

Bulinus sp : Epidémiologie moléculaire, structure génétique et phylogénie dans trois pays africains. Interactions avec le genre Schistosoma

Rima Zein-Eddine

▶ **To cite this version:**

Rima Zein-Eddine. Bulinus sp : Epidémiologie moléculaire, structure génétique et phylogénie dans trois pays africains. Interactions avec le genre Schistosoma. Santé publique et épidémiologie. Ecole Doctorale n°523 Gay Lussac "Sciences pour l'environnement", 2014. Français. NNT : 2014LIMO330C . tel-01287792

HAL Id: tel-01287792
https://unilim.hal.science/tel-01287792

Submitted on 14 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE : SCIENCES POUR L'ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE : UMR INSERM 1094

COMPOSANTE : PHARMACIE

Thèse N° [……]

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Biologie des organismes : Phylogénie, Structure génétique des populations, Evolution

Présentée et soutenue publiquement par

Rima Zein Eddine

le 25 Juin 2014

***Bulinus* sp :**
Epidémiologie moléculaire, structure génétique et phylogénie dans trois pays africains. Interactions avec le genre *Schistosoma*

Thèse co-dirigée par Gilles Dreyfuss
Félicité Flore Djuikwo-Teukeng

JURY :

Rapporteurs

Mme Sylvie Hurtrez, Maître de conférences de l'université de Montpellier 2 (France)

Mme Tine Huyse, docteur de l'université de Louvain (Belgique)

Examinateurs

Mme Marie-Laure Dardé, Professeur, université de Limoges (France)

M. Jean Pierre Pointier, Professeur, EPHE Perpignan (France)

Directeurs

Mme Félicité Flore Djuikwo-Teukeng, Docteur de l'université des Montagnes (Cameroun)

M. Gilles Dreyfuss, Professeur, université de Limoges (France)

Université de Limoges

Dédicace

Je dédie cette thèse à

ma mère qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation

mon père, qui m'a indiqué la bonne voie

rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

mes sœurs : Rola, Rania, Fatima et Feinal,

mon frère : Mohamad

Mon ange gardien et mon fidèle compagnon dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse

Remerciements

A l'issue de la rédaction de cette recherche, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes.

Tout d'abord, je voudrais remercier Madame Tine Huyse et Madame Sylvie Hurtrez d'avoir accepté de relire cette thèse et d'en être rapporteurs. Je remercie également tous les membres du jury d'avoir accepté d'assister à la présentation de ce travail.

Je tiens à remercier sincèrement le Pr. Gilles Dreyfuss, mon directeur de thèse, pour m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de l'UMR INSERM 1094 Neuroépidémiologie Tropicale et Comparée, et dont les qualités humaines et professionnelles m'ont marquée. Il s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce travail.

J'adresse également un remerciement tout particulier au Dr. Félicité Flore Djuikwo Teukeng pour son encadrement, ses conseils, sa confiance, la gentillesse avec laquelle elle a su me faire partager ses connaissances, et le temps qu'elle a bien voulu me consacrer, son goût du travail sérieux et bien fait, sans oublier sa bonne humeur quotidienne sans faille.

Je tiens à remercier le Pr. Pierre Marie Preux, le Pr. Marie laure Dardé et le Dr. Bertrand Courtioux, les membres du Laboratoire de Parasitologie, Martine Gatet et Roselyne Mouzet, pour m'avoir accueillie au laboratoire de parasitologie UMR INSERM 1094 et m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Je tiens à remercier le Dr. Daniel Rondelaud pour son aide précieuse et sa gentillesse.

Mes remerciements sincères vont également à Mustafa Al Jawhari, je lui suis extrêmement reconnaissante pour sa disponibilité ainsi que la gentillesse avec laquelle il a su me faire partager ses connaissances.

J'aimerais adresser un remerciement particulier à Mona Farhat, pour sa gentillesse et son soutien tout au long de ces années.

Je remercie tous mes collègues qui ont partagé mon quotidien durant cette thèse. Un merci spécial à mes amis : Dr. Yasser Dar, Nivine Srour, Saada Diab, Faten Saad, Elie Mespoulet, Hasard el Mohammad, Adnan Halabi, Nour Mammari, Abdelkrim Aroussi, Bruno Senghor.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements et mes pensées particulières à ma mère, mon père, mes sœurs, mon frère et mon ange gardien, qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de cette thèse.

Résumé

Les mollusques d'eau douce du genre *Bulinus* servent d'hôtes intermédiaires pour le développement des stades larvaires des parasites du groupe *Schistosoma* (Digenea, Plathelminthes). Malgré leur importance dans la transmission de ces parasites, l'histoire évolutive de ce genre reste à clarifier. L'élaboration des plans de gestion de transmission de ces parasites nécessite une bonne connaissance de la biologie des bulins, de la structure génétique de ces populations afin de clarifier l'histoire évolutive de ce genre et son rôle dans la coévolution hôte /parasite. Fort de cela, nous nous sommes proposée d'étudier d'une part la phylogénie de sept espèces des bulins originaires de plusieurs pays africains à l'aide de trois types de marqueurs moléculaires : la région de l'ADN mitochondrial (Cox1), les séquences ribosomiques nucléaires (ITS, 18S et 28S) et d'autre part la structure génétique des populations égyptiennes de *B. truncatus* à l'aide des marqueurs microsatellites.

Les résultats portant sur l'étude phylogénétique ont permis de mettre en évidence des niveaux élevés de diversité haplotypique et nucléotidique chez les sept espèces étudiées. De nouveaux haplotypes ont été détectés dans chaque pays, et semblent spécifiques à la région. En revanche, nous avons détecté une diversité génétique inférieure au sein des populations égyptiennes de *B. truncatus* par rapport aux individus originaires de l'Afrique sub-saharienne, ce qui pourrait suggérer une existence plus récente de *B. truncatus* en Afrique du Nord (Egypte), par rapport à l'Afrique noire (Cameroun et Sénégal).

Quant à l'étude de la structure génétique de *B. truncatus*, un taux d'hétérozygotie élevé, et une forte structuration ont été détectés chez les populations égyptiennes de *B. truncatus.* Cette structuration se traduit par l'existence de quatre clusters bien distincts, et elle est caractérisée par un taux relativement faible de flux de gènes.

Nos travaux ont permis d'avoir une meilleure compréhension de la phylogénie et la structure génétique de ce genre. Ceci permettra de proposer une nouvelle approche pour la lutte contre cette parasitose

Mot clés : *Bulinus* sp., phylogéographie, structure génétique, *Schistosoma haematobium*.

Abstract

The *Bulinus* genus acts as intermediate hosts for larval development of the parasite belonging to *Schistosoma* group (Digenea, Platyhelminthes). Despite their importance in the transmission of these parasites, the evolutionary history of this genus is still not very clear. Development of management plans to control these parasites transmission requires a deeper understanding of the past events that have affected the population diversity and distribution of *Bulinus* species. The objective of this study was to learn more about the population structure and phylogeny of several *Bulinus* species originating from different African countries using three types of molecular markers: the partial mitochondrial gene Cox1, the nuclear ribosomal gene (ITS, 18S and 28S), and six microsatellites loci.

Concerning the phylogeography of this genus, high levels of genetic diversity were detected in the seven studied species, with clear segregation between individuals and the presence of many haplotypes, even within same species from the same locality. Our results showed lower diversity within *B. truncatus* populations in North Africa (Egypt) compared to individuals from Sub-Saharan Africa, which may suggest that *B. truncatus* may have colonized Egypt from Sub-Saharan Africa.

About the genetic structure of *B. truncatus*, high rate of heterozygosity, and strong genetic structure were noted in Egyptian populations of *B. truncatus*. This structure is reflected by the existence of four distinct clusters characterized by relatively low gene flew rate between subpopulations.

Our work allowed better understanding of phylogeny and genetic structure of this genus. These informations can be used to develop new approach for controlling the parasite transmission.

Key words: *Bulinus* species, phylogeography, genetic structure, *Schistosoma haematobium.*

Abréviations, sigles et termes anglais utilisés

A

A :	Adénine
ACP :	Phosphatase acide
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
AE :	Tampon d'élution
AL :	Tampon de lyse
APS :	Persulfate d'ammonium
ATL :	Tampon de lyse tissulaire
AW1 :	Tampon de lavage 1
AW2 :	Tampon de lavage 2

B

BET :	Bromure d'éthidium

C

C :	Cytosine
Cox1 :	Cytochrome oxydase C 1

D

dNTP :	Désoxyribo-nucléotides triphosphate
dATP :	Désoxyadénine triphosphate
dCTP :	Désoxycytosine triphosphate
dGTP :	Désoxyguanine triphosphate
dTTP :	désoxythymine triphosphate

E

ELISA :	Enzyme Linked Immunosorbent Assay

G

G :	Guanine
GPS :	Global position system
GPI :	Glucose phosphate isomérase
GTR :	General time reversible

H

HKY 85 :	Modèle de Hasegawa, Kishino et Yano

I

ITS :	Internal transcript spacer

J

JC :	Jukes-Cantor

K

K2P :	Modèle de Kimura
KFPE :	Commission for Research Partnerships with Developing Countries

M

MDH :	malate déhydrogénase
ML :	maximum de vraisemblance
mM :	Micromolaire
MP :	Méthode de parcimonie
$MgCl_2$:	Chlorure de magnésium

N

NJ :	Neighbor joining
Ng :	Nanogramme

O

OMS :	Organisation Mondiale de la Santé

P

PCR :	Polymerase Chain Reaction
Pb :	Paire de bases
PBS :	Tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)
PGM :	Phosphoglucomutase
POP :	Performance Optimized Polymer

R

RAPD :	Random Amplified Polymorphic DNA

S

SRG	Schistosomiasis research group
Sp :	Species

T

T :	Thymine
TBE :	Tampon de migration d'électrophorèse (Tris, Borate, EDTA)
TN :	Modèle de Tajima-Nei

U

UPGMA :	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
UV :	Ultra-violets

18S :	Petite sous- unité
28S :	Grande sous-unité
µL :	Microlitre

Table de matières

Table de matières **1**

Introduction générale **4**

Chapitre 1 : **7**

La schistosomose urinaire et les hôtes intermédiaires du parasite **7**

I. La schistosomose urinaire dans le monde 8

A. Epidémiologie 8

B. *Schistosoma haematobium* 9

II. Les hôtes intermédiaires de *S. haematobium* 14

A. Classification 14

B. Taxonomie et morphologie 14

D. Anatomie des bulins 17

E. Biologie des bulins 17

F. Système de reproduction 17

Chapitre 2 ..... **19**

Présentation des pays étudiés **19**

I. Le Cameroun 20

A. Description physique du pays 20

B. Epidémiologie de la schistosomose urinaire au Cameroun 22

C. Les mollusques hôtes intermédiaires au Cameroun 23

II. L'Egypte 24

A. Description physique du pays 24

B. Epidémiologie de la schistosomose urinaire en Egypte 25

C. Les mollusques hôtes intermédiaires en Egypte 25

III. Le Sénégal 26

A. Description physique du pays 26

B. Epidémiologie de la schistosomose urinaire au Sénégal 28

C. Les mollusques hôtes intermédiaires au Sénégal 28

Chapitre 3 : **29**

Phylogénie moléculaire du genre *Bulinus* **29**

I. Introduction 30

A. Phylogénie moléculaire 30

B. Classification du genre *Bulinus* 39

C. But, problématiques abordées et objectifs 42

II. Matériels et Méthodes 44
A. Matériel biologique 44
B. Extraction de l'ADN 45
C. Gènes étudiés 45
D. Amplification de l'ADN 47
E. Contrôle de la PCR 48
F. Séquençage des fragments amplifiés 49
G. Analyse des séquences et reconstruction phylogénétique 50
III. Résultats 53
A. Variabilité des séquences utilisées 53
B. Analyse génétique des populations étudiées 54
C. Analyse de la distance génétique des populations étudiées 60
D. Tests de neutralité 61
E. Phylogénie des espèces 61
IV. Discussion 68
A. Diversité génétique des populations 68
B. Diversité génétique des bulins et compatibilité avec le parasite 69
C. Phylogéographie des bulins en relation avec la schistosomose 71
Chapitre 4 : 74
Structure génétique des populations égyptiennes de *B. truncatus* 74
I. Introduction 75
A. La diversité génétique 75
B. *Bulinus truncatus* 80
C. But, problématiques abordés et objectifs 82
II. Matériels et Méthodes 83
A. Sites de collection 83
B. Matériel biologique 85
C. Locus choisis 85
D. Extraction d'ADN et amplification de microsatellites 86
E. Génotypage 86
III. Résultats 89
A. Diversité intra populationnelle 89
B. Diversité inter populationnelle 93
IV. Discussion 97
A. Diversité intra populationnelle 97
B. Structuration des populations de *B. truncatus* en Egypte 99

C. Relation *B. truncatus/ S. haematobium* en Egypte 100
V. Conclusion du chapitre 101
Conclusion générale et perspectives de recherche 102
Références Bibliographiques 103
Liste des illustrations 113
A. Liste des figures 113
B. Liste des tableaux 114
Annexes 115
Annexe 1 : Glossaire 115
Annexe 2 : Protocole d'extraction des bulins 117
Annexe 3 : Phylogénie des bulins 118
Annexe 4 : Étude de la structure génétique de *B. truncatus* en Égypte 120
Annexe 5 : Article 1 121
Annexe 6 : Article 2 147

Introduction générale

Les schistosomoses représentent la deuxième endémie parasitaire mondiale après le paludisme. Selon l'OMS, plus de 700 millions de personnes sont exposées dans 74 pays, avec 200 millions de sujets infectés à travers le monde (85 % des cas se retrouvent en Afrique), et elles sont responsables de 800 000 décès par an (OMS, 2010). Malgré le fait qu'elles soient un réel problème de santé publique, ces parasitoses sont considérées comme des maladies négligées du fait de l'apparition des problèmes de santé plus visibles tels que le VIH, la tuberculose, le paludisme (Chipaux, 2000). Malgré les efforts réalisés depuis de nombreuses années, le nombre de sujets atteints par les schistosomoses ne diminue pas significativement (Chipaux, 2000). Cinq espèces de schistosomes humains sont décrites, et classées de façon décroissante.

- *Schistosoma guineensis* (Fisher, 1934), agent de la schistosomose rectale et génitale, principalement présente en Afrique Equatoriale.

- *Schistosoma mekongi* (Voge, Bruckner et Bruce, 1978) agent de la schistosomose intestinale avec des complications artério-veineuses, que l'on retrouve le long du Mékong, au Laos et au Cambodge.

- *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904) à l'origine de la schistosomose hépato-splénique, localisé principalement en Chine, aux Philippines et en Indonésie.

- *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) agent de la schistosomose intestinale, que l'on rencontre surtout en Afrique de l'Est et du Sud, à Madagascar, au Proche-Orient, en Amérique Latine et aux Antilles.

- *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1854) responsable de la schistosomose urinaire, principalement rencontré en Afrique noire, à Madagascar, dans la vallée du Nil et au Moyen-Orient.

Cependant, *S. haematobium* est la plus répandue, avec 112 millions de personnes infectées en Afrique. Ce parasite est transmis à l'homme par des mollusques d'eau douce du genre *Bulinus.* Un meilleur contrôle de cette parasitose passe par une bonne connaissance de la biologie et la diversité génétique de ce dernier.

La grande majorité des études réalisées sur les bulins ont porté sur l'estimation des paramètres concernant la reproduction et l'infection naturelle et expérimentale d'une part

(Beddiny, 1983 ; Marti *et al.*, 1985 ; Ngonseu *et al.*, 1992 ; Njiokou *et al.*, 2004), et d'autre part sur l'utilisation des paramètres morphologiques et biochimiques qui n'ont pas permis de bien clarifier la classification et l'évolution de ce genre (Jelnes, 1984 ; Mimpfoundi *et al.*, 1990 a et b).

L'essor de la génétique constitue une grande avancée, non seulement parce qu'elle apporte des informations importantes sur le comportement, le cycle de vie ou la démographie des populations, mais aussi, et surtout parce qu'elle permet d'appréhender leur structure et leur diversité génétique. En effet, le contrôle des bulins ne dépend pas seulement du nombre total d'individus et du sex-ratio, mais aussi de la diversité génétique de ces populations et de la capacité à maintenir cette diversité d'une génération à l'autre.

Le développement de nouvelles techniques de biologie moléculaire telles que les marqueurs PCR-RFLP (Rollinson *et al.*, 1991 ; Stohard *et al.*, 1996 ; Sène *et al.*, 2004), la RAPD (Raahauge et Kristensen, 2000), les marqueurs microsatellites (Gow *et al.*, 2004 ; Djuikwo-Teukeng *et al.*, 2011), et les marqueurs phylogénétiques, mitochondriaux et ribosomaux (Stohard *et al.*, 2002 ; Jorgensen *et al.*, 2007 ; Kane *et al.*, 2008 ; Naluhwa *et al.*, 2010 ; Jorgensen *et al.*, 2010) ont permis de mieux étudier certains aspects de la biologie et de la diversité des populations des espèces du genre *Bulinus*. D'où notre intérêt d'utiliser cet outil pour mieux comprendre l'écologie de ce genre.

