weinberg (P) pour les populations de *S. minuta*.

Locus	FBN	FBM	FHR	ECT	PAC	MNT	MNC	MSR	MSS	MST
PGI										
(N)	4	45	28	4	33	28	14	18	7	5
1	1.000	1.000	.946	.750	.909	.446	.000	.028	.000	.000
2	.000	.000	.018	.125	.061	.089	.107	.056	.000	.000
3	.000	.000	.018	.000	.000	.000	.036	.000	.000	.000
4	.000	.000	.018	.000	.015	.214	.786	.583	.571	.800
5	.000	.000	.000	.125	.015	.250	.000	.056	.143	.000
6	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.036	.222	.000	.000
7	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.036	.000	.000	.000
8	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.143	.000
9	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.056	.143	.200
P			1.000	1.000	1.000	.067	1.000	.011	.012	.111
PGM										
(N)	4	53	28	6	30	35	16	10	6	4
1	.000	.321	.000	.250	.317	.114	.156	.100	.000	.000
2	.000	.028	.018	.000	.017	.114	.250	.350	.500	.500
3	.875	.557	.714	.250	.600	.771	.594	.150	.333	.125
4	.125	.094	.196	.333	.067	.000	.000	.100	.083	.000
5	.000	.000	.036	.167	.000	.000	.000	.000	.000	.000
6	.000	.000	.036	.000	.000	.000	.000	.100	.000	.375
7	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.083	.000
8	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.100	.000	.000
9	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.100	.000	.000
P	1.000	.408	.157	1.000	.002	.048	.030	.494	.459	.086
HK										
(N)	4	56	28	6	32	31	18	22	8	6
1	.750	.964	.982	1.000	.969	.710	.000	.091	.000	.167
2	.250	.036	.018	.000	.016	.274	.972	.682	.875	.833
3	.000	.000	.000	.000	.016	.016	.000	.159	.125	.000
4	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.028	.068	.000	.000
P	1.000	1.000	1.000		1.000	.000	1.000	.009	.067	.091
FUM										
(N)	3	29	12	1	32	22	19	10	8	4
1	1.000	.983	1.000	1.000	.984	.955	.895	.900	.625	1.000
2	.000	.000	.000	.000	.000	.045	.000	.100	.000	.000
3	.000	.017	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.063	.000
4	.000	.000	.000	.000	.016	.000	.000	.000	.000	.000

5	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
6	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.053	.000	.313	.000
7	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.053	.000	.000	.000
<i>P</i>		1.000			1.000	1.000	1.000	.053	.210	
MDH1										
(N)	4	62	18	5	21	24	23	16	2	3
1	.625	.597	.556	.700	.619	.938	.957	.813	1.000	.333
2	.375	.403	.444	.300	.381	.063	.000	.000	.000	.000
3	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.043	.000	.000	.000
4	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.188	.000	.667
<i>P</i>	.429	.121	.657	1.000	.382	1.000	1.000	.001		.200
ME										
(N)	4	59	25	1	33	32	9	10	1	1
1	1.000	1.000	1.000	1.000	.985	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
2	.000	.000	.000	.000	.015	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P</i>					1.000					
6PGD										
(N)	4	45	20	7	24	21	28	20	9	7
1	1.000	1.000	.850	1.000	.979	.929	.839	.775	.944	1.000
2	.000	.000	.150	.000	.021	.048	.089	.025	.056	.000
3	.000	.000	.000	.000	.000	.024	.071	.175	.000	.000
4	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.025	.000	.000
<i>P</i>			.030		1.000	1.000	.113	.023	1.000	
ICD2										
(N)	2	52	20	7	34	27	6	1	1	1
1	1.000	.981	1.000	1.000	.985	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
2	.000	.019	.000	.000	.015	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P</i>	1.000	1.000			1.000					
ICD1										
(N)	4	64	16	6	26	29	6	1	2	1
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

c. Equilibre de Hardy-Weinberg (HW)

Le test de l'équilibre de HW est donné dans le Tableau 23 (X^2 test, $P < 0.05$). Certaines populations ne sont pas en équilibre de HW et ce déséquilibre est dû essentiellement à un déficit en hétérozygotes : la population FHR pour 6PGD (Fis = + 0.608) ; PAC pour PGM (Fis = + 0.502) ; MNT pour PGM (Fis = + 0.321) ; MNT pour HK (Fis = + 0.847) ; MNC pour PGM (Fis = +0.666) ; MSR pour PGI (Fis = + 0.630) ; MSR pour HK (Fis = + 0.634) ; MSR pour MDH1 (Fis = + 1.000) ; MSR pour 6PGD (Fis = + 0.456) ; MSS pour PGI (Fis = + 0.533).

Ces déséquilibres sont peut-être dus aux faibles effectifs ou à des particularités génétiques de ces populations.

Tableau 24. Estimation de la variabilité génétique des populations de *S. minuta*

Population	Taille moyenne de l'échantillon	Nombre moyen d'allèle par locus	% de locus polymorphe	Ho	He
FBN	3.7 (.2)	1.3 (.2)	33.3	.111 (.061)	.135 (.072)
FBM	51.7 (3.6)	1.8 (.3)	55.6	.109 (.060)	.134 (.076)
FHR	21.7 (2.0)	2.1 (.5)	55.6	.116 (.056)	.152 (.069)
ECT	4.8 (.8)	1.7 (.4)	33.3	.196 (.099)	.193 (.102)
PAC	29.4 (1.5)	2.4 (.3)	88.9	.114 (.044)	.155 (.070)
MNT	27.7 (1.6)	2.2 (.4)	66.7	.127 (.051)	.206 (.081)
MNC	15.4 (2.5)	2.3 (.4)	66.7	.128 (.047)	.176 (.068)
MSR	12.0 (2.6)	3.1 (.8)	66.7	.123 (.057)	.317 (.101)
MSS	4.9 (1.1)	2.1 (.4)	55.6	.109 (.047)	.247 (.099)
MST	3.6 (.7)	1.6 (.2)	44.4	.028 (.028)	.208 (.089)

Tableau 25. Matrice de distance génétique de Nei (haut) et des index de fixation Fst (bas).

Population	FBN	FBM	FHR	ECT	PAC	MNT	MNC	MSR	MSS	MST
FBN	*****	.019	.013	.050	.019	.045	.233	.230	.261	.302
FBM	.0429	*****	.013	.020	.001	.061	.293	.257	.313	.332
FHR	-.0169	.0599	*****	.031	.012	.060	.297	.268	.322	.341
ECT	.1250	.0552	.0994	*****	.019	.062	.284	.221	.285	.309
PAC	.0174	-.0095	.0436	.0364	*****	.051	.279	.247	.303	.326
MNT	.0827	.2152	.1944	.1548	.1708	*****	.121	.122	.141	.214
MNC	.4867	.5634	.5753	.5196	.5546	.3004	*****	.037	.034	.102
MSR	.3150	.5344	.4891	.3098	.4805	.2487	.0667	*****	.042	.064
MSS	.3992	.6471	.5808	.4344	.5941	.3032	.0578	.0057	*****	.109
MST	.5050	.6728	.6224	.4933	.6208	.3789	.2053	.0275	.0397	*****

d. Equilibre de liaison

Le déséquilibre de liaison a été recherché pour tous les couples d'allèles possibles entre deux locus et pour chaque population. Les locus : PGI-HK ; PGM-HK ; PGI-HK ; PGM-HK et PGM-6PGD sont significativement liés chez les populations de : PAC ($P=0.018$); PAC ($P=0.008$); MNT ($P=0.001$) ; MNT ($P=0.005$) et MNC ($P=0.008$), respectivement.

e. Structuration génétique

La distance génétique de Nei et l'index de fixation sont présentés dans le Tableau 25. Le dendrogramme obtenu (UPGMA) à partir des distances de Nei (Fig. 35) montre une séparation entre les populations de *S. minuta* du nord (France, Espagne, Portugal) et du sud méditerranéen (Maroc). La population de Taounate (nord marocain) est sur la même branche que les populations de l'Europe mais elle sort avec 74 %.

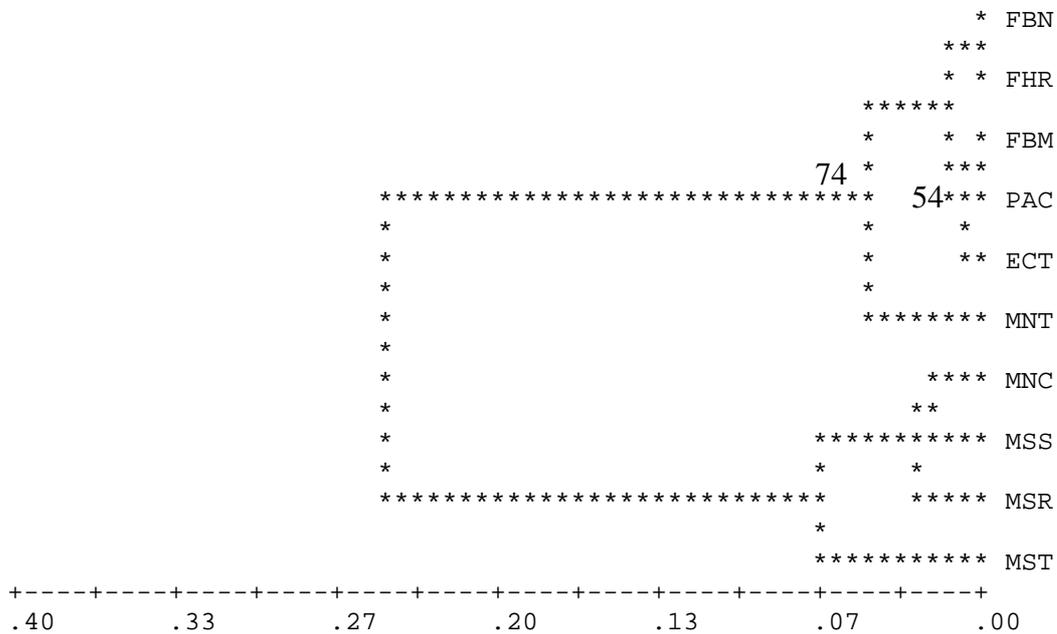


Figure 35. Dendrogramme établi à partir de la matrice de distance de Nei. Les nombres correspondent aux valeurs de bootstrap obtenues après 100 répliques.

III.3. Commentaires

Sergentomyia minuta parroti s'étend sur la bordure méridionale de la région méditerranéenne du Maroc à Chypre. Sa limite sud coïncide avec le Sahara (Abonnenc, 1972). Il est signalé dans les trois pays d'Afrique du Nord (Bailly-Choumara *et al.*, 1971; Crosset *et al.*, 1978; Dedet *et al.*, 1984) et il est considéré ubiquiste au Maroc (Bailly-Choumara *et al.*, 1971).

