

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE EN PHARMACIE

ANNEE 2018

N°

THESE

pour le

DIPLÔME D'ETAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

BLAVIER Antoine

Né le 07 Octobre 1992 à Soissons (Aisne)

présentée et soutenue publiquement le 25 Septembre 2018

INVENTAIRE DES PHLEBOTOMES (DIPTERA,
PSYCHODIDAE) DE LA REGION D'ANKARANA
(MADAGASCAR) AVEC DESCRIPTION DE
NOUVEAUX TAXONS

JURY

Président : M. DEPAQUIT Jérôme
Directeur : M. DEPAQUIT Jérôme
Assesseur(s) : Mme. LEGER Nicole
M. ROBERT Vincent
M. GANTIER Jean-Charles

| | |
|------------------------|---------------|
| DOYEN | M. JM. MILLOT |
| ASSESEURS | M. S. DUKIC |
| | MME C. LAVAUD |
| | M. O. DEBARGE |

CONSERVATEUR DE BIBLIOTHEQUE

M. Q. BOSCOLO

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

| | |
|---------------------------------|------------------------------|
| MME M.C. ANDRY..... | PHARMACIE GALENIQUE |
| M. J. DEPAQUIT | PARASITOLOGIE |
| M. S. DUKIC..... | PHARMACOLOGIE - TOXICOLOGIE |
| MME S. GANGLOFF | BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE |
| M. D. GUILLAUME | CHIMIE THERAPEUTIQUE |
| M. M. KALTENBACH..... | PHARMACOLOGIE |
| MME C. LAVAUD | PHARMACOGNOSIE |
| M. R. LE NAOUR | IMMUNOLOGIE - BIOTECHNOLOGIE |
| MME C. MADOULET..... | BIOCHIMIE |
| M. J.M. MILLOT..... | CHIMIE ANALYTIQUE |
| MME C. MIRAND | CHIMIE ORGANIQUE |
| M. H. MORJANI | BIOCHIMIE |
| M. I. NABIEV | BIOPHYSIQUE-MATHEMATIQUES |
| M. O. PIOT | BIOPHYSIQUE-MATHEMATIQUES |
| M. J.H. RENAULT | PHARMACOGNOSIE |
| M. J. SAPI | CHIMIE THERAPEUTIQUE |
| M. D. SOCKALINGUM | BIOPHYSIQUE-MATHEMATIQUES |
| MME C. VAUTION | PHARMACIE GALENIQUE |
| MME L. VOUTQUENNE-NAZABADIOKO . | BOTANIQUE |

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITES

| | |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| M. A. ALABDULMAGID..... | BOTANIQUE |
| M. J.F. ANGIBOUST | BIOPHYSIQUE-MATHEMATIQUES |
| M. A. BELJEBBAR | CHIMIE ANALYTIQUE |
| MME H. BERBER..... | CHIMIE ORGANIQUE |
| MME E. BOURGUET | CHIMIE ORGANIQUE |
| MME E. BUACHE..... | BIOLOGIE MOLECULAIRE |
| MME M. CALLEWAERT..... | PHARMACIE GALENIQUE |
| MME M. COCHARD..... | CHIMIE THERAPEUTIQUE |
| M. G. COLLIN | BIOLOGIE MOLECULAIRE |
| M. O. DEBARGE..... | DROIT PHARMACEUTIQUE |
| M. C. DENHEZ..... | CHIMIE THERAPEUTIQUE |
| MME F. EDWARDS | PHARMACOTECHNIE |
| M. H. FERTÉ..... | PARASITOLOGIE |
| MME A. FOULEY | TOXICOLOGIE |
| MME CH. GAUVIN..... | CHIMIE ANALYTIQUE |
| M. S. GERARD..... | CHIMIE THERAPEUTIQUE |
| M. C. GOBINET | BIOPHYSIQUE-MATHEMATIQUES |
| MME L. HADJ-HENNI | PARASITOLOGIE |
| MME J. HUBERT | PHARMACOGNOSIE |
| M. D. JOUET..... | BIOCHIMIE CLINIQUE |
| M. P. LAMEIRAS..... | CHIMIE ORGANIQUE – CHIMIE ANALYTIQUE |
| M. B. LAMKHIOUED | IMMUNOLOGIE - BIOTECHNOLOGIE |
| MME H. MARTY..... | PHARMACOLOGIE |
| MME CH. MILLOT | PHYSIOLOGIE HUMAINE |
| MME F. REFFUVEILLE..... | MICROBIOLOGIE |
| MME E. SERRUROT-MILLEROT..... | TOXICOLOGIE |
| MME C. TOURNOIS-HIRZEL..... | HEMATOLOGIE |
| MME A. TRUSSARDI-REGNIER..... | BIOLOGIE CELLULAIRE |

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

| | |
|----------------------|--------------------|
| MME C. MONGARET..... | PHARMACIE CLINIQUE |
| M. F. SLIMANO..... | PHARMACOLOGIE |
| M. B. AZZOUZ | PHARMACOVIGILANCE |

ENSEIGNANT DU SECOND DEGRÉ

| | |
|-----------------------|---------|
| MME S. UMARJIKAR..... | ANGLAIS |
|-----------------------|---------|

A Monsieur Jérôme DEPAQUIT,

Professeur à la faculté de Pharmacie de Reims

Mille mercis d'avoir dirigé cette thèse.

Vous avez tout de suite su capter mon attention dès le premier cours,

Vous avez su entretenir en moi cet intérêt pour la parasitologie tout au long de ces années,

Depuis le temps que je voulais travailler dans le laboratoire, c'est maintenant chose faite.

Cela a été une chance inouïe de travailler à vos côtés durant cette thèse.

A Monsieur Vincent ROBERT

Directeur de recherches à l'IRD

Pour vos piégeages sans lesquels rien de tout cela n'aurait été possible.

Pour votre participation au séquençage de tous ces phlébotomes.

C'est pour moi une joie que vous assistiez à la présentation finale de ce travail.

A Madame Nicole LEGER

Professeur Honoraire à la faculté de Pharmacie de Reims,

Votre expertise sur les Phlébotomes, et notamment ceux de Madagascar est sans égale.

C'est un honneur que le Maître de mon Maître puisse juger cette thèse.

A Monsieur Jean-Charles Gantier

Professeur Honoraire à la faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry

Je vous remercie vivement de votre présence et suis ravi que votre expertise puisse critiquer ce travail.

A Fano RANDRIANAMBININTSOA, Laetitia LAROCHE et Vincent LUCAS,

Pour vos montages et les discussions au sujet de ces phlébotomes, vous avez grandement fait avancer ce travail.

A Denis AUGOT, Leila HADJ-HENNI, Hubert FERTE, Jean-Philippe MARTINET, Mireille COUSINAT, Véronique LEHRTER,

Car on ne perd jamais de temps à discuter, et vous m'avez aussi tous fait avancer dans ce travail.

A ma famille, mes parents bien-entendu, le Xou, la Thilde, mamie et Christine, vous êtes une base solide qui permet d'avancer sereinement.

A la mémoire de mes grands-pères, vous m'avez largement transmis votre curiosité, vous auriez aimé me voir parler d'un sujet comme celui-ci.

A Romain, toi tu es toujours là, et depuis longtemps en plus... kek ?

A Vivien, toi c'est un peu comme Romain mais depuis moins longtemps.

A Nicolas, une fois n'est pas coutume je vais devoir parler.

A Adrien et Irina, quoi, au dernier moment?

A Anne-Charlotte et Edouard, parce qu'avoir toujours quelque chose à se dire c'est un bon moteur d'amitié... Et un bon prétexte pour sortir.

A Mathieu et Gautier, la dream team plebs d'Asie.

A tous mes amis, de la fac et d'avant, merci de m'écouter parler, c'est toujours mieux quand on a quelqu'un devant soi.

Et comme toujours, à tous ceux que j'aurais oublié de citer, c'est même la majorité des personnes que je souhaite remercier.

Les opinions exprimées dans cette thèse n'engagent que son auteur et en aucun cas
l'UFR de Pharmacie de Reims.

INTRODUCTION

I. Introduction :

Les phlébotomes (Phlebotominae) sont des petits diptères hématophages appartenant à la famille des Psychodidés. Ils ont l'apparence de petits moucheron, caractérisés par leur aspect bossu. Mauvais voyageurs et volontiers cavernophiles, ils passent la journée dans les craquelures du sol et diverses anfractuosités; ils ne parcourent pas de grandes distances et restent localisés dans une zone. Leur vol est saccadé. Leur piqûre est plus douloureuse que celle des moustiques en raison de leur telmophagie.

Historiquement il y eu peu d'intérêt pour la faune phlébotomienne de Madagascar car malgré les premières descriptions d'Abonnenc en 1969 d'une espèce, *Phlebotomus madagascariensis* (Abonnenc 1969) ensuite devenu *Grassomyia madagascariensis* ils étaient considérés comme purement hépétophiles et donc comme présentant peu d'intérêt en santé humaine. Cependant des espèces anthropophiles sont mentionnées en 1978 par Léger et *al.* Depuis les années 2000, les travaux menés par J. Depaquit, N. Léger, V. Robert et F. Randrianambinintsoa ont fortement enrichi la faune de l'île continent.

L'étude des phlébotomes est vieille de plus de 100 ans notamment du fait de leur rôle dans la transmission d'arbovirus et de *Bartonella bacilliformis*. Mais leur intérêt majeur demeure celui de leur rôle dans la transmission des Leishmanies dont ils sont le vecteur quasiment exclusif. Elle est globalement cosmopolite. Les cycles se déroulent naturellement dans des zones endémiques dans lesquelles vivent les phlébotomes. Les symptomatologies sont très variées et il en existe trois grands types : cutanée, viscérale et cutanéomuqueuse. Cependant aucune leishmaniose n'est recensée à Madagascar et rien n'est connu sur la compétence et la capacité vectorielles des Phlébotomes malgaches.

L'île de Madagascar présente un très fort endémisme, dû à la dérive des continents énoncée par Wegener. En effet, l'île appartenant initialement au supercontinent Gondwana qui regroupait l'Australie, le sud de l'Afrique, l'Antarctique, l'Amérique, l'Inde ainsi que Madagascar s'est individualisée au fur et à mesure des ères géologiques. Dans un premier temps un bloc australo-indo-malgache s'individualise de l'Amérique du sud et de l'Afrique au Crétacé inférieur (de moins 135 à moins 100 MA) avec la création du canal Mozambique. L'océan indien apparaît au Crétacé supérieur (aux alentours de moins 120 MA) et isole Madagascar au nord et au sud. Ainsi les populations de l'île ont été longtemps isolées et l'endémisme y est marqué.

Les spécimens que nous avons étudiés proviennent de la région d'Ankarana, au nord du pays. C'est un tsingy calcaire typique de Madagascar caractérisé par des érosions induisant un réseau dense, quasiment infranchissable, de canyons, de falaises et de crevasses étroites. Ce lieu est idéal pour le développement et le piégeage des phlébotomes.

A ce jour, treize espèces de phlébotomes réparties en trois genres ont été décrites à Madagascar :

- Genre *Phlebotomus* :
 - *Ph. berentiensis* (Léger & Rodhain, 1978)
 - *Ph. fertei* Depaquit, Léger & Robert, 2002
 - *Ph. fontenillei* Depaquit, Léger & Robert, 2004
 - *Ph. vaomalamae* Randrianambinintsoa, Léger & Depaquit 2013
 - *Ph. vincenti* Randrianambinintsoa & Depaquit 2013

- Genre *Sergentomyia* :
 - *Se. huberti* (Depaquit, Léger & Robert, 2002)
 - *Se. goodmani* Léger, Depaquit & Robert, 2005
 - *Se. majungaensis* Depaquit, Léger & Robert, 2007
 - *Se. sclerosiphon* Depaquit, Léger & Robert, 2008
 - *Se. namo* Depaquit, Léger & Robert, 2008
 - *Se. anka* Depaquit, Léger & Robert, 2008
 - *Se. boironis* Randrianambinintsoa & Depaquit 2014

- Genre *Grassomyia* :
 - *Gr. madagascariensis* (Abonnenc, 1969)

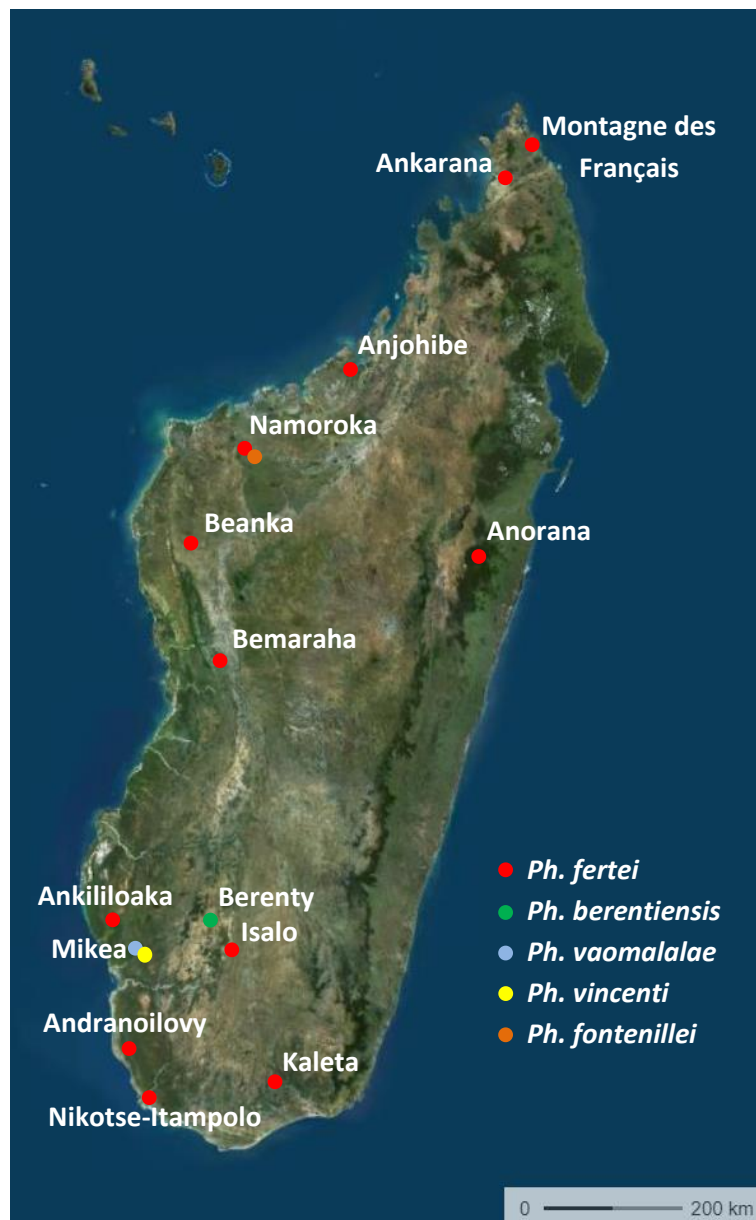


Figure 1 : répartition des phlébotomes du genre *Phlebotomus* à Madagascar

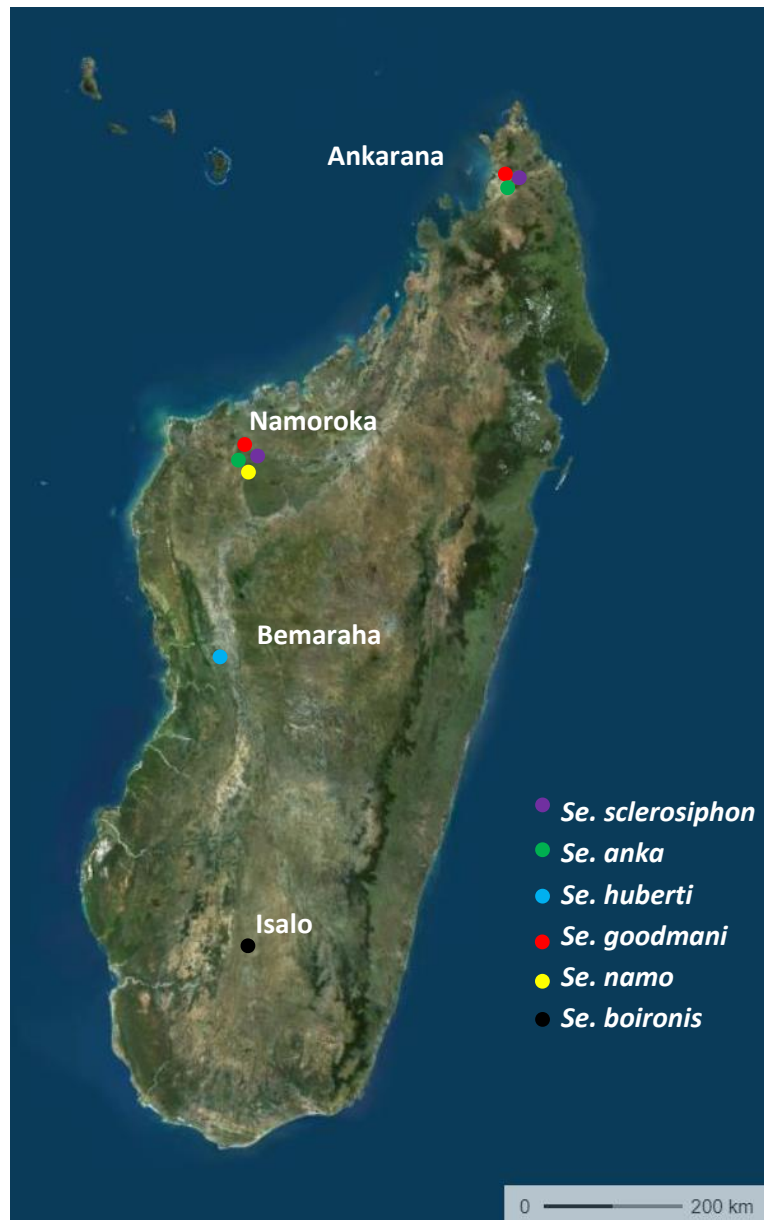


Figure 2 : répartition des phlébotomes du genre *Sergentomyia* à Madagascar

L'objectif de cette thèse est de réaliser un inventaire des phlébotomes de la région d'Ankarana grâce à une analyse morphologique couplée à une analyse moléculaire.

MATERIEL ET METHODES

2. Matériel et Méthodes :

2.1 Matériel :

Les phlébotomes étudiés sont issus de populations sauvages et ont été capturés par une équipe de l'IRD et de l'Institut Pasteur de Madagascar, principalement par Mr Vincent ROBERT.

La collecte a été effectuée loin de toute habitation (à une distance d'au moins 5 Km), dans le Parc National de l'Ankarana (province d'Antsiranana), dans les tsingy de Madagascar. Typiques de l'île ces tsingy sont des plateaux calcaires à faciès karstique. L'érosion a mis à jour de nombreuses cavités et la zone abonde en falaises, grottes, canyons et éboulis, la rendant propice au développement et à la capture des phlébotomes.

Tous les phlébotomes ont été collectés dans trois « localités » :

- Andrafiabe pour VR2 à VR29 et VR36 à VR39
 Campement Andrafiabe : 12°55'52,0"S ; 49°03'22,4"E 25m
 Grotte Andrafiabe : 12°55'48,2"S ; 49°03'33,7"E 25m
- Antsirohandoa pour VR30 à VR35
 Grotte squelette : 12°56'10,0"S ; 49°03'23,4"E 50m
- Aniloitra pour VR40 à VR45

Les spécimens étudiés ont été piégés entre les 20 et 26 mai 2003 et sont répertoriés dans le tableau en annexe 1. L'analyse moléculaire nécessitant des phlébotomes capturés vivants afin de mieux conserver l'ADN, il a été fait usage de pièges lumineux type CDC (Center for Diseases Control, Atlanta, USA).

Ces pièges comportent :

_Une ampoule de 0,3 A de faible luminosité,

_Un moteur alimentant un petit ventilateur qui entretient une aspiration de faible intensité,

_Un cylindre transparent qui protège l'ensemble lampe-moteur-ventilateur et qui porte généralement 4 piles rondes de 1,5 V assurant le fonctionnement de l'appareil.

Afin d'éviter la pénétration des insectes de grande taille, un grillage métallique couvre la partie supérieure.

La partie inférieure quant à elle s'ouvre sur une cage cylindrique de tissu à maille fine (type moustiquaire) que l'on peut ouvrir et fermer grâce à un cordon coulissant. Cette dernière permet la récupération des petits insectes attirés par la lumière et entraînés par l'aspiration créée par le ventilateur.

Tous les spécimens capturés sont ensuite prélevés et fixés dans de l'éthanol à 96° à -20°C pour l'analyse moléculaire.

2.2 Méthodes

Les échantillons conservés à -20°C sont initialement « rangés » par pièges dans des tubes. Le début du traitement consiste à prélever un individu dans une salière, commencer le montage (plusieurs méthodes) sur lame et prélever quelques segments du génitalia voire le thorax en entier et le placer dans un tube Eppendorf® de contenance 1,5mL stérile sec. C'est au début du montage que l'échantillon est identifié : VR [*numéro du piège*] MADA [*numéro de l'échantillon*]. Cet identifiant est reporté sur la lame et sur le tube Eppendorf®, le dernier étant congelé à sec à -20°C.

2.2.1 Montages :

Les phlébotomes étant petits et fragiles, les opérations de dissection s'opèrent sous loupe binoculaire avec de fines aiguilles. Afin d'éviter d'abimer les échantillons ou d'en perdre les étapes intermédiaires doivent être réduites et les bains/lavages sont réalisés à la suite dans des plaques de 24 puits. Chaque spécimen est traité individuellement en vue d'une possible exploitation en biologie moléculaire :

- 1^{ère} étape : chaque phlébotome est d'abord disséqué : les deux ailes sont séparées de l'abdomen et montées directement dans l'Euparal®. La tête, le thorax et l'appareil génital (partie distale de l'abdomen) sont séparés du reste du corps à l'aide d'aiguilles stériles qui sont changées pour chaque échantillon et placés dans la potasse à 10% pour lyser les tissus mous 12 à 24 heures. Quelques segments abdominaux sont découpés puis placés à sec au congélateur dans un tube bien identifié en vue d'une éventuelle exploitation moléculaire.
- 2^{ème} étape : Après deux lavages à l'eau distillée, la tête, le thorax et l'appareil génital sont placés dans le liquide de Marc André une nuit entière afin d'être éclaircis. Cette étape est nécessaire afin de faciliter l'observation de l'anatomie interne des phlébotomes, notamment le génitalia ou l'armature pharyngienne.
- 3^{ème} étape : Les organes sont à nouveau lavés trois fois, puis déshydratés par bains successifs d'alcool à 70° pendant 30 min puis d'alcool à 95° pendant une heure, le milieu de montage final n'étant pas compatible avec l'eau.
- 4^{ème} étape : La tête, trou occipital vers le haut, le thorax et le génitalia sont ensuite montés sur lame dans l'Euparal® puis mis à l'étuve à 37°C pour séchage pendant trois semaines.

Il est à noter que de plus anciens spécimens qui nous intéressent avaient été montés dans de la gomme au chloral, et pour certains *in toto*.

- 1^{ère} étape : Les phlébotomes sont déposés dans quelques gouttes de liquide de Marc-André sur une lame. L'éclaircissement est obtenu par chauffage direct de la lame à la flamme d'un briquet pendant 10 à 15 secondes.
- 2^{ème} étape : Le montage de la tête et de l'appareil génital (si le montage n'est pas *in toto*) est réalisé directement dans une goutte de gomme au chloral puis mis sous lamelle. Pour les spécimens *in toto*, la tête est néanmoins détachée du corps afin d'être orientée trou occipital vers le haut pour pouvoir observer l'armature pharyngienne.
- 3^{ème} étape : Les lames sont mises à sécher à l'étuve à 37°C pendant 5 à 7 jours.

Malheureusement les montages *in toto* ne permettent pas d'analyse moléculaire mais permettent une bonne vue d'ensemble des phlébotomes et n'empêchent pas les analyses morphométriques.

De plus la gomme au chloral permet de facilement observer certaines structures comme les dents, segments antennaires et spermathèques en plus d'offrir la possibilité de remontage de vieilles lames. En revanche elle offre une moins bonne conservation et des détails plus fins comme les denticules sont plus difficilement observables.

Certaines lames d'intérêt anciennes et montées dans la gomme au chloral ont justement nécessité un remontage afin de mieux observer les structures internes de la tête.

- 1^{ère} étape : Les lames sont placées quelques jours en chambre humide afin de liquéfier la résine. La chambre humide est représentée **figure 3**
- 2^{ème} étape : Une fois la résine liquide, la tête et le génitalia (pour certaines les ailes) sont remontés sur une autre lame dans une goutte de gomme au chloral.
- 3^{ème} étape : Les lames sont mises à sécher à l'étuve à 37°C pendant 5 à 7 jours.

Composition du liquide de Marc André (d'après Abonnenc, 1972) :

- | | |
|---------------------------------|-------|
| - Eau distillée | 30 ml |
| - Hydrate de chloral | 40g |
| - Acide acétique cristallisable | 30 ml |

Composition de la gomme au chloral :

- | | |
|----------------------|------|
| - Eau distillée | 50mL |
| - Hydrate de chloral | 50g |
| - Glycérine | 20mL |
| - Gomme arabique | 30g |

Toutes les lames sont conservées dans les collections du laboratoire de parasitologie de la faculté de Pharmacie de Reims.

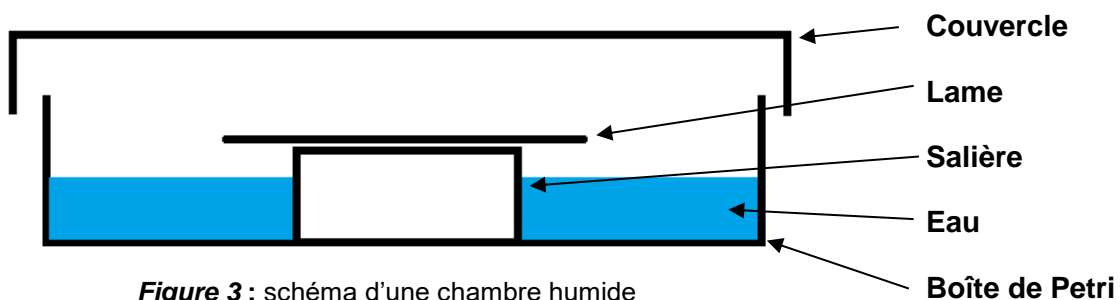


Figure 3 : schéma d'une chambre humide

2.2.2 Mesures :

La prise de mesure n'a pas été effectuée sur le genre *Phlebotomus* car les seuls présents dans cette zone étaient de l'espèce *Ph. fertei* et l'intérêt n'était pas aussi grand que pour les autres groupes. La détermination de l'espèce est morphologique et effectuée au microscope optique avant la prise de mesures.

La prise de mesures de certains segments d'intérêt permet d'une part de lisser les variations interindividuelles au sein d'une espèce en vue d'une future description ou de confirmer l'appartenance à une espèce déjà décrite et aussi d'essayer de discriminer les individus, si possible, d'une espèce par rapport à une autre, notamment dans le cas des *Vattieromyia* mâles.

a) Prise de mesures :

9 longueurs ont été mesurées sur l'ensemble des phlébotomes dont nous disposons d'Ankarana plus 1 moyenne et ce sur 595 individus.

Les segments mesurés sont les suivants :

-Troisième segment antennaire (AIII)

-Quatrième segment antennaire (AIV)

-Cinquième segment antennaire (AV)

-Les pièces buccales

-Premier segment du palpe (P1)

-Deuxième segment du palpe (P2)

-Troisième segment du palpe (P3)

-Quatrième segment du palpe (P4)

-Cinquième segment du palpe (P5)

-Moyenne des largeurs des troisièmes segments du palpe (LargeurP3). Cette dernière est due au fait que nous avons remarqué que les palpes de certains individus paraissent disproportionnés par rapport aux autres segments. La mesure est prise dans la plus grande largeur de chaque palpe, les deux mesures sont additionnées et divisées par deux.

A ces longueurs s'ajoutent le nombre de dents (nb dents 1R) et lorsqu'il y en a, de denticules (2R et 3R pour 2° et 3° rangée).

Les lames sont lues sur un microscope optique Olympus® BX61 (Japon) sur lequel a été monté une caméra et les acquisitions de mesures sont faites grâce au logiciel Stream Motion® (Japon) en traçant des lignes dont la longueur a été calibrée à l'objectif. Pour le P5 on utilise l'outil de traçage « ligne polygonale » afin de pouvoir suivre la courbe du dernier segment du palpe.

Les **figures 4 à 14** montrent comment ont été réalisées ces mesures.