Cette thèse réunit des travaux distincts mais complémentaires, tous destinés à mieux comprendre les facteurs qui déterminent la diversité génétique spatiale et temporelle des bulins. Les différentes parties de ce travail sont reliées par le thème général qui est l'étude de la répartition de la diversité génétique au sein de ces populations. La présentation de mes travaux de thèse s'articule selon quatre chapitres :

- Le **premier chapitre**, entièrement bibliographique, porte sur divers aspects relatifs à la schistosomose urinaire et à son hôte intermédiaire.

- Le **deuxième chapitre** présente les différents pays d'étude : le Cameroun, le Sénégal et l'Egypte.

- Le **troisième chapitre** a pour objet l'étude de la phylogéographie de sept espèces de bulins : *B. truncatus, B. tropicus, B. forskalii, B. globosus, B. senegalensis, B. umbilicatus et B. camerunensis* provenant des différents pays africains. Un article est issu de ce travail.

- Le **quatrième chapitre** présente la structure génétique des populations de *B. truncatus* provenant d'Egypte à l'aide des marqueurs microsatellites. Un article concernant cette partie est en cours de rédaction.

Cette étude appartient pleinement au domaine de la génétique des populations et de la phylogénie. Cependant les résultats obtenus peuvent fournir des éléments utiles pour l'élaboration de plans de gestion pour la transmission des parasites du groupe *Schistosoma*.

Chapitre 1 :

La schistosomose urinaire et les hôtes intermédiaires du parasite

I. La schistosomose urinaire dans le monde

A. Epidémiologie

La schistosomose urinaire, parasitose due à *Schistosoma haematobium*, a été identifiée pour la première fois en 1851 en Egypte par le parasitologue allemand Théodore Bilharz, d'où le nom de la maladie. C'est la quatrième maladie la plus répandue dans le monde (Young, 2008). Elle se manifeste principalement par une hématurie, avec environ 70 millions de cas, et 200 000 décès annuels dans le monde (Montgomery, 2010) **(Figure 1).**

Les taux d'infection symptomatique varient selon l'âge et le sexe, et cela est dû à des différences du style de vie, principalement en fonction de la durée d'exposition à l'eau douce contaminée (Adou-Bryn *et al.*, 1997). Les enfants d'âge scolaire constituent le groupe le plus touché, avec une prévalence pouvant atteindre 100 % et un taux de mortalité allant jusqu'à 25 % (Traore *et al.*, 1998 ; Keita *et al.*, 2001).

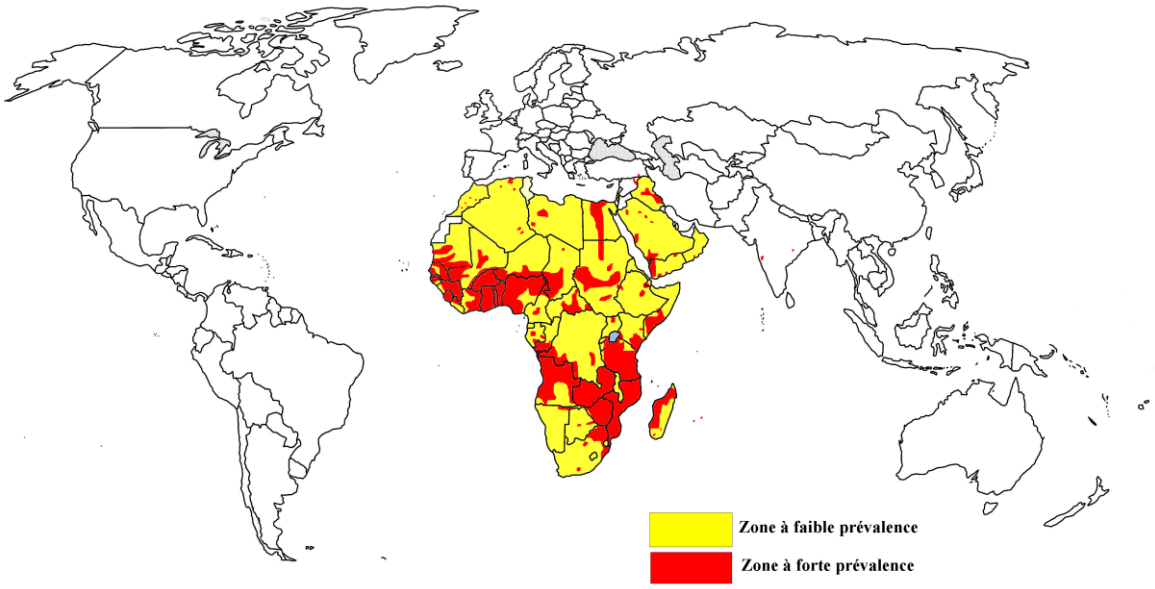


Figure 1 : Répartition mondiale de la schistosomose urinaire (OMS, 2010)

B. *Schistosoma haematobium*

1. Classification

Schistosoma haematobium appartient à l'embranchement des Plathelminthes (vers plats non segmentés), à la classe des Trematoda caractérisée par un appareil digestif avec cæcums, à l'ordre des Protostomata, au sous-ordre des Strigeatida possédant une ventouse ventrale et une buccale, à la famille des Schistosomatidae (cercaires libres), au genre *Schistosoma* et à l'espèce *haematobium*.

2. Cycle biologique

Le cycle biologique de *S. haematobium* est dixène (à deux hôtes) : l'hôte définitif chez qui se déroule la multiplication sexuée, est généralement l'homme, et l'hôte intermédiaire est un Mollusque Gastéropode d'eau douce du genre *Bulinus* **(Figure 2).**

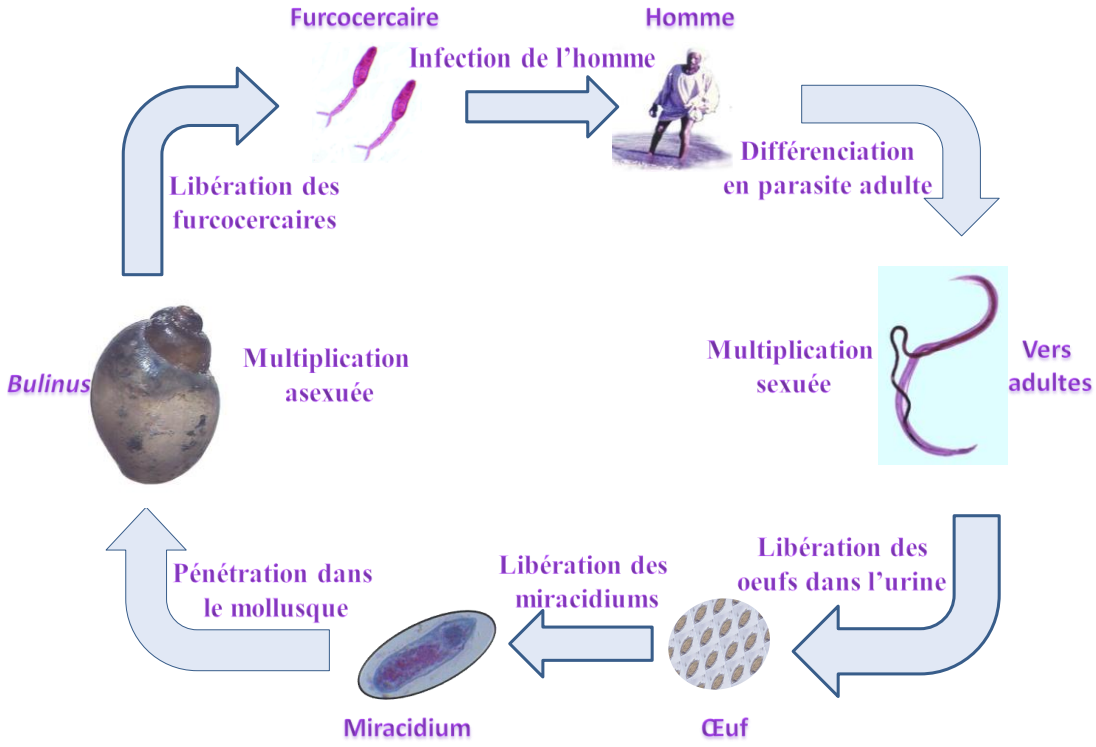


Figure 2 : Cycle biologique de *S. haematobium* (original)

a) Chez l’hôte définitif

L'homme s'infecte durant ses activités domestiques par contact avec de l'eau contaminée contenant des furcocercaires. Ces dernières pénètrent activement dans l'épiderme grâce à leurs secrétions protéolytiques. La cercaire perd sa queue et devient une schistosomule qui migre dans les tissus sous-cutanés et parvient dans les veinules et les capillaires lymphatiques. Puis, elle atteint le cœur ou le poumon en quatre jours grâce au flux sanguin. Une fois dans les veinules portes intra-hépatiques, la schistosomule poursuit son développement jusqu’à la maturation en parasite adulte et l’acquisition de la maturité sexuelle.

Les adultes sont de couleur blanchâtre, et mesurent 10 à 15 mm pour le mâle et 20 à 25 mm pour la femelle. Chez le mâle, de forme aplatie, les bords latéraux se replient ventralement pour délimiter le canal gynécophore où se loge la femelle, de forme cylindrique. Le couple gagne ensuite la circulation veineuse du petit bassin par la veine mésentérique inférieure. La copulation se produit pendant cette migration. Les femelles gravides pondent les œufs qui mesurent 112 -170 x 40 -70 µm. Leur coque est transparente et porte un éperon terminal.

b) Chez l’hôte intermédiaire

Une à trois semaines après la ponte, les œufs du parasite sont libérés dans l’environnement à partir des urines. Ces œufs vont éclore dans l'eau douce si les conditions favorables (température à 25 - 30°C, ensoleillement, pH neutre) sont réunies ; ils vont libérer chacun une petite larve ciliée et mobile, appelée miracidium de 150 à 180 µm, dont le corps, est recouvert de nombreuses rangées de cils qui lui permettent de se déplacer activement à la recherche de l’hôte intermédiaire, un mollusque d’eau douce du genre *Bulinus*, et y pénétrer par un mécanisme enzymatique. A l’intérieur du mollusque, le miracidium se transforme en sporocyste primaire contenant les cellules germinales ; celles-ci se divisent à leur tour pour produire les sporocystes secondaires et aboutissent à la formation de furcocercaires. C’est une larve ciliée, longue de 400 à 600 µm, qui possède un corps et une queue bifide d’où l’appellation furcocercaire. Un seul miracidium peut produire plus de 100 000 cercaires ; leur émergence à partir des mollusques est périodique et soumise à l'influence de la température ambiante et de la lumière principalement entre 9 h et 14 h (Jourdane, 1982). Les cercaires jeunes sont très mobiles et peuvent survivre pendant 24 à 72 heures.

3. Manifestations cliniques de la schistosomose

Les œufs sont responsables de la plupart des lésions anatomo-pathologiques, et induisent la formation d'un granulome bilharzien. Trois phases sont distinguées (Gentilini *et al.*, 1993 ; Aubry, 2013) :

- **Phase initiale** : elle correspond au passage transcutané des cercaires et passe généralement inaperçue (Klotz *et al.*, 1991) . Elle est marquée par une éruption précoce, une heure après la sortie de l'eau contaminée, et est associée à des symptômes généraux discrets. Cette phase dure 1 à 2 jours (Barabe *et al.*, 1984).

- **Phase d'invasion (ou phase aiguë)** : c'est la phase de migration et de transformation des schistosomules (3 mois à 1 ou 2 ans après l'infection). Elle est caractérisée par une fièvre élevée et est associée à une toux sèche, des manifestations cutanées (urticaire, prurit, œdème), et des douleurs digestives diffuses (douleurs abdominales, diarrhées) (Klotz *et al.*, 1991).

- **Phase d'état (ou phase chronique) :** elle est due à la localisation du parasite adulte dans la veine mésentérique inférieure. Elle se manifeste tout d'abord par des mictions fréquentes, une pollakiurie, des brûlures urétrales et des douleurs vésicales. Puis s'en suit une hématurie microscopique, discrète, augmentée par la fatigue et les épices ; cette hématurie devient plus tard macroscopique, avec élimination de caillots (Ross *et al.*, 2002). Cette parasitose peut évoluer vers des complications vésicales, rénales et génitales, et même neurologiques (30 % des malades), conduisant à l'impuissance chez l'homme et la stérilité chez la femme (Warren *et al.*, 1967).

4. Diagnostic biologique

Deux méthodes de diagnostic sont généralement utilisées :

a) Le diagnostic direct :

Il repose principalement sur le diagnostic parasitologique, basé sur la recherche des œufs de *S. haematobium* dans les urines **(Figure 4)**. Il existe deux techniques :

- La technique de sédimentation : elle est basée sur la centrifugation des urines fraîches et l'examen du culot obtenu entre lame et lamelle (Adou-Bryn *et al.*, 1997).

- La technique de filtration : elle correspond à la filtration sur membrane des urines de 24 heures et l'observation au microscope des filtres colorés au Lugol (Plouvier *et al.*, 1975).

b) Le diagnostic indirect :

Il s'applique aux formes chroniques de la bilharziose. Différentes méthodes sérologiques sont utilisées telles que l'immunofluorescence, l'immunoélectrophorèse, l'hémagglutination passive, l'ELISA, et l'analyse par immunotransfert des antigènes membranaires de *Schistosoma haematobium*. Ces méthodes peuvent atteindre un degré élevé de sensibilité et de spécificité à condition d'utiliser l'antigène approprié (Ambroise-Thomas *et al.*, 1981; Bernard *et al.*, 2000, Cesari *et al.*, 2010).



Figure 3 : Collecte des urines pour rechercher la présence des œufs de *S. haematobium* (KFPE, 2008)

5. Contrôle de la maladie

L'objectif prioritaire de la lutte antibilharzienne est la rupture de la chaîne de transmission en intervenant au niveau des différents éléments du cycle sur le couple homme-mollusque (Ripert *et al.*, 1998). Plusieurs méthodes sont ainsi appliquées.

a) Le traitement

Le praziquantel est le traitement recommandé par l'OMS, Il se présente sous forme de comprimés sécables de 600 mg et se prescrit à la posologie de 40 mg/kg en une seule prise orale. Il est efficace chez 90 % des patients (Ross *et al.*, 2002).

b) La prophylaxie

Elle repose sur l'association simultanée de plusieurs mesures constituant le principe de la lutte intégrée :

- L'éducation sanitaire est la première étape dans la réduction de l'infection et la transmission de la maladie (Uwen *et al.*, 2010). Elle a pour objectif, de prévenir l'infection des mollusques par l'introduction d'une hygiène urinaire et des mesures d'approvisionnement en eau potable avec l'installation de points d'adduction d'eau.

- La lutte chimique qui repose sur la destruction de l'hôte intermédiaire en introduisant dans les cours d'eau des molluscicides ; soit d'origine chimique (Niclosamide ou Bayluscide®) soit d'origine végétale tel que l'Endod (Madhina et Shiff, 1996).

- La lutte biologique principalement basée sur l'introduction de prédateurs naturels (autres mollusques), en remplaçant les hôtes intermédiaires sensibles par d'autres moinssusceptibles à l'infection dans les zones endémiques (Hubendick, 1958 ; Gretillat, 1961; Hamed *et al.*, 2010). On peut aussi préconiser le faucardage des végétaux aquatiques supérieurs à proximité des zones de fréquentation des collections d'eau. Cette manœuvre permet de limiter l'apport alimentaire des mollusques et la surface de ponte des œufs (Hamed *et al.*, 2010).

II. Les hôtes intermédiaires de *S. haematobium*

En Afrique, les principaux hôtes intermédiaires de *S. haematobium* sont des mollusques d'eau douce du genre *Bulinus* (Müller, 1781).

A. Classification

Le genre *Bulinus* appartient à l'embranchement des Mollusca qui sont des animaux non segmentés, à symétrie bilatérale quelquefois altérée, à la classe de Gastropoda car ils possèdent une coquille dorsale torsadée et univalve, à l'ordre des Basommatophora (mollusques d'eau douce), à la famille des Planorbidés (caractérisée par une coquille discoïde plate, des poumons), à la sous-famille des Bulininés dont la coquille est ovale ou turriculée, pseudo-branchies plissées, glande prostatique compacte et organe copulateur, et au genre *Bulinus*.