La comparaison des populations de *S. minuta parroti* du Maroc avec celles de *S. minuta minuta* de l'Europe (Espagne, France et Portugal) montre une séparation des deux groupes (Figure 35).

Les deux locus PGI et HK semblent séparer les populations de *S. minuta minuta* de celles de *S. minuta parroti*. L'allèle 01 de la PGI est majoritaire chez les populations de l'Europe alors que l'allèle 04 domine chez les populations du Maroc. L'allèle 09 du même locus est enregistré seulement dans le sud du Maroc. Mery *et al.* (1983) signalent une distinction entre les mâles et les femelles de *Sergentomyia magna* du Congo au niveau du locus de la PGI. Durant ce travail, nous n'avons observé aucune différenciation sexuelle.

Pour le locus HK, l'allèle 01 est bien représenté chez les populations de l'Europe et remplacé par l'allèle 02 au Maroc. Au sein des deux marqueurs enzymatiques, nous trouvons des allèles en commun, témoin d'interfécondité possible entre les populations de *S. minuta* du nord et du sud méditerranéen.

La morphologie (dents cibariales) est en faveur d'un cline (variation continue du nord au sud) qui est démontré dans l'ouest (Rioux *et al.*, 1975b) que dans l'est du Bassin Méditerranéen (Léger *et al.*, 1979 ; Pesson *et al.*, 1984). Par contre, l'analyse enzymatique n'apporte pas d'élément décisif en faveur de ce cline puisqu'il montre une séparation des populations marocaines à l'exception d'une mais qui est tout de même différente.

Vu sa vaste aire de répartition, *S. minuta* mérite une étude, morphologique et moléculaire, plus approfondie sur un nombre plus important de populations.

SYNTHESE & CONCLUSION GENERALE

Les phlébotomes sont des diptères qui posent un problème de santé humaine et animale. Leur rôle vecteur a été démontré dans les arboviroses et dans les leishmanioses qui sont des affections parasitaires dont la focalisation dépend de la distribution de ces insectes (Killick-Kendrick et Ward, 1981). La réussite d'un programme de lutte contre les leishmanioses nécessite une connaissance préalable et approfondie de ces vecteurs. Dans cette optique, nous avons mené de pair des recherches écologiques et des études moléculaires sur les phlébotomes de la ville de Marrakech et ses marges. Nous avons procédé en deux étapes :

- Etape I : inventaire faunistique des espèces de phlébotomes dans la zone d'étude ; fluctuations saisonnières et répartition spatio-temporelle.
- Etape II : analyse moléculaire : isoenzymatique et ADNmt, sur les populations des espèces inventoriées.

Le choix de Marrakech comme zone d'étude est fondé essentiellement sur sa position carrefour entre le foyer de leishmaniose cutanée zoonotique à *Leishmania major* de Ouarzazate (Rioux *et al.*, 1986a) et les foyers de leishmaniose anthroponotique à *L. tropica* d'Azilal (Pratlong *et al.*, 1991) et de Chichaoua (Guernaoui *et al.*, 2005a).

L'inventaire des phlébotomes de la ville de Marrakech révèle la présence en sympatrie de trois espèces vectrices des trois leishmanies responsables des foyers marocains de leishmanioses : *Phlebotomus papatasi/L. major*, *P. longicuspis/L. infantum* et *P. sergenti/L. tropica*. Ces trois espèces sont ubiquistes au Maroc (Bailly-Choumara *et al.*, 1971 ; Rioux *et al.*, 1984). Au sein du genre *Sergentomyia*, nous avons collecté *S. minuta* et *S. fallax* dans la ville de Marrakech.

L'identification de deux vecteurs prouvés : *P. papatasi* et *P. sergenti* (Killick-Kendrick et Killick-Kendrick, 1999) et d'un vecteur suspecté (*P. longicuspis*) de leishmaniose dans une région entourée des foyers leishmaniens est un signe de situation inquiétante.

Un plan d'action anti-vectoriel efficace se base sur une connaissance préalable du vecteur dans son milieu naturel pour préciser les biotopes et les périodes d'intervention ainsi que les conditions biotique et abiotique qui favorisent la pullulation du vecteur.

L'analyse des fluctuations saisonnières des espèces inventoriées à Marrakech montre deux pics de densité totale des phlébotomes: pic de novembre et pic de mai. *P. papatasi* est l'espèce la plus abondante et active sur toute l'année. Il présente deux pics de densité : pic d'automne (novembre) et pic d'été (juin). Ces résultats permettent de cerner les périodes à risque augmenté de transmission de *L. major* à Marrakech. La connaissance précise de ces périodes peut aider à l'intervention anti-vectorielle dans cette région.

L'augmentation de la transmission des leishmanies est le résultat des modifications de l'environnement et du bouleversement de l'équilibre naturel qui favorisent l'installation de l'insecte vecteur et/ou le réservoir (OMS, 1990). La zone de répartition géographique du phlébotome dépend fortement des conditions de l'environnement avec des mécanismes complexes et intriqués (Rodhain, 2000). Seule une approche intégrée peut permettre de mieux comprendre ces phénomènes et de permettre la prévision des risques.

Au Maroc, plusieurs travaux (Rioux *et al.*, 1984 et 1997; Rispail *et al.*, 2002, Rioux et de La Rocque, 2003) ont souligné le rôle joué par le bioclimat sur la répartition des phlébotomes et le risque leishmanien. Par contre, peu de travaux concernent l'action anthropogène qui influence de façon importante l'abondance et la distribution spatio-temporelle des populations de phlébotomes.

L'urbanisation accélérée et non planifiée constitue un facteur de risque pour les leishmanioses dans le monde (Desjeux, 1999). Elle contribue à la persistance de la maladie et à l'extension des foyers ruraux vers les villes (OMS, 2002). Au Maroc, la leishmaniose cutanée anthroponotique est communément liée au milieu rural. Cette forme de la maladie a

commencé à apparaître dans certains sites périurbains comme le cas de Taza (Guessouss Idrissi *et al.*, 1997) et de Zouagha Moulay Yaagoub (Fès) (Raghaoui *et al.*, 2004).

La dynamique démographique soutenue qu'a connue la région de Marrakech Tensift-Al Haouz est à l'origine d'importants changements dans le domaine de l'habitat et de l'urbanisme qui ont engendré de multiples problèmes de dysfonctionnement et de gestion. Ces problèmes sont matérialisés, entre autres, par la multiplication progressive et les extensions, quelquefois démesurées, des espaces urbains, par l'exode rural vers les principales villes de la région, surtout vers Marrakech, par l'insuffisance des équipements publics et de l'infrastructure de base et par le développement de l'habitat anarchique et insalubre.

L'étude de la répartition de la faune phlébotomienne de Marrakech en fonction des habitats, montre une condensation qualitative et quantitative des phlébotomes dans les douars. Le nombre de douars dans l'agglomération de Marrakech dépasse les centaines. Ils se caractérisent par un habitat à patio sur une trame lâche ou insalubre. Hormis les douars ruraux originels qui ont été intégrés dans l'extension du périmètre urbain, les autres ont été constitués clandestinement de manière anarchique par des occupants à faibles revenus dont la majorité sont issus de l'exode rural. Les mouvements des populations rurales vers les villes constituent un autre facteur de risque important qui favorise l'urbanisation des leishmanioses (OMS, 2002 ; Desjeux, 2004).

Les populations des douars amènent avec elles des animaux domestiques et procèdent même à des élevages de bétail sur place. Dans ces milieux, en plus de la présence humaine et animale, l'environnement offre une richesse en matière organique et un abri. Ces conditions constituent un habitat de choix pour les vecteurs. Les matières organiques telles que la bouse de vache offrent un terrain idéal aux phlébotomes, tant pour la ponte que comme gîtes larvaires (OMS, 2002). Au Maroc, Guernaoui *et al.* (2006c) attirent l'attention sur le rôle de certains types de constructions habitables (en terre ou en béton) sur la répartition des phlébotomes. En effet, les

vecteurs sont abondants seulement dans les quartiers où les constructions sont faites en terre (Guernaoui *et al.*, 2006c).

La diversité de la faune phlébotomienne est plus importante dans les douars et les quartiers pauvres ce qui s'explique par la diversité des gîtes et des hôtes (Hommes et animaux domestiques) disponibles. Même si les problèmes sanitaires sévissent principalement dans les quartiers pauvres et les douars, les quartiers riches ne sont pas totalement à l'abri du risque leishmanien pour autant. Ainsi, nous avons collecté les phlébotomes vecteurs (*P. papatasi*, *P. sergenti* et *P. longicuspis*) dans les quartiers les plus riches de Marrakech (Gueliz et Semlalia). La menace posée par la ruralisation, associée à des mouvements de populations vers les villes ainsi que l'urbanisation anarchique, est de nature publique et nécessite donc une intervention des autorités pour contrôler les risques. L'aménagement et la gestion de l'environnement peuvent être des méthodes de lutte efficaces. L'urbanisation étudiée et contrôlée avec la destruction des habitats des vecteurs et des réservoirs, l'amélioration de la qualité de l'habitat humain, le traitement des déchets et des ordures et la séparation des animaux des habitats humains sont des moyens qui devraient permettre de réduire la densité des phlébotomes et, par conséquent, limiter le risque leishmanien.

L'effet global des changements de l'environnement se manifeste sur la distribution des vecteurs soit par leur disparition suite à la destruction des habitats soit par leur extension géographique et leur abondance suite à la création de conditions plus favorables à la pullulation. Dans notre travail, seul *P. papatasi* persiste et résiste après les phénomènes d'urbanisation à Marrakech. D'ailleurs, ce vecteur s'adapte très bien aux habitats «artificiels» (Kamhawi *et al.*, 1991) et il est plus abondant dans les écosystèmes modifiés (Wasserberg *et al.*, 2003b).

En résumé, nous signalons un haut risque leishmanien à Marrakech à cause de la co-existence des conditions d'un foyer potentiel *Leishmania major* :

- présence de *P. papatasi*, vecteur dont le rôle épidémiologique est bien établi au Maroc (Rioux *et al.*, 1986b) et qui est bien adapté aux conditions climatiques de la région (Croset *et al.*, 1974). Il est actif sur toute l'année et résiste bien aux modifications du milieu.
- omniprésence des rongeurs réservoirs, notamment *Meriones shawi* qui constitue le principal réservoir de *L. major* au Maroc (Rioux *et al.*, 1982).
- proximité de Ouarzazate qui constitue un foyer actif de leishmaniose cutanée à *L. major* (Rioux *et al.*, 1986a) avec des mouvements de populations entre ces deux régions.

