



UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

UNITE DE FORMATION et de RECHERCHE de PHARMACIE

Ecole Doctorale: Sciences Technologie Santé

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Discipline: Parasitologie

par

Sonia Zapata Mena

le 9 juillet 2012

**Contribution à l'étude des *Psychodopygina* d'Equateur
(Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Systématique et biologie.**

Jury

Pr. María Dolores BARGUES, Université de Valencia, Espagne (Président de jury)

Pr. Montserrat GALLEGRO, Université de Barcelona, Espagne (Rapporteur)

Pr. Bernard PESSON, Université de Strasbourg (Examineur)

Pr. Jérôme DEPAQUIT, Université de Reims Champagne Ardenne (Directeur)

N° attribué par la bibliothèque

111R|E|I|1111

©

à mon mari Alfredo

à mes parents

Remerciements

A Madame Prof. María Dolores BARGUES

Mi profundo agradecimiento por haber aceptado examinar este trabajo. Me resulta muy agradable recordar que la primera vez que nos conocimos fue en Ecuador y luego tuve la suerte de tenerte como profesora durante el Máster en Valencia.

A Madame Prof. Montserrat GALLEGO

Quiero expresar mis sentimientos de profunda gratitud por haber aceptado revisar este trabajo. El congreso en Turquía (ISOPS) me dio la oportunidad de conocerte y poder valorizar tu calidez tanto humana como científica.

A Monsieur Prof. Bernard PESSON

Je vous remercie infiniment de participer à ce jury. Je vous suis particulièrement reconnaissante de m'avoire accueillié dans votre laboratoire à Strasbourg pour m'initier aux études isoenzymatiques. Merci pour votre gentillesse, pour votre générosité, pour votre bonne humeur et pour votre investissement.

A Monsieur Prof. Jérôme DEPAQUIT

Je t'exprime toute ma reconnaissance pour m'avoire accueillié chaleureusement dans ton laboratoire et pour tes qualités humaines qui te valorisent autant comme un excellent scientifique qu'une grande personne. Si je commence à énumérer toutes les choses que tu as fait de bien pour moi je ne finirai jamais et j'aurai peur d'en oublier certaines, tellement la liste est longue. A toi, toute ma gratitude pour ton aide, tes conseils et ton soutien. Tu es un scientifique exemple. J'espère tracer un chemin aussi réussi que le tien, ça sera peut être la meilleure façon pour te rendre peu de ton investissement dans ce travail !

Je tiens à remercier:

Monsieur le Docteur François Le Pont, initiateur de ce travail sans lequel il n'aurait pu être réalisé. Merci pour votre implication très régulière dans ce travail, pour vos idées pertinentes et pour la mise à disposition de vos collections d'une valeur exceptionnelle.

Madame le Professeur Eunice Galati pour votre accueil dans votre laboratoire, pour vos conseils avisés, pour le don de phlébotomes et pour votre confiance qui se traduit par une collaboration fructueuse dont j'espère qu'elle se poursuivra longtemps.

Madame le Professeur Nicole Léger pour vos encouragements et vos qualités pédagogiques exceptionnelles. Chacune de nos rencontres a été un moment inoubliable.

Monsieur le Professeur Jean-Charles Gantier pour le don de matériel de Guyane, en espérant que cette thèse constituera le début d'une longue collaboration: il y a tant à faire en comparant les phlébotomes d'Equateur avec ceux de Guyane !

Au docteur Denis Augot pour ton accueil chaleureux, ta générosité, tes encouragements quotidiens et les bon moments passés ensemble et avec ta belle famille.

Les docteurs Hubert Ferté et Damien Jouet pour m'avoir accueillie gentiment dans le laboratoire et pour m'avoir encouragée dans le domaine de la biologie moléculaire.

Au docteur Mohamed Kasbari dont la bonne humeur et le calme sont toujours rassurants.

A Fanny Remois qui a eu la générosité de me prêter tout le matériel dont j'avais besoin et pour sa disponibilité et gentillesse.

A tous mes professeurs du CIEF qui m'ont enseigné le français, spécialement à Mme Ramirez de la Rosa pour votre confiance, votre amitié et pour vos encouragements. Merci de m'avoir transmis votre énergie positive. Yo quedo eternamente agradecida !!

A Mireille Cousinat, Denise Pisani, Chantal Grimplet, Yves Gourdain pour m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions et dans la bonne humeur quotidienne.

A Françoise Vernet pour l'aide efficace et discrète que tu m'as apportée avec le sourire et la spontanéité qui te caractérise.

A Camille et Yves pour m'avoir accueillie chez vous, pour partager de bons moments (la cuisine, le basket, les conseils vétérinaires etc.) merci !

A Sana pour les très bons moments passés ensemble et pour la très solide amitié qui nous lie désormais, seulement il me reste à te dire un grande merci !

A Catherine pour ton aide sans limite. Je ne trouve pas les mots pour t'exprimer toute ma gratitude.

A Mohammad, Fano, Darine Caroline, Nicole et Ginah pour les moments agréables en votre compagnie.

A las autoridades de la Universidad San Francisco de Quito

A Santiago, Carlos, Gonzalo, Stella y María de Lourdes por todo el apoyo brindado para realizar mis estudios.

A mis colegas y amigos de Ecuador

A Gabriel Trueba

Por la confianza que pusiste en mí desde el primer día que me conociste, por ser mi mentor y por no haber dejado nunca de insistir en que haga el doctorado. Para ti mis sentimientos de gratitud, respeto y amistad.

A Verónica Barragán

Por todo tu apoyo durante estos cuatro años.

A Renato León

Por haberme acompañado en las salidas de campo y haberme hecho partícipe de tu fascinación por la naturaleza.

A Lorena Mejía

Siempre incondicional conmigo y solo tú sabes cómo me has ayudado durante este tiempo. Solo me resta decirte muchas gracias por todo!

A Anita Freire, Soledad Tello, Karlita Vasco y Moises Gualapuro

Que me acompañaron en mis salidas de campo e hicieron que el trabajo sea muy llevadero y agradable.

A la Senescyt

Entidad que financió mi beca de estudios en Francia

Un agradecimiento muy especial para mi familia

A mis padres que me han enseñado el valor de la constancia y la humildad, gracias a ustedes he llegado hasta aquí y sé que el límite de nuestros sueños solo nos imponemos nosotros mismos.

A mis “ñaños” gracias por estar conmigo siempre, por entenderme y darme su cariño.

A Giuliana por tu dulzura y cariño.

Finalmente, a ti esposo, el eje de mi vida, sin tu apoyo y tu amor probablemente esto no habría sido posible. Gracias por compartir tu vida conmigo y dejarme cumplir mis sueños. Gracias por ser mi compañero incondicional!

Résumé

Des prospections réalisées en Equateur (Amazonie et côte pacifique) ont permis la collecte d'un matériel entomologique abondant et diversifié, notamment chez les Psychodopygina. Nos travaux ont permis de réaliser plusieurs travaux de systématique, essentiellement moléculaire. Afin de tester les hypothèses phylogénétiques développées par Galati (2010), nous avons conduit une étude de phylogénie moléculaire chez les Psychodopygina. Basée sur les séquences des domaines D1, C2 et D2 de l'ADNr 28S et sur celles d'une partie du cytochrome b de l'ADNmt, elle inclut 49 espèces représentant les sept genres de la sous tribu et la majorité des sous-genres et séries. Les marqueurs ribosomiques sont mieux adaptés à la problématique que le marqueur mitochondrial. Le genre *Psychodopygus* est monophylétique. En raison du positionnement de *Ny. richardwardi* parmi les *Trichophoromyia*, nous concluons à la paraphylie des genres *Nyssomyia* et *Trichophoromyia*. Le genre *Psathyromyia* est également paraphylétique, tout comme le genre *Martinsmyia*. Le genre *Bichromomyia* serait le groupe frère du genre *Psychodopygus* et la validité du genre *Vianniamyia*, inclus dans le genre *Psathyromyia* doit être discutée.

Des phylogénies moléculaires plus terminales ont été réalisées par comparaison de séquences de l'ITS2, de l'EF-1 α et du cytochrome b.

Chez les *Psychodopygus* de la série Guyanensis, une étude moléculaire couplée à une étude morphologique et morphométrique de morphotypes différents chez *Ps. geniculatus*, en sympatrie avec *Ps. corossoniensis* et *Ps. luisleoni* nous a conduit à décrire une espèce nouvelle pour la science : *Ps. francoisleonti*.

Chez *Pa. aragoi*, notre étude pilote basée sur l'analyse de morphotypes différents allopatriques et sympatriques renforce l'hypothèse de l'existence probable d'un complexe d'espèces chez ce taxon.

Chez *Ny. trapidoi*, les analyses moléculaires et enzymatiques conduites sur des exemplaires clairs et foncés ne supportent pas la mise en évidence de deux populations comme cela avait été auparavant démontré.

Nos approches épidémiologiques ont permis de mettre en évidence l'ADN d'*Endotrypanum monterogeii* chez plusieurs exemplaires de *Ny. trapidoi*. Si aucun phlebovirus n'a été détecté dans les échantillons étudiés, nous rapportons la présence d'un flavivirus chez *Pa. abbonenci*.

Mots-clés: Psychodopygina, Equateur, ADN ribosomique, ADN mitochondrial, phylogénie, *Endotrypanum*.

Abstract

Most Ecuadorian sand flies studied so far belong to Psychodopygina sub tribe and the present research uses morphometric and modern molecular techniques to answer many some questions regarding this taxon in Ecuador.

We present phenetic and phylogenetic analyses based on the sequences of the domains D1, C2 and D2 of the 28S rDNA and cytochrome b mtDNA were used to test the classification of Psychodopygina sub tribe proposed by Galati (2010). Our study includes 49 species representing the seven genera included in the sub tribe and its main subgenera and series. The results support the monophyly of the genus *Psychodopygus*. The genera *Psathyromyia*, *Nyssomyia* and *Trichophoromyia* are paraphyletic. *Bichromomyia* is the sister group of *Psychodopygus* and the validity of the genus *Viannamyia* is doubtful because it is included inside the *Psathyromyia* genus.

Our data strongly suggest the presence of two populations within *Ps. geniculatus* and the lack of intermediate forms between these two morphotypes incited us to describe a new sympatric species, *Psychodopygus francoisleponti*.

We also carried out a pilot study based on the analysis of different allopatric and sympatric morphotypes of *Pa. aragai* which suggested the existence of a possible complex of species in this taxa.

Finally, we analyzed of mitochondrial gene sequences and isoenzymes from *Ny. trapidoi* collected from Ecuador and our result did not support the existence of two sibling species within as previously reported in the literature. From an epidemiological point of view, we emphasize the probable vectorial role of *Nyssomyia trapidoi* for *Endotrypanum monterogeii*. Moreover, no phlebovirus was detected in the processed sand flies whereas a flavivirus has been found in a pool of *Psathyromyia. abonnenci* females.

Key words: Psychodopygina, Ecuador, ribosomal DNA, mitochondrial DNA, phylogeny, *Endotrypanum*.

Table des matières

1.	INTRODUCTION	1
2.	REVISION BIBLIOGRAPHIQUE	3
2.1	L'ÉQUATEUR.....	3
2.1.1	Situation géographique	3
2.1.2	Le climat	3
2.1.2.1	Température.....	3
2.1.2.2	Pluviométrie.....	5
2.1.2.3	Ensoleillement	6
2.1.3	Végétation.....	6
2.2	LES LEISHMANIOSES EN EQUATEUR	7
2.2.1	Historique des leishmanioses en Equateur	7
2.2.2	Distribution et Epidémiologie	14
2.2.3	Les formes cliniques	18
2.2.4	Le parasite.....	19
2.2.5	Les Phlébotomes de l'Equateur	20
2.2.6	Réservoirs	26
2.3	CLASSIFICATION DES PHLEBOTOMES	27
2.4	JUSTIFICATIF DE NOS TRAVAUX.....	32
3.	MATERIEL ET METHODES.....	34
3.1	Origine des Phlébotomes	34
3.2	Traitement des échantillons destinés aux études moléculaires.....	34
3.3	Identification des spécimens.....	35
3.4	Liste de phlébotomes identifiés	35
3.5	Morphométrie	36
3.6	Analyse moléculaire	37
3.6.1	Extraction de l'ADN.....	37
3.6.2	Amplification de l'ADN.....	38
3.6.3	Marqueurs moléculaires	39
3.6.4	Purification de produit de PCR.....	40
3.7	Détection d'ADN leishmanien	41
3.8	Détection d'ARN viral.....	42
3.9	Séquençage	42
3.10	Analyse des séquences.....	42
3.11	Analyse isoenzymatique	43
3.11.1	Préparation du gel	43
3.11.2	Préparation des extraits protéiques	43
3.11.3	Electrophorèse	43
3.11.4	Coloration des Protéines étalon	44
3.11.5	Révélation des profils isoenzymatiques	44
3.11.6	Analyse des résultats	44
4.	RESULTATS.....	45

4.1	Article N° 1	46
4.2	Article N° 2:.....	62
4.3	Article N° 3	75
4.4	Article N° 4	88
4.5	Résultats préliminaires relatifs à la détection d'un arbovirus sur un pool de <i>Psathyromyia abonnenci</i>	113
5.	DISCUSSION GENERALE	114
6.	CONCLUSIONS.....	122
7.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	123

Liste des figures

FIGURE 1, CARTE PHYSIQUE DE L'ÉQUATEUR AVEC LES QUATRE RÉGIONS : CÔTE PACIFIQUE, ANDES, AMAZONIE ET LES ÎLES GALAPAGOS (DISPONIBLE A PARTIR DE L'URL: HTTP://WWW.IGM.GOB.EC)	4
FIGURE 2. CARTE POLITIQUE DE L'ÉQUATEUR AVEC SES 24 PROVINCES (DISPONIBLE A PARTIR DE L'URL: HTTP://WWW.IGM.GOB.EC)	4
FIGURE 3. CARTE CLIMATIQUE DE L'ÉQUATEUR AVEC LA DIVERSITÉ DES CLIMATS ADAPTE DE (DISPONIBLE A PARTIR DE L'URL: HTTP://WWW.METROPOLITANTOURING.COM)	5
FIGURE 4. DIVERSITÉ D'ÉCOSYSTÈMES PAR RÉGIONS AVEC LA DESCRIPTION DE LA VÉGÉTATION CARACTÉRISTIQUE (INEFAN/GEF-BIRF, WILD LIFE CONSERVATION SOCIETY Y ECOCIENCIA. (DISPONIBLE A PARTIR DE L'URL: HTTP://WWW.ZONU.COM/DETAIL/2011-11-04-14850/TIPOS-DE-VEGETACION-DEL-ÉCUADOR-1999.HTML)	7
FIGURE 5. DISTRIBUTION DES LEISHMANIOSES PAR PROVINCES DANS LE TERRITOIRE ÉQUATORIEN.....	14
FIGURE 6. INCIDENCE DES LEISHMANIOSES PAR PROVINCE (MSP, 2008).....	17
FIGURE 7. NOMBRE DE CAS DE LEISHMANIOSE PAR PROVINCE (MSP, 2010).....	17
FIGURE 8. DISTRIBUTION DES CAS PAR RÉGIONS (MSP, 2001-2010)	18
FIGURE 9. CLADOGRAMME DE PHLEBOTOMINAE GALATI (1995) :	30
FIGURE 10. CARACTÈRES MESURES POUR CARACTÉRISER LES <i>PSYCHODOPYGUS</i> DE LA SÉRIE GUYANENSIS. A) TÊTE: A1. TROISIÈME SEGMENT DE L'ANTENNE (AIII) B) GENITALIA TERMINALE: B1. LONGUEUR DU STYLE, B2. LONGUEUR DU COXITE, B3. LARGEUR DU COXITE, B4. LONGUEUR DU SURSTYLE, B5. INSERTION DE LA PREMIÈRE ÉPINE SUR LE STYLE, B6. INSERTION DE LA DEUXIÈME ÉPINE SUR LE STYLE. C) POMPE GENITALE ET FILAMENTS GENITAUX: C1. LONGUEUR DE LA POMPE GENITALE, C2. LONGUEUR DES FILAMENTS GENITAUX, D) PARAMÈRE : D1+D2. LONGUEUR TOTALE DU PARAMÈRE, D2. LONGUEUR DE LA PARTIE DISTALE.....	38

Liste des tableaux

TABLEAU I . INCIDENCE DES LEISHMANIOSES PAR PROVINCE PENDANT LES ANNEES 2001 A 2010 (MINISTERE DU SANTE PUBLIQUE D'ÉQUATEUR, MSP, 2010)	16
TABLEAU II. DISTRIBUTION D'ESPECES DE LEISHMANIA PAR REGION GEOGRAPHIQUE ET PAR TYPE DE LESION (CALVOPÍÑA ET AL. 2006).	21
TABLEAU III. LISTE DE PHLEBOTOMES ENREGISTRES EN EQUATEUR (ALEXANDER ET AL. 1992).....	22
TABLEAU IV. LISTE ACTUALISE DE PHLEBOTOMES PRESENTS EN EQUATEUR, BASEE DE LA CLASSIFICATION DE GALATI (2010), LES NOUVELLES MENTIONS SONT INDIQUEES AVEC UN ASTERISQUE.	24
TABLEAU V. EVOLUTION DE LA CLASSIFICATION DES PHLEBOTOMINAE (LEGER & DEPAQUIT, 2002)	28
TABLEAU VI. CLASSIFICATION DES PHLEBOTOMES AMERICAINS SELON YOUNG ET DUNCAN (1994).....	29
TABLEAU VII. CLASSIFICATION DE PHLEBOTOMES AMERICAINS PROPOSEE PAR GALATI (1995, 2010).....	31
TABLEAU VIII. ORIGINE DE PHLEBOTOMES CAPTURES ET INCLUS DANS L'ÉTUDE.	34
TABLEAU IX. LISTE DES PHLEBOTOMES POUR L'ANALYSE MOLECULAIRE.....	35
TABLEAU X. COMPOSITION DES MIX DE PCR	39
TABLEAU XI. AMORCES ET PROTOCOLES UTILISES POUR AMPLIFIER LES MARQUEURS MOLECULAIRES.....	40
TABLEAU XII RESULTATS DES ANALYSES MOLECULAIRES ET CULTURE CELLULAIRE POUR LA DETECTION DE LA PRESENCE DE PHLEBOVIRUS ET FLAVIVIRUS	113

Abréviations

ADNmt : Acide désoxyribonucléique mitochondrial

AIII : Troisième segment de l'antenne

ARNr : Acide ribonucléique ribosomal

CDC : Center for disease control

COI : Cytochrome oxydase C subunité I

CYT b : Cytochrome b

D1-D2 : premier et deuxième domaines divergents de l'ADN ribosomal

dNTP : desoxyribonucléotide triphosphate

ITS-2 : Internal transcribed spacer 2

PCR : Polymerase chain reaction

RPM : Rotations par minute

TBE : Tris - Acide Borique - EDTA

1. INTRODUCTION

Les Leishmanioses sont des maladies mondialement distribuées, causées par des parasites protozoaires appartenant au genre *Leishmania* transmis en conditions naturelles par la pique des phlébotomes (Diptera: Psychodidae). Cette maladie est endémique dans 88 pays du monde, fondamentalement dans les régions tropicales et subtropicales d'Afrique, d'Asie, d'Europe, et principalement le Centre et le Sud de l'Amérique. Environ 350 millions personnes vivent dans des zones exposées au risque d'infestation et on estime à 12 millions le nombre de personnes affectées et à 1,5 millions l'incidence annuelle. Il est souvent considéré que le nombre de personnes infestées est sous-estimé et dépasse les 12 millions de cas en raison de la distribution discontinue des zones endémiques, du nombre de cas non rapportés, de ceux mal diagnostiqués et par la difficulté d'obtenir des informations de la part des autorités de santé de certains pays (Desjeux 2001; 2004).

Les leishmanioses représentent un groupe de maladies extrêmement diverses tant sur l'aspect clinique qu'épidémiologique. La présentation clinique est dépendante tant de l'espèce de parasite que de la réaction immunitaire de l'hôte (Ashford, 2000; Kaye et Scott, 2011).

Les formes cliniques des leishmanioses comprennent : la leishmaniose viscérale (LV) caractérisée par un envahissement viscéral où le parasite se multiplie et qui est habituellement d'évolution fatale en l'absence de traitement; la leishmaniose muco-cutanée (LMC) caractérisée par l'inflammation destructive du tissu, et la leishmaniose cutanée (LC) qui se caractérise par la présence de lésions de peau ulcératives plus ou moins importantes, selon l'espèce en cause, qui se localisent à l'endroit même de la piqûre du phlébotome (Desjeux, 2004; Reithinger et al. 2007). D'autres types inhabituels de leishmaniose cutanée existent : la leishmaniose *recidiva cutis* (LRC) caractérisée par le développement plus ou moins tardif de nodules satellites dans ou autour de la cicatrice d'une lésion cliniquement guérie, la leishmaniose cutanée diffuse (LCD) qui présente des nodules non-ulcératifs multiples à cause d'une réponse immunitaire cellulaire déficiente, et la leishmaniose dermique post kala-azar (PKDL), qui peut apparaître sur la peau des individus après traitement d'une leishmaniose viscérale initiale (Ashford, 2000; Kato et al. 2010).

En termes de santé publique, les leishmanioses sont considérées partout comme un véritable problème, qu'il s'agisse des formes viscérales les plus graves ou des formes cutanées, les moins graves mais souvent défigurantes. Cette préoccupation de santé publique est exacerbée

à juste titre par l'augmentation des risques collectifs liés à l'environnement comme les migrations, l'urbanisation, la déforestation, ou à des risques individuels comme la survenue d'un SIDA avec effondrement du taux de lymphocytes T CD4+, la malnutrition ou des facteurs génétiques (Desjeux, 2004 ; WHO, 2010).

En Equateur, la forme viscérale qui sévit en Amérique du Sud, causée par *Leishmania infantum* après son introduction depuis l'Europe, ne se transmet pas de manière autochtone. En revanche, les formes cutanées et cutanéomuqueuse sévissent de manière endémique (Hashiguchi et Gómez, 1991).

La maladie est acquise par les êtres humains en raison de leurs activités de travail, de tourisme, de mouvements migratoires ou de la colonisation de zones tropicales et subtropicales où il y a la présence des vecteurs et des réservoirs qui sont des mammifères sauvages (WHO, 2010).

2. REVISION BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 L'ÉQUATEUR

2.1.1 Situation géographique

La République d'Équateur est un pays situé dans la partie nord-ouest de l'Amérique du Sud. Son nom provient du fait qu'il est traversé par l'équateur. La cordillère des Andes traverse le pays du Nord au Sud et le divise en trois régions naturelles différentes : la côte du Pacifique avec des plaines subtropicales et tropicales, la région des Andes avec de hautes montagnes et des vallées où existent des variations importantes de température (de l'ordre de 15 à 22 °C) et l'Amazonie couverte par la forêt tropicale humide (figure 1). De plus, l'Équateur possède un territoire d'Outre-mer : les îles Galápagos (l'Archipel de Colomb), situées dans l'océan Pacifique, à 1000 km environ à l'ouest de la côte. Ces îles sont connues pour leur biodiversité importante, parmi les la plus denses de la planète. (León, 2005).

Le pays a une superficie de 283 561 kms² divisée administrativement en 24 provinces (figure 2) Sa population totale est 14 800 000 habitants (disponible à partir de l'URL: <http://www.inec.gob.ec/estadisticas/>).

2.1.2 Le climat

Les caractéristiques climatologiques de l'Équateur, répondent à une diversité de facteurs tels: la latitude, l'altitude, l'orientation des chaînes montagneuses, la végétation, la distance par rapport à l'Océan, les courants marins et les vents dominants. (disponible à partir de l'URL: http://www.inamhi.gov.ec/meteorologia/eclimaticos_caracteristicas.htm).

Parmi les principales variables climatiques, nous retiendrons la température, l'humidité, la pluviométrie, l'évaporation, l'ensoleillement, la direction, la force des vents et le niveau de radiation ultraviolette (Figure 3).

2.1.2.1 Température

En zone andine, entre 1500 et 3000 mètres les valeurs moyennes varient entre 10 et 16°C. Dans la région orientale, comme dans la zone littorale ou dans les Îles Galápagos, la moyenne annuelle s'établit avec constance entre 24 et 26°C, avec les maximas excédant rarement 36°C

et des minimas franchissant rarement les 14°C. (Disponible à partir de l'URL: http://www.inamhi.gov.ec/meteorologia/eclimaticos_caracteristicas.htm)

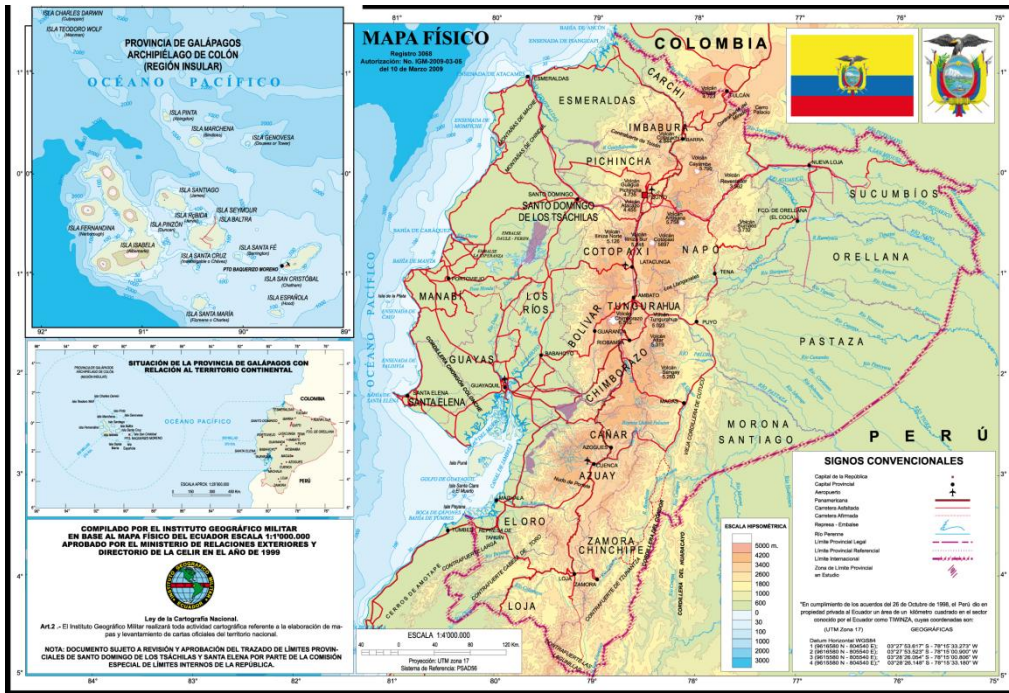


Figure 1, Carte physique de l'Equateur avec les quatre régions : Côte pacifique, Andes, Amazonie et les îles Galápagos (Disponible à partir de l'URL: <http://www.igm.gov.ec>)

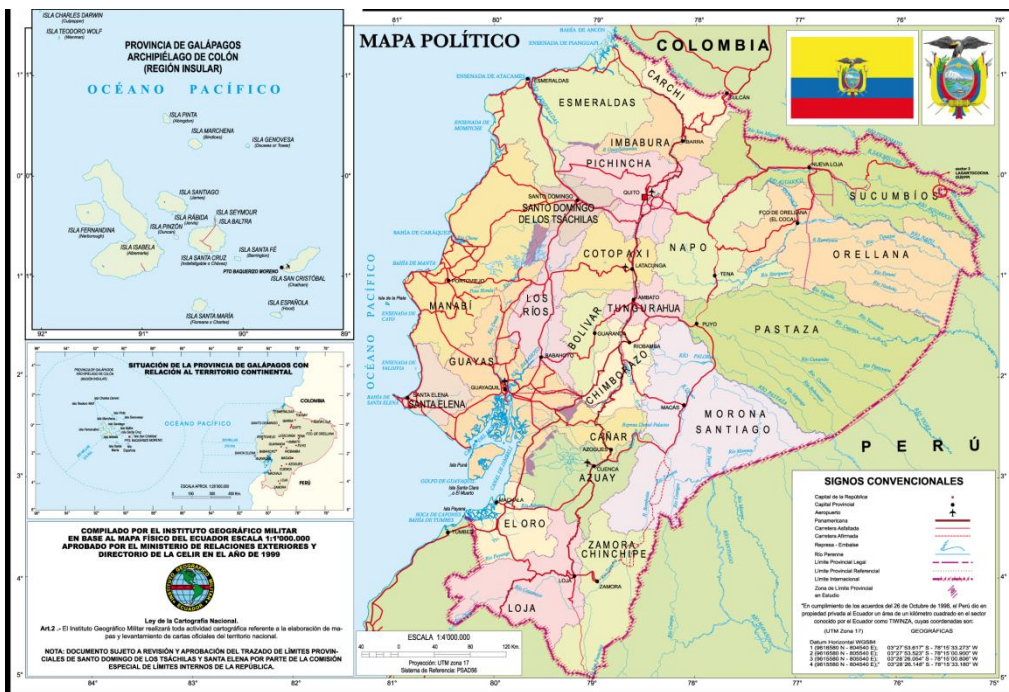


Figure 2. Carte politique de l'Equateur avec ses 24 provinces (Disponible à partir de l'URL: <http://www.igm.gov.ec>)



Figure 3. Carte climatique de l'Equateur avec la diversité des climats adapté de (Disponible à partir de l'URL: <http://www.metropolitantouring.com>)

2.1.2.2 Pluviométrie.

La région amazonienne, tout comme le nord-est de la région littorale, sont les zones les plus pluvieuses avec des cumuls annuels qui fluctuent entre 3000 et 4000 mm. Sur la côte pacifique, les précipitations annuelles augmentent d'Ouest en Est. Les plus basses valeurs s'inscrivent dans le secteur de la Péninsule de Sainte Elena (250 mm), alors que des précipitations annuelles supérieures à 3000 mm peuvent être observées vers l'intérieur de la

région jusqu'à une altitude approximative de 1500 m. Dans la région andine, deux saisons pluvieuses sont observées, de février à mai et d'octobre à novembre, avec une première saison sèche très marquée entre juin et septembre, et une seconde moins accentuée en décembre - janvier. En général, les données pluviométriques fluctuent entre 700 et 1500 mm. Dans les vallées, les valeurs annuelles se trouvent situées aux alentours de 500 mm. Par ailleurs, dans les régions situées au-delà de 3500 m d'altitude, des brouillards fréquents sont observés et les pluies sont en général de longue durée et de faible intensité (disponible à partir de l'URL: http://www.inamhi.gov.ec/meteorologia/eclimaticos_caracteristicas.htm)

2.1.2.3 Ensoleillement

Dans toute la plaine littorale jusqu'à une hauteur de 500 m dans le versant de la cordillère Occidentale, la moyenne annuelle d'heures d'ensoleillement fluctue entre 600 et 1700 heures, en étant la plus élevée dans les zones les plus sèches. Dans la région andine, l'ensoleillement fluctue entre 1200 et 2000 heures annuelles avec certaines exceptions très localisées (microclimats très pluvieux). Malgré des informations assez parcellaires existant dans la région amazonienne l'ensoleillement dans cette région oscille entre 1000 et 1400 heures annuelles. Dans l'Archipel des Galápagos, la moyenne d'ensoleillement se situe autour des 2000 heures annuelles. (Disponible à partir de l'URL: http://www.inamhi.gov.ec/meteorologia/eclimaticos_caracteristicas.htm)

2.1.3 Végétation

Depuis le XVII^e siècle, les nombreux botanistes et naturalistes qui ont visité l'Équateur, ont contribué à l'inventaire et à la classification de la végétation équatorienne. En 1999, Sierra propose un système de classification en considérant les critères suivants :

- La physionomie de formations: mangrove, forêt, buisson, fourré, savane, lande, gelidofitia (lichen et mousse), herbazal (herbes spécifiques)
- Climatiques : Sec, humide, brume, marécage.
- Biotiques : de palmiers, d'herbes, de buissons, de almohadillas, de frailejones.
- Activité photosynthétique: toujours vert, semidecuidos, deciduos
- Topographiques : littoral, lacustre, riverain, terres basses, pied de montagne, montagneux (bas et haut)
- Régions : côte pacifique, Andes, Amazonie, Iles Galápagos

2.2 LES LEISHMANIOSES EN EQUATEUR

2.2.1 Historique des leishmanioses en Equateur

Les représentations antiques de l'art précolombien représentant des lésions de peau et des difformités faciales attribuées à la leishmaniose muco-cutanée trouvées sur des poteries de l'époque pré inca au Pérou et en Colombie (Ala-Vedra, 1952), sont datées de 400 à 900 ans avant Jésus Christ. Les poteries équatoriennes sont datées quant à elles de 500 années avant JC et semblent témoigner de l'existence de telles leishmanioses bien avant l'arrivée des conquistadors (Ala-Vedra, 1952 ; Hashiguchi et Gómez, 1991).

Un déroulé chronologique relatif aux leishmanioses en Equateur est rappelé ci-dessous :

1920 : mention du premier cas de leishmaniose cutanée (ulcères au niveau de l'avant-bras et du thorax) rapportée d'Equateur par Valenzuela, dans la Province de Esmeraldas (Hashiguchi, 1987).



Figure 4. Diversité d'écosystèmes par régions avec la description de la végétation caractéristique (INEFAN/GEF-BIRF, Wild life Conservation Society y EcoCiencia. (Disponible à partir de l'URL: <http://www.zonu.com/detail/2011-11-04-14850/Tipos-de-vegetacion-del-Ecuador-1999.html>)

1924 : Heinert rapporte le premier cas de leishmaniose cutané muqueuse dans un hôpital à Guayaquil (Hashiguchi, 1987).

1928 : Valenzuela rapporte un cas de complication de leishmaniose avec osteoperiostite (Hashiguchi, 1987).

1931 : Trujillo rapporte le premier cas de leishmaniose viscérale dans un patient qui présente un ulcère localisé au niveau de sa jambe. Malgré des signes viscéraux, le parasite n'a jamais été isolé. Ce cas est donc sujet à caution et avec le recul, demeure épidémiologiquement peu probable (sauf si il s'agit d'un cas importé) (Hashiguchi, 1987).

1945 : Carrera décrit le premier cas de leishmaniose en Amazonie (Hashiguchi, 1987).

1949 : León L. observe le premier cas de leishmaniose viscérale chez un garçon de 3 ans, dans la province d'Esmeraldas. Son diagnostic est objectivé par des biopsies de foie et rate positives. Cependant, aucun autre cas de LV n'a été rapporté dans cette zone ni dans d'autres zones d'Equateur et ce cas demeure douteux (Hashiguchi, 1987).

1950 : Rodriguez réalise les premières études sur la faune des phlébotomes d'Equateur et décrit *Phlebotomus camposi* comme une espèce nouvelle pour la science (Hashiguchi, 1987).

1952 : Ala-Vedra présente les aspects cliniques variés des leishmanioses et propose des hypothèses sur leur transmission et leurs réservoirs. De plus, il considère ces maladies comme étant antérieures à l'arrivée des conquistadors.

1953 : Rodríguez et Aviles réalisent une révision bibliographique de tous les cas de leishmaniose rapportés en Equateur.

Rodriguez décrit une nouvelle espèce : *P. leopoldoi*

Carrera signale les premiers cas andins de la maladie en rapportant sept cas de leishmaniose dans les contreforts des Andes, dans la province de Cañar (800 à 1000 m) (Hashiguchi, 1987).

1954 : L. León publie une révision sur la leishmaniose cutané muqueuse, les facteurs de prédisposition et les mécanismes de dispersion (Hashiguchi, 1987).

1956 : Rodríguez décrit *P. guayasi* que Fairchild & Hertig (1961) considèrent comme un synonyme junior de *Lutzomyia serrana* (Hashiguchi, 1987).

1960 : Arzube ajoutent *P.sallesi* et *P.cayennensis cayennensis* à la liste des phlébotomes d'Equateur (Hashiguchi, 1987).

1961 : Zerega décrit le premier cas de leishmaniose cutanée diffuse (LCD) d'Equateur (Hashiguchi, 1987).

1962 : Arzube publie un plan de recherches sur les leishmanioses dans la province d'Esmeraldas (Hashiguchi, 1987).

1967 : León L. dresse une révision rapide des leishmanioses tégumentaires en Equateur (Hashiguchi, 1987).

1969 : Rodríguez rapporte un nouveau foyer dans la localité de Los Bancos (1150 m) qui appartient à la province de Pichincha, notre zone d'étude (Hashiguchi, 1987).

1975 : León L. modifie la classification des formes cliniques des leishmanioses tégumentaires en Equateur, basé sur sa propre expérience et une révision bibliographique (Hashiguchi, 1987).

1978 : Tafur et Detafur ont conçu un essai thérapeutique avec metronidazole pour des leishmanioses tégumentaires dans la province de Los Ríos. Les résultats préliminaires ont été acceptables mais ils n'avaient pas suivi leurs patients pour démontrer leur guérison complète (Hashiguchi, 1987).

1979 : L. et R. León publient une situation épidémiologique de la leishmaniose cutané muqueuse (Hashiguchi, 1987).

1981 : Calero et Coronel effectuent une étude des leishmanioses dans une zone agricole épidémique localisée dans les contreforts des Andes (Hashiguchi, 1987).

1982 : Amunarriz réalise une étude minutieuse de la leishmaniose humaine en Amazonie. Hashiguchi tente la première tentative de détermination des vecteurs et des réservoirs dans les zones endémiques de leishmaniose (Hashiguchi, 1987).

1984 : Amunarriz publie les résultats de son étude, focalisée principalement dans le traitement des patients. Hashiguchi et *al.* publient les résultats d'une enquête épidémiologique effectuée dans une nouvelle plantation de la région andine (Cooperativa 23 de febrero) (Hashiguchi, 1987).

Young and Rogers (1984) actualisent la liste des phlébotomes d'Équateur et l'arrêtent à 49 espèces et sous-espèces. *Lu. amazonensis*, *Lu. davisi* et *Lu. clautrei* sont considérées comme les espèces anthropophiles en Amazonie.

1985 : Hashiguchi et *al.* comptent six espèces anthropophiles (*Lutzomyia gomezi*, *Lu. trapidoi*, *Lu. hartmanni*, *Lu. shannoni*, *Lu. serrana* et *Lu. panamensis*) parmi lesquelles deux (*Lu. trapidoi* et *Lu. hartmanni*) sont incriminées comme vecteurs probables de *Leishmania braziliensis*. De plus, ils identifient trois probables réservoirs naturellement infectés par le parasite, *Choloepus hoffmani dydactilus*, *Sciurus granatensis* et *Potos flavus*.

1986 : Calero et *al.* rapportent deux cas de leishmaniose cutané muqueuse d'Amazonie. Ferreti et *al.* Rapportent quant à eux un cas de leishmaniose ganglionnaire.

1987 : Hashiguchi et *al.* étudient l'infestation naturelle des phlébotomes par des promastigotes dans les contreforts des Andes, en trouvant un taux très important dans les zones localisées à moyenne altitude (500 m). Mimori et *al.* étudient la réponse immunitaire dans les premières étapes des leishmanioses tégumentaires.

1989 : Mimori et *al.* caractérisent des parasites isolés d'animaux sauvages (*L. amazonensis*) et de patients (*L. panamensis*) grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux et par analyse isoenzymatique.

1990 : Takaoka et *al.* trouvent 2% des femelles *L. ayacuchensis* naturellement infestées par des promastigotes de *Leishmania* appartenant au sous-genre *Viannia*. Cette même année, Armijos et *al.* dans trois localités géographiques différentes, isolent et identifient par électrophorèse d'isoenzymes *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana* et *L. amazonensis*.

1991, Hashiguchi et *al.* caractérisent moléculairement les leishmanies dans une petite communauté rurale montagneuse (région des Andes) où des leishmanioses cutanées sont

fortement endémiques et impliquent *L. mexicana* et une espèce apparentée à *L. major*. De plus, *Lutzomyia ayacuchensis* est impliqué comme possible vecteur de *L. mexicana* dans des foyers endémiques des Andes. Par ailleurs, Guderian et al. (1991) utilisent l'antimoine pentavalent combiné à l'allopurinol pour traiter des patients présentant des leishmanioses cutanées.

1992 : *Leishmania equatorensis* est décrite et isolée des viscères de paresseux (*Choloepus hoffmanni*), d'écureuil (*Sciurus granatensis*) vivant en forêt tropicale (Grimaldi et al.). Plusieurs études moléculaires démontreront ultérieurement qu'il s'agit d'une espèce liée au genre *Endotrypanum* (Fernandes et al. 1999 ; Uezato et al. 2001 ; Katakura et al. 2003 ; Azato et al. 2009).

1993 : Katakura et al. utilisent l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) pour faire la caractérisation moléculaire de *L. panamensis*, *L. mexicana* et *L. major-like* isolés de patients et d'un chien.