Figure 4 : mesure AIII



Figure 5 : mesure AIV



Figure 6 : mesure AV



Figure 7 : mesure pièces buccales



Figure 8 : mesure P1



Figure 9 : mesure P2

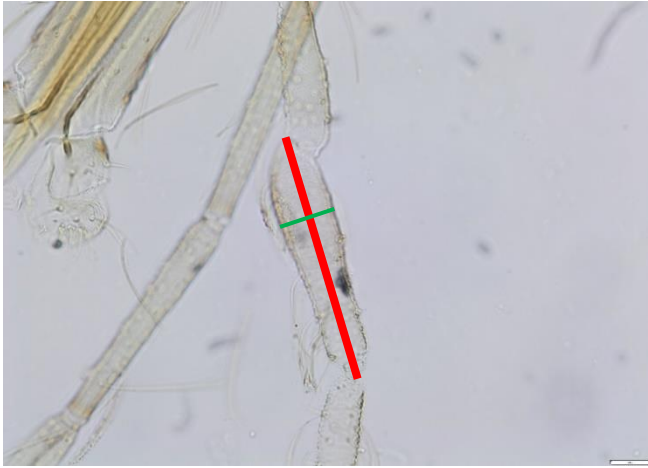


Figure 10 : mesure P3 et une largeur de P3

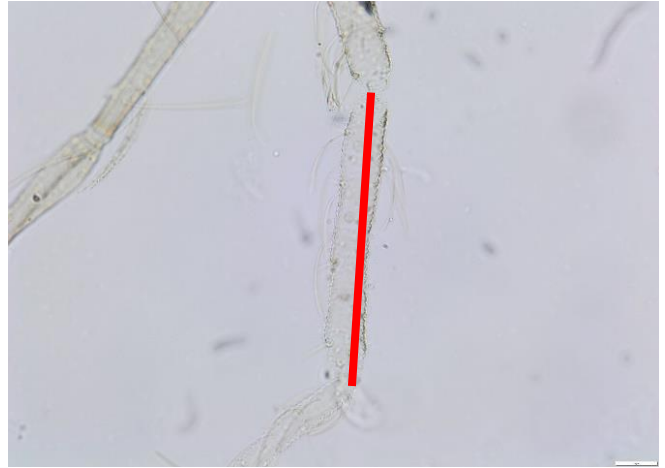


Figure 11 : mesure P4



Figure 12 : mesure P5

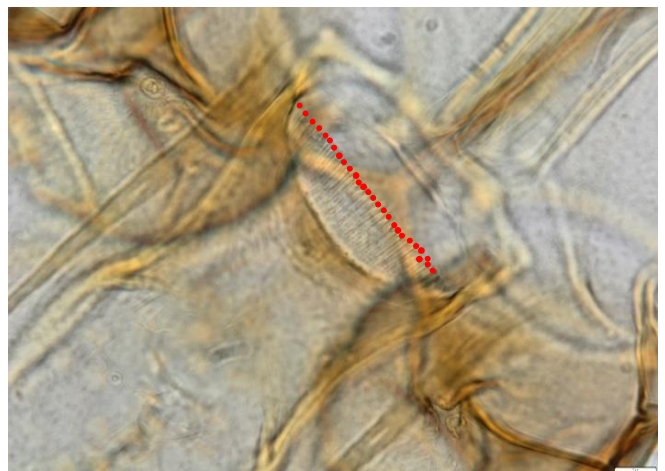


Figure 13 : comptage des dents 1R

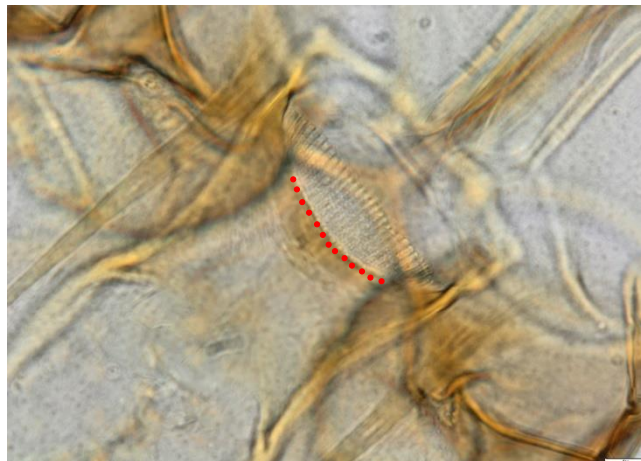


Figure 14 : comptage des denticules 2R

A ces mesures s'ajoutent seulement pour les mâles *Se. sp1* les mesures du génitalia (**fig. 15**). Les « soies internes » sont la somme des deux touffes de soies non caduques (après traitements à la potasse et au Marc-André) situées sur le gonocoxite.

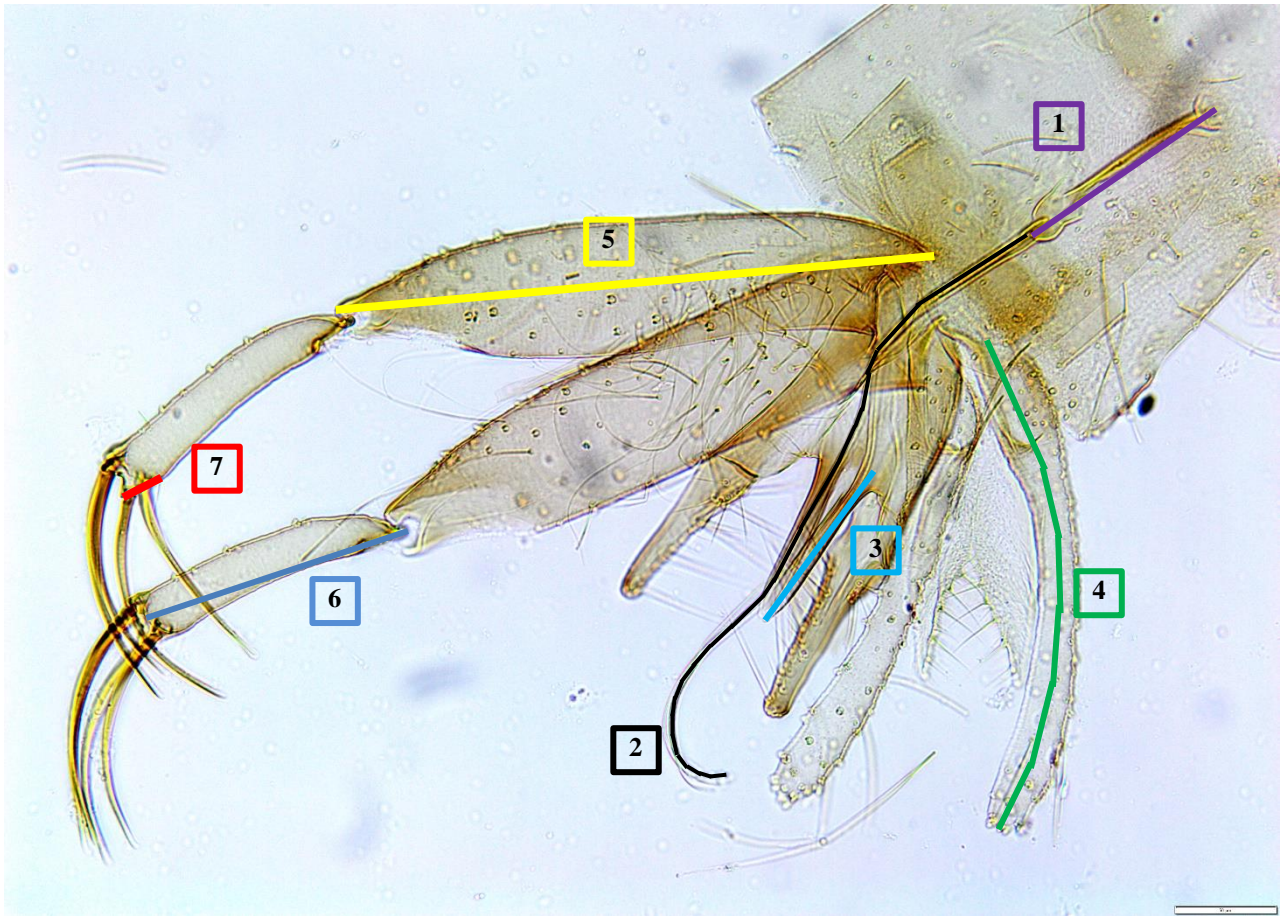


Figure 15 : mesures du génitalia chez *Se. sp1*. 1 : pompe génitale ; 2 : filament génital ; 3 : pénis ; 4 : surstyle ; 5 : gonocoxite ; 6 : gonostyle ; 7 : distance soie non caduque-extrémité distale du gonostyle

b) Analyse statistique :

Les paramètres statistiques sont calculés d'après les mesures obtenues par espèce et un test de normalité d'Agostino & Pearson est réalisé afin de savoir si la répartition des mesures d'un élément se distribue selon une loi normale.

2.2.3 Biologie moléculaire :

L'analyse de segments sélectionnées d'ADN se révèle très utile dans la détermination et la description d'une espèce. Même si elle ne remplace pas l'analyse morphologique elle permet de corroborer ou infirmer des hypothèses, lever des doutes ou mettre en évidence des problématiques imprévues.

Dans le cadre de l'inventaire des phlébotomes de la région d'Ankarana, l'analyse moléculaire nous permet d'individualiser des taxons et de les classer les uns par rapport aux autres.

Afin d'éviter toute contamination avec notre ADN ou d'introduire des enzymes destructrices d'ADN, le port de gants est obligatoire et une certaine stérilité doit être maintenue sur la paillasse de manipulation. Après chaque manipulation le plan de travail doit être nettoyé à l'eau de Javel pour détruire toute trace éventuelle d'ADN résiduel.

a) Extraction de l'ADN

La partie du corps mise de côté au moment du montage doit d'abord être décongelée à température ambiante.

Une centrifugation à 8700RPM pendant 15 secondes permet de faire tomber l'échantillon au fond du tube dans le cas où le matériel prélevé se trouverait en petite quantité afin de vérifier sa présence à la loupe binoculaire (cas de certains phlébotomes sur lesquels seulement quelques segments abdominaux avaient été gardés pour l'analyse moléculaire).

Le restant du corps doit ensuite être directement broyé à l'aide d'un piston pellet (Treff, Suisse) dans 20 μ L puis 160 μ L de tampon de lyse ATL. Le broyage est effectué directement dans le tube Eppendorf® stérile dans lequel a été conservé l'échantillon. Le tampon de lyse quant à lui est contenu dans le kit QIAmp DNA mini kit (Qiagen, Allemagne) et l'extraction est faite selon les instructions du fabricant. **(Annexe 2)**

-Le principe de l'extraction consiste à :

-Lyser les tissus

-Digérer les protéines (DNases, libérer l'ADN)

-Purifier l'ADN par passages successifs sur résine échangeuse d'ions.

Le volume d'élution finale qui représente le volume de notre extrait peut être compris entre 100 et 200 μ L. Pour les gros échantillons le volume final choisi était de 150 μ L, pour les petits échantillons le volume final était de 100 μ L.

L'extrait obtenu est conservé par congélation à -20°C.

b) Amplification de l'ADN

L'ADN extrait dans la première étape est inutilisable en l'état pour 2 raisons majeures :

-L'ADN est présent en trop petite quantité

-L'ADN extrait représente l'intégralité du génome et présente peu de zones d'intérêt.

L'amplification de fragments d'intérêt de l'ADN par PCR pallie à ces deux problèmes en même temps. En effet, la PCR ou Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne) permet la synthèse *in vitro* d'ADN. De plus, le gène qui sera copié et amplifié peut être sélectionné grâce à l'emploi d'amorces oligonucléotidiques qui s'hybrident sur la région d'intérêt du génome.

La PCR repose sur 3 étapes clefs successives et répétées en boucle :

-La dénaturation : Ouverture de la structure en double hélice de l'ADN et passage sous forme monocaténaire.

-L'hybridation : Les amorces sélectionnées viennent se coupler aux zones d'intérêt de l'ADN simple brin. Elles « encadrent » ainsi le gène à amplifier.

-L'élongation : Une polymérase thermostable, la *Taq* polymérase qui possède une activité enzymatique optimale à chaud, réplique le brin d'ADN à partir des amorces.

Quand l'élongation est finie, les brins nouvellement formés peuvent eux-mêmes servir de matrice pour les cycles suivants. Ainsi au fur et à mesure des cycles on obtient majoritairement des copies de la zone encadrée par les sondes spécifiques sélectionnés.

Les trois étapes décrites ci-dessus sont orchestrées par des changements très rapides de température. A chaque étape correspond une température : Celle de dénaturation de l'ADN se situe aux alentours des 100°C (Dans nos protocoles 94°C), celle de l'hybridation dépend de la température de fusion du couple d'amorces que l'on utilise et celle de l'élongation dépend de la *Taq* polymérase employée (Nous utilisons la *DreamTaq* DNA Polymerase® (Thermo Scientific®) qui a une température d'élongation optimale à 72°C)

Afin de réaliser ces changements de température et de les faire tourner en cycles, nous avons utilisé un thermocycleur Personal Mastercycler® (Eppendorf®, Allemagne) dans lequel nous avons édité nos programmes de PCR selon les gènes à amplifier.

Nous avons sélectionné deux couples d'amorces permettant d'amplifier deux gènes : CytB et D1D2

Tout d'abord le gène CytB (Cytochrome B) présente comme avantage d'être un marqueur mitochondrial (Depaquit, 2014). Ainsi il n'est censé être transmis que par la mère et n'est pas sujet aux recombinaisons génétiques ce qui en fait un bon marqueur spécifique.

Les mitochondries étant des organites présents en très grand nombre dans les cellules par rapport au noyau qui est unique, le matériel génétique est présent en plus grande quantité et le gène est, dans notre cas, plus facile à amplifier (les gènes n'étant pas toujours correctement amplifiés avec la PCR).

Cependant ce gène est très variable car soumis à de nombreuses mutations (n'étant pas autant protégé que le noyau) et peut faire apparaître des variations interindividuelles dans les arbres de classification, rendant plus difficile la démarcation d'un taxon. (visualisation de nombreuses variations intraspécifiques)

L'amplification du gène CytB se fait avec le couple d'amorces suivantes (Esseghir et *al.*, 1997) :

C3B : 5'-CAYATTCAACCGAATGATA-3'

N1N : 5'-GGTAYWTTGCCTCGAWTTCGWTATGA-3'

Le gène D1D2 quant à lui est un marqueur ribosomal beaucoup plus conservé que CytB codant le domaine D1D2 de la sous-unité 28S de l'ADN ribosomal. Moins variable il peut donner une idée d'ensemble de la position d'une espèce par rapport à une autre tout en lissant les variations interindividuelles. Cependant il s'amplifie avec un moins bon rendement et peut rendre difficile l'individualisation d'un taxon par rapport à un autre.

L'amplification du gène D1D2 se fait avec le couple d'amorces suivantes (Randrianambinintsoa et *al.*, 2014) :

C'1 : 5'-ACCCGCTGAATTTAAGCAT-3'

D2 : 5'-TCCGTGTTTCAAGACGGG-3'

Les programmes de PCR sont détaillés dans les **tableaux I et II**

Tableau I : Programme PHLECYTB, amorces C3B/N1N

| Température (°C) | Minutes | Cycles |
|------------------|---------|--------|
| 94 | 3 | 1 |
| 94 | 0.5 | 5 |
| 40 | 0.5 | |
| 72 | 1 | |
| 94 | 0.5 | 35 |
| 44 | 0.5 | |
| 72 | 1 | |
| 72 | 10 | 1 |
| 20 | ∞ | 1 |

Tableau II : Programme PhlebD12, amorces C'1/D2

| Température (°C) | Minutes | Cycles |
|------------------|---------|--------|
| 94 | 3 | 1 |
| 94 | 1 | 30 |
| 58 | 1 | |
| 72 | 1 | |
| 72 | 10 | 1 |
| 20 | ∞ | 1 |

En pratique pour réaliser une PCR on doit d'abord réaliser un « mix » qui contient tous les éléments nécessaires à l'amplification, l'élément déclencheur de chaque étape étant la chaleur programmée dans le thermocycleur. Ce mix est préparé dans un tube de 5mL et est aliquoté à raison de 45µL de mix par puits ou microtube. Les microtubes à parois fines (Eppendorf®, Allemagne) ou les plaques de 96 puits présentent tous un volume de remplissage de 0,2mL.

A 45 μ L de ce mix on ajoute 5 μ L d'extrait d'ADN afin d'obtenir un volume d'amplification final de 50 μ L. Un témoin positif avec un échantillon ayant déjà marché et un témoin négatif avec de l'eau sont aussi réalisés (5 μ L de chaque).

Cet amplificat final ne doit pas être congelé et ne doit surtout pas être ouvert dans la même salle servant aux manipulations d'extraction ou aux PCR car les puits contiennent tellement d'ADN qu'ils pourraient contaminer la salle.

| Composants | Quantité (pour 1) en μ L | Total (n+2) pour mix en μ L |
|--|------------------------------|---------------------------------|
| Eau purifiée de qualité biologie moléculaire | 38,15 | 38,15(n+2) |
| Solution tampon 10X | 5 | 5(n+2) |
| dNTP à 10mM | 0,8 | 0,8(n+2) |
| Amorce 1 (C3B ou C'1) | 0,4 | 0,4(n+2) |
| Amorce 2 (N1N ou D2) | 0,4 | 0,4(n+2) |
| Taq polymérase | 0,25 | 0,25(n+2) |
| | | |
| Extrait ADN | 5 | |
| Total | 50 | |

c) Migration

L'ADN amplifié doit être contrôlé afin de voir si la réaction de PCR a bien fonctionné. En effet, de nombreux facteurs peuvent empêcher le bon déroulement de la PCR comme une trop faible quantité initiale d'ADN (quantité finale d'ADN amplifié trop faible pour être détectée) ou au contraire une trop grande concentration qui augmente aussi la quantité en inhibiteurs. Une mauvaise affinité avec la Taq polymérase, une mauvaise hybridation des amorces, une contamination par des enzymes ou une mauvaise purification (DNases), un échec de l'extraction, une erreur de manipulation (préparation du mix), un thermocycleur défectueux etc... Les possibilités sont nombreuses et doivent être étudiées au cas par cas en cas d'échec.

Les réactifs manipulés présentant des risques pour la santé, cette étape doit se faire dans une salle réservée à cet effet et en pression négative. Ce contrôle étant qualitatif et non quantitatif, on cherche juste à voir si de l'ADN a été amplifié ou non et cela se traduit par la présence ou non d'une bande unique. Le contrôle consiste à faire migrer par électrophorèse la solution de PCR obtenue dans un gel d'agarose.

-1^{ère} étape : Couler un gel d'agarose à 1,5% (le gel est assez solide et permet une migration rapide) (voir **Annexe 3**) dans lequel on a incorporé du Gel Green à 0,005%V/V. Le Gel Green est un agent intercalant de l'ADN cancérigène qui possède l'avantage d'être moins dangereux que le BET (Bromure d'éthidium) tout en permettant une bonne révélation de l'ADN par fluorescence. Mettre le gel dans une cuve adaptée, le milieu de migration étant composé de TBE 1X.

-2^{ème} étape : Mélanger 5 μ L d'ADN à tester à 2 μ L de Bleu de Charge et déposer la totalité des 7 μ L obtenus dans chaque puits. Le Bleu de charge permet de garder l'ADN au fond du puits et de visualiser à l'œil nu l'extrait. Pendant la migration cette substance n'est pas retenue par le gel et permet de visualiser le front de migration. Déposer aussi dans le premier

puits de chaque ligne 3µL de solution de Poids Moléculaire. Cette solution est un mélange de fragments d'ADN de tailles et de poids connus et permet d'avoir une échelle pour la lecture des résultats.

-3^{ème} étape : Faire migrer l'ADN dans la cuve à 75V pendant au moins 20min (jusqu'à obtenir une migration suffisante, visualisable grâce au front de migration représenté par le bleu de charge.)

-4^{ème} étape : Révéler l'ADN au transilluminateur qui produit une lumière faisant fluorescer le Gel Green accroché à de l'ADN en vert. Un filtre orange est nécessaire pour observer cette fluorescence en toute sécurité (port de lunettes ou adaptation d'un filtre au transilluminateur).

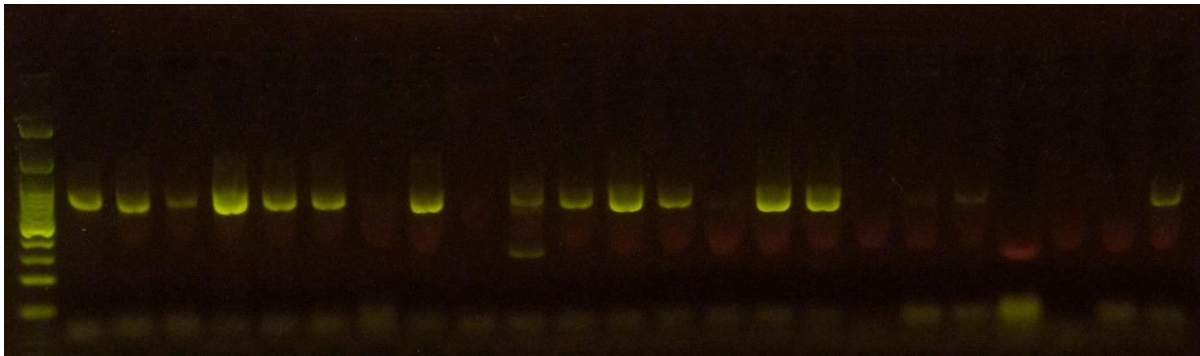
Plus un fragment d'ADN est petit et plus il migrera loin. L'échelle de Poids Moléculaire permet de vérifier la vraisemblance d'un résultat puisqu'un couple d'amorce amplifiera toujours un fragment de même longueur. Les témoins positifs et négatifs doivent être valides sinon toute la migration est ininterprétable.

Exemple de résultat :

Figure X : Migration du 15/06/2018

De Gauche à Droite :

PM ; MADA66 ; MADA196 ; MADA198 ; MADA282 ; MADA285 ; MADA375 ; MADA398 (+) ;
MADA409 ; MADA825 (-) ; MADA829 (à purifier) ; MADA832 ; MADA857 ; MADA861 ;
MADA897 (+) ; MADA973 ; MADA1003 ; MADA1355 (-) ; MADA1377 (+) ; MADA1015 ;
MADA1015 (-) ; MADA1015 (-) ; T- ; T+



PM = Poids Moléculaire

T- = témoin négatif (Eau)

T+ = témoin positif (Moustique CHAMP60)

Pour les MADA1015 nous avons expérimenté diverses concentrations d'extrait croissantes (5µL, 15µL et 30µL) en réduisant la proportion d'eau à chaque fois afin de maintenir une dilution des autres composants équivalente. On peut d'ailleurs voir que l'augmentation de la quantité d'ADN a inhibé la polymérisation et que la PCR a totalement échoué pour les hautes concentrations.

d) Séquençage de l'ADN amplifié :

Le séquençage est l'étape consistant à définir l'enchaînement nucléotidique des gènes amplifiés. Une différence de quelques nucléotides dans ces séquences peut permettre l'individualisation d'un taxon.

Il est réalisé par la société GeneWiz® (Royaume-Uni) selon la méthode de Sanger en double sens. L'envoi nécessite de transférer la totalité de notre volume d'amplificat dans les puits d'une plaque de 96 puits, le transfert se faisant dans la même salle que celle où nous avons effectué la migration. Les primers (amorces) sont dilués au dixième et 10µL de chaque primer est nécessaire pour chaque échantillon.

Le volume final de primers nécessaire est placé dans un tube de 1,5mL stérile Eppendorf® (Allemagne) et identifié par un cap marker (le séquençage étant automatisé). Le remplissage de la commande est totalement informatisé.

Les résultats nous sont livrés par mail sous forme d'électrophorégrammes au format .ABI.

e) Correction des séquences :

La correction des séquences s'effectue grâce aux logiciels Pregap4 et Gap5 (Bonfield et Staden, 1996). Tout d'abord les séquences sont alignées grâce au logiciel Pregap4, c'est un pré-traitement des fichiers chromatographiques de séquençage.

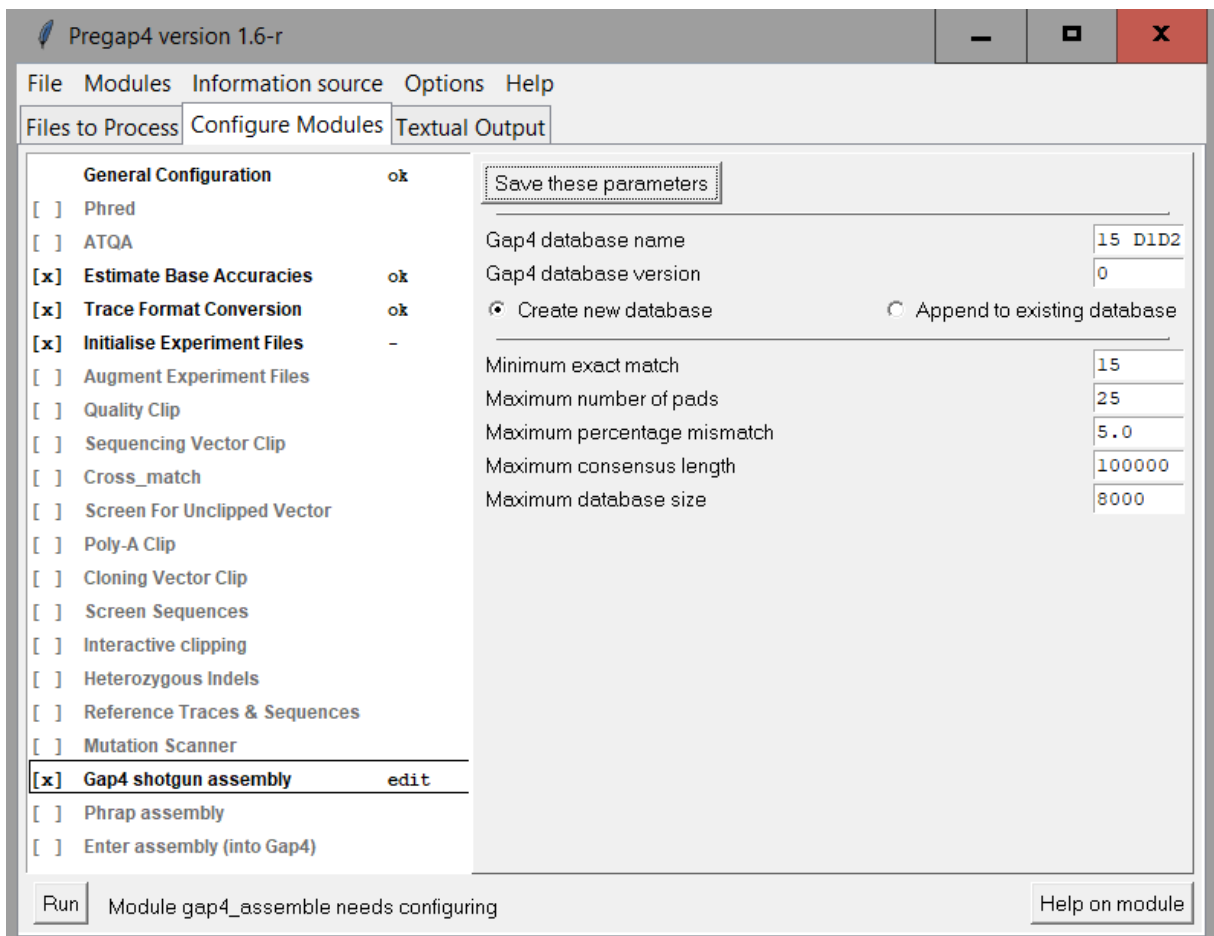


Figure 16 : aperçu du logiciel Pregap4 avec les options nécessaires au traitement

Les deux fichiers de séquences « sens » et « antisens » (lecture de l'ADN à partir d'une amorce et de l'autre) doivent être sélectionnés au format .ABI.

Les modules nécessaires sont sélectionnés comme sur la figure X ci-dessus et le nom des fichiers à créer est entré comme suit : MADA[n°] [gène].

Le logiciel aligne les séquences et crée un unique fichier au format .ABI

On utilise ensuite le logiciel Gap5 qui permet l'assemblage et la comparaison des séquences. Une des deux séquences est d'abord inversée afin de réaliser au mieux le complément de l'autre. Le logiciel trouve alors automatiquement des jonctions base à base (soit A-T et C-G) et affiche une séquence consensus.