L'identification précise des vecteurs de leishmanioses est primordiale pour l'épidémiologie de la maladie. Les espèces vectrices varient d'un foyer à l'autre et leur identification morphologique est souvent difficile. En outre, le rôle joué dans la transmission par chacune d'entre elles n'apparaît pas uniforme dans son aire de répartition. Ceci semble indiquer qu'il existe dans les populations de phlébotomes des variations génétiques conditionnant leur pouvoir vectoriel. La recherche de caractères moléculaires, toujours associée à l'étude morphologique, s'avère utile pour préciser les différences inter- et intraspécifiques et tenter de mettre en évidence d'éventuels marqueurs des populations vectrices.

Le typage enzymatique des populations de *P. papatasi* est réalisé dans le but de déterminer l'origine du repeuplement de Marrakech après les travaux d'aménagements. Les résultats montrent une grande similitude génétique entre les populations urbaine et rurale de *P. papatasi* dans la région de Marrakech. Nous avons comparé aussi les populations marocaines de *P. papatasi* avec d'autres populations naturelles du bassin méditerranéen (Espagne, Chypre et Syrie). L'analyse de la distance génétique entre ces populations montre une nette structuration entre les *P. papatasi* de l'Est et ceux de l'Ouest méditerranéen.

Dans la littérature, aucune structuration génétique n'est signalée entre les populations de *P. papatasi* que ce soit par le typage enzymatique (Kassem *et al.*, 1993 ; Belen *et al.*, 2004) ou par l'analyse de l'ADNmt (Esseghir *et al.*, 1997). Ces résultats peuvent être expliqués par l'utilisation de populations d'élevage dans ces travaux.

En Egypte, un élevage de *P. papatasi* analysé à la 32^{ème} génération présente un taux de polymorphisme élevé, comparable à celui de la population naturelle d'origine, mais à la 34^{ème} génération, ce taux n'est plus que de 23,5 % (Kassem *et al.*, 1990). Mukhopadhyay *et al.* (1997) comparant une population d'élevage de *Lutzomyia longipalpis* maintenue pendant 24 ans, à celle d'origine, constatent une baisse importante du taux de polymorphisme (de 50 à 21%). Ainsi, les populations d'élevage ne sont pas toujours représentatives du patrimoine génétique naturel.

Si le statut épidémiologique de *P. papatasi* est bien défini au Maroc (Rioux *et al.*, 1982 ; 1986a;b), celui de *P. sergenti* se complique de plus en plus. La leishmaniose cutanée à *L. tropica* est la forme la plus active actuellement au Maroc avec un polymorphisme considérable du parasite : *L. tropica* MON-102, MON-107, MON-112, MON-113, MON-122, MON-123 (Pratlong *et al.*, 1991).

Des foyers sont identifiés constamment : Tanant dans la région d'Azilal (Guilvard *et al.*, 1991), Smimou dans la région d'Essaouira (Pratlong *et al.*, 1991), Taza (Guessous Idrissi, 1999), Zouagha My Yacoub dans la région de Fès (Rhajaoui *et al.*, 2004), Chichaoua (Guernaoui *et al.*, 2005a) et récemment le nouveau foyer d'El Haouz (Ramaoui, 2006).

Le cycle épidémiologique est classiquement considéré comme étant anthroponotique mais des cas de leishmaniose cutanée canine causés par *L. tropica* sont identifiés à Tanant (Dereure *et al.*, 1991) et récemment à El Houcima (Lemrani *et al.*, 2002), d'où l'hypothèse de l'existence de souches zoonotiques. La situation se complique d'avantage du fait de l'existence d'espèces cryptiques chez le vecteur *P. sergenti* (Yahia *et al.*, 2004).

Nous avons souligné un déséquilibre génétique des populations de *P. sergenti* du nord et du sud marocain. Chez les phlébotomes, deux causes principales sont habituellement évoquées:

- Un isolement génétique qui se traduit par une absence totale d'hétérozygotes. La mise en évidence d'allèles uniquement sous forme homozygote au locus de la peptidase a permis à Le pont *et al.*, (1985) de distinguer deux espèces cryptiques chez *Psychodopygus carrerai*. Dujardin *et al.*, (1996), à partir du déséquilibre de HW au locus de la glycérophosphate déshydrogénase, démontrent l'existence d'une spéciation cryptique chez *Lutzomyia trapidoi*.
- Un effet Wahlund qui se manifeste par un déficit en hétérozygotes et qui correspond à un regroupement de petites sous-populations de taille différente à l'intérieur d'une même population (Kassem *et al.*, 1990 ; Mery *et al.*, 1982).

Nous privilégions le deuxième cas qui considère *P. sergenti* du Maroc comme un complexe d'espèces cryptiques. Ainsi, des recherches doivent être approfondies afin d'étudier l'effet de cette variabilité intraspécifique sur la transmission du parasite.

Un autre problème taxonomique des phlébotomes vecteurs au Maroc est évoqué chez les *Larroussius*. Le complexe *P. perniciosus* au nord du Maroc est constitué de trois espèces (Pesson *et al.*, 2004):

- *P. perniciosus* avec deux formes, une forme typique et une autre atypique.
- *P. longicuspis* qui peut être confondu avec la forme atypique de *P. perniciosus*.
- une espèce cryptique de *P. longicuspis* (codée LCx).

Dans cette partie du travail, consacrée à un groupe d'espèces affines, nous avons utilisé plusieurs voies d'approche (morphologique, enzymatique et ADNmt) pour essayer de résoudre les problèmes posés par leur individualisation et leurs relations taxonomiques. Ainsi nous avons confirmé la présence des trois espèces du complexe *P. perniciosus* dans le sud marocain jusqu'à la ville de Ouarzazate.

L'analyse de la répartition de ces trois espèces du complexe sur l'ensemble du Maroc montre la co-existence de *P. longicuspis* et son espèce cryptique sur l'ensemble du pays. Par contre, les deux formes de *P. perniciosus* se partagent le territoire marocain. Le morphe typique de *P. perniciosus* se trouve essentiellement dans le nord, tandis que le morphe atypique se localise surtout dans le sud où l'on retrouve de façon sporadique (1 individu sur 100) des mâles présentant des valves péniennes bifides.

La large répartition de la forme atypique de *P. perniciosus* dans le sud peut être expliquée par son adaptation aux conditions d'aridité qui règnent dans ces régions. Selon Rioux *et al.*, (1984 ; 1997 et 2001), *P. perniciosus* couvre l'étage subhumide et l'étage semi-aride alors que *P. longicuspis* s'étend sur les étages semi-aride, aride et hyperaride. Or, pendant ces études, la forme atypique de *P. perniciosus* a pu être considérée comme *P. longicuspis*. Ces travaux suggèrent donc que la forme typique de *P. perniciosus* est adaptée aux étages subhumide et semi-aride alors que la forme atypique co-existe avec *P. longicuspis* dans les étages semi-aride, aride et hyperaride. Cette co-existence facilite aussi la possibilité d'hybridation entre *P. longicuspis* et *P. perniciosus* sous sa forme atypique (Pesson *et al.*, 2004).

La leishmaniose à *L. infantum* est largement répandue dans la partie nord du Maroc et devient sporadique dans la partie sud (Anon., 2001). C'est une distribution qui se calque sur celle de la forme typique de *P. perniciosus* au Maroc. Les cas sporadiques de leishmaniose canine du sud marocain sont enregistrés essentiellement en altitude : le Haut-Atlas (Rioux *et al.*, 1997) et l'Anti-Atlas (Dereure *et al.*, 1986). Le rôle vecteur de *P. perniciosus* et *P. ariasi* a été prouvé en Espagne (Rioux *et al.*, 1986) et au nord du Maroc (Hamdani, 1999), alors que le rôle de *P. longicuspis* reste à déterminer. Dans le sud-ouest marocain, *P. ariasi* est collecté seulement en montagne (Guernaoui, 2006c). L'ensemble de ces données peut expliquer la situation épidémiologique de *L. infantum* dans le sud marocain et met en question la capacité vectorielle de la forme atypique de *P. perniciosus*.

Le dernier chapitre de notre travail est consacré aux *Sergentomyia* de la région de Marrakech. Ce genre présente une richesse spécifique considérable au Maroc surtout dans le sud. Nous avons collecté ces espèces dans le milieu urbain comme dans les zones rurales et avec des densités élevées et un polymorphisme génétique important. Quatre espèces ont été identifiées dans la région de Marrakech : *Sergentomyia africana*, *S. dreyfussi*, *S. fallax* et *S. minuta*. En se basant sur les critères morphologiques, nous avons établi une clé d'identification et nous avons identifié quatre marqueurs enzymatiques pour ces quatre espèces: FUM, ACO, MDH2 et PGI. La capacité vectorielle des espèces de ce genre commence à être découverte (Ba *et al.*, 1999 ; Geevarchese *et al.*, 2005 ; Charrel *et al.*, 2006) ce qui nécessite une bonne connaissance de la biologie et de l'écologie de ces espèces.

En conclusion, nous avons pu mettre en évidence l'effet de l'urbanisation sur la répartition spatio-temporelle des phlébotomes à Marrakech et confirmer le risque leishmanien dans cette agglomération. Si les travaux d'aménagement peuvent diminuer les gîtes potentiels de certains phlébotomes, l'espèce *P. papatasi* peut s'adapter à ce nouveau paysage urbain et c'est certainement sur cette espèce que doit porter en priorité les campagnes de surveillance entomologique dans le cadre de la lutte contre les leishmanioses dans cette région.

L'élaboration de stratégies destinées à prévenir et à combattre les leishmanioses nécessite une bonne connaissance de l'interaction entre l'évolution de l'environnement urbain et les phlébotomes vecteurs (OMS, 2002). Notre travail constitue une contribution à la connaissance de la faune phlébotomienne de la région de Marrakech, du point de vue écologique et systématique. Les données acquises dans ce travail ne doivent pas rester limitées à un cadre de recherche universitaire et doivent être exploitées pour l'établissement d'une stratégie de prévention et de lutte efficace dans la région de Marrakech. Ceci n'est possible que par une coordination pluridisciplinaire entre les services de la santé et les autres secteurs concernés.