1994 : Barrera et al. démontrent l'incidence très élevée des leishmanioses dans deux localités pendant l'année 1991: Paraíso Escondido (14,7 %) et La Tablada (10,6%). Ces données sont beaucoup plus élevées que celles fournies par le Ministère de la Santé. Les vecteurs présumés sont deux espèces anthropophiles : *Lutzomyia trapidoi* à Paraíso Escondido et *Lutzomyia gomezi* à La Tablada (Le Pont et al. 1994a). De plus, *Ny. trapidoi* est considéré comme le principal vecteur de *L. panamensis* (Le Pont et al. 1994b) également isolée d'un chien qui s'avère plutôt une victime malencontreuse qu'un réel réservoir (Dereure et al. 1994). Dans la région de Zumba vers le sud de l'Amazonie d'Équateur, *Lutzomyia serrana*, espèce anthropophile abondante d'activité diurne, est trouvée naturellement infestée avec une forme intermédiaire entre *L. panamensis* et *L. braziliensis*. Cette espèce apparaît donc comme un bon candidat à la transmission (Le Pont et al. 1994c).

1996 : Dujardin et al. démontrent par analyse isoenzymatique, la présence de deux populations chez *Nyssomyia trapidoi* dans deux villages de la côte Pacifique. Bien qu'ils ne les nomment pas, ils les considèrent comme des espèces jumelles bien qu'ils notent l'existence de variants clairs et foncés ne répondant pas exactement à ce concept.

1997 : Armijos et al. publient les résultats de l'étude dans 26 hameaux agricoles situés dans une forêt subtropicale humide placée au nord-ouest dans la Province Pichincha (environ 12.5

miles de la capitale, Quito). Les espèces isolées des lésions prélevées sont *L. guyanensis* (63 %), *L. panamensis* (33 %) et *L. braziliensis* (4 %).

1998 : Mimori et *al.* développent une réaction en chaîne par polymérase (PCR) spécifique pour l'identification de *Leishmania (Viannia) panamensis*, *L. (Leishmania) mexicana* et *L. (L.) amazonensis* à partir de biopsies fixées au formol provenant de lésions de patients. De plus, Katakura et *al.* (1998) amplifient le mini-exon de *Leishmania* dans des biopsies de peau prélevées chez des patients présentant des leishmanioses cutanées. Leur technique montre une bonne sensibilité pour détecter toutes les espèces de *Leishmania* connues d'Équateur.

1999 : Bañuls et *al.* montrent la grande diversité génétique des *Leishmania* en Équateur qui est dominée par le groupe *L. (V.) panamensis/guyanensis*. L'analyse génétique met en doute la validité des espèces *L. (V.) panamensis* et *L. (V.) guyanensis* puisque les analyses en Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) et en Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) n'indiquent pas que *L. (V.) panamensis* et *L. (V.) guyanensis* correspondent à des groupes monophylétiques distincts. Par ailleurs, la même année, Matsumoto et *al.* recommandent l'analyse des liquides exsudatifs des ulcères avec une seringue comme meilleure alternative à l'analyse des biopsies pour le diagnostic moléculaire des leishmanioses cutanées.

2000 : Davies et *al.* révisent la situation des leishmanioses dans les pays andins. En Équateur, il existe un rapport 13/1 entre LC et LMC. *Nyssomyia trapidoi* et *Bichromomyia flaviscutellata* qui possédaient initialement selon toute vraisemblance un habitat en forêt primaire, se sont adaptées à la forêt secondaire dans laquelle on les capture également.

2002, Mimori et *al.* suggèrent la collection des liquides exsudatifs à l'aide de cotons-tiges comme une meilleure alternative à l'obtention de biopsie pour le diagnostic moléculaire de LC, en considérant la haute sensibilité du test et la commodité de la procédure d'échantillonnage.

2003, Armijos et *al.* testent un vaccin (un cocktail de *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* et *L. (L.) amazonensis*) qui semble conférer une protection significative contre la LC pendant 6 mois après les 12 mois initiaux de suivi, malgré un niveau de protection inférieur durant les mois 13 à 18. Par ailleurs, Katakura et *al.* (2003) rapportent par PCR (mini exon) la présence d'*Endotrypanum* proches d'*E. monterogeei* chez un paresseux (*Choloepus hoffmanni*) et un

écureuil (*Sciurus granatensis*). Chez *Lutzomyia hartmanni*, ils rapportent une espèce proche d'*E. schaudinni*.

2004, Armijos et al. examinent dans une population équatorienne endémique rurale, la sécurité, la réponse immunitaire et l'efficacité du vaccin (Leishvaccin ®) contenant des *L. amazonensis* totales autoclavées et le BCG comme adjuvant. De son côté, Kato et al. (2004) détectent et identifient l'ADN de *Leishmania* dans des phlébotomes naturellement infestés en utilisant la PCR et le séquençage des amplifiants. Ces données montrent que 100% de *Lu. ayacuchensis* étaient infestés par *L. mexicana*.

2005, Calvopiña et al. décrivent trois formes cliniques inhabituelles de leishmaniose cutanée identifiée chez des enfants équatoriens. Ce sont respectivement des formes érysypéloïde, récidivante et disséminée. *Leishmania (Viannia) panamensis* a été identifiée dans chacun des trois cas.

2006, Calvopiña et al. réalisent une analyse isoenzymatique de *Leishmania* isolées d'un large spectre de formes cliniques de leishmaniose tégumentaire et trouvent une grande diversité d'espèces phénotypes (zymodemes). Ils concluent que la LMC est associée exclusivement à *L. braziliensis*, que la LRC et d'autres présentations atypiques de LC sont associées à *L. panamensis* et que les lésions de type Uta sont associées à *L. mexicana*.

2007 : Kato et al. proposent une méthode moléculaire de dépistage de masse qui a l'avantage de traiter un grand nombre d'échantillons. Ils mettent en évidence des *Endotrypanum* par séquençage du gène cytochrome b (Cyt b) chez *Lu. hartmanni* qu'ils caractérisent morphologiquement et moléculairement par amplification et séquençage de 18S ARN ribosomique (ADNr).

2008 : Kato et al. rapportent l'infection naturelle de *Lutzomyia tortura* avec *L. (Viannia) naiffi* dans une zone amazonienne. De plus, *Leishmania mexicana* a été identifiée par des méthodes moléculaires chez *Lutzomyia ayacuchensis* (Kato et al. 2008b). Terayama et al. (2008) caractérisent moléculairement (séquençage de l'ADNr 18S) 7 espèces de *Lutzomyia* (*Lu. ayacuchensis*, *Lu. hartmanni*, *Lu. panamensis*, *Lu. trapidoi*, *Lu. dysponeta*, *Lu. gomezi* et *Lu. serrana*).

2010 : Rougeron et *al.* utilisent 18 souches d'Equateur et 12 marqueurs microsatellites pour étudier *L. braziliensis* et le complexe *L. guyanensis*. Les résultats obtenus montrent une diversité génétique importante qui pourrait être liée à la grande richesse d'écosystèmes qui impacte autant les vecteurs et les réservoirs que le cycle de transmission du parasite dans son ensemble.

2.2.2 Distribution et Epidémiologie

Actuellement, les cas enregistrés proviennent de la côte Pacifique, des vallées Andines à des altitudes comprises entre 1200 à 2400 mètres et de la région Amazonienne. Les leishmanioses sont endémiques dans les trois régions continentales de l'Equateur couvrant 22 des 24 provinces du pays (Figure 5). Seules semblent épargnées jusqu'à présent les provinces de Santa Elena et des îles Galápagos (Tableau I) (SNEM, 2010).

Les leishmanioses étant des maladies rurales, on estime qu'environ de 3500000 personnes vivent dans des zones à risque de transmission de leishmaniose en Equateur (Anuario de Epidemiología MSP del Ecuador, enfermedades dermatológicas, año 2009).

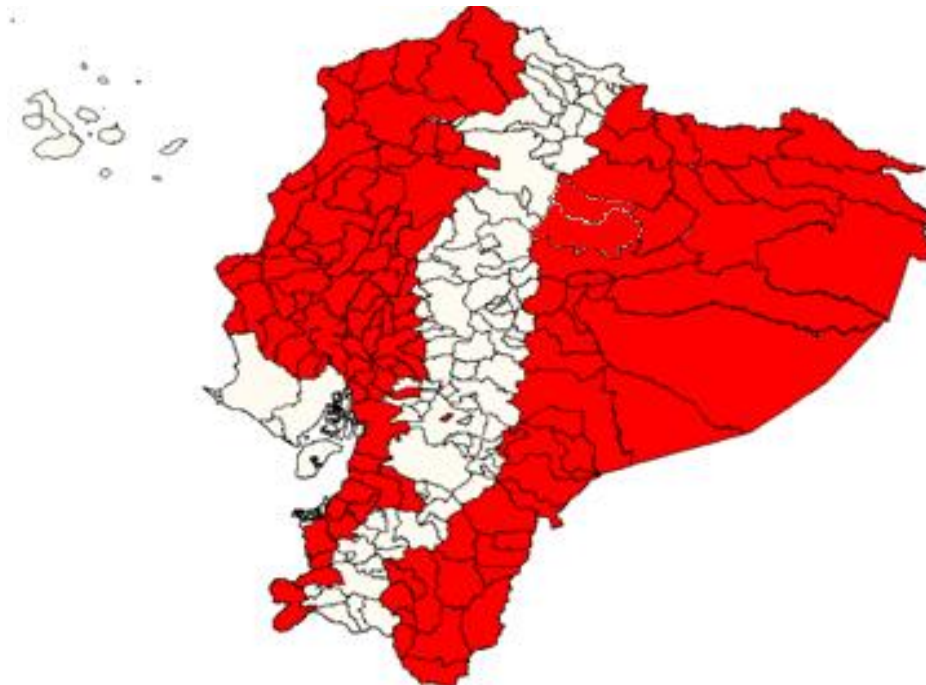


Figure 5. Distribution des leishmanioses par provinces dans le territoire Equatorien

Conformément au registre des cas du Ministère de la Santé Publique (MSP) durant la période allant de 2001 à 2010; le taux moyen d'incidence dans le pays oscille entre 8,71 et 19,2 pour 100.000 habitants, avec une moyenne de 1633 cas par ans (tableau I, figure 6).

Durant l'année 2010, 1629 cas ont été répertoriés parmi lesquels, 73 % ont été contractés dans les huit provinces suivantes : Pichincha (22 %), Morona Santiago (9 %), Orellana (8%), Bolívar (8%), Esmeraldas (8%), Los Ríos (7%), Manabí (6 %), et Santo Domingo de los Tsáchilas (6 %). Cette distribution coïncide avec la présence de forêts tropicales et subtropicales qui sont les niches écologiques appropriées des vecteurs et des réservoirs (Figure 7). Cependant, ces chiffres peuvent être sous estimés parce que le registre des cas est basé sur des déclarations réalisées par les patients soignés dans les unités du MSP, ce qui signifie qu'il y existe une probable sous-déclaration liée au fait que les leishmanioses constituent des maladies rurales et qu'un grand pourcentage de cette population rurale n'a pas accès aux services de santé.

Finalement, la distribution des cas par région pendant les 10 dernières années démontre que la Côte Pacifique représente 41% des cas, la région Andine 34% et l'Amazonie 25% (Figure 8). D'après les données du MSP, le groupe plus affecté correspond aux sujets de sexe masculin, âgés de 15 à 35

Tableau I . Incidence des leishmanioses par province pendant les années 2001 à 2010 (Ministère du Santé Publique d'Équateur, MSP, 2010)

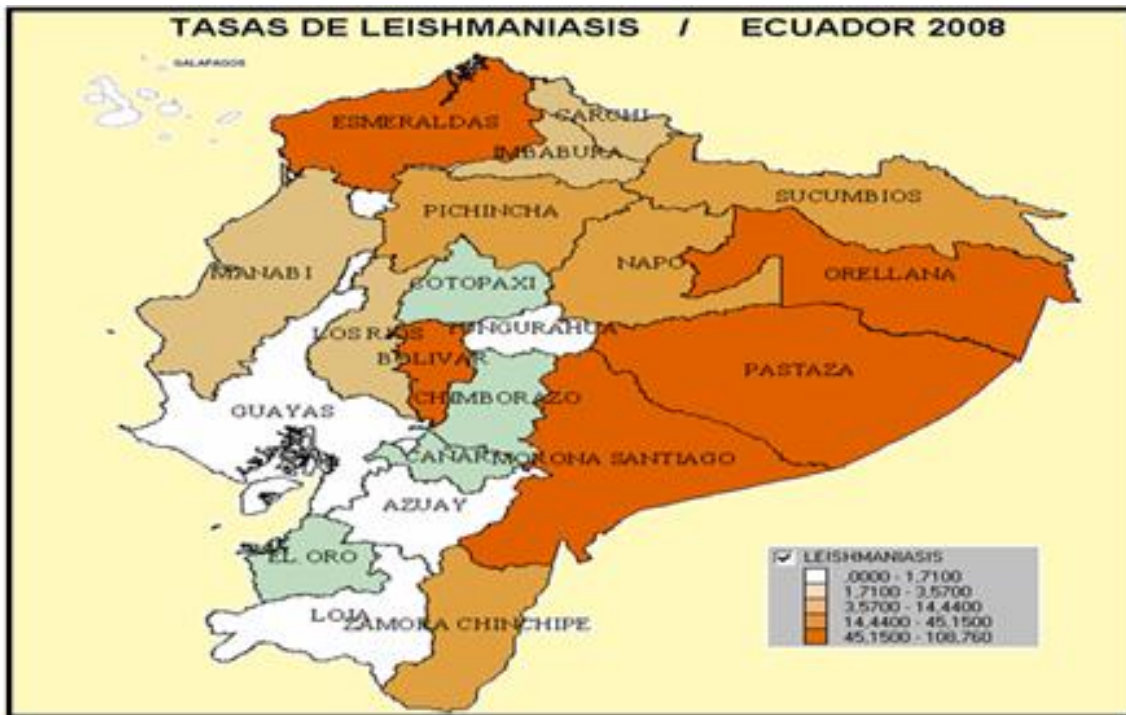
PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA Y CONTROL DE LEISHMANIASIS

NUMERO DE CASOS Y TASAS DE INCIDENCIA ANUAL DE LEISHMANIASIS SEGUN PROVINCIAS Y REGIONES - ECUADOR 2001 - 2010

PROVINCIA	AÑO 2001		AÑO 2002		AÑO 2003		AÑO 2004		AÑO 2005		AÑO 2006		AÑO 2007		AÑO 2008		AÑO 2009		AÑO 2010	
	CASOS	TASA	CASOS	TASA	CASOS	TASA	CASOS	TASA	CASOS	TASA	CASOS	TASA	CASOS	TASA	CASOS	TASA	CASOS	TASA	CASOS	TASA
AZUAY	9	4,9	1	0,58			16	9,06	6	0,93	1	0,15	7	1,05	6	0,87	4	0,58	4	0,58
BOLIVAR	68	37	52	29,9	91	51,7	175	99,1	189	107	107	60,1	36	20,1	82	45,2	62	34,1	129	71
CARCHI			3	1,91	1	0,63									6	3,57	7	4,17	9	5,36
CAÑAR			3	1,41	4	1,86	30	13,8	18	8,23	11	4,98	8	3,58	4	1,75	14	6,12	3	1,31
CHIMBORAZO	20	4,68	14	3,39	15	3,58	12	2,84	15	3,51	15	3,47	20	4,57	12	2,67	2	0,45	1	0,22
COTOPAXI	25	8,24	29	8,13	23	6,37	37	10	38	10,1	25	6,5	15	3,83	7	1,71	5	1,22	21	5,14
EL ORO	8	1,43	12	2,22	22	4,02	23	4,11	5	0,87	9	1,54	11	1,85	19	3,06	40	6,45	23	3,71
ESMERALDAS	429	103	276	69,7	265	66	692	169	446	107	217	51,2	125	29	241	54	225	50,4	127	28,5
GALAPAGOS																				
GUAYAS	30	0,88	26	0,77	26	0,76	49	1,41	26	0,74	72	2,03	23	0,64	13	0,38	27	0,8	17	0,5
IMBABURA	6	1,82	17	4,84	43	12,1	26	7,15	30	8,06	60	15,8	63	16,2	44	10,8	74	18,2	92	22,6
LOJA	3	0,7	10	2,41			3	0,71	1	0,24	10	2,34	2	0,46	1	0,23	1	0,23	2	0,46
LOS RIOS	39	5,88	41	6,13	35	5,16	66	9,56	59	8,39	55	7,68	63	8,65	78	10,3	33	4,37	110	14,6
MANABI	504	39,8	125	10,2	402	32,4	585	46,7	350	27,6	96	7,49	81	6,24	120	9,01	220	16,5	101	7,59
MORONA	53	37	143	119	25	20,5	113	91,2	107	85,1	156	122	183	141	145	109	175	131	140	105
NAPO	34	40,1	51	62	46	55,2	55	64	39	44	39	42,8	48	51,4	40	40,6	43	43,7	59	59,9
PASTAZA	61	98,2	23	35,9	4	6,16	16	23,8	17	24,5	29	40,5	41	55,8	46	59,1	54	69,4	46	59,1
PICHINCHA	343	13,9	286	11,6	196	7,84	415	16,4	384	14,9	386	14,8	242	9,14	393	16,4	393	16,4	353	14,7
SUCUMBIOS	36	24,9	26	19,5	18	13,3	33	23,4	45	30,6	65	42,6	65	41,3	74	43,9	60	35,6	68	40,3
TUNGURAHUA	1	0,22																		
ZAMORA	36	34,9	68	84,9	65	80,1	94	115	54	65,3	65	77,7	36	42,5	27	31,2	42	48,5	92	106
ORELLANA	49	68,7	47	52,6	55	60,7	54	56,9	96	96,8	118	115	116	109	121	106	140	122	133	116
STO. DOMINGO																	114	34,9	99	30,3
STA. ELENA																				
TOTAL	1754	14,1	1253	9,9	1336	10,4	2494	19,2	1925	14,6	1536	11,5	1185	8,71	1479	10,7	1735	12,6	1629	11,6

NUMERO DE CASOS Y TASAS DE INCIDENCIA ANUAL ACUMULADA DE LEISHMANIASIS SEGUN REGIONES DEL ECUADOR																				
T.SIERRA	475	8,48	415	7,3	373	6,47	714	12,2	681	11,5	615	10,2	393	6,43	555	8,95	676	10,7	713	11,2
T.COSTA	1010	16,3	480	7,61	750	11,8	1415	21,9	886	13,5	449	6,77	303	4,51	471	6,92	545	7,9	378	5,4
T.ORIENTE	269	47,2	358	62	213	35,8	365	59,5	358	56,9	472	73,2	489	73,8	453	66,7	514	74	538	75,9
T.INSULAR																				
T.PAIS	1754	14,1	1253	9,9	1336	10,4	2494	19,2	1925	14,6	1536	11,5	1185	8,71	1479	10,7	1735	12,4	1629	11,5

Fuente: MSP, Epidemiologia



Fuente: Epi -2 - MSP

Figure 6. Incidence des leishmanioses par province (MSP, 2008)

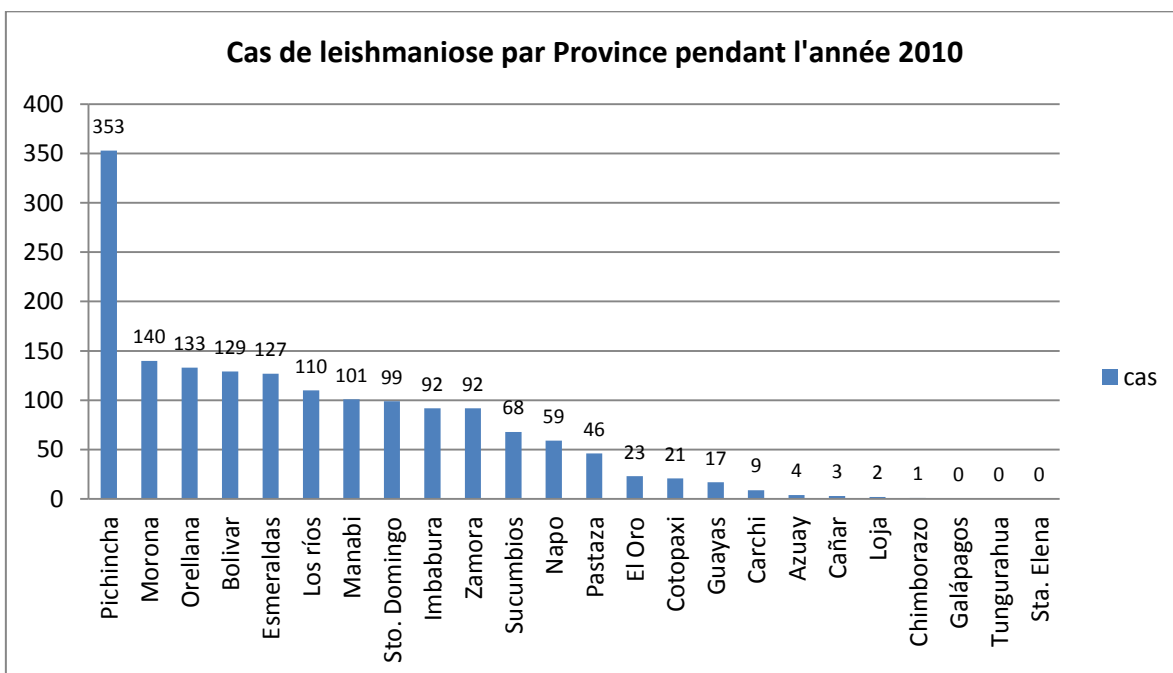


Figure 7. Nombre de cas de leishmaniose par province (MSP, 2010).

ans, en étant principalement affecté les personnes de sexe masculin, probablement à cause des activités de travail qui l'exposent plus au risque de piqûres par le vecteur.

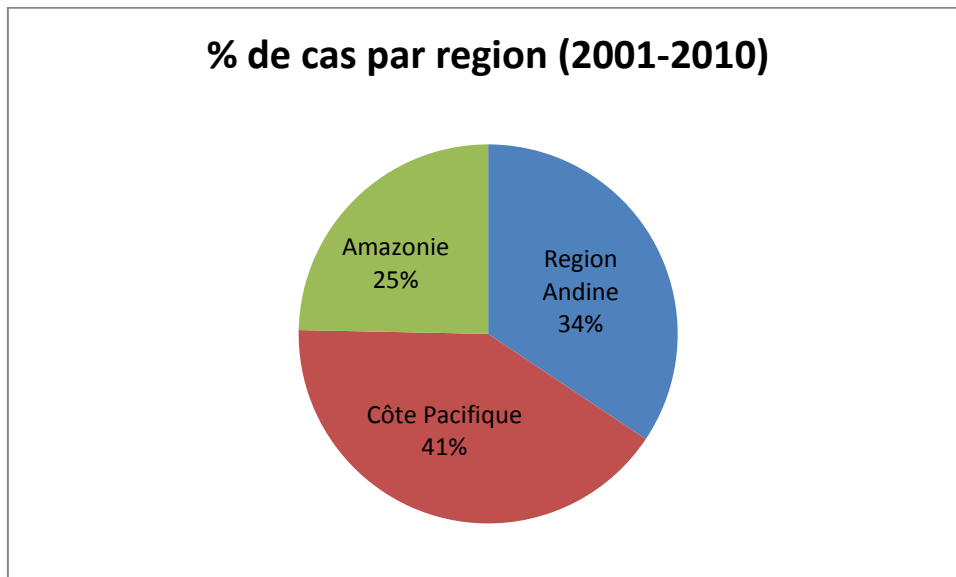


Figure 8. Distribution des cas par régions (MSP, 2001-2010)

2.2.3 Les formes cliniques

En Equateur, la maladie se présente la plupart des fois sous les formes cutanée et cutané muqueuse. Cependant, certains cas de leishmaniose récidivante et un seul cas confirmé de leishmaniose cutanée diffuse ont toutefois été rapportés. (Reyna et *al.* 1994; Calvopiña et *al.* 2004 ; 2006). Jusqu'à présent, deux cas rapportés de leishmaniose viscérale ont été fait par Trujillo en 1931 et par León en 1949 (Hashiguchi et Gomez 1991). Avec le recul, il s'agissait probablement d'erreurs de diagnostic. Ceci est soutenu par l'absence apparente des parasites *L. chagasi/infantum*, de leurs réservoirs infestés et de leurs vecteurs dans le territoire équatorien (absence de *L. longipalpis*). La présence de cas de leishmaniose viscérale dans les pays voisins a conduit à réaliser une étude pilote pour rechercher la présence d'anticorps anti-*Leishmania* dans 246 sérums humains et 33 sérums de chiens dans une région de l'Amazonie où existerait des mentions douteuses de cas cliniques humains. Finalement, tous ces échantillons ont été séronégatifs (Calvopiña et *al.* 2007).

La leishmaniose cutanée est caractérisée pour différentes types de lésions comme des ulcères, des nodules, des plaques érythémateuses et des papules, les ulcères étant les lésions les plus fréquentes (>50% de cas). Les lésions sont principalement localisées sur le visage et au niveau des extrémités (Nonaka et *al.* 2001), ce qui correspond fort logiquement aux régions découvertes du corps où surviennent les piqûres de phlébotomes.

La distribution des types de leishmaniose est associée aux quatre régions écologiques différentes : Dans la région du Pacifique, une région montagneuse ou les contreforts de la cordillère des Andes (500-1,000 m, forêt subtropicale humide, 15-22°C) et une région plaine (< 500 m, forêt tropicale humide, 24-28°C), les deux zones sont principalement forestières dégagées pour l'élevage de bétail ou la culture de banane, le cacao, le café et l'huile de palme africaine. En Amazonie, des régions de plaines (100-500 m) localisées à l'Est des Andes sont couvertes par la forêt tropicale humide dense avec des températures variant entre 25 et 29°C et un haut niveau d'humidité. Finalement, la région des vallées des Andes (Huigra et Paute) localisés à une altitude de 1200 à 2500 m avec des températures oscillant entre 12 et 18°C et caractérisé par une végétation réduite (Nonaka *et al.* 2001, Calvopiña *et al.* 2006).

Dans la région montagneuse de la côte Pacifique, on rencontre des cas de leishmaniose cutanée (avec peu d'ulcères qui sont petits et secs), récidivante et diffuse. Dans la plaine, on rencontre des leishmanioses cutanées (quelques ulcères de grande taille et humides) et des leishmanioses diffuses. Dans la région des vallées des Andes, sévit la leishmaniose cutanée similaire à la forme « Uta », expression clinique décrite du Pérou, caractérisée par la formation de papules. Cependant, la forme péruvienne est plus sévère que la forme équatorienne en raison de différences de parasite et de vecteurs. En Equateur, *Lu. ayacuchensis* est le vecteur de *L. mexicana*. Au Pérou, *Lu. ayacuchensis*, *Lu. peruensis*, *Lu. verrucarum* et *Lu. tejadai* peuvent être vecteurs de *L. (V). peruviana* (Nonaka *et al.* 2001, Calvopiña *et al.* 2006, Hashiguchi *et al.* 2007).

La leishmaniose cutanéomuqueuse « Espundia » a été rapporté depuis 1924. Elle est endémique de l'Amazonie. La population indigène est la plus affectée. Aucun cas n'a été enregistré ni dans la côte pacifique, ni dans les Andes (Calvopiña *et al.* 2001). Le ratio rapporté de LMC:LC est 1:13 (Hashiguchi et Gomez 1991 ; Davies *et al.* 2000, SNEM 2010).

2.2.4 Le parasite

Les interactions entre les caractéristiques moléculaires et biologiques des différentes espèces de *Leishmania*, la génétique et l'immunité de l'hôte ainsi que des facteurs exogènes expliquent les différentes formes cliniques et la sévérité des leishmanioses (Ashford, 2000 ; Calvopiña *et al.* 2006 ; Kaye, 2011).

En Equateur, six espèces de *Leishmania* ont été identifiées. Elles sont très diverses sur le plan de la systématique : *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* et une espèce non décrite appelée *L. (L.) major-like*. Il existe une restriction géographique d'espèce : *L. panamensis*, *L. guyanensis* et *L. amazonensis* ont été isolées de trois régions (à l'exception de la région des Andes) *L. (V.) panamensis* est la plus fréquente dans la région pacifique; *L. braziliensis* a été isolé seulement en Amazonie; *L. mexicana* a été identifié principalement dans les vallées andines, mais cette espèce a été également identifiée dans les plaines du Pacifique, et *L. major-like* a été identifiée dans les deux mêmes endroits (Tableau II) (Calvopiña et al. 2004, 2006).

La LMC est exclusivement causée par *L. (V.) braziliensis*, la LRC et d'autres présentations atypiques de LC sont provoquées par *L. (V.) panamensis* et, la LC de type Uta est causée par *L. (L.) mexicana* (Calvopiña et al. 2004).

A côté de ces leishmanies, on a rapporté d'Equateur des Trypanosomatidés à partir de Phlébotomes et de réservoirs. Katakura et al. (2003) ont caractérisé les parasites isolés chez des réservoirs (*Choloepus hoffmani* et *Sciurus granatensis*) et chez *Lu. hartmanii* : *Endotrypanum monterogeei* a été identifiée chez les premiers et *Endotrypanum schaudinni* (auparavant identifiée comme *L. (V.) equatorensis* par Grimaldi et al. (1992)) chez le vecteur. De la même manière, *Lutzomyia gomezi* et *Psathyromyia dendrophyla* capturés dans la forêt brésilienne ont été trouvés infestés par *Endotrypanum monterogeei* (Ferreira et al. 2008). Les espèces appartenant aux genres *Endotrypanum* et *Leishmania* peuvent infester les mêmes mammifères et les mêmes phlébotomes (Uezato et al. 2001 ; Ferreira et al. 2008). Par conséquent, nous attacherons une importance toute particulière à la connaissance épidémiologique de ces parasites peu connus.

2.2.5 Les Phlébotomes de l'Equateur

En 1979, 39 espèces et sous espèces de phlébotomes sont rapportées d'Equateur grâce aux études réalisées par Rodriguez, Arzube et Young. En 1984, le nombre des espèces enregistrées augmente à 49, et le principal vecteur de leishmaniose viscérale, *Lutzomyia longipalpis* n'est pas présent en Équateur ce qui constitue un argument épidémiologique supplémentaire pour considérer que les cas de LV préalablement décrits du pays ont probablement été des diagnostics erronés (Young et Rogers, 1984). En 1992 le nombre

d'espèces d'Equateur a augmenté à 60 (Alexander et *al.* 1992). Et en 1994 (Young et Duncan) ont enregistré 63 espèces.

Malgré l'existence d'espèces qui sont considérés vecteurs dans autres pays, seulement *Lu. trapidoi*, *Lu. hartmanni*, *Lu. gomezi*, et *Lu. ayacuchensis* sont vecteurs confirmés de *Leishmania* en Equateur (SNEM, 2010)

Tableau II. Distribution d'espèces de *Leishmania* par région géographique et par type de lésion (Calvopiña et *al.* 2006).

<i>Leishmania</i> species	Zymodeme	Geographical region			
		Pacific lowlands	Pacific highlands	inter-Andean valleys	Amazonian lowlands
<i>L. L. amazonensis</i>	Z1	ulcer (1)	ulcer (1)	-	ulcer (1)
	Z2	ulcer (4)	ulcer (3)	-	-
<i>L. V. panamensis</i>	Z3	-	LRC (4), ulcer (1), E (1), DL (1)	-	-
	Z4	-	LRC (2)	-	-
	Z5	-	LRC (2), ulcer (1)	-	-
	Z7	ulcer (1)	-	-	-
	Z8	ulcer (1)	ulcer (1)	-	ulcer (1)
	Z15	-	S (1)	-	-
	Z16	-	ulcer (2), papular (1), S (1)	-	-
	Z11	ulcer (1)	-	-	-
<i>L. V. guyanensis</i>	Z12	-	-	-	ulcer (3)
	Z13	-	ulcer (2)	-	-
	Z14	-	ulcer (1)	-	-
	Z6	-	-	-	ulcer (1), MCL (1)
<i>L. V. braziliensis</i>	Z9	-	-	-	MCL (1)
	Z10	-	-	-	MCL (2)
	Z17	DCL(1)	-	-	-
<i>L. L. mexicana</i>	Z18	-	-	ulcer (3), papular (1)	-
	Z19	-	-	papular (1)	-
	Z20	-	-	papular (5)	-
	Z21	ulcer (1)	-	papular (1)	-

Number of isolates are shown in parentheses. DCL, diffuse cutaneous leishmaniasis; LRC, leishmaniasis recidiva cutis; MCL, mucocutaneous leishmaniasis; S, sporotrichoid; E, erysipeloid.

Tableau III. Liste de phlébotomes enregistrés en Equateur (Alexander et *al.* 1992).

Genre	Espèces ou sous espèces	Province
<i>Brumptomyia</i>	<i>B. galindoi</i>	Sucumbíos, Morona Santiago
	<i>B. leopoldoi</i>	Cañar, Esmeraldas, Guayas, Los Ríos, Manabí, Pichincha, El Oro
	<i>B. pentacantha</i>	Sucumbíos
<i>Warileya</i>	<i>Warileya phlebotomanica</i>	Loja
<i>Lutzomyia</i>	<i>L. gomezi</i>	Azuay, Esmeraldas, Guayas, Los Ríos, Manabí, Sucumbíos, Pichincha, Bolívar, Cañar, El Oro, Loja, Morona Santiago
	<i>L. lichyi</i>	Morona Santiago
	<i>L. spathotrichia</i>	Morona Santiago
	<i>L. gorbitzi</i>	Guayas, Esmeraldas, Manabí
	<i>L. sallesi</i>	Guayas Manabí
	<i>L. sericea</i>	Zamora Chinchipe
	<i>L. walkeri</i>	Sucumbíos
	<i>L. nevesi</i>	Guayas, Sucumbíos, Morona Santiago, Zamora Chinchipe
	<i>L. serrana</i>	Guayas, Sucumbíos, Pichincha, Bolívar, Cañar, El Oro, Esmeraldas, Loja, Los Ríos, Manabí, Zamora Chinchipe
	<i>L. vespertilionis</i>	Guayas, Cañar, Pichincha
	<i>L. camposi</i>	Los Ríos, Pichincha, Bolívar, Cañar
	<i>L. dysponeta</i>	Esmeraldas, Guayas, Los Ríos, Azuay, Bolívar, Cañar, El Oro, Manabí, Pichincha
	<i>L. triacantha</i>	Pichincha
	<i>L. triramula</i>	Sucumbíos
	<i>L. triramula</i>	Cañar, Pichincha
	<i>L. baityi</i>	Sucumbíos
	<i>L. (Evandromyia) sp.</i>	Sucumbíos
	<i>L. saulensis</i>	Pichincha
	<i>L. dendrophyla</i>	Morona Santiago, Sucumbíos
	<i>L. dasymera</i>	Cañar, Manabí, Pichincha
	<i>L. shannoni</i>	Guayas, Manabí, Pichincha, Bolívar, Cañar, El Oro, Esmeraldas, Los Ríos, Morona Santiago, Sucumbíos.
	<i>L. undulata</i>	Cañar, Esmeraldas, Manabí, Pichincha
	<i>L. furcata</i>	Pichincha
	<i>L. abunaensis</i>	Sucumbíos
	<i>L. aragaoi</i>	Cañar
	<i>L. abonnenci</i>	El Oro, Esmeraldas, Guayas, Manabí, Los Ríos
	<i>L. barrettoii majuscula</i>	Bolívar, Cañar, Guayas, Los Ríos, Manabí, Pichincha
	<i>L. barrettoii barrettoii</i>	Morona Santiago
	<i>L. aclydifera</i>	Cañar, Pichincha
	<i>L. cellulana</i>	Morona Santiago, Sucumbíos
	<i>L. napoensis</i>	Napo
	<i>L. reburra</i>	Cañar, El Oro, Pichincha
	<i>L. ubiquitalis</i>	Morona Santiago
<i>L. wilkersoni</i>	Zamora Chinchipe	
<i>L. trichophoromyia sp.</i>	Pastaza	
<i>L. flaviscutellata</i>	Pichincha, Sucumbíos	
<i>L. olmeca bicolor</i>	Cañar, Los Ríos, Sucumbíos	
<i>L. trapidoi</i>	Bolívar, Cañar, El Oro, Esmeraldas, Guayas, Los Ríos, Pichincha	
<i>L. ylephiletor</i>	Guayas	
<i>L. yuilli</i>	Cañar, Sucumbíos	
<i>L. amazonensis</i>	Bolívar, Sucumbíos, Pastaza	
<i>L. ayrozai</i>	El Oro	
<i>L. bispinosa</i>	Sucumbíos	
<i>L. carrerai carrerai</i>	Morona Santiago, Sucumbíos	

<i>L. carrerai thula</i>	Cañar, Bolivar, Pichincha
<i>L. davisii</i>	Morona Santiago, Sucumbíos, Pastaza
<i>L. geniculata</i>	Morona Santiago, Sucumbíos, Pastaza
<i>L. hirsuta hirsuta</i>	Morona Santiago, Sucumbíos
<i>L. nocticola</i>	Sucumbíos
<i>L. panamensis</i>	Bolívar, Cañar, Manabí, Pichincha
<i>L. paraensis</i>	Pastaza
<i>L. hartmanii</i>	Bolívar, Cañar, El Oro, Pichincha, Esmeraldas, Guayas, Loja, Pichincha
<i>L. tortura</i>	Morona Santiago, Sucumbíos
<i>L. ayacuchensis</i>	Azuay
<i>L. osornoi</i>	Azuay
<i>L. stricivilla</i>	Zamora Chinchipe
<i>L. cayennensis</i>	El Oro, Esmeraldas, Guayas, Loja, Los Ríos, Manabí
<i>L. micropyga</i>	El Oro, Guayas, Los Ríos, Manabí, Pichincha, Sucumbíos
<i>L. trinidadensis</i>	Esmeraldas, Pichincha, Sucumbíos
<i>L. sordellii</i>	Cañar, Guayas, Los Ríos, Pichincha, Sucumbíos

Tableau IV. Liste actualisé de phlébotomes présents en Equateur, basée de la classification de Galati (2010), les nouvelles mentions sont indiquées avec un astérisque.