B. Taxonomie et morphologie

La première révision de la taxonomie des bulins a été faite par Mandahl-Barth en 1957, en se basant sur les variations de la morphologie de la coquille ainsi que sur la description des parties molles et de la radula. Il a décrit ainsi 27 espèces et sous-espèces. En 1979, Bioca a proposé la division des bulins en trois genres en se basant sur les caractères biochimiques associés à la morphologie. Cette classification entraînant trop de confusion n'a pas été retenue. Puis Mandahl-Barth a proposé une autre classification qui a été mise à jour par Brown en 1994 et se base sur la morphologie, le nombre des chromosomes (Jelnes, 1985), les allozymes (Biocca *et al.*, 1979), et d'autres propriétés moléculaires, la chromatographie et l'immunodiffusion. Ce dernier a recensé 37 espèces de bulins réparties en quatre groupes : *B. africanus, B. forskalii, B. truncatus/tropicus,* et *B. reticulatus* **(Figure 4).**

1. Complexe *B. truncatus/tropicus*

Ce complexe se caractérise par une coquille lisse et ne possède pas des micro-sculptures (Fig. 5). C'est dans ce groupe que l'on rencontre les espèces polyploïdes ; le nombre de chromosomes varie de 2n = (36, 72, 108 ou 144). Ce groupe contient 14 espèces des bulins, dont les plus connues sont *B. truncatus, B. tropicus* (Krauss, 1848) et *B. natalensis* (Kuster, 1841). Elles assurent le développement larvaire de *S. haematobium* et de *S. bovis*.

2. Groupe *B. africanus*

Les bulins de ce groupe se caractérisent par une coquille globuleuse avec une spire plus courte que l'ouverture, et on note également la présence des micro-sculptures sur les tours de spire supérieurs, ce sont les plus gros bulins **(Figure 4)**. Le nombre de chromosomes est diploïde (2n=36). Ce groupe contient dix espèces des bulins dont les plus connus sont *B. globosus* (Morelet, 1866), *B. africanus* (Krauss, 1848) *et B. umbilicatus* (Mandahl-Barth , 1973b). Elles assurent le développement larvaire du groupe *S. haematobium*.

3. Groupe *B. forskalii*

Celui-ci est caractérisé par une coquille très effilée et lisse. Chez les adultes, la spire est plus haute que l'ouverture **(Figure 4)**. Le nombre de chromosomes est diploïde (2n = 36). Ce groupe contient 11 espèces de bulin, dont les plus connues sont *B. forskalii* (Ehrenberg, 1831), *B. senegalensis* (Muller, 1781), et *B. camerunensis* (Mandahl-Barth, 1957b). Les espèces de ce groupe assurent la transmission de *S. intercalatum*, de *S. haematobium* et de *S. bovis*.

4. Groupe *B. reticulatus*

Ce groupe comprend deux espèces : *B. reticulatus* (Mandahl-Barth, 1954) en Afrique de l'est et *B. wrighti* (Mandahl-Barth, 1965) en Arabie Saoudite. Ces deux espèces ont en commun des caractères morphologiques et moléculaires **(Figure 4)**. Le nombre de chromosomes est diploïde (2n=36). *Bulinus wrighti* est l'hôte intermédiaire de *S. haematobium* dans le sud de Yémen.



B. truncatus/ tropicus



B. africanus



B. forskalii



B. reticulatus

Figure 4 : Les quatre groupes de bulins (Brown, 1994)

D. Anatomie

L'anatomie topographique générale des bulins est la suivante :

- ***Les organes palléaux*** : Ils sont situés sur la paroi interne du manteau et comprennent le poumon, le rein et le cœur. On peut ajouter le rectum et la pseudo-branchie.

- ***Les organes de la digestion*** : Ils comprennent la masse buccale, piriforme avec la mâchoire, la radula et les orifices des glandes salivaires, le long œsophage, l'estomac, le gésier, et le long intestin enroulé autour de l'estomac formant une boucle enrobée dans le foie.

- ***Les organes génitaux :*** Ils sont constitués de trois parties essentielles : i) une partie hermaphrodite constituée de la gonade qui fabrique les deux types de gamètes. ii) une partie femelle qui comprend l'oviducte par laquelle passent l'allosperme et les œufs fécondés. iii) une partie male qui comprend le spermiducte par laquelle transite l'autosperme.

E. Biologie

Les bulins sont très répandus en Afrique, à Madagascar (Stothard *et al.,* 2001) et au Moyen-Orient (Jørgensen *et al.,* 2008). Ils sont très tolérants aux conditions climatiques, et sont susceptibles de survivre en anhydrobiose, c'est-à-dire de résister parfois plusieurs mois à la dessiccation en s'enfonçant dans les fonds vaseux des mares. Ainsi ils peuvent peupler aussi bien des cours d'eau permanents que temporaires (Doumengue *et al.,* 1987).

Les bulins ont un mode de développement très rapide qui leur permet d'augmenter très rapidement en nombre et ceci grâce à leur cycle biologique très court (en général trois générations par an) et à leur système de reproduction. De plus, la polyploïdie chez le complexe *truncatus/tropicus* apparaît être un facteur favorable à son expansion (Njiokou, 1992).

Ils ont une grande tolérance aux parasites : en effet sept espèces différentes de Trématodes ont été trouvées chez *B. forskalii* (Locker *et al.,* 1981).

F. Système de reproduction

Les bulins sont des individus hermaphrodites pratiquant deux types de reproduction :

- L'autofécondation, il permet de se reproduire en absence de partenaire. Les individus vierges et isolés se reproduisent principalement par autofécondation (Rudolph et Bailey, 1985).

- L’allofécondation qui est basée sur la fécondation croisée par copulation unilatérale, dans laquelle un des individus agit comme mâle, tandis que l’autre agit comme femelle (Rudolph et Bailey, 1985 ; Rollinson, 1986 ; Simpson *et al.,* 1993). Le sperme étranger est utilisé pour la fécondation croisée presque immédiatement après l'accouplement. Si un individu est isolé après la copulation, les stocks de spermatozoïdes permettent l’allofécondation au cours des mois suivants.

Certains bulins dits euphalliques sont capables de se reproduire par autofécondation et par allofécondation en utilisant les voies mâles et femelles. D’autres sont aphalliques et peuvent utiliser les deux modes de reproduction, mais uniquement en tant que femelle (ils ne peuvent pas transférer leur sperme à d’autres individus).

Chapitre 2

Présentation des pays étudiés

Dans ce chapitre, nous décrirons les différentes zones d'étude, à savoir ; i) le Cameroun, un pays d'Afrique centrale marqué par un climat équatorial et tropical, ii) l'Egypte en Afrique du Nord traversée par un climat tempéré, iii) le Sénégal, pays de l'Afrique de l'Ouest (Sénégal). Le climat général varie du nord au sud en allant d'un climat Méditerranéen au niveau de l'Egypte, vers un climat équatorial au Cameroun, en passant par un régime tropical au Sénégal.

I. Le Cameroun

Le Cameroun est un pays d'Afrique Centrale situé au fond du Golfe de Guinée. Il s'étire vers le nord jusqu'au lac Tchad, formant un triangle de 475 442 km² de superficie, et reliant l'Afrique équatoriale à l'Afrique occidentale (Ngnikam et Tanawa, 2006).

A. Description physique du pays

- ***Les zones biogéographiques***

Elles comprennent deux grands climats principaux : le climat tropical sec dans la zone septentrionale et le climat équatorial humide dans le sud. Cinq zones écologiques ont été décrites **(Figure 5)** :

1. La zone soudano-sahélienne : qui va de l'Adamaoua au Lac Tchad ; elle est caractérisée par un climat tropical sec marqué par une très longue saison sèche avec une faible pluviométrie (500 à 800 mm). Les cours d'eau sont généralement des mares temporaires.

2. La zone soudano-soudanienne : elle couvre la région de l'Adamaoua et une partie des régions de l'Est et du Centre. Elle se caractérise par un climat tropical humide avec une alternance d'une saison des pluies et d'une saison sèche plus ou moins égales. Les cours d'eau sont des mares semi-permanentes.

3. La zone des hauts-plateaux de l'ouest et du nord-ouest : elle correspond aux régions de l'Ouest et du Nord-Ouest. Elle se caractérise par un climat tropical montagneux avec une longue saison de pluies et une courte saison sèche. Les cours d'eau sont permanents.

4. La zone côtière et maritime : elle couvre les régions du Littoral et du Sud-Ouest. Elle se caractérise par un climat tropical très humide avec une pluviométrie importante (4000 mm par an) ; les cours d'eau sont permanents.

5. La zone des forêts équatoriales : elle couvre une grande partie des régions du centre et se caractérise par un climat équatorial à quatre saisons : deux saisons sèches et deux saisons des pluies.

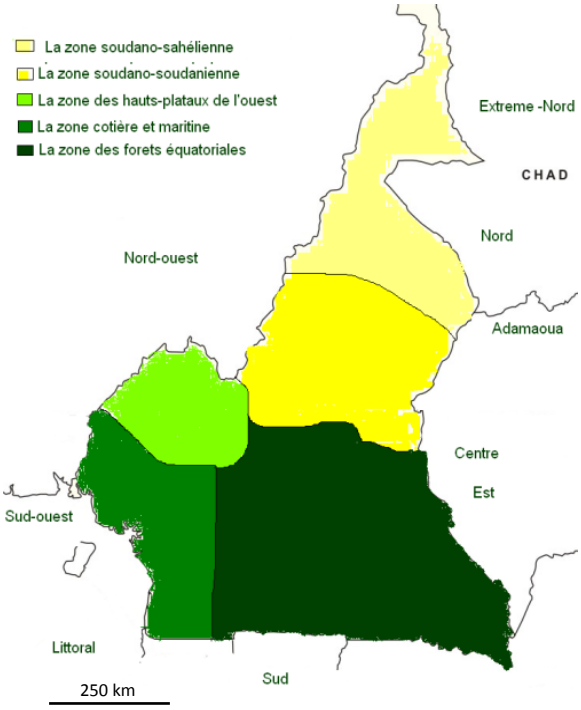


Figure 5 : Les différentes zones écologiques au Cameroun (original)

- ***Le réseau hydrographique***

1. Les bassins et les rivières

La plupart des rivières naissent dans l'Adamaoua et dans le plateau sud camerounais. Ces cours d'eau se répartissent en quatre bassins.

- Le bassin de l'Atlantique : c'est le plus important. Trois groupes de fleuves sont distingués :

- Les fleuves côtiers de l'ouest dont les plus importants sont le Mougo et la Manyo. Ils descendent de la dorsale camerounaise et se jettent dans l'Atlantique.

- La Sanaga est le plus important cours d'eau du Cameroun. Il draine un bassin versant d'environ 140.000 km^2, ses principaux affluents sont le Mbam, le Noun et le Nkim.

- Les fleuves côtiers du sud qui prennent naissance sur le plateau sud camerounais. Parmi lesquels le Nyong qui prend sa source à l'Est d'Abong-Mbang.

- Le bassin du Congo : il est représenté au sud-est par le Kadéi et la Ngoko qui prennent leur source dans l'Adamaoua.

- Le bassin du Niger : la Bénoué et ses affluents appartiennent à ce bassin, dont ses principaux sont Faro et Mayo-Déo qui collectent les eaux de l'Adamaoua, des Monts Mandara et des Monts Alantika.
- Le bassin du Tchad : ce bassin est le moins important, et le fleuve principal est le Logone. Son principal affluent est la Vina qui naît au nord de Ngaoundéré.

2. Les lacs

Ils se divisent en quatre groupes :

- Les lacs volcaniques : qui proviennent de l'accumulation des eaux dans les cratères volcaniques éteints. Exemples : le lac Tison, le lac Oku, le lac Nyos...
- Les lacs tectoniques : qui sont localisés dans les fossés d'effondrement tels que le lac Ossa, le lac Dissouni, le lac Ejagham.
- Le lac des cuvettes dont le lac Tchad où une petite partie est située au Cameroun.
- Les lacs artificiels : ce sont les retenues d'eaux nécessaires à la production de l'hydro-électricité. Exemples : Songloulou et Lagdo.

B. Epidémiologie de la schistosomose urinaire au Cameroun

La bilharziose urinaire a été découverte au Cameroun pour la première fois entre 1949 et 1951 dans la partie sud-ouest du pays avec une prévalence de 76 % chez les pêcheurs de Barombi-Kotto, et de 91 % chez ceux du lac Barombi Mbo (Doumengue *et al.*, 1987) . Avec près de 1,1 million de cas sur 14 millions d'habitants (Brooker et al., 2000), elle constitue un réel problème de santé publique surtout en zone septentrionale où les taux d'infection peuvent atteindre 100 % (Brooker *et al.*, 2000), dans les régions de l'Extrême Nord et du Nord **(Figure 6)**. La prévalence est faible dans l'Adamaoua (1 – 10 %).

En zone équatoriale, il existe quelques foyers endémiques dans les régions du Littoral, notamment le foyer de Loum avec une prévalence de 62,8 % (Tchuem Tchuenté *et al.*, 2003), du Sud-Ouest avec des foyers importants tels que celui de Barombi-Kotto avec une prévalence de 69,5 % (Nkengazong *et al.*, 2009), et dans la zone équatoriale, notamment la région de l'Est avec une prévalence relativement faible à Bertoua (10 à 20 %) (Brooker *et al.*, 2000).

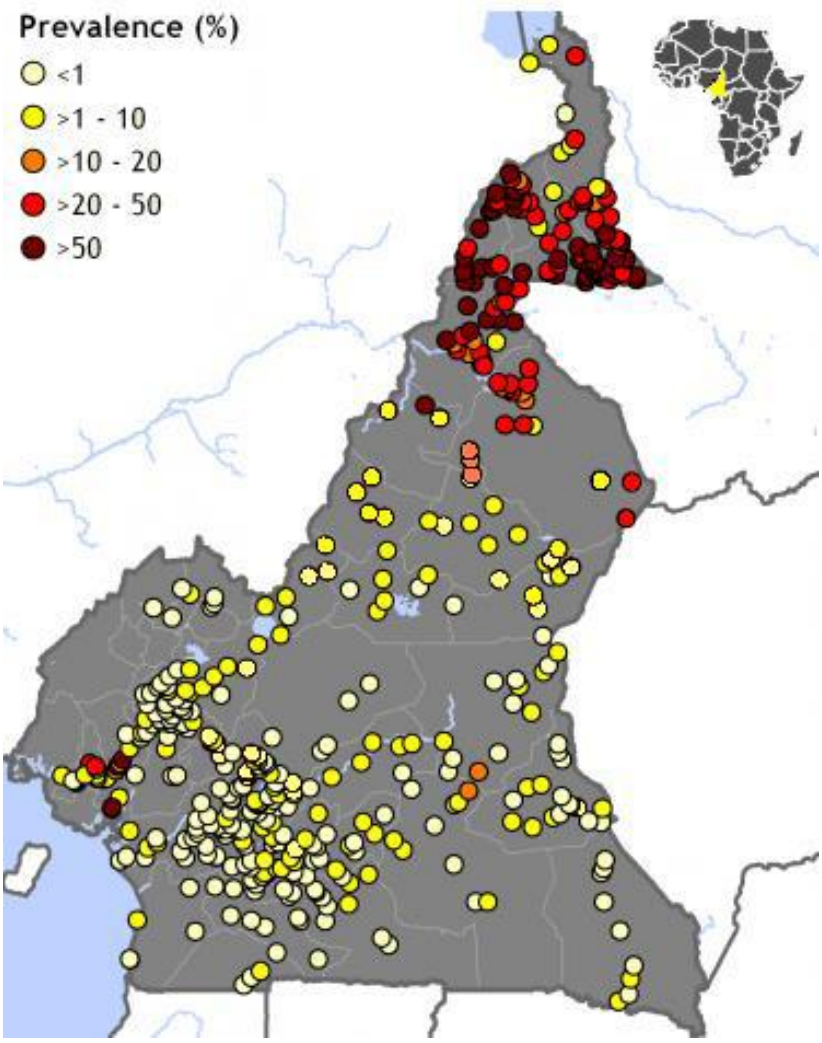


Figure 6 : Prévalence de la schistosomose urinaire au Cameroun (This Wormy World, 2001)

C. Les mollusques hôtes intermédiaires au Cameroun

Au Cameroun, *S. haematobium* est principalement transmis par quatre espèces de bulins (Greer *et al.*, 1990) :

- *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827) que l'on retrouve beaucoup plus en zone équatoriale qu'en zone tropicale (Greer *et al.*, 1990 ; Ngonseu *et al.*, 1992).
- *Bulinus globosus* (Morelet, 1866) que l'on retrouvait aussi bien en zone tropicale qu'équatoriale (Greer *et al.*, 1990). Cependant depuis quelque temps, on l'observe uniquement en zone tropicale (Djuikwo-Teukeng, communication personnelle).
- *Bulinus senegalensis* (Müller, 1845) uniquement en zone tropicale sèche.
- *Bulinus camerunensis* (Mandahl-Barth, 1957) est uniquement localisé dans deux lacs de cratère en zone équatoriale (le lac Debunsha et le lac Barombi-Kotto) (Greer *et al*. ., 1990).

II. L'Egypte

L'Egypte est un pays d'Afrique du Nord, situé au carrefour de l'Afrique et de l'Asie. Sa superficie représente 1 001 449 km^2, avec 2450 km de côtes sur deux façades maritimes, l'une sur la Méditerranée au nord et l'autre sur la mer Rouge et le golfe d'Aqaba, à l'est. Elle est entourée par le Soudan, au sud et par la Libye, à l'ouest **(Figure 7)**.