Les résultats obtenus au cours de notre thèse nous permettent de proposer trois perspectives de travaux de recherche correspondant aux trois vecteurs principaux présents dans la région de Marrakech :

- *P. papatasi* : pour compléter l'évaluation du risque de transmission de *L. major* à Marrakech, les populations de ce vecteur devraient être comparées à celles de Ouarzazate tant sur le plan génétique que sur la détermination de leur pouvoir vectoriel.
- *P. sergenti* : l'émergence de nouveaux foyers autour de Marrakech comme la découverte dans tout le Maroc d'une grande variabilité génétique de ce vecteur doivent inciter à isoler de *P. sergenti* un plus grand nombre de souches en typant vecteur et leishmanie.
- *P. perniciosus* : le complexe *perniciosus* nécessite une étude détaillée sur l'ensemble du territoire marocain pour établir et l'écologie et la capacité vectorielle des trois espèces : *P. perniciosus*, *P. longicuspis s.s* et LCx ainsi que celles de la forme atypique de *P. perniciosus*. Ces investigations devraient s'accompagner de la recherche d'autres caractères morphologiques à valeur diagnostique chez les espèces du complexe *perniciosus* et en particulier chez les femelles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abonnenc E. 1972- Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera: Phlebotomidae). *Mémoire de l'ORSTOM*. 55, 1–289.
- Adhami J. 1991- Anomalies morphologiques des phlébotomes (Diptera: Psychodidae) d'Albanie. *Parassitologia*. 33, 169-173
- Adler S. & Ber M. 1941- The transmission of *Leishmania tropica* by the bite of *P. papatasi*. *Znd. J. med. Res.* 29, 803-809.
- Adl S.M., Simpson A.G.B., Farmer M.A., Andersen R.A., Andersen O.R., Barta J.R., Bowser S.S., Brugerolle G., Fensome R.A., Frederrig S., James T.Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C.E., Lewis L.A., Lodge J., Lynn D.H., Mann D.G., Mccourt R.M., Mendoza L., Moestrup O., Mozley-Standridge S., Nerad T.A., Shearer C.A., Smirnov A.V., Spiegel F. & Taylor M.F.J.R. 2005- The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52, 399-451.
- Al Zahrani M.A., Peters W., Evans D.A., Chin C., Smith V. & Lane R.P. 1988- *Phlebotomus sergenti*, a vector of *Leishmania tropica* in Saudi Arabia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 416.
- Antoine J.C., Lang T., Prina E., Courret N. & Hellio R. 1999- H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages and internalize by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*. *J Cell Sci.* 112, 2559-70.
- Anon., 1993- Complément n°1 au dossier général remis le 15 septembre 1993 à Mr. Le Président de la Communauté urbaine de Marrakech, objet : environnement Marrakech.
- Anon., 1994- Royaume du Maroc, Ministère de l'Intérieur, Wilaya de Marrakech, Préfecture de Marrakech-Ménara, Municipalité de Ménara-Guéliz, plan d'aménagement, rapport justificatif.
- Anon., 1995- Royaume du Maroc, Ministère de l'Environnement, Observation National de l'Environnement, Gestion des déchets de la communauté urbaine de Marrakech, rapport d'expertise – Projet PNUD-UNESCO et Cités Unies Développement, IDEE.
- Anon., 1997- Lutte contre les leishmanioses. Guide des activités. Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies. Service des Maladies parasitaires. Ministère de la Santé. Maroc
- Anon., 2001- Etat d'avancement des programmes de lutte contre les maladies parasitaires. Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies. Ministère de la Santé, Rabat, Maroc
- Anon., 2003- Etat d'avancement des programmes de lutte contre les maladies parasitaires. Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies. Rapport Annuel de la Ministère de la Santé, Ministère de la Santé, Rabat, Maroc. 34–49.
- Anon., 2004- Programme de lutte contre les leishmanioses. Préfecture de Marrakech. Plan d'Action Préfectoral 2005, Ministère de la Santé, Rabat, Maroc. 1–12.

- Aransay A.M., Testa J.M., Morillas-Marquez F., Lucientes J. & Ready D.P. 2004- Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain. *Parasitol. Res.* 94, 416-420.
- Artemiev M.M. 1991- A classification of the subfamily Phlebotominae. *Parassitologia.* 33, 69-78.
- Ashford R.W. 1996- Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.* 14, 523-532.
- Ashford R.W. 2000- The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30, 1269-1281.
- Aubert G. 1978- Méthodes d'analyses des sols. *Edition C.R.D.P.*, Marseille, 360 p.
- Ba Y., Trouillet J., Thonnon J., Fontenille D. 1999- *Phlebotomus* of Senegal: survey of the fauna in the region of Kedougou. Isolation of arbovirus. *Bull Soc Pathol Exot.* 92, 131-135.
- Bacaër N. & Guernaoui S. 2006- The epidemic threshold of a simple seasonal model of cutaneous leishmaniasis. *J. Math. Biol.* 53, 421-436
- Bagnouls F. & Gaussen H., 1957- Climats biologiques et leur classification. *Ann. Géogr.*, 66, 193-320.
- Bailly-Chaumara H., Abonnec E. & Pastre J. 1971- Contribution à l'étude des phlébotomes du Maroc (Diptera: Psychodidae). Données faunistiques et écologiques. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. Méd. Parasitol.* IX, 4, 431-460.
- Belezzoug S., Mahzoul D., Addadi K. & Dedet J.P. 1982- *Sergentomyia minuta parroti* (Adler et Theodor, 1927) en Algérie (Diptera: Psychodidae). Systématique infraspécifique et répartition géographique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 57, 621-630.
- Belazzoug S. 1983- Isolation of *Leishmania major* Yakimoff & Schokhor, 1914 from *Psammomys obesus* Gretzheimar, 1828 (Rodentia: Gerbillidae) in Algeria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 876.
- Belen A., Alten B. & Aytakin A.M. 2004- Altitudinal variation in morphometric and molecular characteristics of *Phlebotomus papatasi* populations. *Med. Vet. Entomol.* 18, 343-350.
- Benabdennbi I. 1994- Etude de populations de *Sergentomyia* (Psychodidae, Phlebotominae) de l'Est Méditerranéen. *Mémoire de DEA, Université de Paris XII.* 48p.
- Benabdennbi I. 1998- Contribution à l'étude de la biodiversité chez les *Larroussi* (Diptera: Psychodidae) du bassin méditerranéen. Apports de l'analyse isoenzymatique. *Thèse Université Strasbourg I*, 152 p.
- Benabdennbi I., Bombard S., Braverman Y. & Pesson B. 1996- Differentiation of Females in *Sergentomyia* sensu stricto (Diptera: Psychodidae) Using Scanning Electron Microscopy of Pharyngeal Armatures. *J. Med. Entomol.* 33, 265-268.
- Benabdennbi I. & Pesson B. 1998- A propos de la variabilité morphologique de *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). *Bull. Soc. Fran. Parasitol.* 16, 53-60.

- Benabdennbi I., Pesson B., Cadi-soussi M. & Morillas Marquez F. 1999- Morphological and isoenzymatic differentiation of sympatric populations of *P. perniciosus* and *P. longicuspis* (Diptera: Psychodidae) in northern Morocco. *J. Med. Entomol.* 36, 116-120.
- Ben Ismail R., Gramiccia M., Gradoni L., Helal H. & Ben Rachid M. S. 1987- Isolation of *Leishmania major* from *Phlebotomus papatasi* in Tunisia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 749.
- Berchi S., Bounamous A., Louadi K. & Pesson B. 2007- Différenciation morphologique de deux espèces sympatriques: *Phlebotomus perniciosus* Newstead 1911 et *P. longicuspis* Nitzulescu 1930 (Diptera: Psychodidae). *Ann. Soc. Entomol. Fr.* 43, 201-203.
- Baron S., Martin-Sanchez J., Gallego M., Boussaa S., Morales-Yuste M. & Morillas-Marquez F. (soumis). Intraspecific Variability (rDNA ITS and mtDNA Cyt b) of *Phlebotomus sergenti*, vector of *Leishmania tropica*, in Spain. *Acta Trop.*
- Bettini S. & Gradoni L. 1986- Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. *Insect. Sci. Applic.* 7, 241-245.
- Blanc G. & Pietri A. 1934- Nouveau cas de leishmaniose viscérale infantile au Maroc. *Maroc méd.* 146, 327-329.
- Boussaa S. 2003- Contribution à l'étude de la dynamique de vol de la faune phlébotomienne dans les zones aride et semi-aride: cas de Marrakech et ses marges. *Mémoire de DESA, Université Cadi Ayyad, Marrakech.* 45p.
- Charrel R.N., Izri A., Temmam S., Lamballerie X. & Parola P. 2006- Toscana Virus RNA in *Sergentomyia minuta* Flies. *Emerging Infectious Diseases.* www.cdc.gov/eid. 12, 8.
- Christophers S.R., Short H.E. & Barraud P.J. 1925- The development of the parasite of Indian Kala-azar in the sandfly *Phlebotomus argentipes* Annandale & Bnmetti. *Ind. J. med. Res.* 12, 605-608
- Christophers S.R., Short H.E. & Barraud P.J. 1926- The anatomy of the sandfly *Phlebotomus argentipes* Ann. & Brun. (Diptera). 1. The head and mouth parts of the imago. *Ind. med. Res. Mem.* 4, 177-204.
- Chuchana P. 1992- Réactions de polymérisation en chaîne: Méthodologie générale. *Ann. Biol. Clin.* 50, 703-708.
- Comer J.A. & Tesh R.B. 1991- Phlebotomine sandflies as vectors of vesiculovirus: a review. *Parassitologia.* 33, 143-150.
- Colonieu L. 1931- Sur un cas de boutons d'Orient multiples contractés dans l'Atlas marocain. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie.* 9, 13-14.
- Croset H., Rioux J.A., Léger N., Houin R., Cadi Soussi M., Benmansour N. & Maistre M. 1974- Les méthodes d'échantillonnage des populations de phlébotomes en région méditerranéenne. In: Rioux, J.A. (Ed.), *Ecologie des leishmanioses.* CNRS, Paris. 139-151.