Genre	Sous genre	Série	Espèce
<i>Warileya</i>			<i>phlebotomanica</i> (Hertig, 1948)
<i>Brumptomyia</i>			<i>galindoi</i> (Fairchild & Hertig, 1947) <i>hamata</i> (Fairchild & Hertig, 1947) <i>leopoldoi</i> (Rodriguez, 1953) <i>pentacantha</i> (Barretto, 1947)
<i>Micropygomyia</i>	<i>Sauromyia</i>	oswaldoi cayennensis	<i>trinidadensis</i> (Newstead, 1922) <i>cayennensis cayennensis</i> (Floch & Abonnenc, 1941) <i>micropyga</i> (Mangabeira Fo, Mangabeira Fo, 1942)
<i>Sciopemyia</i>			* <i>preclara</i> (Young & Arias, 1984) <i>sordellii</i> (Shannon & Del Ponte, 1927)
	<i>Helcocyrtomyia</i>	sanguinaria osornoi	<i>hartmanni</i> (Fairchild & Hertig, 1957) <i>tortura</i> (Young & Rogers, 1984) <i>castanea</i> Galati & Cáceres, 1994 <i>osornoi</i> (Ristorcelli & Van Ty, 1941) <i>strictivilla</i> Young, 1979
	<i>Tricholateralis</i>	peruensis	<i>ayacuchensis</i> Cáceres & Galati, 1988 <i>gomezi</i> (Nitzulescu, 1931) <i>falcata</i> Young, Morales & Ferro, 1994 <i>sherlocki</i> Martins, Silva & Falcão, 1971 <i>spathotrichia</i> (Martins, Falcão & Silva, 1963)
	<i>Lutzomyia</i>		<i>lichyi</i> (Floch & Abonnenc, 1950)
<i>Migonemyia</i>	<i>Blancasmyia</i>		<i>bursiformis</i> (Floch & Abonnenc, 1944) <i>gorbitzi</i> (Blancas, 1959/1960)
<i>Pintomyia</i>	<i>Pifanomyia</i>	evansi serrana	<i>maranonensis</i> Galati, Cáceres & Le Pont, 1995 <i>nevesi</i> (Damasceno & Arouck, 1956) <i>robusta</i> Galati, Cáceres & Le Pont, 1995 <i>serrana</i> (Damasceno & Arouck, 1949) <i>Pintomyia</i> sp. de Anchicaya (Young, 1979)
<i>Dampfomyia</i>	<i>Coromyia</i>		<i>vespertilionis</i> (Fairchild & Hertig, 1947)
<i>Pressatia</i>			<i>camposi</i> (Rodríguez, 1950) <i>choti</i> (Floch & Abonnenc, 1941) <i>dysponeta</i> (Fairchild & Hertig, 1952) <i>triacantha</i> (Mangabeira Fo, Mangabeira Fo, 1942)
<i>Trichopygomyia</i>			<i>triramula</i> (Fairchild & Hertig, 1952) <i>witoto</i> (Young & Morales, 1987)
<i>Evandromyia</i>	<i>Aldamyia</i>		<i>hashiguchii</i> (León, Teran, Neira & Le Pont, 2009) <i>sericea</i> (Floch & Abonnenc, 1944) <i>walkeri</i> (Newstead, 1914)
		infraespinosa saulensis cortelezzii	<i>ledezmaae</i> León, Teran, Neira & Le Pont, 2009 <i>saulensis</i> (Floch & Abonnenc, 1944) <i>sallei</i> (Galvão & Coutinho, 1939)
<i>Psathyromyia</i>	<i>Forattiniella</i>		<i>abunaensis</i> (Martins, Falcão & Silva, 1965) * <i>antezanai</i> (Le Pont, Dujardin, Mouchet & Desjeux, 1990) <i>aragaoi</i> (Costa Lima, 1932) <i>barrettoi barrettoi</i> (Mangabeira Fo, 1942) <i>barrettoi majuscula</i> Young, 1979 * <i>brasiliensis</i> (Costa Lima, 1932) <i>castilloi</i> León Mollinedo & Le Pont, 2009 * <i>countihoi</i> (Mangabeira, 1942) * <i>lutziana</i> (Costa Lima, 1932) * <i>pradobarrientosi</i> (Le Pont, Matias, Martinez & Dujardin 2004)

	<i>Xiphomyia</i>	<i>runoides</i> (Faichild & Hertig, 1953) <i>aclydifera</i> (Fairchild & Hertig, 1952) <i>dreisbachi</i> (Causey & Damasceno, 1945) <i>dasymera</i> (Fairchild & Hertig, 1961) <i>dendrophyla</i> (Mangabeira Fo, 1942) <i>puntigeniculata</i> (Floch & Abonnenc, 1944) <i>shannoni</i> (Dyar, 1929) <i>undulata</i> (Fairchild & Hertig, 1950)
<i>Viannamyia</i>		<i>furcata</i> (Mangabeira, 1941)
<i>Bichromomyia</i>		<i>flaviscutellata</i> (Mangabeira Fo, 1942) <i>olmea bicolor</i> (Fairchild & Theodor, 1971)
<i>Psychodopygus</i>	davisi	<i>amazonensis</i> (Root, 1934) <i>davisi</i> (Root, 1934)
	panamensis	<i>ayrozai</i> (Barretto & Coutinho, 1940) <i>carrerai carrerai</i> (Barretto, 1946) <i>carrerai thula</i> Young, 1979 <i>hirsutus hirsutus</i> (Mangabeira Fo, 1942) <i>nocticolus</i> Young, 1973 <i>panamensis</i> (Shannon, 1926) <i>paraensis</i> (Costa Lima, Costa Lima, 1941) <i>yasuniensis</i> León, Neira & Le Pont, 2009
	guyanensis	<i>geniculatus</i> (Mangabeira Fo, 1941) <i>*corossoniensis</i> (Le Pont & Pajot, 1978) <i>luisleoni</i> León, Mollinedo & Le Pont, 2009 <i>*francoisleponti</i> Zapata, Depaquit & León, 2012
	bispinosus	<i>bispinosus</i> (Fairchild & Hertig, 1951) <i>*antunesi</i> (Countiho, 1939)
<i>Nyssomyia</i>		<i>richardwardi</i> (Ready & Fraiha, 1981) <i>trapidoi</i> (Fairchild & Hertig, 1952) <i>yuilli yuilli</i> (Young & Porter, 1972) <i>ylephiletor</i> (Fairchild & Hertig, 1952)
<i>Trichophoromyia</i>		<i>cellulana</i> Young, 1979 <i>napoensis</i> Young & Rogers, 1984 <i>reburra</i> (Fairchild & Hertig, 1961) <i>ubiquitalis</i> (Mangabeira Fo, 1942) <i>wilkersoni</i> Young & Rogers, 1984 <i>pabloi</i> (Barreto, Burbano & Young, 2002) <i>*velascoi</i> (Le Pont & Desjeux, 1992) <i>*sinuosa</i> (Young & Duncan, 1994)

2.2.6 Réservoirs

Plusieurs d'études ont été réalisées pour déterminer les probables réservoirs. Les méthodes utilisées ont été de type immunologique, moléculaire, de culture et de caractérisation du parasite.

En 1982, 48 animaux sauvages ont été capturés et examinés pour étudier l'infestation par *Leishmania*. Trois espèces de mammifères *Choloepus hoffmanni didactylus* (paresseux), *Sciurus granatensis* (écureuil) et *Potos flavus* (kinkajou) ont été positifs après mise en culture de prélèvements hépatiques mais négatifs à la mise en culture de prélèvements spléniques, tandis que d'autres comme *Didelphis marsupialis*, *Tamandua tetradactyla*, *Sylvilagus brasiliensis*, *Dasypus novemcinctus*, *Proechimys semispinosus* (*Rattus spinosus*), *Rattus rattus*, *Coendou bicolor*, *Agouti paca* et *Dasyprocta punctata* ont donné des résultats négatifs, les parasites isolés n'ayant malheureusement pas été caractérisés (Hashiguchi et al. 1985).

Des études postérieures ont démontré que *Sciurus vulgaris*, *Potos flavus* et *Tamandua tetradactyla* ont été trouvés infestés dans la région Pacifique avec *L. amazonensis* (Mimori et al. 1989). De plus, un *Canis familiaris* a été trouvé infesté par *L. (V). panamensis* ou *panamensis/guyanensis* et un autre avec *L. (L.) mexicana* dans la côte Pacifique et la région des Andes, respectivement (Calvopiña et al. 2004). Il n'existe pas d'étude sur les réservoirs en Amazonie.

2.3 CLASSIFICATION DES PHLEBOTOMES

Les phlébotomes appartiennent à l'Ordre des Diptera, au sous-ordre des Nematocera, à la famille des Psychodidae et à la sous-famille des Phlebotominae (Killick Kendrick, 1990).

Le tableau V résume l'évolution des positions sur la division en genres et en sous-genres parfois regroupés en tribus, jusqu'en 1977 lorsque Lewis et *al.* essaient de trouver un consensus qu'ils espèrent "stable" ! Leurs propositions constituent un seuil minimum au dessous duquel aucun phlébotomologiste n'oserait actuellement s'aventurer. Toutes les propositions ultérieures vont dans le sens d'un démantèlement des genres et des sous-genres (Léger et Depaquit, 2002).

Dès 1979, l'addition de taxons nouveaux pour des espèces nouvelles aberrantes est proposée : (*Capensomyia*) (Davidson, 1979), (*Demeillonius*) (Davidson, 1980), (*Kasaulius*) (Lewis, 1982), *Chinius* (Leng, 1987). Des sous-genres sont élevés au rang de genres : *Psychodopygus* (Ready et *al.* 1980), *Australophlebotomus*, *Spelaeophlebotomus*, *Idiophlebotomus*, *Grassomyia*, *Parvidens* (Abonnenc et Léger, 1976 ; Artemiev et Neronov, 1984).

Sauf exceptions, ces modifications sont acceptées par la communauté scientifique bien que ne reposant pas toujours sur des bases phylogénétiques indiscutables. En 1991, Artemiev propose une classification générale s'appuyant essentiellement sur les ressemblances morphologiques et les répartitions géographiques, sans réelle ambition phylogénétique. Il subdivise la sous-famille des Phlebotominae en deux tribus (Idiophlebotomini et Phlebotomini), 7 sous-tribus, 24 genres, 40 sous-genres et 70 groupes d'espèces. Sa proposition sombre sous l'indifférence générale.

En 1993, Seccombe et *al.* puis en 1994, Young et Duncan, qui n'ont d'autre ambition que d'aider les parasitologistes et les entomologistes médicaux, suivent la classification de Lewis et *al.* (1977).

Pour les phlébotomes américains il existe actuellement deux classifications qui s'opposent. D'un côté, celle de Young et Duncan (1994), minimaliste, qui ne reconnaît que trois genres : *Warileya*, *Brumptomyia* et *Lutzomyia*. Seul le dernier est d'importance médicale. Le genre *Lutzomyia* inclut alors plus de 400 espèces organisées dans 15 sous genres, 11 groupes d'espèces et quelques espèces non groupées (Tableau VI).

Tableau V. Evolution de la classification des Phlebotominae (Léger & Depaquit, 2002)

1843 Rondani	1920 França & Parrot	1921 França & Parrot	1931 Nitzulescu	1948 à 1958 Theodor	1955 Fairchild	1972 Abonnenc	1977 Lewis et al.
<i>Phlebotomus</i>	<i>Phlebotomus</i> <i>Phlebotomus</i>	<i>Phlebotomus</i> <i>Phlebotomus</i> <i>Sergentomyia</i> (<i>nec sensu</i> França & Parrot, 1920)	<i>Phlebotomus</i> <i>Phlebotomus</i> <i>Larroussius</i> <i>Adlerius</i>	<i>Phlebotomus</i> <i>Phlebotomus</i> <i>Larroussius</i> <i>Adlerius</i> <i>Paraphlebotomus</i> <i>Synphlebotomus</i> <i>Euphlebotomus</i> <i>Anaphlebotomus</i> <i>Australophlebotomus</i> <i>Spelaeophlebotomus</i>	<i>Phlebotomus</i> <i>Phlebotomus</i>	<i>Phlebotomus</i> <i>Phlebotomus</i>	<i>Phlebotomus</i> <i>Phlebotomus</i> <i>Larroussius</i> <i>Adlerius</i> <i>Paraphlebotomus</i> <i>Synphlebotomus</i> <i>Euphlebotomus</i> <i>Anaphlebotomus</i> <i>Australophlebotomus</i> <i>Spelaeophlebotomus</i> <i>Idiophlebotomus</i>
	<i>Sergentomyia</i>	<i>Prophlebotomus</i> (= <i>Sergentomyia</i> <i>sensu</i> França & Parrot, 1920)	<i>Brumptius</i> + <i>Sintonius</i> (= <i>Sergentomyia</i> <i>sensu</i> França & Parrot, 1920)	<i>Sergentomyia</i> <i>Sergentomyia</i> <i>Sintonius</i> <i>Spelaeomyia</i> <i>Parrotomyia</i> <i>Rondanomyia</i> <i>Grassomyia</i> <i>Parvidens</i>	<i>Sergentomyia</i>	<i>Sergentomyia</i> <i>Spelaeomyia</i> <i>Grassomyia</i> <i>Parvidens</i>	<i>Sergentomyia</i> <i>Sergentomyia</i> <i>Sintonius</i> <i>Spelaeomyia</i> <i>Parrotomyia</i> <i>Rondanomyia</i> <i>Grassomyia</i> <i>Parvidens</i>
		<i>Brumptomyia</i>		<i>Brumptomyia</i>	<i>Brumptomyia</i>	<i>Brumptomyia</i>	<i>Brumptomyia</i>
		<i>Lutzomyia</i>		<i>Lutzomyia</i>	<i>Psychodopygus</i>	<i>Psychodopygus</i> <i>Vianniamyia</i>	<i>Lutzomyia</i> (9 sous-genres)
					<i>Warileya</i> <i>Hertigia</i>	<i>Warileya</i> <i>Hertigia</i> <i>Spelaeophlebotomus</i> <i>Idiophlebotomus</i>	<i>Warileya</i> <i>Warileya</i> <i>Hertigia</i>

Tableau VI. Classification des Phlebotomes américains selon Young et Duncan (1994)

Genre	Sous genres	Groupes d'espèces
<i>Lutzomyia</i>	<i>Lutzomyia</i>	
	<i>Sciopemyia</i>	<i>Migonei</i> <i>Verrucarum</i> <i>Delpozoi</i>
	<i>Coromyia</i>	
	<i>Dampfomyia</i>	<i>Saulensis</i>
	<i>Pintomyia</i>	
	<i>Pressatia</i>	<i>Baityi</i>
	<i>Evandromyia</i>	
	<i>Viannamyia</i>	<i>Rupicola</i>
	<i>Psathyromyia</i>	<i>Aragoi</i> <i>Lanei</i> <i>Deishbachi</i>
	<i>Trichopygomyia</i>	
	<i>Nyssomyia</i>	
	<i>Trichophoromyia</i>	
	<i>Psychodopygus</i>	
	<i>Micropygomyia</i>	<i>Pilosa</i> <i>Oswaldoi</i>
<i>Helcocyrtomyia</i>		

D'un autre côté, en 1995 Galati propose une classification basée sur l'approche phylogénétique de 88 caractères morphologiques élevant certains sous-genres au rang de genres (figure 9). Cette classification divise la famille Phlebotominae dans deux tribus : Hertigiini et Phlebotomini. La première se divise en deux sous tribus: Hertigiina pour l'Amérique et Idiophlebotomina pour l'Ancien Monde et la région australienne. La tribu des Hertigini inclut les genres *Warileya* et *Hertigia*. La tribu des Phlebotomini est divisée en six sous-tribus : Phlebotomina, Australophlebotomina, Brumptomyiina, Sergentomyiina, Lutzomyina et Psychodopygina parmi lesquelles seules les Brumptomyiina, les Sergentomyiina, les Lutzomyina et les Psychodopygina incluent des espèces américaines. Chaque sous tribu est organisé en genres, sous-genres, séries et groupe d'espèces (tableau VII).

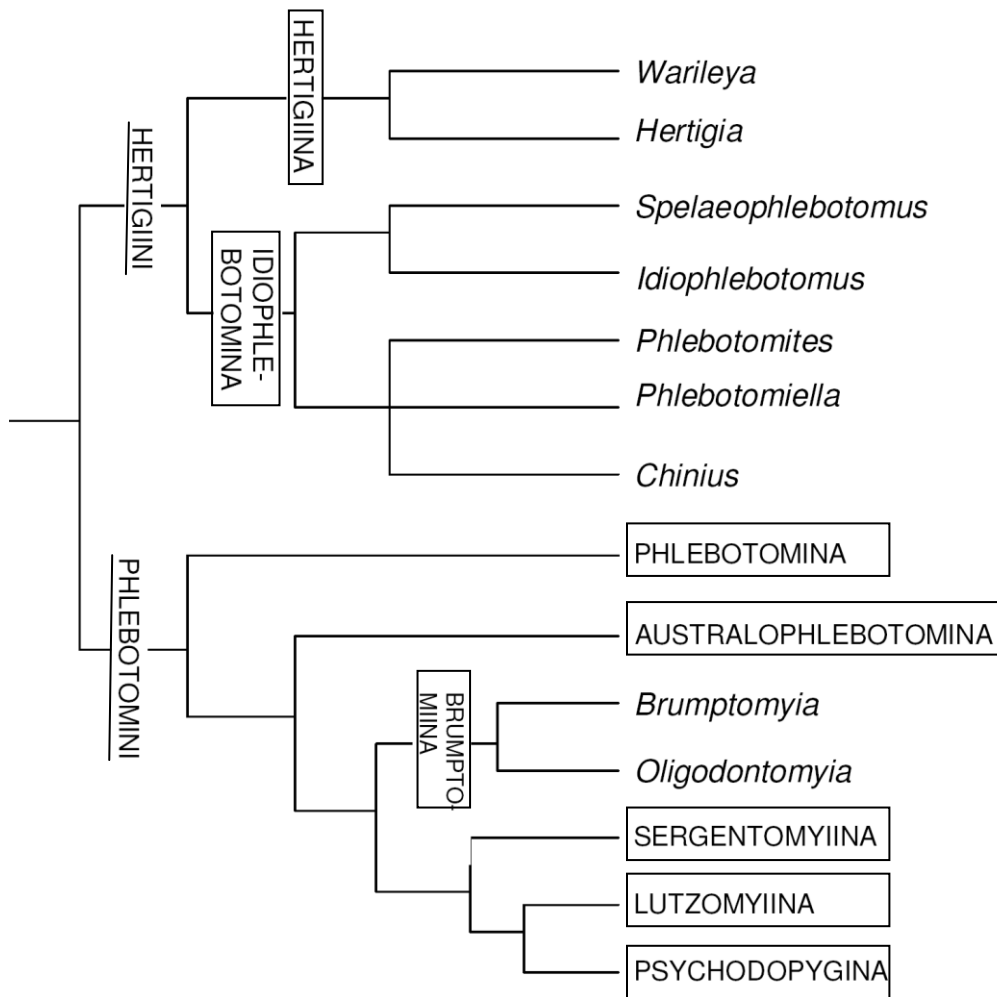


Figure 9. Cladogramme de Phlebotominae Galati (1995) :
 Les tribus sont soulignées et les sous tribus sont encadrés.

Tableau VII. Classification de Phlébotomes américains proposée par Galati (1995, 2010)

Sous tribu	Genre	Sous genre	Série	Groupe d'espèces
Sergentomyiina	<i>Sergentomyia</i>			
	<i>Deamemyia</i>			
	<i>Micropygomyia</i>	<i>Sylvamyia</i>	Oswaldoi	
		<i>Sauromyia</i>	Autroclavata	
		<i>Coquillemomyia</i>	Vexator	
		<i>Micropygomyia</i>	Chiapanesis	
			Cayennensis	
			Pilosa	
Lutzomyiina	<i>Sciopemyia</i>			
	<i>Lutzomyia</i>	<i>Helcocyrtomyia</i>		
		<i>Castromyia</i>		
		<i>Tricholateralis</i>		
		<i>Lutzomyia</i>		
	<i>Migonemyia</i>	<i>Migonemyia</i>		
		<i>Blancasmyia</i>		
	<i>Pintomyia</i>	<i>Pintomyia</i>		
		<i>Pifanomyia</i>	Pacae	
			Monicola	
			Pia	
			Verrucarum	
			Evansi	
			Serrana	
		Townsendi		
	<i>Dampfomyia</i>	<i>Coromyia</i>		
		<i>Dampfomyia</i>		<i>Delpozoi</i>
	<i>Exapapillata</i>			
	<i>Pressatia</i>			
	<i>Trichopygomyia</i>			
	<i>Evandromyia</i>	<i>Aldamyia</i>		
		<i>Evandromyia</i>	Infraespinosa	
			Saulensis	
			Rupicola	
		<i>Barrettomyia</i>	Tupynambai	
			Monstruosa	
			Cortelezzii	
Psychodopygina	<i>Psathyromyia</i>	<i>Foratinella</i>		
		<i>Xiphomyia</i>		
		<i>Psathyromyia</i>	Lanei	
			Shannoni	
	<i>Viannamyia</i>			
	<i>Martinsmyia</i>			<i>Alphabeticata</i>
				<i>Gasparviannai</i>
	<i>Bichromomyia</i>			
	<i>Psychodopygus</i>		Arturi	
			Davisi	
			Panamensis	
			Guyanensis	
			Chagasi	
			Bispinosus	
	<i>Nyssomyia</i>			
	<i>Trichophoromyia</i>			

2.4 JUSTIFICATIF DE NOS TRAVAUX

La révision bibliographique conduite sur les leishmanioses en Équateur depuis 1920 nous indique clairement que ces maladies, comme partout ailleurs, comportent des cycles complexes incluant trois acteurs: le parasite, le vecteur et le réservoir. Notre travail se focalise presque exclusivement sur l'étude des Phlébotomes, vecteurs biologiques exclusifs des *Leishmania*.

Depuis toujours, *Nyssomyia trapidoi* est considéré comme le principal vecteur de la leishmaniose tégumentaire dans le territoire équatorien. Dujardin et *al.* (1996) mènent une étude isoenzymatique sur de nombreux spécimens appartenant à cette espèce, capturés dans deux localités de la côte Pacifique. Ils soulignent la possible existence de deux espèces jumelles dont les potentialités vectorielles peuvent différer. L'un des principaux objectifs de cette thèse est l'étude de la même population avec une caractérisation morphologique des formes claires et foncées, leur sélection et une analyse systématique menée sur la base des mêmes isoenzymes et par biologie moléculaire par séquençage de marqueurs moléculaires mitochondriaux connus pour être informatifs à ce niveau taxonomique interspécifique ou inter-populationnel : cytochrome b (cyt b) et cytochrome C oxydase I (COI). Par ailleurs, afin d'étudier leur implication épidémiologique, nous avons recherché la présence d'ADN de Trypanosomatidae ainsi que celle d'ARN de phlebovirus et de flavivirus. En effet, *Ny. trapidoi* est un vecteur connu de vesiculovirus (Tesh et *al.* 1971 ; 1972) mais rien n'est connu sur ses facultés à porter et transmettre des phlebovirus. Par ailleurs, cette recherche d'arbovirus a été réalisée sur d'autres espèces de phlébotomes.

Par ailleurs, nous avons récolté des spécimens dans plusieurs régions d'Équateur et nous sommes intéressés à la systématique des Psychodopygina, à plusieurs niveaux taxonomiques. En 1995, Galati a proposé une nouvelle classification des phlébotomes qui les divise en 2 tribus et 8 sous tribus. Parmi ces dernières se trouve celle des Psychodopygina, très peu documentée sur le plan phylogénétique. Cette sous tribu des Psychodopygina compte 7 genres : *Psathyromyia*, *Viannamyia*, *Martinsmyia*, *Bichromomyia*, *Psychodopygus*, *Nyssomyia* et *Trichophoromyia*. Une première partie de notre travail a consisté à réaliser une étude de systématique moléculaire destinée à étudier les relations phylogénétiques existant entre ces genres de Psychodopygina. Elle est basée sur la comparaison de marqueurs moléculaires possédant un rythme de mutation

relativement lent (ADNr 28 partiel) et un peu plus rapide (cyt b de l'ADNmt), ceci afin de tester la classification proposée par Galati sur des arguments morphologiques.

A des niveaux taxonomiques plus terminaux, nous avons étudié par des approches morphologique et moléculaire [cyt b et le second espace interne transcrit (ITS-2)] la variabilité existant chez les *Psychodopygus* de la série Guyanensis vivant en sympatrie dans le Parc National Yasuní situé en Amazonie chez lesquels la présence de deux morphotypes est connue chez *Psychodopygus geniculatus*.

Enfin, l'existence de différents morphotypes chez *Psathyromyia aragaoi* dans des captures réalisées sur la côte Pacifique et en Amazonie nous a conduit à envisager une étude moléculaire intra-spécifique.

3. MATERIEL ET METHODES

3.1 Origine des Phlébotomes

Les spécimens analysés dans cette étude proviennent d'Equateur, du Brésil, de la Bolivie, de la Guyane Française et du Nicaragua. Ils ont été capturés vivants à l'aide de pièges lumineux miniature de type CDC (Center for Diseases Control) et conservés immédiatement dans l'éthanol à 96% en vue de leur analyse moléculaire. Quelques spécimens destinés à une analyse isoenzymatique ont été capturés de la même manière et immédiatement stockés dans l'azote liquide (-196°C).

L'origine des échantillons est détaillée dans le tableau V. Ils proviennent de nos propres captures et des captures réalisées par des collègues (F. Le Pont, E. A. B. Galati, J.C. Gantier, R. Terán).

Tableau VIII. Origine de Phlébotomes captures et inclus dans l'étude.

Pays	Localité	Biotope	Altitude	Coordonnés GPS
Equateur	Paraíso Escondido	Forêt secondaire	600 m	00°05'-79°17''
	La Tablada	Forêt secondaire	200 m	
	Tiputini	Forêt tropicale humide primaire	240 m	00°37'- 76°10'
Bolivie	Roboré	Forêt sèche de Chiquitanie	300 m	18°20''-59°46''
	Rio Camata	Forêt subtropicale humide	2000 m	15°12''-68°57''
Nicaragua	Musun	Forêt nuageuse	300 m	12°58''-85°15''

3.2 Traitement des échantillons destinés aux études moléculaires

Chaque phlébotome est déposé en position latérale sur une lame, la tête, les ailes et la génitalia sont prélevés à l'aide de fines aiguilles stériles à usage unique. Le thorax et le reste de l'abdomen

sont conservés à sec dans un micro tube de 1,5 ml stérile à -20°C pour les études moléculaires. Ensuite, la tête, les ailes et le génitalia sont éclaircis dans la solution de Marc-André (Abonnenc, 1972) à chaud directement sur la lame avant d'être montés entre lame et lamelle dans la gomme au chloral qui parfait l'éclaircissement des éléments nécessaires à l'identification du phlébotome et permet les études morphologiques et morphométriques. Certains spécimens, au lieu d'être montés dans la gomme au chloral, ont été déshydratés avant d'être montés définitivement dans l'Euparal.

3.3 Identification des spécimens

Tous les spécimens ont été identifiés avec les caractères décrits dans les clés d'identification de Young & Duncan (1994) et de Galati (1995).

3.4 Liste de phlébotomes identifiés

Tous les spécimens qui ont été utilisés pour les analyses morphologique, morphométrique et moléculaire sont précisés dans le tableau IX:

Tableau IX. Liste des phlébotomes pour l'analyse moléculaire

Genre	Sous genre	Série	Espèces	Pays	Nombre	
<i>Psathyromyia</i>	<i>Foratiniella</i>		<i>abunaensis</i>	Equateur	2	
			<i>antezanai</i>	Equateur	2	
			<i>aragaoi</i>	Equateur	7	
					Bolivie	13
				<i>barretoii majuscula</i>	Equateur	2
				<i>brasiliensis</i>	Bolivie	1
				<i>castilloi</i>	Equateur	2
				<i>coutinhoi</i>	Equateur	2
				<i>pascalei</i>	Bresil	1
				<i>pradobarientosi</i>	Equateur	1
				<i>runoides</i>	Bolivie	1
				<i>texana</i>	Mexico	1
			<i>Xiphomyia</i>		<i>aclydifera</i>	Equateur
		<i>dreisbachi</i>		Equateur	2	
	<i>Psathyromyia</i>		<i>lanei</i>	Bresil	1	
		<i>shannoni</i>	<i>dasymera</i>	Equateur	2	
			<i>dendrophyla</i>	Bolivie	1	
<i>Viannamyia</i>			<i>furcata</i>	Guyane Française	1	
<i>Martinsmyia</i>		<i>alphabetica</i>	<i>alphabetica</i>	Bresil	1	
			<i>brisolai</i>	Bolivie	3	
<i>Bichromomyia</i>			<i>flaviscutellata</i>	Equateur	1	

			Bresil	1
<i>Psychodopygus</i>	<i>arthuri</i>	<i>lloydi</i>	Bresil	1
	<i>davisi</i>	<i>claustrai</i>	Guyane Française	1
		<i>davisi</i>	Equateur	1
	<i>panamensis</i>	<i>ayrozai</i>	Equateur	1
		<i>hirsutus</i>	Equateur	2
		<i>llanosmartinsi</i>	Bolivie	1
		<i>nocticola</i>	Bolivie	1
		<i>panamensis</i>	Equateur	5
	<i>guyanensis</i>	<i>corossoniensis</i>	Equateur	7
		<i>francoisleponti</i>	Equateur	12
		<i>geniculatus</i>	Equateur	27
		<i>luisleoni</i>	Equateur	8
	<i>chagasi</i>	<i>squamiventris</i>	Guyane Française	1
<i>bispinosus</i>	<i>bispinosus</i>	Equateur	3	
<i>Nyssomyia</i>		<i>antunesi</i>	Equateur	2
		<i>intermedia</i>	Bresil	2
		<i>neivai</i>	Bresil	2
		<i>richardwardi</i>	Equateur	5
		<i>trapidoi</i>	Equateur	266
			Nicaragua	4
		<i>umbratilis</i>	Bresil	1
		<i>whitmani</i>	Bresil	2
		<i>ylephiletor</i>	Nicaragua	4
	<i>yuilli yuilli</i>	Guyane Française	1	
<i>Trichophoromyia</i>		<i>ininii</i>	Guyane Française	1
		<i>cellulana</i>	Equateur	1
		<i>pabloi</i>	Equateur	1
		<i>reburra</i>	Equateur	2
		<i>sinuosa</i>	Equateur	1
		<i>velascoi</i>	Equateur	1
<i>Brumptomyia</i>		<i>sp.</i>	Equateur	1
<i>Warileya</i>		<i>rotundipennis</i>	Bolivie	1

3.5 Morphométrie

La morphométrie a été réalisée à l'aide d'un microscope couplé au logiciel Perfect Image (Aries, France). Pour les *Psychodopygus* mâles de la série *guyanensis*, ont été mesurées chez les mâles (Figure 9) : les longueurs du troisième segment de l'antenne (AIII), de la pompe génitale, des filaments génitaux, du surstyle, du style et du coxite. La largeur du style et du coxite a été également mesurée.

3.6 Analyse moléculaire

3.6.1 Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait à l'aide du QiaampDNA minikit (QIAGEN®) en utilisant le protocole suivant :

1. Broyer le thorax et abdomen dans un micro tube stérile Treff (Suisse) à l'aide d'un piston pellet parfaitement adapté (Treff, Suisse) avec 20 µl de tampon de lyse ATL jusqu'à ce que les tissus soient parfaitement lysés. Ajouter alors 160 µl de tampon ATL et 20 µl de protéinase K
2. Incuber 30 minutes minimum à 56°C pour obtenir une lyse parfaite des tissus.
3. Ajouter 200 µl de tampon AL et incuber 10 min à 70°C.
4. Ajouter 200 µl d'éthanol absolu et transférer la totalité du liquide sur une colonne fournie.
5. Centrifuger à 8700 rotations par minute (rpm) pendant 1 minute.
6. Ajouter 500 µl de la solution de lavage AW1 et centrifuger à 8700 rpm pendant 1 minute.

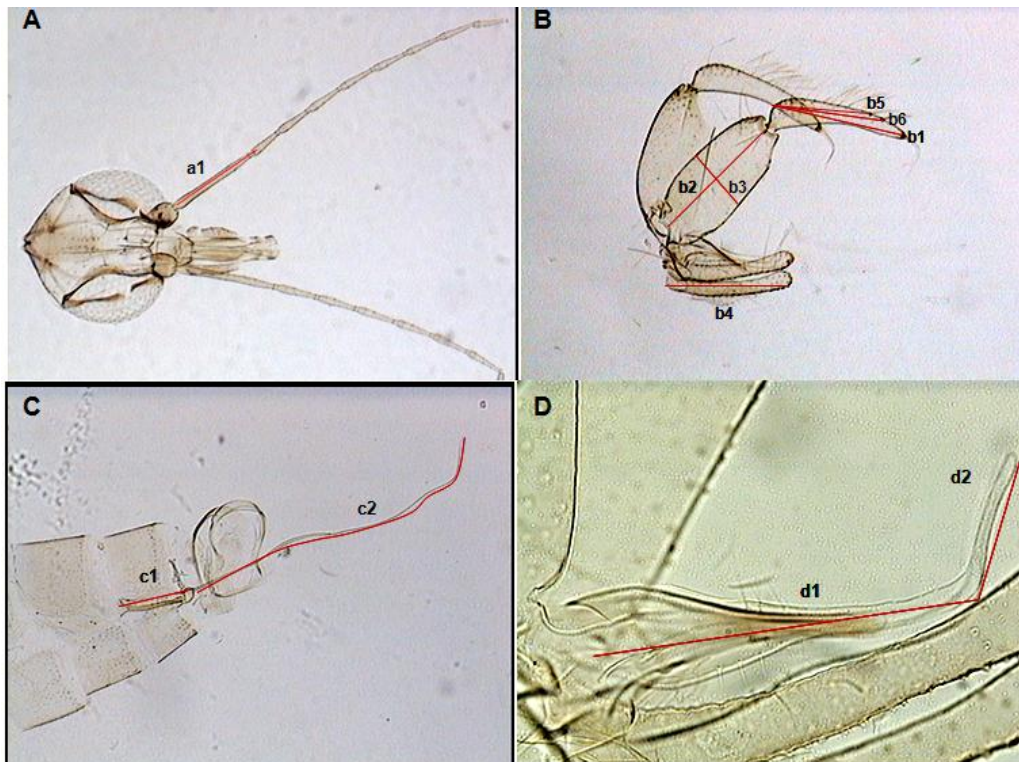


Figure 10. Caractères mesurés pour caractériser les *Psychodopygus* de la série Guyanensis. A) Tête: a1. Troisième segment de l'antenne (AIII) B) Genitalia Terminale: b1. Longueur du style, b2. Longueur du coxite, b3. Largeur du coxite, b4. Longueur du surstyle, b5. Insertion de la première épine sur le style, b6. Insertion de la deuxième épine sur le style. C) pompe génitale et filaments génitaux: c1. Longueur de la pompe génitale, c2. Longueur des filaments génitaux, D) Paramère : d1+d2. Longueur totale du paramère, d2. longueur de la partie distale.

7. Ajouter 500 μ l de la solution de lavage AW2 et centrifuger à 14000 rpm pendant 1 minute.
8. Placer la colonne dans un micro tube 1,5 ml stérile
9. Ajouter 200 μ l de tampon AE dans la colonne et attendre 5 minutes avant de centrifuger 1 minute à 8700 rpm afin d'éluer l'ADN.
10. Réaliser extemporanément la PCR ou conserver l'extrait d'ADN à -20°C.

3.6.2 Amplification de l'ADN

Une même concentration de composants a été utilisée pour tous les domaines à amplifier. Toutes les réactions ont été ajusté à un volume final de 50 μ l avec 5 μ l d'ADN de chaque échantillon (Tableau VI):

Tableau X. Composition des mix de PCR

Réactifs	Concentration	Volume (μ l)
Solution tampon	10 X	5
Sonde forward	50 mM	0,4
Sonde reverse	50 mM	0,4
dNTP „s	10 mM	0,7
Taq Polimerase	5 U/ μ l	0,25
Eau ultrapure	-	38,25
ADN	-	5

3.6.3 Marqueurs moléculaires

Les marqueurs mitochondriaux et nucléaires sélectionnés dans cette étude ont été amplifiés avec les couples des amorces indiqués dans le tableau VII, et dans les conditions réactionnelles précisées dans le tableau VI.

Tableau XI. Amorces et protocoles utilisés pour amplifier les marqueurs moléculaires.

Marqueur	Noms	Séquence 5' - 3'	Taille (pb)	Références	Conditions
Cytochrome b	C3B-PDR N1N-PDR	5''- GGTAYWTTGCCTCGAWTTCGWTATGA-3'' 5''- CAYATTCAACCWGAATGATA-3''	550	Esseghir et al. 1997	94°C, 3 min [94°C, 30 sec; 40°C, 30 sec; 68°C, 60 sec] _{5 cycles} [94°C, 30 sec; 44°C, 30 sec; 68°C, 60 sec] _{35 cycles} et une extension finale 68°C, 10 min.
Cytochrome c oxydase 1 (COI)	LEP-R1 LEP-F1	5''- TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3'' 5''- TTTCTACAAATCATAAAGATATTGG-3''	500	Costa et al. 2007 Boudabous et al. 2008	94°C, 3 min [94°C, 30 sec; 45°C, 90 sec; 68°C, 60 sec] _{5 cycles} [94°C, 30 sec; 51°C, 30 sec; 68°C, 60 sec] _{35 cycles} et une extension finale 68°C, 10 min.
Second espace interne transcrit (ITS-2)	C1A JTS3	5''- CCT GGT TAG TTT CTT TTC CTC CGC T-3'' 5''- CGC AGC TAA CTG TGT GAA ATC-3''	550	Depaquit et al. 2000	94°C, 3 min [94°C, 30sec; 56°C, 45sec; 68°C, 60sec] _{40 cycles} et une extension finale 68°C, 10 min
Facteur d'élongation alpha (EF1- α)	EF 09 EF 12	5'-GCTCCTGGACATCGTGATTTYATYAA-3' 5'-CCACCAATCTTGTAGACATCTTGCAG-3'	500	Parvizi et Assmar, 2007	94°C, 3 min [94°C, 30sec; 58°C, 30sec; 68°C, 30sec] _{40 cycles} et une extension finale 68°C, 10 min
Domain ribosomiaux (D1 et D2)	C1'' D2	5''-ACCCGCTGAATTTAAGCAT-3'' 5''-TCCGTGTTTCAAGACGGG-3''	850	Depaquit et al. 1998 Goüy de Bellocq et al. 2001	94°C, 3min [94°C, 60sec; 58°C, 60sec; 68°C, 60sec] _{35 cycles} et une extension finale 68°C, 10 min

3.6.4 Purification de produit de PCR

En vue du séquençage, le produit de PCR est purifié directement par le service de séquençage. Néanmoins, en cas de double bande ou plus généralement dans le cas de l'amplification du marqueur ITS2, la totalité de l'amplifiat est déposé dans deux puits sur gel d'agarose. Après migration prolongée, la bande d'ADN de taille attendue est découpée sur un transilluminateur

ultraviolet à l'aide d'un scalpel stérile. Le morceau ainsi découpé est placé dans un tube 1,5 ml stérile. L'ADN est extrait du gel d'agarose à l'aide du kit QIAquick PCR Purification (Qiagen®) selon le protocole suivant :

1. Ajouter 300 µl de tampon QG pour chaque 100 mg de gel d'agarose 1,5%
2. Incuber 10 min à 50°C avec agitation chaque 3 min à l'aide du vortex pour fondre l'agarose.
3. Ajouter 100 µl d'alcool isoamylique et transférer la totalité du liquide sur une colonne fournie.
4. Centrifuger à 8700 rpm pendant 1 minute.
5. Ajouter 500 µl de tampon QG pour éliminer totalement l'agarose et centrifuger à 8700 rpm pendant 1 minute.
6. Ajouter 750 µl de la solution de lavage PE et centrifuger à 14000 rpm pendant 1 minute.
7. Placer la colonne dans un microtube 1,5 ml stérile
8. Ajouter 50 µl de tampon EB dans la colonne et attendre 5 minutes avant de centrifuger 1 minute à 8700 rpm afin d'éluer l'ADN.
9. Conserver à 4°C.
10. Contrôler l'ADN purifié par électrophorèse sur gel d'agarose.

3.7 Détection d'ADN leishmanien

La présence d'ADN de leishmanie a été recherchée sur un total de 121 femelles capturées. Nous avons utilisé la technique décrite par Nicolas et *al.* (2002) qui utilise les couples d'amorces JW11 5'-CCT ATT TTA CAC CAA CCC CCA GT-3' et JW12 5'-GGG TAG GGG CGT TCT GCG AAA-3'. Les conditions réactionnelles sont précisées dans le tableau VI. Le programme d'amplification utilisé est : dénaturation initiale (94°C, 4 min) suivi par 40 cycles [94°C, 60sec; 58°C, 30sec; 68°C, 30sec] et une extension finale 68°C, 10 min. Ces amorces génèrent un fragment de 120 pb.

3.8 Détection d'ARN viral

La recherche d'ARN d'arbovirus (Phlebovirus et Flavivirus) a été réalisée sur des pools de 50 spécimens conservés dans l'azote liquide, puis dans la carboglace avant d'être définitivement stockés à -80°C. Après broyage du pool dans le PBS puis aliquotage

La recherche d'ARN de phlebovirus a été réalisée comme indiquée dans l'article n°4 (Zapata et *al.* Parasites & Vectors, sous presse).

La recherche d'ARN de flavivirus est réalisée d'une part par RT-PCR quantitative avec marquage Sybr green à l'aide des amorces Pan-Flavi PF1/ Pan-Flavi PF2 (R. Charrel, communication personnelle) et d'autre part par inoculation d'une aliquote sur cellules Vero, de la même manière que pour la recherche d'ARN de phlebovirus.

3.9 Séquençage

Les amplifiants ont été séquencés directement en double sens à l'aide des primers utilisés pour les PCRs. Cette étape n'est pas réalisée au laboratoire. La majorité des échantillons a été séquencée par le centre national de séquençage (Genoscope) dans le cadre du projet @speed-ID (Accurate SPEciEs Délimitation and Identification of eukaryotic biodiversity using DNA markers). Quelques échantillons ont été séquencés par les sociétés Cogenics, Eurofins-Operon et par le département de Parasitologie de l'Université de Valencia, Espagne.

3.10 Analyse des séquences

La correction des séquences a été réalisée avec les logiciels Pregap et Gap (Bonfield et Staden, 1996) L'alignement des séquences a été réalisé à l'aide du logiciel Bioedit (Thompson et *al.* 1994) en réalisant un alignement automatique à l'aide de ClustalW puis en optimisant systématiquement l'alignement à l'œil. L'analyse des matrices de caractères en Neighbor-Joining et bootstrap a été réalisée à l'aide du logiciel MEGA (Kumar et *al.* 2004). Les analyses en maximum de vraisemblance (maximum likelihood) ont été réalisées à l'aide du logiciel PhyML 3.0 (Guindon et *al.* 2010) en utilisant le modèle de substitution HKY85. Les analyses en parcimonie menées chez les Psychodopygina ont été réalisées avec le logiciel PAUP* (Swofford, 1993). En raison du nombre important de taxons inclus dans cette étude, nous étions dans

l'impossibilité de réaliser une recherche exhaustive ou par l'option Branch and Bound de l'arbre le plus court. Par conséquent, nous avons réalisé des recherches heuristiques.