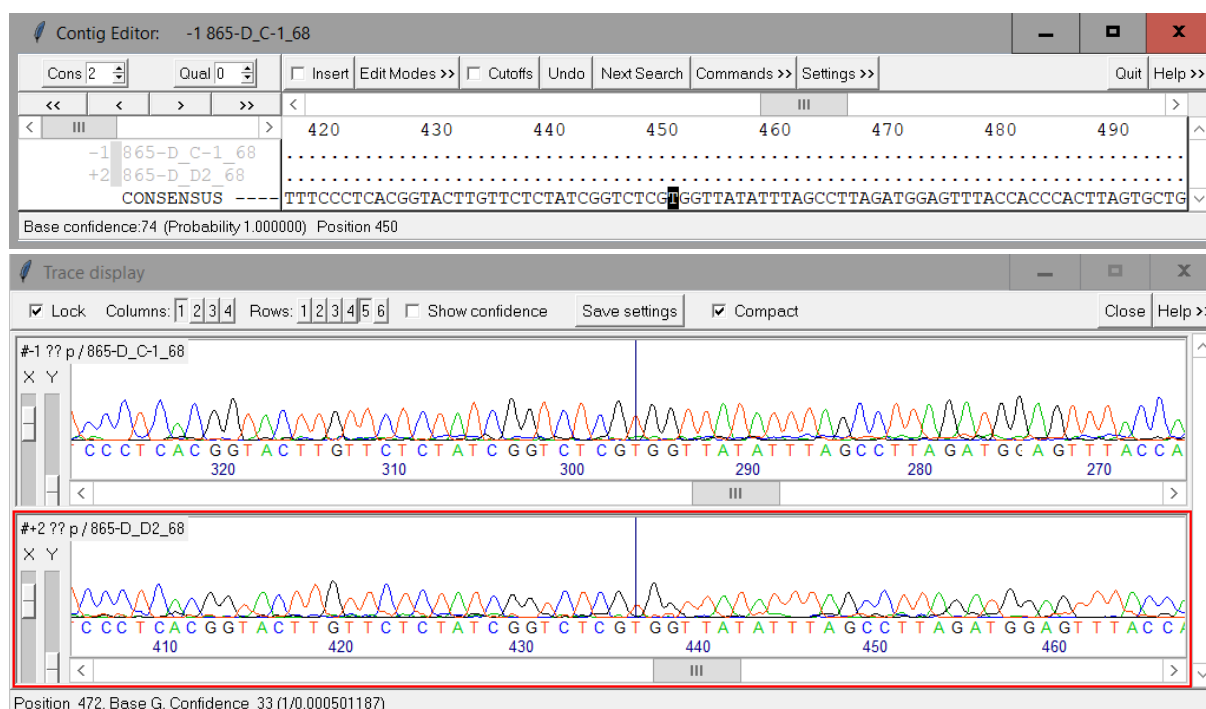


Figure 17 : correction d'une séquence consensus grâce à la mise en corrélation des deux électrophorégrammes, programme Gap5, logiciel STADEN PACKAGE

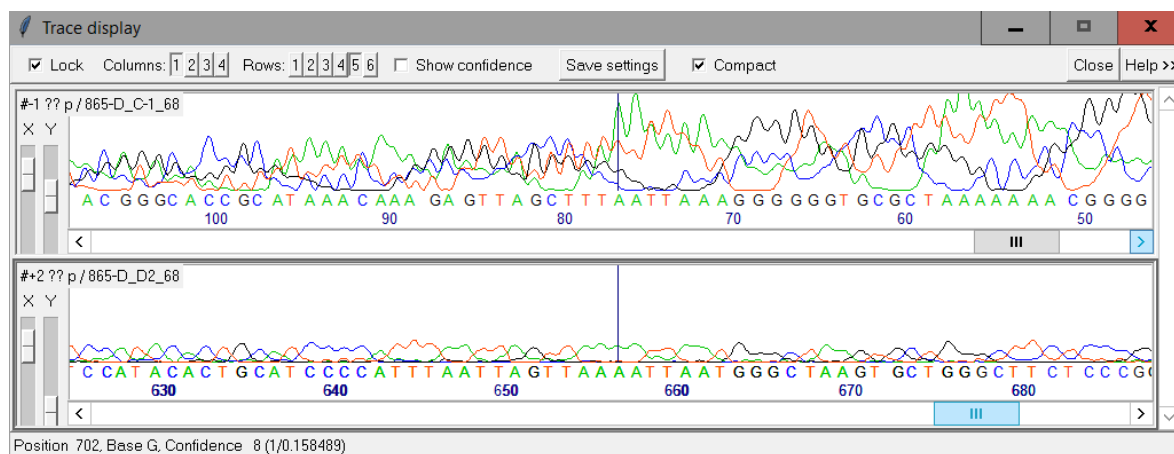


Figure 18 : exemple de bruit de fond en fin de réaction.

Cette dernière séquence comporte de nombreuses erreurs car les fragments ne sont pas forcément parfaitement alignés et la méthode de Sanger détecte mal les bases en début et en fin de réaction. La correction se fait manuellement sur la séquence consensus, cela permet de réaligner correctement les deux séquences et de lever des doutes par exemple liés au bruit de fond de la réaction ou à des hybridations non spécifiques.



Figure 19 : exemple de correction du bruit de fond grâce à la deuxième séquence

La séquence consensus corrigée est ensuite copiée et enregistrée au format fasta.

On peut noter qu'une séquence en CytB mesure environ 550pdb et qu'une séquence en D1D2 mesure environ 800pdb

Une fois que les séquences sont éditées, nous utilisons le logiciel MEGA 7 (Tamura et al, 2011) afin de les aligner et de réaliser une analyse par neighbor-joining en effectuant mille réplicats de bootstrap. Le résultat final est alors visualisable sous forme d'arbre.

RESULTATS

3. Résultats :

3.1 Inventaire des phlébotomes :

707 phlébotomes ont été observés sur la localité d'Ankarana. La détermination de ces derniers a été morphologique. Sur ces 707, 595 phlébotomes ont été mesurés, principalement des *Sergentomyia*.

Les résultats sont ventilés dans le tableau ci-dessous. *Se. sclerosiphon* est l'espèce la plus représentée avec près de 50% des captures suivie par *Se. anka* avec plus de 25% des individus capturés. Le genre *Phlebotomus* est représenté par *Ph. fertei* (17% des captures). Les autres espèces sont plus confidentielles. Hormis 5 *Grassomyia* non identifiés au niveau spécifique, on note la capture d'un seul exemplaire de *Se. goodmani* et celle de quatre espèces nouvelles pour la science sur des effectifs de un à quatre exemplaires et un seul sexe sauf *Se. sp1* capturée sur 30 exemplaires mâles et femelles.

Tableau III : Recensement et pourcentage des phlébotomes d'Ankarana par genre, sous-genre et espèce.

| | | | Femelles | Mâles | Total | Pourcentage par espèce | Pourcentage par sous-genre | Pourcentage par genre |
|---------------------|---------------------|---------------------|----------|-------|-------|------------------------|----------------------------|-----------------------|
| <i>Phlebotomus</i> | <i>Phlebotomus</i> | <i>fertei</i> | 38 | 82 | 120 | 16,97% | 16,97% | 16,97% |
| <i>Sergentomyia</i> | <i>Vattieromyia</i> | <i>sclerosiphon</i> | 202 | 150 | 352 | 49,79% | 75,25% | 82,32% |
| | | <i>anka</i> | 96 | 84 | 180 | 25,46% | | |
| | <i>Rondanomyia</i> | <i>goodmani</i> | 1 | 0 | 1 | 0,14% | 0,71% | |
| | | sp 2 | 4 | 0 | 4 | 0,57% | | |
| | à créer | sp 1 | 16 | 14 | 30 | 4,24% | 4,24% | |
| | non groupés | sp 3 | 1 | 0 | 1 | 0,14% | 0,28% | |
| | | sp 4 | 1 | 0 | 1 | 0,14% | | |
| | | non identifiés | | | 13 | 1,84% | 1,84% | |
| <i>Grassomyia</i> | | spp. | 3 | 2 | 5 | 0,71% | 0,71% | 0,71% |
| | | | | | 707 | 100,00% | 100,00% | 100,00% |

3.2 Morphométrie :

Les données morphométriques des 595 phlébotomes ont été analysées. Nous en présentons pour les espèces dont les effectifs sont suffisants, les statistiques descriptives ainsi que le résultat du passage de chaque variable du test de normalité d'Agostino et Pearson. En théorie, dans un effectif biologique, la distribution des valeurs suit une loi normale dans une population sans barrière reproductive. Cependant, pour certaines variables, il peut y avoir un biais lié à la mensuration elle-même. La mesure du cinquième segment du palpe, long et de structure souple, se repliant souvent et occupant volontiers l'épaisseur entre la lame et la lamelle, peut conduire parfois à une mesure erronée malgré l'utilisation de lignes polygonales.

La mesure des pièces buccales quant à elle dépend beaucoup de l'inclinaison de la tête et donc de la qualité du montage, une mauvaise orientation faussant les résultats.

Les dents, plus faciles à observer chez les passants ainsi le test de normalité.

Cependant les denticules parfois difficilement visibles présentent des valeurs aberrantes (0) et la distribution affichée par le test n'est pas très significative.

Tableau IV : statistiques descriptives et passage du test de normalité chez *Se. anka* mâle et diagrammes représentant la dispersion des valeurs en cas de non normalité du paramètre.

Sergentomyia anka – Mâles

| | A III | A IV | A V | Pièces buccales | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | dents 1R | dents 2R | dents 3R |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|----------|----------|
| Number of values | 79 | 78 | 76 | 83 | 83 | 81 | 79 | 77 | 76 | 75 | 74 | 76 |
| Minimum | 158 | 87.3 | 88.0 | 131 | 28.1 | 64.4 | 87.4 | 99.2 | 159 | 7.00 | 0.0 | 0.0 |
| 25% Percentile | 182 | 99.7 | 104 | 147 | 37.1 | 73.3 | 99.6 | 115 | 227 | 12.0 | 6.00 | 0.0 |
| Median | 193 | 105 | 108 | 155 | 40.0 | 78.0 | 105 | 122 | 247 | 14.0 | 7.00 | 0.0 |
| 75% Percentile | 205 | 110 | 113 | 160 | 43.9 | 80.9 | 109 | 126 | 259 | 16.0 | 8.00 | 0.0 |
| Maximum | 248 | 129 | 126 | 180 | 51.8 | 91.7 | 120 | 141 | 287 | 23.0 | 12.0 | 0.0 |
| Mean | 193 | 105 | 109 | 155 | 40.0 | 77.5 | 104 | 121 | 243 | 14.0 | 6.72 | 0.0 |
| Std. Deviation | 15.4 | 7.95 | 7.00 | 9.36 | 5.09 | 5.58 | 6.68 | 8.16 | 27.1 | 2.88 | 2.44 | 0.0 |
| Lower 95% CI of mean | 190 | 103 | 107 | 152 | 38.9 | 76.3 | 103 | 119 | 236 | 13.3 | 6.15 | 0.0 |
| Upper 95% CI of mean | 197 | 107 | 110 | 157 | 41.2 | 78.7 | 106 | 123 | 249 | 14.6 | 7.28 | 0.0 |
| D'Agostino & Pearson normality test | | | | | | | | | | | | |
| P value | 0.0620 | 0.5112 | 0.8290 | 0.5474 | 0.5269 | 0.5797 | 0.9262 | 0.9265 | 0.0016 | 0.0925 | 0.0001 | |
| Passed normality test (alpha=0.05)? | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | No | Yes | No | |
| P value summary | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ** | ns | *** | |

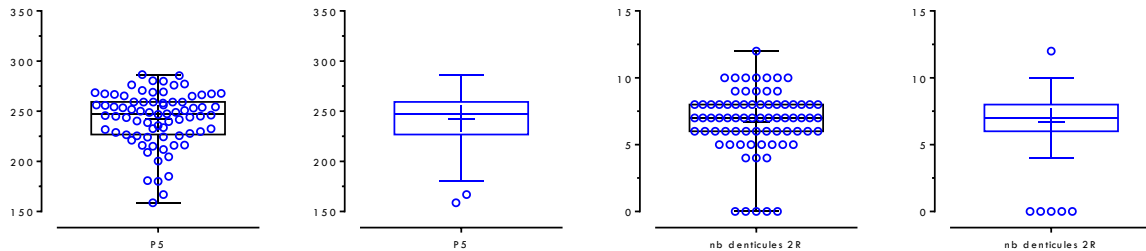


Tableau V : statistiques descriptives et passage du test de normalité chez *Se. anka* femelle et diagrammes représentant la dispersion des valeurs en cas de non normalité du paramètre.

Sergentomyia anka – Femelles

| | A.III | A.IV | A.V | Pièces buccales | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | nb dents | | |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|----------|----------|
| | | | | | | | | | | 1R | dents 2R | dents 3R |
| Number of values | 94 | 93 | 93 | 95 | 95 | 95 | 94 | 93 | 86 | 94 | 93 | 93 |
| Minimum | 159 | 87.3 | 91.5 | 153 | 25.1 | 72.3 | 88.8 | 109 | 200 | 30.0 | 5.00 | 0.0 |
| 25% Percentile | 187 | 99.2 | 103 | 187 | 38.9 | 84.4 | 112 | 127 | 255 | 36.0 | 7.00 | 3.00 |
| Median | 199 | 104 | 108 | 196 | 44.5 | 88.9 | 119 | 133 | 273 | 38.0 | 8.00 | 4.00 |
| 75% Percentile | 211 | 110 | 113 | 201 | 49.1 | 92.8 | 125 | 140 | 289 | 40.0 | 9.00 | 5.00 |
| Maximum | 235 | 124 | 124 | 218 | 60.7 | 108 | 136 | 160 | 312 | 45.0 | 11.0 | 7.00 |
| Mean | 198 | 104 | 108 | 193 | 43.5 | 88.6 | 118 | 133 | 268 | 37.7 | 7.99 | 3.92 |
| Std. Deviation | 16.5 | 7.82 | 6.89 | 11.3 | 7.63 | 6.93 | 8.29 | 9.51 | 27.6 | 3.31 | 1.25 | 1.30 |
| Std. Error of Mean | 1.71 | 0.810 | 0.714 | | 0.783 | 0.711 | 0.855 | 0.986 | 2.97 | 0.341 | 0.129 | 0.135 |
| Lower 95% CI of mean | 195 | 103 | 106 | 191 | 42.0 | 87.2 | 116 | 131 | 262 | 37.0 | 7.73 | 3.66 |
| Upper 95% CI of mean | 202 | 106 | 109 | 196 | 45.1 | 90.1 | 120 | 135 | 274 | 38.4 | 8.25 | 4.19 |
| D'Agostino & Pearson normality test | | | | | | | | | | | | |
| P value | 0.5682 | 0.7771 | 0.7750 | 0.0008 | 0.4487 | 0.7762 | 0.0531 | 0.2690 | 0.0339 | 0.7076 | 0.8065 | 0.6660 |
| Passed normality test (alpha=0.05)? | Yes | Yes | Yes | No | Yes | Yes | Yes | Yes | No | Yes | Yes | Yes |
| P value summary | ns | ns | ns | *** | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns | ns |

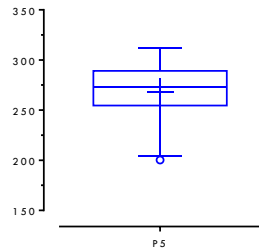
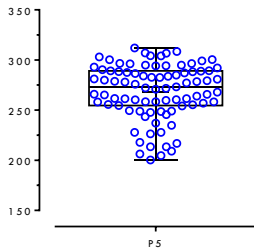


Tableau VI : statistiques descriptives et passage du test de normalité chez *Se. sclerosiphon* mâle et diagrammes représentant la dispersion des valeurs en cas de non normalité du paramètre.

Sergentomyia sclerosiphon - Mâles

| | A III | A IV | A V | Pièces buccales | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | dents 1R | dents 2R | dents 3R |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|----------|----------|
| Number of values | 148 | 147 | 141 | 148 | 146 | 146 | 140 | 138 | 134 | 136 | 133 | 132 |
| Minimum | 179 | 101 | 100 | 134 | 28.2 | 58.7 | 92.8 | 98.1 | 181 | 9.00 | 0.0 | 0.0 |
| 25% Percentile | 232 | 117 | 119 | 152 | 37.0 | 77.9 | 104 | 124 | 257 | 13.0 | 7.00 | 0.0 |
| Median | 244 | 122 | 123 | 159 | 40.6 | 81.7 | 109 | 131 | 281 | 14.0 | 8.00 | 0.0 |
| 75% Percentile | 255 | 127 | 127 | 164 | 44.5 | 86.7 | 114 | 136 | 297 | 16.0 | 10.0 | 0.0 |
| Maximum | 287 | 154 | 144 | 189 | 54.3 | 97.3 | 124 | 150 | 332 | 20.0 | 16.0 | 0.0 |
| Mean | 242 | 122 | 123 | 158 | 40.8 | 81.8 | 109 | 130 | 273 | 14.6 | 8.28 | 0.0 |
| Std. Deviation | 19.9 | 8.22 | 7.62 | 9.61 | 5.00 | 6.47 | 6.65 | 9.68 | 33.1 | 2.45 | 3.19 | 0.0 |
| Std. Error of Mean | 1.64 | 0.678 | 0.642 | 0.790 | 0.414 | 0.536 | 0.562 | 0.824 | 2.86 | 0.210 | 0.277 | 0.0 |
| Lower 95% CI of mean | 239 | 121 | 121 | 156 | 40.0 | 80.7 | 107 | 128 | 267 | 14.2 | 7.73 | 0.0 |
| Upper 95% CI of mean | 245 | 123 | 124 | 160 | 41.6 | 82.8 | 110 | 131 | 278 | 15.0 | 8.83 | 0.0 |
| D'Agostino & Pearson normality test | | | | | | | | | | | | |
| P value | 0.0161 | 0.0569 | 0.1675 | 0.6599 | 0.3338 | 0.0703 | 0.7581 | 0.0885 | 0.0013 | 0.1068 | <0.0001 | |
| Passed normality test (alpha=0.05)? | No | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | No | Yes | No | |
| P value summary | * | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ** | ns | **** | |

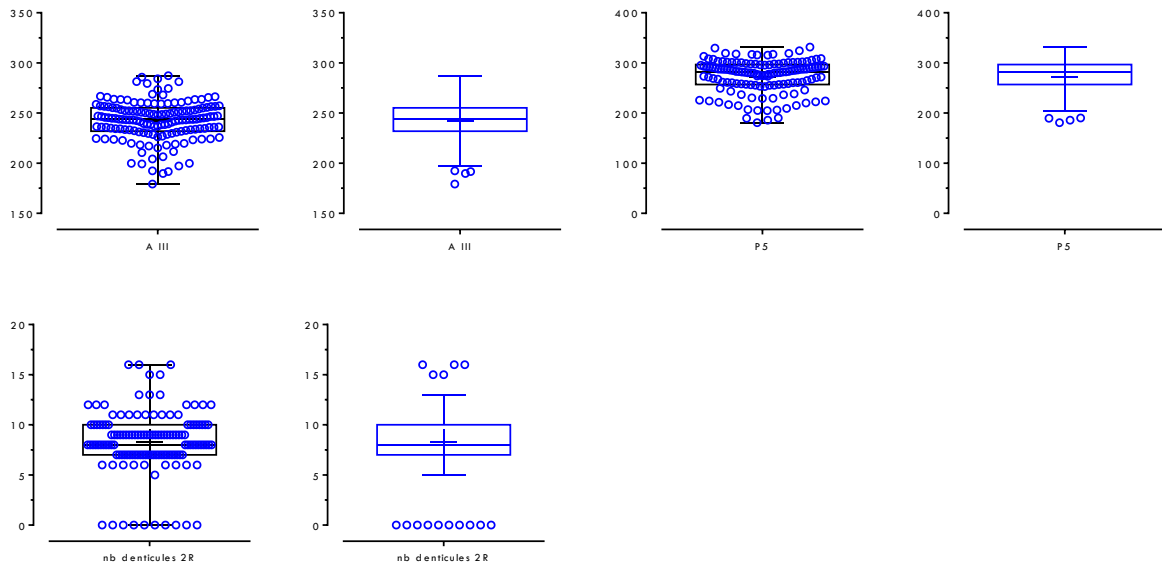


Tableau VII : statistiques descriptives et passage du test de normalité chez *Se. sclerosiphon* femelle et diagrammes représentant la dispersion des valeurs en cas de non normalité du paramètre.

Sergentomyia sclerosiphon - Femelles

| | A III | A IV | A V | Pièces buccales | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | dents 1R | dents 2R | dents 3R |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|-----------------|--------|--------|----------|--------|----------|----------|----------|----------|
| Number of values | 204 | 205 | 204 | 209 | 208 | 209 | 207 | 204 | 200 | 206 | 206 | 204 |
| Minimum | 196 | 103 | 104 | 168 | 25.4 | 71.9 | 99.4 | 115 | 168 | 21.0 | 7.00 | 0.0 |
| 25% Percentile | 252 | 120 | 120 | 189 | 41.6 | 86.7 | 120 | 141 | 282 | 25.0 | 13.0 | 0.0 |
| Median | 265 | 125 | 126 | 195 | 47.1 | 91.1 | 126 | 148 | 309 | 27.0 | 14.0 | 0.0 |
| 75% Percentile | 278 | 131 | 130 | 203 | 51.7 | 95.2 | 131 | 153 | 325 | 29.0 | 16.3 | 6.00 |
| Maximum | 331 | 145 | 144 | 230 | 63.1 | 111 | 142 | 186 | 356 | 34.0 | 22.0 | 15.0 |
| Mean | 264 | 125 | 125 | 196 | 46.4 | 90.5 | 125 | 147 | 299 | 26.9 | 14.5 | 2.73 |
| Std. Deviation | 20.7 | 8.20 | 7.78 | 9.54 | 7.18 | 6.54 | 7.66 | 10.8 | 38.0 | 2.76 | 2.85 | 4.42 |
| Std. Error of Mean | 1.45 | | 0.545 | 0.660 | 0.498 | 0.453 | 0.532 | 0.756 | 2.69 | 0.192 | 0.199 | 0.310 |
| Lower 95% CI of mean | 261 | 124 | 124 | 194 | 45.5 | 89.7 | 124 | 145 | 294 | 26.5 | 14.1 | 2.11 |
| Upper 95% CI of mean | 267 | 126 | 126 | 197 | 47.4 | 91.4 | 126 | 148 | 304 | 27.3 | 14.9 | 3.34 |
| D'Agostino & Pearson normality test | | | | | | | | | | | | |
| P value | 0.0055 | 0.1176 | 0.2383 | 0.3295 | 0.1179 | 0.5470 | < 0.0001 | 0.0490 | < 0.0001 | 0.5273 | 0.8229 | < 0.0001 |
| Passed normality test (alpha=0.05)? | No | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | No | No | No | Yes | Yes | No |
| P value summary | ** | ns | ns | ns | ns | ns | **** | * | **** | ns | ns | **** |

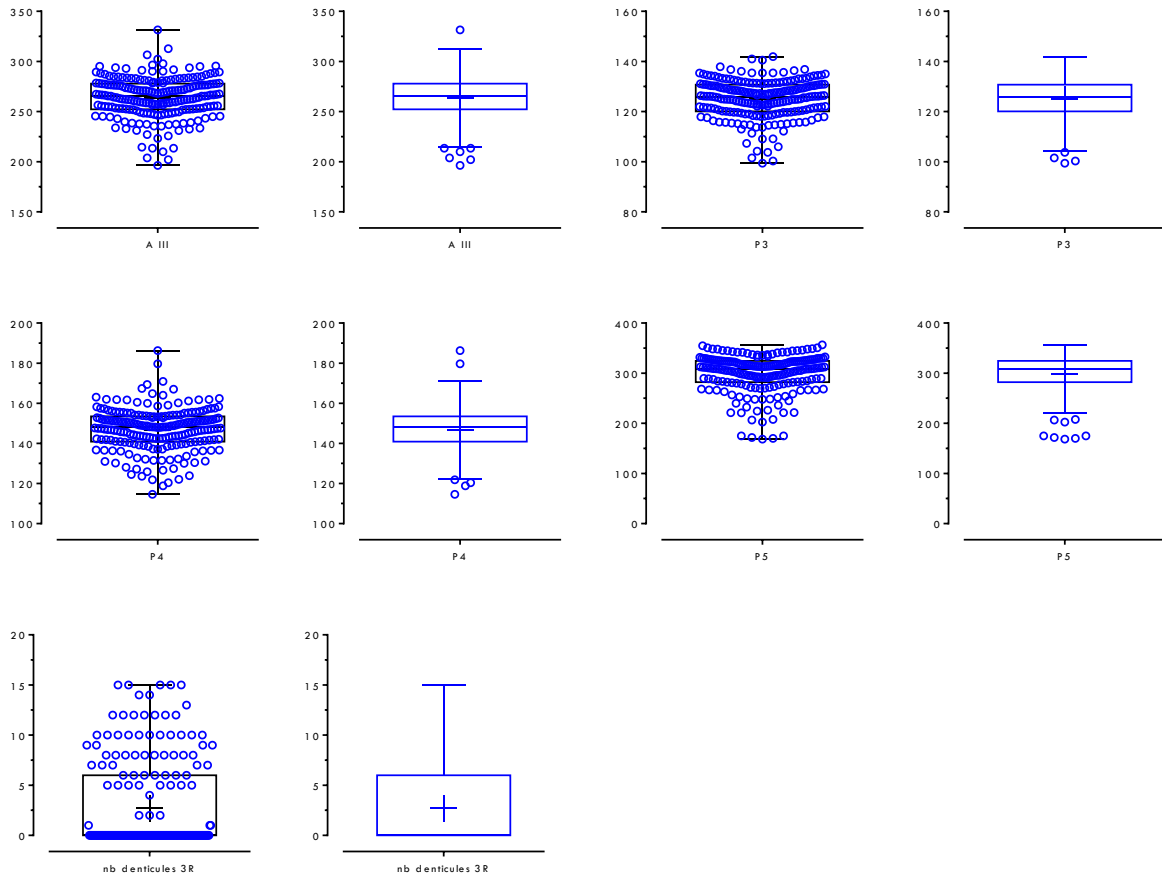


Tableau VIII : statistiques descriptives et passage du test de normalité chez *Se. sp1* mâle et diagrammes représentant la dispersion des valeurs en cas de non normalité du paramètre.

Sergentomyia Sp1 - Mâles

| | A III | A IV | A V | Pièces Buccales | P1 | P2 | P3 | largeur P3 | P4 | P5 | dents 1R | dents 2R | dents 3R |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|--------------------|--------|--------|--------|------------|--------|--------|----------|----------|----------|
| Number of values | 13 | 13 | 13 | 12 | 13 | 13 | 13 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| Minimum | 176 | 92.3 | 100 | 129 | 31.0 | 56.5 | 93.4 | 19.0 | 116 | 208 | 10.0 | 4.00 | 0.0 |
| 25% Percentile | 196 | 96.8 | 102 | 136 | 37.6 | 65.4 | 105 | 20.6 | 129 | 253 | 11.0 | 7.00 | 0.0 |
| Median | 206 | 101 | 105 | 141 | 41.0 | 77.1 | 115 | 22.0 | 137 | 279 | 12.0 | 8.00 | 0.0 |
| 75% Percentile | 228 | 108 | 114 | 149 | 45.0 | 82.4 | 118 | 24.5 | 145 | 305 | 14.0 | 9.75 | 0.0 |
| Maximum | 265 | 125 | 131 | 180 | 56.1 | 91.0 | 139 | 26.9 | 166 | 325 | 15.0 | 12.0 | 0.0 |
| Mean | 215 | 104 | 109 | 145 | 41.2 | 74.5 | 114 | 22.4 | 138 | 274 | 12.3 | 8.08 | 0.0 |
| Std. Deviation | 27.2 | 9.73 | 9.59 | 13.2 | 6.47 | 10.9 | 12.4 | 2.41 | 14.8 | 37.9 | 1.67 | 2.31 | 0.0 |
| Std. Error of Mean | 7.55 | 2.70 | 2.66 | 3.81 | 1.80 | 3.02 | 3.44 | 0.696 | 4.27 | 10.9 | 0.482 | 0.668 | 0.0 |
| Lower 95% CI of mean | 199 | 98.0 | 103 | 136 | 37.3 | 67.9 | 106 | 20.8 | 129 | 250 | 11.3 | 6.61 | 0.0 |
| Upper 95% CI of mean | 232 | 110 | 115 | 153 | 45.1 | 81.1 | 121 | 23.9 | 148 | 298 | 13.4 | 9.55 | 0.0 |
| D'Agostino & Pearson normality test | | | | | | | | | | | | | |
| P value | 0.4647 | 0.1120 | 0.0558 | 0.0015 | 0.2725 | 0.5404 | 0.6212 | 0.6239 | 0.4345 | 0.7414 | 0.5125 | 0.9936 | |
| Passed normality test (alpha=0.05)? | Yes | Yes | Yes | No | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes |
| P value summary | ns | ns | ns | ** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

| | Pompe Génitale | Filament | Pénis | Lobe Epandrial | Gonocoxite | Gonostyle | Distance Soie | Soies internes |
|-------------------------------------|-------------------|----------|--------|-------------------|------------|-----------|------------------|-------------------|
| Number of values | 12 | 12 | 12 | 12 | 13 | 13 | 12 | 14 |
| Minimum | 83.3 | 255 | 62.7 | 173 | 173 | 89.5 | 91.7 | 9.00 |
| 25% Percentile | 88.0 | 275 | 64.2 | 177 | 236 | 115 | 96.4 | 12.5 |
| Median | 90.9 | 292 | 69.6 | 186 | 248 | 119 | 103 | 15.5 |
| 75% Percentile | 98.3 | 322 | 75.3 | 209 | 280 | 142 | 117 | 19.3 |
| Maximum | 110 | 380 | 90.5 | 258 | 303 | 147 | 127 | 23.0 |
| Mean | 93.3 | 299 | 71.0 | 196 | 253 | 125 | 106 | 15.8 |
| Std. Deviation | 7.55 | 35.1 | 8.54 | 24.8 | 34.3 | 16.8 | 12.1 | 4.30 |
| Std. Error of Mean | 2.18 | 10.1 | 2.46 | 7.17 | 9.52 | 4.66 | | |
| Lower 95% CI of mean | 88.5 | 277 | 65.6 | 180 | 233 | 115 | 98.3 | 13.3 |
| Upper 95% CI of mean | 98.1 | 322 | 76.4 | 211 | 274 | 135 | 114 | 18.3 |
| D'Agostino & Pearson normality test | | | | | | | | |
| P value | 0.2426 | 0.1626 | 0.0828 | 0.0107 | 0.2454 | 0.7843 | 0.3544 | 0.7341 |
| Passed normality test (alpha=0.05)? | Yes | Yes | Yes | No | Yes | Yes | Yes | Yes |
| P value summary | ns | ns | ns | * | ns | ns | ns | ns |

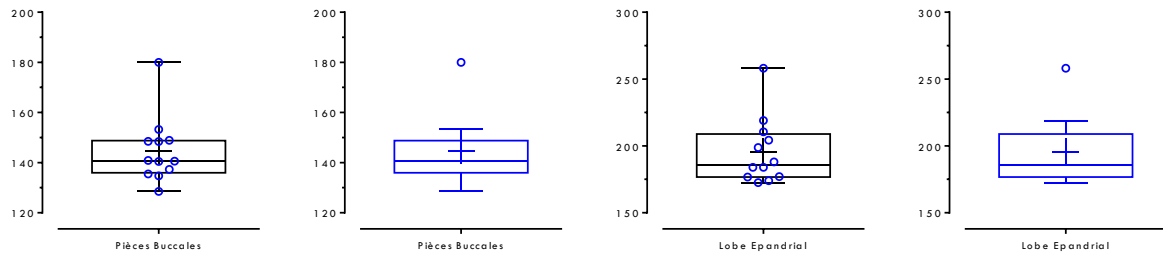
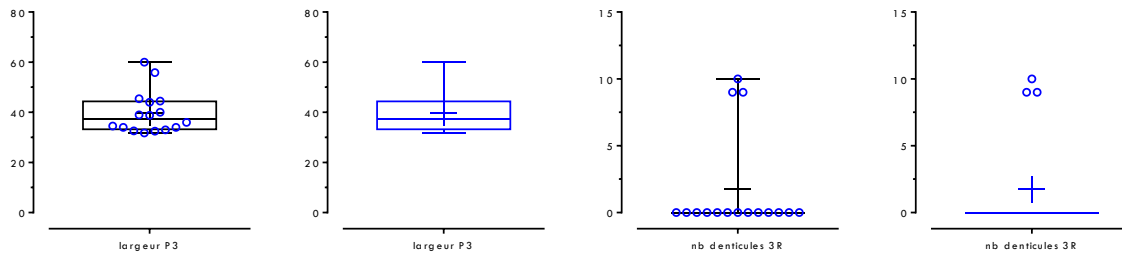


Tableau IX : statistiques descriptives et passage du test de normalité chez *Se. sp1* mâle et diagrammes représentant la dispersion des valeurs en cas de non normalité du paramètre.