- Croset H., Rioux J.A., Maistre M., & Bayar N. 1978- Les phlébotomes de Tunisie (Diptera: Psychodidae). Mise au point systématique, chorologique et éthologique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 53, 711-749.
- Dedet J.P., Addadi K. & Belazzoug S. 1984- Les phlébotomes (Diptera: Psychodidae) d'Algérie. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Paradol.*, XXI-I, 2, 99-127.
- Dedet J. P. 1999- Les leishmanioses. Edition Ellipses, 253 p.
- Delanoë P. 1916- Existence de *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) à Mazagan. *Bull. Soc. Path. Exot.* 9, 762.
- Depaquit J., Léger N. & Killick-Kendrick R. 1998- Description de *Phlebotomus (Paraphlebotomus) riouxi* n. sp (Diptera-Psychodidae) d'Afrique du Nord. *Parasite.* 5, 151-158
- Depaquit J., Ferté H. & Léger N. 2000- Révision du sous-genre *Paraphlebotomus (Phlebotomus-Phlebotominae-Psychodidae-Diptera)*. Approches morphologique et moléculaire. *Ann. Pharm. Fr.* 58: 333-340.
- Depaquit J., Muller F., Gantier J.C., Léger N., Ferté H., Ready P. & Niang A.A. 2005- Phlebotomine sand flies from Ouagadougou, Burkina Faso: first record of *Phlebotomus (Larroussius) longicuspis* south of the Sahara. *Med. Vet. Entomol.* 19, 322-325.
- Dereure J., Velez I.D., Pratlong F., Denial M., Lardi M., Moreno G., Serres E., Lanotte G. & Rioux J.P. 1986- La leishmaniose viscérale autochtone au Maroc méridional. Présence de *Leishmania infantum* MON-1 chez le Chien en zone présaharienne. *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. Coll. Int. CNRS/INSERM*, 1984. IMEEE, Montpellier. 421-425.
- Dereure J., Rioux J.P., Gallego M., Perieres J., Pratlong F., Mahjour J. & Saddiki A. 1991- *Leishmania tropica* in Morocco: infection in dogs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85, 595.
- Dejeux P. 1991- Information sur l'épidémiologie des leishmanioses et la lutte contre ces maladies par pays ou territoires. *OMS.*, 30.
- Desjeux P. 1996- Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clin. Dermatol.* 14, 417- 423.
- Desjeux P. 1999- Les leishmanioses. Aspect de santé publique et lutte. *Edition Ellipses*, 253p.
- Desjeux P. 2001- Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Med. Microb. Immunol.* 190, 77-79.
- Desjeux P. 2002- The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *WHO Mediterr Zoon Control Cent.* 55p.
- Desjeux P. 2004- Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305-318.
- Desjeux P. & Alvar J. 2003- *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 97, 3-15.

- Dujardin J.P., Le pont F., Cruz M., Leon R., Tarrieu F., Guderian R., Echevarria R. & Tibayrenc M., 1996- Cryptic speciation in *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *trapidoi* (Fairchild & Hertig) (Diptera: Psychodidae) detected by multilocus enzyme electrophoresis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54, 42-45.
- D'Urso V., Ruta F., Khoury C., Bianchi R., Depaquit J. & Maroli M. 2004- About the presence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 (Diptera: Psychodidae) in eastern Sicily, Italy. *Parasite.* 11, 279-283.
- Esseghir S., Ready P.D., Killick-Kendrick R., & Ben-Ismail R. 1997- Mitochondrial haplotypes and phylogeography of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. *Insect Mol. Biol.* 6, 211-225.
- Esseghir S. 1998- Phylogénie des phlébotomes méditerranéens vecteurs de *Leishmania major* et de *Leishmania infantum* et marqueurs moléculaires de populations. *Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences, Université de Tunis, Tunisia.* 150p.
- Esseghir S., Ready P.D. & Ben-Ismail R. 2000- Speciation of *Phlebotomus* sandflies of the subgenus *Larroussius* coincided with the late Miocene-Pliocene aridification of the Mediterranean subregion. *Biol. J. Linn. Soc.* 70, 189-219.
- Felsenstein J. 1989- PHYLIP-Phylogeny Inference Package (version 3.2). *Cladistics.* 5, 164-166.
- Flys-Sainte-Marie P.E. 1934- Premier cas de leishmaniose viscérale infantile observé dans la région de Fés. *Maroc méd.* 146, 320-332.
- Foley H., Vialatte C. & Adde R. 1914- Existence dans le sud marocain (Haut Guir) du bouton d'orient à l'état endémique. *Bull. Soc. Path. Exot.* 7, 114-115.
- Forget G. 2004. Étude des mécanismes de régulation négative utilisés par *Leishmania* pour contrer la réponse immunitaire innée. *Doctorat en microbiologie-immunologie. Faculté de Médecine, Université Laval.* <http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede.html>
- França C. 1918- Note sur les espèces portugaises du genre *Phlebotomus*. *Bull. Soc. Path. Exot.* 11, 730-733.
- Fryauff D. & Hanaffi H. 1991- Demonstration of hybridization between *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) and *Phlebotomus bergeroti* Parrot. *Parassitologia.* 33, 237-243.
- Garnham P.C.C. 1965- The *Leishmania*, with special references of the role of animal reservoir. *Am. Zool.* 5. 141-151
- Gaud M. 1935- La leishmaniose viscérale au Maroc. *Bull. off. Int. Hyg. Publ.* 27, 533-535
- Gaud J. 1947- Phlébotomes du Maroc. *Bull. Soc. Nat. Maroc.* 27, 207-212.
- Gaud J. 1954- Phlébotomes du Maroc. *Bull. Instit. Hyg. Maroc.* 14, 91-107.
- Gaud J. & Laurent J. 1952- Observations sur les phlébotomes de la région de Rabat. *Bull. Soc. Scs Nat. Maroc.* XXVII, 207-212.
- Geevarghese G., Arankalle V.A., Jadi R., Kanojia P.C., Joshi M.V., Mishra A.C. 2005- Detection of Chandipura virus from sand flies in the genus *Sergentomyia* (Diptera:

- Phlebotomidae) at Karimnagar District, Andhra Pradesh, India. *J Med Entomol.* 42, 495–496.
- Ghosh K.N., Mukhopadhyay J.M., Guzman H., Tesh R.B. & Munstermann L.E. 1999- Interspecific hybridization and genetic variability of *Phlebotomus* sand flies. *Med. Vet. Entomol.* 13, 78–88.
- Ghrab J., Rhim A., Bach-Hamba D., Chaheb M. K., Aoun K., Noura S. & Bouratbine A. 2006- Phlebotominae (Diptera, Phlebotomidae) of human leishmaniosis sites in Tunisia. *Parasite.* 13, 23-33.
- Gomes A. C., Santos J. F. & Galati E. A. B. 1986- Ecological aspects of American cutaneous leishmaniasis. 4. Observations on the endophilic behavior of the sandfly and the vectorial role of *Psychodopygus intermedius* in the Ribeira valley region of the S. Paulo state, Brazil. *Revista de Saúde Pública.* 20, 280–287.
- Gramiccia M. & Gradoni L. 2005- The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* 35, 1169–1180
- Grassi B. 1907- Ricerche sui Flebotomi. *Mem. Mat. Fis. Soc. Ital. SC.* 14, 353-393.
- Guernaoui S. 2000- Contribution à l'étude des phlébotomes vecteurs potentiels des leishmanioses dans la région de Marrakech. *Mémoire de DESA, Université Cadi Ayyad, Marrakech.* 40p.
- Guernaoui S., Boumezzough A., Pesson B. & Pichon G. 2005a- Entomological investigations in Chichaoua: an emerging epidemic focus of cutaneous leishmaniasis in Morocco. *J. Med. Entomol.* 42, 697–701.
- Guernaoui S., Pesson B., Boumezzough A. & Pichon G. 2005b- Distribution of phlebotomine sand flies, of the subgenus *Larroussius*, in Morocco. *Med. Vet. Entomol.* 19, 111–115.
- Guernaoui S., Boussaa S., Pesson B. & Boumezzough A. 2006a- Nocturnal activity of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis focus in Chichaoua, Morocco. *Parasitol. Res.* 98, 184–188.
- Guernaoui S., Boumezzough A. & Laamrani A. 2006b- Altitudinal structuring of sand flies (Diptera: Psychodidae) in the High-Atlas mountains (Morocco) and its relation to the risk of leishmaniasis transmission. *Acta Trop.* 97, 346–351.
- Guernaoui S. 2006c- Les leishmanioses dans les zones arides et semi-arides du sud-ouest marocain. Ecologie, épidémiologie, modélisation et aide à la décision pour la lutte antivectorielle. *Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences, Semlalia, Marrakech.* 166p
- Guessous-Idrissi N., Chiheb S., Hamdani A., Riyad M., Bichichi M., Hamdani S. & Krimech A. 1997- Cutaneous leishmaniasis: an emerging epidemic focus of *Leishmania tropica* in north Morocco. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91, 660–663.
- Guessous-Idrissi N. 1999- La leishmaniose cutanée à Taza. *Recherche Nationale, les Cahiers du Médecin.* Tome II- N° 19, 37-40.

- Guilvard E., Rioux J.P., Gallego M., Pratlong F., Mahjour J., Martinezorlega E., Dereure J., Saddiki A. & Martini A. 1991- *Leishmania tropica* au Maroc III- Rôle de *Phlebotomus sergenti*. A propos de 89 isolats. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 66, 96-99.
- Guo S.W. & Thompson E.A. 1992- Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics.* 48, 361-372.
- Hamarshah O., Presber W., Abdeen Z., Sawalha S., AL Lahem A. & Schoenian G. 2006- Isolation and characterization of microsatellite loci in the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *Mol Ecol Notes.* 6, 826-828.
- Hamarshah O., Presber W., Abdeen Z., Sawalha S., AL Lahem A. & Schoenian G. 2007- Genetic structure of Mediterranean populations of the sandfly *Phlebotomus papatasi* by mitochondrial cytochrome b haplotype analysis. *Med. Vet. Entomol.* 21, 270-277
- Hamdani A. 1999- Etude de la faune phlébotomienne dans trois foyers de leishmanioses au Nord du Maroc : Espèces, Abondance, Saisonalité et incrimination du vecteur. *Thèse de 3^{ème} cycle, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech.* 57 p.
- Harrat Z. & Belkaid M. 2002- Les leishmanioses dans l'Algérois. Données épidémiologiques. *Bull. Soc. Path. Exot.* 96, 212-214.
- Herrer A. 1982- Empleo de hamster dorado como animal centinela en las localidades donde es endémica la uta (leishmaniasis tegumentaria). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 24, 162-167.
- Hoogstraal H., Dietlein D.R. & Heyneman D. 1962- Leishmaniasis in the Sudan Republic. 4. Preliminary observations on man-biting sandflies (Psychodidae: *Phlebotomus*) in certain Upper Nile endemic Nile endemic areas. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 56, 411-422.
- Izri M.A., Marty P., Rahal A., Lelievre A., Ozon C., Baldelli G., Presiozo J., Haas P. & Le Fichoux Y. 1992- *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 naturellement infesté par des promastigotes dans la région de Nice (France). *Bull. Soc. Path. Ex.* 85, 385-387.
- Jacobson R.L., Eisenberger C.L., Svobodova M., Baneth G., Sztern J., Carvalho J., Nasereddin A., El Fari M., Shalom U., Volf P., Votypka J., Dedet J.P., Pratlong F., Schonian G., Schnur L.F. Jaffe C.L. & Warburg A. 2003- Outbreak of Cutaneous Leishmaniasis in Northern Israel. *J. Infect. Dis.* 188, 1065-1073.
- Jarry D.M. 1999- Historique des leishmanioses et de leurs complexes pathogènes. In Dedet J-P., *Les Leishmanioses, Ellipses Ed., Paris,* 89-108.
- Kamhawi S., Abdel-Hafez S.K. & Molyneux D.H. 1991- Urbanization - how does it affect the behaviour of sandflies? *Parassitologia.* 33 (Suppl. 1), 299-306.
- Kamhawi S., Modi G.B., Pimenta P.F.P., Rowton E. & Sacks D.L. 2000a- The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan mediated midgut attachment. *Parasitology.* 121, 25-33.
- Kamhawi S., Belkaid Y., Modi G., Rowton E. & Sacks D. 2000b. Protection against cutaneous Leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science.* 290:13, 51-54.