A. Description physique du pays

- ***Le climat***

Le climat varie entre le nord et le sud de l'Égypte, avec des importants écarts de température entre la nuit et le jour dans les régions désertiques. Il est méditerranéen sur la côte d'Alexandrie, semi-désertique au niveau du Caire et complètement désertique dans le Grand Sud. La région côtière marquée par un climat tempéré regroupe la plupart des grandes villes égyptiennes (EEI, 2005). Trois zones écologiques peuvent être distinguées **(Figure 7)** :

1. La vallée du Nil qui va de la frontière soudanaise (Haute Egypte) jusqu'au Caire (longue de 1500 km et large de 1 à 20 km) ; elle n'occupe que 4 % du territoire et abrite la quasi-totalité de la population car c'est une zone propice à l'agriculture.

2. Le désert libyque ou désert occidental : c'est un ensemble de plateaux peu élevés de 300 à 400 m, souvent couverts de dunes, qui s'étend de la Libye au nord-ouest du Soudan.

3. Le désert arabique ou désert oriental, qui s'étend jusqu'à la Mer Rouge ainsi que sur l'ensemble de la péninsule du Sinaï.



Figure 7 : Les zones écologiques en Egypte (Visite-Egypte.com)

- ***Le réseau hydrographique***

Le Nil est la principale source de vie du pays ; il traverse l'Egypte sur environ 1500 km du sud au nord. Sans sa présence, l'Egypte ne serait probablement qu'un vaste désert avec quelques points de peuplement, les côtes n'étant pas beaucoup plus habitées (Ayeb, 1990).

B. Epidémiologie de la schistosomose urinaire en Egypte

Des œufs calcifiés de *S. haematobium* ont été retrouvés dans deux momies remontant à la XX^{ème} dynastie (1250-1000 av. J.C.). En revanche, la schistosomose urinaire a été découverte pour la première fois en 1851 par T. Bilharz, qui a mis en évidence l'agent de cette maladie à l'hôpital Qasr Al-Ayne du Caire.

Actuellement, deux espèces des schistosomes humains y sont rencontrées à savoir *S. haematobium* et *S. mansoni* au sein des populations vivant dans le delta du Nil (Basse Egypte). En revanche, dans la vallée (Haute Egypte) seule l'infection à *S. haematobium* est présente. Au total, six millions d'Egyptiens sont infectés par *S. haematobium* (Hussein *et al.,* 2006) avec une prévalence qui diminue des gouvernorats du sud au nord du pays **(tableau 1)**.

Tableau 1 : Prévalence et intensité de l'infection par *S. haematobium* dans les neuf gouvernorats de l'Egypte (El-Khoby *et al.,* 2000)

Gouvernorat	Prévalence (%)	Intensité de l'infection (oeufs / 10 mL d'urine)
Ismailia	1,80	3,55
Kafr-El-Sheikh	0,45	2,54
Gharbia	0,26	2,06
Manofia	0,44	5,50
Qalubia	0,08	1,53
Fayoum	13,69	9,95
Minya	8,89	8,47
Assiut	5,21	6,63
Qena	4,78	7,04

C. Les mollusques hôtes intermédiaires en Egypte

En Egypte, *S. haematobium* est principalement transmis par *B. truncatus* que l'on retrouve tout le long du Nil (Badran, 1996). *Bulinus forskalii* est rare dans la quasi-totalité des biotopes, et il n'est pas reconnu comme hôte intermédiaire de ce parasite au sein de ce pays.

III. Le Sénégal

Le Sénégal est un pays d'Afrique de l'Ouest. Il est bordé par l'océan Atlantique à l'ouest avec 531 km de côtes, la Mauritanie au nord et à l'est, le Mali à l'est, la Guinée et la Guinée-Bissau au sud. Sa pointe ouest est la région la plus occidentale de toute l'Afrique continentale. Le Sénégal s'étend sur 196 722 km (Muriel et Devey, 2000).

A. Description physique du pays

- ***Les zones biogéographiques***

Le Sénégal est situé dans la zone intertropicale. Il se caractérise par 2 saisons : la saison sèche (octobre à juin), et la saison des pluies (juillet à septembre).

Cinq zones écologiques sont distinguées **(Figure 8)** :

1. Le Ferlo : qui recouvre la zone nord-est du pays et est caractérisé par une steppe semi-désertique, peuplée par des bergers.

2. La région maritime : qui s'étend le long de l'océan, de Saint Louis à la Gambie, la côte étant formée d'alignements de dunes.

3. La zone soudano-sahélienne : que l'on retrouve au nord et à l'est du pays, c'est une zone de savane arborée, régulièrement ravagée par les feux de brousse.

4. La zone soudanienne : au nord et à l'est de la basse Casamance, est un paysage de forêt claire.

5. La zone sub-tropicale : principalement en basse Casamance, elle présente une végétation très dense avec des arbres immenses, des rizières, des palmiers et des arbres fruitiers.

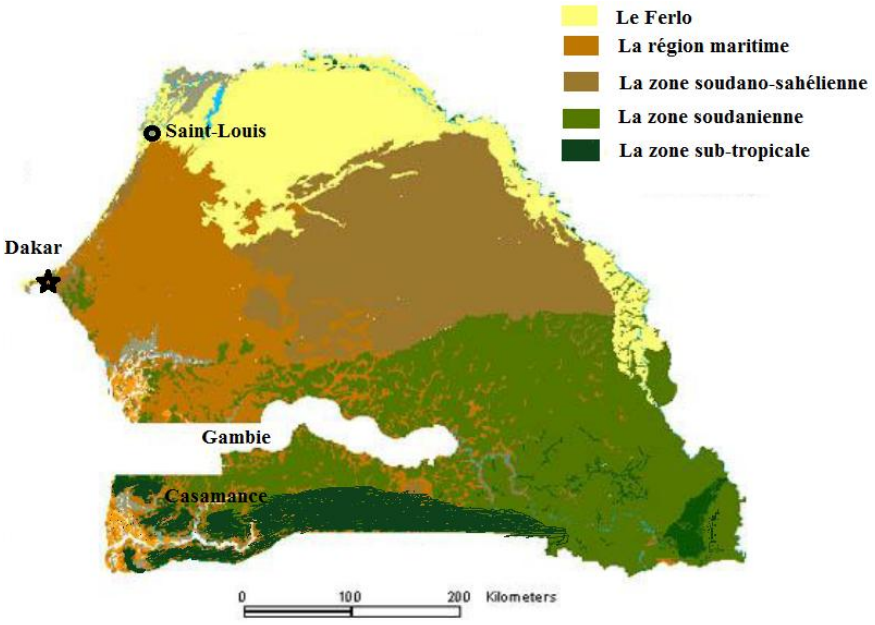


Figure 8 : Les zones écologiques au Sénégal (Niayis.e-monsite.com)

- ***Le réseau hydrographique***

Le réseau hydrographique du Sénégal résulte d'une part, de la configuration géologique et géomorphologique du pays, et d'autre part du régime et de la répartition de la pluviométrie dans la sous-région. Le Sénégal a quatre grands systèmes hydrographiques (Unicef, 2007) :

1. Le fleuve Sénégal : le fleuve Sénégal est long de 1 770 km et son bassin versant s'étend sur 337 000 km^2 dont 60 000 dans le territoire national. Il est caractérisé par une forte irrégularité liée aux conditions climatiques particulièrement sévères qui affectent la vallée du fleuve Sénégal depuis plus de deux décennies.

2. Le fleuve Gambie, long de 1 150 km dont 477 km se trouvent en territoire sénégalais. Son bassin versant couvre une superficie de 77 100 km^2.

3. Le fleuve Casamance est entièrement situé en territoire national. Il prend sa source dans la zone de Vélingara à 50 m d'altitude.

4. Le Sine Saloum : son bassin est intégralement dans l'espace national.

Les deux premiers cours d'eau sont des bassins internationaux dont les surfaces s'étendent au moins sur trois états. D'autres ressources en eau de surface sont constituées par le lac de Guiers et le bassin de l'Anambé.

B. Epidémiologie de la schistosomose urinaire au Sénégal

La schistosomose urinaire sévit au Sénégal avec 1,3 million de sujets infectés par *S. haematobium*, et 8,5 millions sont exposés au risque d'infection (Chitsulo *et al.,* 2000). Un foyer important est connu autour du lac de Giers où le taux d'infection moyen atteint 71,8 % (Ndir, 1999 ; Picquet *et al.,* 1996). Cette prévalence a augmenté avec la construction des barrages **(Figure 9)**.

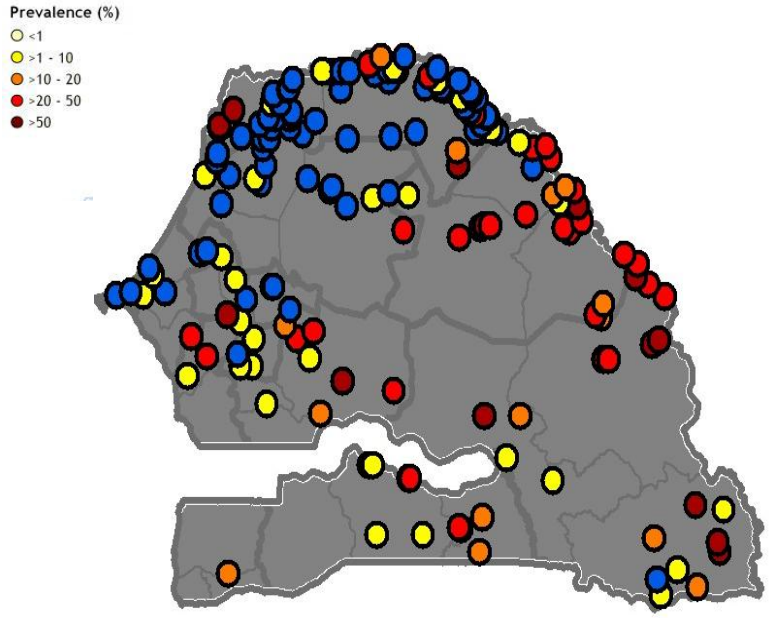


Figure 9 : Prévalence de la schistosomose urinaire au Sénégal (This Wormy World, 2001)

C. Les mollusques hôtes intermédiaires au Sénégal

Au Sénégal, *S. haematobium* est principalement transmis par *B. globosus, B. senegalensis, B. umbilicatus* (Sène *et al.,* 2002). Les travaux de Huyse *et al.,* en 2009 ont permis de mettre en évidence le rôle de *B. truncatus* dans la transmission des formes hybrides de *S. haematobium* et *S. bovis*. Néanmoins, une variabilité de la susceptibilité de *B. truncatus* à l'infection par ces hybrides en fonction de l'origine du parasite ou du mollusque, a été observée.

Chapitre 3 :

Phylogénie moléculaire du genre *Bulinus*

I. Introduction

La phylogénie est une discipline qui est née au milieu du 19ème siècle. Elle permet de résoudre les relations évolutives entre les organismes afin de reconstruire l'histoire et la généalogie de la vie. Cette discipline a longtemps été basée sur l'analyse de caractères anatomiques ou morphologiques d'organismes vivants ou de fossiles. En revanche, cette analyse n'était pas possible pour la plupart des microorganismes, en particulier les Procaryotes et certains Eucaryotes, qui n'ont que peu de caractères morphologiques distinctifs (Pace *et al.*, 1986). Par conséquent, Zuckerland et Pauling, en 1965, ont introduit l'utilisation de séquences de macromolécules (phylogénie moléculaire), et ont affirmé que la comparaison de ces séquences était une méthode fiable pour déduire les relations phylogénétiques.

A. Phylogénie moléculaire

a) Définition

La phylogénie moléculaire est une analyse basée sur des séquences de nucléotides ou d'acides aminés afin de déduire des hypothèses phylogéniques sur des événements évolutifs anciens. Elle a donc pour but l'étude des relations évolutives entre les organismes en utilisant les séquences de macromolécules codées par les gènes, principalement l'ADN mitochondrial, l'ARN ribosomique et les protéines.

b) Principe

La phylogénie moléculaire est basée sur l'analyse des séquences de l'ADN. La reconstruction phylogénétique requiert que les séquences comparées aient un ancêtre commun. Par conséquent, les analyses phylogénétiques commencent avec des alignements de ces séquences (protéiques ou nucléotidiques) qui permettent de les organiser de façon à ce que les séquences homologues se rapprochent entre elles (Olsen et Woese, 1993).

Les relations entre les organismes sont représentées sous la forme d'un arbre phylogénétique constitué de sommets et des liens **(Figure 10)**.

- Les sommets : on distingue deux types de sommets :

- Les sommets externes ou feuilles qui constituent les taxons terminaux ou unités évolutives (UE).

- Les sommets internes ou nœuds qui constituent les unités taxonomiques ancestrales.

➢ Les liens : ils sont appelés encore branches, et ils constituent les relations entre deux sommets. Deux nœuds internes sont reliés par un lien interne tandis qu'un nœud et une feuille sont reliés par un lien externe, désigné généralement comme une branche terminale.

L'arrangement des branches et des sommets constitue la topologie de l'arbre (Darlu et Tassy, 1993). On dira que le premier nœud est l'ancêtre par rapport au second défini comme descendant. L'arbre phylogénétique présente une racine qui est un nœud particulier symbolisant le dernier ancêtre commun de tous les taxons (Le *et al.*, 2000 ; Darlu et Tassy, 1993). Finalement, la topologie des branches d'un arbre organise les taxons en groupes monophylétiques appelés clades (Morrison et Ellis, 1997). Cette reconstruction des arbres phylogénétiques se fait grâce à des méthodes statistiques et des modèles d'évolution.

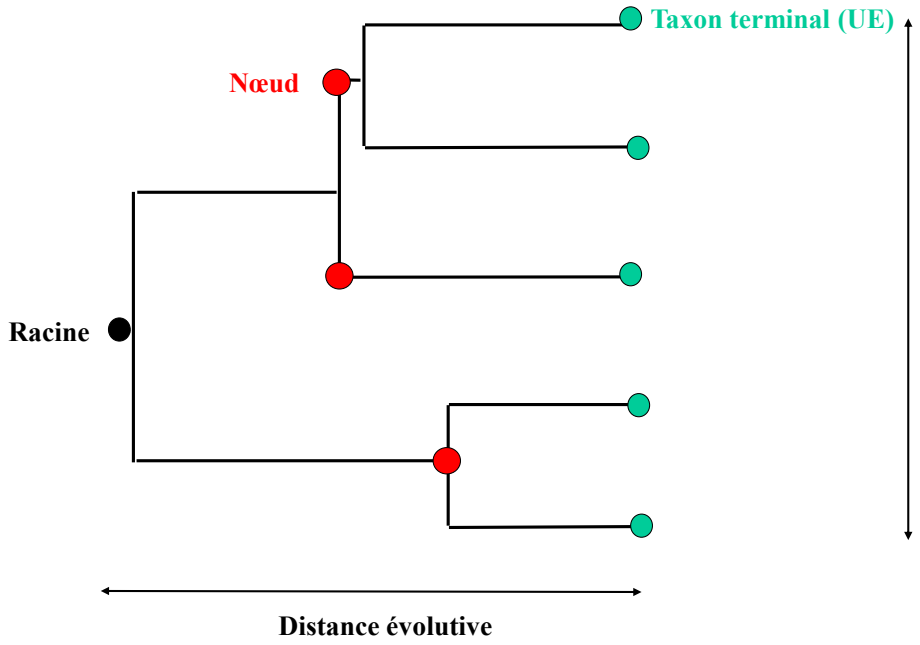


Figure 10 : Diagramme représentant un arbre phylogénétique (original)

c) Les méthodes d'étude de la phylogénie

Deux grands types de méthodes sont distingués en phylogénie : les méthodes de distance qui convertissent l'alignement des séquences en matrice de distances et les méthodes de caractères qui s'intéressent au nombre de mutations telles que les substitutions, les insertions et les délétions, affectant chacun des sites de la séquence.

1. Les méthodes de distance

Aussi appelées méthodes phénétiques, elles permettent de reconstruire des arbres à partir des ressemblances observées entre chaque paire d'unités évolutives. Ces ressemblances sont exprimées à travers des mesures de distances évolutives basées sur le nombre de substitutions qui se sont produites sur les lignées évolutives depuis l'ancêtre. Plusieurs méthodes ont été développées pour construire un arbre phylogénétique à partir d'une matrice de distance. Parmi ces méthodes, on peut citer :

1.1 La méthode d'UPGMA (Sneatch et Sokal, 1973) :

Elle permet de regrouper les séquences les plus proches. C'est une méthode simple, développée pour construire des phénogrammes taxonomiques. Mais elle impose que les séquences évoluent à une vitesse constante, dite hypothèse d'horloge moléculaire. Cette hypothèse étant rarement confirmée, la méthode UPGMA n'est pratiquement plus utilisée en phylogénie.