Sergentomyia Sp1 - Femelles

| | A III | A IV | A V | Pièces buccales | P1 | P2 | P3 | largeur P3 | P4 | P5 | dents 1R | dents 2R | dents 3R |
|---|--------|--------|--------|--------------------|--------|--------|--------|---------------|--------|--------|----------|----------|----------|
| Number of values | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 |
| Minimum | 186 | 91.6 | 93.9 | 156 | 28.4 | 74.7 | 113 | 31.8 | 136 | 249 | 20.0 | 4.00 | 0.0 |
| 25% Percentile | 201 | 95.0 | 102 | 163 | 33.7 | 79.3 | 123 | 33.3 | 145 | 281 | 21.3 | 8.00 | 0.0 |
| Median | 220 | 99.5 | 105 | 175 | 45.1 | 85.4 | 132 | 37.4 | 153 | 304 | 23.5 | 11.0 | 0.0 |
| 75% Percentile | 234 | 105 | 111 | 182 | 49.5 | 96.4 | 135 | 44.4 | 162 | 335 | 29.5 | 12.0 | 0.0 |
| Maximum | 270 | 107 | 116 | 193 | 58.1 | 107 | 147 | 60.0 | 179 | 384 | 31.0 | 14.0 | 10.0 |
| Mean | 220 | 99.5 | 106 | 173 | 43.0 | 87.7 | 130 | 39.7 | 154 | 306 | 24.7 | 10.1 | 1.75 |
| Std. Deviation | 22.5 | 5.15 | 6.34 | 11.1 | 9.64 | 9.78 | 9.29 | 8.42 | 12.7 | 39.1 | 4.05 | 2.52 | 3.77 |
| Std. Error of Mean | 5.62 | 1.29 | 1.59 | 2.78 | 2.41 | 2.45 | 2.32 | 2.11 | 3.18 | 9.78 | 1.01 | 0.629 | 0.942 |
| Lower 95% CI of mean | 208 | 96.8 | 103 | 168 | 37.9 | 82.5 | 125 | 35.3 | 147 | 285 | 22.5 | 8.72 | -0.258 |
| Upper 95% CI of mean | 232 | 102 | 109 | 179 | 48.2 | 93.0 | 135 | 44.2 | 160 | 327 | 26.8 | 11.4 | 3.76 |
| D'Agostino & Pearson normality test P value | 0.5239 | 0.1737 | 0.9472 | 0.4650 | 0.3714 | 0.4085 | 0.9958 | 0.0318 | 0.7969 | 0.8843 | 0.1419 | 0.1947 | 0.0070 |
| Passed normality test (alpha=0.05)? | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | No | Yes | Yes | Yes | Yes | No |
| P value summary | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns | ns | ns | ** |



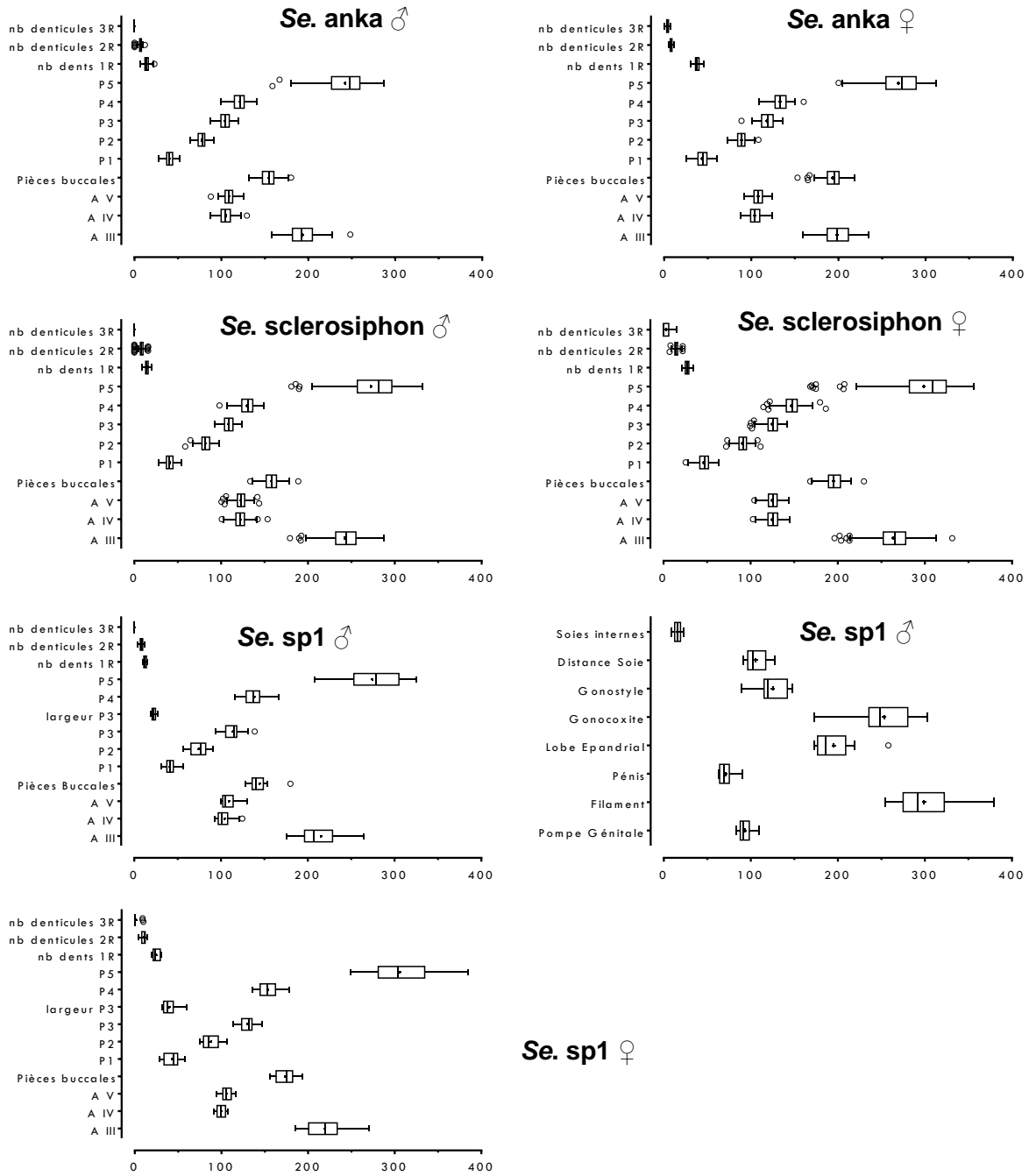


Figure 20 : résumé des dispersions des paramètres par espèce par rapport à un intervalle de confiance à 95%

3.3 Biologie moléculaire :

79 spécimens ont été séquencés en Cytochrome b et 71 pour les domaines D1 et D2. L'analyse en Neighbor-Joining a permis la construction d'arbres (figures 21 et 22). Les valeurs de bootstrap sont indiquées pour chaque nœud. A l'exception des espèces *Se. namo* et *Se. anka* qui ne sont pas différenciées avec les séquences de D1-D2, toutes les espèces sont individualisées, quel que soit le marqueur moléculaire utilisé.

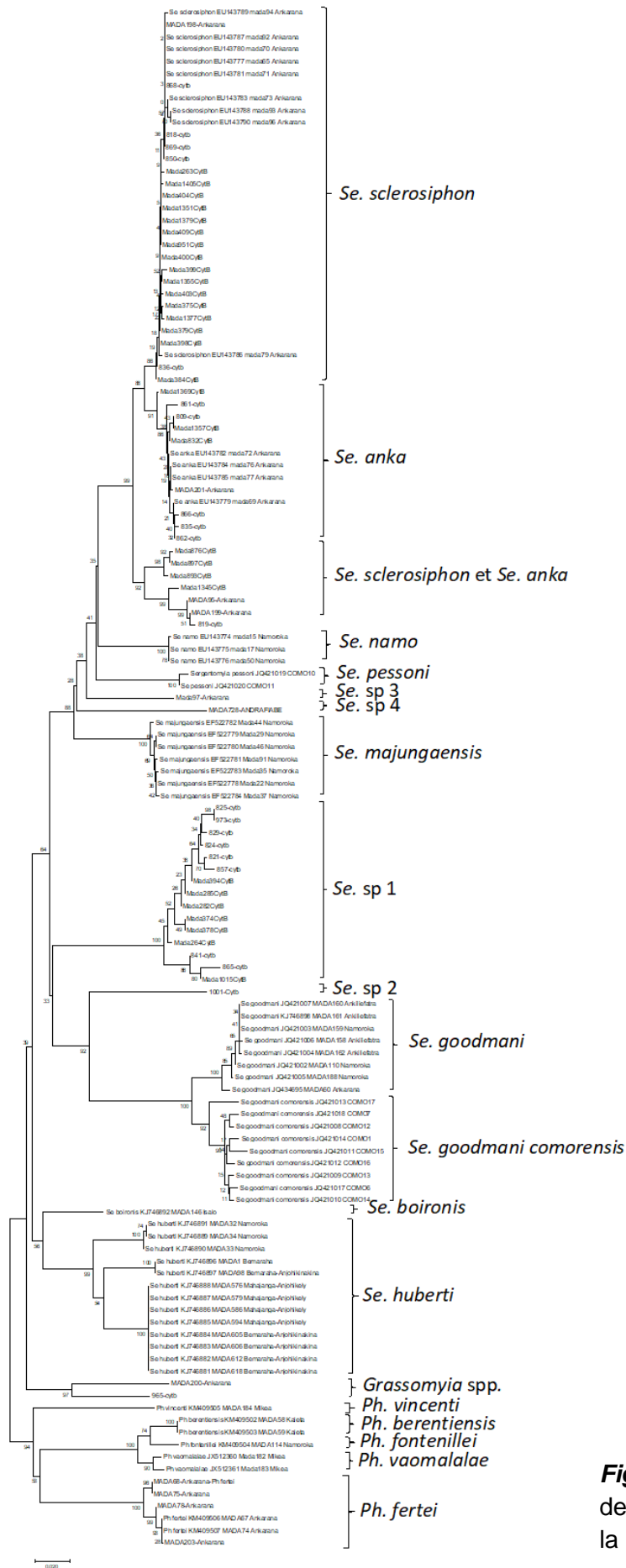


Figure 21 : arbre obtenu par analyse des séquences du cytochrome B par la méthode de neighbor-joining.

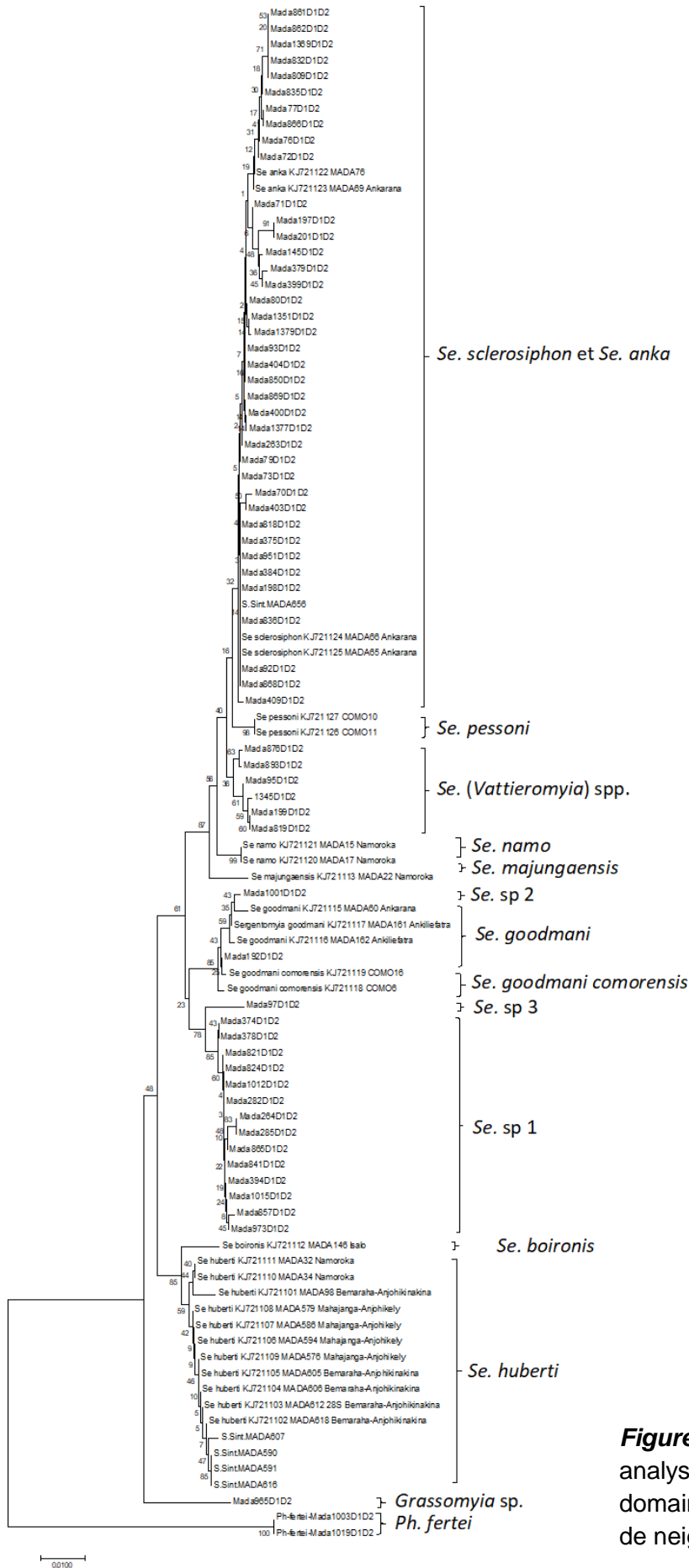


Figure 22: arbre obtenu par analyse des séquences dans les domaines D1 et D2 par la méthode de neighbor-joining.

La variabilité interspécifique et la variabilité infraspécifique sont présentées pour chaque marqueur dans les tableaux ci-dessous.

Tableau X : Pourcentages de variabilité en cytochrome B

| | <i>Se. huberti</i> | <i>Se. namo</i> | <i>Se. majungaensis</i> | <i>Ph. berentensis</i> | <i>Se. goodmani</i> | <i>Se. sclerosiphon</i> | <i>Ph. fertei</i> | <i>Se. anka</i> | <i>Se. (Vattieromyia). spp.</i> | <i>Se. sp3</i> | <i>Ph. fontenillei</i> | <i>Se. boironis</i> | <i>Ph. vaomalalae</i> | <i>Ph. vincenti</i> | <i>Grassomyia. spA</i> | <i>Se. sp1</i> | <i>Grassomyia. spB</i> | <i>Se. sp2</i> | <i>Se. goodmani. comorensis</i> | <i>Se. pessoni</i> | <i>Se. sp4</i> | |
|---------------------------------|--------------------|-----------------|-------------------------|------------------------|---------------------|-------------------------|-------------------|-----------------|---------------------------------|----------------|------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|------------------------|----------------|------------------------|----------------|---------------------------------|--------------------|----------------|--|
| <i>Se. huberti</i> | 0,033 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Se. namo</i> | 0,138 | 0,001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Se. majungaensis</i> | 0,138 | 0,106 | 0,004 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Ph. berentensis</i> | 0,169 | 0,180 | 0,186 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Se. goodmani</i> | 0,177 | 0,170 | 0,184 | 0,212 | 0,006 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Se. sclerosiphon</i> | 0,143 | 0,077 | 0,095 | 0,188 | 0,177 | 0,003 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Ph. fertei</i> | 0,160 | 0,188 | 0,175 | 0,146 | 0,215 | 0,171 | 0,006 | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Se. anka</i> | 0,143 | 0,085 | 0,111 | 0,180 | 0,176 | 0,027 | 0,168 | 0,005 | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Se. (Vattieromyia). spp.</i> | 0,154 | 0,086 | 0,106 | 0,188 | 0,174 | 0,044 | 0,178 | 0,045 | 0,024 | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Se. sp3</i> | 0,146 | 0,100 | 0,104 | 0,173 | 0,179 | 0,093 | 0,168 | 0,098 | 0,109 | - | | | | | | | | | | | | |
| <i>Ph. fontenillei</i> | 0,164 | 0,178 | 0,175 | 0,032 | 0,213 | 0,186 | 0,144 | 0,182 | 0,194 | 0,176 | - | | | | | | | | | | | |
| <i>Se. boironis</i> | 0,091 | 0,105 | 0,119 | 0,153 | 0,164 | 0,117 | 0,143 | 0,120 | 0,122 | 0,112 | 0,151 | - | | | | | | | | | | |
| <i>Ph. vaomalalae</i> | 0,161 | 0,169 | 0,158 | 0,043 | 0,202 | 0,180 | 0,135 | 0,177 | 0,183 | 0,169 | 0,032 | 0,142 | 0,012 | | | | | | | | | |
| <i>Ph. vincenti</i> | 0,166 | 0,173 | 0,161 | 0,148 | 0,170 | 0,172 | 0,139 | 0,173 | 0,183 | 0,169 | 0,144 | 0,132 | 0,148 | - | | | | | | | | |
| <i>Grassomyia. spA</i> | 0,139 | 0,155 | 0,155 | 0,172 | 0,200 | 0,162 | 0,184 | 0,163 | 0,169 | 0,151 | 0,170 | 0,133 | 0,165 | 0,186 | - | | | | | | | |
| <i>Se. sp1</i> | 0,155 | 0,137 | 0,139 | 0,200 | 0,193 | 0,152 | 0,197 | 0,157 | 0,157 | 0,147 | 0,212 | 0,134 | 0,200 | 0,199 | 0,164 | 0,016 | | | | | | |
| <i>Grassomyia. spB</i> | 0,134 | 0,130 | 0,156 | 0,153 | 0,179 | 0,154 | 0,154 | 0,147 | 0,155 | 0,146 | 0,150 | 0,128 | 0,154 | 0,168 | 0,101 | 0,147 | - | | | | | |
| <i>Se. sp2</i> | 0,164 | 0,151 | 0,152 | 0,230 | 0,149 | 0,154 | 0,214 | 0,164 | 0,161 | 0,170 | 0,240 | 0,157 | 0,224 | 0,198 | 0,186 | 0,162 | 0,173 | - | | | | |
| <i>Se. goodmani. comorensis</i> | 0,176 | 0,175 | 0,178 | 0,214 | 0,053 | 0,178 | 0,217 | 0,172 | 0,177 | 0,183 | 0,219 | 0,168 | 0,198 | 0,178 | 0,203 | 0,194 | 0,181 | 0,154 | 0,018 | | | |
| <i>Se. pessoni</i> | 0,148 | 0,093 | 0,109 | 0,190 | 0,178 | 0,089 | 0,165 | 0,091 | 0,097 | 0,116 | 0,193 | 0,127 | 0,190 | 0,174 | 0,170 | 0,139 | 0,140 | 0,166 | 0,181 | 0,005 | | |
| <i>Se. sp4</i> | 0,163 | 0,124 | 0,124 | 0,215 | 0,182 | 0,125 | 0,215 | 0,124 | 0,135 | 0,133 | 0,220 | 0,165 | 0,207 | 0,200 | 0,184 | 0,168 | 0,176 | 0,173 | 0,182 | 0,122 | - | |

Tableau XI : Pourcentages de variabilité en D1D2

| | <i>Se. namo</i> | <i>Se. majungaensis</i> | <i>Se. huberti</i> | <i>Se. goodmani</i> | <i>Se. sclerosiphon</i> | <i>Se. anka</i> | <i>Se. (Vattieromyia). spp.</i> | <i>Se. sp3</i> | <i>Se. boironis</i> | <i>Se. sp1</i> | <i>Grassomyia. sp</i> | <i>Se. sp2</i> | <i>Ph. fertei</i> | <i>Se. goodmani. comorensis</i> | <i>Se. pessoni</i> |
|---------------------------------|-----------------|-------------------------|--------------------|---------------------|-------------------------|-----------------|---------------------------------|----------------|---------------------|----------------|-----------------------|----------------|-------------------|---------------------------------|--------------------|
| <i>Se. namo</i> | 0 | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Se. majungaensis</i> | 0,015 | - | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Se. huberti</i> | 0,030 | 0,034 | 0,001 | | | | | | | | | | | | |
| <i>Se. goodmani</i> | 0,026 | 0,024 | 0,030 | 0,003 | | | | | | | | | | | |
| <i>Se. sclerosiphon</i> | 0,012 | 0,016 | 0,027 | 0,024 | 0,002 | | | | | | | | | | |
| <i>Se. anka</i> | 0,012 | 0,020 | 0,033 | 0,027 | 0,006 | 0,003 | | | | | | | | | |
| <i>Se. (Vattieromyia). spp.</i> | 0,010 | 0,017 | 0,034 | 0,030 | 0,008 | 0,008 | 0,004 | | | | | | | | |
| <i>Se. sp3</i> | 0,030 | 0,025 | 0,035 | 0,020 | 0,026 | 0,028 | 0,030 | - | | | | | | | |
| <i>Se. boironis</i> | 0,034 | 0,035 | 0,012 | 0,031 | 0,033 | 0,038 | 0,038 | 0,037 | - | | | | | | |
| <i>Se. sp1</i> | 0,027 | 0,025 | 0,030 | 0,017 | 0,021 | 0,025 | 0,026 | 0,013 | 0,032 | 0,001 | | | | | |
| <i>Grassomyia. sp</i> | 0,043 | 0,043 | 0,037 | 0,032 | 0,044 | 0,045 | 0,046 | 0,041 | 0,039 | 0,034 | - | | | | |
| <i>Se. sp2</i> | 0,027 | 0,023 | 0,029 | 0,005 | 0,026 | 0,028 | 0,032 | 0,019 | 0,032 | 0,019 | 0,030 | - | | | |
| <i>Ph. fertei</i> | 0,110 | 0,115 | 0,101 | 0,106 | 0,112 | 0,116 | 0,119 | 0,110 | 0,104 | 0,116 | 0,111 | 0,105 | 0 | | |
| <i>Se. goodmani. comorensis</i> | 0,023 | 0,026 | 0,031 | 0,005 | 0,021 | 0,024 | 0,027 | 0,020 | 0,032 | 0,018 | 0,032 | 0,008 | 0,107 | 0,003 | |
| <i>Se. pessoni</i> | 0,013 | 0,018 | 0,031 | 0,026 | 0,007 | 0,011 | 0,012 | 0,027 | 0,033 | 0,022 | 0,047 | 0,024 | 0,109 | 0,025 | 0 |

DISCUSSION

4. Discussion :

4.1 Monographies :

4.1.1 *Sergentomyia sclerosiphon* :

202 femelles et 150 mâles ont été mesurés et observés. Leurs caractéristiques sont globalement conformes à la description proposée par Depaquit, Léger & Robert, 2008.

L'étude moléculaire confirme bien l'individualisation de ce taxon avec les séquences de CytB mais pas avec les séquences de D1D2).

Figures 22 à 26 : Femelle de *Se. sclerosiphon* :



Figure 22 : dents du cibarium

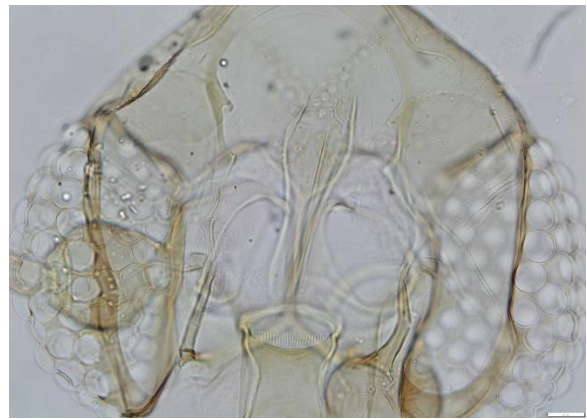


Figure 23 : cibarium et pharynx

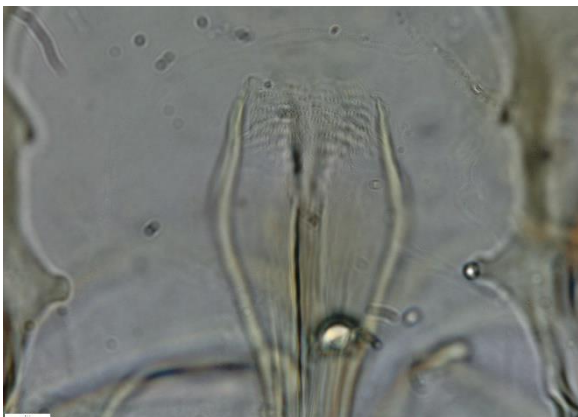


Figure 24 : pharynx



Figure 25 : spermathèques



Figure 26 : aspect général de la tête

Figures 27 à 31 : Mâle de *Se. sclerosiphon*

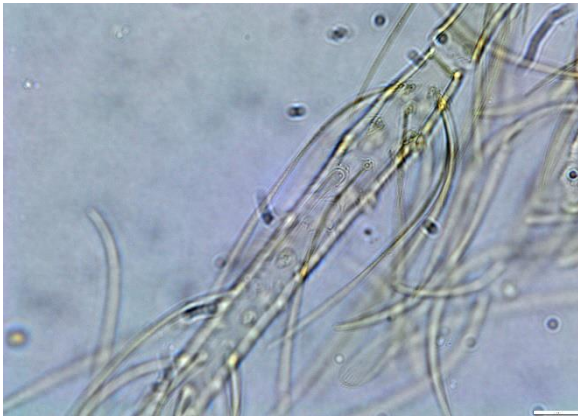


Figure 27 : ascocide unique sur AIV



Figure 28 : cibarium et pharynx

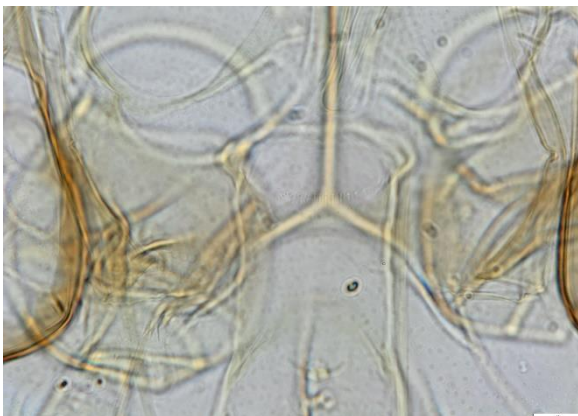


Figure 29 : dents du cibarium

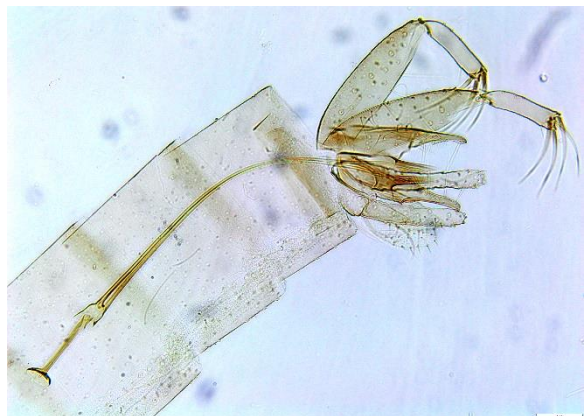


Figure 30 : génitalia mâle



Figure 31 : aspect général de la tête

4.1.2 *Sergentomyia anka* :

96 femelles et 84 mâles ont été mesurés et observés. Leurs caractéristiques sont conformes à la description proposée par Depaquit, Léger & Robert, 2008.

L'étude moléculaire confirme bien l'individualisation de ce taxon avec les séquences de CytB mais pas avec les séquences de D1D2).