- Kamhawi S., Ramalho-Ortigao M., Pham V.M., Kumar S., Lawyer P.G., Turco S. J., Barillas-Mury C., Sacks D. & Valenzuela J.G. 2005- Identification of the receptor of *Leishmania major* Lipophosphoglycan from the midgut of *P. papatasi*. *ISOPS V, Arch. Inst. Pasteur, Tunis.* 82, 35-36.
- Katz O., Waitumbi J.N., Zer R. & Warburg A. 2000- Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 145-50.
- Kassem H.A., Abdel Sattar S., Shehata M.G. & El Sawaf B.M. 1988- Abnormalities in the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) (Diptera: Psychodidae) of Egypt. *J. Egypt. Public. Health Assoc.* (3, 4), 209-213.
- Kassem H.A., Fryauff D.J., El Sawaf B.M., Shehata M.G. & Shoumar N.F. 1990- Electrophoretic comparison of the *Leishmania* vectors *Phlebotomus papatasi* and *P. langeroni* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 27, 592-601.
- Kassem H.A., Fryauff D.J., Shehata M.G. & El Sawaf B.M. 1993- Enzyme Polymorphism and Genetic Variability of One Colonized and Several Field Populations of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 30, 407-413.
- Keilin D. & Tate P. 1937- A comparative account of the larvae of *Trichomyia urbica* Curtiz, *Psychodes albipennis* Zett., and *Phlebotomus argentipes* Ann. et Brun. (Diptera, Psychodidae). *Parasitol.* 29, 347-358.
- Killick-Kendrick R. & Ward R.D. 1981- Ecology of *Leishmania*. *Parasitology.* 82, 143-152.
- Killick-Kendrick R., Rioux J.A., Bailly M., Guy M.W., Wilkes T. J., Guy F.M., Davidson I., Knechtli R., Ward R.D., Guilvard E., Perieres J. & Dubois H. 1984- Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 59, 555-572.
- Killick-Kendrick R. 1985- Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between *Leishmania* and their phlebotomine vectors. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 78, 747-55
- Killick-Kendrick R., Leaney A.L., Peters W., Rioux J.A. & Bray R.S. 1985- Zoonotic cutaneous leishmaniasis in Saudi Arabia: The incrimination of *Phlebotomus papatasi* as the vector in the Al-Hassa oasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79, 252-5.
- Killick-Kendrick R. 1990- Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.* 4, 1-24.
- Killick-Kendrick R., Killick-Kendrick M. & Tang Y. 1995- Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afganistan: the high susceptibility of *Phlebotomus sergenti* to *Leishmania tropica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89, 477.
- Killick-Kendrick R. 1999- The biology and Control of Phlebotomine Sandflies. *Clin. Dermatol.* 17, 279-289.

- Killick-Kendrick R. & Killick-Kendrick M. 1999- Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. *In*: Canine Leishmaniasis: an up date. *Proceedings of a canine Leishmaniasis Forum*, Barcelona, 28-31.
- Klippel A. & Monier V. 1921- Un cas de Kala-Azar d'origine marocaine. *Société Méd. Hôp. de Paris*, 8 juillet, 1037- 1038.
- Knowles R., Napier L.E. & Smith R.O.A. 1924- On a Herpetomonas found in the gut of the sandfly *Phlebotomus argentipes* fed on Kala azar patients. *Ind. med. Gaz.* 59, 593-697.
- Kravchenko V., Wasserberg G. & Warburg A. 2004. Bionomics of phlebotomine sand flies in the Galilee focus of cutaneous leishmaniasis in northern Israel. *Med. Vet. Entomol.* 18, 418-428.
- Laamrani-Idrissi M. 2000- Programme de lutte contre les leishmanioses. *Séminaire national sur la surveillance et la lutte contre les rongeurs*. Marrakech, 07 et 08 juin.
- Lambert M., Rioux J.A., Mahjour J. & Saddik A. 1994- Nouvelles stations de *Phlebotomus mariae* Rioux, Croset, Léger & Bailly Choumara, 1974 au Maroc. *Parasite.* 1, 93.
- Lane R.P. 1993- Sand flies. *In: Medical Insects and Arachnids (ed. by R. P. Lane & R. W. Crosskey). Chapman and Hall*, London. 78-119.
- Latyshev N.I & Krujukova A.P. 1941- On the epidemiology of the cutaneous leishmaniasis as cutaneous zoonotic disease of wild rodents in Turkmenia. *Trudy Voennomedskaya Akad. Krasnoi Armii.* 25, 229-242.
- Le pont F., Caillard T., Tibayrenc M., Dujadin J.P. & Desjeux P. 1985- distinction par les isoenzymes entre deux espèces cryptiques au sein du taxon *Psychodopygus carrerai* (Diptera: Psychodidae). *C. R. Acad. Sc. Paris. Sér III.*, 300, 479-481.
- Léger N., Rioux J.A, Croset H., Cadi Soussi M. & Benmansour N. 1974- Le « complexe » *Sergentomyia (Sergentomyia) antennata* (Newstead, 1912). Remarques systématiques et écologiques, à propos de 948 exemplaires récoltés dans le Sud-marocain. *Ann. Parasit.* t49, n° 5, 577- 591.
- Léger N., Saratsiotis A., Pesson B. & Léger P. 1979- La leishmaniose en Grèce. Résultats d'une enquête entomologique effectuée en juin 1977. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 54, 11-29.
- Léger N., Pesson B., Madulo-Leblond G. & Abonnenc E. 1983- Sur la différenciation des femelles du sous-genre *Larroussius* Nitzulescu, 1931 (Diptera, Phlebotomidae) de la région méditerranéenne. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 58, 611-623.
- Léger N. & Pesson B. 1987- Taxonomy and geographic distribution of *Phlebotomus (Adlerius) chinensis* s. l. and *P. (Larroussius) major* s. l. (Psychodidae-Diptera). Status of species present in Greece. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 80(2), 252-60.
- Léger N. & Depaquit J. 1999- Les Phlébotomes. *In Dedet J-P., Les Leishmanioses, Ellipses Ed.*, Paris, 89-108.
- Le Houerou H. 1989- Classification écoclimatique des zones arides (s. l.) de l'Afrique du nord. *Ecol. Médit.* 15(3/4), 95-144.

- Lemrani M., Nejjar N. & Benslimane A. 1999- A new focus of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Northern Morocco. *G. Ital. Med. Trop.* 4, 3-4.
- Lemrani M., Nejjar R. & Pratlong F. 2002- A new *Leishmania tropica* zymodeme-causative agent of canine visceral leishmaniasis in northern Morocco. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 96, 637-638.
- Leng Y.J. 1987- A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Sichuan and Guizhou provinces, South West China, and description and discussion of a primitive new genus *Chinius*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 81. 311-317.
- Levene, H. 1949. On amatching problem arising in genetics. *Ann. Math. Stat.* 20: 91-94.
- Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.F.G., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J. & Wallace F. G. 1980- A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.* 27. 37-58.
- Lewis D.J., Young D.G., Fairchild G.B. & Minter D.M. 1977- Proposals for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Syst. Ent.* 2, 319-332.
- Lewis D.J. 1982- A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bull. British Museum of Natural History (Entomology Series)*. 45, 121-209.
- Lima H.C. & Titus R.G. 1996- Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 64, 5442-45.
- Louis E.J. & Dempster E.R. 1987- An exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles. *Biometrics.* 43, 805-811.
- Maazoun R., Pratlong F., Lanotte G. & Rioux J.A. 1986- Le complexe *Leishmania major*. A propos de l'analyse numérique de 35 souches identifiées par la méthode enzymatique. In: *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications écoépidémiologiques.* J.A. Rioux éd. (Coll. Int. CNRS/INSERM, 1984). IMEEE, Montpellier. 129-137.
- Madulo-leblond G. 1983- Les phlébotomes (Diptera: Phlebotomidae) des îles Ioniennes. *Thèse de Doctorat (Sciences Pharmaceutiques). Université de Reims.* 218p.
- Madulo-Leblond G., Killick-Kendrick R., Killick-Kendrick M., & Pesson B. 1991- Comparaison entre *Phlebotomus duboscqi* Neveu-Lemaire, 1906 et *Phlebotomus papatasi* (Scopoli, 1786) : étude morphologique et isoenzymatique. *Parassitologia.* 33 (suppl.1), 387-391.
- Mahjour J., Akalay O. & Saddiki A. 1992- Les leishmanioses au Maroc de l'analyse éco-épidémiologie à la prévention. *DEPS Bul. Epidém. Supp.* N°7.
- Marcondes C., Day J. & Ready P. 1997- Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *Lu. neivai* and *Lu. whitmani*, and their roles as vectors of *Leishmania braziliensis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91, 725-726.
- Maroli M, Pennisi M.G., Di Muccio T., Khoury C., Gradoni L. & Gramiccia M. 2007- Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* 145, 357-60.