3.11 Analyse isoenzymatique

3.11.1 Préparation du gel

200 mg d'agarose et 2,4 g de sorbitol sont dissouts dans 18 ml d'eau distillée au bain-marie sous agitation permanente. Ensuite, 0.9 ml d'ampholyte de pHi connu est ajouté. La solution est immédiatement coulée dans un moule constitué d'une plaque de verre sur laquelle est appliqué un support plastique recouvert d'une pellicule hydrophile. Une deuxième plaque de verre munie de joints espaceurs (500 μ m) lui est superposée. Ce système est maintenu par deux pinces et préchauffé 15 minutes à l'étuve (55°C). La polymérisation se fait alors en 15 minutes à température ambiante. Le gel est ensuite démoulé avec son support et entreposé dans une chambre humide à + 4°C pendant une heure au minimum (Boussa, 2008).

3.11.2 Préparation des extraits protéiques

Chaque spécimen est placé dans une alvéole d'une palette de porcelaine conservée au congélateur entre les manipulations. Après prélèvement des parties qui seront destinées pour le montage, le reste de l'insecte est broyé dans l'eau distillée et déposé sur des puits. La préparation des échantillons s'effectue le plus rapidement possible pour éviter une dénaturation des enzymes. Des extraits de *P. dubosqi* ont été utilisés comme témoin lors de chaque migration (Boussa, 2008).

3.11.3 Electrophorèse

Le gel d'agarose est placé sur une cuve de migration réfrigérée. Deux mèches de papiers découpées aux dimensions du gel sont imbibées de solution d'électrodes. Après essorage sur papier filtre, elles sont placées à 0,5 cm du bord des grands côtés du gel. Les électrodes sont placées sur les mèches et reliées à un générateur réglé initialement à un courant et une puissance électrique maximaux et pour un débit de 500 V. On réalise dans un premier temps une préfocalisation de 15 min afin de stabiliser le gradient d'ampholyte.

L'isoélectrofocalisation commence après répartition dans les puits de l'applicateur des extraits protéiques et un témoin de protéines-étalon de pHi connu qui est déposé dans le premier puit de

l'applicateur. L'IEF démarre à 500V et la migration dure 60 min, temps nécessaire au passage à 1200 Volt/heure. Le gel est ensuite rincé à l'eau distillée découpé et coloré.

3.11.4 Coloration des Protéines étalon

La bande de gel portant les protéines-étalon est immergée pendant 10 minutes dans une solution aqueuse de fixation constituée d'acide trichloroacétique (10%) et d'acide sulfosalicylique (1%). Le gel est ensuite séché à l'air chaud avant d'être coloré par le bleu de Coomassie G 250 (0,2%) pendant 10 min. L'excès de colorant est éliminé par rinçage du gel dans une solution aqueuse de décoloration (éthanol 35%, acide acétique 10%). Le gel est séché une dernière fois à température ambiante, les bandes protéiques apparaissent alors colorées en bleu foncé. Les pHi connus des protéines-étalon permettent de repérer et de déterminer les pHi des isoenzymes révélées (Boussa, 2008).

3.11.5 Révélation des profils isoenzymatiques

Les solutions de révélations spécifiques des différents systèmes enzymatiques ont été adaptées d'après Pasteur et *al.* (1987) et Kassem et *al.* (1990).

3.11.6 Analyse des résultats

La fréquence allélique, l'équilibre d'Hardy-Weinberg et la distance génétique de Nei ont été calculé par le logiciel BIOSYS-2 (Swofford et Selander, 1981), le déséquilibre de liaison et la différenciation genotypic ont été évalué utilisant GENEPOP (Raymond et Rousset, 1995)

4. RESULTATS

Les résultats obtenus dans cette thèse sont présentés sous la forme de quatre articles : un article publié, un sous presse, deux en préparation, et un résultat préliminaire.

4.1 Article N° 1

Titre: A molecular systematics of the Psychodopygina (Diptera; Psychodidae) inferred from ribosomal and mitochondrial DNA.

Auteurs : Zapata S, Galati EAB, Le Pont F, Gantier JC, Trueba G, Léger N, Couloux A, Barges MD, Mas-Coma S, and Depaquit J.

En cours de préparation

A molecular systematics of the Psychodopygina (Diptera; Psychodidae) inferred from ribosomal and mitochondrial DNA.

Zapata S^{1,2}, Galati EAB³, Le Pont F⁴, Gantier JC⁵, Trueba G², Léger N¹, Couloux A⁵, Bargues MD⁶, Mas-Coma S⁶, and Depaquit J^{1*}

- ¹ Université de Reims Champagne-Ardenne, ANSES, EA 4688 – USC Transmission vectorielle et épidémiologie-surveillance de maladies parasitaires “VECPAR”, France
- ² Microbiology Institute, Universidad San Francisco de Quito, Quito, Equateur
- ³ Universidad de Sao Paulo,
- ⁴ 72 Rue de la Colonie, Paris, France
- ⁵ Genoscope, Centre National de Séquençage, 2 rue Gaston Crémieux, CP5706, 91057 Evry Cedex, France; www.genoscope.fr
- ⁶ Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Burjassot, Spain.

***Corresponding author:**

Jérôme DEPAQUIT

Faculté de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne

JE 2533 – USC « VECPAR », 51 rue Cognacq-Jay

51096 Reims cedex - France

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

1. INTRODUCTION

The present classification of Phlebotomine sandflies from the Americas opposes two systematics. Young & Duncan (1994) individualize three genera: *Lutzomyia* França & Parrot, 1924; *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 and *Warileya* Hertig, 1940. This classification is “minimalist”, lacking of phylogenetical arguments and is linked with the transmission of *Leishmania*. The individualization of the genera *Warileya* and *Brumptomyia*, which have never been involved in the transmission of pathogens, was approved by all of the specialists in the field whereas the individualization of the genus *Lutzomyia* sensu Young & Duncan (1994) is not (Ready *et al.* 1980). It contains more than 400 species and subspecies including those involved in the transmission of *Leishmania*, *Bartonella* and arboviruses (Young & Duncan, 1994; Izri *et al.* 2006; Fisher *et al.* 2011).

Young & Duncan (1994) divided the latter genus into 15 subgenera and 11 species groups.

On the other hand, Galati (1995, 2010) using morphological phylogenetic approaches, divided the Phlebotominae into two tribes: Hertigini and Phlebotomini. The Hertigini tribe includes the genera *Warileya*, *Hertigia*, and *Chinius*. The Phlebotomini tribe is subdivided into six subtribes: Phlebotomina, Australophlebotomina, Brumptomyiina, Sergentomyiina, Lutzomyina and Psychodopygina. The Lutzomyiina subtribe includes nine genera all from the Americas. The Psychodopygina subtribe also includes seven genera, all from the Americas: *Psathyromyia*, *Viannamyia*, *Martinsmyia*, *Bichromomyia*, *Psychodopygus*, *Nyssomyia* and *Trichophoromyia*.

No molecular studies have been carried out in order to test the Galati's hypotheses. A large number of molecular studies have been published comparing closely related species, however,

only three have been published with the goal of inferring phylogenetic relationships between genera of Phlebotomine sand flies (Depaquit *et al.* 1998; Aransay *et al.* 2000; Beati *et al.* 2004).

The present study provides molecular phylogenies of the Psychodopygina subtribe based on partial 28S rDNA and cytochrome b mtDNA sequences. These results are compared with the classification proposed by Galati.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Sand fly collection

Sandflies were captured using CDC miniature light traps from Mexico, Nicaragua, Guyane Française, Equateur, Bresil and Bolivie. A total of 49 species representing the seven genera of the Psychodopygina (*Psychodopygus*, *Nyssomyia*, *Trichophoromyia*, *Psathyromyia*, *Bichromomyia*, *Martinsmyia*, and *Viannamyia*) are included in the sampling (table 1)

Head, wings and genitalia from Equateurian specimens were cleared in boiling Marc-André solution, and mounted between slide and cover slide. The thorax related to each specimen was stored at -20°C or in 96 % ethanol before DNA extraction. Some specimens were dried and stored at -20°C or at room temperature waiting their processing.

2.2 DNA extraction, PCR amplification and sequencing

DNA was extracted using the QIAmp[®] DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) following the protocol used by Depaquit *et al.* (2008). Polymerase Chain reactions (PCR) were performed in a 50µl volume using 5µl of DNA extracted solution and 50 pmol of primers C3B-PDR / NIN-PDR (Esseghir *et al.* 1997), and C1/D2 (Depaquit *et al.* 1998; Goüy de Bellocq *et al.* 2001) described previously to amplify cytochrome b from mitochondrial DNA and domains D1-D2 from rDNA 28S respectively. PCR products were sequenced in both directions using the primers used for

DNA amplification by National Center of Sequencing (genoscope) project@speed-ID (Accurate Species Delimitation and Identification of Eukaryotic Biodiversity) and by the Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Spain.

2.3 Sequence alignment and phylogenetic analyses

The sequences were treated using Pregap and Gap program included in the Staden Package software (Bonfield & Staden, 1996). Sequence alignment was done using ClustalW software (Thompson *et al.* 1994). Neighbor-joining (NJ) analyses were performed using MEGA 4.0 software (Kumar *et al.* 2004) node support was assessed by bootstrapping over 500 replications and maximum parsimony (MP) analyses were performed using the heuristic search option of PAUP* (Swofford, 1993) according to the high number of taxa excluding an exhaustive or a Branch and Bound search option.

3. RESULTS

Samples were sequenced for both D1 and D2 domains of the rDNA and cytochrome b mtDNA Sequences obtained are available in Genbank under accession numbers XXXXXX to XXXXXX for partial rDNA and XXXXXX to XXXXXX for cytochrome b.

3.1 Analysis of partial rDNA sequences

The lengths of domains D1, C2 and D2 ITS2 segments in males were 657 to 721 (*Warileya*) bp. The alignment of sequences include 755 nucleotidic positions: 505 are constant, 139 are variable but parsimony uninformative, and 111 are parsimony informative.

A heuristic search of PAUP* provides 296 trees equiparcimonious (trees length = 628 steps. CI= 0.551. RI = 0.699). A consensus cladogram is provided in figure 1.

The NJ tree obtained is shown in figure 2.

3.2 Analysis of cytochrome b sequences

The lengths of the studied partial cyt B sequences range from 508 to 513 bp. A total of 545 nucleotidic positions have been retained after alignment: 269 are constant, 70 are variable but parsimony uninformative, and 206 are parsimony informative.

A heuristic search of PAUP* provides three equiparcimonious trees (length = 1344 steps. CI= 0.32. RI = 0.55). A consensus cladogram of these trees is shown in figure 3.

The NJ tree obtained is shown in figure 4.

DISCUSSION

The values of the consistency index are low: 0.55 for D1-D2 and 0.32 for cyt B. They show a high level of homoplasy within the selected databases. Moreover, the percentage (37.7 %) of nucleotidic positions which are parsimony informative within the cyt B database indicates clearly that this marker is not well adapted to the inferred problem, despite globally similar topologies obtained from sequences of both ribosomal and mitochondrial markers. Consequently, we will mainly comment on the results obtained from D1 and D2 sequences.

In 1980, Ready *et al.* described that *Psychodopygus* could be considered as a genus. Galati agreed with this position, arguing that the particular spermathecae of the females is a strong synapomorphy of this group. Our molecular data agree with the monophyly of the genus *Psychodopygus*, underlined by parsimony and strongly supported by NJ and bootstrap (figures X and XX). According to parsimony, *Bichromomyia flaviscutellata* is the sister group of *Psychodopygus*, a position differing according to NJ tree. Within the genus *Psychodopygus*, the series Guyanensis is monophyletic: *Ps. corossoniensis*, *Ps. luisleoni*, *Ps. francoisleponti* and *Ps. geniculatus* forming a clade. We cannot test the monophyly of the series Chagasi, Arthuri and Bispinosus represented each by only one species: *Ps. squamiventris*, *Ps. lloydi*, and *Ps. bispinosus*, respectively. However, the series Panamensis and Davisi are paraphyletic. The first one includes five species: *Ps. hirsutus* and *Ps. llanosmartinsi* which are closely related to, *Ps. davisi* but not closely related to *Ps. panamensis*, nor to *Ps. ayrozai* and *Ps. nocticolus*. Within the series Davisi, *Ps. davisi* and *Ps. clautrei* are located on two distinct branches.

The genus *Martinsmyia* is paraphyletic. According to MP, *Mt. brisolai* is the sister species of all other *Psychodopygina* whereas *Mt. alphabetica* is the sister species of a clade grouping the genera *Psychodopygus*, *Bispinosus* and *Nyssomyia* (except *Ny. richardwardi*).

Concerning the genus *Nyssomyia*, it appears to be paraphyletic according to the position of *Ny. richardwardi*, grouped within the genus *Trichophoromyia*. With the exception of this species, the other *Nyssomyia* form a clade subdivided in two groups. One contains the closely related species *Ny. whitmani*, *Ny. intermedia* and *Ny. neivai* (Andrade *et al.* 2004, 2007; Alves *et al.* 2010). The other branch includes the related species *Ny. trapidoi*, *Ny. ylephiletor*, *Ny. yuilli pajoti*, *Ny. umbratilis* and *Ny. antunesi*. Phenomenons of introgression have been described for

Ny. whitmani and *Ny. intermedia* (Marcondes *et al.* 1997; Mazzoni *et al.* 2006, 2008). The position of *Ny. richardwardi* has been assessed by the sequencing of four specimens and cannot be considered as a technical mistake.

The genus *Psathyromyia* is paraphyletic according to the position of *Pa. dasymera* which also explain the paraphyly of the subgenus *Psathyromyia* represented by *Pa. lanei* and *Pa. dendrophyla*. We also can conclude to the paraphyly of the series shannoni to which *Pa. dasymera* and *Pa. dendrophyla* belong. Identical sequences of *Pa. dasymera* have been obtained from two specimens.

The individualization of the genus *Viannamyia* is not supported by our study indicating that *Vi. furcata* can be considered as a *Psathyromyia* (*Foratiniella*). According to this point of view, the subgenus *Foratiniella* of *Psathyromyia* could be monophyletic. Lastly, the subgenus *Xiphomyia* is monophyletic.

This pilot study proposing a molecular phylogeny of the Psychodopygina give interesting results and needs to be confirmed by the use of other molecular markers and by inclusion of more species.

REFERENCES:

1. Alves CR, Côrtes LM, Bresil RP. The vectorial potential of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* and *Lutzomyia* (*N.*) *whitmani* in the transmission of *Leishmania* (*V.*) *Bresiliensis* can also be related to proteins attaching. J Biomed Biotechnol. 2010; 2010:827-851.

2. Andrade Filho JD, Galati EA, Falcão AL. Biology of the first generation of a laboratory colony of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99(6):597-601.
3. Andrade Filho JD, Galati EA, Falcão AL. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102(4):481-7.
4. Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y, Ready PD. Phylogenetic relationships of phlebotomine sandflies inferred from small subunit nuclear ribosomal DNA. Insect Mol Biol. 2000; 9:157-68.
5. Beati L, Caceres AG, Lee JA, Munstermann LE. Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. Int J Parasitol. 2004; 34: 225–234.
6. Bonfield JK, & Staden R. Experiment files and their application during large-scale sequencing projects. DNA 1996; Seq 6: 109-117.
7. Depaquit J, Lienard E, Verzeaux-Griffon A, Ferte H, Bounamous A, Gantier JC, Hanafi HA, Jacobson RL, Maroli M, Moin-Vaziri V, Müller F, Ozbel Y, Svobodova M, Volf P, Léger N. Molecular homogeneity in diverse geographical populations of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA and ITS2 rDNA epidemiological consequences. Infect Genet Evol. 2008; 8:159-70.
8. Depaquit J, Perrotey S, Lecointre G, Tillier A, Tillier S, Ferté H, Kaltenbach M, Léger N. (Molecular systematics of Phlebotominae: a pilot study. Paraphyly of the genus *Phlebotomus*. C R Acad Sci III. 1998; 321:849-55.

9. Esseghir S, Ready PD, Killick-Kendrick R, Ben-Ismaïl R. Mitochondrial haplotypes and phylogeography of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. *Insect Molec. Biol.* 1997; 6: 211–225.
10. Fischer D, Moeller P, Thomas SM, Naucke TJ, Beierkuhnlein C. Combining climatic projections and dispersal ability: a method for estimating the responses of sandfly vector species to climate change. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(11):e1407.
11. Galati, E.A.B. 1995. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera:Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bol. Dir. Malariol. Saneamient. Ambient.* 35, 133-142.
12. Galati, E.A.B. 2010. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) Classificação, Morfologia, Terminologia e Identificação de Adultos. Apostila Disciplina HEP 5752 Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. Vol. I. Departamento de Epidemiologia Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo Av. Dr. Arnaldo, 715, 01246-904, São Paulo, SP, Brasil.
13. Gouÿ de Bellocq J, Ferté H, Depaquit J, Justine JL, Tillier A, Durette-Desset MC. 2001. Phylogeny of the Trichostrongyline (Nematoda) inferred from 28S rDNA sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 19:430-42.
14. Izri A, Depaquit J, Parola P. Phlebotomine sandflies and transmission of disease agents around the Mediterranean basin. *Med Trop (Mars).* 2006; 66(5):429-35.
15. Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5: 150–163.

16. Marcondes CB, Day JC, Ready PD. Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *Lu. neivai* and *Lu. whitmani*, and their roles as vectors of *Leishmania Brasiliensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997; 91(6):725-6. No abstract available.
17. Mazzoni CJ, Araki AS, Ferreira GE, Azevedo RV, Barbujani G, Peixoto AA. Multilocus analysis of introgression between two sand fly vectors of leishmaniasis. *BMC Evol Biol.* 2008; 8:141.
18. Mazzoni CJ, Souza NA, Andrade-Coelho C, Kyriacou CP, Peixoto AA. Molecular polymorphism, differentiation and introgression in the period gene between *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani*. *BMC Evol Biol.* 2006; 27:6:85.
19. Swofford D.L. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version PAUP*4.0. 2002; Smithsonian Institution Press, Washington DC, U.S.A
20. Ready PD, Fraiha H, Lainson R, Shaw JJ. *Psychodopygus* as a genus: reasons for a flexible classification of the phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 1980; 17: 75–88.
21. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 4673–4680.
22. Young DG and Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae), *Mem Ann Entomol Institut* 1994; 54: 1-881.

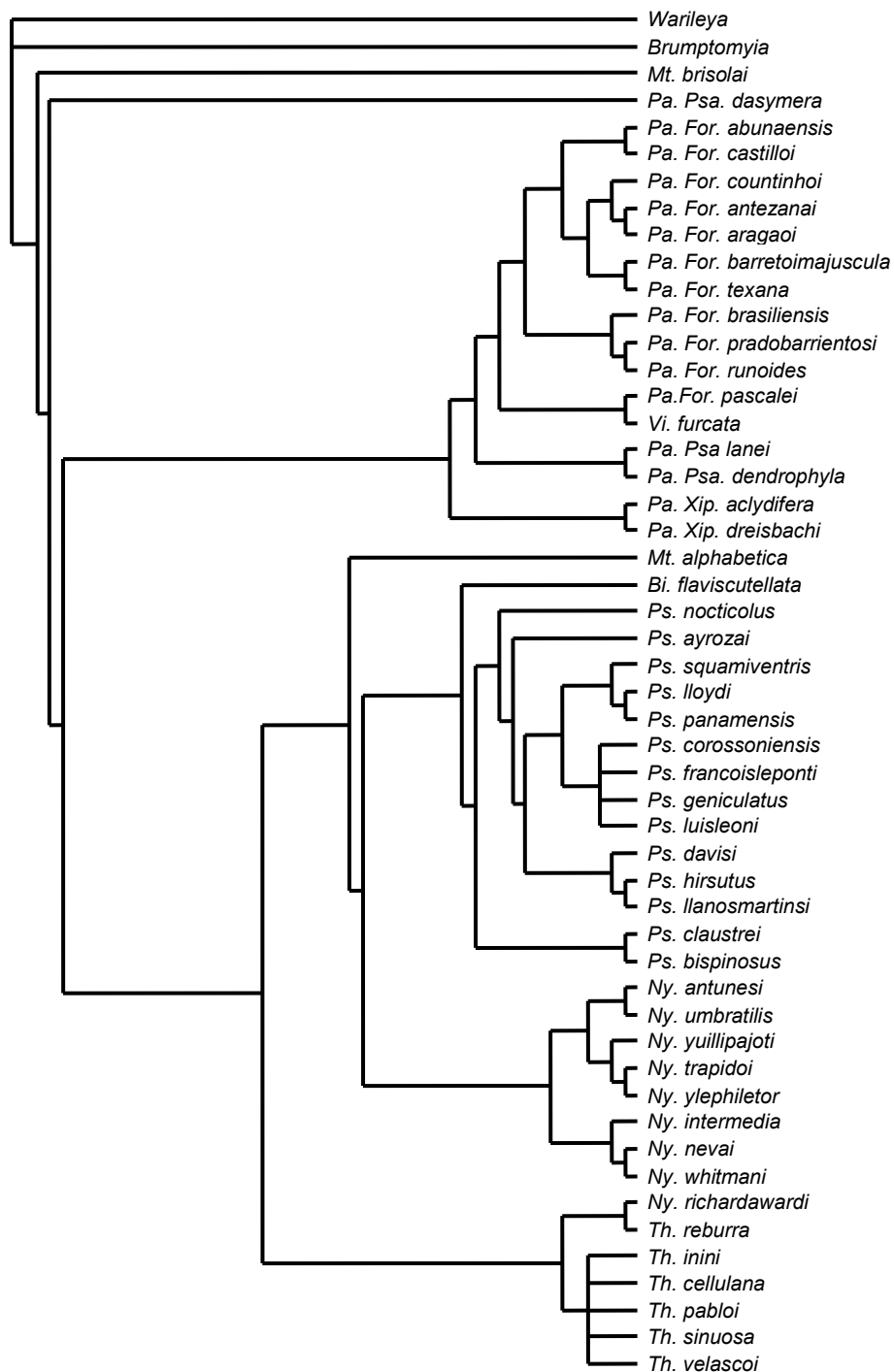


Figure 1: consensus cladogram of 296 trees obtained after an heuristic search of PAUP* based on the sequences of D1 and D2 domains of rDNA. On the 755 nucleotidic positions, 505 are constant, 139 are variable but parsimony uninformative, and 111 are parsimony informative. Tree length = 628 steps. CI= 0.551. RI = 0.699.

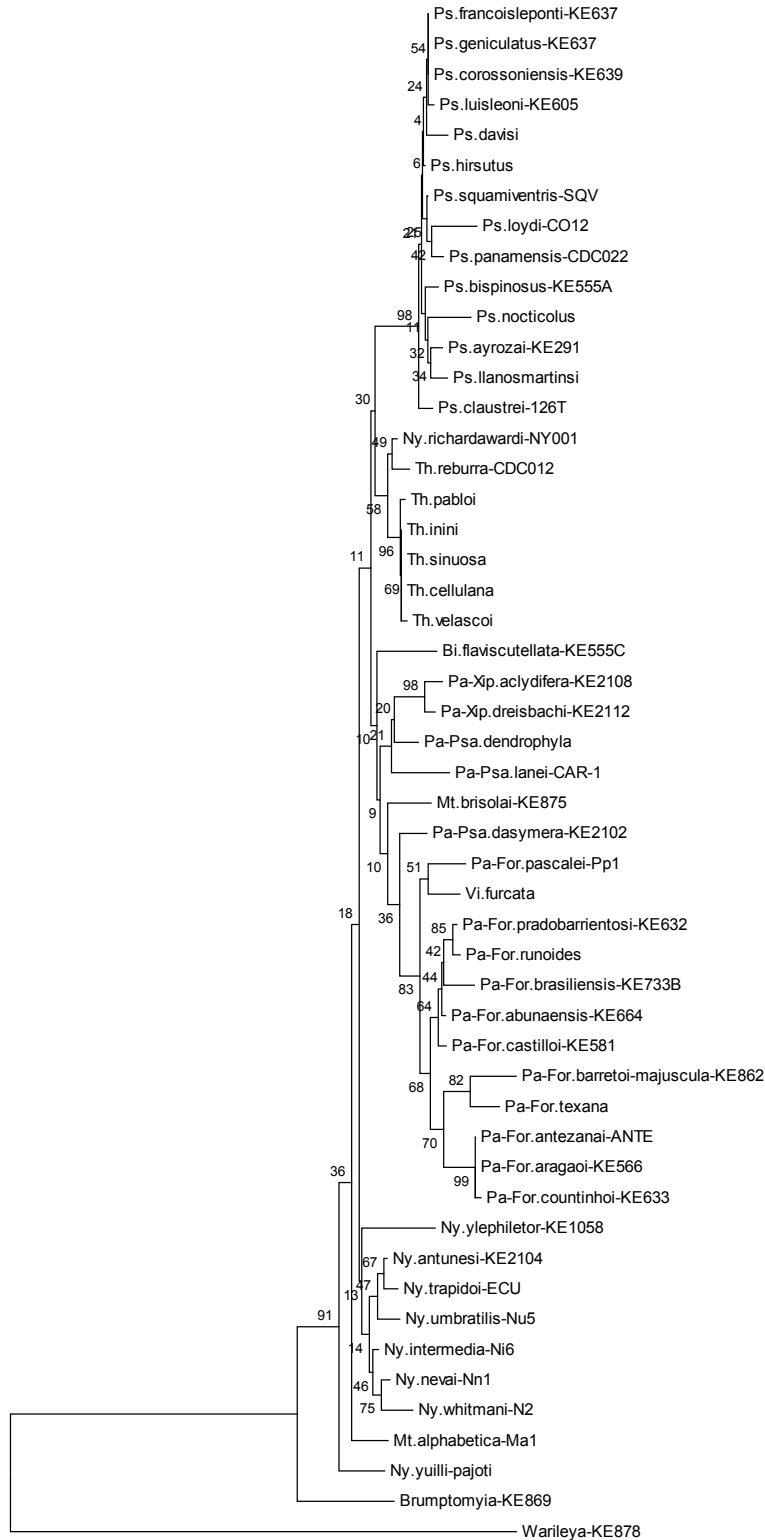


Figure 2: Neighbor-Joining tree based on the on the sequences D1 and D2 domains of rDNA. Bootstrap values (1000 replicates) are indicated on the nodes.

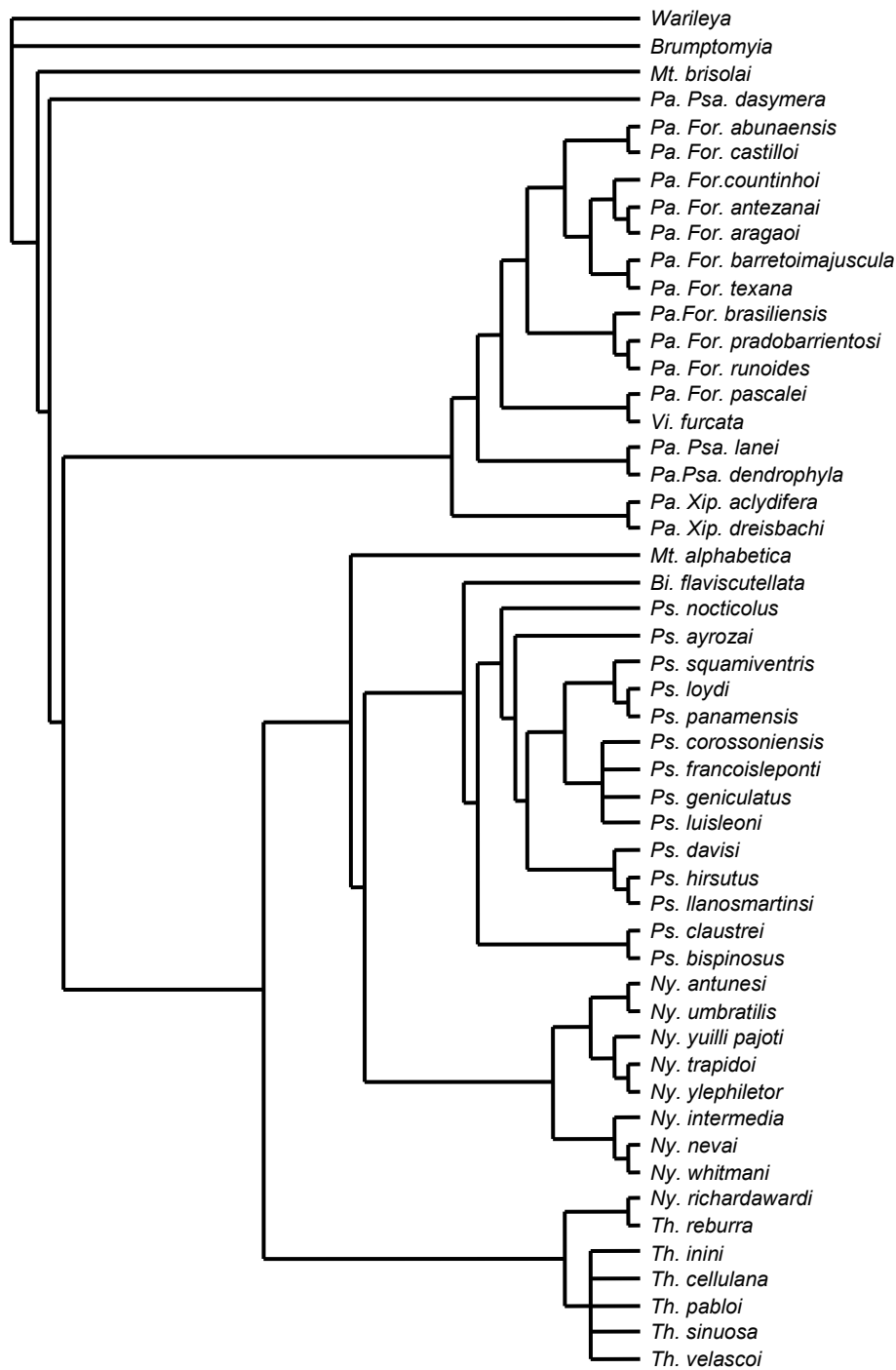


Figure 3: consensus cladogram of 296 trees obtained after an heuristic search of PAUP* based on the sequences of partial cyt b of mtDNA. On the 545 nucleotide positions, 269 are constant, 70 are variable but parsimony uninformative, and 206 are parsimony informative. Tree length = 1344 steps. CI= 0.32. RI = 0.55.

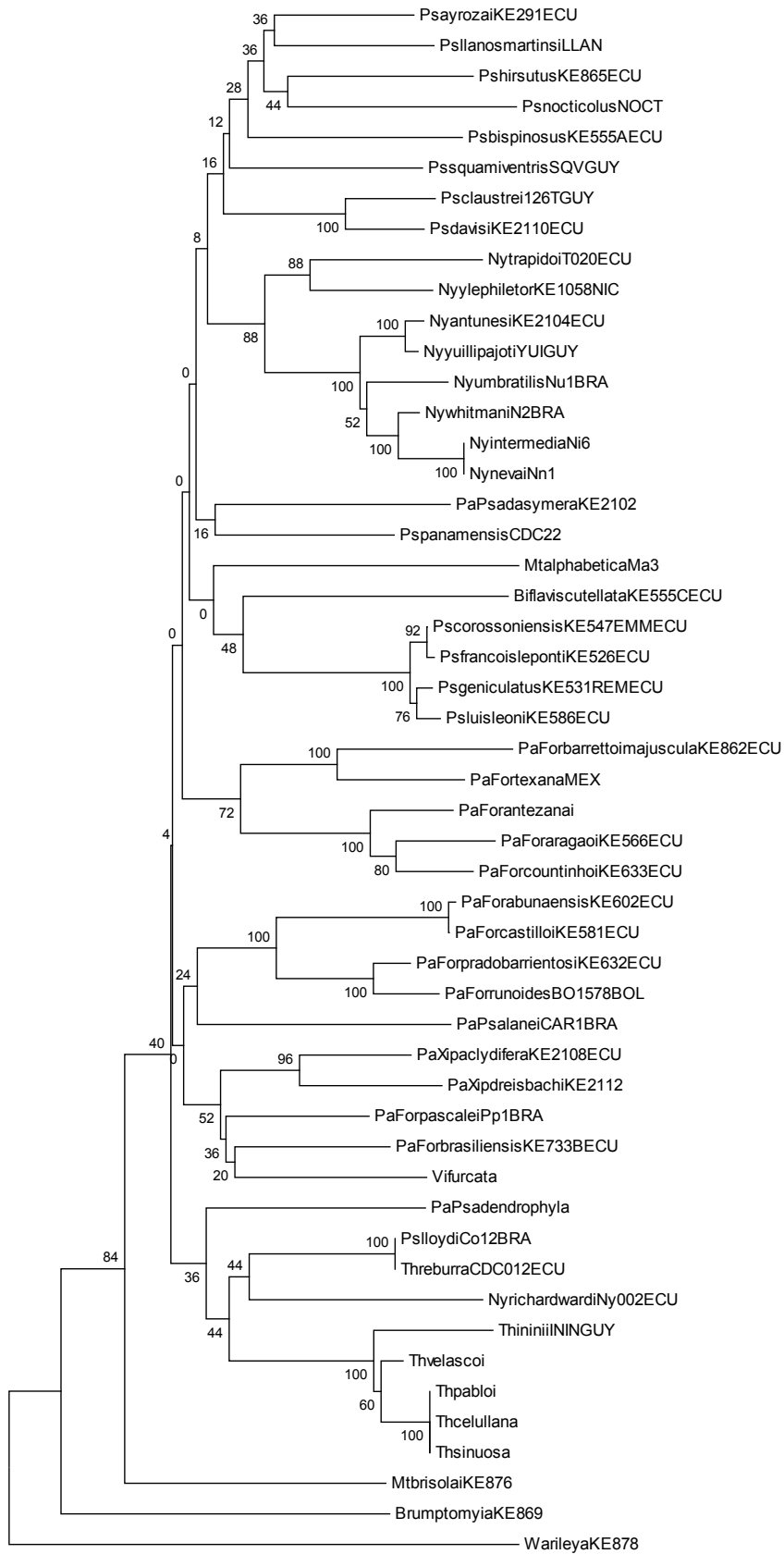


Figure 4: Neighbor-Joining tree based on the on the sequences of cyt B of mtDNA. Bootstrap values (1000 replicates) are indicated on the nodes.

Table 1: List of specimens analyzed in this study, country and locality of collection and GenBank sequences accession

Genus	Subgenus	Serie	Species	Country	sex	specimen	rDNA (D1-D2)	DNA mt Cyt b	
<i>Psathyromyia</i>	<i>Foratiniella</i>		<i>abunaensis</i>	Equateur	♂	KE664			
			<i>antezanai</i>	Equateur	♂	ANTE			
			<i>aragaoi</i>	Equateur	♂	KE566			
			<i>barretoii majuscula</i>	Equateur	♂	KE862			
			<i>brasiliensis</i>	Bolivie	♂	KE733B			
			<i>castilloi</i>	Equateur	♂	KE581			
			<i>coutinhoi</i>	Equateur	♂	KE633			
			<i>pascalei</i>	Bresil	♀	Pp1			
			<i>pradobarientosi</i>	Equateur	♂	KE632			
			<i>runoides</i>	Bolivie	♂	BO1578			
		<i>texana</i>	Mexico	♂	TEXA				
		<i>Xiphomyia</i>		<i>aclydifera</i>	Equateur	♂	KE2108		
				<i>dreisbachi</i>	Equateur	♂	KE2112		
	<i>Psathyromyia</i>		<i>lanei</i>	Bresil	♂	CAR1			
		<i>shannoni</i>	<i>dasymera</i>	Equateur	♂	KE2102			
			<i>dendrophylla</i>	Bolivie		DEN			
<i>Viannamyia</i>			<i>furcata</i>	Guyane Française	♂	FUR			
<i>Martinsmyia</i>	<i>alphabetica</i>		<i>alphabetica</i>	Bresil	♀	Ma1			
			<i>brisolai</i>	Bolivie	♂	KE875			
<i>Bichromomyia</i>			<i>flaviscutellata</i>	Equateur	♂	KE555C			
<i>Psychodopygus</i>	<i>arthuri</i>		<i>lloydi</i>	Bresil	♂	Co12			
			<i>davisi</i>	Guyane Française		CLAU			
		<i>davisi</i>		<i>davisi</i>	Equateur	♂	KE2110		
			<i>panamensis</i>	<i>ayrozai</i>	Equateur	♀	KE291		
			<i>hirsutus</i>	Equateur	♂	HIR			
			<i>llanosmartinsi</i>	Bolivie	♂	LLAN			
			<i>nocticola</i>	Bolivie	♂	NOC			
			<i>panamensis</i>	Equateur	♀	CDC022			
		<i>guyanensis</i>		<i>corossoniensis</i>	Equateur	♂	KE639		
				<i>francoisleponti</i>	Equateur	♂	KE637		
				<i>geniculatus</i>	Equateur	♂	KE531REM		
				<i>luisleoni</i>	Equateur	♂	KE605		
		<i>chagasi</i>		<i>squamiventris</i>	Guyane Française		SQV		
		<i>bispinosus</i>		<i>bispinosus</i>	Equateur	♂	KE555A		
	<i>Nyssomyia</i>			<i>antunesi</i>	Equateur	♂	KE2104		
			<i>intermedia</i>	Bresil	♂	Ni6			
			<i>neivai</i>	Bresil	♂	Nn1			
			<i>richardwardi</i>	Equateur	♂	Ny001			
			<i>trapidoi</i>	Equateur	♀	T020			
			<i>umbratilis</i>	Bresil	♀	Nu5			
			<i>whitmani</i>	Bresil	♂	N2			
			<i>ylephiletor</i>	Nicaragua	♂	KE1058			
			<i>yuilli yuilli</i>	Guyane Française	♂	YUI			
<i>Trichophoromyia</i>			<i>inirii</i>	Guyane Française	♂	ININ			
			<i>cellulana</i>	Equateur	♂	CELU			
			<i>pabloi</i>	Equateur	♂	PABLO			
			<i>reburra</i>	Equateur	♀	CDC012			
			<i>simuosa</i>	Equateur	♂	SINUO			
			<i>velascoi</i>	Equateur	♂	VELAS			
<i>Brumptomyia</i>			<i>sp.</i>	Equateur	♀	KE 869			
<i>Warileya</i>			<i>rotundipennis</i>	Bolivie	♀	KE 878			

4.2 Article N° 2:

Titre: Morphometric and molecular characterization of the Series Guyanensis (Diptera, Psychodidae, *Psychodopygus*) from the Equateurian Amazon Basin with description of a new species.

Auteurs : Zapata S, León R, Sauvage F, Augot D, Trueba G, Cruaud C, Couloux A, Teran R, Depaquit J.

Publié dans: Journal of Infection Genetics of Evolution 2012; 12(5):966-77.



Morphometric and molecular characterization of the series Guyanensis (Diptera, Psychodidae, *Psychodopygus*) from the Ecuadorian Amazon Basin with description of a new species

S. Zapata^{a,b}, R. León^b, F. Sauvage^c, D. Augot^a, G. Trueba^b, C. Cruaud^d, A. Couloux^d, R. Terán^b, J. Depaquit^{a,*}

^a Université de Reims Champagne-Ardenne, ANSES, EA4688, USC «Transmission vectorielle et épidémiologie de maladies parasitaires» (VECPAR), France

^b Microbiology Institute, Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador

^c Université Lyon 1, CNRS, UMR5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622 Villeurbanne, France

^d Genoscope, Centre National de Séquençage, 2 rue Gaston Crémieux, CP5706, 91057 Evry Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 October 2011

Received in revised form 31 January 2012

Accepted 15 February 2012

Available online 22 February 2012

Keywords:

Morphometrics

Common principal component analysis

Linear discriminant analysis

DNA barcoding

Sympatry

New species

ABSTRACT

Several populations of the series Guyanensis (Diptera, Psychodidae, *Psychodopygus*) were collected from the Yasuni National Park in the Ecuadorian Amazon region. The specimens comprised the species *Psychodopygus geniculatus*, *Psychodopygus luisleoni* and *Psychodopygus corrossoniensis*. Within *Ps. geniculatus*, we observed two populations, one with a narrow paramere and relatively short genital filaments and the other characterized by a wider coxite and longer genital filaments. A multiple approach combining morphology, morphometry and DNA sequencing of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) and the mitochondrial cytochrome *b* gene was carried out. Morphological, morphometric and molecular data strongly suggested the presence of two populations within *Ps. geniculatus*. The lack of intermediate forms within these populations supported the proposal of two sympatric species. This report describes *Psychodopygus francoisleponti* n. sp.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The subgenus *Psychodopygus* Mangabeira, 1941 has been reclassified several times since its original description. *Psychodopygus* was recognized as a new genus in the seventies based on comparative analysis of its main traits, which differed from those of other New World sand flies (Ready et al., 1980; Fraiha and Ward, 1974). Other taxonomists (Young and Duncan, 1994), however, maintained it as a subgenus within the genus *Lutzomyia* França and Parrot, 1924.