1.2 La méthode de Neighbor-Joining (NJ, Saitou et Nei, 1997) :

Elle est basée sur le calcul de distances évolutives séparant des séquences homologues. Elle n'implique pas l'hypothèse d'horloge moléculaire, et tient compte des différences de vitesse d'évolution entre les différentes branches de l'arbre phylogénétique. Par conséquent, elle constitue la méthode de distances la plus souvent utilisée.

1.3 Avantages et désavantages des méthodes de distance

- ***Avantages :*** les méthodes de distance ont l'avantage d'être rapides et permettent d'analyser de grandes bases de données, de tester un grand nombre d'hypothèses alternatives, et aussi d'intégrer des modèles de changements évolutifs.

- ***Désavantages :*** les méthodes de distance réduisent la matrice de caractères à une matrice de distances ce qui induit une perte d'information. Toutefois, elles ne permettent pas

de combiner dans une même matrice des caractères de nature différente (morphologique ou moléculaire). Elle produit des arbres sans racines.

En conclusion, ces méthodes sont plutôt recommandées pour analyser les séquences très similaires. Les substitutions multiples ne sont pas prises en compte par ce type d'analyse. La méthode de Neighbor-Joining reste cependant utilisée en routine afin d'avoir une idée des relations entre les taxa concernés par l'analyse et avant d'utiliser les méthodes reposant sur les caractères, plus longues à mettre en œuvre.

2. Les méthodes de caractères

Ces méthodes s'intéressent au nombre de mutations, à savoir les substitutions, les insertions et les délétions, qui affectent chacun des sites de la séquence. Elles font intervenir des critères d'optimalité, deux types de méthodes se distinguent :

- La méthode de parcimonie encore appelée le maximum de parcimonie
- Les méthodes probabilistes ou maximum de vraisemblance, inférence bayesienne

1.1 La méthode de parcimonie (MP) (Eck et Dayhoff 1966) :

Elle repose sur plusieurs hypothèses :

i) Les êtres vivants ont une origine commune,

ii) les caractères que l'on considère sont héritables et indépendants les uns des autres.

Le principe de parcimonie repose sur le fait que, pour un groupe d'espèces, la phylogénie la plus vraisemblable est celle qui nécessite le plus petit nombre de changements évolutifs. L'arbre phylogénétique des espèces est conçu de manière à impliquer le minimum d'événements évolutifs.

- ***Avantages :*** la parcimonie permet l'analyse des caractères morphologiques ou des données fossiles, de même que l'évaluation des différents arbres.

- ***Désavantages :*** cette méthode ne s'applique qu'à des caractères discrets. Les résultats obtenus dépendent du taux de substitution, qui ne doit pas être trop élevé. De plus, le calcul des substitutions ne tient pas compte de la longueur des branches («attraction des longues branches», Felsenstein 1978).

1.2 La méthode de maximum de vraisemblance (ML) (Felsenstein, 1981) :

Elle consiste à ajuster les valeurs des paramètres numériques du modèle (matrice de substitutions, longueur des branches) aux données (l'alignement de séquences), pour chaque topologie candidate, c'est-à-dire estimer les valeurs des paramètres ayant la plus forte probabilité de conduire aux séquences observées sachant le modèle évolutif. Cette méthode s'applique à des caractères qualitatifs ou quantitatifs et nécessite de poser un modèle explicite d'évolution. Le maximum de vraisemblance permettra de donner le même résultat que la méthode de parcimonie mais de façon plus lente.

- ***Avantages :*** la méthode de ML est considérée comme l'une des plus fiables, car elle permet d'obtenir le résultat le plus proche de l'arbre évolutif réel. Comparée à la parcimonie, elle est beaucoup moins sensible aux effets de l'attraction de longues branches. En plus, elle permet d'appliquer différents modèles d'évolution et d'estimer la longueur des branches en fonction des changements évolutifs.

- ***Désavantages :*** cette méthode est la plus longue (temps de calcul lourds) vu le nombre important d'estimations nécessaires à faire.

- ***Modèles d'évolution des séquences***

La séquence d'ADN est répliquée au cours du temps. Toutefois cette réplication est discrète, et les mutations sont des évènements rares et aléatoires. On suppose que chaque site de la séquence d'ADN évolue indépendamment des autres sites et suivant un noyau markovien avec des taux de substitutions spécifiques (Falconnet, 2006). Un grand nombre de modèles d'évolution moléculaire a été développé ces dernières années pour étudier ces processus.

Les modèles d'évolution ont pour but de modéliser les divers types de mutation affectant l'ADN, et d'expliquer ainsi certaines différences fonctionnelles ou structurales entre les organismes. Ils permettent les calculs de distances évolutives et surtout la construction d'arbres phylogénétiques exhibant les relations de parenté entre espèces.

Plusieurs logiciels statistiques permettent d'étudier l'évolution des séquences tels que Modeltest, Mega 5 (Posada et Crandall, 1998), et choisissent, sans *a priori*, le modèle d'évolution qui correspond le mieux aux données moléculaires considérées. Nous citons ici les modèles d'évolution les plus utilisés :

Modèle de Jukes-Cantor (JC) :

Ce modèle, souvent noté JC69, suppose que les sites évoluent indépendamment les uns des autres et que chaque substitution a le même taux d'occurrence, c'est-à-dire les quatre bases ont les mêmes fréquences ($\pi A = \pi T = \pi G = \pi C$). Les transitions ($\alpha$) et les transversions ($\beta$) sont équiprobables ($\alpha = \beta$).

Modèle de Kimura (K2P) :

D'après ce modèle, souvent noté K80, les quatre bases ont les mêmes fréquences ($\pi A = \pi T = \pi G = \pi C$). Par contre les transitions (α) et les transversions (β) ne sont pas équiprobables ($\alpha \neq \beta$), car dans la réalité les transitions (T ⟷ C et A ⟷ G) sont plus fréquentes que les transversions (T ou C ⟷ A ou G).

Modèle de Tajima-Nei (TN) :

Il est basé sur l'hypothèse selon laquelle les quatre bases n'ont pas les mêmes fréquences ($\pi A \neq \pi T \neq \pi G \neq \pi C$). Par contre, les transitions (α) et les transversions (β) sont équiprobables ($\alpha = \beta$).

Modèle de Hasegawa, Kishino et Yano (HKY 85) :

Suivant ce modèle, les quatre bases n'ont pas les mêmes fréquences ($\pi A \neq \pi T \neq \pi G \neq \pi C$), et les transitions ($\alpha$) et les transversions ($\beta$) ne sont pas équiprobables ($\alpha \neq \beta$).

Modèle GTR (General time reversible) :

Dans ce modèle également, les quatre bases ont des fréquences différentes ($\pi A \neq \pi T \neq \pi G \neq \pi C$), et il existe 6 types de substitutions (AC, AT, AG, CT, CG, TG).

A chaque modèle ci-dessus cité, des paramètres additionnels peuvent être ajoutés tels que la distribution gamma (Γ) qui permet de corriger les variations de substitutions entre les différents sites, et la proportion de sites invariables (I). On peut inclure les paramètres Γ et I dans différents modèles de changements évolutifs, par exemple : GTR + Γ + I.

d) Fiabilité des arbres phylogénétiques

Plusieurs tests statistiques ont été élaborés pour évaluer la fiabilité des arbres phylogénétiques. Citons ici la méthode la plus utilisée.

Le bootstrapping :

C'est une méthode statistique utilisée pour évaluer la robustesse d'une reconstruction phylogénétique (Felsenstein, 1985). C'est un tirage avec remise des caractères de la matrice de départ permettant de constituer de nouvelles matrices de taille identique. En d'autres termes, ce test permet d'évaluer la résistance de la reconstruction suite à une perturbation du jeu de données initiales par pondération aléatoire des différents caractères. Chacune de ces nouvelles matrices est soumise à une recherche de l'arbre le plus parcimonieux. Ces arbres sont ensuite combinés en un seul arbre de consensus majoritaire. Les clades apparaissent dans plus de 50 % des cas, recevant alors une valeur de bootstrap comprise entre 50 et 100 % (un soutien supérieur à 70 % est considéré comme bon selon Hillis et Bull (1993).

e) La recherche du meilleur arbre

Le choix d'une méthode de reconstruction phylogénétique est laissé au libre arbitre du biologiste, mais il est recommandé de tester au moins deux méthodes différentes pour un jeu de données. Les progrès réalisés en biologie moléculaire permettent à présent d'obtenir rapidement de grandes quantités de séquences. De nombreux jeux de données peuvent ainsi être synthétisés afin d'augmenter la fiabilité des phylogénies obtenues. Toutefois, ceci s'accompagne d'une augmentation de la complexité des analyses, et pose de nouveaux problèmes de résolution et de comparaison des arbres phylogénétiques.

f) Jeux de données multiples et incongruences

Il est important de garder à l'esprit la distinction fondamentale entre l'histoire d'un gène établie à partir de la phylogénie d'une séquence donnée et l'histoire réelle des organismes qui le véhiculent (Doyle et Gaut, 2000). En raison de l'histoire (pas forcément identique) de gènes différents, l'utilisation de plusieurs jeux de données en comparant différents gènes peut engendrer des conflits phylogénétiques résultant de topologies différentes (arbres « non congruents », Darlu et Tassy, 1993). Ces conflits ont des origines variées. Wendel et Doyle (1998) ont distingué les causes potentielles suivantes :

1. Sources liées à la méthodologie utilisée :

Les analyses phylogénétiques basées sur plusieurs jeux de données peuvent différer du fait de problèmes expérimentaux ou techniques :

1. Le manque de résolution des données : si le signal phylogénétique est très faible, il est possible que l'on obtienne des résultats contradictoires.

2. Le choix des gènes utilisés : il est recommandé d'utiliser des gènes dont les taux d'évolution reflètent le mieux possible la divergence entre les taxa étudiés afin d'obtenir le meilleur arbre phylogénétique possible. Ainsi, si les gènes employés ont des taux d'évolution faibles, on aura une faible résolution phylogénétique pouvant générer de l'incongruence. La longueur du gène influe également : en effet, il faut que suffisamment de nucléotides soient échantillonnés afin de donner un signal phylogénétique fiable et cohérent (Hillis, 1996).

3. Les biais techniques tels que : les erreurs de séquençage, les contaminations, les erreurs de lecture ou l'alignement des séquences (Kelchner et Wendel, 1996)).

4. L'échantillonnage des taxa : il peut favoriser l'attraction de longues branches en analyse suivant le critère de parcimonie (Felsenstein, 1981) . Ainsi deux espèces évoluant plus vite que les autres pour le locus considéré seront rapprochées lors de la construction de l'arbre phylogénétique même si elles ne sont pas particulièrement proches.

2. Sources liées au processus affectant les organismes

Plusieurs phénomènes peuvent affecter la phylogénie :

1. La convergence évolutive : qui crée des caractères similaires chez des taxa pouvant être très éloignés. Ces taxa seront alors regroupés alors qu'ils sont évolutivement éloignés.

2. L'évolution rapide de certains traits pose le problème contraire : par conséquent deux taxa proches seront séparés lors de l'analyse.

3. La radiation évolutive : c'est une diversification rapide d'organismes, plus rapide que la diversification génétique. Ainsi, lors de la reconstruction phylogénétique, les entre-nœuds seront courts et difficiles à résoudre en toute confiance.

4. La phénomène d'hybridation : il peut conduire à la formation d'une nouvelle espèce à partir du croisement entre deux espèces différentes. L'histoire réticulée d'une telle espèce est difficile à reconstruire par des méthodes conçues sur la base d'une évolution dichotomique (Linder et Rieseberg, 2004).

3. Sources liées au processus affectant les gènes ou les génomes

Certains processus affectant directement les gènes peuvent générer des conflits phylogénétiques à savoir :

1. La recombinaison intra-génique est due aux échanges entre chromosomes homologues. Elle a le même effet au niveau des gènes que l'hybridation au niveau des organismes (Cronn *et al.,* 2003). Cela peut introduire un biais dans la reconstruction des relations entre organismes et donc des conflits phylogénétiques. Une autre conséquence de la recombinaison intra-génique est qu'elle peut créer des interactions entre locus : le mécanisme de la recombinaison peut être à l'origine de conversion génique. A grande échelle, ce mécanisme entraîne l'évolution concertée de certains locus et est observé notamment au niveau des gènes produisant les ARN ribosomaux (Buckler *et al.,* 2006).

2. La duplication des gènes va créer deux gènes qui vont évoluer indépendamment. Si on souhaite reconstruire l'histoire des espèces, il faudrait employer des jeux de données ne contenant que des gènes orthologues, c'est-à-dire des gènes homologues divergeant par spéciation. Si on inclut un ou plusieurs gènes paralogues, divergeant par duplication, l'arbre obtenu retraçant les divergences entre les organismes sera biaisé par l'histoire de la duplication.

3. L'hétérogénéité des taux de substitutions pour les séquences issues des différents taxa génère des branches pouvant avoir des longueurs très différentes au sein de l'arbre (Gaut *et al.,* 1993). Les longues branches étant sujettes à une attraction, cela biaise le résultat obtenu et génère des conflits avec les autres jeux de données.

4. Les mécanismes moléculaires, tels que les biais de composition en base, les biais mutationnels (Lockhart *et al.,* 1994), ou l'édition des ARN des organites cytoplasmiques (Bowe et Pamphilis, 1996).

B. Classification du genre *Bulinus*

Plusieurs méthodes de classification permettent de distinguer les bulins à l'intérieur de ces quatre groupes.

a) Les méthodes morphologiques

Elles sont principalement basées sur deux critères.

1. La taille

Les bulins ont une hauteur allant de 7 à 23 mm et une largeur de 1,2 à 3,2 mm. Wright (1957) a utilisé les variations entre les proportions (rapport = hauteur / largeur) comme caractère taxonomique. C'est un critère peu fiable car il est difficile de standardiser la croissance des bulins et de savoir reconnaître avec exactitude un individu de taille juvénile ou mature.

2. La forme de la coquille

La coquille caractérisée par une ouverture sénestre, c'est-à-dire à droite, est généralement plus haute que large dans les formes qui ont une spire basse et relativement plus étroite dans les formes qui ont une spire haute. Elle est sous forme de cône inversé, ovale parfois plus allongée au point de devenir presque cylindrique ; selon la hauteur de la spire, elle peut être turriculée. Le nombre de tours varie généralement de 4 à 5, mais peut parfois atteindre 7. La couleur varie du blanc pur au brun marron (Mandahl-Barth, 1959).

b) Les méthodes non morphologiques

Plusieurs méthodes basées sur des marqueurs biochimiques ou moléculaires ont été utilisées pour une meilleure classification des bulins telles que :

1. La chromatographie du mucus

Le mucus à la surface du corps des bulins présente des bandes brillantes fluorescentes sous l'action d'une lumière ultraviolette en utilisant une feuille de papier chromatographique (Mandahl-Barth, 1959). Le groupe *africanus* ne présente aucune bande, tandis qu'une seule bande a été révélée dans le groupe *forskalii*. Par contre, trois à cinq bandes suivant les individus peuvent être observées dans le groupe *truncatus/tropicus* (Mandahl-Barth, 1959).

2. La détermination du nombre de chromosomes

Le nombre de chromosomes varie entre les espèces au sein de ces quatre groupes. Burch en 1960 a mis en évidence la tétraploïdie de *B. truncatus* (2n = 72). Cette tétraploïdie n'est trouvée que parmi les bulins du complexe *truncatus/tropicus,* contrairement aux Planorbes qui sont généralement diploïdes (2n = 18). De plus, cette méthode a permis de décrire trois autres espèces : *B. hexaploidus* (2n = 108), *B. octoploidus* (2n = 144) en Ethiopie (Brown et Burch, 1967 ; Burch, 1972) et *B. permenbranaceus* (2n = 72) au Kenya (Brown, 1976).

3. Les marqueurs biochimiques

De nombreuses informations taxonomiques ont été obtenues grâce à l'analyse enzymatique des bulins. Cette méthode a permis de contribuer à la discrimination de *B. liratus* et *B. obtusispira* à Madagascar (Jelnes, 1984), et de confirmer les populations camerounaises de *B. truncatus* et *B. forskalii* décrites morphologiquement au Cameroun (Mimpfoundi *et al.,* 1990a et b). L'utilisation de cette méthode est possible pour l'identification d'une espèce dans la même région, mais pas entre deux régions différentes. Elle se révèle très peu polymorphe et ne permet pas de décrire la variabilité intra et inter populationnelle.