- Martin-Sanchez J., Acedo C., Munoz-Pérez M., Pesson B., Marchal O., Morillas-Marquez F. 2007- Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Vet. Parasitol.* 145, 267-73.
- Marthy P., Le Fichoux Y., Pratlong F., Rioux J.A., Rostain G. & Lacour J.P. 1989- Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica* in a young Moroccan child observed in Nice, France. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83, 510.
- Mazelet L. 2004- La Leishmaniose canine dans le bassin méditerranéen français. *Mémoire de Maîtrise de Biologie des Populations et des Ecosystèmes. Université Pierre et Marie Curie, PARIS VI.* 31p.
- Mbow M.L., Bleyenbergh J.A., Hall L.R., Titus R.G. 1998- *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *J. Immunol.* 161, 571-77.
- McConville M.J. & Ralton J.E. 1997- Developmentally regulated changes in the cell surface architecture of *Leishmania* parasites. *Behring Inst. Mitt.* 99, 34-43.
- Mery A., Trouillet J., Vattier-Bernard G. & Pasteur N. 1982- Polymorphisme enzymatique et différenciation génétique chez quatre espèces du genre *Sergentomyia* de la République du Congo. *Biochem. Syst. Ecol.* 10, 83-90
- Moin-Vaziri, V., J. Depaquit, M.R. Yaghoobi-Ershadi, M.A. Oshaghi, P. Derakhshandeh-Peykar, H. Ferte, M. Kaltenbach, M.D. Bargues, A. Nadim, E. Javadian, Y. Rassi, and R. Jafari. 2007. Geographical variation in populations of *Phlebotomus (Paraphlebotomus) caucasicus* (Diptera : Psychodidae) in Iran. *Bulletin de la société de Pathologie Exotique* 4: 291-295.
- Morillas Marquez F., Sanchis Marin M.C., Martin Sanchez J. & Acedo Sanchez C. 1991- On *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera, Phlebotomidae) in the province of Almeria in south eastern Spain. *Parassitologia.* 33 (Suppl. 1), 437-444.
- Modi G.B. & Tesh R.B. 1983- A simple technique for mass rearing of *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J. Med. Entomol.* 20, 568-569.
- Molina R. 1991- Laboratory adaptation of an autochthonous colony of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera: Psychodidae). *Res. Rev. Parasitol.* 51, 87-89.
- Musser G.G. & Carleton M.D. 1993- Mammals species of the world. A taxonomic and geographic reference. 2nd. ed., Wilson D.E. & Reeder D.A.M., eds, *Smithsonian Institution Press.*
- Murray H.W. 1999- Kala-azar as an AIDS-related opportunistic infection. *AIDS Patient Care STDS.* 13 (8), 459-65.
- Mukhopadhyay J., Rangel E.F., Ghosh K. & Munstermann L.E. 1997- Patterns of genetic variability in colonized strains of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and its consequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57, 216-221.

- Nejjar R., Lemrani M., Boucedda L., Amarouch H. & Benslimane A. 2000- Variation in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in northern Morocco. *Revue Méd. Vét.* 151, 8-9, 841-846
- Natami A., Sahibi H., Lasri S., Boudouma M., Guessous-Idrissi N. & Rhalem A. 2000- Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the khemisset province, Morocco. *Vet. Res.* 31, 355-363
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 583-590.
- Nei M. 1978- Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics.* 89, 583-590.
- Nicolle C. & Comte C. 1908- Kala-Azar expérimental du Chien. In : Recherches sur le Kala-Azar entreprises à l'Institut Pasteur de Tunis. *Arch. Inst. Pasteur Tunis.* 3, 99-103.
- Nitzulescu V. 1930- *Phlebotomus langeroni* n.sp. et *P. langeroni* var *longicuspis* n.var. de Douar-Shott (Tunisie). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 8, 547-553.
- Oliveira C.C.G., Lacerda H.G., Martins D.R. M., Barbosa J.D.A., Monteiro G.R., Queiroz J.W., Sousa J.M.A., Ximenes M.F.F.M. & Jeronimo S.M.B. 2004- Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. *Acta Trop.* 90, 155-162.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 1975- The who division of malaria and other parasitic diseases. *Manual on practical entomology in malaria-* Part II, 15-39.
- OMS, 1990- Lutte contre les leishmanioses. *Série de Rapports Techniques.* Genève, 176 p.
- OMS, 2000- *Leishmania* and HIV co-infection. *Lepr. Rev.* 71, 104-5.
- OMS, 2002- Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Weekly Epidemiological Record.* 77, 365-372.
- Ozon C., Marty P., Pratlong F., Breton C., Blein M., Lelièvre A. & Haas P. 1998- Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. *Vet. Parasitol.* 75, 273-277.
- Palit A., Bhattacharya S.K. & Kundu S.N. 2005- Host preference of *Phlebotomus argentipes* and *Phlebotomus papatasi* in different biotopes of West Bengal, India. *Inter. J. Enviro. Heal. Res.* 15, 449-454.
- Papadopoulos B. & Tselentis Y. 1994- Sandflies in the Greater Athens region, Greece. *Parasite.* 1, 131-140.
- Parrot L. & Durand-Delacre R. 1947- Notes sur les phlébotomes LVI. – Phlébotomes de Beni Ounif-de-Figuig. *Arch. Instit. Past. d'Algérie.* 25, 77-86.
- Parrot L. 1936- Notes sur les phlébotomes XXI- Sur la valve copulatrice de *Phlebotomus perniciosus* Newstead. *Arch. Institut Pasteur d'Algérie.* 144-146.
- Parrot L., Donatien A. & Lestoquard F. 1930- Sur le développement du parasite de la leishmaniose canine viscérale chez *Phlebotomus major* var. *perniciosus* Newstead. *Bull. Soc. Path. Exot.* 23, 724-725.

- Parrot L. 1917- Sur un nouveau Phlébotome algérien, *Phlebotomus sergenti* sp. n. *Bull. Soc. Path. exot.* 10, 564-567.
- Parvizi P., Benlarbi M. & Ready P.D. 2003- Mitochondrial and Wolbachia markers for the sand fly *Phlebotomus papatasi*: little population differentiation between peridomestic sites and gerbil burrows in Isfahan province, Iran. *Med. Vet. Entomol.* 17, 351-362.
- Parvizi P. & Ready P.D. 2006- Molecular Investigation of the Population differentiation of *Phlebotomus papatasi*, Important Vector of *Leishmania major*, in Different Habitats and Regions of Iran. *Ira. Biomed. J.* 10, 69-77.
- Pasteur N., Pasteur G., Bonhomme F., Catalan J. & Britton- Davidian J. 1987- Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Paris, éd. Lavoisier (Technique et Documentation), 217p.
- Perfiliev P.P. 1928- Sur l'anatomie des Phlébotomes. *Bull. Soc. Path. exot.* 21, 159-171; 254-257.
- Peters W., Chance M.L., Chowdhury A.B., Ghoshdastidar B., Nandy A., Kalra J.L., Sanyal R.K., Sharma M.I.D., Srivastava L. & Schnur L.F. 1981- The identity of some stocks of *Leishmania* isolated in India. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 75, 247-249.
- Pesson B., Léger N. & Madulo-Leblond G. 1984- Les phlébotomes de Grèce: les îles Ioniennes et les îles de la Mer Egée. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 59, 277-296
- Pesson B., Ready J.S., Benabdennbi I., Martin-Sanchez J., Esseghir S., Cadi Soussi M., Morillas-Marquez F. & Ready P.D. 2004- Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif. *Med. Vet. Entomol.* 18, 25-37.
- Pimenta P.F., Saraiva E.M. & Sacks D.L. 1991- The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Exp Parasitol.* 72, 191-204.
- Pimenta P.F., Saraiva E.M., Rowton E., Modi G.B. & Garraway L.A. 1994- Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 9155-56.
- Pinto M.C., Campbell-Lendrum D.H., Lozovei A.L., Teodoro U. & Davies C.R. 2001- Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Med. Vet. Entomol.* 15, 132-139.
- Pratlong F., Rioux J.A., Dereure J., Mahjour J., Gallego M., Guilvard E., Lanotte G., Périères J., Martini A. & Saddiki A. 1991- *Leishmania tropica* au Maroc. IV. Diversité isozymique intrafocale. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 66, 100-104.
- Proudfoot L., Schneider P., Ferguson M.A. & McConville M.J. 1995- Biosynthesis of the glycolipid anchor of lipophosphoglycan and the structurally related glycoinositolphospholipids from *Leishmania major*. *Bio. Chem. J.* 308, 45-55.

- Ramaoui K., 2006- Contribution à l'étude des Phlébotomes (vecteurs de la leishmaniose) et du réservoir canidé dans les foyers Sud-ouest et partie centrale du Maroc. *Mémoire de DESA, Université Cadi Ayyad, Marrakech.* 47p
- Raymond M. & F. Rousset. 1995- GENEPOP Version 1.2.: population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Hered.* 86, 248–249.
- Ready P.D., Day J.C., De Souza A.A., Rangel E.F. & Davies C.R. 1997- Mitochondrial DNA characterization of populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) incriminated in the peri-domestic and silvatic transmission of *Leishmania* species in Brazil. *Bull. Entomol. Res.* 87, 187-195.
- Rhajaoui M., Fellah H., Pratlong F., Dedet J. P. & Lyagoubi M. 2004- Leishmaniasis due to *Leishmania tropica* MON-102 in a new Moroccan focus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 299–301.
- Rioux J.A. & Golvan Y. 1969- Épidémiologie des leishmanioses dans le Sud de la France. Monographie de l'I.N.S.E.R.M., N° 37, Paris, 221 p.
- Rioux J.A., Croset H., Léger N. & Bailly-Choumara H. 1974- *Phlebotomus (Larrousius) mariae* n. sp. (Diptera: Psychodidae). *Ann. Parasitol.* 49, 91-101.
- Rioux J.A., Croset H., Léger N., Ben Mansour N. & Cadi Soussi M. 1975a- Presence of *Phlebotomus bergeroti*, *Phlebotomus chabaudi*, *Phlebotomus chadlii* and *Sergentomyia christophersi* in Morocco. *Ann Parasitol Hum Comp.* 50, 493-506.
- Rioux J.A., Croset H., Léger N. & Maistre M. 1975b- Remarques sur la taxonomie infraspécifique de *Sergentomyia minuta*, *Sergentomyia africana* et *Sergentomyia antennata*. *Ann Parasitol Hum Comp.* 50, 635-641.
- Rioux J.A., Croset H., Léger N. & Rosin G. 1977- Présence au Maroc de *Phlebotomus perfiliewi* Parrot, 1930. *Ann. Parasitol.* 52, 377-380.
- Rioux J.A., Lanotte G., Maazoun R., Perello R. & Pratlong F. 1980- Parasitologie animale-*Leishmania infantum* Nicolle, 1908, agent du bouton d'Orient autochtone. A propos de l'identification biochimique de deux souches isolées dans les Pyrénées-Orientales. *C. R. Acad. Sc. Paris.* 291, 701-703.
- Rioux J.A., Petter F., Akalay O., Lanotte G., Ouazani A., Seguignes M. & Mohcine A. 1982- *Meriones shawi* (Duvernoy, 1842) (Rodentia, Gerbillidae), réservoir de *Leishmania major* Yakimoff et Shokhor, 1914 dans le Sud Marocain. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 294, 515–517.
- Rioux J.A., Rispaïl P., Lanotte G. & Lepart J. 1984. Relations phlébotomes-bioclimats en écologie des leishmanioses. Corollaires épidémiologiques. L'exemple du Maroc. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 131, 549–557.
- Rioux J.A., Lanotte G., Petter F., Dereure J., Akalay O., Pratlong F., Velez G., Fikri N.B., Maazoun R., Denial M., Jarry D.M., Zahaf A., Ashford R.W., Cadi Soussi M., Killick-Kendrick R., Benmansour N., Moreno G., Périères J., Guilvard E., Zribi M., Kennou M. F., Rispaïl P.,