Based on morphological and phylogenetic data, Galati (1995, 2010) proposed the reclassification of *Psychodopygus* as a genus within the subtribe Psychodopygina. According to this new classification, the genus *Psychodopygus* would include six series (Arthuri, Davisi, Panamensis, Guyanensis, Chagasi and Bispinosus) and 28 species.

The series Guyanensis was created by Barretto (1962) and currently includes six species: *Psychodopygus guyanensis* (Floch and Abonnenc, 1941), *Psychodopygus geniculatus* (Mangabeira, 1941), *Psychodopygus lainsoni* (Fraiha and Ward, 1974), *Psychodopygus corrossoniensis* (Le Pont and Pajot, 1978), *Psychodopygus dorlinsis* (Le Pont and Desjeux, 1982) and *Psychodopygus luisleoni* (León et al., 2009). This series is characterized by the absence of anepimeral setae and a style with one large terminal spine and three atrophied subapical spines. While males are identified by morphological differences in the paramere, females are morphologically indistinguishable (Young and Duncan, 1994; León et al., 2009; Galati, 2010).

Within this series, *Ps. guyanensis* (type-species) has barely been studied. Its original description was based on a single female from French Guyana lacking informative features. *Ps. lainsoni* is easily distinguished from the other members of the series because of the distinct morphology of its complex paramere. In contrast, *Ps. geniculatus*, *Ps. corrossoniensis* and *Ps. luisleoni* are morphologically very similar (Young and Duncan, 1994; Galati, 2010), thus hindering identification.

Currently developed molecular markers have proven useful in distinguishing between closely related species. The most commonly used have been mitochondrial DNA (mtDNA) markers such

* Corresponding author. Address: Faculté de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, ANSES, EA4688, USC «VECPAR», 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France. Tel.: +33 326913723; fax: +33 326913552.

E-mail address: jerome.depaquit@univ-reims.fr (J. Depaquit).
URLs: <http://www.genoscope.fr> (C. Cruaud), <http://www.genoscope.fr> (A. Couloux).

as cytochrome *b* (Esseghir et al., 1997; Torgerson et al., 2003; Franco et al., 2010) and cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) (Arrivillaga et al., 2002; Boudabous et al., 2008; Cohnstaedt et al., 2011), and nuclear ribosomal DNA (rDNA) such as the second internal transcribed spacer (ITS2) (Depaquit et al., 2000, 2008; Khalid et al., 2010). In closely related species of Phlebotomine, mitochondrial introgression may occur (Marcondes et al., 1997; Testa et al., 2002; Pesson et al., 2004), and nuclear genes such as ITS2 provide useful information for distinguishing between them.

Recent entomological sand fly collection at the Tiputini Biodiversity Station in Yasuní National Park found three species belonging to the series Guyanensis (*Ps. geniculatus*, *Ps. corossoniensis* and *Ps. luisleoni*), among others. Morphological analysis of the *Ps. geniculatus* specimens showed variation in the coxite of the male genitalia suggesting the presence of two different populations and an incipient speciation process. In this study, we further investigated these initial observations using morphometric and molecular analysis through the ITS2 and cytochrome *b* molecular markers. The current study provides evidence of a recent process of speciation and the presence of a new *Psychodopygus* species closely related to *Ps. geniculatus* sensu stricto.

2. Materials and methods

2.1. Sand fly collection

Sand flies were captured at the Tiputini Biodiversity Station (TBS) 00°37'05" S, 76°10'19", Yasuní National Park, Ecuador. CDC miniature light traps were baited with and without carbon dioxide source (Insectagator® sachets) and left overnight in primary and secondary forests. Entomological samples were collected early the following morning and sand flies were separated and stored in 96% ethanol. Species identification was carried out based on morphology (shape of the female's spermathecae and

male genitalia) using taxonomical keys published by Young and Duncan (1994). Voucher specimens are kept at the Medical Entomology Laboratory, Universidad San Francisco de Quito (USFQ). The last abdominal segments, head and wing were separated and mounted after clarification (KOH 10%, H₂O then Marc-André) and dehydrated between slide and cover slip in Euparal for later identification, whereas the rest of the bodies were stored individually in 96% ethanol for the molecular analyses.

2.2. Molecular analysis

DNA was extracted using QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) as described previously by Depaquit et al. (2008). Polymerase chain reactions (PCR) for ITS2 and cytochrome *b* genes were performed in a 50 µL volume using 5 µL of DNA solution and 50 pmol of primers C1A (5'-CCT GCT TAG TTT CTT TTC CTC CGC T-3') and JTS3 (5'-CGC AGC TAA CTG TGT GAA ATC-3') for ITS2 (Depaquit et al., 2002) and C3B-PDR (5'-CAY ATT CAA CCW GAA TGA TA-3') and NIN-PDR (5'-GGT AYW TTG CCT CGA WTT CGW TAT GA-3') for cytochrome *b* (Esseghir et al., 1997). Amplification conditions for ITS 2 were as follows: after an initial denaturation step at 94 °C for 3 min, 40 amplification cycles were performed (94 °C for 30 s, 56 °C for 45 s, 68 °C for 60 s) and a final extension at 68 °C for 10 min. For cytochrome *b*, the initial denaturation step at 94 °C for 3 min was followed by 5 cycles (94 °C for 30 s, 40 °C for 30 s, 68 °C for 60 s) then 35 cycles (94 °C for 30 s, 44 °C for 30 s, 68 °C for 60 s) and a final extension at 68 °C for 10 min. Amplicons were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gel stained with 0.1% ethidium bromide.

PCR products were directly sequenced in both directions by the National Center of Sequencing (Genoscope, France). Some ITS2 products were cloned into pDrive Cloning Vector using the QIAGEN® PCR Cloning kit (Qiagen, Germany) according to

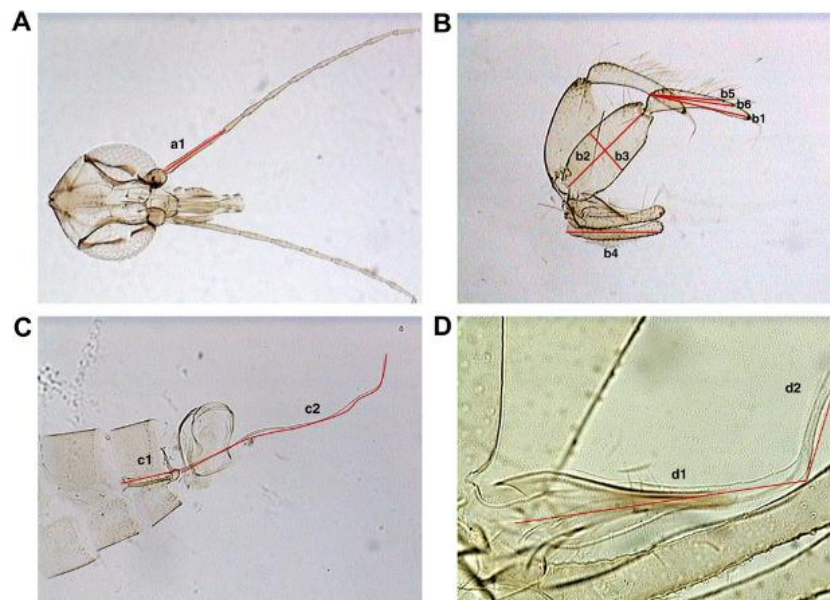


Fig. 1. Morphometric characters used to characterize *Psychodopygus* of the serie Guyanensis. (A) Head: (a1) third antennal segment (AIII) length, (B) terminal genitalia: (b1) style length, (b2) coxite length, (b3) coxite width, (b4) lateral lobe length, (b5) insertion of the first spine in the style, (b6) insertion of the second spine in the style. (C) Anterior genitalia: (c1) genital pump length, (c2) genital filaments length, (D) paramere: (d1 + d2) paramere total length, (d2) distal part of the paramere length.

manufacturer's instructions, and were sequenced with universal primers M13rev and M13uni by Eurofins-Operon Company.

2.3. Sequences analysis

The sequences were corrected using Pregap and Gap softwares included in the Staden Package (Bonfield and Staden, 1996). Sequence alignments were done utilizing ClustalW software (Thompson et al., 1994). Maximum likelihood (ML) analysis was performed using PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010) using the substitution model HKY85. Neighbour-Joining analysis was performed using MEGA version 4.0 software (Kumar et al., 2004) with the Kimura-2 parameter model and using uniform rates among sites. Gaps were treated as missing data. Node support was assessed by bootstrapping over 1000 replications.

2.4. Morphometric protocol

All the specimens were measured prior to molecular analysis. Specimens were observed utilizing a BX50 microscope (Olympus, Japan). Measurements were performed using the Perfect Image software (Aries Company, Chatillon, France) and a video camera connected to the microscope. Morphometric measurements were taken on genitalia of individual male sand flies. A total of 13 variables were recorded in *Psychodopygus* of the series *Guyanensis* adult males: (1) **AIII**; (2) **style length**; (3) **coxite length**, (4) **coxite width**; (5) **genital pump length**; (6) **genital filaments length**; (7) **lateral lobe length**; (8) **paramere total length**; (9) **distal part of the paramere length**; (10) **insertion of the first spine**, (11) **insertion of the second spine**; (12) **distance between internal spines** and (13) **number of clypeal setae**. Three additional variables were

Table 1

Specimens collected at Yasuni National Park, females were tentatively assigned to species based on ITS2 and cytochrome *b* sequences homology.

Species	Authors	Locality	Catching method	Sex	Number of specimens	Code of specimen	Molecular analysis	GenBank accession number ITS2 Cyt b
<i>Ps. geniculatus</i>	Mangabeira (1941)	Tiputini	Light trap with CO ₂	Female*	1	KE 290R	Yes	JN19417 JN674411
				Male	26	KE 527	No	
				Male		KE 531REM	No	
				Male		KE 559B	No	
				Male		KE 559A	No	
				Male		KE 572WWT	No	
				Male		KE 572PORC	No	
				Male		KE 577	No	
				Male		KE 578	No	
				Male		KE 580	No	
				Male		KE 592	No	
				Male		KE 593	No	
				Male		KE 594	Yes	JN193413 JN674430
				Male		KE 595	Yes	JN193409 JN674422
				Male		KE 604	No	
				Male		KE 606	No	
				Male		KE 607	Yes	JN193411 JN674423
				Male		KE 610	Yes	JN193414 JN674431
				Male		KE 612	No	
				Male		KE 613	No	
				Male		KE 615	Yes	JN193408 JN674432
				Male		KE 618	Yes	JN193415 JN674421
				Male		KE 621	No	
				Male		KE 627	Yes	JN193407 JN674436
				Male		KE 628	Yes	JN193410 JN674433
				Male		KE 634	Yes	JN193412 JN674434
Male		KE 636	Yes	JN193416 JN674435				
<i>Ps. corrossiensis</i>	Le Pont and Pajot (1978)	Tiputini	Light trap with CO ₂	Male	7	KE 429	No	
				Male		KE 430	No	
				Male		KE 531	No	
				Male		KE 547EMN	Yes	JN193396 JN674427
				Male		KE 555B	Yes	JN193398 JN674428
				Male		KE 639	Yes	JN193397 JN674429
				Male		KE 655	No	
<i>Ps. luisleoni</i>	León et al. (2009)	Tiputini	Light trap with CO ₂	Male	8	KE 423	No	
				Male		KE 428	No	
				Male		KE 472	No	
				Male		KE 585	Yes	JN193395 JN674425
				Male		KE 586	Yes	JN193394 JN674426
				Male		KE 603	No	
				Male		KE 605	Yes	JN193393 JN674424
				Male		KE 679	No	
<i>Ps. francoisleponti</i>	n.sp.	Tiputini	Light trap with CO ₂	Female*	1	KE 288R	Yes	JN193418 JN674410
				Male	11	KE 526	No	
				Male		KE 608	Yes	JN193400 JN674412
				Male		KE 620	Yes	JN193402 JN674413
				Male		KE 629	No	
				Male		KE 630	Yes	JN193403 JN674414
				Male		KE 631	Yes	JN208879 JN674415
				Male		KE 637	Yes	JN193404 JN674420
				Male		KE 638	Yes	JN193399 JN674416
				Male		KE 645	Yes	JN193406 JN674417
				Male		KE 654	Yes	JN193401 JN674418
Male		KE 656	Yes	JN193405 JN674419				

Table 2

Comparative morphometrics measurements (in μm) and ratios of *Psychodopygus* of the serie Guyanensis. (n) represents the number of specimens measured and SD represents standard deviation.

Character measured	<i>Ps. corosoniensis</i> (n = 7)		<i>Ps. luisleoni</i> (n = 7)		<i>Ps. geniculatus</i> (n = 26)		<i>Ps. francoisleponti</i> n.sp. (n = 11)	
	Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD	Range
AllI length	229 \pm 6.91	(218–236)	203 \pm 18.01	(190–216)	222 \pm 16.17	(198–255)	233 \pm 9.61	(222–251)
Number of clypeal setae	17 \pm 3.06	(12–21)	16 \pm 1.00	(15–18)	16 \pm 1.39	(13–18)	15 \pm 2.19	(12–18)
Style length	368 \pm 14.53	(349–387)	227 \pm 11.31	(209–242)	319 \pm 11.57	(296–335)	299 \pm 6.92	(292–316)
Coxite length	409 \pm 13.02	(383–424)	283 \pm 11.02	(268–302)	370 \pm 10.17	(349–394)	327 \pm 10.06	(309–347)
Coxite width	176 \pm 9.28	(165–188)	97 \pm 9.74	(81–113)	95 \pm 6.49	(73–105)	144 \pm 11.22	(118–157)
(Coxite length/width) ratio	2.33 \pm 0.16	(2.17–2.55)	2.94 \pm 0.25	(2.55–3.29)	3.90 \pm 0.29	(3.57–4.97)	2.29 \pm 0.21	(2.03–2.82)
Genital pump length	194 \pm 14.93	(169–210)	191 \pm 9.97	(171–201)	186 \pm 7.36	(169–196)	187 \pm 7.62	(176–198)
Genital filaments length	713 \pm 59.13	(656–794)	729 \pm 22.65	(704–769)	645 \pm 28.58	(581–696)	768 \pm 29.33	(715–815)
Lateral lobe length	308 \pm 6.17	(296–315)	226 \pm 5.80	(216–232)	274 \pm 6.82	(259–286)	281 \pm 7.79	(268–293)
Paramere total length	311 \pm 42.75	(218–344)	211.50 \pm 16.31	(185–236)	246 \pm 35.53	(192–290)	231 \pm 37.43	(182–289)
Distal part of the paramere length	n/a	n/a	65 \pm 6.65	(57–75)	76 \pm 5.12	(66–85)	88 \pm 5.04	(77–94)
Insertion of the first setae in the style	284 \pm 8.30	(272–295)	158 \pm 9.38	(143–171)	239 \pm 14.12	(204–261)	211 \pm 9.33	(199–231)
Insertion of the second setae in the style	315 \pm 9.18	(305–327)	192 \pm 10.57	(175–208)	266 \pm 11.89	(242–288)	244 \pm 6.88	(233–255)
(Insertion first setae/style length) ratio	0.78 \pm 0.03	(0.73–0.83)	0.70 \pm 0.03	(0.68–0.76)	0.75 \pm 0.02	(0.68–0.79)	0.71 \pm 0.02	(0.68–0.74)
Internal setae distance	31 \pm 7.34	(22–45)	34 \pm 3.94	(29–41)	28 \pm 4.22	(19–38)	33 \pm 5.09	(24–41)
(Internal setae distance/style length) ratio	0.09 \pm 0.02	(0.06–0.12)	0.15 \pm 0.01	(0.13–0.17)	0.09 \pm 0.02	(0.06–0.13)	0.11 \pm 0.02	(0.08–0.14)

Table 3

Characterization of four members of the series Guyanensis (*Ps. corosoniensis*, *Ps. luisleoni*, *Ps. geniculatus* and *Ps. francoisleponti* n.sp.) using the results of values of the coefficients of variation (CV) on 13 morphometrics parameters.

Parameter (maximum measurements)	Coefficients of variation (CV)			
	<i>Ps. corosoniensis</i>	<i>Ps. luisleoni</i>	<i>Ps. geniculatus</i>	<i>Ps. francoisleponti</i> n.sp.
AllI length	2.76	6.28	7.05	3.83
Number of clypeal setae	16.64	5.79	8.6	13.93
Style length	3.66	4.61	3.55	2.21
Coxite length	2.95	3.61	2.7	2.93
Coxite width	4.89	9.32	6.68	7.43
Genital pump length	6.9	4.83	3.88	3.86
Genital filaments length	7.41	2.88	4.34	3.64
Lateral lobe length	1.86	2.37	2.44	2.64
Paramere total length	12.74	7.14	14.17	15.44
Distal part of the paramere length	NA	9.52	6.6	5.47
Insertion of the first setae	2.71	5.49	5.8	4.22
Insertion of the second setae	2.7	5.09	4.37	5.09
Internal setae distance	21.75	10.72	14.83	14.78

Table 4

Characterization of allometry in two *Psychodopygus* (gn: *geniculatus*, fr: *francoisleponti* n.sp.) species using the Principal Component Analyses (PCA) and Common Principal Analysis (CPCA) on 9 morphometrical parameters.

	Principal component analyses		CPCA
	FP1 gn	FP1 fr	CPC1
Style length	–0.106	–0.060	–0.180
Coxite length	–0.090	0.035	–0.111
Coxite width	0.040	–0.255	0.061
Genital filaments length	–0.033	–0.163	–0.120
Lateral lobe length	–0.034	–0.050	–0.057
Distal part of paramere length	–0.197	–0.113	–0.271
Insertion of the first setae	–0.277	–0.194	–0.373
Insertion of the second setae	–0.151	–0.051	–0.241
Internal setae distance	0.916	0.921	0.814

calculated as ratios of these measures: **coxite length/width**; **first spine/style length** and distance between internal setae/style length (**dist. int. spines/style length**) (Fig. 1).

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R 2.14.1 (R Development Core Team, 2011) and CPC software by Patrick Phillips (1994–97).

Measurements of each assessed variable were evaluated using the coefficient of variation (CV) according to Augot et al. (2010). Due to the low number of specimens for *Ps. corosoniensis* and

Table 5

Linear Discriminant Analysis (LDA) on 9 morphometrical parameters, on growth-invariant data (corrected by the CPC1 vector). LDA axis gives the cosines between the variables and the canonical scores.

	LDA axis
Style length	0.454
Coxite length	0.883
Coxite width	–0.942
Genital filaments length	–0.927
Lateral lobe length	–0.588
Distal part of paramere length	–0.857
Insertion of the first setae	0.579
Insertion of the second setae	0.500
Internal setae distance	–0.092

Ps. luisleoni (7 individuals each) and for the *Ps. dorlinsii* holotype, these were only included for morphological comparisons but not in the morphometric analysis. Because of alterations of male appendices or incorrect appendix position after mounting, measurements were not taken from all individuals. Only data from the new species *Psychodopygus francoisleponti* and from *Ps. geniculatus* were considered for multivariate morphometric analyses. To perform the multivariate analyses, missing values were replaced with the averages from informative measurements (for further details, see Augot et al., 2010).

The morphometric analysis between species followed the approach presented by Klingenberg (1996). Raw data were

log-transformed. In a first step, species-specific PCA was performed for both groups (individuals from *Ps. francoisleponti* n.sp. and *Ps. geniculatus*) to explore the specific allometric structure. A common allometric pattern was then examined according to Flury's common principal component analysis (CPCA) method (1988) to compare covariance matrices. This second step aimed to procure "size-free" matrices allowing shape comparison between both species, since the first common principal component (CPC1) is interpreted as an allometric pattern shared by all groups (i.e., species, in this case). The CPCs were computed using Patrick Phillips' CPC software to compare covariance matrices using Flury's hierarchy of tests. Lastly, a linear discriminant analysis (LDA) was applied to the growth-invariant data, i.e., the log-transformed raw data corrected by the CPC1 as growth vector, to identify which variables best discriminate between the two species. New data matrices were obtained as $X_i(1-bb')$, where the CPC1 vector has a norm equal to one; X_i is the log-transformed initial raw-data matrix of group i ; I is the identity matrix of rank p (p being the number of variables); b is the growth vector (the CPC1 here); and b' is the transposed vector b (Klingenberg, 1996).

We lack data, however, to run accurate bootstraps that allow computing standard errors of the principal component coefficients.

3. Results

Collection of entomological specimens between July 2004 and August 2010 in the northwestern Amazon region of Ecuador revealed the presence of three sympatric species of the series Guyanensis. Morphological examination of males of *Ps. geniculatus* showed variations in coxite shape and size, hinting at the existence of a new species described in this report as *Ps. francoisleponti* n. sp.

3.1. Morphometric analysis

Individuals belonging to the series Guyanensis (Table 1) were identified as follows: 7 *Ps. corrossoniensis*, 7 *Ps. luisleoni*, 26 *Ps. geniculatus* and 11 *Ps. francoisleponti* n. sp.

3.1.1. Descriptive statistics

CV values ranged from 1.86 (lateral lobe length) to 21.75 (internal setae distance). Incidentally, both values corresponded to *Ps. corrossoniensis* with a weighted average of 6.45. The means, standard deviation (SD) and 95% confidence intervals (CI) are presented in Table 2. Boxplot examination focusing on the new species revealed that several variables appeared to contain little

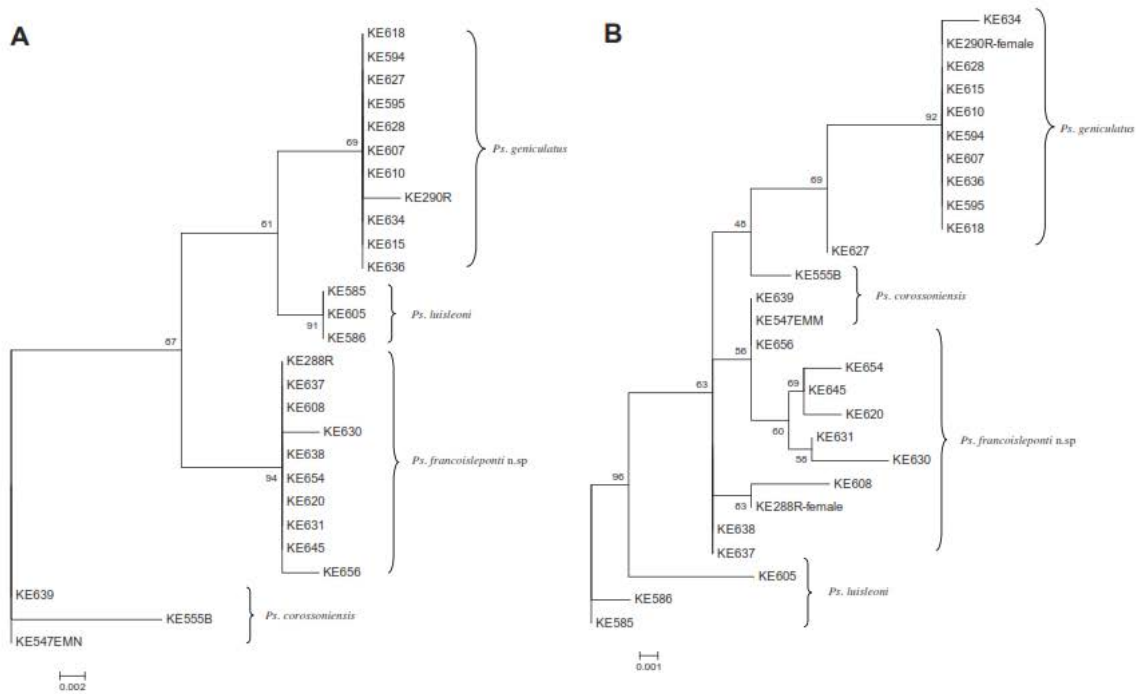


Fig. 3. Maximum likelihood trees obtained from nucleotide analysis of: (A) ITS2 rDNA and (B) cytochrome *b* mtDNA sequences of the 4 species of *Psychodopygus* of the series Guyanensis. Bootstrap values are shown in nodes (500 replicates).

Table 6
Pairwise distances between species based on ITS2 sequences (%).

	<i>Ps. luisleoni</i>	<i>Ps. corrossoniensis</i>	<i>Ps. francoisleponti</i> n. sp.	<i>Ps. geniculatus</i>	Pairwise distance within species
<i>Ps. luisleoni</i>					0.2
<i>Ps. corrossoniensis</i>	3.7				1.1
<i>Ps. francoisleponti</i> n. sp.	3.8	5.3			0.8
<i>Ps. geniculatus</i>	2.1	3.3	4.4		0.5

discriminant information, especially for distinguishing *Ps. geniculatus* from *Ps. francoisleponti* n. sp. **AIII, genital pump length, paramere total length and number of clypeal setae** were thus removed from the subsequent multivariate analyses. CV values for each character are shown in Table 3.

3.1.2. Principal component analysis

We studied size differences through PCA of log-transformed raw data. In a first step, an independent PCA was performed for each species (*Ps. geniculatus* and *Ps. francoisleponti* n. sp.). The first principal factor (FP1) is quite typical for static allometry (Cuzin-Roudy and Laval, 1975); Table 4 shows the coefficients obtained for each species. These values do not conform to overall isometry, where all coefficients would be equal to $1/3$ ($n_{variables}^{-0.5} = 9^{-0.5}$). The first axes accounted respectively for 61% and 69% of overall variance in *Ps. geniculatus* and *Ps. francoisleponti* n. sp. samples.

Table 4 shows that some coefficients presented very similar values for both species (e.g., **insertion of the first spine, or distance between internal spines**), while others differ considerably (e.g., **coxite width** coefficients). As an overall measure of these differences, Klingenberg (1996) proposed computing the angle between FC1 of both species, which reached 22° in our case. This value is not

low, but the CPC software tests, AIC and the jump-up approach validated the use of the two-CPC model from our species covariance matrices.

The first common principal component (CPC1) is presented in Table 4 and is a compromise between both FP1 vectors. The associated first eigenvalue accounted for 59% of the total variance in the *Ps. geniculatus* sample and 55% in the *Ps. francoisleponti* n. sp. sample (61% and 69% for the specific PCA, respectively). The growth-invariant data were computed as detailed in Section 2.5 and an LDA was performed on the resulting data.

3.1.3. Discriminant analysis

LDA was performed on growth-invariant data. Since only two species remained in the analysis, the resulting space is an axis that best discriminates between the two. The proportion of interclass variance is 96.8% (Wilk's Lambda = 0.032, $F = 105.73$, $df = (8, 28)$, $p < 10^{-4}$).

The LDA axis mainly correlates with **coxite width, genital filament length, coxite length and distal paramere length** (Table 5). *Ps. francoisleponti* n.sp. individuals projected at negative coordinates on the axis, while *Ps. geniculatus* individuals presented positive coordinates. These results reveal some possible

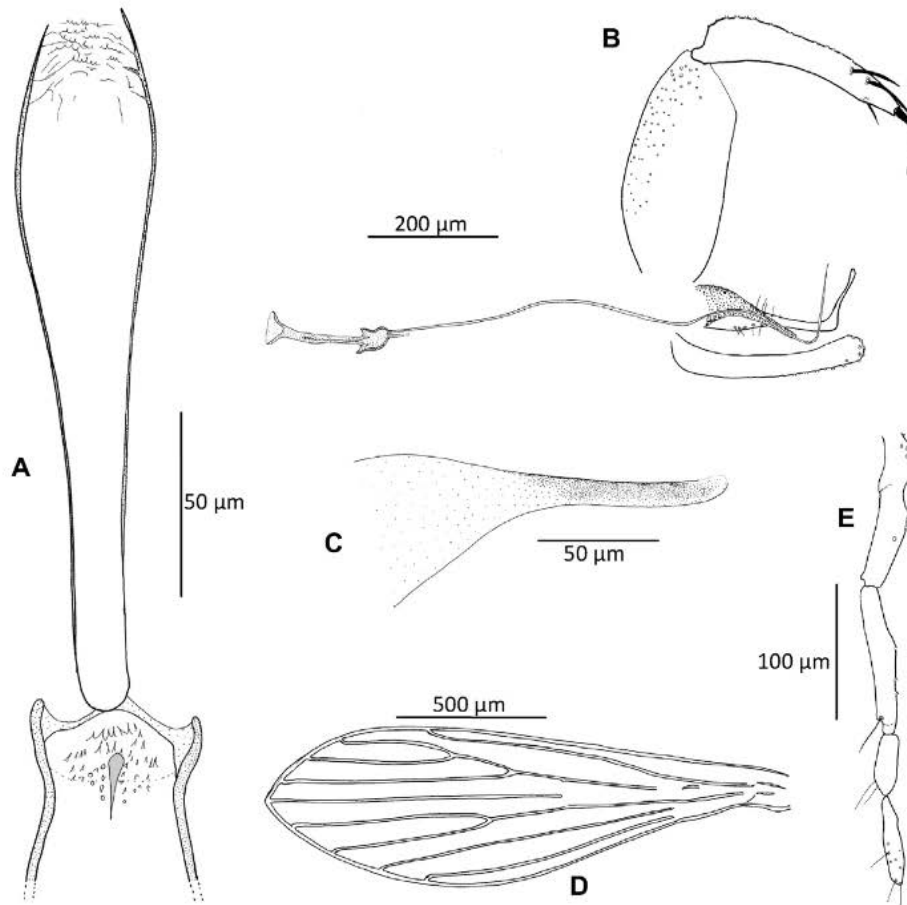


Fig. 4. *Psychodopygus francoisleponti* n. sp. All the drawings are those of male holotype (specimen KE631) except that of palp (specimen KE620). (A) pharynx and cibarium; (B) genitalia; (C) aedeagus; (D) wing; (E) palp.

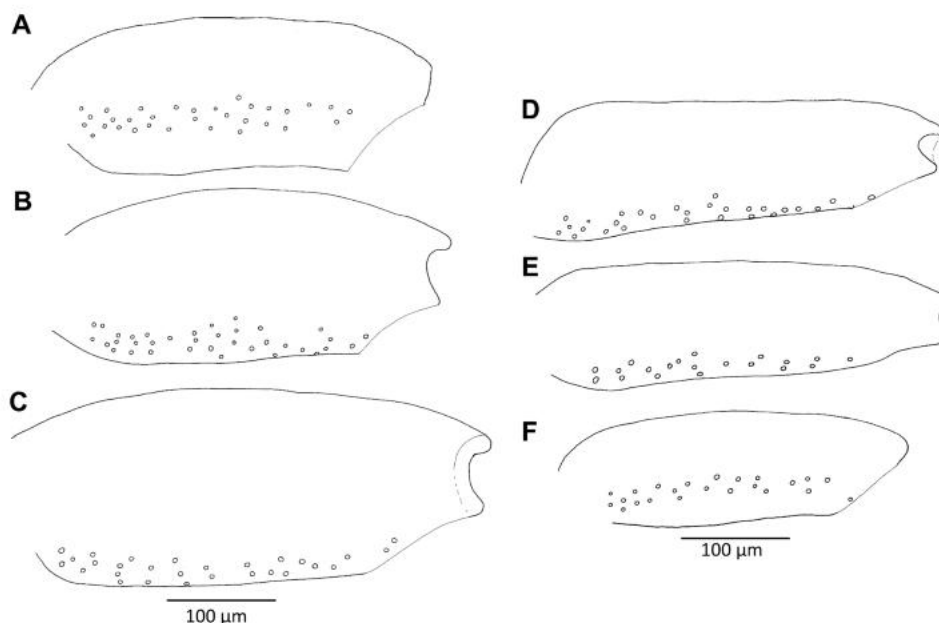


Fig. 5. Drawings of coxites of some *Psychodopygus* belonging to the serie Guyanensis: (A and B) *Psychodopygus francoisleponti* n. sp. (specimens KE656, KE630, respectively); (C) *Ps. corossoniensis* (specimen KE555B); (D) *Ps. geniculatus* (specimen KE593); (E) *Ps. dirlinsis* (holotype); (F) *Ps. luisleoni* (specimen KE585).

shape differences between both groups as well as which variables may be the best candidates to characterize individuals of these species.

3.2. Molecular analysis

Samples from 27 specimens were sequenced for both ITS2 rDNA and cytochrome *b* mtDNA as follows: 3 *Ps. corossoniensis*, 3 *Ps. luisleoni*, 10 *Ps. geniculatus*, 9 *Ps. francoisleponti* n. sp. and 2 females belonging to the series. Sequences obtained are available in GenBank under accession numbers JN193393–JN193418 and JN208879 for ITS2 and JN674410–JN674436 for cytochrome *b*.

3.2.1. Analysis of ITS2 sequences

The lengths of ITS2 segments in males were 353–354 bp for *Ps. luisleoni*, 355–357 bp for *Ps. corossoniensis*, 359–362 bp for *Ps. francoisleponti* n. sp. and 352–354 bp for *Ps. geniculatus*. Sequences in females KE288R and KE290R were 353 and 352 bp, respectively.

The alignment of ITS2 sequences showed 33 variable sites (including indels), of which 24 were parsimony-informative (Fig. 2). Nucleotide composition was similar for the four species: around 39–40% T, 12–13% C, 35–36% A and 11% G. The ML analysis clustered *Ps. francoisleponti* n. sp. ITS2 sequences together with high bootstrap support (94%) and suggested that *Ps. francoisleponti* n. sp. is the sister group of both *Ps. luisleoni* and *Ps. geniculatus*. Moreover, *Ps. luisleoni* seemed to be the sister species of *Ps. geniculatus* (Fig. 3). Both ML and NJ trees showed the same topology (data not shown).

3.2.2. Analysis of cytochrome *b* sequences

All sequences studied were 482 bp. Their alignment did not show any indels and included 19 variable sites, of which 11 were parsimony-informative (Fig. 2). The nucleotide composition was similar for the four species: about 41% T, 12% C, 38% A and 9% G.

ML analysis of cytochrome *b* sequences adequately individualizes *Ps. geniculatus*, despite the position of specimen KE627. The specimens of *Ps. luisleoni* are grouped together, whereas *Ps. francoisleponti* n.sp. are grouped with *Ps. corossoniensis* (except specimen

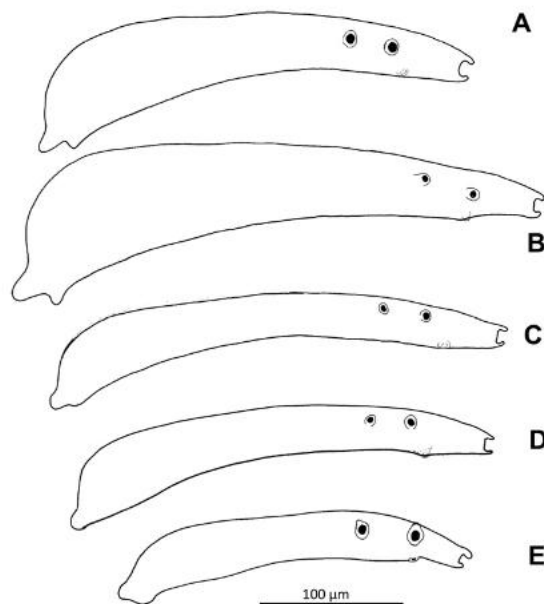


Fig. 6. Drawings of styles of some *Psychodopygus* belonging to the serie Guyanensis. (A) *Psychodopygus francoisleponti* n. sp. (specimen KE630); (B) *Ps. corossoniensis* (specimen KE555B); (C) *Ps. geniculatus* (specimen KE593); (D) *Ps. dirlinsis* (holotype); (E) *Ps. luisleoni* (specimen KE586).

KE555B). Both ML and NJ trees showed the same topology (data not shown).

4. Discussion

This report provides morphological, morphometric and molecular evidence supporting the creation of *Ps. francoisleponti* n. sp. This analysis also suggests an incipient speciation process occurring in sympatry.

We observed a discrepancy between ITS2 and cytochrome *b* trees that may have been caused by mitochondrial introgression, a phenomenon frequently described in Phlebotomine sand flies (Marcondes et al., 1997; Testa et al., 2002; Pesson et al., 2004). ITS2 sequences are less affected by mitochondrial introgression than cytochrome *b* sequences and have therefore been widely used to infer relationships between closely related species, subspecies and populations of insects, including taxa belonging to the subgenera *Phlebotomus*, *Paraphlebotomus* and *Larrousius* of the genus *Phlebotomus* (Mas-Coma and Bargues, 2009; Di Muccio et al., 2000; Depaquit et al., 2002, 2008). ITS2 data showed a high correlation with morphological and morphometric features, suggesting that ITS2 sequences are more robust markers for this taxon than mitochondrial data. This finding corroborates the risk of exclusively using mitochondrial molecular markers to infer systematic relationships.

The number of base substitutions per site from averaging over all ITS2 sequence pairs was 2.9%. The pairwise distances of ITS2 sequences among the four species described in this study were higher than those described for Old World Phlebotomine sand flies, as shown in Table 6. Pairwise distances between *Ps. luisleoni* and *Ps. corossoniensis* (3.7%) and between *Ps. corossoniensis* and *Ps. francoisleponti* n. sp. (5.3%) were higher than the distances between *P. papatasi* and *P. salehi* (1.9–2.8%), and comparable to those between *P. bergeroti* and *P. papatasi* (3–5.5%) (Depaquit et al., 2008). Nevertheless, they were lower or similar to those found between species

belonging to the subgenus *Larrousius*, where the distance between two closely related taxa *P. perniciosus* and *P. longicuspis* was 4.5% (Di Muccio et al., 2000). Additionally, there were few intraspecific variations in ITS2 sequences in individuals processed in the present study: less than 1% for all the species except for *Ps. corossoniensis* (Table 6). These results are comparable to those of Di Muccio et al. (2000) and Depaquit et al. (2000, 2002, 2008), having also found less than 1% intraspecific variability within members of Old World sand fly subgenera. Higher intraspecific variation may indicate that the speciation process of *Ps. corossoniensis* pre-dated those of the other species described in this report.

Interestingly, the four species, *Ps. luisleoni*, *Ps. corossoniensis*, *Ps. geniculatus* and *Ps. francoisleponti* n. sp., coexist in sympatry, which is a very unusual occurrence in sand flies.

The diagnostic value of morphometric variables in males confirmed the molecular typing using the ITS2 DNA sequences. Our results showed that coxite length and width were the most reliable morphological variables for differentiation of *Ps. luisleoni* from the other closely related species. Other variables such as style length, genital filament length, insertion of the spines of the style, AIII and coxite length/width ratio were useful in distinguishing *Ps. francoisleponti* n. sp. from the related species *Ps. geniculatus*.

Some of the data presented in this manuscript stemmed from a small number of specimens (*Ps. luisleoni* and *Ps. corossoniensis*) and it will therefore be necessary to collect a larger number of individuals to include these species in further analyses.

4.1. Description of *Ps. francoisleponti* n. sp. Zapata, Depaquit and León

The authors Zapata, Depaquit and León are responsible for satisfying the criteria of availability of the name *Ps. francoisleponti* and should be cited as the sole authority of these taxa, according to the Article 50(1) of the International Code of Zoological Nomenclature, 4th edition, 2000.

(1^o) Description of the male of *Ps. francoisleponti* n. sp. (Fig. 4).

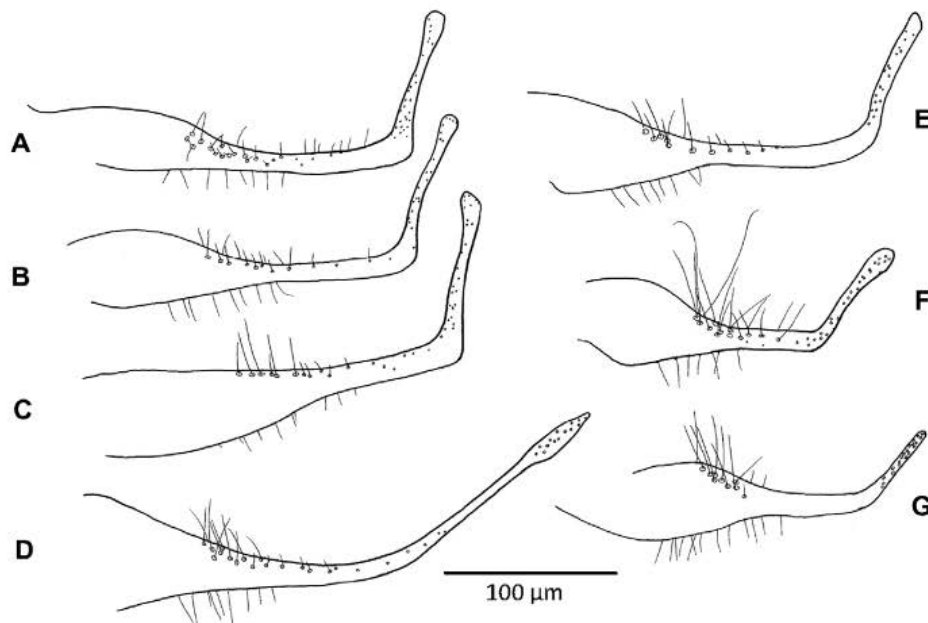


Fig. 7. Drawings of parameres of some *Psychodopygus* belonging to the serie Guyanensis: (A–C) *Psychodopygus francoisleponti* n. sp. (specimens KE656, KE526 and KE688, respectively); (D) *Ps. corossoniensis* (specimen KE555B); (E) *Ps. geniculatus* (specimen KE609); (F) *Ps. luisleoni* n. sp. (specimen KE586); (G) *Ps. dorlinsi* (holotype).