Figures 32 à 35 : Femelle de *Se. anka* :



Figure 32 : pharynx

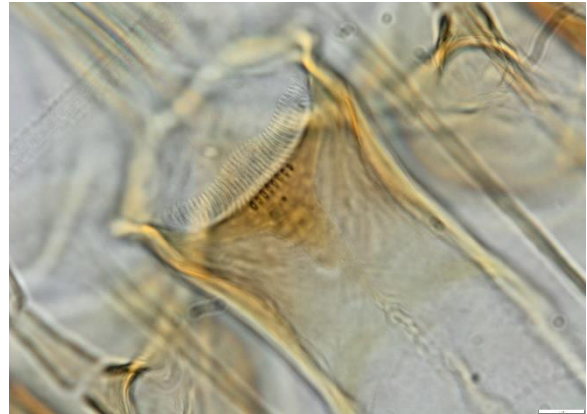


Figure 33 : dents du cibarium



Figure 33 : spermathèques

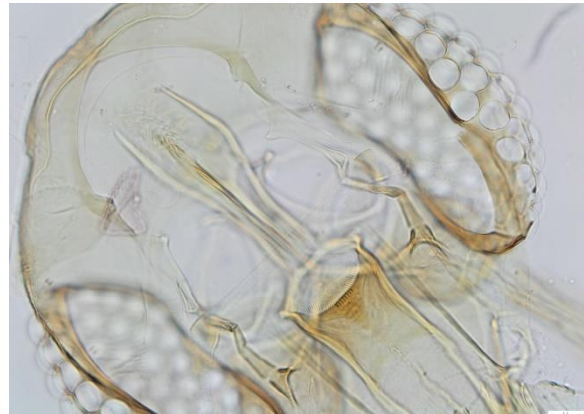


Figure 34 : pharynx et cibarium



Figure 35 : aspect général de la tête

Figures 36 à 39 : Mâle de *Se. anka* :



Figure 36 : cibarium et pharynx



Figure 37 : cibarium



Figure 38 : génitalia mâle

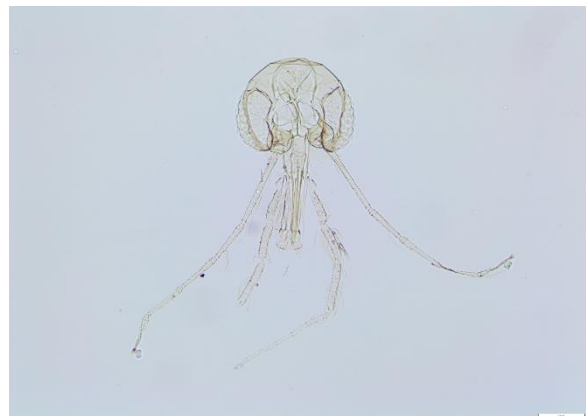


Figure 39 : aspect général de la tête

4.1.3 *Phlebotomus fertei* :

38 femelles et 82 mâles ont été observés sans être mesurés. Néanmoins l'analyse morphologique et les quelques exemplaires examinés en biologie moléculaire montrent qu'ils sont conformes à la description proposée par Depaquit, Léger & Robert, 2002.

Figures 40 à 42 : Femelle de *Ph. fertei* :



Figure 40 : cibarium et pharynx



Figure 41 : spermathèques



Figure 42 : aspect général de la tête

Figures 43 à 46 : Mâle de Ph. fertei :

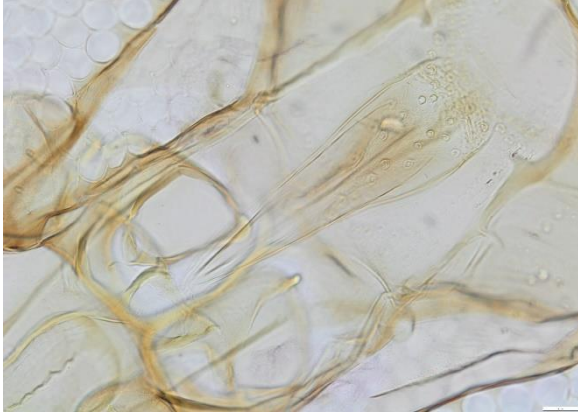


Figure 43 : pharynx



Figure 44 : cibarium et pharynx



Figure 45 : génitalia



Figure 46 : aspect général de la tête

4.1.4 *Grassomyia* spp :

Un total de deux femelles et de trois mâles ont été capturés, observés et mesurés. Cependant aucune femelle n'a pu être analysée en biologie moléculaire du fait de l'échec de l'extraction d'ADN. Leur aspect plus sombre, leur petite taille et l'aspect de leurs dents cibariales, de leurs antennes ainsi que l'examen de leur thorax nous permettent de les identifier au niveau générique comme appartenant au genre *Grassomyia* (Abonnenc, 1969, 1972). Cependant, ce groupe est complexe et mal étudié et nous préférons nous limiter à une identification générique pour ces individus.

Figures 47 à 50 : Photos d'un *Grassomyia* sp. femelle :

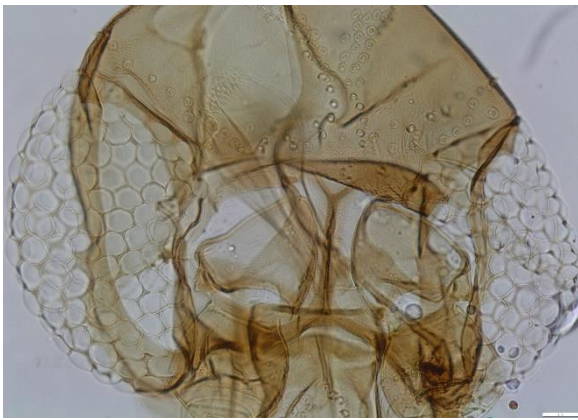


Figure 47 : cibarium et pharynx

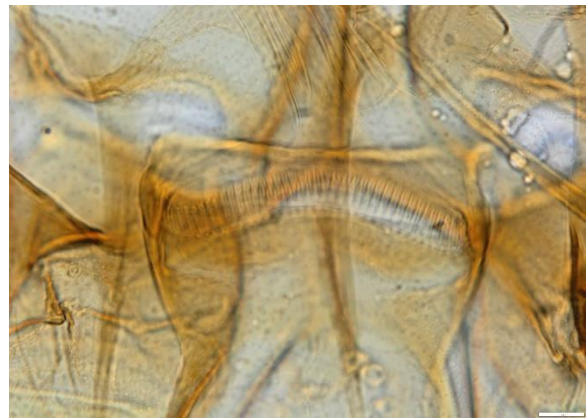


Figure 48 : dents du cibarium



Figure 49 : aspect général de la tête



Figure 50 : visualisation des antennes et des palpes

Figures 51 à 54 : Photos d'un *Grassomyia* sp. mâle :

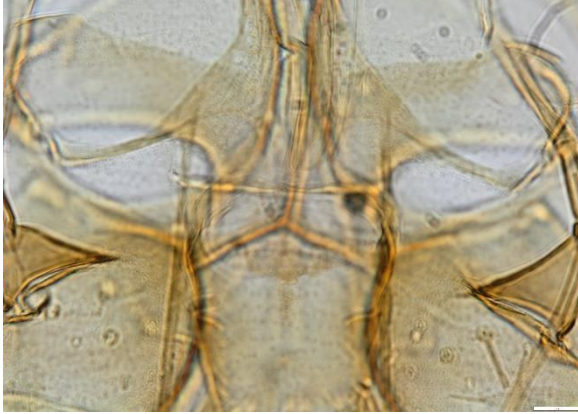


Figure 51 : cibarium



Figure 52 : génitalia



Figure 53 : aspect général de la tête



Figure 54 : visualisation des antennes et des palpes

4.1.5 Se. sp1 :

Cette espèce de *Sergentomyia* s'individualise par rapport aux autres de par notamment ses spermathèques qui sont différentes de celles des *Vattieromyia* ou des *Rondanomyia*, la forme ainsi que l'arrangement des dents et l'absence d'ascoïdes sur les 3^{ème} et 4^{ème} segments antennaires. De plus les femelles présentent un renflement du troisième segment du palpe leur donnant un aspect caractéristique.

16 femelles et 14 mâles ont été mesurés et observés.

L'étude moléculaire confirme bien l'individualisation de ce taxon avec les domaines étudiés (CytB et D1D2) avec des valeurs de bootstrap élevées, même si on y observe deux populations et une forte variabilité infraspécifique.

Nous proposons une description de cette espèce qui, comme les suivantes, s'appuie autant que possible sur les recommandations de Galati et al. (2017) :

Description de Se. sp1

Genre : *Sergentomyia*

Sous-genre : à créer

Femelle :

Tête

Occiput avec deux lignes étroites bien individualisées de soies. Sur la ligne au-dessus des yeux, deux insertions de soies plus grosses sont observées de chaque côté.

Clypeus mesurant 81 µm de long sur 63 µm de large, avec environ 30 soies aléatoirement distribuées.

Yeux 188 / 107 µm de large portant environ 100 facettes

Suture interantennaire incomplète.

Suture interoculaire n'atteignant pas la suture interantennaire.

Flagellomères

Flagellomère1 plus long que f2+f3.

Absence d'ascoïde sur f1 et sur f2. Formule ascoïdaire : 2/f3-f13

Une papille distale sur f1 et f2. Absence de papille de f3 à f11. Trois papilles sur les flagellomères 12, 13 et 14.

Absence de soies simples sur f1, f2 and f3. Une soie simple sur les flagellomères f4, f5, f6, f7, f8, f10 et f12. Deux soies simples sur f9, f11 et f13. Environ une vingtaine de soies simples sur f14.

Palpes présentant un très gros P3

Formule palpale : 1, 2, 3, 4, 5

Présence de nombreuses épines de Newstead sur P3 (74 sur l'holotype) implantées de manière basale. Absence d'épine de newstead sur P2

Présence d'une soie spiniforme distale sur P3 et de 5 soies spiniformes sur P4.

Labre-épipharynx 187 µm de long

Hypopharynx avec 3 petites dents apicales de chaque côté du canal salivaire.

Lacinia maxillaire avec environ 10 grosses dents externes et une vingtaine d'internes.

Labium présentant une suture labiale ouverte.

Cibarium avec 24 dents claires et palissadiques organisées le long d'une ligne horizontale. On observe en avant une dizaine de denticules punctiformes irrégulièrement disposés le long d'une ligne horizontale. La plage pigmentée est peu colorée, triangulaire avec une expansion antérieure lui conférant un aspect global de russule.

Pharynx bien armé sur son quart postérieur de longues dents pigmentées orientées postérieurement et vers le centre

Cervix

Présence de deux sensilles cervicales de chaque côté.

Sensille ventro-cervicale non observée.

Thorax 556 µm de long.

Sclérites brun moyen

Absence de soie post-alaire sur le mésonotum

Soies proépimérales non observées.

Absence de soies anépisternales supérieures.

Absence de soies anapisternales inférieures.

Absence de soies anépimérales.

Absence de soies métépisternales.

Absence de soies métépimérales.

Absence de soies sur la région antérieure du katépisternum.

Absence de suture entre le métépisternum et le katépiméron.

Métafurca avec bras verticaux séparés.

Aile

Taille : 1930 μm de long/510 μm de large

Taille de R5 = 1340 μm ; alpha (=R2) = 356 μm ; beta (=R2+3) = 390 μm ; gamma (=R2+3+4) = 327 μm ; delta = 349 μm ; pi = -142 μm ; epsilon (=R3) = 500 μm ; thêta (=R4) = 998 μm

Pattes

Longueur du segment :

Patte antérieure : coxa = 284 μm ; fémur = 691 μm ; tibia = 813 μm ; tarsomère i = 455 μm ; somme de tii, tiii, tiv, tv = 592 μm

Patte médiane : coxa = 277 μm ; fémur = 696 μm ; tibia = 949 μm ; tarsomère i = 537 μm ; autres tarsomères cassés

Patte postérieure : coxa = 305 μm ; fémur = 765 μm ; tibia = 1099 μm ; tarsomère i = 626 μm ; somme de tii, tiii, tiv, tv = 720 μm

Absence d'épines sur le métafémur

Deux épines au milieu du métatarsomère iii et une distale observées sur le paratype MADA1010.

Abdomen

Soies aléatoirement distribuées sur les tergites ii–v

Tergite VIII avec 14 soies de chaque côté

Tergite IX sans protubérance

Cerques mesurant 155 μm de long

Soies non observées sur le sternite X

Génitalia

L'aspect des spermathèques dans le liquide de Marc-André est tout à fait différent de celui après leur déshydratation en vue de leur montage dans l'Euparal®. Dans le liquide de Marc-André, elles apparaissent allongées, à parois assez épaisses, non sclérifiées. Le corps est non segmenté mais couvert de nombreux plis parallèles transversaux lui conférant un aspect strié. La tête, qui porte 4 à 5 canalicules terminés par un renflement, est légèrement enfoncée dans le corps au niveau distal et on observe une collerette d'aspect nuageux qui l'entoure.

Après montage dans l'Euparal®, les spermathèques se rétractent systématiquement pour prendre une forme rectangulaire et les plis ont tendance à s'estomper.

Les conduits individuels sont fins et étroits, lisses et non sclérifiés. Ils se rejoignent pour former un court conduit commun débouchant au niveau des culs de sac vaginaux.

La furca possède des ailes latérales larges et bien développées et un manche s'élargissant vers l'apex. L'armature de l'atrium génital est constituée de nombreuses petites épines disposées alignées plus ou moins régulièrement sur quelques rangées.

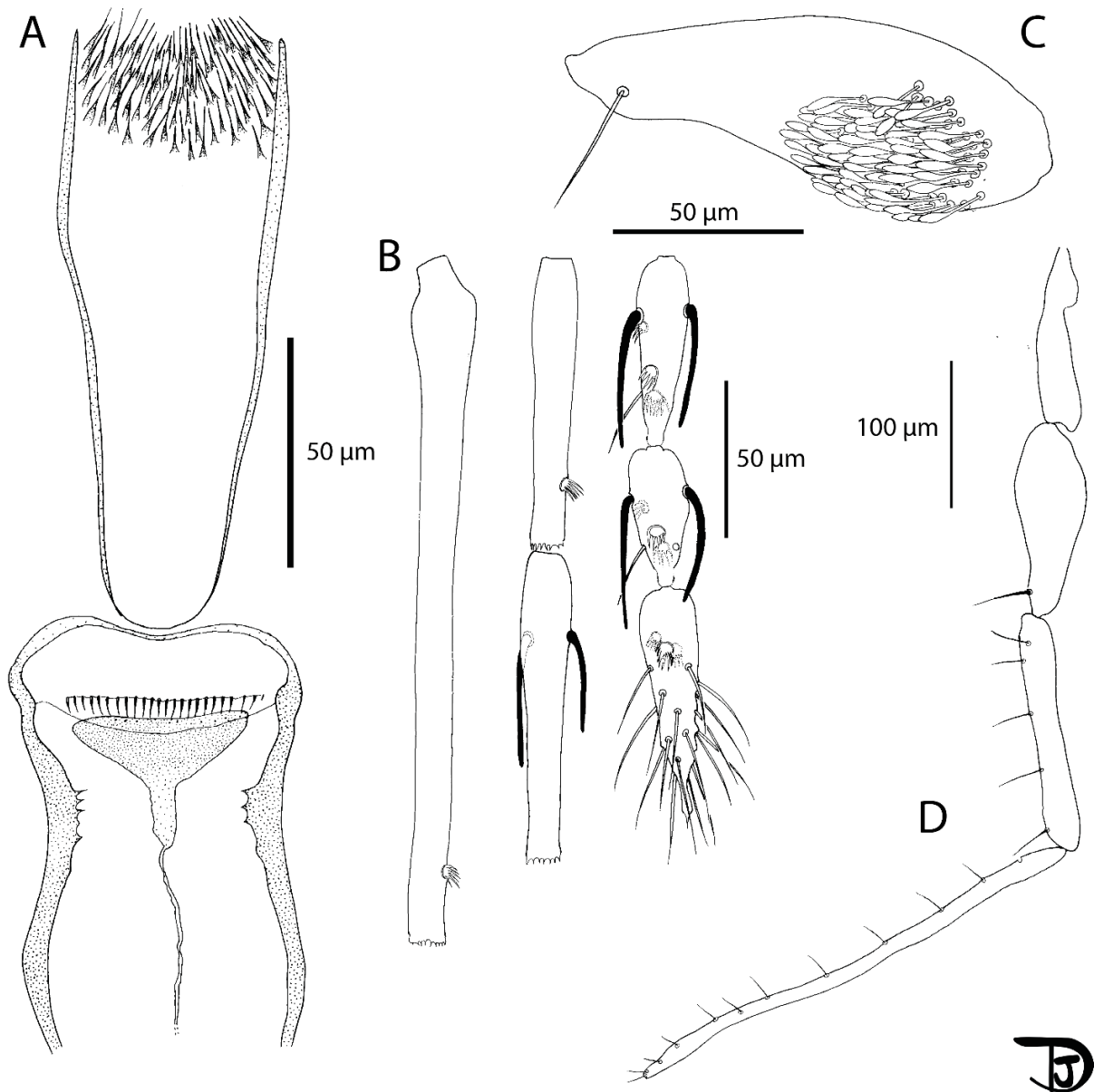


Figure 55 : *Se. sp1*. A : pharynx et cibarium ; B : segments antennaires III, IV, V et XIV, XV, XVI ; C : segment palpal P3 ; D : palpe.

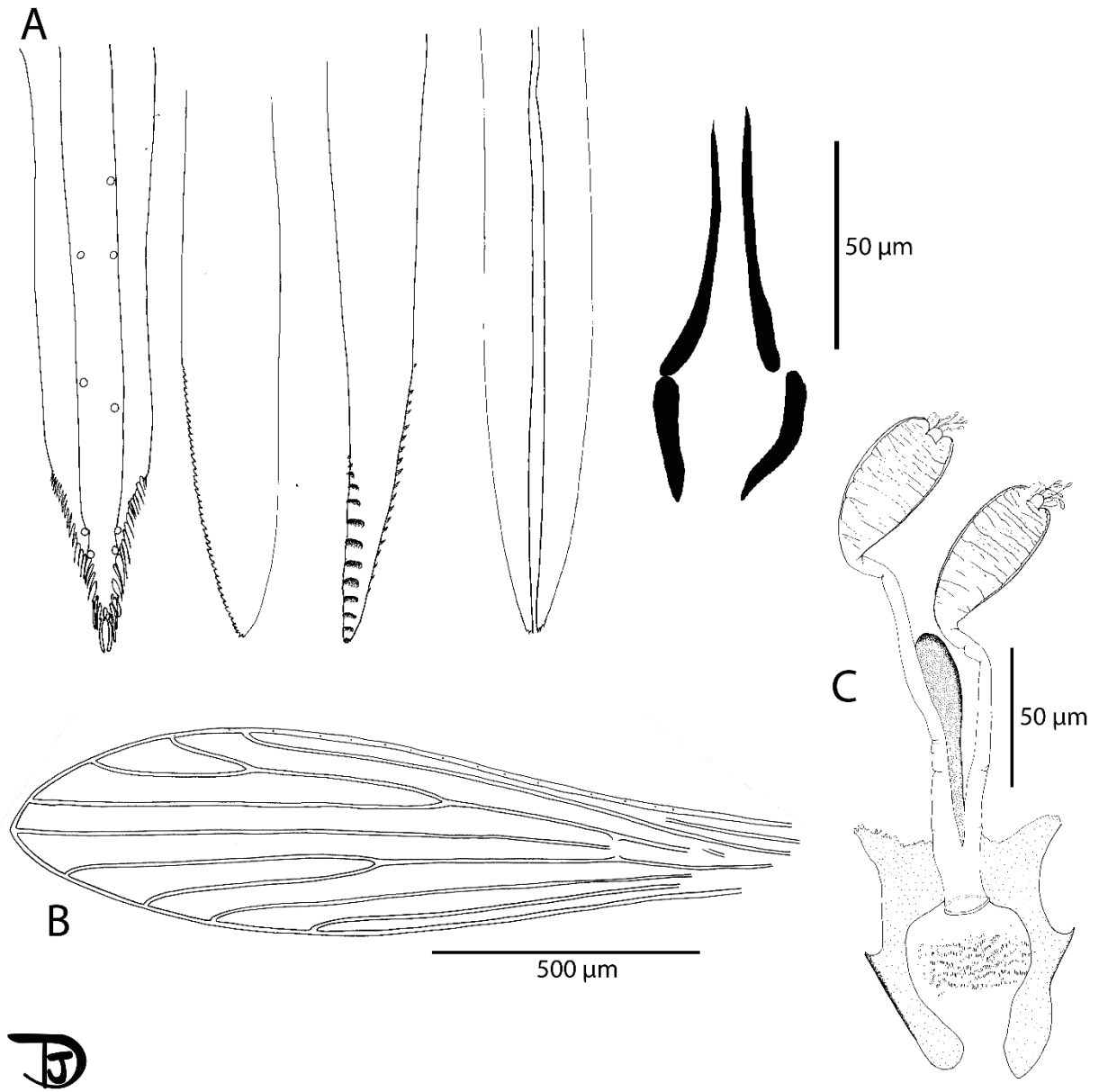


Figure 56 : *Se. sp1*. A : pièces buccales ; B : aile ; C : furca et spermathèques.



Figure 57 : cibarium et pharynx

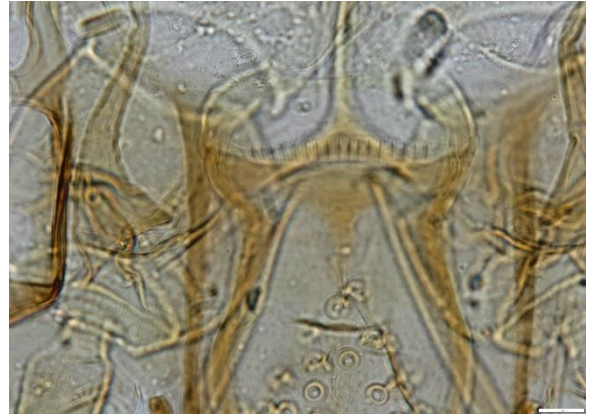


Figure 58 : dents du cibarium

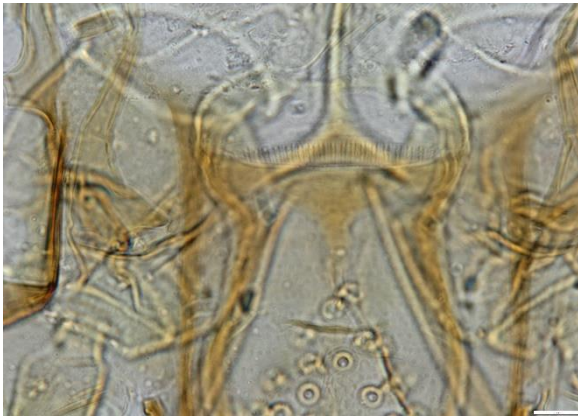


Figure 59 : dents du cibarium

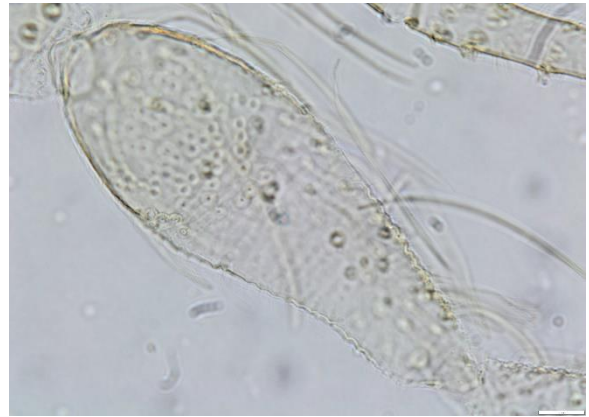


Figure 60 : segment P3 du palpe

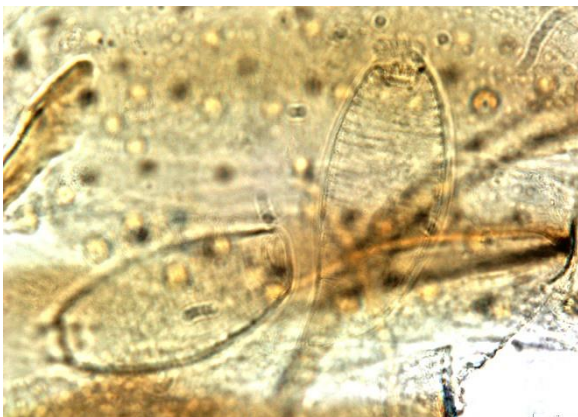


Figure 61 : spermathèques



Figure 62 : spermathèques

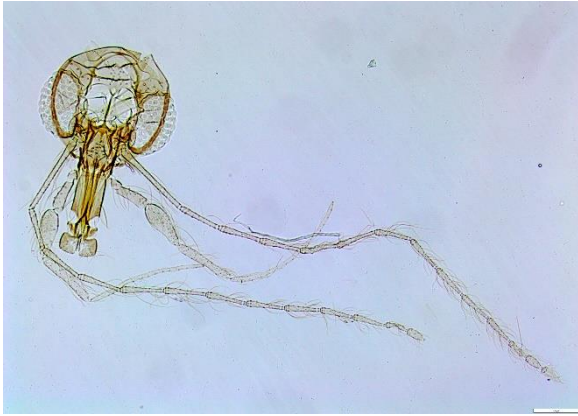


Figure 63 : aspect général de la tête



Figure 64 : tête

Description du mâle Sp1 :

Les mensurations réalisées sur plusieurs spécimens sont indiquées dans le **tableau IV**. Celles indiquées dans la description ci-dessous sont celles du paratype MADA825.

Tête

Occiput portant deux lignes bien individualisées de soies. Sur la ligne inféro-latérale, on note la présence de deux plus grosses insertions de chaque côté.

Clypeus portant 24 soies réparties aléatoirement

Yeux mesurant 150 μm de haut sur 85 μm de large, porteurs d'environ 70 facettes

Sutures interoculaires incomplètes

Flagellomères

Formule antennaire : 1/f3-f13. Absence d'ascoïde sur les segments f1 et f2 (=AIII et AIV)

1 sensille terminale sur les flagellomères f1 et f2. Une sensille sur f11 et 3 sensilles sur les segments f12 à f14

Absence de soies simples sur les segments f1 à f5 ainsi que f12 et f13. Une soie simple de f6 à f8. Deux soies simples de f9 à f11 et une dizaine sur f14.

Formule palpale : 1, 2, 3, 4, 5. Une dizaine d'épines de Newstead groupées, implantées au quart basal de l'article. Absence d'épines de Newstead sur P2

Une longue soie spiniforme implantée distalement sur P3 et quatre régulièrement implantées sur P4.

Labre-épipharynx long de 140 μm

Suture labiale fermée ou parfois très légèrement ouverte

Cibarium armé d'une dizaine de paquets de trois à quatre petites dents groupées sur une ligne irrégulière plus ou moins horizontale. En avant, on note quelques denticules à peine observables. Absence de plage pigmentée.

Pharynx armé sur son quart postérieur de petites dents pointues orientées vers l'arrière, disposées le long de lignes plus ou moins concentriques.

Cervix

Présence de deux soies cervicales par côté et d'une soie ventro-cervicale.

Thorax

Sclérites de couleur brun clair

Absence de soies post-alaires sur le mésonotum

Soies proépimerales non observées

Absence de soies supérieures ou inférieures sur le mésanepisternum

Absence de soies anépimerales

Absence de soies sur le métépisternum

Absence de soies métépimerales

Absence de soies dans la région antérieure du katépisternum

Absence de suture entre le métépisternum et le katépiméron

Metafurca présentant des bras verticaux séparés

Aile

Longueur : 1280 μm . Largeur : 308 μm

Longueur de $R_5 = 931 \mu\text{m}$; $\alpha (=R_2) = 118 \mu\text{m}$; $\beta (=R_{2+3}) = 253 \mu\text{m}$; $\gamma (=R_{2+3+4}) = 302 \mu\text{m}$; $\delta = -8 \mu\text{m}$; $\pi = -50 \mu\text{m}$; $\epsilon (=R_3) = 231 \mu\text{m}$; $\theta (=R_4) = 602 \mu\text{m}$

Pattes

Longueur des segments :

Patte antérieure : coxa = 256 μm ; fémur = 520 μm ; tibia = 594 μm ; tarsomère i = 318 μm ; somme des tarsomères tii, tiii, tiv et tv = 434 μm

Patte médiane : coxa = 240 μm ; fémur = 543 μm ; tibia = 734 μm ; tarsomère i = 375 μm ; somme des tarsomères tii, tiii, tiv et tv = 505 μm

Patte postérieure : coxa = 270 μm ; fémur = 580 μm ; tibia = 885 μm ; tarsomère i = 473 μm ; somme des tarsomères tii, tiii, tiv et tv = 564 μm

Absence d'épines sur le métafémur

Deux soies implantées au milieu du métatarsomère iii et une implantée de manière distale

Abdomen

Soies réparties aléatoirement sur l'ensemble des tergites ii à v (

Absence de papilles sur les tergites ii à vii

Génitalia

Absence de baguettes abdominales

Gonocoxite portant une touffe d'une vingtaine de soies internes. Absence de lobe basal.

Gonostyle porteur de 4 épines épaisses et incurvées terminales (ou deux terminales et deux subterminales). La soie non caduque est implantée de manière très distale.

Paramère simple, légèrement recourbé à son apex avec une vestiture occupant la face interne de la moitié distale, constituée de longues soies effilées

Pénis droit, digitiforme, se rétrécissant progressivement depuis l'extrémité proximale vers l'extrémité distale qui est arrondie

Filaments génitaux striés, pointus à leur apex

Pompe génitale munie d'un piston long et fin garni d'un pavillon

Surstyle plus court que le gonocoxite, dépourvue d'épines permanentes

Longueur des cerques : 100 μm

Figures 65 à 70 : Mâle de *Se. sp1* :



Figure 65 : cibarium et pharynx

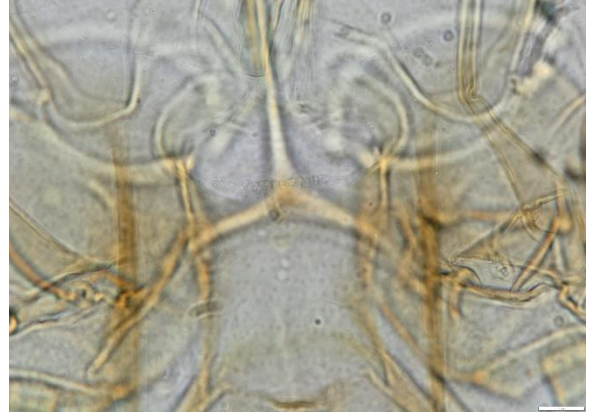


Figure 66 : dents du cibarium



Figure 67 : génitalia



Figure 68 : touffe de soies internes



Figure 69 : aspect général de la tête



Figure 70 : position terminale de la soie non caduque

4.1.6 Se. sp2 :

Cette espèce qui sera rangée dans le sous-genre *Rondanomyia* s'apparente beaucoup à une espèce déjà décrite : *Sergentomyia (Rondanomyia) goodmani* par Léger, Depaquit & Robert, 2005 dont elle en diffère par la présence de denticules cibariaux. Cette individualisation est bien soutenue par l'analyse des séquences du cytochrome b.