- Knechtli R. & Serres E. 1986a- Les leishmanioses cutanées du bassin méditerranéen occidental: de l'identification enzymatique à l'analyse éco-épidémiologique, l'exemple de trois 'foyers', tunisien, marocain et français. In *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications Écoépidémiologiques*, ed. Rioux, J. A. Montpellier, France: Institut Méditerranéen d'Études Épidémiologiques et Ecologiques. pp. 365–395.
- Rioux J.A., Guilvard E., Dereure J., Lanotte G., Denial M., Pralong F., Serres E. & Belmonte A. 1986b- Infestation naturelle de *Phlebotomus papatasi* (Scopoli, 1786) par *Leishmania major* MON-25. A propos de 28 souches isolées dans un foyer du Sud Marocain. In: *Leishmania. Taxinomie et Phylogénèse. Applications écoépidémiologiques*. (Coll. Int. CNRS/INSERM, 1984), IMEEE, Montpellier, France, pp. 471–480.
- Rioux J.A., Velez I.D., Denial M., Dereure J., Périères J., Lanotte G. & el Mellouki W. 1986c- Presence in Morocco of *Phlebotomus (Paraphlebotomus) kazeruni* Theodor and Mesghali, 1964. *Ann Parasitol Hum Comp.* 61, 473-81.
- Rioux J.A., Mahjour J., Gallego M., Dereure J., Périères J., Laamrani A., Riera C., Saddiki A. & Mouki B. 1996- Leishmaniose cutanée humaine à *Leishmania infantum* MON-24 au Maroc. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 14, 179-183.
- Rioux J.A., Akalay O., Périères J., Dereure J., Mahjour J., Le Houérou H.N., Léger N., Desjeux P., Gallego M., Saddiki A., Barkia A. & Nachi H. 1997- L'évolution éco-épidémiologique du 'risque leishmanien' au Sahara atlantique marocain. Intérêt heuristique de la relation 'phlébotomesbioclimats'. *Ecol. Mediterr.* 23, 73–92.
- Rioux J.A. 2001- Trente ans de coopération franco-marocaine sur les leishmanioses: dépistage et analyse des foyers. Facteurs de risque. Changements climatiques et dynamique nosogéographique. *Association des Anciens Elèves de l'Institut Pasteur*, 168, 90–101.
- Rioux J.A. & De La Rocque S., 2003- Climats, leishmanioses et trypanosomiasés. Changements climatiques, maladies infectieuses et allergiques. *Ann. Inst. Past.* 16, 41-62.
- Rispail P. & Léger N. 1998a- Numerical Taxonomy of Old World Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). 1. Considerations of Morphological Characters in the Genus *Phlebotomus* Rondani & Berté 1840. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 93, 773-785.
- Rispail P. & Léger N. 1998b- Numerical Taxonomy of Old World Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). 2. Restatement of Classification upon Subgeneric Morphological Characters. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 93, 787-793.
- Rispail P., Dereure J. & Jarry D. 2002- Risk zones of human leishmaniasés in the western Mediterranean basin. Correlations between vectors sand flies, bioclimatology and phytosociology. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 97, 477- 483.
- Ristorcelli A. 1939- Contribution à l'étude des phlébotomes du Maroc. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 17, 364–365.
- Ristorcelli A. 1940- Sur les phlébotomes du Maroc. *Arch. Inst. Pasteur du Maroc.* 2, 367-381.

- Ristorcelli A. 1941- Sur les phlébotomes du Maroc (2° note). *Arch. Inst. Pasteur du Maroc*. 2, 521-533.
- Ristorcelli A. 1945- Sur les phlébotomes du Maroc (3° note). *Arch. Inst. Pasteur du Maroc*. 3, 105-109.
- Ristorcelli A. 1947- Sur les phlébotomes du Maroc (4° note). *Arch. Inst. Pasteur du Maroc*. 3, 487-488.
- Roberts L.S. & Janovy J.J. 2000- *Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology*. McGraw-Hill Higher Education, Boston.
- Rodhain F. 2000- Impacts sur la santé : le cas des maladies à vecteurs. In : Impacts potentiels du changement climatique en France au XXIe siècle, Mission interministérielle de l'effet de serre, Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement, Paris, 122-127.
- Rogers J.S. 1972- Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genet.* VII. *University of Texas Pub.* 7213, 145-153.
- Sacks D.L. 2001- *Leishmania*–sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell. Microb.* 3, 1–9.
- Sadlova J., Hajmova M. & Volf P. 2003- *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* vector competence for *Leishmania major* and *Le. tropica*. *Med. Vet. Entomol.* 17, 244–250.
- San Martin Mouriz Savani E., Gibrail de Oliveira Camargo M.C., Russi de Carvalho M., Andrade Zampieri R., Gonzaga dos Santos M., Nicoletti D'Auria S.R., Shaw J.J. & Floeter-Winter L.A. 2004- The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, Sao Paulo State. *Brazil. Vet. Parasitol.* 120, 229–233.
- Sergent E.D., Sergent E.T., Lombard J. & Quilichini M. 1912- La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. *Bull. Soc. Path. Exot.* 5, 93-98.
- Schmidt M.L. & Schmidt J.R. 1962- Variation in the antennal ascoid segment ratio in *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) (Diptera: Psychodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 55, 722-723.
- Schneider P., Rosat J.P., Bouvier J., Louis J. & Bordier C. 1992- *Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Exp Parasitol.* 75, 196-206.
- Short H.E., Smith R.A. & Swaminath C.S. 1932- Miscellaneous experiments with *Phlebotomus argentipes* Ann. & Brun. in relation to transmission of Kala azar. *Ind. Med. Res. Mem.* 90-102.
- Singh K.V. 1999- Studies on the role of climatological factors in the distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in semi-arid areas of Rajasthan, India. *J. Arid Environ.* 42, 43–48.
- Srinivasan R., Panicker K.N., Dhanda V. 1993- Population dynamics of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Phlebotomidae) in Pondicherry, India. *Acta Trop.* 54, 125–130.

- Sneath P.H.A. & Sokal R.R. 1973- Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. *W. H. Freeman and Co., San Francisco.* 573pp.
- Souhail M. 1994- La leishmaniose viscérale (revue de littérature nationale et internationale). *Thèse de Doctorat en Médecine*, Faculté de Médecine, Casablanca. Maroc. 90 p.
- Svobodova M., Sadlova J., Chang K.P & Volf P. 2003- Distribution and feeding preference of the sandflies *Phlebotomus sergenti* and *P. papatasi* in a cutaneous leishmaniasis focus in Sanliurfa, Turkey. *Am J Trop Med Hyg.* 68, 6 – 9.
- Swofford D.L. & Selander R.B. 1981- BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Hered.* 72, 281–283.
- Swofford D.L. 2002- PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version PAUP*4.0. Smithsonian Institution Press, Washington DC, U.S.A
- Teodoro U., Silveira T.G.V., Santos D.R., Santos E.S., Santos A.R., Oliveira O., Kühl J.B. & Albetton D. 2003- Influência da reorganização, da limpeza do peridomicílio e a da desinsetização de edificações na densidade populacional de flebotomíneos no município de Doutor Camargo, estado do Paraná, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 19, 1801–1813.
- Traoré K.S., Sawadogo N.O., Traoré A., Ouedraogo J.B., Traoré K.L. & Guiguemdé T.R. 2001- Etude préliminaire de la leishmaniose cutanée dans la ville de Ouagadougou de 1996 à 1998. *Bull. Soc. Path. Exo.* 94, 52–55.
- Teixeira M.J., Teixeira C.R., Andrade B.B., Barral-Netto M. & Barral A. 2006- Chemokines in host–parasite interactions in leishmaniasis. *Tr. Parasitol.* 22, 1.
- Verani P., Nicoletti L., Ciufolini M.G. & Baducci I. 1991- Viruses transmitted by sandflies in Italy. *Parassitologia.* 33, 513-518.
- Verani P., Ciufolini M.G. & Nicoletti L. 1995- Arbovirus surveillance in Italy. *Parassitologia.* 37, 105-8.
- Vialatte C.H. & Parrot L. 1920- Phlébotomes du Maroc. *Annales de l'Institut Pasteur de Tunisie*, 34, 566.
- Volf P., Ozbel Y., Akkafa F., Svobodova M., Votypka J. & Chang K.P. 2002- Sand Flies (Diptera: Phlebotominae) in Sanliurfa, Turkey: Relationship of *Phlebotomus sergenti* with the Epidemic of Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis. *J. Med. Entomol.* 39, 12-15
- Wasserberg G., Yarom I. & Warburg A. 2003a- Seasonal abundance patterns of the sand fly *Phlebotomus papatasi* in climatically distinct foci of cutaneous leishmaniasis in Israeli deserts. *Med. Vet. Entomol.* 17, 452–456.
- Wasserberg G., Abramsky Z., Kotler B.P., Ostfeld R.S., Yarom I. & Warburg A. 2003b- Anthropogenic disturbances enhance occurrence of cutaneous leishmaniasis in Israel deserts: patterns and mechanisms. *Eco. App.* 13, 868–881.
- Weir B.S. & Cockerham C.C. 1984- Estimating F-statistics for analysis of population structure. *Evolution.* 38, 1358-1370.

- Weir B.S. 1990- Genetic data analysis. Sinauer Publ. Sunderland, MA.
- Wright S. 1969- Evolution and the genetics of populations, Vol 2. The theory of gene frequencies. University of Chicago Press, Chicago.
- Wright S. 1978- Evolution and the genetics of populations, Vol 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago.
- Yaghoobi-Ershadi M.R., Javadian E. & Tahvildare-Bidruni G.H. 1995- *Leishmania major* MON-26 isolated from naturally infected *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in Isfahan Province, Iran. *Acta Trop.* 59, 279-282.
- Yahia H., Ready P.D., Hamdani A., Testa J.M. & Guessous Idrissi N. 2004- Regional genetic differentiation of *Phlebotomus sergenti* in three Moroccan foci of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*. *Parasite.* 11, 189-199.
- Yahia H., Riyad M., Hamdani A., Guessous N. & Ready P.D. 2007- Phylogéographie et évolution de *Phlebotomus sergenti*, vecteur de *Leishmania tropica* au Maroc. Impact des changements climatiques sur l'émergence et l'épidémiologie des maladies vectorielles. Premier colloque International d'Acarologie et d'Entomologie Médicales (CIAEM). 2-4 novembre.
- Young D.G., Perkins P.V. & Endris R.G. 1981- A larval diet for rearing phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 18, 446.