Eleven males were examined and measured.

Head:

- AIII = 222–251 μm ; AIV = 94–99 μm ; AV = 84–95 μm .
- Ascoids highly difficult to observe, despite the use of phase contrast.
- Palpal formula: 1-(4-5)-2-3.
- No Newstead's scales have been observed, despite the use of phase contrast microscope.
- Epipharynx = 177–210 μm ; AIII/labrum = 1.21.
- Clypeus: length = 74–91 μm , with 15–18 setae.

Thorax:

For all the specimens used in molecular studies, only the wing has been observed. Their measurements were: length = 1.4–1.6 mm; breadth = 0.4–0.5 mm; α = 0.4–0.5 mm, β = 0.2–0.3 mm, γ = 130–190 μm , π = 140–172 μm .

Abdomen and genitalia:

- Coxite: length = 309–347 μm ; width = 118–157 μm (Fig. 5).
- Style: length = 292–316 μm ; breadth = 35–44 μm , with 1 terminal spine and 3 atrophied sub apical spines (Fig. 6).
- Paramere simple, showing an obtuse angle similar to an ice hockey stick. Full length = 182–289 μm , distal part: 77–94 μm with presence of hairs on the superior and inferior surfaces (Fig. 7).

- Surstyle simple: length = 268–291 μm .
- Aedeagus: length = 153–168 μm , finger-like.
- Genital filaments: length = 715–815 μm .
- Genital pump: length = 176–198 μm .
- Genital filament/pump ratio: 4.5.

(2°) Description of the presumed female of *Ps. francoisleponti* n. sp. (Fig. 8). One specimen was observed and measured. The association of this female with *Ps. francoisleponti* n.sp. was based on molecular analysis (Fig. 3).

Head:

- AIII = 236 μm ; AIV = 94 μm ; AV = 86 μm .
- Long ascoids extend beyond the next articulation. Ascoid formula = 2/III-X (antennae are broken after the 10th segment).
- Palpal formula: 1-4-5-2-3.
- Newstead's scales have not been observed, despite the use of phase contrast.
- Epipharynx: = 311 μm ; AIII/E = 1.
- Clypeus: Length = 88 μm with 15 setae.
- Cibarium: Four vertical teeth and about 10 horizontal ones. Triangular pigmented patch.
- Pharynx: posterior area covered with small teeth aligned along a few lines.

Thorax: is lacking on the specimen observed according to its molecular process.

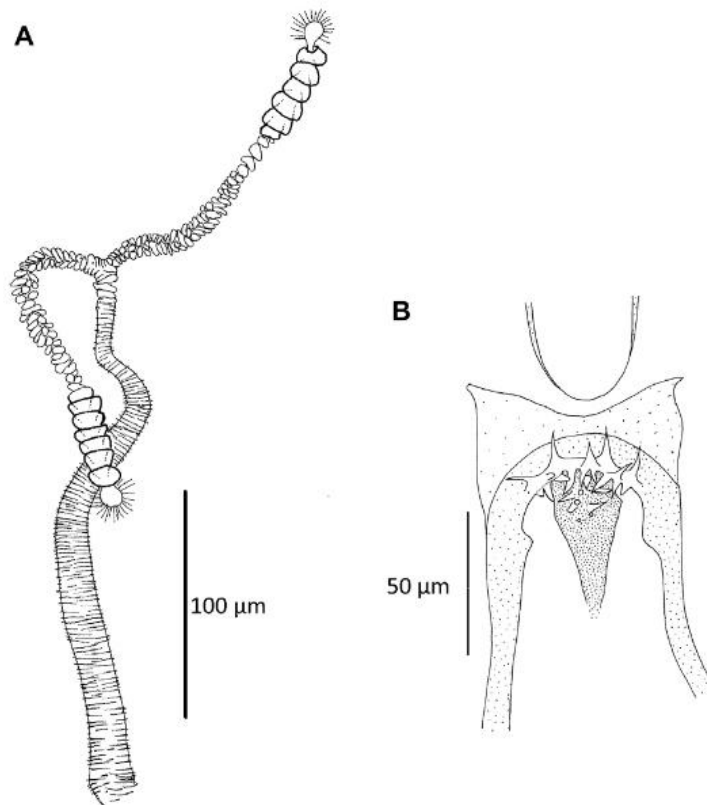


Fig. 8. *Psychodopygus francoisleponti* n. sp. female. (A) Spermathecae (specimen KE288); (B) cibarium (specimen KE288).

Genitalia:

- Spermathecae: with 6 or 7 rings.
- Common duct longer than the individual ducts and shows a striation. Length of common duct = 239 μm .
- Individual ducts: length = 99 μm , without striation, constituted by rounded elements. Length of common duct/length of individual duct ratio: 2.4.

Derivatio nominis: this species is dedicated to our colleague François Le Pont who described two species belonging to the series Guyanensis. Moreover, he collected most of the specimens analyzed in the present report during many field trips to Ecuador and observed the coxite width in this population.

Type material:

Male holotype, two male and one female paratypes have been deposited in the department of Entomology of the Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris (France).

Differential diagnosis

Ps. francoisleponti n. sp. differs from *Ps. geniculatus* by the coxite thickness and by the genital filament length. *Ps. francoisleponti* n. sp. and *Ps. corrossoniensis* share a thick coxite (Fig. 5). However they vary in paramere morphology. In *Ps. francoisleponti* n. sp. the paramere's distal extremity forms an obtuse angle while in *Ps. corrossoniensis* distal extremity is enlarged and it is gently arched upwards (Fig. 7).

Ps. luisleoni and *Ps. dirlinsis* are very similar and the size of their parameres is the only feature that allows differentiation between them. *Ps. francoisleponti* n. sp. has larger and thicker coxite than those of *Ps. dirlinsis* and *Ps. luisleoni*. Also *Ps. francoisleponti* n. sp. differs from *Ps. luisleoni* in a longer genital filament and the obtuse angle at the distal extremity of the paramere.

Acknowledgements

The authors wish to thank Eunice Aparecida Bianchi Galati and Nicole Léger for their valuable comments about this work, Hubert Ferté and Damien Jouet for their technical help, and Bernardo Gutierrez for reading this manuscript.

This work was supported by Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología (SENESCYT), and it is part of the project @ SPEED-ID "Accurate SPECIES Delimitation and Identification of eukaryotic biodiversity using DNA markers" proposed by F-BoL, the French Barcode of life initiative.

References

- Arrivillaga, J.C., Norris, D.E., Feliciangeli, M.D., Lanzaro, G.C., 2002. Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Infect. Genet. Evol.* 2, 83–95.
- Augot, D., Sauvage, F., Jouet, D., Simphal, E., Vuille, M., Couloux, A., Kaltenbach, M.L., Depaquit, J., 2010. Discrimination of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus*, potential bluetongue vectors, by morphometrical and mitochondrial cytochrome oxidase subunit I analysis. *Infect. Genet. Evol.* 10, 629–637.
- Barretto, M.P., 1962. Nova subgeneros de *Lutzomyia* França, 1924 (Psychodidae, subfamilia Phlebotominae). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 4, 91–100.
- Bonfield, J.K., Staden, R., 1996. Experiment files and their application during large scale sequencing projects. *DNA Seq.* 6, 109–117.
- Boudabous, R., Bounamous, A., Jouet, D., Depaquit, J., Augot, D., Ferté, H., Berchi, S., Couloux, A., Vuille, M., Babba, A., 2008. Mitochondrial DNA differentiation between two closely related species, *Phlebotomus* (Paraphlebotomus) *chabaudi* and *Phlebotomus* (Paraphlebotomus) *riouxi* (Diptera: Psychodidae), based on direct sequencing and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 102, 1–6.
- Cohnstaedt, L.W., Beati, L., Caceres, A.G., Ferro, C., Munstermann, L.E., 2011. Phylogenetics of the Phlebotomine Sand Fly Group Verrucarum (Diptera: Psychodidae: *Lutzomyia*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84, 913–922.
- Cuzin-Roudy, J., Laval, P., 1975. A canonical discriminant analysis of post-embryonic development in *Notonecta maculata* Fabricius (Insecta: Heteroptera). *Growth* 39, 251–280.
- Depaquit, J., Ferté, H., Léger, N., Killick-Kendrick, R., Rioux, J.A., Killick-Kendrick, M., Hanafi, H.A., Gobert, S., 2000. Molecular systematics of the phlebotomine sand flies of the subgenus *Paraphlebotomus* (Diptera, Psychodidae, *Phlebotomus*) based on ITS2 rDNA sequences. Hypotheses of dispersion and speciation. *Insect Mol. Biol.* 9, 293–300.
- Depaquit, J., Ferté, H., Léger, N., Lefranc, F., Alves-Pires, C., Hanafi, H., Maroli, M., Morillas-Marquez, F., Rioux, J.A., Svobodova, M., Volf, P., 2002. ITS2 sequences heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus similis* (Diptera, Psychodidae): Possible consequences in their ability to transmit *Leishmania tropica*. *Int. J. Parasitol.* 32, 1123–1131.
- Depaquit, J., Lienard, E., Verzeaux-Griffon, A., Ferte, H., Bounamous, A., Gantier, J.C., Hanafi, H.A., Jacobson, R.L., Maroli, M., Moïn-Vaziri, V., Müller, F., Ozbel, Y., Svobodova, M., Volf, P., Léger, N., 2008. Molecular homogeneity in diverse geographical populations of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA and ITS2 rDNA epidemiological consequences. *Infect. Genet. Evol.* 8, 159–170.
- Di Muccio, T., Marinucci, M., Frusteri, L., Maroli, M., Pesson, B., Gramiccia, M., 2000. Phylogenetic analysis of *Phlebotomus* species belonging to the subgenus *Larrousius* (Diptera, Psychodidae) by ITS2 rDNA sequences. *Insect. Biochem. Molec.* 30, 387–393.
- Essegir, S., Ready, P.D., Killick-Kendrick, R., Ben-Ismaïl, R., 1997. Mitochondrial haplotypes and phylogeography of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. *Insect Mol. Biol.* 6, 211–225.
- Floch, H., Abonnenc, E., 1941. Phlébotomes de la Guyane Française. *Inst. Pasteur Guyane* 15, 18–21.
- Flury, B., 1988. Common Principle Components Analysis and Related Multivariate Models. John Wiley and Sons, New York.
- Fraiha, H., Ward, R.D., 1974. A new species of *Psychodopygus* Mangabeira (Diptera, Phlebotomidae) from the transamazonica highway Pard State. *Brazil. Bull. Ent. Res.* 64, 209–212.
- Franco, F.A., Morillas-Márquez, F., Barón, S.D., Morales-Yuste, M., Gálvez, R., Díaz, V., Pesson, B., Alves-Pires, C., Depaquit, J., Molina, R., Afonso, M.O., Gállego, M., Guernaoui, S., Bounamous, A., Martín-Sánchez, J., 2010. Genetic structure of *Phlebotomus* (*Larrousius*) *ariasii* populations, the vector of *Leishmania infantum* in the western Mediterranean: epidemiological implications. *Int. J. Parasitol.* 40, 1335–1346.
- Galati, E.A.B., 1995. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera:Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bol. Dir. Malariol. Sanamient. Ambient.* 35, 133–142.
- Galati, E.A.B., 2010. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) Classificação, Morfologia, Terminologia e Identificação de Adultos. Apostila Disciplina HEP 5752 Biologia e Identificação de Phlebotominae. Vol. I. Departamento de Epidemiologia Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo Av. Dr. Arnaldo, 715, 01246-904, São Paulo, SP, Brasil.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321.
- Khalid, N., Elnaïem, D., Aboud, M., Al Rabba, F., Triplet, F., 2010. Morphometric and Molecular differentiation of *Phlebotomus* (*Phlebotomus*) sandflies. *Med. Vet. Entomol.* 24, 352–360.
- Klingenberg, C.P., 1996. Multivariate allometry, in *Advances in Morphometrics*. Marcus, L.F., Corti, M., Loy, A., Naylor, G.J.P., Slice D. (Eds.). Nato ASI series, Life Sciences, Vol. 284. Plenum Press, NewYork. pp. 23–50. ISBN 0-306-45301-0.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5, 150–163.
- Le Pont, F., Desjeux, P., 1982. *Psychodopygus dirlinsis* n. sp. (Diptera: Psychodidae) nouveau Phlébotome de Guyane Française. *Description du mâle*. *Cab. O.R.S.T.O.M. Ser. Ent. Med. Parasit.* 20, 279–283.
- Le Pont, F., Pajot, F.X., 1978. *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *corrossoniensis* n. sp. (Diptera: Psychodidae) nouveau Phlébotome découvert en Guyane Française. *Cah. O.R.S.T.O.M. Ser. Ent. Med. Parasit.* 16, 223–226.
- León, R., Mollinedo, S., Le Pont, F., 2009. Phlébotomes d'Equateur et de Bolivie: descriptions de *Psathyromyia castilloi* n. sp. et *Psychodopygus luisleoni* n. sp. (Diptera, Psychodidae). *Bull. Soc. Entomol. France* 114, 83–89.
- Mangabeira, O., 1941. Contribuição ao estudo dos Flebotomus. *Psychodopygus* n. subg. (Diptera: Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 36, 237–250.
- Marcondes, C.B., Day, J.C., Ready, P.D., 1997. Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *Lu. neivai* and *Lu. whitmani*, and their roles as vectors of *Leishmania braziliensis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91, 725–726.
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D., 2009. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Trop.* 110, 112–136.
- Pesson, B., Ready, J.S., Benabdennbi, I., Martín-Sánchez, J., Essegir, S., Cadi-Soussi, M., Morillas-Marquez, F., Ready, P.D., 2004. Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif. *Med. Vet. Entomol.* 18, 25–37.
- Phillips, P., 1994–97. CPC – Common Principal Component Analysis Program. University of Texas at Arlington. <<http://pages.uoregon.edu/pphill/programs/cpc/cpc.htm>>.
- R Development Core Team, 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation Statistical Computing. <<http://www.R-project.org>>.
- Ready, P.D., Fraiha, H., Lainson, R., Shaw, J.J., 1980. *Psychodopygus* as a genus: reasons for a flexible classification of the phlebotomine sand flies (Diptera:Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 17, 75–88.

- Testa, J.M., Montoya-Lerma, J., Cadena, H., Oviedo, M., Ready, P.D., 2002. Molecular identification of vectors of *Leishmania* in Colombia: mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townsendi* series. *Acta Trop.* 84, 205–218.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Torgerson, D.G., Lampo, M., Velázquez, Y., Woo, P.T.K., 2003. Genetic relationships among some species groups within the genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hygiene* 5, 484–493.
- Young, D.G., Duncan, M.A., 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem. Ann. Entomol. Institut.* 54, 1–881.

4.3 Article N° 3

Titre: Is *Psathyromyia aragoi* (Diptera: Psychodidae) a single species?

Auteurs : Zapata S, Le Pont F, León R, Trueba G, Cruaud C, Depaquit J.

En cours de préparation

Is *Psathyromyia aragoi* (Diptera: Psychodidae) a single species?

Zapata S^{1,3}, Le Pont F², León R³, Trueba G³, Cruaud C⁴ and Depaquit J^{1*}

¹ Université de Reims Champagne-Ardenne, ANSES, EA 4688 – USC Transmission vectorielle et épidémiologie-surveillance de maladies parasitaires “VECPAR”, France

² 72 Rue de la Colonie, Paris, France

³ Instituto de Microbiología, Universidad San Francisco de Quito, Quito, Equateur

⁴ Genoscope, Centre National de Séquençage, 2 rue Gaston Crémieux, CP5706, 91057 Evry Cedex, France; www.genoscope.fr

***Corresponding author:**

Jérôme DEPAQUIT

Faculté de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne

EA 4688 – USC ANSES « VECPAR »

51 rue Cognacq-Jay

51096 Reims cedex - France

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

1. Introduction

Psathyromyia aragaoi Costa Lima, 1932 has been described on five male specimens from the „Cerrado“ region, State of Minas Gerais (Bresil). This species has a wide distribution, it can be found from Bresil (Rio de Janeiro) to Costa Rica, including the North-eastern lowlands (North Beni and Pando) and Andean foothills (Alto Beni) of Bolivie (Dujardin *et al.* 2005). According to Galati's classification, it belongs to the sub tribe Psychodopygina, genus *Psathyromyia* and subgenus *Forattiniella* (Galati, 1995; 2010). The first report of *Pa. aragaoi* in Equateur was carried out by Alexander *et al.* in 1992 and it is distributed in the Pacific Coast and Amazonia. This non-anthropophilic species inhabits armadillo burrows and few studies of systematic have been carried out because it has never been involved in the transmission of *Leishmania* spp.

Previous reports describe variations in the shape of the paramere in males collected from different localities (Young & Duncan, 1994; Dujardin *et al.* 2005): parameres can be straight or curved, rounded or more pointed at the top, thick with an inferior tubercle or narrow and elongated, The main differences about aedeagus are observed on the top with a diameter regularly decreasing from the base to the top or with an angle on the superior part (figure 1). Young and Duncan (1994) considered this considerable variability between specimens coming from different localities of „unknown significance“. However, in 2005 Dujardin *et al.* characterized two populations in sympatry in Bolivie by morphology and morphometry. Consequently, they consider that several different species could be included within *Pa. aragaoi s.l.* and the observed variability could be of interspecific origin and not of intraspecific origin.

In this report, we study specimens from Equateur and Bolivie showing different morphotypes by molecular biology using two molecular markers: cytochrome b gene of DNA mitochondrial (mt)

and elongation factor 1 alpha (EF1- α), a nuclear marker previously used for phylogenetic studies carried out on Phlebotomine sand flies (Testa *et al.* 2002, Parvizi *et al.* 2008).

2. Materials and methods

2.1 Sand fly collection

Sand flies were captured in two Equateurian localities (Paraíso Escondido on the Pacific Coast and the Tiputini Biodiversity Station in Amazonia) and in one Bolivien place (Aguas Calientes) (table 1). CDC miniature light traps were left overnight in primary and secondary forests. Entomological samples were separated and stored in 96% ethanol. Species identification was carried out based on morphology using taxonomical keys published by Young and Duncan (1994) and Galati (1995). The last abdominal segments, head and wing were separated and mounted after clarification (KOH 10%, H₂O then Marc-André) and dehydrated between slide and cover slip in Euparal for later identification, the rest of the bodies were stored individually in 96% ethanol for the molecular analyses. *Pa. aclydifera* was used as outgroup.

2.2 Molecular analysis

DNA was extracted using QIAmp[®] DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) as described previously by Depaquit *et al.* (2008). Polymerase Chain reactions (PCR) for nuclear elongation factor-1 α (EF-1 α) and cytochrome b genes were performed in a 50 μ L volume using 5 μ L of DNA solution and 50 pmol of primers EF-09 (5'-GCT CCT GGA CAT CGT GAT TTY ATYA A-3') and EF-R12 (5'-CCA CCA ATC TTG TAG ACA TCT TGCA G-3') for EF-1 α (Esseghir *et al.* 2000) and C3B-PDR (5'-CAY ATT CAA CCW GAA TGA TA-3') and NIN-PDR (5'-GGT AYW TTG CCT CGA WTT CGW TAT GA-3') for cytochrome b (Esseghir *et al.* 1997). Amplification

conditions for EF-1 α were as follows: After an initial denaturation step at 94°C for 3 min, 40 amplification cycles were performed (94°C for 30 s, 56°C for 45 s, 68°C for 60 s) and a final extension at 68°C for 10 min. For cytochrome b, the initial denaturation step at 94°C for 3 min was followed by 5 cycles (94°C for 30 s, 40°C for 30 s, 68°C for 60 s) then 35 cycles (94°C for 30 s, 44°C for 30 s, 68°C for 60 s) and a final extension at 68°C for 10 min. Amplicons were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gel stained with 0.1% ethidium bromide.

PCR products were directly sequenced in both directions by the National Center of Sequencing (Genoscope, France).

2.3 Sequences analysis

The sequences were corrected using Pregap and Gap softwares included in the Staden Package (Bonfield and Staden, 1996). Sequence alignments were done utilizing ClustalW software (Thompson *et al.* 1994). Neighbour-Joining (NJ) analysis was performed using MEGA version 4.0 software (Kumar *et al.* 2004) with the Kimura-2 parameters model and using uniform rates among sites. Gaps were treated as missing data. Node support was assessed by bootstrapping over 1000 replications.

3. Results

Morphological analysis showed different morphotypes varying in the morphology of the paramere and of the aedeagus of *Pa. aragaoi*. The Bolivian specimens show homogeneous parameres similar to that of Equatorial specimen KE651 whereas KE867 from the Pacific coast exhibits an important inferior tubercle and the other specimens show a long-ended apex, more or less similar to that of specimens described by Costa-Lima. (Figure 2).

The length of EF-1 α analysed fragment was 488 bp (genbank accession numbers XXXXX to XXXXXX) for all specimens including males and females. The alignment of sequences, which includes 491 positions, showed 21 variable sites of which 8 were parsimony-informative. Nucleotide composition was very similar for the all specimens: 25.8% T, 21.8% C, 24.9% A and 27.5% G. The NJ tree clustered all the specimens from Bolivia together with a strong bootstrap support (72%). Two haplotypes are recorded in Bolivia: one corresponding to the specimens KE739.4 and KE764A, and another grouping the specimens KE739.2 and KE739.3. Equatorial individuals were grouped in three clusters of which two were formed by samples from Amazonia and the other, KE867 from the Pacific coast of Equator, is strongly individualized from all other *Pa. aragaoi* (bootstrap value 100%).

On the other hand, the cytochrome b sequences were 462 bp long (genbank accession numbers XXXXXX to XXXXXX). Their alignment did not show any indel and included 58 variable sites, of which 23 were parsimony-informative. The nucleotide composition was 39.5% T, 13.8% C, 38.3% A and 8.3% G. The topology of the NJ tree based on cytochrome b sequences is similar to that of the NJ tree built on EF alpha sequences. All specimens from Bolivia are grouped in the

same cluster. The specimens from Equateur were grouped in 3 clusters and the specimen KE867 is strongly individualized (bootstrap value of 96% grouping all other specimens).

4. Discussion

It is very common to observe significant morphological variations within neotropical sandflies (Dujardin *et al.* 2004). NJ trees obtained with EF-1 α and from cyt b sequences showed similar topologies. The Bolivien specimens were grouped together, which was in agreement with their geographical origin and morphotype. The Equateurian specimen showing a paramere with a short-ended apex similar to those of Bolivien sand flies is not included in the previous cluster. It is closely related to the specimen KE566 having a paramere with a small tubercle. The specimens KE601 and KE647 having a similar tubercle on the paramere were grouped together. Lastly, the specimen from the Pacific Coast is strongly individualized from all other specimens. This specimen exhibits an original paramere (figure 2), very different from the other ones which has a big inferior tubercle. Its individualization is in agreement with this morphological feature, molecular analyses and geographical origin. It is the only specimen caught western of the Andes cordillera and its individualization is the consequence of its geographical isolation. However, there is no link between morphology and molecular biology for the other specimens.

The transmission of EF-1 α is both of maternal and paternal inheritance whereas the transmission of mtDNA (cyt b) is of maternal inheritance. The similarity of the topologies of the trees obtained from both nuclear and mitochondrial markers lend support there is no hybridization between lineages. A potential allopatric reproductive isolation could indicate a speciation process, especially because the most striking differences were found in the genitalia (shape of paramere,

style, coxite and lateral lobe), which are generally accepted as species characters (Dujardin *et al.* 2005).

Our pilot study, limited to a small number of specimens, suggests that *Pa. aragoi* might actually represent a complex of species. This work has to be completed in the future by a largest sampling, including specimens from different countries and populations, especially Bresilian topotypes. This step will be necessary to discuss the taxonomic status of these specimens at the light of their morphology and haplotypes.

References

1. Alexander JB, Takaoka H, Eshita Y, Gomez EA, Hashiguchi Y. New records of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Equateur. Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87:123-130.
2. Bonfield, J.K. and Staden, R. Experiment files and their application during large scale sequencing projects. DNA Seq 1996; 6: 109–117.
3. Depaquit J, Lienard E, Verzeaux-Griffon A, Ferte H, Bounamous A, Gantier JC, Hanafi HA, Jacobson RL, Maroli M, Moin-Vaziri V, Müller F, Ozbel Y, Svobodova M, Volf P, Léger N. Molecular homogeneity in diverse geographical populations of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA and ITS2 rDNA epidemiological consequences. Infect Genet Evol. 2008; 8:159-70.
4. Dujardin JP, Le Pont F, Matias A, De la Riva JX. Morphometrical evidence for speciation within Bolivien *Lutzomyia aragoi* (Diptera: Psychodidae). Infect Genet Evol. 2005; 5(4):362-5.

5. Dujardin JP, Le Pont F. Geographic variation of metric properties within the neotropical sandflies. *Infect Genet Evol.* 2004; 4(4):353-9.
6. Essegir, S., Ready, P.D., Killick-Kendrick, R., Ben-Ismael, R., Mitochondrial haplotypes and phylogeography of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. *Insect Mol. Biol.* 1997; 6: 211–225.
7. Essegir S, Ready PD. Speciation of *Phlebotomus* sandflies of the subgenus *Larroussius* coincided with the late Miocene-Pliocene aridification of the Mediterranean subregion. *Biological Journal of Linnean Society* 2000; 70:189-219
8. Galati, E.A.B. 2010. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) Classificação, Morfologia, Terminologia e Identificação de Adultos. Apostila Disciplina HEP 5752 Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. Vol. I. Departamento de Epidemiologia Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo Av. Dr. Arnaldo, 715, 01246-904, São Paulo, SP, Brasil.
9. Galati, E.A.B. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bol. Dir. Malariol. Saneamient. Ambient.* 1995; 35: 133-142.
10. Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform* 2004; 5: 150–163.
11. Parvizi P, Assmar M. Nuclear Elongation Factor-1 α Gene A Molecular Marker for Iranian Sandfly Identification. *Iranian J Publ Health* 2007; 36(2):25-37.
12. Testa JM, Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD. Molecular identification of vectors of *Leishmania* in Colombia: mitochondrial introgression in *the Lutzomyia townsendi* series. *Acta Trop.* 2002; 84(3):205-18.

13. Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 4673-4680.
14. Young, D.G. and Duncan, M.A. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae), *Mem. Ann. Entomol. Institut.* 54, 1-881.

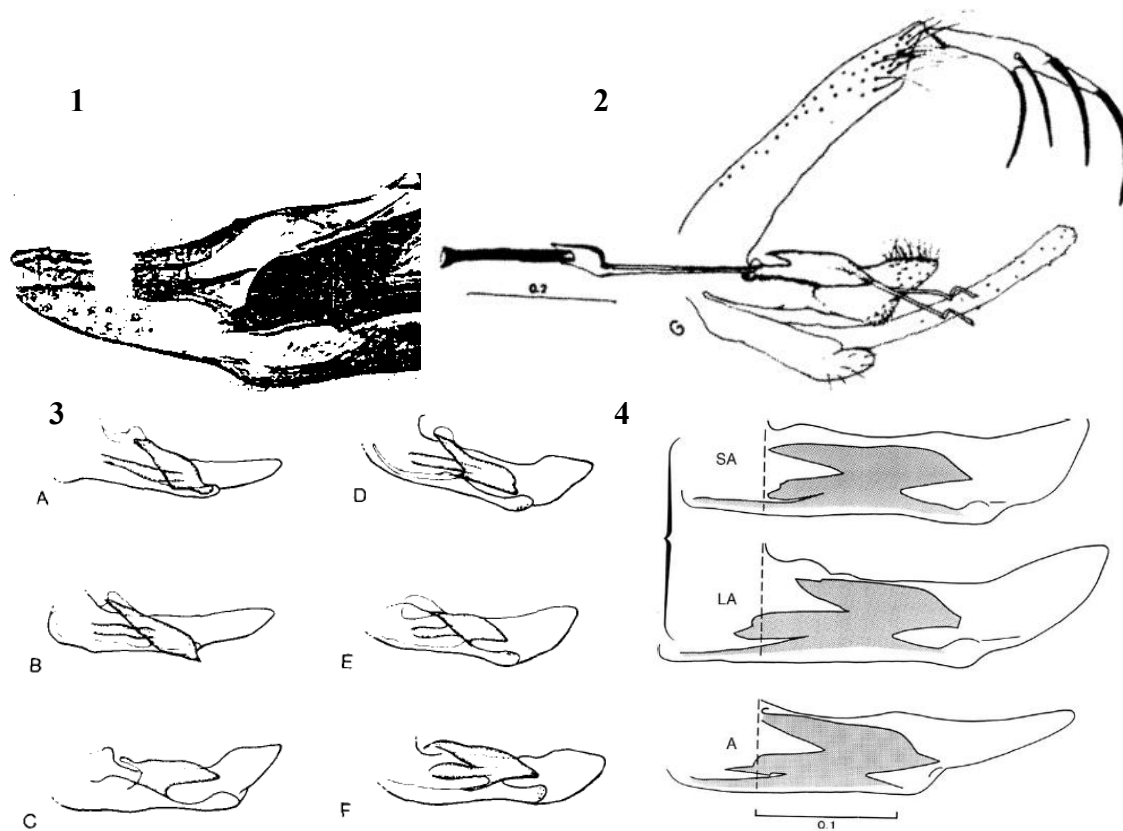
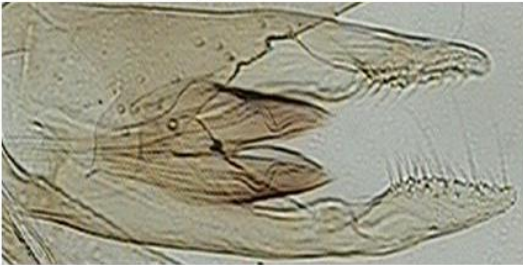


Figure 1: morphotypes of male parameres reported by Costa Lima from Bresil (1, Costa-Lima, 1932), by Young & Duncan (1994) without specifying the geographical origin (2, in their figure 161) and from A. Acd Poi, San Pedro, Paraguay; B. Cruces Trail, Canal Zone, Panama; C. Rio Curiche, Choco, Colombia; D. Trinidad; E. Manaus, Amazonas, Bresil; F. Tres Esquinas, Caqueta (3). The number 4 are from the publication of Dujardin et al. (2005) showing sympatric specimens from Bolivie with parameres having a shortended apex (SA) or a long-ended apex (LA) versus the slender and shorter apex of the type specimen (A).

KE566-*Pa.aragaoi*-TIPUTINI



KE601-*Pa.aragaoi*-TIPUTINI



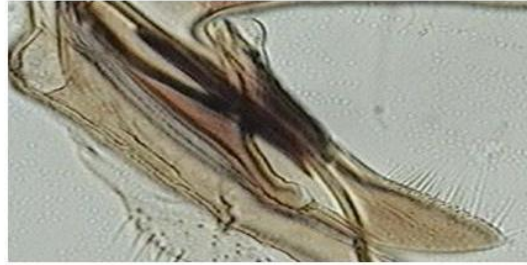
KE647-*Pa.aragaoi*-TIPUTINI



KE651-*Pa.aragaoi*-TIPUTINI



KE739.4-*Pa.aragaoi*-BOL



KE739.2-*Pa.aragaoi*-BOL



KE867-*Pa.aragaoi*-PACIFIC COAST



Figure 2. Photographies of genitalia from some specimens analysed.

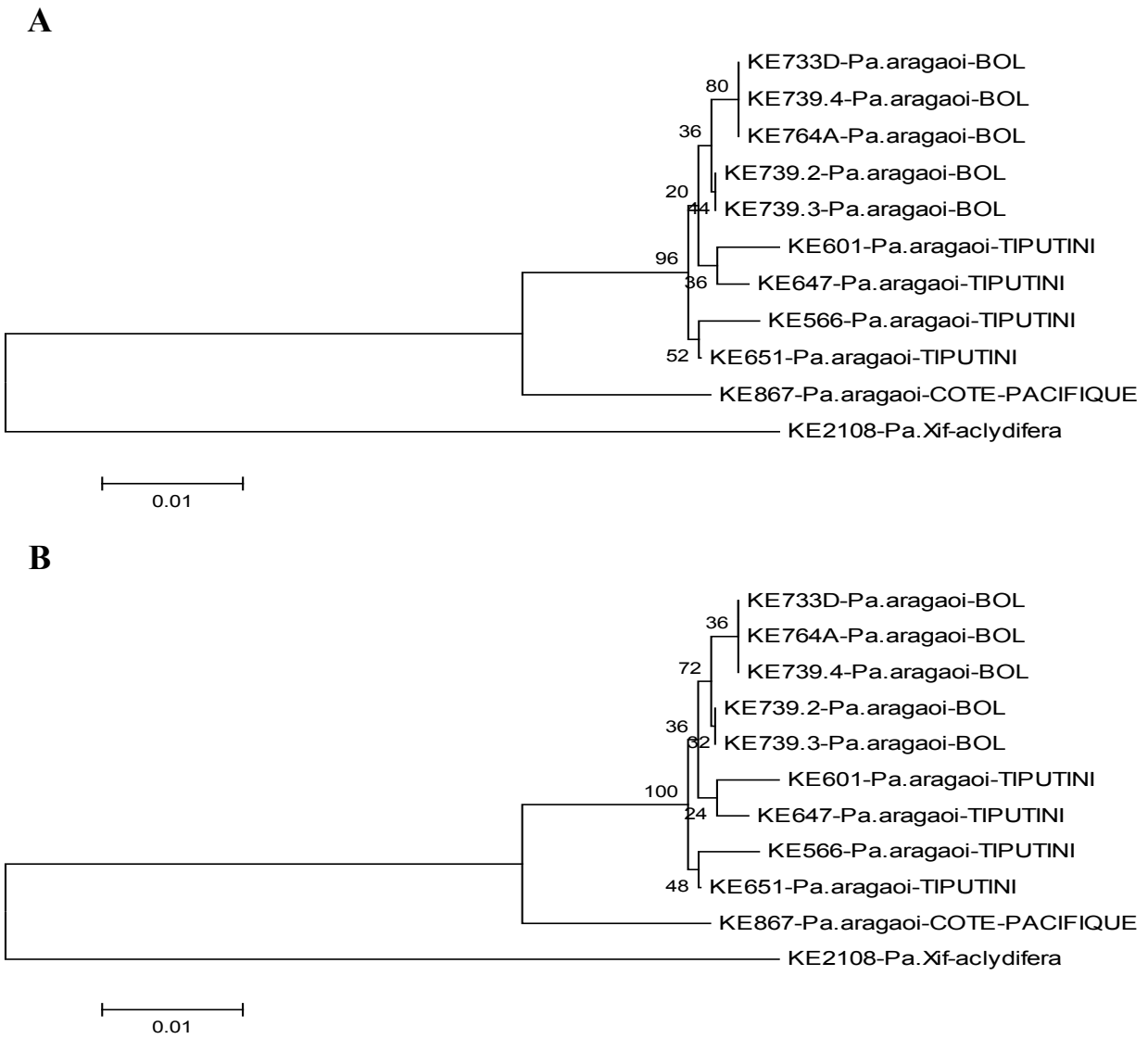


Figure 3: Neighbor Joining trees obtained from nucleotide analysis of: A) cytochrome b mtDNA sequences B) Elongation factor 1 alpha sequences of the *Pa. aragaii* specimens from Ecuador and Bolivia. *Pa. aclydifera* is used as outgroup. Bootstrap values are shown in nodes (500 replicates).

Table 1: List of specimens analyzed in this study, country and locality of collection and GenBank sequences accession numbers

Genus	Subgenus	Species	Country	Locality	Sex	Specimen	Genbank accession number	
							EF-1 α	Cyt B
<i>Psathyromyia</i>	<i>Foratiniella</i>	<i>aragaoi</i>	<i>Equateur</i>	Tiputini	♂	KE 566		
			<i>Equateur</i>	Tiputini	♂	KE 601		
			<i>Equateur</i>	Yasuni	♂	KE 647		
			<i>Equateur</i>	Yasuni	♂	KE 651		
			<i>Equateur</i>	Pacific Coast	♂	KE 867		
			<i>Bolivie</i>	Aguas Calientes	♂	KE 739.2		
			<i>Bolivie</i>	Aguas Calientes	♂	KE 739.3		
			<i>Bolivie</i>	Aguas Calientes	♂	KE 739.4		
	<i>Bolivie</i>		Aguas Calientes	♀	KE 733D			
	<i>Xiphomyia</i>	<i>aclydifera</i>	<i>Equateur</i>	Tiputini	♀	KE 2108		

4.4 Article N° 4

Titre: A study of a population of *Nyssomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) caught on the Pacific coast of Equateur.

Auteurs : Zapata S, Mejía L, Le Pont F, León R, Pesson B, Ravel C, Bichaud L, Charrel R, Cruaud C, Trueba G, Depaquit J.

Accepté pour publication par Parasites & Vectors Journal.

A study of a population of *Nyssomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) caught on the Pacific coast of Equateur.

Zapata S^{1,2}, Mejía L², Le Pont F³, León R², Pesson B^{1,4}, Ravel C⁵, Bichaud L⁶, Charrel R⁶, Cruaud C⁷, Trueba G² and Depaquit J^{1*}

⁷ Université de Reims Champagne-Ardenne, ANSES, EA 4688 – USC Transmission vectorielle et épidémiologie-surveillance de maladies parasitaires “VECPAR”, France

⁸ Instituto de Microbiología, Universidad San Francisco de Quito, Quito, Equateur

⁹ 72 Rue de la Colonie, Paris, France

¹⁰ Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg

¹¹ University of Montpellier, UMR5290, French Reference Centre on Leishmaniasis, 39 Av. Charles Flahault, F34295 Montpellier, France

¹² Unité des virus émergents, UMR 190 « Emergence des pathologies virales », Aix-Marseille Université – IRD --- EHESP, Marseille, France

¹³ Genoscope, Centre National de Séquençage, 2 rue Gaston Crémieux, CP5706, 91057 Evry Cedex, France; www.genoscope.fr

***Corresponding author:**

Jérôme DEPAQUIT

Faculté de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne

EA 4688 – USC ANSES « VECPAR »

51 rue Cognacq-Jay

51096 Reims cedex - France

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

Abstract

Background

Cutaneous leishmaniasis is endemic to the Pacific coast of Equateur, and *Nyssomyia trapidoi* is considered to be its main vector. Dujardin *et al.* [1] recorded some differences in body pigmentation and isoenzymatic profiles in sympatric populations of *Ny. trapidoi* from the Pacific coast of Equateur and suggested the existence of two cryptic species.

Methods

Entomological collections were performed in November 2008 and March 2011 in the locality of Paraíso Escondido using CDC miniature light traps and human bait. Morphological, isoenzymatical and molecular (sequencing of cytochrome *b* and cytochrome *c* oxidase 1 of the mitochondrial DNA) analyses, such as detection of *Leishmania* DNA and phlebovirus RNA in some females, were performed.

Results

Neighbor-joining trees from mitochondrial sequences grouped all of Equateurian *Ny. trapidoi* (including the two color variants) in one cluster, except for two specimens which clustered separately in both genes. Isoenzymatic characterization confirmed that the color variants belong to the same population. Additionally, 11.5% of females were found by PCR to contain *Endotrypanum monterogeii* kinetoplastid DNA. All pools of *Ny. trapidoi* were negative for phlebovirus RNA.

Conclusion

Analysis of mitochondrial gene sequences and isoenzymes was unable to support the existence of two sibling species within *Ny. trapidoi*, which is a probable vector of *Endotrypanum monterogei*.

Keywords

Cryptic species – isoenzymes – mitochondrial DNA – sympatry – *Endotrypanum*, Phlebovirus.

Background

Currently, 76 species of phlebotomine sand flies belonging to 17 genera have been reported for Equateur [2]; of these, *Nyssomyia trapidoi*, *Lutzomyia hartmanni*, *Lutzomyia gomezi* and *Lutzomyia ayacuchensis* are proven vectors of *Leishmania* parasites [3]. Leishmaniasis was first reported in Equateur in 1920 [4] and is now endemic in the coastal region. It is present in 22 of the country's 24 provinces and purportedly has an incidence of approximately 1,650 cases per year [5] (likely unknown) in various clinical forms: cutaneous (CL), mucocutaneous (MCL), diffuse cutaneous (DCL) and recidiva cutis (LRC) [3, 6, 7].

In the Pacific region of Equateur, the sand fly species *Nyssomyia trapidoi* is distributed throughout the western foothills of the Andes and along the coast and is an important vector of *Leishmania (Viannia) panamensis* [3, 8, 9,10]. *Ny. trapidoi* is highly anthropophilic [11, 12, 13] and is commonly collected in secondary forests, crop plantations and close to human dwellings. The same features were observed in the original description of *Ny. trapidoi* by Fairchild & Hertig [14] who analyzed specimens from Panama (type-locality) and from the Equateurian Coast. A recent study in Panama found a high prevalence (43.3%) of *Leishmania naiffi* in *Ny. trapidoi* [15].