Nous en proposons une première description.

Description de Se. sp2

Les mesures sont indiquées dans le **tableau IV**. Les mesures ci-dessous sont celles que nous désignerons ultérieurement comme holotype.

Nombre de spécimens étudiés : 4

Femelle :

Tête

Occiput avec deux lignes de soies étroites bien individualisées. Sur la ligne au-dessus des yeux, deux plus grandes insertions de soies de chaque côté.

Clypeus mesurant 110 µm de long sur 184 µm de large, avec des soies réparties aléatoirement.

Yeux bien développés incluant plus de 130 facettes.

Suture interantennaire incomplète

Sutures interoculaires épaisses

Flagellomères avec deux ascoïdes de f1 à f13. Les ascoïdes internes et externes de f1 sont implantés au même niveau.

Sur l'holotype, une papille terminale sur f1 et f2 ; une papille médiane sur f9, f10 et f11. Trois papilles sur f12, f13 et f14.

Sur l'holotype, pas d'observation de soie simple de f1 à f6 ; deux de f7 à f11 ; trois sur f12 et f13 ; environ dix soies simples et une épine sur f14.

Formule palpale : 1, 2, 3, 4, 5. Environ 50 sensilles de Newstead implantées au niveau basal sur p3. Absence de telles sensilles sur p2. Une soie distale spiniforme sur p3 et 5 sur p4, régulièrement implantée.

Labre-épipharynx mesurant 197 µm de long.

Hypopharynx avec de très petites dents apicales

Lacinia maxillaire avec environ 25 dents externes atteignant la partie médiale de la bouche et 10 dents internes en haut.

Labium exposant une suture labiale ouverte.

Cibarium avec une ligne d'environ 20 dents postérieures incolores. Les centrales sont plus ou moins identiques aux latérales, à l'exception de quelques denticules de chaque côté. Une rangée de denticules punctiformes. Les centrales sont plus grosses que les latérales. A l'avant de cette dernière rangée, il y a une ligne de denticules sombre doublement ondulée, parallèle aux lignes de dents, traversant complètement la plage pigmentée qui présente une expansion postérieure.

Pharynx armé avec de petites dents punctiformes arrangées le long de lignes plus ou moins concentriques.

Cervix

Deux sensilles cervicales de chaque côté.

Sensille ventro-cervicale non observée.

Thorax

590 μm de long

Sclérites sombres

Présence de soies post-alaires sur le mésonotum.

Absence de soies sur les sclérites pleurales.

Absence de soies proépimérales.

Absence de soies anépisternales supérieures.

Absence de soies anépisternales inférieures.

Absence de soies anépimérales

Absence de soies métépisternales

Absence de soies métépimérales

Absence de soies sur la région antérieure du katépisterne.

Absence de suture entre le métépisterne and katépimère

Métafurca avec bras verticaux séparés

Aile

Taille : 1824 μm de long/500 μm de large

Taille de R5 = 1292 μm ; alpha (=R₂) = 332 μm ; beta (=R₂₊₃) = 390 μm ; gamma (=R₂₊₃₊₄) = 264 μm ; delta = 184 μm ; pi = -245 μm ; epsilon (=R₃) = 390 μm ; thêta (=R₄) = 984 μm

Pattes

Longueur des segments :

Patte antérieure : coxa = 318 μm ; fémur = 791 μm ; tibia = 1084 μm ; tarsomère i = 573 μm ; somme de tii, tiii, tiv, tv = 729 μm

Patte médiane : coxa = 315 μm ; fémur = 749 μm ; tibia = 1080 μm ; tarsomère i = 579 μm ; somme de tii, tiii, tiv, tv = 735 μm

Patte postérieure : coxa = 330 μm ; fémur = 659 μm ; tibia = 757 μm ; tarsomère i = 422 μm ; somme de tii, tiii, tiv, tv = 645 μm

Absence d'épines sur le métafémur

Deux épines sur le métatarsomère iii

Abdomen

Soies aléatoirement implantées sur les tergites ii–v

Présence d'environ 20 soies sur le tergite VIII

Absence de protubérance sur le tergite IX

Soies non observées sur le sternite X

Génitalia

Spermathèque ovale, à paroi fine comprenant sur toute sa longueur, de nombreuses épines internes apparaissant en épines de rosier en vue latérale et en forme de point en vue apical ou proximale. Tête courte et aplatie, invaginée dans le corps de la spermathèque, portant une dizaine de canalicules.

Furca peu visible mais montrant néanmoins un manche long et étroit. Armature de l'atrium génital peu visible et impossible à dessiner.

Partie distale des canaux individuels des spermathèques sans sclérisation ni stries.

Partie basale des spermathèques non observée sur le futur holotype. Sur un futur paratype, observation d'un probable conduit basal commun.

Cerques mesurant 166/69 μm

Figures 71 à 75 : femelle de *Se. sp2*



Figure 71 : dents du cibarium



Figure 72 : montage *in toto* permettant de visualiser ailes, thorax et abdomen.

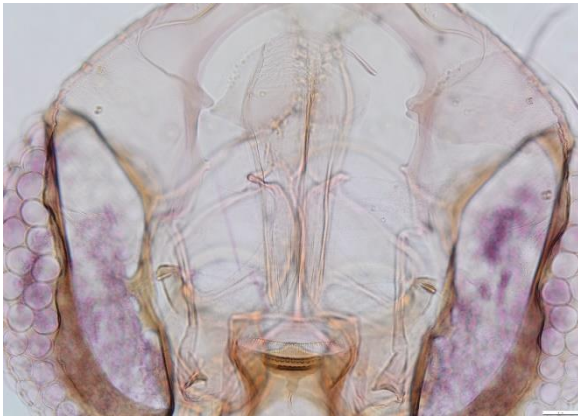


Figure 73 : pharynx

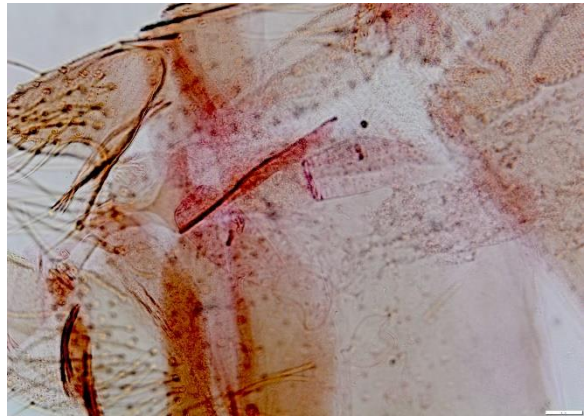


Figure 74 : spermathèques



Figure 75 : allure générale de la tête

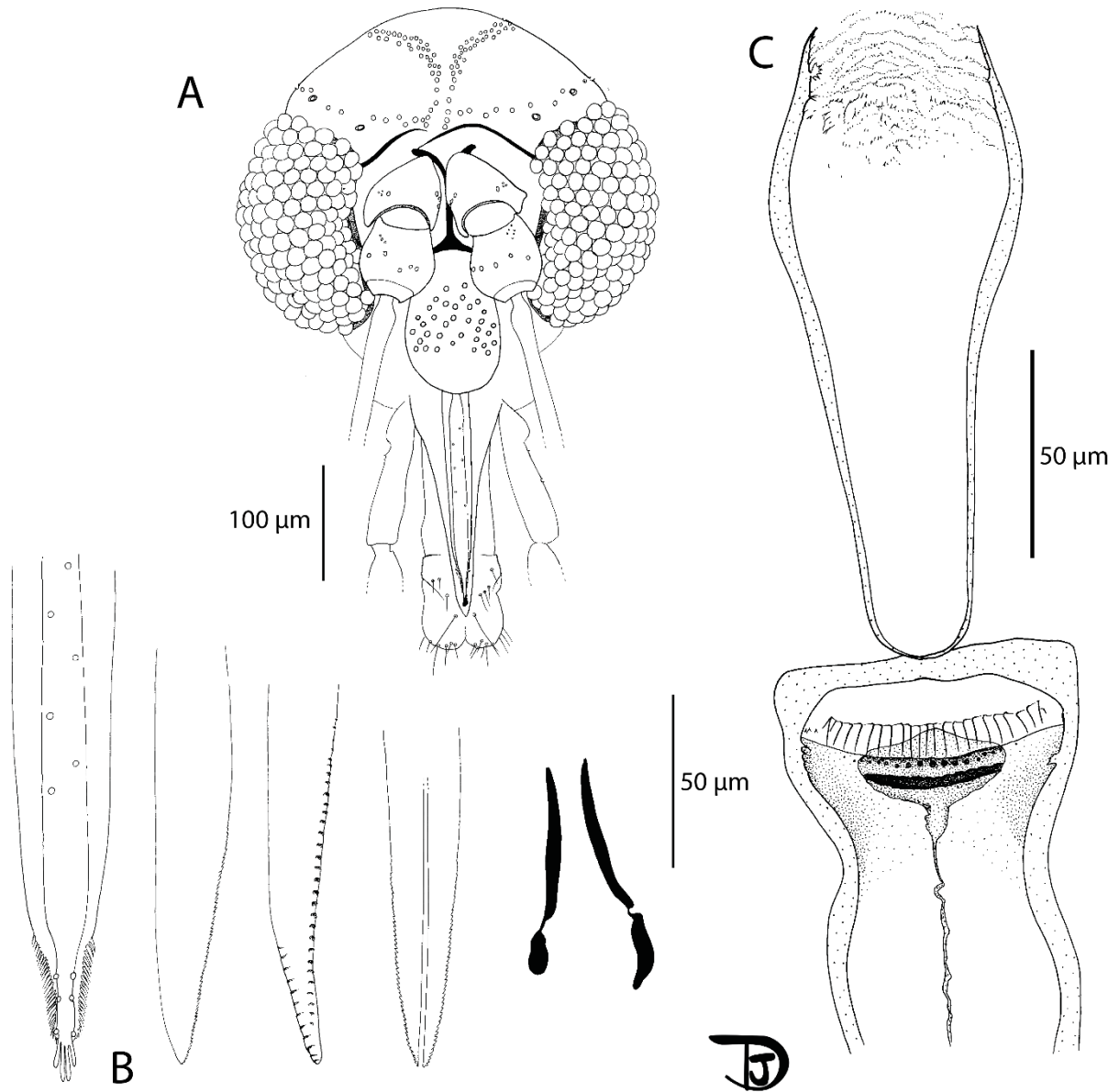


Figure 76 : *Se. sp2*. A : tête ; B : pièces buccales ; C : cibarium et pharynx.

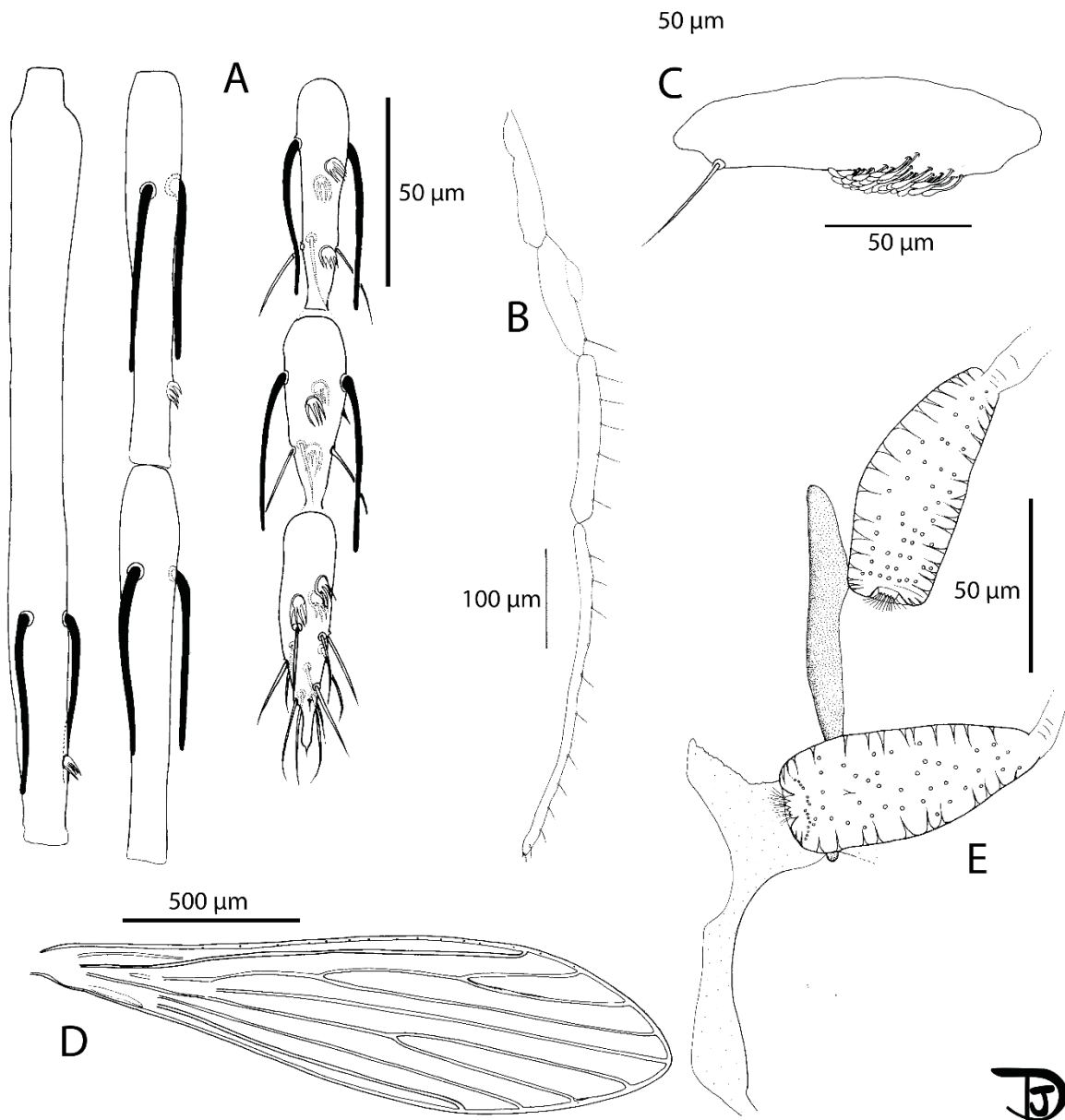


Figure 77 : *Se. sp2*. A : segments antennaires AIII, AIV, AV et AXIV, AXV, AXVI. B : palpe ; C : segment palpal P3 ; D : aile ; E : spermatheques et fragment de furca.

4.1.7 Se. sp3 :

Une seule femelle appartenant à cette espèce a été étudiée et mesurée. L'aspect de ses spermathèques et ses dents cibariales ainsi que l'analyse moléculaire sont en faveur de la description d'une nouvelle espèce voire d'un nouveau sous-genre. Le mâle demeure inconnu.

Description de Se. sp3 (spécimen MADA97)

Certains organes ont été détruits durant le processus de montage et sont inobservables.

Femelle :

Tête

Occiput avec deux lignes étroites de soies bien individualisées. Sur la ligne au-dessus des yeux, deux plus grandes insertions de soies de chaque côté.

Clypeus mesurant 109 μm de long et 84 μm de large, avec des soies aléatoirement distribuées dans la partie médiane.

Yeux bien développés comprenant plus de 120 facettes.

Suture interantennaire et interoculaire complète.

Flagellomères détruits après f11. Deux ascoïdes de f2 à f11. Pas d'ascoïde sur f1. L'ascoïde interne est implanté de manière un peu plus proximale que l'externe sur la majorité des articles.

Une papille terminale sur f1 et f2 ; pas de papille sur f3. Une papille médiane de f4 à f9 et sur f11. Deux papilles sur f10.

Pas de soies simples observées de f1 à f4 ; une sur f5 ; quatre sur f6 et plus sur les segments suivants.

Palpes détruits après p2. Absence de sensilles de Newstead ou de soie spiniforme sur p2.

Labre-épipharynx 151 μm de long avec épines latérales distales

Hypopharynx difficile à observer, apparaissant lisse à l'apex, sans aucune dent.

Mandibules avec environ 25 petites dents

Lacinia maxillaire avec environ 20 dents externes n'atteignant pas le haut de la lacinia et 8 grandes dents internes distales.

Labium avec une suture labiale ouverte

Cibarium avec une ligne droite horizontale comptant 29 dents postérieures hautes, fines, pointues, orientées aléatoirement. Les plus latérales sont plus petites que les autres. Les 30 dents antérieures punctiformes sont implantées le long de deux lignes se chevauchant parfois. La plus grosse est localisée au centre de la ligne, bien individualisée des autres. Plage pigmentée large et aplatie.

Pharynx armé dans sa partie distale avec de longues dents orientées en arrière, implantées aléatoirement.

Cervix

Deux sensilles cervicales de chaque côté

Sensille ventro-cervicale non observée.

Thorax

590 µm de long

Sclérites sombres

Soies post-alaires sur le mésonotum non observées.

Soies proépimérales non observées

Absence de soies anépisternales supérieures.

Absence de soies anépisternales inférieures.

Absence de soies anépimérales.

Absence de soies métépisternales.

Soies métépimérales non observées.

Soies sur la région antérieure du katépisternum non observées.

Suture entre le métépisternum et le katépimère non observée.

Métafurca non observée

Ailes et pattes non observées

Abdomen

Soies sur les tergites ii–v non observées

Présence d'environ 12 soies sur le tergite VIII

Absence de protubérance sur le tergite IX

Soies non observées sur le sternite X

Génitalia

Spermathèque allongée, à parois fines, lisse et facilement pliable. La partie basale est légèrement pigmentée avec des parois sclérifiées. Une double collerette autour de la tête. La plus centrale est courte et arrondie à l'apex alors que l'externe est environ quatre fois plus haute et son extrémité distale apparaît pointue. La tête porte moins de 10 canalicules.

Furca avec un long manche montrant un élargissement. L'armature génitale de l'atrium montre des épines groupées.

Partie distale des conduits individuels des spermathèques sans sclérification ni stries.

Partie basale des spermathèques non observable.

Cerques mesurant 139 sur 53 μm

Figures 78 à 82 : Se. sp3

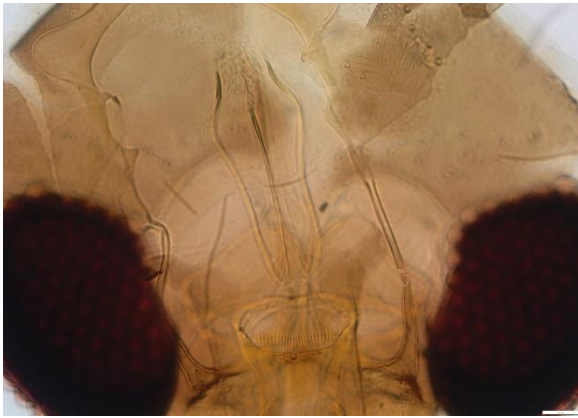


Figure 78 : pharynx

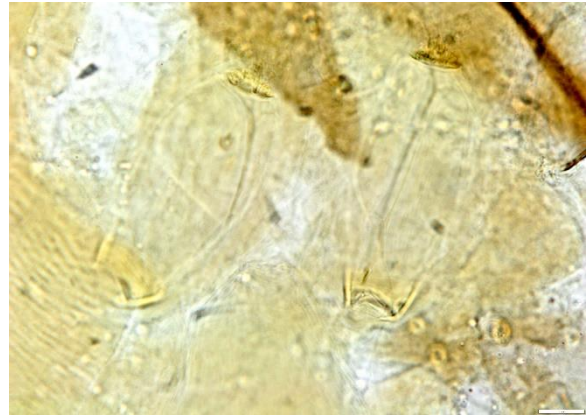


Figure 79 : spermathèques

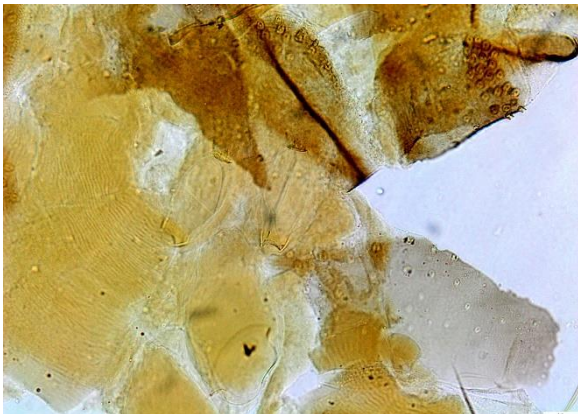


Figure 80 : spermathèques



Figure 81 : cibarium et son armature



Figure 82 : aspect général de la tête

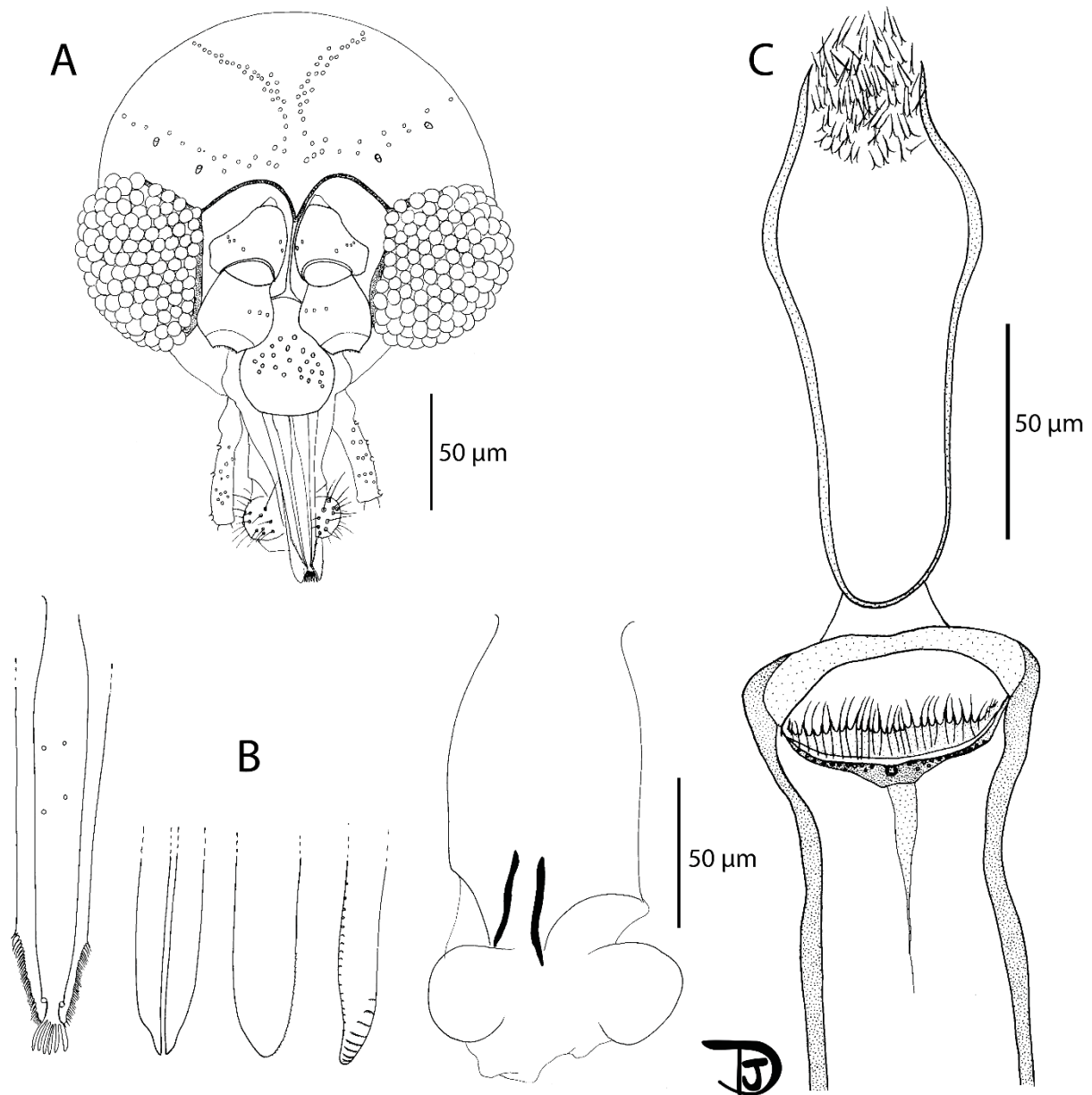


Figure 83 : Se. sp3 - A : tête ; B : pièces buccales (de gauche à droite : labre-épipharynx, hypopharynx, mandibule, maxille et labium) ; C : cibarium et pharynx.

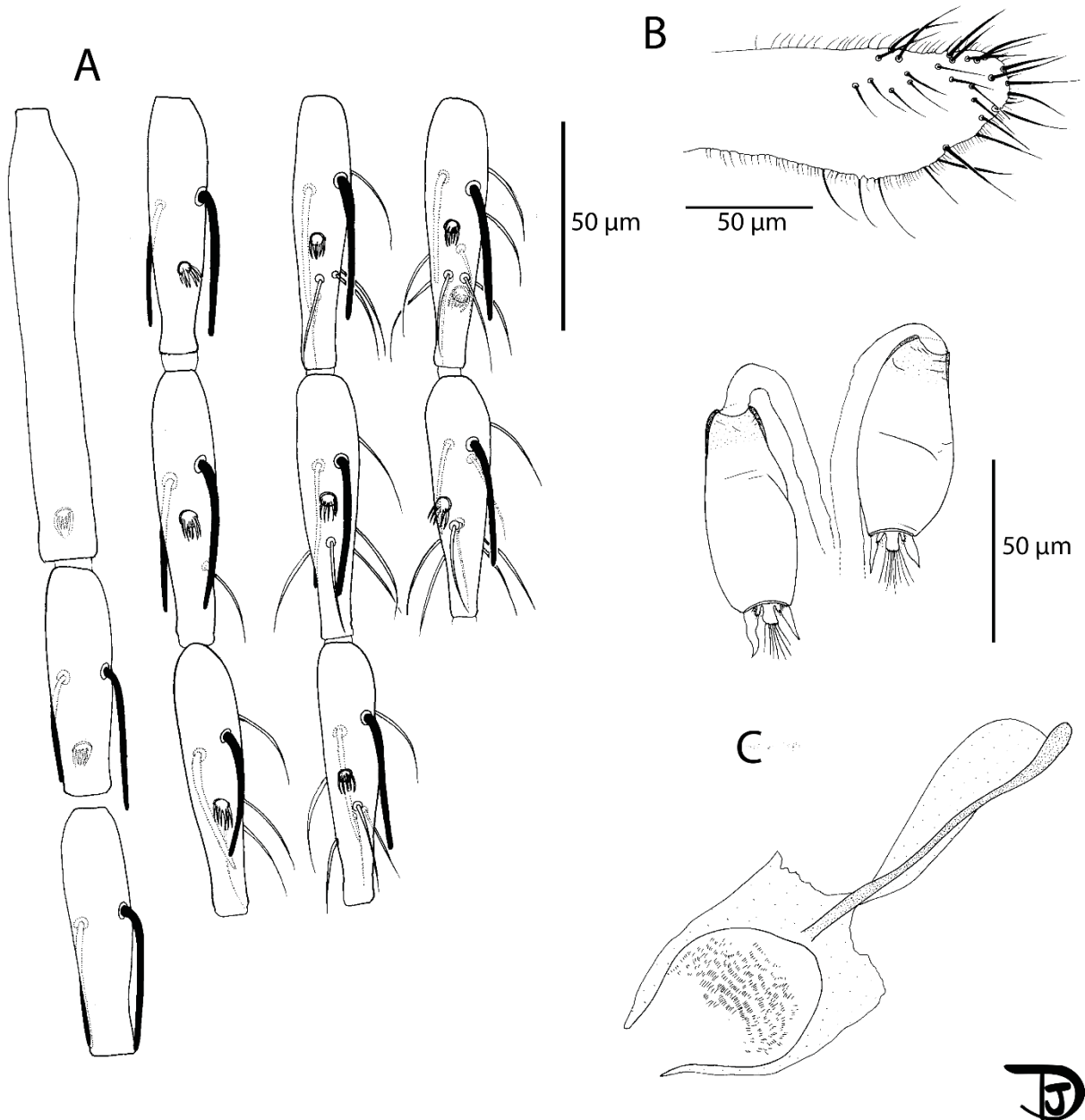


Figure 84 : *Se. sp3* - A : segments antennaires AIII, AIV, AV et AIV, AV, AVI, AVII, AVIII, AIX, AX, AXI (=f1 à f11) ; B : cercus ; C : spermathèques et furca.

4.1.8 Se. sp4 :

Une seule femelle a été capturée et étudiée. L'aspect de ses spermathèques et de son cibarium plaident pour la description d'une nouvelle espèce, voire d'un nouveau sous-genre. En revanche, seules les séquences de CytB ont été obtenues pour cette espèce. Le mâle demeure inconnu.