4. Les marqueurs moléculaires

Au vu des limites des précédents outils, les marqueurs moléculaires ont été utilisés afin de mieux établir la classification des espèces de ce genre. Parmi ces marqueurs :

i) **Les gènes mitochondriaux** ont été utilisés pour construire la phylogénie du genre *Bulinus*. Les travaux de Stohard *et al.* (2001, 2002) en utilisant le Cox1 ont permis d'établir la distinction entre les populations kenyanes de *B. nasutus* et de *B. globosus.* Ceux de Jorgensen *et al.* (2007) en utilisant le Cox1 et le 16S sur plusieurs populations africaines de bulins ont classé *B. nyassanus* et *B. succinoides* au sein du complexe *B. truncatus / tropicus*. Ndassa *et al.* (2007) en utilisant également le Cox1 ont permis de classer les populations du genre *Bulinus* provenant de la région Ouest du Cameroun (Peptonoun) au sein du groupe *truncatus/tropicus* ; cependant elle n'a pas pu identifier l'espèce. Enfin, les études menées par Nalugwa *et al.* (2010) sur 5 populations sénégalaises du complexe *B. truncatus/tropicus* ont permis de distinguer les échantillons de *B. truncatus* et de *B. tropicus* dans cette zone.

ii) **Les gènes ribosomaux** ont également été utilisés comme marqueurs phylogénétiques pour classifier les espèces de ce genre. Kane *et al.* (2008) ont utilisé l'ITS_2 combiné avec le Cox1 pour caractériser plusieurs espèces de *Bulinus* provenant de plusieurs pays. Ces travaux ont permis l'identification de certaines espèces au sein des quatre groupes. De plus, Jorgensen

(2012) en utilisant l'ITS2 a trouvé que le groupe *B. reticulatus* contient une hélice supplémentaire entre les domaines DII et DIII. Cette hélice est unique pour *B. wrighti*. Jorgensen a conclu que le marqueur ITS2 ne peut pas être utilisé comme seul marqueur pour une distinction entre les espèces car les séquences se chevauchent. Une seule étude a utilisé la petite sous-unité 18S, la grande sous-unité 28S et l'histone 3 comme marqueurs phylogénétiques pour étudier le genre *Bulinus* : c'est celle de Jorgensen *et al.* (2010). Les résultats obtenus ont permis de classer *B. truncatus/tropicus* et *B. wrighti* (groupe *reticulatus*) dans un même clade (deux groupes frères) bien soutenus. De plus, ces deux groupes sont plus proches génétiquement du groupe *B. africanus* que du groupe *B. forskalii*. L'accumulation de connaissances sur la dynamique évolutive des gènes répétés ARNr permet actuellement une meilleure exploitation phylogénétique des données fournies par ces régions, y compris la mise en évidence des processus d'évolution réticulée (Soltis *et al.*, 2008).

C. But, problématiques abordées et objectifs

L'élucidation de la diversité génétique des schistosomoses et de leurs hôtes intermédiaires est indispensable pour comprendre les nombreux aspects de l'épidémiologie de la transmission de ces maladies (Agola *et al.,* 2009). En effet, la phylogéographie peut être utilisée pour révéler la diversité génétique dans une zone précise, les événements ayant affecté la démographie des populations, et de mettre en évidence les liens de parenté entre ces espèces (Criscione *et al.,* 2005 ; Archie *et al.,* 2009). Tout ceci, dans le but de prédire les changements évolutifs potentiels induits chez les populations de parasites (Webster *et al.,* 2008; Norton *et al.,* 2010), de même que la dynamique évolutive des pathogènes telle que l'introduction des allèles de résistance aux médicaments (Criscione *et al.,* 2005 ; Huyse *et al.,* 2009).

Les mollusques d'eau douce du genre *Bulinus* sont les hôtes intermédiaires de schistosomes du groupe *S. haematobium* qui sont des parasites importants de l'homme et des animaux domestiques en Afrique. Ce genre a longtemps été reconnu comme un assemblage taxonomique difficile à élucider et actuellement 37 espèces sont regroupées en quatre groupes. Au sein de chaque groupe, il existe des espèces, impliquées dans la transmission des schistosomes. Cette classification est principalement basée sur les caractères taxonomiques, notamment la morphométrie, le nombre de chromosomes, les études d'immunodiffusion et, plus récemment, l'électrophorèse des protéines et l'analyse de l'ADN. Malgré cela, une classification entièrement satisfaisante n'est toujours pas encore disponible (Brown, 1994). En effet, des travaux portant sur l'utilisation des enzymes se sont révélés utiles pour étudier la biologie de ces organismes (Jelnes, 1979, 1986 ; Njiokou *et al.,* 1993) et pour évaluer les relations entre les groupes d'espèces (Biocca *et al.,* 1979 ; Jelnes, 1987).

Pour une classification plus précise de ces mollusques, il serait judicieux d'utiliser des marqueurs moléculaires (Stothard *et al.,* 2001 ; Ndassa *et al.,* 2007 ; Jørgensen *et al.,* 2008). Cependant, il existe encore des limites dans la classification de ce genre en raison d'une variété de facteurs i) tels que l'échantillonnage de taxon insuffisant (nombre et réparation), ii) les marqueurs moléculaires choisis et iii) la méthode statistique et le modèle d'évolution utilisés dans les études.

Afin d'apporter une meilleure approche, nous avons choisi dans ce travail de combiner les marqueurs mitochondriaux et ribosomaux, pour étudier la phylogéographie du genre *Bulinus*.

D’où notre objectif principal qui est d’étudier la phylogénie de sept espèces du genre *Bulinus* provenant de trois pays africains (le Cameroun, le Sénégal et l’Egypte) par deux groupes de marqueurs de phylogénie.

Avec comme objectifs spécifiques :

- ✓ De déterminer la diversité génétique dans les zones étudiées,
- ✓ D’étudier les liens de parenté entre ces espèces,
- ✓ De comprendre l’impact de cette diversité sur la transmission de la schistosomose urinaire.

II. Matériels et Méthodes

A. Matériel biologique

Les échantillons ont été collectés dans trois pays Africains (Cameroun, Sénégal, et l'Egypte). Les caractéristiques géographiques des sites de collecte sont données dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Caractéristiques des différents sites étudiés dans les trois pays

Espèce	Localités	Latitude et longitude	Pré en %	*N*
B. truncatus	Bertoua, Cameroun	4°35'20" N, 13°40'52"E	43,3 (3)	4
	Kékem, Cameroun	5°09'47" N, 10°0'37" E	1 - 4 (1)	4
	Mokolo, Cameroun	10°44'0" N, 13°46'4" E	25 - 49 (1)	2
	Barombi-kotto, Cameroun	4°28'4" N, 9°15'2" E	68.9 (5)	4
	Dschang, Cameroun	5°26'43" N, 10°4'1" E	1 - 4 (1)	4
	Ngaoundéré, Cameroun	7°18'59" N, 13°35'22" E	1 - 4 (1)	4
	Loum, Cameroun	4°42'58" N, 9°44'11" E	62,8 (4)	2
	Behera, Egypte	30°33'28" N, 30°42'14" E	1,80 (6)	4
	Kafer-zayat, Egypte	30°48'08" N, 30°48'06" E	0,45 (6)	2
	Tanta, Egypte	30°45'32" N, 31°00'07" E	0,45 (6)	2
	Kenesa West, Egypte	30°09'39" N, 31°10'09" E	0,26 (6)	2
	Giza, Egypte	30°08'29" N, 31°04'37" E	0,26 (6)	4
	Mansouria, Egypte	30°00'28" N, 31°12'07" E	0,26 (6)	4
	Quena, Egypte	26°10'23" N, 32°09'58" E	4,78 (6)	2
	Diama, Sénégal	15°26'10.43" N, 16°14'2.4" E	-	4
	Guedé, Sénégal	16°31'52.31" N, 14°47'33.62" E	-	4
	Ndmobo, Sénégal	16°26'8.04" N, 15°41'52.18" E	-	4
B. tropicus	Petponoun-East, Cameroun	5°37'59.31" N, 10°38'9.60" E	95	5
	Petponoun-West, Cameroun	5°37'59.12" N, 10° 38' 7.35" E	95	5
B. globosus	Mourtouwa, Cameroun	10°12'42" N, 14°11'28" E	50-100 (1)	4
	Yagoua, Cameroun	10°20'58" N, 15°13'55" E	25-49 (1)	2
	Gounougou, Cameroun	9°4'33" N, 13°42'25" E	78,8 (2)	2
	Ouroudoukoudje, Cameroun	9°5'53" N, 13°43'22" E	57,3 (2)	2
	Djalingo, Cameroun	10°23 '53" N, 15°15'11" E	-	4
	Bessoum, Cameroun	9°7' 0" N, 13°15'11" E	77,2 (2)	6
	Richard Toll, Sénégal	16°27'40.04" N, 15°41'15.29" E	-	4
B. umbilicatus	Gadiak, Sénégal	14°51'49.91" N, 16°3'24.43" E	66.97 (7)	4
	Ngangarame, Sénégal	14°34'60.00" N, 16°28'60.00" E	60.50 (7)	4
B. senegalensis	Maroua, Cameroun	10°34'56.3" N, 14°19'39.6" E	-	4
	Mora, Cameroun	11°3'3.93" N, 14°8'58.7" E	-	4
	Gounougou, Cameroun	9°4'33" N, 13°42'25" E	78,8 (2)	2
	Kaélé, Cameroun	10°6'7.19" N, 14°27'3.01" E	> 50 (1)	4
	Kousseri, Cameroun	12°4'59.99" N, 15°1'60.0" E	-	2
	Toukar, Sénégal	14°31'51.59" N, 16°28'36.60" E	61,31(7)	4
	Diohine, Sénégal	14°29'48.9" N, 16°30'17.82" E	72,54 (7)	4
	Gadiak, Sénégal	14°51'49.91" N, 16°3'24.43" E	66,97 (7)	4
	Poudaye, Sénégal	14°48'48.4" N, 16°37'13.0" E	62,50 (7)	6
	Logdir, Sénégal	14°30'48.4" N, 16°30'13.0" E	48,53 (7)	2
	Ngalagne, Sénégal	14°24'29.08" N, 16°47'43.26" E	91,53 (7)	6
	Kotior, Sénégal	14°28'32.68.2" N, 16°32'13.35" E	43,33 (7)	2
	Godiyel, Sénégal	13°41'0.03" N, 13°26'0.10" E	53,03 (7)	2
	Sob, Sénégal	14°29'20.22" N, 16°26'58.36" E	34,55 (7)	2
	Sass, Sénégal	14°30'3.02" N, 16°24'4.47" E	45,61 (7)	2
B. camerunensis	Barombi-kotto, Cameroun	4°28'4" N, 9°15'2" E	68,9 (5)	6
B. forskalii	Gounougou, Cameroun	9°4'33" N, 13°42'25" E	78,8 (2)	10
Total				164

(1) Brooker *et al.,* 2000 ; (2) Cunin *et al*., 2002 ; (3) Ratard *et al*., 1990 ; (4) Tchuem Tchuente *et al.,* 2003 ; (5) Nkengazong *et al.,* 2009 ; (6) El-Khoby *et al.,* 2000 ; (7) : Senghor *et al.,* 2014. **Pré** = prévalence des cas humains de schistosomose, ***N*** **=** nombre des individus échantillonnés par site.

B. Extraction de l'ADN

Les échantillons préservés dans l'alcool ont été disséqués. Le pied de chaque mollusque a été rincé avec du PBS sous agitation pendant 30 min pour éliminer toute trace d'alcool. L'extraction d'ADN est ensuite réalisée grâce au kit QiAamp DNA Mini Kit (Qiagen®,Courtaboeuf, France) suivant les indications du fournisseur **(cf. annexe 1).**

La qualité de l'ADN extrait a été contrôlée et quantifiée par spectrophotométrie (Nanodrop). Cette extraction permet d'obtenir environ 50 à 300 ng/µL d'ADN, puis les extraits ont été conservés à −20 °C.

C. Gènes étudiés

Dans ce travail, notre choix est basé sur une préoccupation, celle d'utiliser les séquences d'ADN qui permettront de reconstruire l'histoire des organismes, et élucider l'origine des espèces des bulins. Pour cela, nous avons choisi d'analyser deux types de gènes en fonction de la question biologique posée et de leur vitesse d'évolution.

a) Les gènes mitochondriaux

Le génome mitochondrial est considéré comme clonal et rarement ou jamais soumis à la recombinaison (Le *et al.*, 2000). Il contient les gènes de plusieurs protéines de la chaîne respiratoire et des composantes de l'appareil de traduction nécessaire à la biosynthèse des protéines codées par l'ADNmt. Les gènes mitochondriaux sont d'excellents marqueurs moléculaires pour définir des groupes de populations, pour étudier l'histoire génétique d'un groupe d'isolats ainsi que pour construire des phylogénies (Le *et al.*, 2000). Ces marqueurs mitochondriaux sont transmis par les femelles. Par conséquent, la cytochrome C oxydase 1 a été choisie en utilisant deux types d'amorces **(Figure 11)**.

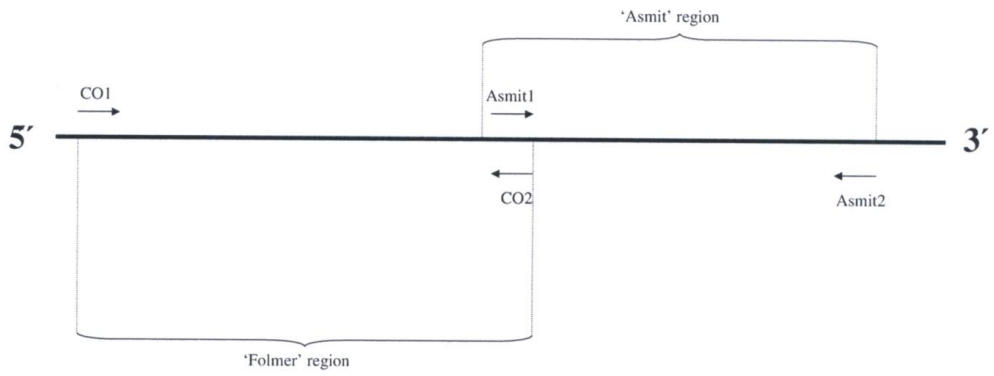


Figure 11. Localisation des amorces utilisées pour la Cox1 (Kane *et al.*, 2008)

b) Les gènes ribosomaux

Les gènes codant l'ARN ribosomal (ARNr) forment une famille multigénique très utilisée en phylogénie moléculaire. La conservation des zones codantes au cours de l'évolution a permis la définition d'amorces « universelles » utilisées pour analyser les "espaceurs internes transcrits" communément appelés ITS **(Figure 13)** et qui sont très variables entre taxons proches (White *et al.* 1990). Ces séquences sont soumises à une évolution concertée, ce qui fait qu'en général un seul type de répétition est présent dans un génome, en plusieurs centaines de copies et cela permet de s'affranchir des biais engendrés par la paralogie (Baldwin *et al.*, 1998). Toutefois, chez les espèces d'origine hybride ou polyploïde, l'évolution différentielle des copies parentales et les taux variables d'évolution concertée représentent une limite sérieuse de ces marqueurs en phylogénie s'ils sont employés seuls (Álvarez et Wendel, 2003). Trois gènes ribosomaux ont été utilisés pour les analyses phylogénétiques : les espaceurs internes transcrits ITS1, ITS2, la grande sous-unité 28S et la petite sous-unité 18S **(Figure 12).**

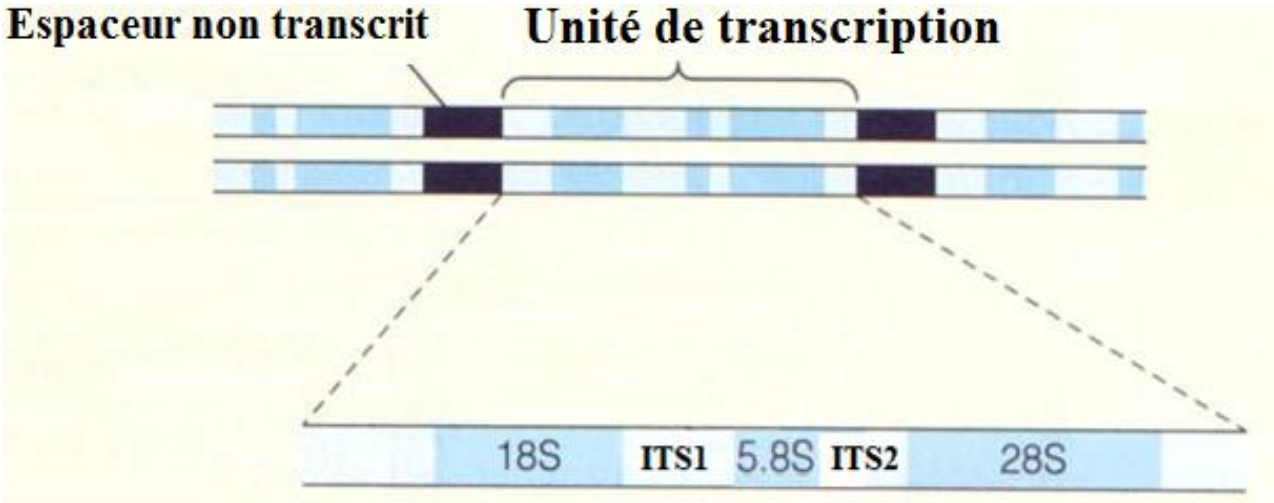


Figure 12 : **Organisation de la région des gènes ribosomaux utilisés (original)**

D. Amplification de l'ADN

La Polymerase Chain Reaction (PCR) (Kleppe *et al.*, 1971) est une méthode *in vitro* d'amplification de séquences spécifiques d'ADN en un très grand nombre de copies. Elle permet d'amplifier une séquence spécifique d'ADN dans un mélange réactionnel approprié.