In 1996, an entomological collection carried out in two communities on the north coast of Equateur, obtained specimens of *Ny. trapidoi* showing a slight color variation. Additionally, isoenzymatic analysis revealed a possible presence of two species living in sympatry [1], although they did not correspond to the color variants. The purpose of the present study was to confirm the existence of two species under the name *Ny. trapidoi* at these locations. This report

describes the results of an isoenzymatic and mitochondrial DNA analysis carried out on specimens of *Ny. trapidoi* collected in 2008 and 2011 at one of the locations described previously by Dujardin *et al.*[1]. Moreover, we investigated the vectorial role of *Ny. trapidoi* for Trypanosomatids and phleboviruses.

Methods

Sand fly collection

Sand flies were captured in November 2008 and March 2011 in the locality of Paraíso Escondido (00° 85' 03" N, 79° 17' 49" W), Pichincha Province, using CDC miniature light traps. Moreover, female sand flies were collected manually on human bait (captured on the skin of the authors). An out-group was analyzed consisting of specimens from Nicaragua (Musun), a place close to the type-locality of the species. Equatorial specimens were identified based on color phenotypes: light (B), dark (G) and indistinguishable (T). Specimens were killed using carbon dioxide and immediately stored in 96% ethanol for molecular studies and liquid nitrogen for isoenzymatic analysis. Once in the laboratory, the thorax of each specimen was separated and stored at -20 °C for subsequent DNA extraction. The specimens used for isoenzymatic study and virus detection were processed as described below. The head, wings and genitalia of each specimen processed for morphology, molecular biology or isoenzyme analysis were cleared in boiling Marc-André [16] solution and mounted between slide and cover slide. The specimens selected for virus detection and isolation were individually identified in a drop of sterile saline solution under a stereomicroscope and pooled in groups of 50 belonging to the same species and of the same

gender. The specimens we were unable to identify according to the latter method were stored at 80°C for future studies.

Isoenzyme analysis

Isoelectrofocusing was carried out in ultrathin agarose gels (MultiphorTM II Electrophoresis system, GE Healthcare Life Sciences) with the ampholyte at pH 4.0-6.5 in accordance with the protocols described by Pesson *et al.* [17]. The following isoenzyme systems were tested: malate dehydrogenase (MDH, E.C.1.1.1.37), isocitrate dehydrogenase (ICD, E.C.1.1.1.42), glycerol-3-phosphate dehydrogenase (α GPDH, E.C.1.1.1.8), glucose-6-phosphate dehydrogenase (6PGD, E.C.1.1.1.44), hexokinase (HK, E.C.2.7.1.1), phosphoglucomutase (PGM, E.C.5.4.2.2), fumarase (FUM, E.C.4.2.1.2), and glucose phosphate isomerase, (GPI, E.C.5.3.1.9). The alleles for each locus were visualized as colored bands on the gels and numbered from the lowest to the highest pHi.

Allele frequencies, tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and Nei's [18] genetic distance between the two groups of sand flies were calculated using BIOSYS-2 [19]. Genotypic linkage disequilibrium and genotypic differentiation were tested using GENEPOP 3.3[20].

Molecular taxonomy of phlebotomine sand flies

DNA was extracted using the QIAmp[®]DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) and following the protocol used by Depaquit *et al.* [21]. Polymerase chain reactions (PCR) were performed for 30

Ny. trapidoi specimens. Each PCR was carried out in a 50µl volume using 5µl of DNA extracted solution and 50 pmol of the primers LepF and LepR [22] and C3B-PDR / NIN-PDR [23], as described previously, to amplify, respectively, cytochrome *c* oxidase 1 (COI) and cytochrome *b* genes from sand fly mitochondrial DNA. Amplification conditions for COI were as follows: an initial denaturation step at 94 °C for 3 min followed by 5 cycles of 94 °C denaturation for 30 s, 45 °C annealing for 90 s, and 68 °C extension for 60 s followed by 35 cycles of 94°C denaturation for 30 s, 51 °C annealing for 30 s, 68 °C extension for 60 s and, finally, a 68 °C extension for 10 min [24, 25]. For cytochrome *b*, an initial denaturation step at 94 °C for 3 min was followed by 5 cycles (94 °C for 30 s, 40 °C for 30 s and 68 °C for 60 s) then 35 cycles (94 °C for 30 s, 44 °C for 30 s and 68 °C for 60 s), with a final extension at 68 °C for 10 min [23].

PCR products were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gels stained with 0.1% ethidium bromide. Amplicons were sequenced in both directions using the primers for DNA amplification.

DNA sequences were edited using the Pregap and Gap programs from the Staden Package software [26]. Sequence alignments were done using ClustalW software [27] and checked by eye. We selected a Neighbor-joining (NJ) analysis, which is a suitable method for intraspecific characterization of populations [28, 29]. NJ was performed using MEGA 4.0 software [30]. Node support carried out using the NJ method was assessed by bootstrapping with 500 replications.

Trypanosomatid DNA detection

Detection of trypanosomatid DNA was carried out by PCR using two segments: a 120 bp kDNA corresponding to the conserved region of kinetoplast minicircles (primers JW11, 5'-CCT ATT

TTA CAC CAA CCC CCA GT-3'' and JW12, 5''-GGG TAG GGG CGT TCT GCG AAA-3'' [31] and the ribosomal small sub-units (SSU) (primers: KRD5, 5'-GATCTGGTTGATTCTGCCAGTAG-3' and KRD3, 5'-GATCCAGCTGCAGGTTACCTAC-3') [32]. As positive controls, DNA samples from *Leishmania* reference strains belonging to *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. Bresiliensis* and *L. peruviana* were used. The conditions for these PCR reactions were the same as those described by Nicolas *et al.* [31] and Clark *et al.* [32].

Detection of phleboviruses in sandfly pools by RT-PCR

Twelve pools, each containing 50 *Ny. trapidoi* sand flies (a total of 550 females and 50 males) were ground using a Mixer Mill MM300 (Qiagen) with a 3-mm tungsten bead at a frequency of 30 cycles s⁻¹ for 3 min in the presence of 600 µl Eagle's minimal essential medium supplemented with 5% decompemented calf serum, 1 % L-Glutamine and 100 IU penicillin G ml⁻¹, 100 mg kanamycin ml⁻¹, 100 mg streptomycin ml⁻¹ and 7.5 µg amphotericin B ml⁻¹. The resulting mixture was clarified by centrifugation at 5800 g for 10 min and the supernatant fluid aliquoted (three aliquots of 200 µl for each pool) and stored at -80 °C. One 200 µl aliquot was used for viral DNA and RNA purification using a BioRobot EZ1XL and the EZ1 Virus Mini kit (Qiagen), eluted into 90 µl and stored at -80 °C. 10µl was subsequently used in each RT-PCR reaction. Two sets of primers targeting different genes were used in independent reactions: (i) phlebovirus consensus primers targeting the polymerase gene in the L RNA segment [33], (ii) primers specific for the nucleoprotein gene in the S RNA segment of phleboviruses within the Sandfly fever Naples virus complex [34]. The RT-PCR cycling conditions consisted of 48 °C for 45 min

and 94 °C for 2 min, followed by 40 cycles at 94 °C for 30 s, 45 °C for 1 min and 68 °C for 45 s, with a final elongation step at 68 °C for 7 min. Nested PCRs were performed using the same conditions with 1.25 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA). PCR products were visualized in a 2 % TAE/agarose electrophoresis gel and sequenced in both directions either directly or after cloning in a TA cloning vector.

Virus isolation

Pooled sandfly homogenates stored at –80 °C were used to inoculate Vero cells. Briefly, 100 µl each homogenate was diluted with 900 µl Eagle's minimal essential medium without fetal bovine serum (FBS), but enriched with antibiotics (100 IU penicillin G ml⁻¹, 100 mg streptomycin ml⁻¹, 100 mg kanamycin ml⁻¹ and 7.5 µg amphotericin B ml⁻¹) and used to seed Vero monolayers in a 12.5-cm² flask. After incubation at room temperature for 1 hr, 4 ml of fresh 5% FBS medium was added. The flask was incubated at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂. Flasks were examined daily for the presence of a cytopathic effect, and 400 µl supernatant was removed and tested by RT-PCR after viral RNA/DNA extraction as aforementioned.

Results and Discussion

Entomological captures using human baits resulted in 93% *Ny. trapidoi*, 4.2% *Psychodopygus panamensis* and 2.8% *Lutzomyia (Helcocyrtomyia) hartmanni*. Captures with CDC light traps yielded, in order of abundance: *Ny. trapidoi*, *Trichophoromyia reburra*, *Pressatia dysponeta*, *Psathyromyia aragoi*, *Psychodopygus panamensis*, *Lutzomyia hartmanni*, *Psathyromyia*

abunaensis and *Psychodopygus carrerai thula* respectively (Table 1). Sixty-four *Ny. trapidoi* females were used for isoenzyme analysis and 550 *Ny. trapidoi* females and 50 *Ny. trapidoi* males were processed for virus detection. Of the males captured with CDC light traps, a small proportion was subsequently studied. They belonged to the same species as the females and most were *Ny. trapidoi*. They were stored at -80°C.

Analysis of sand fly mitochondrial DNA

Mitochondrial COI and cytochrome *b* sequences from 30 *Ny. trapidoi* females were obtained and submitted to Genbank (accession numbers JQ 322908 through JQ 322968). Nucleotide sequences from COI amplicons (683 bp) revealed 31 variable sites, 10 of which were informative; cytochrome *b* (511 bp) contained 16 variable sites, two of them informative. The nucleotide composition was 37% T, 19% C, 28% A and 17% G for COI and 38% T, 15% C, 39% A and 9% G for cytochrome *b*. The alignment showed no indel in either sequence. COI sequences showed an average base substitution per site of 0.6 % and cytochrome *b* sequences showed an average of 0.25%. There are more COI haplotypes than *cyt b* haplotypes. (Fig. 1).

Analysis of isoenzyme polymorphism

Since MDH and ICD each showed two distinct loci, a total of 10 loci were studied. Six of these gave clearly interpretable polymorphic patterns: GPI, PGM, HK, FUM, 6PGD and MDH1. Samples tested for α GPDH were monomorphic. Table 2 shows the number of sand flies and allelic frequencies at each polymorphic locus.

Both populations of light and dark sand flies were in Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). When combined as one group, only PGM deviated ($P = 0.033$); this disequilibrium was due to a deficiency of heterozygotes. There was no significant linkage disequilibrium for either populations tested alone or grouped together ($1 > P > 0.180$). Nei's genetic distance value was 0.004 and there was no genotypic differentiation between light and dark *Ny. trapidoi* ($\chi^2 = 12.309$, $P = 0.421$).

Detection of trypanosomatid DNA

Out of 78 *Ny. trapidoi* females tested by PCR for the presence of trypanosomatid kDNA, 9 (11.5%) were positive. BLAST analysis of the 120 bp PCR products failed to reveal any significant score. However, 8 out of 78 kDNA PCR positive females were also PCR positive for the SSU rDNA locus. All the 2,135 bp sequences obtained from our samples were similar and showed 100% identity to the *Endotrypanum monterogeii* sequence (X53911) described by Fernandes *et al.* [35]. One sequence was deposited in Genbank (JQ863389).

Detection of phleboviruses in sandfly pools by RT-PCR and by viral isolation

No pools were positive for phleboviruses using RT-PCR or by isolation on Vero cells.

Conclusion

The results of this study confirmed that *Ny. trapidoi* is the most common species captured [9] in the Paraíso Escondido community in the central coastal region of Equateur. Two other

anthropophilic species, *Psychodopygus panamensis* and *Lutzomyia hartmanni*, were recorded at this locality. Other non- anthropophilic species, i.e. *Trichophoromyia reburra*, *Pressatia dysponeta*, *Psathyromyia aragoi*, *Lutzomyia hartmanni*, *Psathyromyia abunaensis* and *Psychodopygus carrerai thula* were also collected there (Table 1).

Molecular (mtDNA sequencing) and isoenzymatic analyses did not support the existence of two populations (possible cryptic species) at Paraíso Escondido as previously hypothesized by Dujardin *et al.* [1]. The topology of the NJ tree obtained using cytochrome *b* sequences (Figure 1) grouped all Equateurian *Ny. trapidoi* into two clusters. The first cluster comprised the specimens B001 and B010 and the second cluster grouped the other specimens. This dichotomy is supported by only two nucleotide substitutions (positions 222 and 482). The *Ny. trapidoi* from Nicaragua differed from the Equateurian specimens in 12 nucleotide positions (Figure 2).

On the other hand, the NJ tree of COI sequences showed 5 clusters (Figure 1). The main branch included many of the specimens sharing the main cytochrome *b* haplotype. Another branch includes the B001 and B010 specimens, which grouped exactly as in the cytochrome *b* NJ clustering, thus perhaps warranting additional studies. These two specimens differ from the main haplotype by two nucleotide positions: 35 and 642. Specimens B007, B033 and G309 make up a third cluster that is supported mainly by one mutation. The fourth cluster (specimens B070, B071, G092 and T025) is strongly supported by seven positions (Figure 2). It is interesting to note that there is no correlation between haplotypes and color phenotypes. In this case, the COI gene provided a greater level of stratification than the cytochrome *b* gene.

Isozyme analysis suggested that the two color variants are conspecific *Ny. trapidoi*, and we did not find any variation of α GPDH profiles in our samples. However, the electrophoresis protocol used by Dujardin *et al.* [1] was different from that used in this study.

Ny. trapidoi is known to be an efficient vector for the vesicular stomatitis virus (Vesiculovirus) [36, 37]. According to our study, there is no evidence for the circulation of any phlebovirus in *Ny. trapidoi* in the locality of Paraíso Escondido.

In this work, we processed 78 *Ny. trapidoi* females, 2 engorged on human blood and the rest unfed. Nine (11.5%) of the unfed sand flies had identical trypanosomatid kDNA sequences and showed no homology to *Leishmania panamensis* and *L. guyanensis*, species commonly found in *N. trapidoi* [3]. However, SSU rDNA sequences (2135bp) from the same specimens showed 100% homology with the *Endotrypanum monterogeei* sequence (GenBank X53911) obtained from a sloth (*Choloepus hoffmanni*) and described by Fernandes *et al.* [35]. Moreover, our sequences showed a high homology (over more than 2100 bp) to sequences described as *Endotrypanum* sp. by Ferreira *et al.* [38]: 99.7%, homology to *Endotrypanum* isolated from *Lutzomyia gomezi* (EU21238) and 99.8-99.9% to isolates from *Psathyromyia dendrophyla* (EU21239, EU21240). If we consider this variability as intraspecific, it might suggest that *E. monterogeei* has a wide spectrum of vectors, including the genera *Lutzomyia*, *Psathyromyia* and *Nyssomyia*. Although sloths were common in study sites some time ago, they are now rare, and other vertebrates may play a role as reservoirs. Further studies are needed to learn more about the vertebrate hosts of *E. monterogeei*, since to date our knowledge is limited to *C. hoffmanni* [35, 39].

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

SZ, FLP, RL & JD were responsible for the conception and design of the work and have been involved in drafting the manuscript. SZ & BP carried out the isoenzymatic analysis and have given final approval of the version to be published. SZ, JD and CR did the parasitologic study and have given final approval of the version to be published. CC did the sequencing of the samples through the project @speed-ID and have given final approval of the version to be published. LM & GT helped with collecting and processing the samples, revising the manuscript critically and have given final approval of the version to be published.

LB and RC carried out the viral study, critically reviewed the manuscript and have given final approval of this version to be submitted for publication.

Acknowledgements

The authors are grateful to Anita Freire, Soledad Tello and Moisés Gualapuro for their invaluable support in entomological collection and field work.

This work is part of the @ SPEED-ID “Accurate SPEciEs Delimitation and IDentification of Eukaryotic Biodiversity using DNA Markers” project proposed by F-BoL, the French Barcode of Life initiative, funded by the French National Center of Sequencing (Genoscope) and supported

by the National Secretariat for Higher Education, Science, Technology and Innovation (SENESCYT) of Equateur.

References

1. Dujardin JP, Le Pont F, Cruz M, Leon R, Tarrieu F, Guderian R, Tibayrenc M: Cryptic speciation in *Lutzomyia (Nyssomyia) trapidoi* (Fairchild and Hertig) (Diptera: Psychodidae) detected by multilocus enzyme electrophoresis. *Am J Trop Med Hyg* 1996, 54: 42-45.
2. Galati E.A.B: *Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) Classificação, Morfologia, Terminologia e Identificação de Adultos. Apostila Disciplina HEP 5752 Bioecologia e Identificação de Phlebotominae Vol. I.* Departamento de Epidemiologia Faculdade de Saúde Pública Universidade de São, São Paulo, SP, Brasil. Press 2010.
3. Calvopiña M, Armijos RX, Hashiguchi Y: Epidemiology of leishmaniasis in Equateur: current status of knowledge - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004, 99(7):663-72.
4. Rodríguez JD: Lecciones de Parasitología Humana: Género *Leishmania* (5th edit) Departamento de publicaciones de la Universidad de Guayaquil 1974, pp 170-185.
5. Servicio nacional de control de la malaria y otras enfermedades transmitidas por vectores artrópodos “Juan Montalván Cornejo” (SNEM), 2010.
6. Hashiguchi Y, Gomez EA: A review of leishmaniasis in Equateur. *Bull Pan Am Health Organ* 1991, 25(1):64-76.
7. Calvopiña M, Uezato H, Gomez EA, Korenaga M, Nonaka S, Hashiguchi Y: Leishmaniasis recidiva cutis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in subtropical Equateur: isoenzymatic characterization. *Int J Dermatol* 2006, 45(2):116-20.

8. Armijos RX, Chico ME, Cruz ME, Guderian RH, Kreutzer RD, Berman JD, Rogers MD, Grögl M: Human cutaneous leishmaniasis in Equateur: identification of parasites by enzyme electrophoresis. *Am J Trop Med Hyg* 1990, 42(5):424-428.
9. Le Pont F, Leon R, Guerrini F, Gantier JC, Mouchet J, Echeverria R, Guderian RH: Leishmaniasis in Equateur. 3. *Lutzomyia trapidoi*, vector of *Leishmania panamensis*. *Ann Soc Belg Med Trop* 1994b, 74(1): 23-28.
10. Dantas-Torres F: *Canine Leishmaniosis in South America. Parasit Vectors*. 2009, 26;2 Suppl 1:S1.
11. Le Pont F, Leon R, Mouchet R, Echeverria R, Guderian RH: Leishmaniose en Equateur. 2. Contacts Homme/vecteurs de Leishmaniose: Cas de *Lutzomyia trapidoi* et *Lutzomyia gomezi*. *Ann Soc Belge Med Trop* 1994a, 74(1): 13-21.
12. Mouchet J, Le Pont F, Leon R, Echeverria R, Guderian RH: Leishmaniasis in Equateur. 5. Leishmaniasis and anthropization on the Pacific coast. *Ann Soc Belg Med Trop* 1994, 74(1):35-41.
13. Barrera C, Herrera M, Martinez F, Leon R, Richard A, Guderian RH, Mouchet R, Echeverria R, Le Pont F: Leishmaniose en Equateur. 1. Incidence de la Leishmaniose Tegumentaire sur la Façade Pacifique. *Ann Soc Belge Med Trop* 1994, 74(1): 1-12.
14. Fairchild GB and Hertig M: Notes on the Phlebotomus of Panama (Diptera, Psychodidae). IX. Description of seven new species. *Ann Entomol Soc Amer* 1952, 45: 505-28.
15. Azpurua J, De La Cruz D, Valderama A, Windsor D: *Lutzomyia* Sand Fly Diversity and Rates of Infection by *Wolbachia* and an Exotic *Leishmania* Species on Barro Colorado Island, Panama. *PLoS Negl Trop Dis* 2010, 4(3):e627.

16. Abonnenc E : Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera: Phlebotomidae). *Mémoires de l'ORSTOM* 1972, 55: 1-289.
17. Pesson B, Wallon M, Floer MT, Ktistensen AR: Étude isoenzymatique de populations méditerranéennes de phlébotomes du sous-genre Larroussius. *Parassitologia* 1991, 33 (1) :471-476.
18. Nei M: Genetic distance between populations. *Am Nat* 1972, 106(949): 283-292.
19. Swofford DL, Selander RB: BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J Hered* 1981, 72(4): 281-3
20. Raymond M, Rousset F: GENEPOP (version 12): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 1995, 86(3): 248-249.
21. Depaquit J, Lienard E, Verzeaux-Griffon A, Ferté H, Bounamous A, Gantier JC: Molecular homogeneity in diverse geographical populations of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA and ITS2 rDNA epidemiological consequences. *Infect Genet Evol* 2008, 8(2): 159-70.
22. Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN: DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103(4):968-97.
23. Essegir S, Ready PD, Killick-Kendrick R, Ben-Ismaïl R: Mitochondrial haplotypes and phylogeography of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. *Insect Molec Biol* 1997, 6(3), 211–225.
24. Costa FO, DeWaard JR, Boutillier J, Ratnasingham S, Dooh RT, Hajibabaei M, Hebert PDN: Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Can J Fish Aquat Sci* 2007, 64: 272-295.

25. Boudabous R, Bounamous A, Jouet D, Depaquit J, Augot D, Ferté H, Berchi S, Veuille M & Babba H: Mitochondrial DNA differentiation between two closely related species *Phlebotomus chabaudi* Croset, Abonnenc & Rioux, 1970 and *P. (Pa.) riouxi* Depaquit, Killick-Kendrick & Léger, 1998 based on direct sequencing and PCR-RFLP. *Ann Entomol Soc Am* 2009, 102(1): 347-353.
26. Bonfield JK, Staden R: Experiment files and their application during large-scale sequencing projects. *DNA. Seq* 1996, 6: 109–117.
27. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994, 22(22): 4673–4680.
28. Lecointre G: Que représente-t-on avec un arbre ? *Biosystema* 2011, 28: 9-40.
29. Tassy P, & Barriel V: L'homologie, l'arbre généalogique et le cladogramme : un apologue. *Bull Soc Zool Fr* 1995, 120: 361-378.
30. Kumar S, Tamura K, Nei M: MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004, 5(2): 150–163.
31. Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G: Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. *J Clin Microbiol* 2002, 40(5):1666-1669.
32. Clark CG, Martin DS, Diamond LS: Phylogenetic relationships among anuran trypanosomes as revealed by riboprinting. *J Eukaryot Microbiol* 1995, 42(1):92–96.
33. Sánchez-Seco MP, Echevarría JM, Hernández L, Estévez D, Navarro-Marí JM, Tenorio A: Detection and identification of Toscana and other phleboviruses by RT-nested-PCR assays with degenerated primers. *J Med Virol* 2003, 71(1):140-9.

34. Charrel RN, Izri A, Temmam S, Delaunay P, Toga I, Dumon H, *et al.* Cocirculation of 2 genotypes of Toscana virus, southeastern France. *Emerg Infect Dis* 2007, 13:465-8.
35. Fernandes AP, Nelson K, Beverley SM: Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. *PNAS* 1993, 90(24):11608-12.
36. Tesh RB, Chaniotis BN, Johnson KM: Vesicular stomatitis virus, Indiana serotype: multiplication in and transmission by experimentally infected phlebotomine sandflies (*Lutzomyia trapidoi*). *Am J Epidemiol* 1971, 93(6):491-5.
37. Tesh RB, Chaniotis BN, Johnson KM: Vesicular stomatitis virus (Indiana serotype): transovarial transmission by phlebotomine sandflies. *Science* 1972, 175(4029):1477-9.
38. Ferreira RC, De Souza AA, Freitas RA, Campaner M, Takata CS, Barrett TV, Shaw JJ, Teixeira MM: A Phylogenetic Lineage of Closely Related Trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of Anurans and Sand Flies (Psychodidae, Diptera) Sharing the Same Ecotopes in Brazilian Amazonia. *J Eukaryot Microbiol* 2008, 55(5):427-35.
39. Katakura K, Mimori T, Furuya M, Uezato H, Nonaka S, Okamoto M, Gomez L EA, Hashiguchi Y: Identification of *Endotrypanum* species from a sloth, a squirrel and *Lutzomyia* sandflies in Equateur by PCR amplification and sequencing of the mini-exon gene. *J Vet Med Sci* 2003, 65(5):649-53.

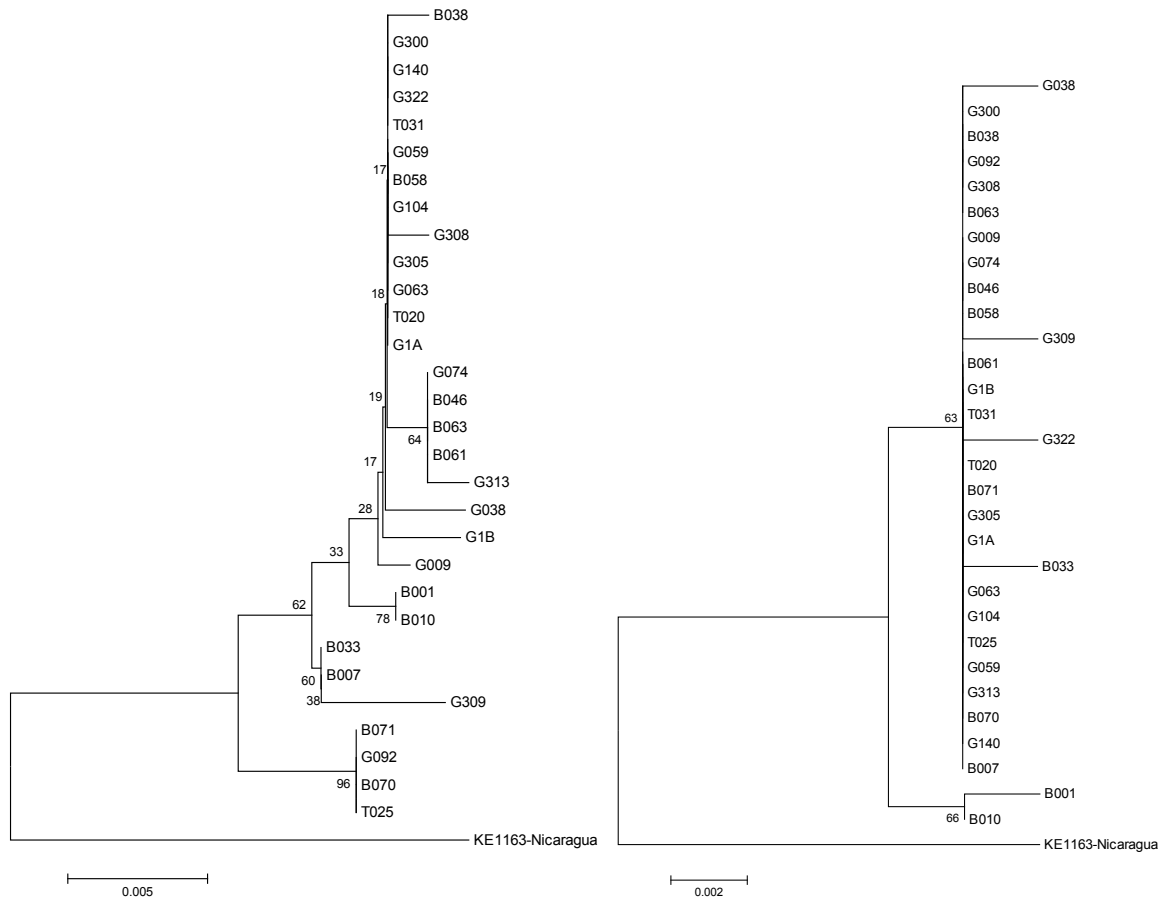


Figure 1. Neighbor joining trees obtained from nucleotide analysis of: A) COI mtDNA and B) cytochrome b mtDNA sequences of the 30 Equateurian specimens of *Nyssomyia trapidoi* and one from Nicaragua. Bootstrap values are shown in nodes (500 replicates).

A)

	1111222333334444445555666
	2358908992381334824888912349446
	1647920258155062767069202491283
B001	ACGAGCATAAGCAACCCCGAACAGCTAAACA
B010
B007	.T.....T.....
B033	.T.....T.....
B038	.T.....T.....G..
G309	.T...T.....TA.G.....
G322	.T.....G..
T020	.T.....G..
T031	.T.....G..
G038	.T.....TT.....G..
G059	.T.....G..
G063	.T.....G..
G074	.T.....G.....G..
G104	.T.....G..
G140	.T.....G..
G300	.T.....G..
G305	.T.....G..
G308	.T.....GG..
B058	.T.....G..
G1A	.T.....G..
B046	.T.....G.....G..
B061	.T.....G.....G..
B063	.T.....G.....G..
G313	.T.....G.....GT.
G009	.T.....A.....G..
G092	.T..A..G.....T.T...AT.....
B070	.T..A..G.....T.T...AT.....
B071	.T..A..G.....T.T...AT.....
T025	.T..A..G.....T.T...AT.....
G1B	.TA.....A.....G..
KE1163-Nicaragua	GTAG..GC.GATG.TT.T.G.TGA.AG...C

B)

	111122222234444
	3005602789963368
	1257572082791772

B001	TATGTCGCCAATTCCC
B010T.....
B007AT.....T
B033C.AT.....T
B038AT.....T
B046AT.....T
B058AT.....T
B061AT.....T
B063AT.....T
B070AT.....T
B071AT.....T
G1AAT.....T
G1BAT.....T
G009AT.....T
G038AT...G...T
G059AT.....T
G063AT.....T
G074AT.....T
G092AT.....T
G104AT.....T
G140AT.....T
G300AT.....T
G305AT.....T
G308AT.....T
G309AT..G...T
G313AT.....T
G322AT.G.....T
T020AT.....T
T025AT.....T
T031AT.....T
KE1163-Nicaragua	CGCA.TATA...CTT.

Figure 2. Variable nucleotides found in DNA sequence alignments. A) COI mt DNA (683 bp) and B) cytochrome *b* mtDNA (511bp). Identical bases are represented by dots. Numbers above indicate the positions in the nucleotide sequence.

Table 1. Phlebotomine sand fly species collected using two methods of capture

Genus	Species	Method of capture	Sex	Number of specimens	Percentage (%)
<i>Nyssomyia</i>	<i>trapidoi</i>	Human baits	♀	266	93
<i>Psychodopygus</i>	<i>panamensis</i>	Human baits	♀	12	4.2
<i>Lutzomyia</i>	<i>hartmanni</i>	Human baits	♀	8	2.8
<i>Nyssomyia</i>	<i>trapidoi</i>	CDC	♀	108	38.7
<i>Trichophoromyia</i>	<i>reburra</i>	CDC	♀	102	36.6
<i>Pressatia</i>	<i>dysponeta</i>	CDC	♀	18	6.5
<i>Psathyromyia</i>	<i>aragoi</i>	CDC	♀	15	5.4
<i>Psychodopygus</i>	<i>panamensis</i>	CDC	♀	12	4.3
<i>Lutzomyia</i>	<i>hartmanni</i>	CDC	♀	12	4.3
<i>Psathyromyia</i>	<i>abunaensis</i>	CDC	♀	6	2.2
<i>Psychodopygus</i>	<i>carrerae thula</i>	CDC	♀	6	2.2

Table 2. Allelic frequencies at the six polymorphic isoenzyme loci characterized in light and dark populations of *Nyssomyia trapidoi*. n : sample size; *P* : probability of χ^2 value occurring by chance, when testing for deviation from Hardy-Weinberg expectations of genotypes frequencies.

locus	Populations	
	<i>Nyssomyia trapidoi</i> LIGHT	<i>Nyssomyia trapidoi</i> DARK
PGI		
n	33	31
1	0.879	0.806
2	0.076	0.065
3	0.045	0.113
4	0.000	0.016
<i>P</i>	1.000	0.558
PGM		
n	33	32
1	0.803	0.891
2	0.015	0.000
3	0.182	0.109
<i>P</i>	0.077	0.306
HK		
n	33	31
1	0.955	1.000
2	0.015	0.000
3	0.030	0.000
<i>P</i>	1.000	-
FUM		
n	22	23
1	0.932	1.000
2	0.068	0.000
<i>P</i>	1.000	-
6 PGD		
n	22	23
1	0.932	0.848
2	0.023	0.022
3	0.023	0.109
4	0.023	0.022
<i>P</i>	1.000	1.000
MDH 2		
n	21	22
1	0.976	1.000
2	0.024	0.000
<i>P</i>	1.000	-

4.5 Résultats préliminaires relatifs à la détection d'un arbovirus sur un pool de *Psathyromyia abonnenci*.

Nous avons donc détecté un potentiel nouveau flavivirus dans un pool de 50 *Psathyromyia abonnenci* alors que tous les autres pools se sont révélés négatifs tant en Phlebovirus qu'en flavivirus. La séquence obtenue à l'aide des amorces Pan-Flavi PF1/ Pan-Flavi PF2 compte 195 nucléotides. Une première analyse de cette séquence nous a permis de mettre en évidence la proximité de notre échantillon avec Ilheus virus et Saint-Louis Encephalitis virus (R. Charrel, communication personnelle) (Tableau VIII)

Afin de préciser l'identité et la position systématique du virus isolé, des amplifications d'autres séquences sont en cours afin de réaliser une phylogénie plus robuste.

Un effort particulier est produit par nos collègues de Marseille en vue de cultiver ce virus.

Tableau XII Résultats des analyses moléculaires et culture cellulaire pour la détection de la présence de Phlebovirus et flavivirus

espèce et sexe (pools de 50 individus)	PCR sur les broyats						PCR sur les passages 1 sur Vero					
	N-Phlebo I	N-Phlebo II	SFN I	SFN II	Pan-Flavi PF1/PF2	Pan-Flavi PF2/PF3	N-Phlebo I	N-Phlebo II	SFN I	SFN II	Pan-Flavi PF1/PF2	Pan-Flavi PF2/PF3
<i>Nyssomyia trapidoi</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Nyssomyia trapidoi</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Nyssomyia trapidoi</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Nyssomyia trapidoi</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Nyssomyia trapidoi</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Nyssomyia trapidoi</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Nyssomyia trapidoi</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Nyssomyia trapidoi</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Nyssomyia trapidoi</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Nyssomyia trapidoi</i> ♂	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Trichophoromyia spp.</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Psathyromyia abonnenci</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Positif 21 ct	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Psychodopygus panamensis</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Psychodopygus panamensis</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Trichophoromyia reburra</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Trichophoromyia reburra</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Trichophoromyia reburra</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Psathyromyia aragai</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Psathyromyia aragai</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Psathyromyia aragai</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Trichophoromyia reburra</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Lutzomyia hartmanni</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>Lutzomyia hartmanni</i> ♀	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif

5. DISCUSSION GENERALE

L'objectif de cette thèse était, sur la base d'échantillonnages réalisés en Equateur par nous même et par des collègues, de combiner des approches de systématique à des approches épidémiologiques ou de santé publique. A ce titre, nous avons dans un premier temps proposé une systématique moléculaire des Psychodopygina. Dans un second temps, nous avons proposé des études de systématique moléculaire plus terminales. Le choix des taxons étudiés a été justifié par l'accès à un échantillonnage suffisamment pertinent. Ces approches concernaient les *Psychodopygus* de la série Guyanensis, *Psathyromyia aragaoi* et *Nyssomyia trapedoi*. Enfin, nos études épidémiologiques ont permis la mise en évidence d'*Endotrypanum monterogeei* chez *Nyssomyia trapedoi* et l'absence de portage de Phlebovirus chez cette dernière espèce. En revanche, nous mettons en évidence le portage d'un probable nouveau flavivirus chez *Psathyromyia abbonenci*.

En 1980, Ready et al. ont élevé les *Psychodopygus* au rang de genre, position certes justifiée mais relativement surprenante étant donné que le statut des autres groupes n'a pas été modifié. Ce n'est qu'ultérieurement que Galati (1995 ; 2010), en se basant sur des caractères morphologiques traités selon le principe de parcimonie, confirme la valeur de genre non seulement des *Psychodopygus* mais également d'un ensemble de taxons que Young & Duncan (1994) considéraient comme des sous-genres de *Lutzomyia*. La finalité de notre étude a donc été de tester la validité, c'est-à-dire la monophylie des groupes individualisés par Galati au sein des Psychodopygina.

La systématique moléculaire des Psychodopygina a été abordée par le couplage de deux marqueurs indépendants: une partie (D1, D2 et C2 de l'ARN ribosomal) et une partie du cytochrome b de l'ADN mitochondrial.

Notre échantillonnage compte 49 Psychodopygina. Il est représentatif de tous les genres et des principaux sous-genres et séries reconnus par Galati (2010), à savoir sept genres, trois sous genres et neuf séries (tableau 1 de l'article numéro 1). Le choix des extra groupes s'est porté sur un *Warileya* et un *Brumptomyia* qui sont extérieurs à la problématique.

Les arbres obtenus par la méthode de parcimonie montrent un niveau élevé d'homoplasie qui se reflète dans les valeurs des indices de cohérence: 0,55 pour les domaines D1, D2 et C2 et 0,32 pour le cytochrome b. Si ce niveau peut être relativement acceptable pour les domaines D1 et D2, il ne peut l'être pour le cytochrome b chez lequel on observe, en lien évident avec cette homoplasie, un pourcentage de 37,7 % de sites informatifs pour la parcimonie qui montre que ce marqueur n'est pas correctement adapté pour cette problématique phylogénétique. Cependant, les topologies des arbres obtenus sur la base des séquences de ces deux marqueurs donnent des topologies globalement comparables. Néanmoins la discussion de ces résultats est presque exclusivement basée sur l'arbre obtenu en D1-D2. Ce choix est également justifié par l'existence de phénomènes d'introgression connus chez les *Psychodopygina* (Marcondes et *al.* 1997; Testa et *al.* 2002) qui font considérer le marqueur ribosomal plus adapté pour résoudre cette problématique qu'un marqueur mitochondrial (Mas-Coma et Bargues, 2009).

Nos données montrent que le genre *Psychodopygus* constitue bien un groupe monophylétique, bien soutenu par les topologies des arbres obtenus autant par la parcimonie que par le Neighbor-Joining (NJ) et des valeurs élevées de bootstrap. Le genre *Psychodopygus* est organisé en six séries, parmi lesquelles les séries Guyanensis, Davisi et Panamensis sont représentées dans notre étude par au moins deux membres analyses. En revanche, les séries Chagasi, Arthuri et Bispinosus comptent un seul membre respectivement. Nos résultats montrent que la série Guyanensis est monophylétique parce que tous ses membres (*Ps. corossoniensis*, *Ps. luisleoni*, *Ps. francoisleponti* et *Ps. geniculatus*) sont groupés sur une même branche. Nous notons qu'il est surprenant que cette série s'appelle Guyanensis car les femelles de cette série sont considérées comme étant morphologiquement non différenciables. C'est l'identification des mâles qui permet la détermination des espèces. Or, *Ps. guyanensis* est connu de sa seule femelle. Le mâle demeure actuellement inconnu, ce qui rend particulièrement douteuse la validité de cette espèce, surtout à la lumière de la description récente d'espèces affines (Le Pont et Pajot, 1978 ; Le Pont et Desjeux, 1982 ; León et *al.* 2009 ; Zapata et *al.* 2012). En revanche, les séries Davisi et Panamensis sont paraphylétiques. Il n'est pas possible d'établir la monophylie ou la paraphylie des séries Chagasi, Arthuri et Bispinosus qui sont représentées par une seule espèce.

Nos données de parcimonie indiquent que le genre *Bichromomyia* est le groupe frère du genre *Psychodopygus*. Cependant, l'arbre obtenu par la méthode de NJ ne confirme pas cette position systématique qui mérite discussion. Cette espèce originale fut souvent considérée comme un *Nyssomyia* (Young & Duncan, 1994).

Selon la parcimonie, le genre *Martinsmyia* est paraphylétique. *Mt. brisolai* est l'espèce de frère de l'ensemble des autres *Psychodopygina* tandis que *Mt. alphabetica* est l'espèce sœur du clade qui regroupe les genres *Psychodopygus* et *Nyssomyia*, à l'exception de *Ny. richardwardi*.

Le genre *Nyssomyia* est paraphylétique en raison de la position de *Ny. richardwardi* qui s'insère parmi les *Trichophoromyia*. Les autres *Nyssomyia* s'organisent en deux clades. D'un côté, *Ny. whitmani*, *Ny. intermedia* et *Ny. neivai* qui sont très proches et chez lesquels des phénomènes d'introgression ont été rapportés (Marcondes et al. 1997; Mazzoni et al. 2006, 2008). Dans l'autre branche se trouvent *Ny. trapidoi*, *Ny. ylephiletor*, *Ny. yuilli pajoti*, *Ny. umbratilis* et *Ny. antunesi*.

Pour la même raison que précédemment, la position de *Ny. richardwardi* rend le genre *Trichophoromyia* paraphylétique.