Description de Se. sp4 (spécimen MADA728)

Genre : *Sergentomyia*

Espèce : *Sp4*

Certains organes ont été détruits durant le montage et sont impossibles à observer.

Femelle :

Tête

Occiput avec deux lignes étroites de soies bien individualisées.

Clypeus mesurant 105 µm de long sur 80 µm de large, avec des soies distribuées aléatoirement.

Yeux mesurant 186 µ sur 86 µm, bien développés porteurs d'environ 100 facettes.

Suture interantennaire et interoculaire complète.

Flagellomère 1 (246 µm) plus long que f2 (109 µm) + f3 (108 µm).

Deux ascoïdes de f1 à f13. L'ascoïde interne est implanté approximativement au même niveau que l'externe sur f1.

Une papille terminale sur f1 et f2 ; pas de papille de f3 à f9. Une papille sur f10 et f11. Trois papilles sur f12 et quatre sur f13 et f14.

Pas de soies simples observées de f1 à f12 ; trois sur f13 et huit sur f14.

Formule palpale : 1 (50 µm), 2 (102 µm), 3 (109 µm), 4 (164 µm), 5 (326 µm). Environ une quinzaine d'épines de Newstead implantées dans la partie basale de p3. Pas d'épines de Newstead sur p2. Une soie distale spiniforme sur p3 et sept sur p4, régulièrement implantées.

Pièces buccales difficiles à observer en raison de l'orientation latérale de l'holotype.

Labre-épipharynx mesurant 195 µm.

Lacinia maxillaire avec environ 25 dents internes et 25 dents externes.

Furca labiale non observée en raison d'un montage de profil du labium.

Cibarium avec une rangée horizontale de 52 dents palissadiques. Les plus latérales sont plus courtes que les autres. On observe juste en dessous 21 petits denticules punctiformes qui leur sont liés. Au milieu de la plage pigmentée, existe une ligne transversale de 19 petits denticules également punctiformes. La plage pigmentée se décompose en une partie postérieure assez pigmentée, en forme de saucisse, traversant la totalité du cibarium. En avant, on note une avancée triangulaire peu pigmentée.

Le pharynx est armé de nombreuses dents fortes orientées vers l'arrière et le centre du pharynx. Elles occupent le tiers postérieur du pharynx.

Cervix

Sensille cervicale et sensille cervico-ventrale non observées.

Thorax

Environ 460 μm de long

Sclérites sombre.

Absence de soie post-alairale sur le mésonotum.

Soie proépimerale non observée.

Absence de soies anépisternales supérieures.

Absence de soies anépisternales inférieures.

Absence de soies anépimérales.

Absence de soies métépisternales.

Absence de soies métépimérales.

Absence de soies sur la région antérieure du katépisternum.

Absence de suture entre le métépisternum et le katépimeron.

Metafurca non observée.

Aile

Taille : 1888 μm de long/482 μm de large

Taille de R5 = 1298 μm ; alpha (=R2) = 268 μm ; beta (=R2+3) = 375 μm ; gamma (=R2+3+4) = 327 μm ; delta = 90 μm ; pi = -165 μm ; epsilon (=R3) = 445 μm ; thêta (=R4) = 921 μm

Pattes

Taille des segments de :

Patte antérieure : coxa = 329 μm ; fémur = 664 μm ; tibia = 728 μm ; tarsomère i = 357 μm ; somme de tii, tiii, tiv, tv = 603 μm

Patte médiane : coxa = 297 μm ; fémur = 648 μm ; tibia = 888 μm ; tarsomère i = 437 μm ; somme de tii, tiii, tiv, tv = 650 μm

Patte postérieure : coxa = 307 μm ; fémur = 728 μm ; tibia = 1044 μm ; tarsomère i = 532 μm ;
somme de tii, tiii, tiv, tv = 724 μm

Absence d'épines sur le métafémur

Quelques épines au milieu du tarsomère iii.

Abdomen

Soies sur les tergites ii–v non observées

Tergite VIII, IX et sternite IX non observés

Génitalia

Spermathèques lisses et larges, à parois fines, de structure semblant fragile et facilement pliable. La tête est légèrement enfoncée dans le corps et porte une dizaine de canalicules. La partie distale qui entoure la tête est originalement plissée de chaque côté avec l'existence de 4 à 5 bourrelets. Les conduits et la furca ne sont pas observables sur l'unique exemplaire capturé.

Cerques non observées

Figures 85 à 91 : Sp4

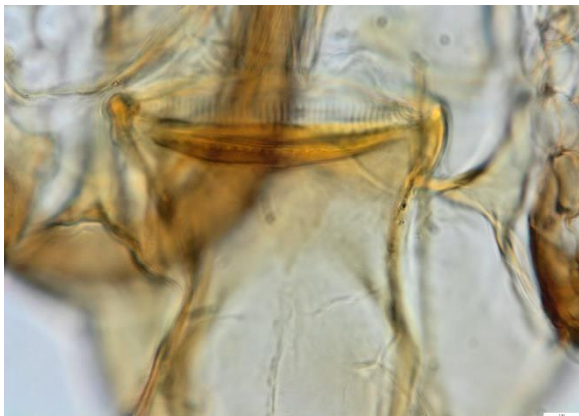


Figure 85 : denticules du cibarium



Figure 86 : ascöide sur AIV

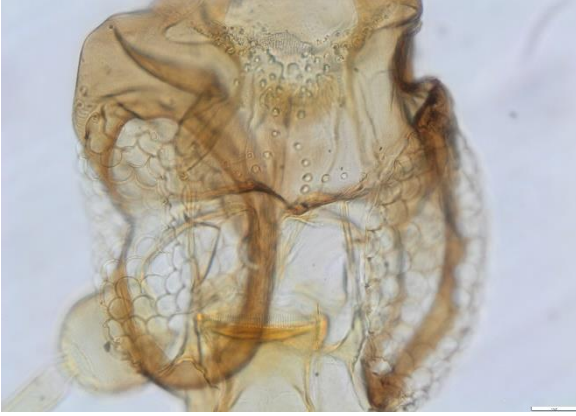


Figure 87 : cibarium et pharynx

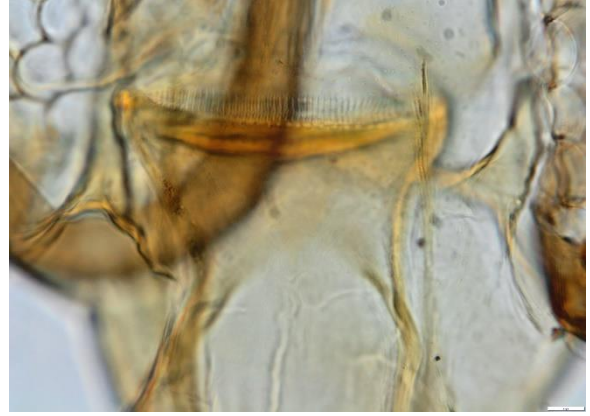


Figure 88 : dents du cibarium

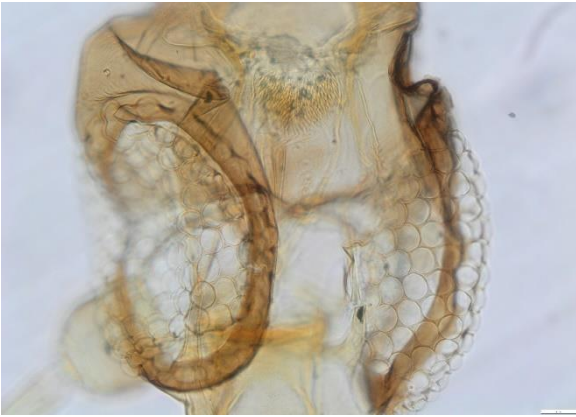


Figure 89 : pharynx



Figure 90 : spermathèques



Figure 91 : aspect général de la tête

Figures 92 et 93 : Dessins de Sp4 :

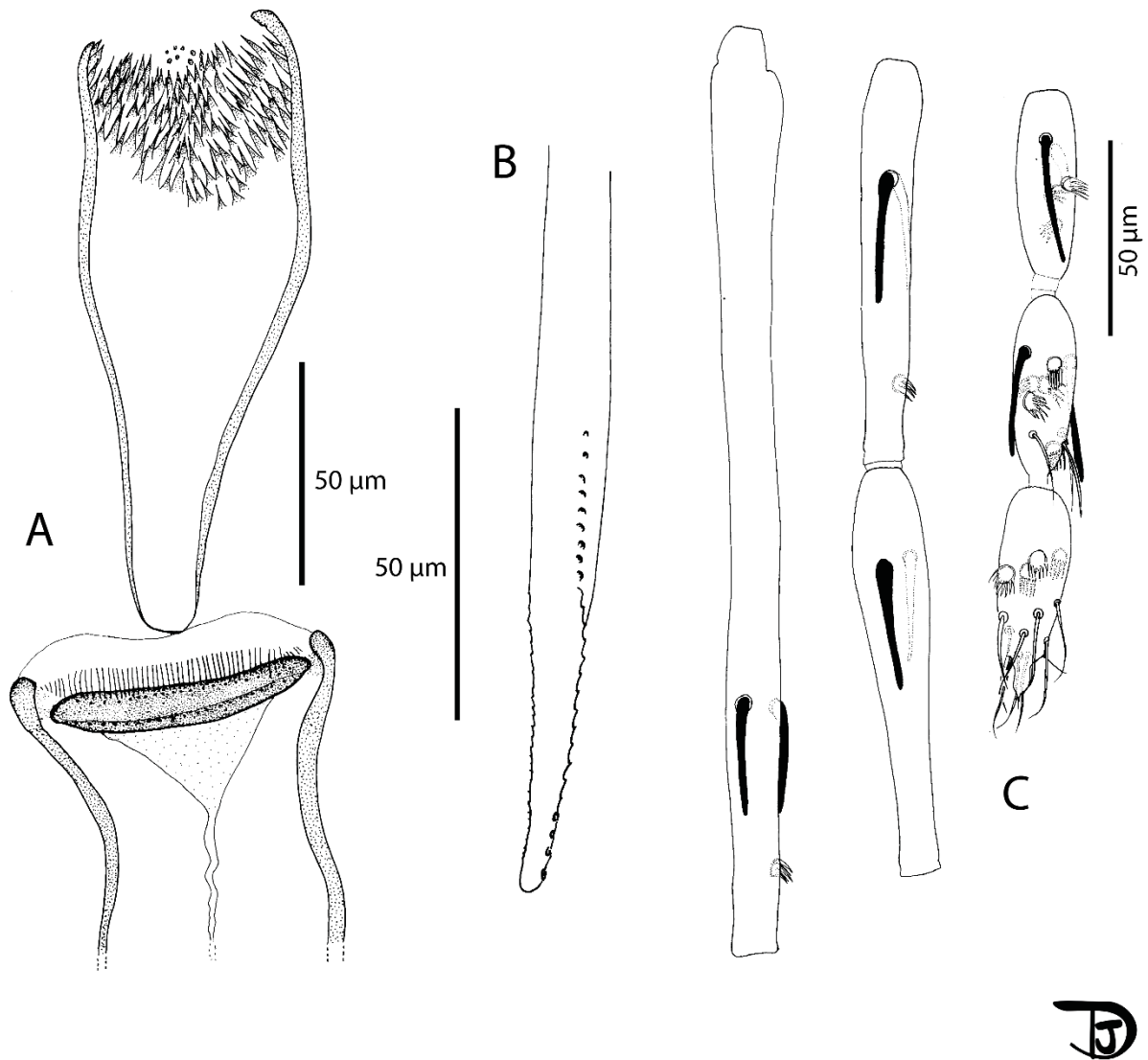


Figure 92 : Se. sp4. A : cibarium et pharynx ; B : maxille ; C : segments antennaires AIII, AIV, AV et AXIV, AXV, AXVI.

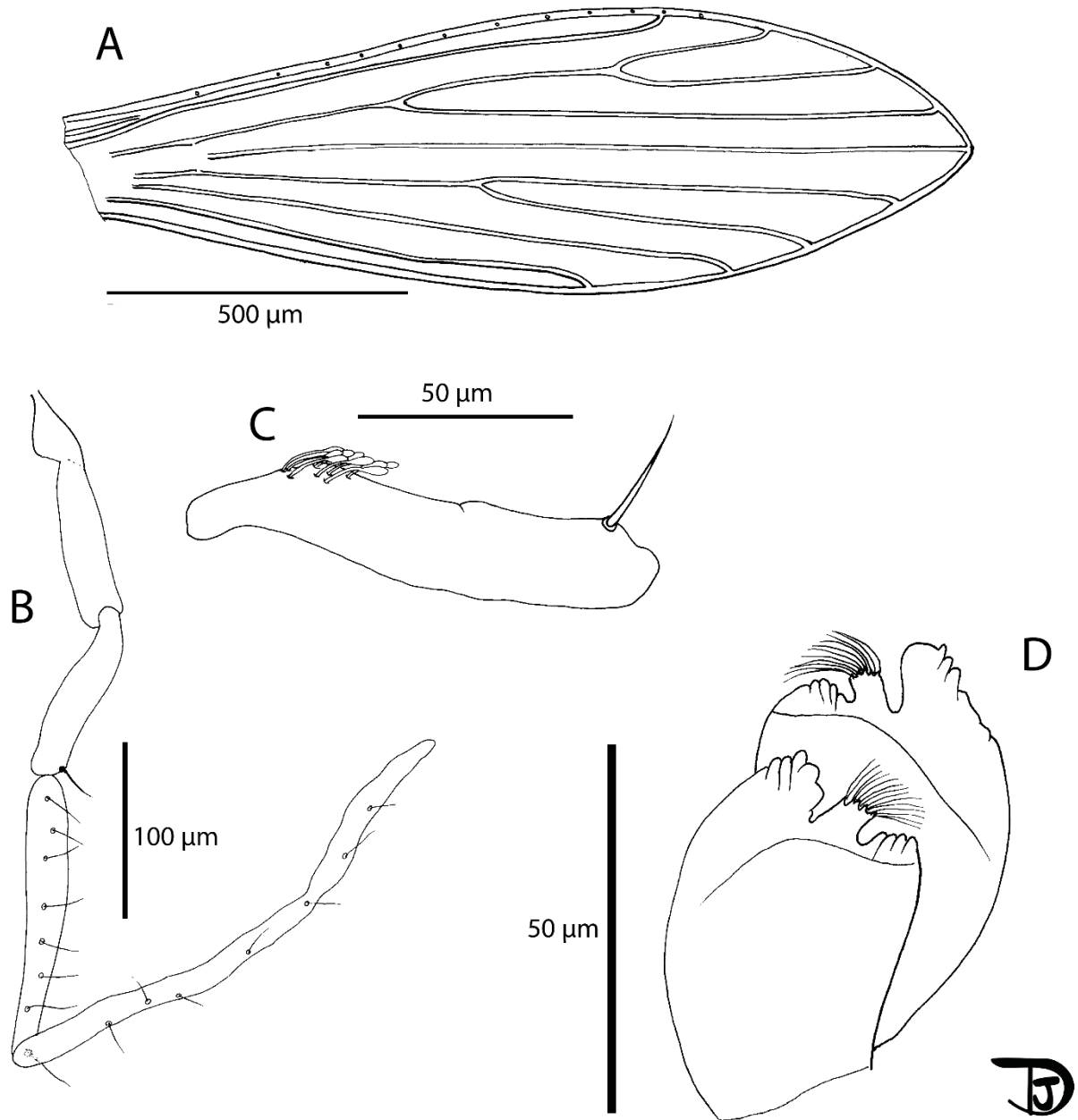


Figure 93 : *Se. sp4*. A : aile ; B : palpe ; C : segment palpal P3 ; D : spermathèques.

4.2 Discussion :

L'inventaire réalisé sur les Phlébotomes du tsingy d'Ankarana a permis la collecte de 707 phlébotomes. Il met en évidence une faune riche d'au moins 10 espèces, chacune dans des proportions très différentes.

Le genre *Phlebotomus* est représenté exclusivement par l'espèce *Ph. fertei*. Notre travail s'est peu focalisé sur ce genre qui reste le mieux étudié de Madagascar malgré son abondance à Ankarana (120 exemplaires capturés représentant près de 17% des captures).

Nous ne nous sommes pas non plus concentrés sur le genre *Grassomyia* pour lequel nous avons identifié seulement 5 exemplaires (3 femelles et 2 mâles). Ce groupe particulièrement complexe nécessite une révision complète qui dépassera largement le cadre de Madagascar. Ce genre est très peu représenté à Ankarana alors qu'il l'est bien mieux dans le reste du pays (Dhondt, 2009).

Nous nous sommes essentiellement concentrés sur les espèces du genre *Sergentomyia* qui sont les plus abondantes dans la région étudiée avec plus de 82% des captures.

Les espèces les plus capturées appartiennent au sous-genre *Vattieromyia* avec plus de 75% des captures. Ce sous-genre est constitué de quatre espèces : *Se. sclerosiphon* et *Se. anka* décrites de la région d'Ankarana, *Se. namo* décrite de la région de Namoroka et *Se. pessoni* décrite de l'archipel des Comores. Seules les deux premières espèces sont connues des deux sexes. Les deux dernières ne sont connues que des femelles. Comme fréquemment chez les *Sergentomyia*, la diagnose est moins difficile chez les femelles que chez les mâles qui, d'une espèce à l'autre voire d'un sous-genre à l'autre, se ressemblent parfois énormément et rendent la diagnose compliquée. Les *Vattieromyia* de Madagascar partagent avec les *Grassomyia* et *Se. majungaensis* une formule antennaire originale dépourvue d'ascoïde sur le premier flagellomère.

Nous avons identifié les spécimens que nous avons examinés en les comparant à la description originale. La diagnose des femelles est plus sûre que celle des mâles. Si les spermathèques constituent un caractère d'identification subgénérique, leur valeur spécifique est nulle. C'est sur la structure du cibarium que repose cette diagnose spécifique. Chez *Se. anka*, la description originale repose sur la présence d'une rangée postérieure de 35 à 43 dents (moyenne : 38). Les médianes étant nettement plus longues que les latérales et arquées dorso-ventralement. Nous retrouvons sur un effectif plus important que dans la description princeps des valeurs débordant des précédentes : de 30 à 45 avec une moyenne de 37,7. Nous avons bien retrouvé cette morphologie de dents centrales hautes et arquées. En ce qui concerne le nombre de denticules de la première rangée, nous en avons retrouvé de 5 à 11 (versus de 7 à 10 dans la description originale). Enfin, nous avons retrouvé sur tous nos exemplaires sauf un (MADA817), la deuxième rangée de denticules, comme dans la description originale où la plage s'étendait de 3 à 7. Dans notre série, le nombre de ces denticules les plus antérieurs varie de 1 à 7.

L'identification des femelles de *Se. sclerosiphon* repose sur des dents cibariales plus espacées et dont les centrales sont droites et non arquées. Nous en comptons 21 à 34 versus 20 à 29 dans la description originale. Nous avons compté 7 à 22 denticules sur la première rangée versus 8 à 15. Si la description originale ne fait pas état d'une seconde rangée de denticules, nous en avons observé une comptant sur 59 spécimens sur les 202 examinés. Le nombre de denticules constituant cette rangée la plus antérieure varie de 1 à 15 avec une majorité des exemplaires qui en contiennent 8 à 15. Les statistiques du **tableau IV** incluent les spécimens n'en possédant pas et ne reflètent donc pas la moyenne des exemplaires qui en disposent.

La diagnose des mâles est beaucoup plus délicate. La position plus ou moins distale de la soie non caduque du gonostyle ne s'avérant pas un caractère intéressant pour l'identification. De même, la longueur du premier flagellomère (=A III) n'est pas d'une utilisation absolue car il existe un recouvrement important des valeurs. Chez *Se. anka*, cette longueur varie de 158 à 248 μm tandis que chez *Se. sclerosiphon*, cette longueur varie de 179 à 287 μm . Donc, si ce flagellomère est de longueur inférieure à 179 μm , l'exemplaire appartient à *Se. anka*. Si la longueur est supérieure à 248 μm , l'individu appartient à *Se. sclerosiphon* mais entre 179 et 248 μm , ce caractère ne permet pas d'identifier un individu. Finalement, nos identifications sont donc basées presque exclusivement sur l'armature cibariale.

L'approche moléculaire ne résout que partiellement la problématique taxinomique chez les *Vattieromyia*. L'approche morphologique se voit globalement confortée par les séquences du cytochrome b qui individualisent bien la très grande majorité des *Se. anka* mâles et femelles

des *Se. sclerosiphon* des deux sexes. En revanche, ce n'est pas le cas des domaines D1 et D2 de l'ADN ribosomique qui sont incapables de différencier ces deux espèces qui se retrouvent mêlées sur la même branche. Ce constat traduit la grande conservation des domaines D1 et D2 et la grande variabilité, parfois trop importante du cytochrome b. La variabilité intraspécifique observée au sein des individus inclus sur la branche des *Se. anka* est de 0,5% et celle des individus sur la branche *Se. sclerosiphon* est de 0,3% ce qui est faible (Depaquit, 2014). Si l'on prend les mêmes individus et que l'on calcule leur variabilité pour les séquences des domaines D1 et D2, on observe une variabilité de 0,03 et 0,02% respectivement, ce qui est logiquement plus faible.

Ce qui est plus surprenant est la position individualisée, bien que faiblement soutenue par le bootstrap de quelques exemplaires qui avaient retenu notre attention à l'examen morphologique par un cibarium pas tout à fait typique des espèces *Se. anka* et *Se. sclerosiphon* (**figure 94**). Il est très intéressant de noter que tant le cytochrome b que les domaines D1 et D2 individualisent nettement ces exemplaires : MADA 95 (♂), MADA199 (♀), MADA819 (♀), MADA876 (♀), MADA893 (♀), MADA897 (♂) et MADA 1345 (♂).

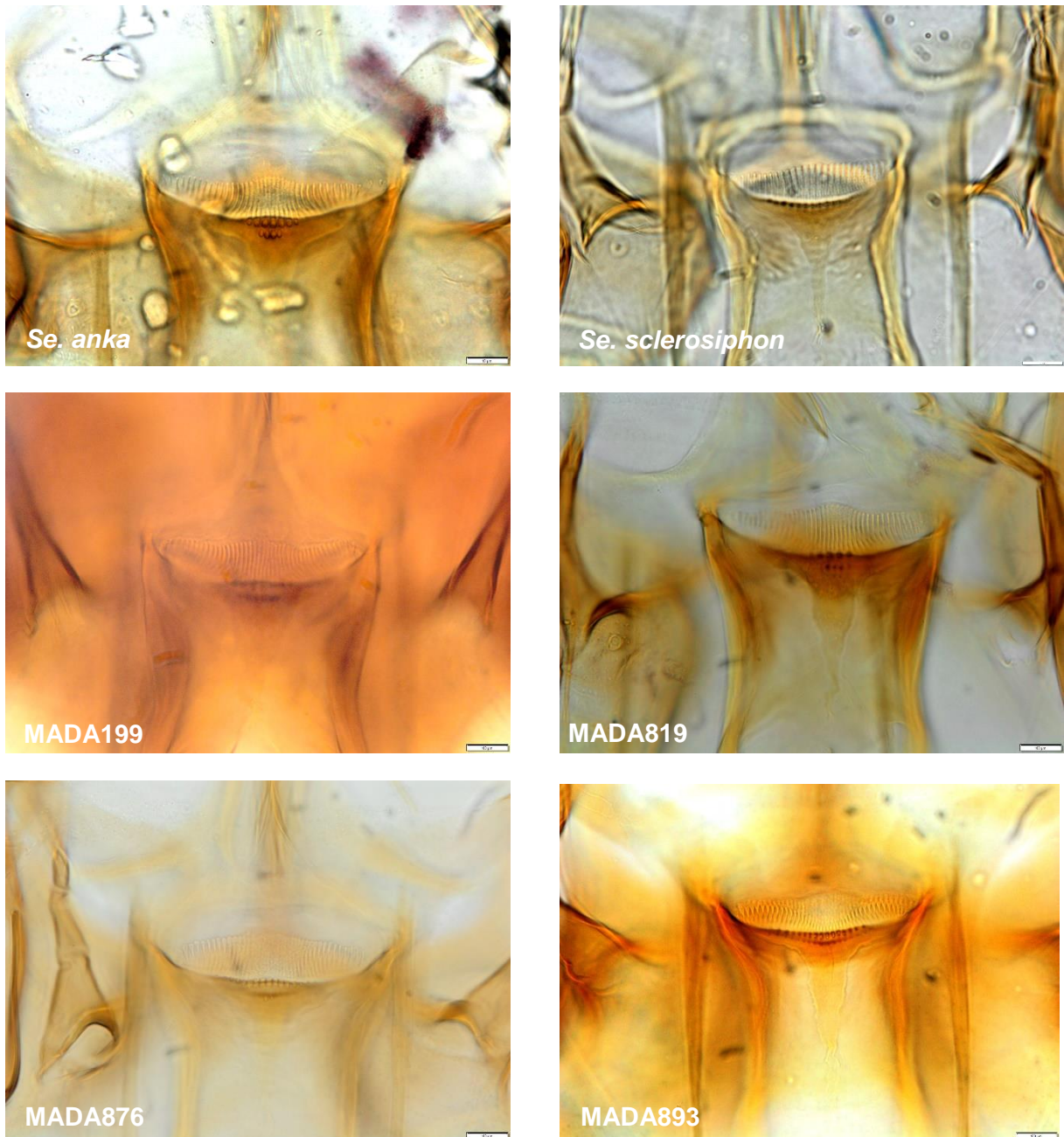


Figure 94 : comparaison des cibariums de *Se. anka* et de *Se. sclerosiphon* avec ceux de quatre femelles génétiquement individualisées.

La variabilité entre ces exemplaires est de 2,4% pour cytochrome b et de 0,4% pour D1-D2. De même, les variabilités moyennes sont plus élevées entre ces individus et *Se. anka* ou *Se. sclerosiphon* (>4.5% avec les séquences de cytochrome b) qu'entre ces deux espèces (2,7% avec les séquences de cytochrome b). Cette individualisation reflète probablement un phénomène de spéciation en cours. Ces exemplaires ont été identifiés comme *Se. anka* ou comme *Se. sclerosiphon*. Il nous semble prématuré de décrire une nouvelle espèce sur ces

seuls exemplaires car si l'on peut ne peut discuter l'évidence moléculaire, force est de constater que peu de caractères morphologiques viennent corroborer cette dernière. De légères différences morphologiques sont en contradiction avec la création d'une espèce jumelle et un statut de sous-espèce ne pourrait être envisagé en raison de la sympatrie avec *Se. anka* et *Se. sclerosiphon*. L'analyse des séquences ne fait pas ressortir de manière évidente de traces d'hybridation entre *Se. anka* et *Se. sclerosiphon*. De plus, la forte variabilité entre ces 7 exemplaires et leur répartition sur deux branches différentes est peut-être en faveur de l'existence de plusieurs populations et il nous semble raisonnable, à l'heure actuelle, de les considérer comme des individus atypiques.

L'espèce *Se. sp1* appartient à une nouvelle espèce. Les évidences sont de nature morphologique et moléculaire. D'un point de vue morphologique, la spermathèque possède une structure très légèrement plissée, sans sclérisation qui ne rappelle aucune de celle des principaux sous-genres décrits. Le troisième segment du palpe est particulièrement large chez la femelle et recouvert d'un grand nombre d'épines de Newstead. Enfin, l'absence d'ascoïde sur les flagellomères 1 et 2 tant chez les mâles que chez les femelles, en font un caractère unique à notre connaissance chez les Phlébotomes. Disposant d'un nombre de spécimens assez conséquent (16 femelles et 14 mâles), nous pensons que ce dernier caractère, associé à la structure particulière de la spermathèque, nécessitera la création d'un sous-genre nouveau. Un autre caractère très original a été observé chez la femelle et chez le mâle : l'extrémité distale frangée des flagellomères f1 à f6.

Les données moléculaires indiquent une grande variabilité intraspécifique (1,6% avec les séquences de cytochrome b et de 0,1% avec les séquences de D1-D2). Parallèlement, nous avons noté sur l'effectif dont nous disposons des variabilités que nous avons un temps pressenti comme la possibilité de l'existence de deux populations distinctes. Chez six femelles, on compte 26 à 31 dents cibariales et chez les 10 autres, 20 à 24. De même chez les mâles, on dénombre 15 à 23 soies internes gonocoxales chez huit exemplaires tandis que les cinq autres en comptent 9 à 14. Contrairement à notre intuition d'observation (observer 20 ou 31 dents cibariales chez les femelles ou compter 9 ou 23 soies coxales chez les mâles se révèle chez de nombreuses espèces comme des caractères de bonne valeur spécifique), ces variables ont passé avec succès les tests de normalité. Nous considérons donc que cette variabilité est de niveau infraspécifique.