1. Les étapes de l'amplification

La PCR est constituée de plusieurs cycles et comporte trois étapes successives :

La dénaturation : elle correspond à la séparation des brins de l'échantillon d'ADN par chauffage entre 90°C et 95°C pendant une courte durée (quelques secondes). L'ADN se retrouve ainsi sous forme monocaténaire.

L'hybridation : les amorces se fixent sur l'ADN monobrin dans les zones de complémentarité des nucléotides selon l'association A-T et C-G à la température d'hybridation (55°C et 68°C).

L'élongation : c'est la phase d'élongation des amorces par la Taq polymérase qui va synthétiser le brin complémentaire en utilisant les dNTP, ce qui permet de doubler l'ADN cible. Chaque cycle ainsi répété permet d'aboutir à un ADN cible multiplié.

2. Le mélange réactionnel

Le mélange réactionnel contient :

Une enzyme : appelée Taq polymérase thermostable qui permet la synthèse de nouveaux brins d'ADN identiques aux précédents par élongation des amorces.

Les dNTP (déoxynucléotide triphosphate) : ce sont les unités constitutives d'ADN. Il existe quatre différentes bases : adénine (A), thymine (T), guanine (G), cytosine (C). Leur ordre d'association constitue le code de l'expression de l'information génétique.

$MgCl_2$: les ions magnésium influent sur l'activité enzymatique de la Taq.

Les amorces ou oligonucléotides (primers) : ce sont des polymères nucléotidiques, de 10 à 30 paires de base, de séquences spécifiques du gène à amplifier, et capable de s'hybrider sélectivement avec une région particulière de l'ADN.

Un tampon : il contient du Tris-Cl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$, $MgC1_2$ (15mM), pH = 8,7.

L'ADN extrait de chaque individu des bulins a été amplifié en utilisant des amorces codant pour la Cox1, les ITS1 et ITS2, 18S et 28S **(cf. annexe 2)**. La solution d'amplification pour toutes les amorces consiste en 5 µL de tampon 1×0,8 µL de dNTP, 1,5 µL de $MgCl_2$,

0,4 µL de chaque amorce à 20 ng/µL, 2,5 unités de Taq polymérase Qiagen®, et 500 ng/µL d'ADN matrice, dans un volume réactionnel final de 25 µL. Le programme du thermocycleur pour chaque amorce est décrit en annexe 2.

E. Contrôle de la PCR

La présence des amplicons est révélée sur gel d'agarose à 2 %.

1. Préparation du gel

Dans 75 µL du tampon TBE 1 X (Tris Borate EDTA), 1,5g d'agarose a été ajouté. Le mélange a été chauffé jusqu'à dissolution totale de l'agarose. Puis 5 µL de BET (bromure d'éthidium) ont été ajoutés. Le bromure d'éthidium est un agent intercalant de l'ADN qui permet la visualisation des molécules d'ADN par exposition à une lumière UV. Le gel est ensuite déposé dans une cuve Thermo Minicel Primo EC320 (Electrophoretic gel system) sur laquelle ont été déposés des peignes de 14 puits afin de polymériser.

2. Dépôt des échantillons

5 µL d'ADN de chaque échantillon amplifié ont été mélangés avec 1,5 µL de bleu de charge (Gel Loading Solution type I : Sigma®, Saint-Louis, Missouri, USA) et déposés dans chaque puits du gel. La même opération est réalisée avec 1 µL de marqueur de poids moléculaire (Invitrogen®, Carlsbad, USA), ce qui permet d'apprécier la taille des fragments amplifiés.

3. La migration

La migration de l'ADN dans le gel est possible grâce à sa charge négative. Il va se déplacer dans un champ électrique, du pôle négatif vers le pôle positif. Elle permet de séparer les molécules en fonction de leur taille et de leur forme. Ainsi les grandes molécules très étendues migrent lentement alors que les petites molécules repliées sur elles-mêmes migrent rapidement.

4. La photographie

La photographie du gel se fait avec une chambre photographique à ultra-violets. Les résultats sont enregistrés sur le logiciel GELSMART (7.0 Clara Vision.8).

F. Séquençage des fragments amplifiés

Le séquençage de produits de PCR se déroule en trois étapes :

1. Purification des produits de PCR

Après vérification sur gel, les produits de PCR sont purifiés via le kit Mini kit Qiagen®.

2. Réaction de séquençage

Elle repose sur la méthode de SANGER ou méthode des interrupteurs de chaîne, adaptée à la fluorescence.

- Principe de la méthode de SANGER

La réaction de Sanger repose sur l'incorporation aléatoire de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) présents dans le milieu réactionnel par l'ADN polymérase. Ces ddNTP diffèrent des dNTP par leur extrémité 3'. L'extrémité 3'OH des dNTP est remplacée par une extrémité 3'H. Cette modification empêche la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant. L'allongement de la chaîne est alors interrompu. Dans le milieu réactionnel il y a compétition entre les dNTP et les ddNTP. Le rapport spécifique ddNTP/dNTP et l'affinité de la taq pour chaque nucléotide sont optimisés de telle façon qu'un ddNTP soit statistiquement incorporé à toutes les positions possibles. L'élongation de chaque produit monobrin se termine par l'incorporation d'un ddNTP spécifique. Ici, chaque ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) est marqué par un fluorochrome différent dont le spectre d'émission est spécifique. Une analyse spectrale va différencier les différents fluorochromes, associer la base correspondante et donc définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial.

Nous avons utilisé la technologie Big Dye® Terminator_version 3.1 (PE Applied Biosystems). Cette technologie utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un linker. Le premier est une fluorescéine (6 carboxyfluoréscéine) appelé fluorochrome donneur, commun aux quatre ddNTP. Le second est une dichlororhodamine (dRhodamine) qui joue le rôle de fluorochrome accepteur. Le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser à argon émettant à 488 nm et 514,5 nm. Son énergie de fluorescence émise (515-520 nm) est captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est excité à son tour. Le fluorochrome accepteur ou dichloroRhodamine est différent pour chaque type de ddNTP. Le spectre de la fluorescence réémise sera ainsi spécifique de chaque type de ddNTP. Le transfert du signal de

la fluorescéine vers la dRhodamine permet une amplification du signal et, par conséquent, une augmentation de la sensibilité de la technique. L'adaptation de la technique de Sanger à la fluorescence permet d'effectuer la réaction de séquençage dans un tube unique.

3. Purification de la réaction de séquençage par Sephadex G-50

Une deuxième purification a été faite via la plaque MultiScreen filtre HTS-HV (Merck Millipore) et le Sephadex G-50 superfine (Fisher Scientific).

- Principe

La chromatographie d'exclusion permet le piégeage de particules de bas poids moléculaire sur une colonne Sephadex G50 constituée de billes perforées dont les trous ont un diamètre déterminé (ici de 20 à 50 µm). Les petites particules de diamètre inférieur à ceux-ci entrent et sont piégées. A l'inverse, les grosses vont passer autour et être éluées très rapidement. La réaction de séquençage est purifiée par chromatographie pour piéger les ddNTP libres, en excès. En effet, ces ddNTP libres non incorporés lors de la réaction pourraient parasiter les signaux de fluorescence spécifiques. Les sels éventuellement présents sont piégés de la même manière que les ddNTP.

Ensuite, les séquençages ont été réalisés par un séquenceur capillaire ABI 377 (méthode Sanger). La qualité du séquençage Sanger est d'éviter un recours systématique au clonage.

G. Analyse des séquences et reconstruction phylogénétique

a) Préparation des séquences

Les séquences obtenues ont été corrigées et traduites en nucléotides en utilisant le code génétique mitochondrial des invertébrés et inspectées pour codons stop en utilisant SeqScape v2.5. Une fois les séquences corrigées, nous avons vérifié qu'elles correspondent à la portion de génome ciblée. Pour ce faire, les séquences sont soumises à BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) via le centre national d'information biotechnologie GenBank. Nous avons ainsi pu obtenir le pourcentage d'identité entre la séquence soumise et la séquence-cible, la longueur de recouvrement et surtout, l'orientation de la séquence soumise par rapport à la séquence de référence (plus/moins). Avant de procéder à l'alignement des séquences obtenues, les outliers ont été éliminés, c'est-à-dire les séquences présentant moins de 40 % d'identité avec les autres séquences de la matrice. En effet, en-dessous de ce seuil, l'alignement multiple est fortement perturbé et peut conduire à de fausses interprétations. Les séquences nucléotidiques obtenues

ont ensuite été soumises à GenBank sous les numéros d'accession KJ135287-KJ135308 et KJ157326-KJ157508.

b) Alignement des séquences

L'alignement de séquences est une des opérations les plus courantes en bioinformatique. Son importance est fondamentale dans le processus de la reconstruction phylogénétique, puisque c'est sur elle que se basent beaucoup de résultats comme les mesures d'identité et la recherche d'homologies entre séquences (Morrison et Ellis, 1997). En effet, tout le reste de la chaîne de traitement va être affecté par les choix faits à cette étape.

Dans notre étude, les données ont été alignées en utilisant CLUSTAL 1.83 (Soltis *et al.*, 2008) qui permet de réaliser des alignements multiples, et c'est d'une remarquable efficacité tant que le jeu de données ne présente pas de complexité particulière. Les alignements ont été sauvegardés sous forme FASTA (extension.fas).

c) Analyse de la diversité des séquences

L'objectif de cette section est d'identifier des populations et de déterminer quelle est la structure de ces populations de bulins dans les régions d'étude. Pour cela, nous avons cherché à différencier des groupes d'individus, puis nous les avons classés en ensembles significativement divergents les uns des autres en considérant le niveau haplotypique.

Nous avons utilisé la matrice de données de chaque gène étudié pour calculer les paramètres suivants en utilisant le logiciel DNAsp (Rozas *et al.*, 2003) : les sites variables, les sites informatifs de la parcimonie, le nombre des haplotypes, la diversité haplotypique, et la diversité nucléotidique. Pour vérifier si nos résultats sont statistiquement significatifs, nous avons utilisé le nombre total des mutations pour calculer le test Tajima's (Neutrality test).

Ensuite, nous avons calculé les distances génétiques entre les quatre groupes et au sein des groupes des bulins, à l'aide de Mega 5 en utilisant le modèle de P-distance. Ainsi l'indice de diversification Fst a été calculé pour les mêmes espèces entre les trois pays d'études à l'aide de DNAsp (Rozas *et al.* 2003).

Enfin, nous avons calculé les taux de substitutions synonymes (Ks) et non synonymes (Ka) à l'aide du logiciel DNAsp (Rozas *et al.* 2003) pour les régions codantes de tous les gènes afin de déterminer le type d'évolution qui affecte nos séquences.

d) Reconstruction phylogénétique

Dans cette section, nous décrirons notre axe méthodologique concernant l'analyse phylogénétique. En construisant des phylogénies de séquences, notre objectif est double. Dans

un premier temps, il s'agit de clarifier les relations de parenté existant entre les différentes lignées de bulins, avec comme hypothèse sous-jacente l'idée que la phylogénie des gènes reflète celle des organismes. Dans un deuxième temps, en appliquant les techniques de reconstruction phylogénétique à des séquences d'éléments transposables, nous avons cherché à évaluer leur diversité et leur fréquence au sein de certaines lignées de bulins.

- Les analyses de Neighbor-Joining sont réalisées en conservant tous les paramètres par défaut via le logiciel Mega version 5 (Kumar *et al.*, 2004).

- Les analyses de parcimonie sont réalisées en utilisant les paramètres par défaut et en ignorant les caractères non phylogénétiquement informatifs pour la méthode de parcimonie. Le choix du modèle pour les analyses de maximum de vraisemblance se fait à l'aide du logiciel Mega version 5 (Kumar *et al.*, 2004). Des tests de bootstrap ont été réalisés avec au minimum 1000 réplicats à chaque fois que cela a été possible. Les nœuds pour lesquels la valeur du bootstrap est supérieure à 90 % ont été considérés comme fortement soutenus, et ceux avec des valeurs de bootstrap entre 70 % et 89 % sont considérés comme modérément soutenus.

Pour chaque analyse phylogénétique, nous avons testé un ou plusieurs groupes externes pour vérifier qu'ils n'introduisaient pas de biais dans les topologies obtenues. Les différentes topologies ont été comparées visuellement.

Enfin, avec l'aide du logiciel Mega 5 (Kumar *et al.* 2004), nous avons testé l'hétérogénéité des taux de substitution sur les séquences en utilisant le test des taux relatifs de Tajima (1993), afin de voir si les différentes copies des gènes dupliqués par polyploïdie évoluaient différentiellement.

III. Résultats

L'objectif de cette section est, d'une part, de présenter les jeux de données mitochondriales et ribosomales qui serviront par la suite aux traitements statistiques et, d'autre part, de déterminer la diversité génétique des bulins dans les régions étudiées, afin d'établir les relations phylogénétiques entre les différents taxons. Dans cette partie, les résultats de chaque gène étudié sont présentés séparément, puis les données sont combinées pour former une seule matrice.

A. Variabilité des séquences utilisées

Au total, des taxons appartenant à 7 espèces des bulins ont été séquencés avec 5 amorces : 2 amorces codant pour la Cox1, et une amorce pour chacun des gènes ribosomaux.

Le tableau 3 regroupe quelques données statistiques concernant les matrices COI, ITS, 18S et 28S analysées dans la suite du chapitre. Les outgroups ont été exclus afin que les données présentées soient représentatives du genre *Bulinus*.

Tableau 3 : **Résumé des données statistiques des matrices COI, ITS, 18S et 28S**

Gènes	Amorces	Taxons	Longueur (Pb)	Sites variables	Nb de sites informatifs de la parcimonie
Gène mitochondrial	COI	132	647	401	67
	ASMIT	158	391	276	144
Gènes Ribosomaux	18S	80	974	23	4
	28S	80	270	281	83
	ITS1 et ITS2	17	650	102	65
	Matrices combinées	40	2653	600	394

Le marqueur 18S présente environ 4 caractères informatifs pour 974 nucléotides, tandis que la Cox1 est largement plus riche en signal phylogénétique pour les deux amorces COI et ASMIT (tableau 4). Quant au marqueur 28S, il présente un niveau de signal comparable à celui de ITS (83 caractères informatifs pour 872 nucléotides). Le 18S s'est révélé plus conservatif, les séquences ont une forte similitude

B. Analyse génétique des populations étudiées

2.1. ADN mitochondrial

Outre les 162 séquences d'ADN mitochondrial obtenues dans cette étude provenant de trois pays (Cameroun, Egypte et Sénégal), nous avons repris toutes les séquences de l'ADN mitochondrial des bulins trouvées dans GenBank du génome accessible au public, afin de comparer la diversité actuelle de ces sept espèces entre les différents pays africains. Les séquences étudiées se sont révélées assez variables, la majorité des mutations uniques ne forme pas des liens entre les haplotypes, suggérant ainsi que ce sont des mutations aléatoires qui ne persistent pas au sein de la population.

a) Cox1-région Folmer

Une matrice de données de 611 pb a été utilisée dans cette analyse. Le nombre d'haplotypes par espèce est présenté dans le **tableau 4**. La diversité haplotypique globale est très élevée dans nos échantillons, ainsi que la diversité nucléotidique. La plus grande diversité haplotypique (HD) a été notée chez *B. senegalensis* et *B. forskalii*, tandis que *B. umbilicatus* et *B. camerunensis* ont les valeurs les plus basses.

- *B. truncatus*

Au total, 60 séquences ont été analysées, 30 séquences de nos échantillons et 30 séquences extraites de GenBank (Ouganda et Nigeria) **(tableau 4)**. Nous avons identifié 23 haplotypes distincts et un nombre total de 36 mutations. La diversité haplotypique globale dans les cinq pays était très élevée (Hd = 0,926), tandis que la diversité nucléotidique était faible (π = 0,007). La diversité des haplotypes dépasse 0,800 dans toutes les régions à l'exception de l'Ouganda **(Tableau 4)**. Le Nigeria a partagé le même haplotype avec l'Ouganda et le Sénégal, et un autre avec l'Egypte. Par contre, il n'y avait pas d'haplotype commun entre le Cameroun et le Nigeria.

Nous avons pu calculer cinq haplotypes dans les populations de *B. truncatus* provenant du Cameroun, que nous pouvons repartis en quatre groupes : un haplotype de l'Extrême Nord (Mokolo), deux haplotypes du Sud-Ouest (Dschang, Kekem, Loum et Barombi-kotto), un haplotype de l'est (Bertoua) et un haplotype de l'Adamaoua (N'Gaoundéré). Il n'y avait pas d'haplotypes communs entre les quatre haplo-groupes.

En Egypte, deux différents haplotypes ont été notés : un haplotype du nord (Mansoura, Behera, Tanta, et Giza) et un autre du sud (Quena). Les haplotypes égyptiens forment un

groupe spécial qui diffère des haplotypes camerounais par quatre changements simples de nucléotides.