Enfin, le genre *Psathyromyia* apparaît paraphylétique en raison d'une part de la position de *Pa. dasymera* (qui confirme également la paraphylie du sous-genre *Psathyromyia* représenté par *Pa. dasymera*, *Pa. lanei* et *Pa. Dendrophyla*) et de l'inclusion de *Viannamyia furcata* dans la descendance du dernier ancêtre commun aux *Psathyromyia* (hors *Pa. dasymera*). Les données morphologiques qui individualisent *Vi. furcata* sont relativement fragiles et méritent d'être réexaminées (Galati, communication personnelle). Enfin, le sous genre *Xiphomyia* est monophylétique.

Les récoltes réalisées dans la Station de Biodiversité de Tiputini, nous ont permis d'identifier deux morphotypes chez *Psychodopygus geniculatus* qui vivent en sympatrie avec des autres membres de la série Guyanensis : *Ps. luisleoni* et *Ps. corossoniensis*. Notre objectif était de caractériser ces morphotypes qui diffèrent par l'épaisseur du coxite (gros coxite et coxite fin). Pour y parvenir, nous avons utilisé des outils morphométriques et moléculaires.

L'analyse en composantes principales (PCA) et l'analyse discriminante linéaire (LDA) réalisées sur 9 variables mesurées chez 37 individus ont été informatives et ont individualisé une espèce nouvelle proche de *Ps. geniculatus*.

L'utilisation de deux marqueurs, un mitochondrial (cytochrome b) et un ribosomal (second espace interne transcrit « ITS-2 ») a également permis la caractérisation moléculaire de cette espèce nouvelle proche de *Ps. geniculatus* que nous avons nommée *Ps. francoisleponti*. L'arbre obtenu avec les séquences d'ITS-2 individualise clairement *Ps. francoisleponti*. L'arbre obtenu par l'analyse des séquences du cytochrome b montre l'existence d'introgression entre *Ps. francoisleponti* et *Ps. corossoniensis*. Comme nous l'avons précédemment mentionné, ce phénomène est fréquent chez les phlébotomes (Marcondes et al. 1997; Testa et al. 2002; Pesson et al. 2004) et constitue probablement une voie importante de spéciation.

L'analyse des séquences de l'ITS2 a montré une bonne corrélation avec les données morphologiques et morphométriques, suggérant que ce marqueur n'est pas affecté par le phénomène d'introgression. Ce résultat corrobore le risque d'utiliser exclusivement des marqueurs mitochondriaux pour reconstruire les relations phylogénétiques chez les phlébotomes. Ces données nous indiquent que nous sommes spectateurs d'un processus de spéciation récent ou en cours chez des populations sympatriques en Amazonie Equatorienne.

Des paramètres morphologiques et morphométriques permettent de différencier les deux espèces chez les mâles. En revanche, la différenciation des femelles est pratiquement impossible mais l'analyse des séquences des deux marqueurs nous a permis d'identifier deux femelles : l'une est celle de *Ps. geniculatus* et l'autre, celle de *Ps. francoisleponti*.

En ce qui concerne le travail mené sur *Psathyromyia aragai*, l'analyse morphologique de notre échantillonnage fait ressortir l'existence de différents morphotypes, à l'image de ce qui est connu dans la littérature (Young & Duncan, 1994, Dujardin et al. 2005) (figure 1 de l'article n°3). Nos exemplaires de Bolivie présentent tous un paramère homogène qu'ils partagent avec un exemplaire d'Equateur : KE651. Les autres spécimens d'Amazonie équatorienne présentent des paramères plus allongés avec une petite protubérance. Quant à l'exemplaire KE867 capturé sur la

côte Pacifique, il montre une morphologie particulière avec un tubercule inférieur volumineux (figure 2 de l'article n°3).

Les variations morphologiques observées chez les phlébotomes américains sont fréquentes (Dujardin *et al.* 2004). En ce qui concerne *Pa. aragaoi*, cette observation semble parfaitement justifiée et la question qui se pose est de savoir si ces variations correspondent à des populations différentes d'une même espèce ou à des espèces différentes. En 1994, Young et Duncan jugent cette variabilité allopatrique d'importance inconnue. En 2005, Dujardin *et al.* étudient deux morphotypes sympatriques différents par approche morphométrique et concluent, en l'absence de morphotype intermédiaire, à la probable existence d'espèces sympatriques différentes.

Dans notre étude, les arbres obtenus à partir des séquences de l'EF-1 α et du cytochrome b montrent des topologies identiques. Tous les exemplaires de Bolivie sont groupés, ce qui est en accord avec leur même morphotype et avec leur même origine géographique. En revanche, les spécimens d'Equateur ne sont pas regroupés ensemble. Le KE651 qui partage ce "morphotype bolivien" n'est pas regroupé avec ces derniers sur le plan moléculaire. Il est sur la même branche que l'exemplaire KE566 qui présente un paramère orné d'un petit tubercule semblable à ceux des deux spécimens moléculairement regroupés KE601 et KE647. Enfin, l'exemplaire provenant de la côte pacifique s'individualise très nettement de tous les autres exemplaires de Bolivie et d'Equateur. Ce dernier présente un tubercule très caractéristique, épais avec un gros processus inférieur. L'individualisation moléculaire et morphologique de ce spécimen est corroborée par son origine géographique. Capturé à l'ouest de la Cordillère des Andes, il illustre parfaitement le principe de spéciation par vicariance en cours ou passé.

Toutefois, cette congruence observée entre approches moléculaire et morphologique pour l'exemplaire capturé à l'ouest des Andes n'est pas systématique pour les autres exemplaires. Comme la transmission du marqueur EF-alpha suit les règles classiques, celle de l'ADN mitochondrial suit une transmission exclusivement maternelle. La similarité des topologies indique l'absence d'hybridation entre ces différentes lignées.

Ces différences morphologiques observées chez des exemplaires allopatriques voire sympatrique (à Tiputini) indique la vraisemblance de phénomènes de spéciation, notamment parce que les

variations morphologiques affectent l'appareil génital qui est considéré comme le principal caractère spécifique chez les Phlébotomes (Dujardin et *al.* 1999).

Cette étude pilote est limitée par un échantillonnage de petite taille mais vient à l'appui des travaux précédents et suggère que *Pa. aragaoi* pourrait être en réalité un complexe d'espèces. Dans l'avenir, ce travail devra être complété par un échantillonnage plus important qui devra nécessairement inclure des topotypes du Brésil. Ces derniers seront absolument nécessaires pour bien définir *Pa. aragaoi* s. st. lors de la description d'espèces nouvelles affines.

Quelques hypothèses ont guidé notre travail concernant le groupe des Psychodopygina qui inclut des genres dotés d'un grand intérêt médical.

Deux zones d'étude ont été principalement prospectées : Paraíso Escondido, localité rurale située sur la côte Pacifique considérée comme une zone endémique de leishmaniose tégumentaire et Tiputini, localité située dans le Parc National Yasuní en Amazonie, sélectionnée en raison de sa grande diversité biologique.

Nyssomyia trapedoi est considéré comme étant le principal vecteur de *L. (V). panamensis* et sa distribution couvre différentes provinces de la côte pacifique (Esmeraldas, Manabí, Pichincha, Guayas et El Oro) où la leishmaniose cutanée est endémique. En 1996, Dujardin et *al.* ont réalisé une enquête entomologique dans la localité de Paraíso Escondido et y ont décrit la présence de deux populations de *Ny. trapedoi* caractérisées par une pigmentation différente du corps (claire ou foncée). Les résultats de leur analyse isoenzymatique démontrent l'existence de deux possibles espèces jumelles chez *Ny. trapedoi* sans pour autant corrélérer de manière claire et nette ce résultat avec les différences de pigmentation observées.

Il est important de mettre en évidence la présence d'espèces jumelles ou de populations qui peuvent posséder des compétences vectorielles, et par conséquent des capacités vectorielles différentes pour la transmission du parasite, comme cela a été observé ou évoqué pour *Lu. longipalpis*, *P. longicuspis*, *P. (Larrousius) ariasi* (Maingon et *al.* 2003 ; Pesson et *al.* 2004 ; Lins et *al.* 2008 ; Franco et *al.* 2010). C'est la raison pour laquelle nous avons souhaité réexplorer, vingt ans plus tard, les résultats de Dujardin et *al.* (1996) en étudiant ces *Ny. trapedoi*

de Paraíso Escondido par couplage de l'approche isoenzymatique (comme dans l'étude originale) avec une approche moléculaire et épidémiologique. Avec une méthodologie légèrement différente, nous avons testé les mêmes systèmes isoenzymatique que Dujardin et *al.* (1996). Notre approche moléculaire s'est concentrée sur la comparaison de séquences de deux marqueurs mitochondriaux : le cytochrome b (cyt b) et le cytochrome C oxydase I (COI). Ces deux approches montrent la conspécificité des deux populations claire et foncée. Nous notons néanmoins une plus grande variation intraspécifique avec COI qu'avec cyt b.

D'un point de vue épidémiologique, la recherche d'ADN leishmanien initiée a débouché sur une prévalence de portage d'ADN de Trypanosomatidae de 11,5 % des femelles non gorgées. L'analyse des séquences obtenues montre une homologie de 99,8 à 100% avec celles d'*Endotrypanum monterogeei*, espèce à laquelle nous rapportons les ADN amplifiés à partir des femelles échantillonnées dans notre étude. Les genres *Endotrypanum* et *Leishmania* sont très proches au niveau moléculaire, ils partagent probablement les mêmes réservoirs et sont transmis par les mêmes phlébotomes (Fernandes et *al.* 1993; Ferreira et *al.* 2008). *E. monterogeei* a été identifié chez les réservoirs de *Leishmania* que sont *Choloepus hoffmanni* et *Sciurus granatensis* ainsi que chez les phlébotomes *Lutzomyia harmanni*, *Lu. gomezi* et *Psathyromyia dendrophyla* (Uezato et *al.* 2001; Katakura et *al.* 2003; Ferreira et *al.* 2008). Très peu de données épidémiologiques relatives à *E. monterogeei* sont aujourd'hui connues et nos résultats montrent que *Ny. trapidoi* est un vecteur potentiel d'*E. monterogeei*. La prévalence élevée que nous avons observée chez *Ny. trapidoi* indique une circulation probablement très active dans la région prospectée entre les réservoirs dont l'identité reste à préciser en raison de la diminution locale de la population des paresseux. Une telle prévalence nous ouvre des perspectives intéressantes pour le proche avenir avec le projet de tentative d'isolement de souches à Paraíso Escondido à partir de *Ny. trapidoi* et de divers réservoirs potentiels locaux dont l'abondance serait en adéquation avec l'importance de la prévalence observée chez les phlébotomes.

Par ailleurs, les tentatives de mise en évidence de traces moléculaires de phlebovirus et de flavivirus chez 550 femelles et 50 mâles de *Ny. trapidoi* s'est révélée infructueuse, tant par détection moléculaire que par culture cellulaire. Nos résultats ne plaident pas en faveur d'une quelconque implication dans la circulation de phlebovirus par *Ny. trapidoi* mais notre

échantillonnage est peut être trop faible pour exclure de manière définitive son rôle dans la transmission de tels agents. *Ny. trapidoi* donc doit toujours être considéré comme un vecteur du Vesiculovirus agent de la stomatite vésiculaire (Tesh et *al.* 1971 ; 1972).

Le résultat très récemment obtenu mettant en évidence le portage d'un flavivirus par *Pa. abonnenci* doit être poursuivi pour caractériser ce virus, le situer systématiquement et éventuellement le décrire si la mise en culture s'avère positive.

Ce dernier résultat, ainsi que la détection d'*Endotrypanum monterogeei* chez *Ny. trapidoi* nous incite à développer dans un proche avenir des missions sur le terrain pour isoler les pathogènes et les mettre en culture afin de connaître leurs rôles respectifs en épidémiologie.

6. CONCLUSIONS

Les résultats obtenus contribuent à une meilleure connaissance de la faune des phlébotomes d'Équateur. Ils ont permis la description d'une espèce nouvelle pour la science : *Psychodopygus francoisleponti*, basée sur des caractères morphologiques, morphométriques et moléculaires. De plus, nous avons mentionné 10 espèces nouvelles pour l'Équateur : *Sciopemyia preclara*, *Psathyromyia antezanai*, *Psa. brasiliensis*, *Psa. coutinhoi*, *Psa. lutziana*, *Psa. pradobarrientosi*, *Psychodopygus corossoniensis*, *Nyssomyia antunesi*, *Trichophoromyia velascoi* et *Th. sinuosa*.

Par ailleurs, nous avons testé les hypothèses de Galati (1995) sur la classification de la sous-tribu des Psychodopygina en utilisant des marqueurs moléculaires mitochondriaux et ribosomiques. Les arbres obtenus montrent la monophylie du genre *Psychodopygus* et des sous-genres *Psathyromyia* et *Xiphomyia* ainsi que la paraphylie des genres *Nyssomyia*, *Trichophoromyia* et *Vianniamyia*.

En ce qui concerne, *Nyssomyia trapidoi* le vecteur principal de la leishmaniose cutanée en Équateur, les données moléculaires et izoenzymatiques montrent que la probabilité de l'existence de deux espèces jumelles décrites en 1996 pour Dujardin et coll. est très faible. En revanche, 11.5% des femelles testées étaient porteuses de l'ADN d'*Endotrypanum monterogeei* dont la position taxonomique est très proche des *Leishmania*. Ce Kinetoplastida a été isolé par d'autres équipes du paresseux et d'autres phlébotomes mais son cycle biologique n'est pas encore clairement documenté.

Enfin, *Psathyromyia abbonenci* a été trouvé porteur d'un nouveau virus proche du virus Iléhus de celui de l'encéphalite de Saint Louis. Nous proposons de le nommer Paráiso Escondido Virus en raison de la localité où il a été isolé, selon les règles en usage pour la nomenclature des arbovirus.

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABONNENC E.

Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera: Phlebotomidae).
Mémoire de l'ORSTOM 1972; 55:1-289.

ALA-VEDRA JT.

El botón de Oriente en el Equateur. Paper presented at the IV Congreso de Medicina y I de Cirugía Ecuatorianos, I Jornada Pediátrica Ecuatoriana. Guayaquil:
Universidad de Guayaquil; 1952:1-23.

ALEXANDER JB, TAKAOKA H, ESHITA Y, GOMEZ EA, HASHIGUCHI Y.

New records of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Equateur.
Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87:123-130.

ARMIJOS RX, WEIGEL MM, IZURIETA R, RACINES J, ZURITA C, HERRERA W, VEGA M.

The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in subtropical Equateur.
Trop Med Int Health 1997; 2(2):140-52.

ARMIJOS RX, WEIGEL MM, ROMERO L, GARCIA V, SALAZAR J.

Field trial of a vaccine against new world cutaneous leishmaniasis in an at-risk child population: how long does protection last?
J Infect Dis 2003; 187(12):1959-61.

ARMIJOS RX, WEIGEL MM, CALVOPINA M, HIDALGO A, CEVALLOS W, CORREA J.

Safety, immunogenicity, and efficacy of an autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous leishmaniasis.
Vaccine 2004; 22(9-10):1320-26.

ASATO Y, OSHIRO M, MYINT CK, YAMAMOTO Y, KATO H, MARCO JD, MIMORI T, GOMEZ EA, HASHIGUCHI Y, UEZATO H.

Phylogenic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing.

Exp Parasitol 2009; 121(4):352-61.

ASHFORD RW.

The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses.

Int J Parasitol 2000; 30(12-13):1269-81.

BAÑULS AL, JONQUIERES R, GUERRINI F, LE PONT F, BARRERA C, ESPINEL I, GUDERIAN R, ECHEVERRIA R, TIBAYRENC M.

Genetic analysis of *Leishmania* parasites in Equateur: are *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (V.) guyanensis* distinct taxa?

Am J Trop Med Hyg 1999; 61(5):838-45.

BARRERA C, HERRERA M, MARTINEZ F, LEON R, RICHARD A, GUDERIAN RH, MOUCHET J, ECHEVERRIA R, LE PONT F.

Leishmaniasis in Equateur. 1. Incidence of cutaneous leishmaniasis on the Pacific coast. Ann Soc Belg Med Trop 1994; 74(1):1-12.

BONFIELD, JK, STADEN R.

Experiment files and their application during large scale sequencing projects.

DNA Seq 1996; 6:109-17.

BOUDABOUS R, BOUNAMOUS A, JOUET D, DEPAQUIT J, AUGOT D, FERTE H, BERCHI S, COULOUX A, VEUILLE M, BABBA A.

Mitochondrial DNA differentiation between two closely related species, *Phlebotomus (Paraphlebotomus) chabaudi* and *Phlebotomus (Paraphlebotomus) riouxi* (Diptera: Psychodidae), based on direct sequencing and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism.

Ann Entomol Soc Am 2008; 102:1- 6.

BOUSSAA S.

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

Thèse doctorale : Strasburg : 2008.

CALERO G, HEINERT JM, MARTINEZ RL.

Leishmaniasis cutaneo mucosa: reporte de dos casos de la amazonia ecuatoriana.

Dermatol Ecuat 1986; 1:26-29.

CALVOPINA M, GUEVARA A, ARMIJOS R, HASHIGUCHI Y. Clinical features of mucocutaneous leishmaniasis in the amazonian region of Equateur. In: Studies on the New World Leishmaniasis and its Transmission with Particular Reference to Equateur.

Res Rep Series 2001; 6:82-89.

CALVOPÍÑA M, ARMIJOS RX, HASHIGUCHI Y.

Epidemiology of leishmaniasis in Equateur: current status of knowledge a review.

Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99:663-672.

CALVOPINA M, GOMEZ EA, UEZATO H, KATO H, NONAKA S, HASHIGUCHI Y. Atypical clinical variants in New World cutaneous leishmaniasis: disseminated, erysipeloid, and recidiva cutis due to *Leishmania (V.) panamensis*.

Am J Trop Med Hyg 2005; 73(2):281-4.

CALVOPINA M, ARMIJOS RX, MARCO JD, UEZATO H, KATO H, GOMEZ EA, KORENAGA M, BARROSO PA, MIMORI T, COOPER PJ, NONAKA S, HASHIGUCHI Y.

Leishmania isoenzyme polymorphisms in Equateur: relationships with geographic distribution and clinical presentation.

BMC Infect Dis 2006; 6:139.

CALVOPÍÑA M, ATHERTON R, KATO H, YANAMOTO Y, GEBB M, GUEVARA A, HASHIGUCHI Y.

Visceral Leishmaniasis in Equateur: Seroepidemiological Survey of Human and Canine Infection in the Equateurian Amazon. A Pilote Study. In Studies on New World Leishmaniasis and its Transmission with Particular Reference to Equateur.

Res Rep Series 2007; 8: 157-162.

COSTA FO, DEWAARD JR, BOUTILLIER J, RATNASINGHAM S, DOOH RT, HAJIBABAEI M, HEBERT PDN.

Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea.

Can J Fish Aquat Sci 2007; 64:272-95.

DAVIES CR, REITHINGER R, CAMPBELL-LENDRUM D, FELICIANGELI D, BORGES R, RODRIGUEZ N.

The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries.

Cad Saude Publica. 2000; 16(4):925-50.

DEPAQUIT J, PERROTEY S, LECOINTRE G, TILLIER A, TILLIER S, FERTÉ H, KALTENBACH M, LÉGER N.

(Molecular systematics of Phlebotominae: A pilot study. Paraphyly of the genus *Phlebotomus*.)

C R Acad Sci III. 1998; 321:849-55.

DEPAQUIT J, FERTÉ H, LÉGER N, KILLICK-KENDRICK R, RIOUX JA, KILLICK-KENDRICK M, HANAFI HA, GOBERT S.

Molecular systematics of the phlebotomine sand flies of the subgenus *Paraphlebotomus* (Diptera, Psychodidae, *Phlebotomus*) based on ITS2 rDNA sequences. Hypotheses of dispersion and speciation.

Insect Mol Biol 2000; 9:293–300.

DEREURE J, ESPINEL I, BARRERA C, GUERRINI F, MARTINI A, ECHEVERRIA R, GUDERIAN RH, LE PONT F.

Leishmaniasis in Equateur. 4. Natural infestation of the dog by *Leishmania panamensis*.
Ann Soc Belg Med Trop 1994; 74(1):29-33.

DESJEUX P.

Leishmaniasis: current situation and new perspectives.
Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004; 27(5): 305-318.

DESJEUX P.

The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide.
Trans R Soc Trop Med Hyg 2001; 95(3):239-43.

DUJARDIN JP, LE PONT F, CRUZ M, LEON R, TARRIEU F, GUDERIAN R, TIBAYRENC M.

Cryptic speciation in *Lutzomyia (Nyssomyia) trapidoi* (Fairchild and Hertig) (Diptera: Psychodidae) detected by multilocus enzyme electrophoresis.
Am J Trop Med Hyg 1996; 54:42-5.

DUJARDIN JP, LE PONT F, GALATI EAB. Cryptic speciation suspected by morphometry in sandfly (Diptera: Phlebotominae).

Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Life Sci 1999; 322:375–82.

DUJARDIN JP, LE PONT F.

Geographic variation of metric properties within the neotropical sandflies.
Infect Genet Evol 2004; 4(4):353-9.

DUJARDIN JP, LE PONT F, MATIAS A, DE LA RIVA JX.

Morphometrical evidence for speciation within Bolivien *Lutzomyia aragaoi* (Diptera: Psychodidae).

Infect Genet Evol 2005; 5(4):362-5.

ESSEGHIR S, READY PD, KILLICK-KENDRICK R, BEN-ISMAIL R.

Mitochondrial haplotypes and phylogeography of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*.
Insect Mol Biol 1997; 6:211–25.

ESSEGHIR S, READY PD.

Speciation of *Phlebotomus* sandflies of the subgenus *Larroussius* coincided with the late Miocene-Pliocene aridification of the Mediterranean subregion.
Biological Journal of Linnean Society 2000; 70:189-219.

FAIRCHILD GB, HERTIG M.

Notes on the *Phlebotomus* of Panama. XVI. (Diptera, Psychodidae). Description of new and little-known species from Panama and Central America.
Ann Entomol Soc Amer 1961; 54: 237-55.

FERNANDES AP, NELSON K, BEVERLEY SM.

Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism.
PNAS 1993; 90(24):11608-12.

FERREIRA RC, DE SOUZA AA, FREITAS RA, CAMPANER M, TAKATA CS, BARRETT TV, SHAW JJ, TEIXEIRA MM.

A Phylogenetic Lineage of Closely Related *Trypanosomes* (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of Anurans and Sand Flies (Psychodidae, Diptera) Sharing the Same Ecotopes in Brazilian Amazonia.
J Eukaryot Microbiol 2008; 55(5):427-35.

FERRETTI HZ, DE FERRETTI MIB, DE RAMIREZ B.

Leishmaniasis ganglionar: reporte de un caso.
Dermatol Ecuat 1986; 1:30-34.

FRANCO FA, MORILLAS-MÁRQUEZ F, BARÓN SD, MORALES-YUSTE M, GÁLVEZ R, DÍAZ V, PESSON B, ALVES-PIRES C, DEPAQUIT J, MOLINA R, AFONSO MO, GÁLLEGO M, GUERNAOUI S, BOUNAMOUS A, MARTÍN-SÁNCHEZ J.

Genetic structure of *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* populations, the vector of *Leishmania infantum* in the western Mediterranean: epidemiological implications.

Int J Parasitol 2010; 40:1335-46.

GALATI EAB.

Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) Classificação, Morfologia, Terminologia e Identificação de Adultos. Apostila Disciplina HEP 5752 Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. Vol. I. Departamento de Epidemiologia Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo São Paulo, SP, Brasil. 2010.

GALATI EAB.

Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera:Psychodidae) with emphasis on American groups.

Bol Dir Malariol Saneamient Ambient 1995; 35:133-142.

GOUÿ DE BELLOCQ J, FERTE H, DEPAQUIT J, JUSTINE JL, TILLIER A, DURETTE-DESSET MC.

Phylogeny of the Trichostrongylina (Nematoda) inferred from 28S rDNA sequences.

Mol Phylogenet Evol 2001; 19:430-42.

GRIMALDI JR G, KREUTZER RD, HASHIGUCHI Y, GOMEZ EA, MIMORY T, TESH RB.

Description of *Leishmania equatorensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting arboreal mammals in Equateur.

Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87(2):221-8.

GUDERIAN RH, CHICO ME, ROGERS MD, PATTISHALL KM, GROGL M, BERMAN JD.

Placebo controlled treatment of Equateurian cutaneous leishmaniasis.

Am J Trop Med Hyg 1991; 45(1):92-7.

GUINDON S DUFAYARD JF, LEFORT V, ANISIMOVA M, HORDIJK W, GASCUEL O.

New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0.

Syst Biol 2010; 59:307-21.

HASHIGUCHI Y, GÓMEZ LANDIRES EA, DE CORONEL VV, MIMORI T, KAWABATA M.

Natural infections with promastigotes in man-biting species of sand flies in leishmaniasis-endemic areas of Equateur.

Am J Trop Med Hyg 1985a; 34 (3):440-6.

HASHIGUCHI Y, GOMEZ EA, DE CORONEL VV, MIMORI T, KAWABATA M. *Leishmania* isolated from wild mammals caught in endemic areas of leishmaniasis in Equateur.

Trans R Soc Trop Med Hyg 1985b; 79 (1):120-1.

HASHIGUCHI Y, GÓMEZ EAL, DE CORONEL VV, MIMORI T, KAWABATA M. Leishmaniasis in different altitudes on Andean slope of Equateur.

Jpn J Trop Med Hyg 1987; 15:7-15.

HASHIGUCHI Y.

Studies on New World leishmaniasis and its transmission, with particular reference to Equateur.

Res Rep Series 1987; 1:1-174.

HASHIGUCHI Y, GÓMEZ LANDIRES EA.

A review of leishmaniasis in Equateur.

Bull Pan Am Health Organ 1991; 25(1):64-76.

HASHIGUCHI Y, GOMEZ E, KATO H, MIMORI T, UEZATO H.

Why are there so many differences in “Uta” between Peruvian and Equatorial regions of the Andes? A brief bibliographic review and comments. In Studies on New World Leishmaniasis and its Transmission with Particular Reference to Equateur.

Res Rep Series 2007; 8:112-132.

INSTITUTO ECUATORIANO DE ESTADÍSTICAS Y CENSOS

[consulté le 10/03/2012].

Disponible à partir de l'URL: <http://www.inec.gob.ec/estadisticas/>

INSTITUTO GEOGRÁFICO MILITAR

[consulté le 10/03/2012].

Disponible à partir de l'URL: <http://www.igm.gob.ec>

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGÍA E HIDROLOGÍA

[Consulté 10/03/2012].

Disponible à partir de l'URL: http://www.inamhi.gov.ec/meteorologia/eclimaticos_caracteristicas.htm

KASSEM HA, FRYAUFF DJ, EL SAWAF BM, SHEHATA MG, SHOUMAR NF
Electrophoretic comparison of the *Leishmania* vectors *Phlebotomus papatasi* and *P. langeroni* (Diptera: Psychodidae).

J Med Entomol 1990; 27:592-601.

KATAKURA K, MATSUMOTO Y, GOMEZ EA, FURUYA M, HASHIGUCHI Y. Molecular karyotype characterization of *Leishmania panamensis*, *Leishmania mexicana*, and *Leishmania major*-like parasites: agents of cutaneous leishmaniasis in Equateur.

Am J Trop Med Hyg 1993; 48(5):707-15.

KATAKURA K, KAWAZU SI, SANJYOKA C, NAYA T, MATSUMOTO Y, ITO M, NAGAKURA K, AIKAWA M, HASHIGUCHI Y.

Leishmania mini-exon genes for molecular epidemiology of leishmaniasis in China and Equateur.

Tokai J Exp Clin Med 1998; 23(6):393-9.

KATAKURA K, MIMORI T, FURUYA M, UEZATO H, NONAKA S, OKAMOTO M, GOMEZ L EA, HASHIGUCHI Y.

Identification of *Endotrypanum* species from a sloth, a squirrel and *Lutzomyia* sandflies in Equateur by PCR amplification and sequencing of the mini-exon gene.

J Vet Med Sci 2003; 65(5):649-53.

KATO H, UEZATO H, KATAKURA K, CALVOPÍÑA M, MARCO JD, BARROSO PA, GOMEZ EA, MIMORI T, KORENAGA M, IWATA H, NONAKA S, HASHIGUCHI Y.

Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Equateur by a polymerase chain reaction.

Am J Trop Med Hyg 2005; 72(1):87-93.

KATO H, GOMEZ EA, YAMAMOTO Y, CALVOPÍÑA M, GUEVARA AG, MARCO JD, BARROSO PA, IWATA H, HASHIGUCHI Y.

Natural infection of *Lutzomyia tortura* with *Leishmania (Viannia) naiffi* in an Amazonian area of Equateur.

Am J Trop Med Hyg 2008a; 79(3):438-40.

KATO H, CÁCERES AG, GOMEZ EA, MIMORI T, UEZATO H, MARCO JD, BARROSO PA, IWATA H, HASHIGUCHI Y.

Molecular mass screening to incriminate sand fly vectors of Andean-type cutaneous leishmaniasis in Equateur and Peru.

Am J Trop Med Hyg 2008b; 79(5):719-21.

KATO H, GOMEZ EA, CÁCERES AG, UEZATO H, MIMORI T, HASHIGUCHI Y. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis.

Int J Environ Res Public Health 2010; 7(3):814-26.

KATO H, UEZATO H, GOMEZ EA, TERAYAMA Y, CALVOPÍÑA M, IWATA H, HASHIGUCHI Y.

Establishment of a mass screening method of sand fly vectors for *Leishmania* infection by molecular biological methods.

Am J Trop Med Hyg 2007; 77(2):324-9.

KAYE P, SCOTT P.

Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface.

Nat Rev Microbiol 2011; 9(8):604-15.

KILLICK-KENDRICK R.

Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review.

Med. Vet. Entomol. 1990; 4:1-24.

KUMAR S, TAMURA K, NEI M.

MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment.

Brief. Bioinform 2004; 5:150–63.

LE PONT F, PAJOT FX.

Lutzomyia (Psychodopygus) corossoniensis n. sp. (Diptera: Psychodidae) nouveau Phlébotome découvert en Guyane Française.

Cah. O.R.S.T.O.M. Ser Eni Med Parasit 1978; 16:223-6.

LE PONT F, DESJEUX P.

Psychodopygus dorlinsis n. sp. (Diptera: Psychodidae) nouveau Phlébotome de Guyane Française. Description du mâle.

Cab. O.R.S.T.O.M. Ser. Ent Med Parasit 1982; 20:279-83.

LE PONT F, LEON R, MOUCHET R, ECHEVERRIA R, GUDERIAN RH.

Leishmaniose en Equateur. 2. Contacts Homme/vecteurs de Leishmaniose: Cas de *Lutzomyia trapidoi* et *Lu. gomezi*.

Ann Soc Belg Med Trop 1994a; 74(1): 13-21.

LE PONT F, BARRERA C, CACERES AL, GALATI EA, JARRA O, RIOFRIO AR, MOUCHET J, ECHEVERRIA R, GUDERIAN RH. Leishmaniasis in Equateur. 6. Epidemiological and entomological note on the focus of leishmaniasis in Zumba.

Ann Soc Belg Med Trop 1994c; 74(1):43-9.

LE PONT F, LEON R, GUERRINI F, GANTIER JC, MOUCHET J, ECHEVERRIA R, GUDERIAN RH.

Leishmaniasis in Equateur. 3. *Lutzomyia trapidoi*, vector of *L. panamensis*.

Ann Soc Belg Med Trop 1994b; 74(1): 23-28

LÉGER N. & DEPAQUIT J. Systématique et biogéographie des Phlébotomes (Diptera: Psychodidae). Annales de la Société Entomologique de France, 2002, 38: 163-175.

LEÓN JB.

Equateur en el mundo: manual ilustrado de geografía,
Grupo de Comunicación El Comercio. 2005: pp 1-32.

LEÓN R, MOLLINEDO S, LE PONT F.

Phlébotomes d'Equateur et de Bolivie: descriptions de *Psathyromyia castilloi* n. sp. et *Psychodopygus luisleoni* n. sp. (Diptera, Psychodidae).

Bull Soc Entomol France 2009; 114:83-9.

LEWIS DJ, YOUNG DG, FAIRCHILD GB, MINTER DM.

Proposals for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae).

Syst. Ent 1977; 2:319-32.

LINS RM, SOUZA NA, PEIXOTO AA.

Genetic divergence between two sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in the paralytic gene, a locus associated with insecticide resistance and lovesong production.

Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; 103(7):736-40.

MAINGON RD, WARD RD, HAMILTON JG, NOYES HA, SOUZA N, KEMP SJ, WATTS PC.

Genetic identification of two sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceará State, Brasil.

Mol Ecol 2003; 12(7):1879-94.

MARCONDES CB, DAY JC, READY PD.

Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *Lu. neivai* and *Lu. whitmani*, and their roles as vectors of *Leishmania Brasiliensis*.

Trans R Soc Trop Med Hyg 1997; 91:725–726.

MAS-COMA S, BARGUES MD.

Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA.

Acta Trop 2009; 110:112-36.

MATSUMOTO T, HASHIGUCHI Y, GOMEZ EA, CALVOPÍÑA MH, NONAKA S, SAYA H, MIMORI T.

Comparison of PCR results using scrape/exudate, syringe-sucked fluid and biopsy samples for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Equateur.

Trans R Soc Trop Med Hyg 1999; 93(6):606-7.

MAZZONI CJ, ARAKI AS, FERREIRA GE, AZEVEDO RV, BARBUJANI G, PEIXOTO AA.

Multilocus analysis of introgression between two sand fly vectors of leishmaniasis.

BMC Evol Biol. 2008; 8:141.

MAZZONI CJ, SOUZA NA, ANDRADE-COELHO C, KYRIACOU CP, PEIXOTO AA.

Molecular polymorphism, differentiation and introgression in the period gene between *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani*.

BMC Evol Biol. 2006; 27:6:85.

METROPOLITANG TOURING.

[consulté le 10/03/2012].

Disponible à partir de l'URL: <http://www.metropolitantouring.com>

MIMORI T, HASHIGUCHI Y, KAWABATA M, GOMEZ EA, DE CORONEL VV.

The relationship between severity of ulcerated lesions and immune responses in the early stage of cutaneous leishmaniasis in Equateur.

Ann Trop Med Parasitol 1987; 81:681-85.

MIMORI T, GRIMALDI Jr.G, KREUTZER RD, GOMEZ EA, McMAHON-PRATT D, TESH RB, HASHIGUCHI Y.

Identification of *Leishmania* isolates from humans and wild animals in Equateur, using isoenzyme electrophoresis and monoclonal antibodies.

Am J Trop Med Hyg 1989; 40:156-60.

MIMORI T, SASAKI J, NAKATA M, GOMEZ EA, UEZATO H, NONAKA S, HASHIGUCHI Y, FURUYA M, SAYA H.

Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction.

Gene. 1998; 210(2):179-86.

MIMORI T, MATSUMOTO T, CALVOPÍÑA MH, GOMEZ EA, SAYA H, KATAKURA K, NONAKA S, SHAMSUZZAMAN SM, HASHIGUCHI Y.

Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World.

Acta Trop 2002; 81(3):197-202.

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA DEL EQUATEUR,(MSP)

Av. República del Salvador 36-64 y Suecia, Quito-Equateur.

NICOLAS L, PRINA E, LANG T, MILON G.

Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues.

J Clin Microbiol 2002; 40(5):1666-69.

NONAKA S, HOSOKAWA A, MARUNO M, HASHIGUCHI Y.

Clinical survey of cutaneous leishmaniasis in Equateur. In: Studies on the New World Leishmaniasis and its Transmission with Particular Reference to Equateur.

Res Rep Series 6. 2001; 69–81.

PARVIZI P, ASSMAR M.

Nuclear Elongation Factor-1 α Gene A Molecular Marker for Iranian Sandfly Identification.

Iranian J Publ Health 2007; 36(2):25-37.

PASTEUR N, PASTEUR G, BONHOMME F, CATALAN J, BRITTON-DAVIDIAN J.

Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines.

Paris, éd. Lavoisier (Technique et Documentation) 1987: 217p.

PESSON B, READY JS, BENABDENNBI I, MARTÍN-SÁNCHEZ J, ESSEGHIR S, CADI-SOUSSI M, MORILLAS-MARQUEZ F, READY PD.

Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif.

Med Vet Entomol 2004; 18(1):25-37.

RAYMOND M, ROUSSET F.

GENEPOP Version 1.2.: population genetics software for exact test and ecumenicism.

J Hered 1995; 86:248–9.

READY PD, FRAIHA H, LAINSON R, SHAW JJ.

Psychodopygus as a genus: reasons for a flexible classification of the phlebotomine sand flies (Diptera:Psychodidae).

J. Med. Entomol 1980; 17:75–88.

REITHINGER R, DUJARDIN JC, LOUZIR H, PIRMEZ C, ALEXANDER B, BROOKER S.
Cutaneous leishmaniasis.
Lancet Infect Dis 2007; 7(9):581-96.

REYNA E, DE AROCA M, CASTILLO A, GOMEZ E, NONAKA S, KATAKURA K,
FURUYA M, HOSOKAWA A, HASHIGUCHI Y.
Diffuse cutaneous leishmaniasis: The first report of a parasitologically confirmed case in
Ecuator. In Studies on New World Leishmaniasis and its Transmission with Particular
Reference to Ecuator.
Res Rep Series 1994; 4:85-92.

ROUGERON V, DE MEEÛS T, HIDE M, WALECKX E, DEREURE J, AREVALO J,
LLANOS-CUENTAS A, BAÑULS AL.
A battery of 12 microsatellite markers for genetic analysis of the *Leishmania (Viannia)*
guyanensis complex.
Parasitology 2010; 137(13):1879-84.

SERVICIO NACIONAL DE CONTROL DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR
VECTORES ARTROPODOS (SNEM)
Calle 10 y av. 6 frente a la Cdla. Naval norte, Guayaquil-Ecuator.

SIERRA R.
Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuator continental
Proyecto INEFAN/GEF-BIRF y EcoCiencia 1999; pp 58-82

SWOFFORD DL, SELANDER RB.
BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in
population genetics and systematics.
J Hered 1981; 72:281-3.

SWOFFORD DL.

PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version PAUP*4.0.

Smithsonian Institution Press, Washington DC, USA, 2002.

TERAYAMA Y, KATO H, GOMEZ EA, UEZATO H, CALVOPÍÑA M, IWATA H, HASHIGUCHI Y.

Molecular typing of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from areas endemic for Leishmaniasis in Equateur by PCR-RFLP of 18S ribosomal RNA gene.

J Vet Med Sci 2008; 70(9):907-13.

TESH RB, CHANIOTIS BN, JOHNSON KM.

Vesicular stomatitis virus, Indiana serotype: multiplication in and transmission by experimentally infected phlebotomine sandflies (*Lutzomyia trapidoi*).

Am J Epidemiol 1971; 93(6):491-5.

TESH RB, CHANIOTIS BN, JOHNSON KM.

Vesicular stomatitis virus (Indiana serotype): transovarial transmission by phlebotomine sandflies.

Science 1972, 175(4029):1477-9.

TESTA JM, MONTOYA-LERMA J, CADENA H, OVIEDO M, READY PD.

Molecular identification of vectors of *Leishmania* in Colombia: mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townsendi* series.

Acta Trop 2002; 84:205-18.

THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ. CLUSTAL W:

Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice.

Nucleic Acids Res. 1994; 22:4673-80.

TIPOS DE VEGETACION DEL EQUATEUR.

[consulté le 10/03/2012].

Disponible à partir de l'URL: <http://www.zonu.com/detail/2011-11-04-14850/Tipos-de-vegetacion-del-Equateur-1999.html>

UEZATO H, MARUNO M, KHASKHELY NM, NONAKA S, OSHIRO M, KARIYA K, KATAKURA K, MIMORI T, GOMEZ EA, SHAMSUZZAMAN SM, HASHIGUCHI Y. Detection of *Endotrypanum* using PCR and Southern blotting. In Studies on New World Leishmaniasis and its Transmission with Particular Reference to Equateur.

Res Rep Series 2001; 6:17-25.

World Health Organization, Control of the leishmaniasis.

Report N° 949, 2010.

YOUNG DC, ROGERS TE.

The phlebotomine sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) of Equateur.

J Med Entomol 1984; 21:597-611.

YOUNG DG, DUNCAN MA.

Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae).

Mem Ann Entomol Institut 1994; 54: 1-88.

ZAPATA S, LEÓN R, SAUVAGE F, AUGOT D, TRUEBA G, CRUAUD C, COULOUX A, TERÁN R, DEPAQUIT J.

Morphometric and molecular characterization of the series Guyanensis (Diptera, Psychodidae, *Psychodopygus*) from the Equateurian Amazon Basin with description of a new species.

Infect Genet Evol 2012; 12(5):966-77.