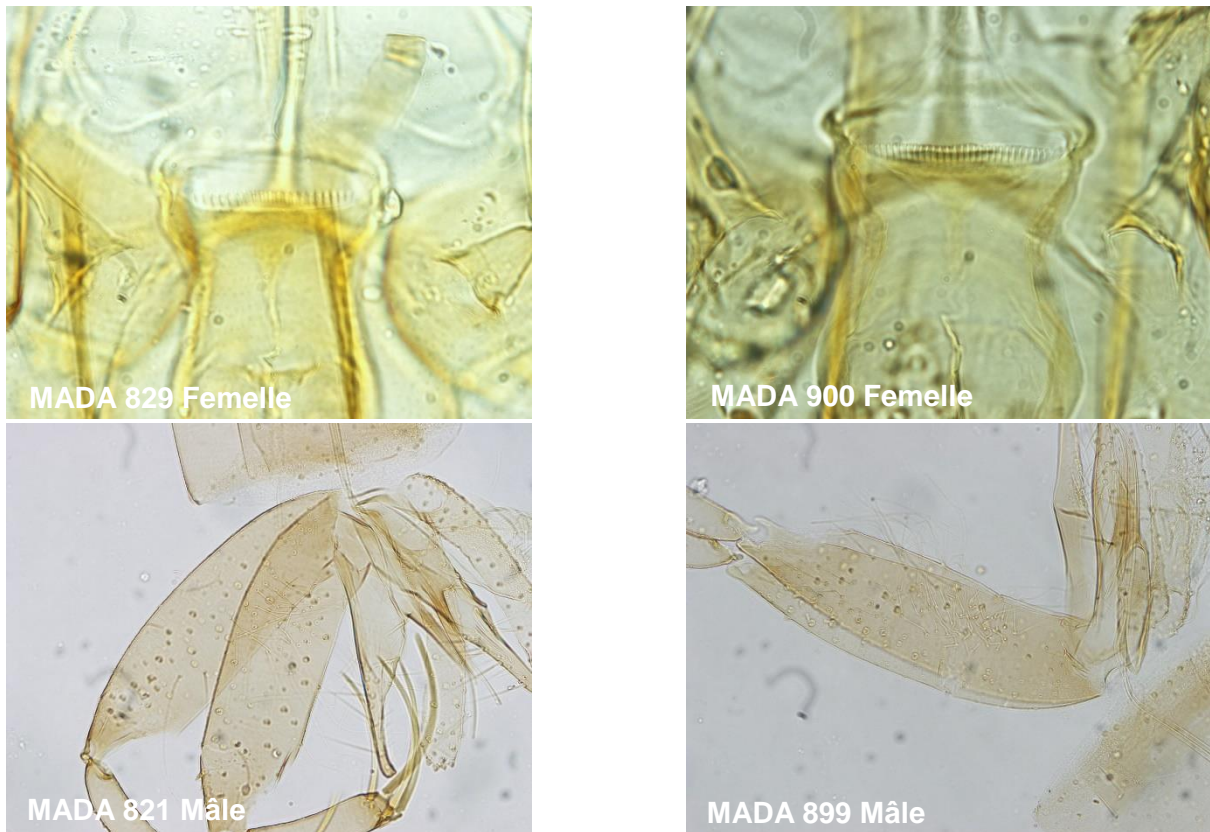


Figure 95 : *Se. sp1* - Armature cibariale chez deux femelles (en haut à gauche avec 20 dents, en haut à droite avec 30 dents) et gonocoxites chez deux mâles (en bas à gauche avec 9 soies internes et en bas à droite avec 23 soies internes).

Se. sp2 constitue une espèce nouvelle pour la Science. Son inclusion dans le sous-genre *Rondanomyia* repose sur l'aspect de la spermathèque, très caractéristique. L'espèce *Se. goodmani* de Madagascar et sa sous-espèce *Se. goodmani comorensis* des Comores sont dépourvues de denticules cibariaux. Le caractère de diagnose différentielle de *Se. sp2* avec ces taxons est l'existence de deux rangées de denticules cibariaux dont la plus antérieure est très originale : les denticules jointifs sont à peine individualisés et l'ensemble forme une ligne foncée traversant la totalité de la plage pigmentée.

L'espèce *Se. sp3* ne correspond à aucune espèce connue de Madagascar ou d'ailleurs et constitue une nouvelle espèce pour la Science. Les spermathèques sont originales. Elles sont lisses à parois fines et sclérifiées à leur base. Ce dernier caractère est original. On le rencontre outre les *Vattieromyia*, chez les Phlébotomes américains du genre *Pressatia* Mangabeira, 1942 et chez deux espèces australiennes non groupées : *Se. pugifera* Lewis & Dyce, 1988 et *Se. standfasti* Lewis & Dyce, 1988. Néanmoins, la structure de la spermathèque

de *Se. sp3* est bien différente de celles-ci. De plus, le cibarium est particulier. Les dents sont longues et pointues, orientées vers l'arrière et le denticule central, beaucoup plus gros que les denticules latéraux présente une grande originalité. On note également l'absence d'ascoïde sur le premier flagellomère ce qui semble être un caractère commun chez les *Sergentomyia* de Madagascar. Cette espèce appartient de toute évidence à un sous-genre nouveau et son positionnement dans les *Sergentomyia* non groupés ajouterait encore un peu de confusion à un groupe complexe et très insuffisamment étudié. Cependant, est-il raisonnable de créer un nouveau sous-genre pour une espèce capturée à un seul exemplaire et dont le montage de l'holotype est de qualité moyenne ?

Enfin, l'espèce *Se. sp4* constitue une quatrième espèce nouvelle pour la Science originaire d'Ankarana. Cette espèce s'individualise des autres d'une part par un cibarium comptant un très grand nombre de dents palissadiques et d'autre part par la structure originale de sa spermathèque. De structure lisse et très fine, les corps de celle-ci rappellent ceux du sous-genre *Sergentomyia* avec une tête enfoncée dans le corps de la spermathèque. Cependant, elle s'en différencie nettement par les quelques bourrelets bilatéraux originaux qui existent à l'extrémité distale du corps. De manière intuitive, cette espèce appartient selon toute vraisemblance à un nouveau sous-genre. De la même manière que pour *Se. sp3*, cette espèce n'a été capturée qu'à un seul exemplaire dont la qualité du montage est très moyenne et la question de créer un nouveau sous-genre se pose donc.

BIBLIOGRAPHIE

5. Bibliographie :

1. Abonnenc E. Sur *Phlebotomus squamipleuris* Newstead, 1912 et espèces voisines (Diptera: Psychodidae). Cah ORSTOM, Sér Ent Méd Parasitol. 1969;7(4):307-23.

2. Abonnenc E. Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera, Psychodidae). Paris, France: ORSTOM;1972.289 p.

3. Bonfield J, Staden R. Experiment files and their application during large-scale sequencing projects. DNA Seq. 1996; 6(2):109-17.

4. Depaquit J, Léger N, Robert V. Première mention de *Phlebotomus* à Madagascar (Diptera: Psychodidae). Description de *Phlebotomus (Anaphlebotomus) fertei* n. sp. et de *Phlebotomus (Anaphlebotomus) huberti* n. sp. Parasite. dec 2002;9(4):325-31.

5. Depaquit J. Molecular systematics applied to Phlebotomine sandflies: review and perspectives. Inf, Gen & Evol. dec 2014; 28:744-756.

6. Depaquit J, Léger N, Robert V. Les phlébotomes de Madagascar (Diptera: Psychodidae). VI--Un sous-genre nouveau (*Vattieromyia*) avec trois espèces nouvelles: *Sergentomyia (V.) sclerosiphon*, *S. (V.) namo* et *S. (V.) anka*. Parasite. nov 2008;15(1):15-26.

7. Esseghir S, Ready PD, Killick-Kendrick R, Ben-Ismaïl R. Mitochondrial haplotypes and geographical vicariance of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. Ins Mol Biol. août 1997;6(3):211-25.

8. Léger N, Rodhain F. *Sergentomyia berentiensis* n. sp. (Diptera, Psychodidae). Description à partir d'un exemplaire femelle récolté à Madagascar. Bull Soc Path Ex. 1978;71(6):476-9.

9. Léger N, Rodhain F, Coulanges P, Clerc Y, Ranaivosata J. Présence de Phlébotomes anthropophiles à Madagascar. Arch Inst Pas Mada. 1980;47(1):249-50.

10. Randrianambinintsoa FJ, Léger N, Robert V, Depaquit J. Paraphyly of the subgenus *Sintonius* (Diptera, Psychodidae, *Sergentomyia*): status of the Malagasy species. Creation of a new subgenus and description of a new species. PLoS One. juin 2014;9(6):e98065.

11. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. oct Mol Biol Evol. 2011;28(10):2731-9.

ANNEXES

Annexe 1

Tableau : Spécimens identifiés et zones de capture.

| Zone capture | Descriptif de l'environnement | Spécimens identifiés MADA |
|--------------|--|--|
| VR 2 | Province d'Antsiranana, En contre-bas du « premier canyon » Au pied de la falaise, dans un bas-fond sableux, en forêt, à 1,4Km du campement des américains Date de capture : 20 mai 2003 | <u>Se. anka</u> : - femelles : 197, 199, 201, 202 - mâle : 200 |
| | | <u>Se. sclerosiphon</u> : - femelle : 198 |
| VR 3 | Province d'Antsiranana, Zone de Tsingy calcaire Au pied de la falaise, au bord d'un pierrier de calcaire, en forêt, à 400m du campement des américains Date de capture : 20 mai 2003 | <u>Se. anka</u> : - femelle : 801 |
| | | <u>Se. sclerosiphon</u> : - femelle : 802 |
| VR 4 | Province d'Antsiranana, Zone de Tsingy calcaire Au pied de la falaise, à 1m au-dessus de l'eau entre les rochers, en forêt, à 100m du campement des américains. Date de capture : 20 mai 2003 | <u>Ph. fertei</u> : - mâle : 804 |
| | | <u>Se. sclerosiphon</u> : - femelle : 803, 805, 806 |
| VR 5 | Province d'Antsiranana, En forêt à 20m du campement des américains et à 100m du pied de la falaise. Date de capture : 20 mai 2003 | <u>Goodmani-like</u> : - femelle : 60 |
| VR 12 | Province d'Antsiranana, | <u>Se. anka</u> : |

| | | |
|--------------|---|---|
| | <p>Zone de Tsingy calcaire</p> <p>Extérieur fond « canyon », proche rivière</p> <p>Date de capture : 21 mai 2003</p> | <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 809, 810, 811, 814, 817, 819, 834 - mâles : 807, 808, 820, 823, 827, 828, 832, 833, 835, 837, 840 <p><u>Se. n. sp A :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 824, 829 - mâles : 816, 821, 825, 826, 830, 831 <p><u>Se. sclerosiphon :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 813, 822, 839 - mâles : 812, 818, 836, 838 |
| VR 13 | <p>Province d'Antsiranana,</p> <p>Sous de grands arbres au fond du « premier canyon » en extérieur.</p> <p>Date de capture : 21 mai 2003</p> | <p><u>Se. anka :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 76, 77 - mâle : 72 <p><u>Se. sclerosiphon :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelle : 73 |
| VR 14 | <p>Province d'Antsiranana,</p> <p>Zone de Tsingy calcaire</p> <p>Au pied de la falaise, en forêt, entre la grotte d'Andrafiabe et « canyon »</p> <p>Date de capture : 21 mai 2003</p> | <p><u>Grassomyia sp :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - mâle : 1217 <p><u>Se. anka :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 241, 1211, 1214, 1216, 1218, 1219, 1220 - mâles : 1210, 1213, <p><u>Se. sclerosiphon :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 239, 240, 1215 - mâles : 1212 |
| VR 15 | <p>Province d'Antsiranana,</p> <p>Zone de Tsingy calcaire</p> <p>Extérieur, dans le premier « canyon »</p> <p>Date de capture : 21 mai 2003</p> | <p><u>Grassomyia sp :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelle : 904 <p><u>Se. anka :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 905 - mâles : 907, 908, 909 |

| | | |
|-------|---|---|
| | | <u>Se. n. sp A :</u> - mâle : 911 |
| | | <u>Se. sclerosiphon :</u> - femelles : 903, - mâles : 906, 910, 912, 913 |
| VR 16 | Province d'Antsiranana, Zone de Tsingy calcaire Entre le deuxième « canyon » et la grotte « cathédrale » Date de capture : 21 mai 2003 | <u>Se. anka :</u> - femelles : 407, 842 - mâles : 844, 845, 846, 847, 849 |
| | | <u>Se. sclerosiphon :</u> - femelles : 244, 400, 402, 403, 404, 405, 406, 409, 848 - mâles : 408, 841, 843, 850 |
| VR 17 | Province d'Antsiranana, Zone de Tsingy calcaire Dans la grotte « cathédrale » Date de capture : 21 mai 2003 | <u>Ph. fertei :</u> - femelles : 67, 68, 1277, 1278, 1280, 1281, 1284, 1287, 1288, IT16 - mâles : 1279, 1283, 1285, 1291, |
| | | <u>Se. goodmani-like :</u> - Femelle : IT13 |
| | | <u>Se. anka :</u> - femelles : 69, 1282, 1293, 1297, 1298, 1301, 1308, 1316 - mâles : 1306, |
| | | <u>Se. sclerosiphon :</u> - femelles : 71, 1289, 1290, 1292, 1294, 1295, 1296, 1299, 1300, 1302, 1303, 1304, 1307, 1309, 1320, IT9, IT10, IT11, IT12, IT14, IT15 - mâles : 1286, 1305, 1310, 1311, 1312, 1313, 1314, 1315, 1317, 1318, 1319, 1322 |
| VR 18 | Province d'Antsiranana | <u>Ph. Fertei :</u> - mâles : IT40, IT43, IT44 |

| | | |
|--------------|---|---|
| | <p>Intérieur grotte d'Andrafiabe, à 50m de l'entrée.</p> <p>Zone encore bien éclairée par la lumière du jour.</p> <p>Date de capture : 22 mai 2003</p> | <p><u>Se. anka</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - mâle : IT37bis <hr/> <p><u>Se. sclerosiphon</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - femelle : IT42 - mâles : IT37prime, IT38, IT39, IT41 |
| VR 22 | <p>Province d'Antsiranana,</p> <p>Zone de Tsingy calcaire</p> <p>Extérieur, entre la sortie de la grotte d'Andrafiabe et la grotte « cathédrale », sous de petits arbres</p> <p>Date de capture : 22 mai 2003</p> | <p><u>Grassomyia</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - mâle : 978, <hr/> <p><u>Ph. fertei</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 974, 980, 983, 987, 990, - mâles : 970, 971, 975, 981, 982, 984, 985, 986, 988, 989, 991, 992 <hr/> <p><u>Se. anka</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - femelle : 979 - mâle : 976 <hr/> <p><u>Se. n. sp A</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - femelle : 973, <hr/> <p><u>Se. sclerosiphon</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - femelle : 367, 972 - mâle : 977 |
| VR 23 | <p>Province d'Antsiranana,</p> <p>Dans la grotte « cathédrale » à 50cm du guano de chauve-souris</p> <p>Date de capture : 22 mai 2003</p> | <p><u>Se. anka</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - mâle : 1340 <hr/> <p><u>Se. sclerosiphon</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 145, 1338, 1341 - mâles : 1339, 1343 <hr/> <p><u>Se. n. sp A</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - mâle : 1342 |
| VR 24 | <p>Province d'Antsiranana,</p> | <p><u>Grassomyia sp</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - mâle : 965 |

| | | |
|---|--|--|
| | <p>Extérieur, en forêt, à 200m de l'entrée du 3^{ème} « canyon »</p> <p>Date de capture : 22 mai 2003</p> | <p><u>Se. anka :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelle : 955 <p><u>Se. sclerosiphon :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 964, 967 - mâles : 954, 963, 966, 968, 969 |
| <p>VR 25</p> | <p>Province d'Antsiranana,</p> <p>Extérieur, en forêt, à 2m du tsingy, entrée du 3^{ème} « canyon »</p> <p>Date de capture : 23 mai 2003</p> | <p><u>Grassomyia sp :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelle : 1327 |
| | | <p><u>Se. goodmani-like :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelle : 1368 |
| | | <p><u>Se. Anka :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 1326, 1337, 1346, 1360, 1366, 1369, 1382 - mâle : 1335, 1344, 1348, 1349, 1350, 1353, 1354, 1357, 1358, 1359, 1361, 1375, 1378, 1380, 1383, 1384, 1386, 1387, 1388, 1389, 1390, 1394, 1396, 1401, 1403, 1409 |
| | | <p><u>Se. sclerosiphon :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 1328, 1329, 1330, 1333, 1334, 1336, 1363, 1365, 1367, 1371, 1372, 1373, 1379, 1391, 1392, 1400 - mâles : 1331, 1332, 1345, 1347, 1351, 1352, 1355, 1356, 1362, 1370, 1374, 1376, 1377, 1381, 1385, 1395, 1405, 1406, 1407, 1408 |
| <p><u>Se. n. sp A :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - mâle : 1398 | | |
| <p>VR 26</p> | <p>Province d'Antsiranana,</p> <p>Zone de Tsingy calcaire</p> <p>Au pied de la falaise</p> <p>Début du 3^{ème} « canyon »</p> <p>Date de capture : 23 mai 2003</p> | <p><u>Se. anka :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelle : 898 <p><u>Se. n. sp A :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 900, 901 - mâle : 899 |

| | | |
|---------------------|---|---|
| <p>VR 27</p> | <p>Province d'Antsiranana, Zone de Tsingy calcaire Dans une grotte, totalement obscure, assez étroite</p> <p>Date de capture : 23 mai 2003</p> | <p><i>Se. anka</i> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 266, 377, 387, 851, 859, 861, 862, 864, 866 - mâles : 858, 863 <hr/> <p><i>Se. n. sp A</i> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 264, 374, 378, 857 - mâles : 865 <hr/> <p><u><i>Se. sclerosiphon</i></u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 258, 262, 263, 265, 375, 379, 381, 384, 385, 852, 853, 854, 855 - mâles : 386, 856, 860, 868, 869, 870 |
| <p>VR 29</p> | <p>Province d'Antsiranana, Zone de Tsingy calcaire Dans une grotte très vaste située entre le 3^{ème} « canyon » et la grotte « cathédrale »</p> <p>Date de capture : 23 mai 2003</p> | <p><u><i>Ph. fertei</i></u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 1003, 1008, 1013, 1022, 1034 - mâles : 997, 998, 1000, 1019 <hr/> <p><u><i>Se. anka</i></u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 1005, 1016, 1018, 1020, 1026, 1029, 1033, 1038, 1233, 1246, 1248, 1253, 1254, 1256, 1257, 1267, 1269, 1271, 1276 - mâles : 994, 999, 1006, 1009, 1239, 1251, 1258, 1259, 1260, 1262, 1263, 1265, 1266, 1268, 1270, 1275 <hr/> <p><u><i>Se. goodmani</i></u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - femelle : 1001 <hr/> <p><u><i>Se. n. sp. A</i></u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 1010, 1011, 1015 - mâle : 1012, 1234, <hr/> <p><u><i>Se. sclerosiphon</i></u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 995, 1002, 1004, 1014, 1023, 1025, 1028, 1030, 1031, 1035, 1036, 1037, 1231, 1235, 1236, 1237, 1240, 1243, 1245, 1249, 1250, 1252 - mâles : 993, 996, 1007, 1017, 1021, 1024, 1027, 1032, 1232, 1238, 1241, 1244, 1247, 1255, 1261, 1264, 1272, 1273 |

| | | |
|--------------|--|---|
| | | |
| VR 31 | Province d'Antsiranana, Zone de Tsingy calcaire Extérieur, en forêt, au pied de l'entrée de la grotte d'Antsiroandoha Date de capture : 24 mai 2003 | <u>Se. anka :</u> - femelles : 893 - mâles : 894 |
| VR 32 | Province d'Antsiranana, Au sommet des éboulis en extérieur, avant de redescendre dans la grotte d'Antsiroandoha. Date de capture : 24 mai 2003 | <u>Se. n. sp. A :</u> - femelle : 394 |
| | | <u>Se. anka :</u> - femelles : 247, 390, 392 |
| | | <u>Se. sclerosiphon :</u> - femelles : 393, 398 - mâles : 395, 397, 399 |
| VR 35 | Province d'Antsiranana, Au fond de la grotte d'Antsiroandoha, à 5m du départ d'un petit couloir. Date de capture : 24 mai 2003 | <u>Se. n. sp. A :</u> - femelles : 282, 285 |
| | | <u>Se. sclerosiphon :</u> - femelles : 284, 286 |
| VR 36 | Province d'Antsiranana, Zone de Tsingy calcaire Grotte d'Andrafiabe, à 50 m de l'entrée, zone lumineuse Date de capture : 25 mai 2003 | <u>Ph. fertei :</u> - femelles : 1039, 1040, 1048, 1050, 1060, 1061, 1063, 1066, 1068, - mâles : 1041, 1042, 1043, 1044, 1045, 1046, 1047, 1049, 1051, 1052, 1053, 1054, 1055, 1056, 1057, 1059, 1062, 1064, 1065, 1067, 1069, 1070, 1071, 1072, 1073, 1074, 1075, 1076, 1077, 1078, 1080, 1081, 1082, 1083, 1084, 1086, 1087, 1088, 1089, 1091, 1105, 1108 |
| | | <u>Se. anka :</u> - femelle : 1104 - mâles : 1101, 1103 |
| | | <u>Se. sclerosiphon :</u> |

| | | |
|--------------|--|---|
| | | <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 1079, 1085, 1090, 1092, 1093, 1094, 1096, 1097, 1099, 1106, 1107, - mâles : 1058, 1100, 1102, |
| VR 37 | Province d'Antsiranana, Zone de Tsingy calcaire Grotte « squelette », à l'entrée, zone très éclairée Date de capture : 25 mai 2003 | <u>Ph. fertei</u> : <ul style="list-style-type: none"> - mâles : 935, 937, 949 |
| | | <u>Se. goodmani-like</u> : <ul style="list-style-type: none"> - femelle : IT7 |
| | | <u>Se. anka</u> : <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 934, 942, 944, 947, IT1 - mâles : 932, 939, IT3 |
| | | <u>Se. sclerosiphon</u> : <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 933, 938, 941, 943, IT8 - mâles : 344, 936, 940, 945, 946, 948, 950, 951, 952, 953, IT2, IT4, IT5, IT6 |
| VR 38 | Province d'Antsiranana, Zone de Tsingy calcaire Grotte « squelette », à 50m de l'entrée, à gauche Date de capture : 25 mai 2003 | <u>Ph. fertei</u> : <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 917, 920, 930 - mâles : 914, 915, 916, 919, 922, 924, 926, 927, 928, 929, 931 |
| | | <u>Se. sclerosiphon</u> : <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 228, 921, 925, - mâles : 923 |
| VR 39 | Province d'Antsiranana, Zone de Tsingy calcaire Grotte « cathédrale », milieu, à 200m de la sortie de la grotte dans le 3 ^{ème} « canyon » Date de capture : 25 mai 2003 | <u>Ph. fertei</u> : <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 1110, 1121, 1150, - mâles : 1109, 1137, |
| | | <u>Se. anka</u> : <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 1114, 1148, 1162, 1171, 1180, 1186, 1195, - mâles : 1181, 1182, 1183, 1203 |
| | | <u>Se. n. sp. A</u> : <ul style="list-style-type: none"> - femelle : 1166 |

| | | |
|-------|---|--|
| | | <p><u>Se. sclerosiphon :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 1111, 1113, 1115, 1118, 1122, 1123, 1124, 1125, 1128, 1129, 1130, 1131, 1133, 1134, 1135, 1136, 1138, 1139, 1140, 1142, 1143, 1146, 1147, 1149, 1151, 1152, 1153, 1154, 1155, 1156, 1157, 1160, 1163, 1164, 1165, 1167, 1168, 1169, 1170, 1173, 1174, 1176, 1177, 1178, 1184, 1190, 1191, 1197, 1198, 1205, 1206, 1207, 1209, IT33, IT34, IT45, IT46, IT47, IT48, IT49, IT50, IT51, IT52 - mâles : 1116, 1117, 1119, 1120, 1126, 1127, 1132, 1141, 1144, 1158, 1159, 1172, 1175, 1179, 1185, 1187, 1188, 1189, 1192, 1193, 1194, 1196, 1199, 1201, 1202, 1204, 1208, IT17, IT18, IT19, IT20, IT21, IT22, IT23, IT24, IT25, IT27, IT29, IT30, IT31, IT32, IT35, IT36 |
| VR40 | Province d'Antsiranana, Zone de Tsingy calcaire Extérieur, en forêt, milieu du campement Anilotra | <p><u>Se. anka :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 873, 876 - mâle : 872 |
| | Date de capture : 26 mai 2003 | <p><u>Se. sclerosiphon :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelle : 875, 879 |
| VR 42 | Province d'Antsiranana, Zone de Tsingy calcaire Extérieur, en forêt, au pied de la falaise. 2 pièges CDC écartés de 100m l'un de l'autre. | <p><u>Ph. fertei :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelle : 1226 |
| | Date de capture : 25 mai 2003 | <p><u>Se. anka :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 1222, 1223, 1229, - mâles : 1225, |
| | | <p><u>Se. sclerosiphon :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 1227, 1228, - mâles : 1224, 1230 |
| VR 44 | Province d'Antsiranana, Zone de Tsingy calcaire Grotte Anilotra | <p><u>Ph. fertei :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 78, 892 |
| | | <p><u>Se. anka :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - femelles : 885, 889, 891 - mâle : 96 |

| | | |
|-------------------|--|--|
| | Date de capture : 26 mai 2003 | |
| | | <u>Se. n. sp 3 :</u> - femelle : 97 |
| | | <u>Se. sclerosiphon :</u> - femelles : 79, 92, 877, 879, 880, 882, 883, 884, 888, 890 - mâles : 93, 878, 881, 886, 887 |
| Andrafiabe | Ces lames ne comportent pas de numéro de piège | <u>Se. sclerosiphon :</u> - femelle : 719 - mâle : 654 |
| | | <u>Se. n. sp 2 :</u> - femelle : 728 |

Note : Les spécimens notés « IT[n] » sont des exemplaires montés *in toto* et qui n'avaient jamais été nommés.

Annexe 2

Protocole d'Extraction**Consignes :** Port de gants

Kit QIAmp DNA mini kit

Utilisation de pilons, verre à pied et tubes coniques 1.5ml

1ère étape

- Allumer le bain marie → Le positionner sur 56 °C
- Dans le tube conique → Ajouter 20 µl de tampon ATL à l'échantillon
 Broyer l'échantillon à l'aide d'un pilon (et laisser le pilon dans le tube si plusieurs échantillons)
 Ajouter 160 µl de tampon ATL (*Lyse*) en rinçant le pilon.
 Mettre le pilon dans le verre à pied.
 Vortexer 15 sec
- Ajouter 20 µl de Protéinase K
- Chauffer au bain marie 30 min minimum à 56°C.
- *Pendant ce temps, noter les tubes dont vous aurez besoin dans la suite de la manipulation et mettre de l'eau de javel (moitié javel moitié eau) dans le verre à pied pour la nuit. Le lendemain, laver les pilons à l'eau savonneuse, bien rincer, les essuyer puis les mettre dans l'alu pour autoclaver. Le verre à pied est à mettre dans la bassine de vaisselle sale)*
- Centri paillasse 15 sec
- Régler le bain marie sur 70°C
- Ajouter 200 µl de tampon AL
- Vortexer 15 sec
- Centri paillasse 15 sec
- Mettre 10 min à 70°C
- Ajouter 200 µl d'éthanol (*précipitation ADN*)

- Vortexer 15 sec
- Centri paillasse 15 sec

2ème étape

- Placer le mélange dans une colonne Qiagen + tube (environ 700 µl)
- Centrifuger à 8 700 RPM pendant 2 min
- Récupérer la colonne sur un tube propre (fourni dans le kit)
- Ajouter 500 µl de tampon AW1
- Centrifuger à 8 700 RPM pendant 2 min
- Récupérer la colonne sur un nouveau tube propre
- Ajouter 500 µl de tampon AW2
- Centrifuger à 14 000 RPM pendant 3 min
- Récupérer la colonne sur un tube conique de 1.5 ml
- Ajouter 100 à 200 µl de tampon AE
- Attendre 5 min
- Centrifuger à 8 700 RPM pendant 2 min

IMPORTANT : PENSER A NOTER LE NOM DE L'ÉCHANTILLON SUR LE BOUCHON ET SUR LE COTE DU TUBE

Annexe 3

Préparation d'un gel d'agarose à 1,5% :

- 1) Peser 60mg de poudre d'agarose.
- 2) Compléter avec 40mL de tampon TBE 1X.
- 3) Dissoudre l'agarose en portant le mélange à ébullition au micro-ondes environ 1min30. La solution obtenue doit être limpide.
- 4) Une fois la solution légèrement refroidie, ajouter sous hotte à flux laminaire 2 μ L de GelGreen® à l'aide d'une pipette réservée à cet usage. Homogénéiser la solution.
- 5) Couler le gel encore liquide dans le compartiment correspondant à la quantité de gel préparé. Les peignes servant à former les puits de dépôt d'ADN ont été placés au préalable et doivent être légèrement surélevés afin de ne pas toucher le fond du compartiment.
- 6) Laisser la solution prendre en masse et se gélifier à température ambiante sous la hotte.
- 7) Une fois le gel formé au bout de 20 à 45min les peignes peuvent être délicatement retirés et le gel sorti de l'enceinte de la hotte.

BLAVIER Antoine – Inventaire des phlébotomes (Diptera, Psychodidae) de la région d'Ankarana (Madagascar) avec description de nouveaux taxons

Thèse d'exercice : Pharmacie : Reims : 2018

RESUME

Cette thèse propose un inventaire des phlébotomes de la région d'Ankarana (Madagascar). Une identification morphologique a été couplée à une identification moléculaire (séquençage du cytochrome B de l'ADNr et des domaines D1 et D2). Ces analyses ont mis en évidence la présence de 10 espèces parmi lesquelles au moins quatre sont nouvelles pour la Science. Nous en proposons une première description.

MOTS-CLES

- Phlebotomus
- ADN mitochondrial
- ADN ribosomique

JURY

Président : M. DEPAQUIT Jérôme
Directeur : M. DEPAQUIT Jérôme
Assesseur(s) : Mme. LEGER Nicole
M. ROBERT Vincent
M. GANTIER Jean-Charles

ADRESSE DE L'AUTEUR

M. BLAVIER Antoine
37 Rue Clovis 51100 Reims