Au Sénégal, nous avons trouvé trois haplotypes spécifiques pour chaque site (Diama, Guédé et Ndombo). Au sein de cette catégorie, il n'y avait pas d'haplotypes communs entre les individus provenant de trois pays d'étude.

- ***B. globosus***

Au total, 29 séquences ont été analysées, 10 séquences du Cameroun ont été séquencées dans le cadre de cette étude et 19 séquences ont été récupérées de GenBank (Tanzanie et Kenya) **(Tableau 4)**. Nous avons identifié 17 haplotypes différents et un total de 135 mutations a été calculé. La diversité haplotypique était très élevée (Hd = 0,961), avec une diversité nucléotidique globale de 0,053. La Tanzanie et le Kenya partagent quatre haplotypes, alors il n'y avait pas haplotypes communs entre le Cameroun et les deux autres pays. Concernant les populations camerounaises de *B. globosus*, six haplotypes uniques ont été relevés parmi les 6 populations étudiées (un haplotype unique pour chaque site).

- ***B. senegalensis***

Au total, 20 séquences du Cameroun et du Sénégal ont été séquencées ; il n'y avait pas de séquences de cette espèce dans GenBank **(Tableau 4)**. Nous avons calculé 20 haplotypes distincts et un nombre total de 298 mutations. La diversité globale des haplotypes est la plus élevée (Hd = 1,000) par rapport aux autres espèces, comme pour la diversité nucléotidique (π = 0,093). Les deux pays ne partagent pas tous les haplotypes communs.

- ***B. tropicus***

Au total, 21 séquences ont été analysées : 10 séquences de deux localités du Cameroun, et 11 séquences de GenBank (Ouganda) **(Tableau 4)**. Nous avons calculé 17 haplotypes différents et 46 mutations. La diversité haplotypique était élevée (Hd = 0,981) ainsi que la diversité nucléotidique (π = 0,023). Les deux pays africains partageaient un haplotype.

- ***B. forskalii***

Au total, 21 séquences ont été analysées : 10 séquences de Gounougou au Cameroun, et 11 séquences ont été extraites de GenBank (Ouganda) **(Tableau 4)**. Nous avons calculé 21 haplotypes différents et 81 mutations. La Hd était comparable à celle trouvée chez *B. senegalensis* (Hd = 1,000), tandis que la diversité globale de nucléotides était plus faible (π = 0,093). Aucun haplotype commun n'a été partagé entre les deux pays.

- ***B. umbilicatus*** **et** ***B. camerunensis***,

Seulement deux séquences ont été analysées à partir de chacune des espèces **(Tableau 4)**. Ainsi, la diversité globale des haplotypes était élevée (Hd = 1,00), mais ces résultats ne

sont pas comparables avec les séquences d'autres espèces étant donné la faible taille de l'échantillonnage.

b) Cox1-région Asmit

Une matrice de données de 387 pb a été utilisée dans cette analyse. Un plus grand nombre d'individus de chaque espèce a été séquencé avec cet amorce, et nous avons détecté une diversité haplotypique et nucléotidique plus élevée dans toutes les espèces par rapport à la région Folmer **(Tableau 4)**. En outre, chez les populations pour lesquelles il y avait un grand nombre d'individus génotypés, la quasi-totalité d'entre eux contenait des haplotypes relativement proches qui différent par une ou deux substitutions de bases au sein des espèces provenant d'un même pays. En revanche, ce n'est pas le cas lorsque les populations de la même espèce, originaires de différents pays, sont comparées. Par exemple, chez *B. truncatus*, les haplotypes des populations égyptiennes différent des populations camerounaises par trois à cinq substitutions de base. De même que les populations de *B. senegalensis* où les haplotypes du Sénégal ont différé de ceux du Cameroun par quatre substitutions de bases.

2.2. ADN nucléaire

Dans cette analyse, nous avons utilisé uniquement des séquences générées dans le cadre de cette étude, car il n'avait pas des séquences d'ADNr des bulins dans GenBank pour réaliser une étude au niveau de la diversité des populations.

a) région 18S

Une matrice de données de 852 pb a été alignée pour 80 échantillons. Les séquences avaient une forte similitude.

- B. truncatus

Au total, 30 échantillons provenant de trois pays ont été analysés **(Tableau 4)**. Trois haplotypes ont été calculés. La diversité globale des haplotypes était très faible (Hd = 0,157), avec une diversité nucléotidique globale de 0,001. Un haplotype a été détecté au Sénégal dans la population de Diama, qui diffère de l'haplotype détecté dans les autres sites de collecte.

- B. globosus

Au total, 10 séquences ont été analysées à partir de 6 localités différentes au Cameroun **(Tableau 4)**. Nous avons calculé trois haplotypes et 3 mutations ; la diversité moyenne des haplotypes était de 0,417, et la diversité nucléotidique totale était de 0,001.

- ***B. senegalensis***

Au total, 20 séquences ont été analysées des populations venant du Cameroun et du Sénégal **(Tableau 4)**. Malgré le caractère très conservateur de la région 18S, un total de 13 haplotypes a été observé parmi les populations de *B. senegalensis*, et cinq haplotypes communs ont été notés entre les populations camerounaises et sénégalaises. Une diversité haplotypique et nucléotidique plus élevée a été détectée chez *B. senegalensis* du Cameroun (Hd = 0,964 ; π = 0,002).

- ***B. forskalii***

Au total, 10 séquences ont été analysées provenant des populations de Gounougou au Cameroun **(Tableau 4)**. Quatre haplotypes différents et 3 mutations ont été calculés. La diversité moyenne des haplotypes était élevée (Hd = 0,417) compte tenu du fait que les échantillons ont été prélevés dans la même localité, avec une diversité nucléotidique de 0,001.

- ***B. tropicus* et *B. umbilicatus***

Deux séquences ont été seulement analysées à partir de chacune des deux espèces **(Tableau 4)**. Ainsi, la diversité globale des haplotypes était élevée (Hd = 1,00), mais ces résultats ne sont pas comparables avec les séquences provenant d'autres espèces étant donné la faible taille d'échantillonnage.

b) région 28S

Une matrice de données de 855 pb a été utilisée dans cette analyse. Les séquences se sont révélées plus variables que celles de 18S. Le marqueur 28S a montré un nombre plus élevé d'haplotypes que celui révélé avec la 18S **(Tableau 4)**. La diversité haplotypique dépasse 0,5 dans toutes les espèces. Chez *B. truncatus*, 13 haplotypes ont été définis dont quatre ont été partagés entre les trois pays. Chez *B. globosus*, 8 haplotypes ont été notés. Chez *B. senegalensis*, 14 haplotypes ont été trouvés ; il n'y avait aucun haplotype commun entre le Cameroun et le Sénégal. Chez *B. umbilicatus* et *B. tropicus*, nous avons calculé deux haplotypes différents et enfin trois haplotypes ont été trouvés chez *B. forskalii*.

c) région ITS

Les données d'ITS n'étaient disponibles que pour 17 populations. Par conséquent, ces données ont été utilisées uniquement pour les analyses phylogénétiques de base et non pas au niveau de la génétique des populations. Les séquences étaient très différentes en termes de variation de longueur, avec une gamme allant de 600 à 990 pb. Les séquences les plus courtes ont été notées chez *B. globosus* chez lequel une grande partie de la séquence manquait, ce qui

indique probablement des événements de suppression. Les séquences les plus longues en termes de paire de base ont été trouvées chez l'espèce *B. tropicus*.

Tableau 4 : Diversité de séquences d'ADN étudié chez différentes espèces de *Bulinus*

	Région	**n**	***u***	***Hd***	***π***	***D (P-value)***	***Fs (P-value)***
COX1- région Folmer							
B. truncatus	**total**	**60**	**23**	**0,926**	**0,007**	**-1,549**	**-9,209 ***
	Cameroun	10	6	0,833	0,006	-1,765 *	-0,803
	Egypte	10	5	0,800	0,006	0,699	0,276
	Sénégal	10	6	0,810	0,006	-1,048	-1,938
	Nigeria	20	5	0,621	0,005	-0,258	1,471
	Uganda	10	7	0,933	0,006	-0,352	-1,343
B. globosus	**total**	**29**	**17**	**0,961**	**0,053**	**-0,354**	**1,840**
	Cameroun	10	10	1,000	0,045	-0,654	0,438
	Tanzanie	12	6	0,848	0,025	1,131	7,216
	Kenya	7	5	0,905	0,035	1,450	3,464
B. senegalensis	**total**	**20**	**20**	**1,000**	**0,093**	**-1,773**	**-1,229**
	Cameroun	10	10	1,000	0,050	-0,274	-0,299
	Senegal	10	10	1,000	0,135	-1,412	1,637
B. tropicus	**total**	**21**	**17**	**0,981**	**0,023**	**0,337**	**-0,302**
	Cameroun	10	7	0,933	0,029	0,982	0,487
	Uganda	11	11	1,000	0,011	2,233	-5,868
B. forskalii	**total**	21	21	1,000	0,038	-0,568	-4,852
	Cameroun	10	10	1,000	0,043	-0,823	0,349
	Uganda	11	11	1,000	0,012	0,653	-5,362
B. umbilicatus	Senegal	2	2	1,000	0,002	-	-
B. camerunensis	Cameroun	2	2	1,000	0,002	-	-
COX1- région Asmit							
B. truncatus	**total**	**62**	**48**	**0.981**	**0,092**	**-1,834 ***	**-0,875**
	Cameroun	24	20	0,955	0,042	-1,712	-0,249
	Egypte	20	12	0,614	0,023	-0,844	1,997
	Sénégal	12	9	0,961	0,083	-0,867	4,159
	Madagascar	6	5	0,933	0,020	-0,537	0,175
B. globosus	**total**	**45**	**26**	**0,945**	**0,058**	**0,256**	**0,569**
	Cameroun	20	18	0,978	0,035	-1,082	-1,351
	Tanzanie	15	7	0,781	0,034	0,825	3,603
	Kenya	10	4	0,800	0,019	1,446	4,810

B. senegalensis	**total**	**50**	**45**	**0,992**	**0,046**	**-1,611**	**-8,626**
	Cameroun	16	14	0,964	0,031	-0,364	-0,141
	Sénégal	34	30	0,985	0,041	-1,666	-2,707
B. tropicus	Cameroun	10	8	0,932	0,005	-0,271	-1,531
B. forskalii	Cameroun	10	10	1,000	0,031	-0,027	-2,667
B. umbilicatus	Sénégal	8	5	0,860	0,065	1,466	2,921
B. camerunensis	Cameroun	6	4	0,899	0,016	-0,8374	1,655
18S							
B. truncatus	**total**	**30**	**2**	**0,157**	**0,001**	-0,0483	-4,121
	Cameroun	10	1	0,000	0,000	-	-
	Egypte	10	1	0,000	0,000	-	-
	Senegal	10	2	0,278	0,002	-0,507	2,199
B. globosus	Cameroun	10	3	0,417	0,001	-1,233	-0,189
B. senegalensis	**total**	**20**	**13**	**0,894**	**0,002**	**-0,009**	**-4,792**
	Cameroun	10	9	0,964	0,002	0,168	-4,538
	Sénégal	10	7	0,833	0,001	0,592	-0,658
B. tropicus	Cameroun	2	2	1,000	0,002	-	-
B. forskalii	Cameroun	10	4	0,458	0,001	-0,612	0,172
B. umbilicatus	Senegal	2	2	1,000	0,002	-	-
28S							
B. truncatus	**total**	**30**	**13**	**0,505**	**0,009**	**-1,956 ***	**-4,095**
	Cameroun	10	5	0,539	0,010	-1,116	-0,062
	Egypte	10	4	0,504	0,006	-1,193	-1,716
	Senegal	10	6	0,568	0,014	1,323	1,285
B. globosus	Cameroun	10	8	0,965	0,004	1,168	-0,946
B. senegalensis	**total**	**20**	**14**	**0,955**	**0,009**	**-0,159**	**-1,962**
	Cameroun	10	8	0,893	0,003	-1,375	-1,785
	Senegal	10	9	0,956	0,004	1,168	-0,946
B. tropicus	Cameroun	2	1	0,000	0,000	-	-
B. forskalii	Cameroun	10	7	0,800	0,082	1,365	7,499 **
B. umbilicatus	Sénégal	2	1	0,000	0,000	-	-

n : nombre d'échantillons **;** ***u*** : nombre des haplotypes ; ***Hd*** : diversité haplotypique ; ***π*** **:** diversité nucléotidique ; **K** : nombre moyen de différence ; ***D*** : Tajima's D statistic ; ***Fs*** : Fu's Fs statistic.

* P < 0.05 ; ** P < 0.01

C. Analyse de la distance génétique des populations étudiées

1. Entre les espèces

La matrice de données combinée a été utilisée pour calculer l'indice de diversification (Fst) entre les sept espèces étudiées **(tableau 5)**. La plus grande divergence a été observée entre les populations de *B. umbilicatus* et *B. forskalii* (Fst = 0,903) tandis que celles de *B. truncatus* et *B. tropicus* sont les plus étroitement liées (Fst = 0,206).

Tableau 5 : Estimation de (Fst) par paires d'espèces en utilisant la matrice de données combinées

Espèces	*B. truncatus*	*B. tropicus*	*B. senegalensis*	*B. camerunensis*	*B. forskalii*	*B. globosus*
B. tropicus	0,206					
B. senegalensis	0,538	0,600				
B. camerunensis	0,622	0,699	0,777			
B. forskalii	0,618	0,703	0,761	0,623		
B. globosus	0,523	0,599	0,721	0,791	0,793	
B. umbilicatus	0,659	0,711	0,817	0,899	0,903	0,774

2. Au sein des espèces

La divergence moyenne entre les haplotypes au sein d'une espèce a été calculée en utilisant la matrice de données combinées **(tableau 6)**. L'espèce la plus hétérogène est *B. senegalensis*, tandis que les individus au sein de *B. forskalii* et *B. tropicus* sont les plus homogènes.

Tableau 6 : Estimation de la divergence évolutive moyenne au sein des espèces en utilisant la Cox1 (Folmer et Asmit), 18S, 28S et la matrice de données combinées.

Espèces	**Cox1-Folmer**	**Cox1-Asmit**	**18S**	**28S**	**Matrice combinée**
B. truncatus	0,007±0.002	0,099 ±0,006	0,000±0,000	0,008±0,002	0,023±0,001
B. tropicus	0,001±0.005	0,005 ±0,009	0,000±0,001	0,003±0,008	0,004±0,003
B. senegalensis	0,052±0.005	0,048 ±0,005	0,002±0,001	0,010±0,002	0,034±0,002
B. forskalii	0,005±0.005	0,002 ±0,006	0,001 ±0,001	0,004±0,008	0,003±0,003
B. globosus	0,074±0.006	0,039 ±0,006	0,001±0,001	0,015±0,002	0,026±0,002
B. umbilicatus	0,010±0.003	0,012 ±0,004	0,002±0,001	0,004±0,002	0,005±0,001
B. camerunensis	0,018±0.004	0,021 ±0,006	-	-	-
Distance moyenne	0,131 ± 0.009	0,134±0,009	0,006±0,002	0,039±0,003	0,076±0,003

D. Tests de neutralité

Le logiciel DnaSP v5.10.1 a été utilisé pour calculer les deux tests de neutralité (Tajima et Fu) afin de détecter une déviation de l'équilibre causée par une sélection au niveau génétique ou un changement dans la taille de la population. Chez *B. truncatus*, le test Fu' *Fs* global était significativement négatif avec la Cox1-région Folmer, alors qu'aucun des résultats significatifs n'a été obtenu lorsque les échantillons provenant de différents pays ont été analysés, probablement en raison de la petite taille des échantillons. Le test Tajima a été significativement négatif avec le Cox1-région Asmit et la 28S. Bien que ces deux statistiques aient été initialement introduites comme des tests de neutralité, le test de Fu est considéré comme un test puissant pour détecter une expansion démographique passée des populations (Fu, 1997 ; Ramos-Onsins et Rozas, 2002). Par conséquent, les valeurs négatives importantes, comme celles détectée ici, peuvent indiquer l'expansion de la population surtout chez les populations camerounaises de *B. truncatus* (Simonsen *et al.*, 1995). Pour les autres espèces, les estimations des deux statistiques ne sont pas significatives dans toutes les régions, ce qui indique une évolution neutre pour ces espèces dans les pays étudiés.

E. Phylogénie des espèces

Les analyses phylogénétiques ont été faites en utilisant trois différents algorithmes de construction de l'arbre : le maximum de vraisemblance (ML), le maximum de parcimonie (MP) et le neighbor-joining (NJ), avec les différentes séquences des gènes. Ils ont montré une topologie similaire des arbres obtenus et ont confirmé l'état monophylétique du genre à 93,3 %. Dans cette partie, les résultats des données combinées et des deux types de marqueurs sont présentés à part.

1. Matrice de données combinées (gènes mitochondriaux et ribosomaux)

Les jeux de données Cox1 (régions Folmer et Asmit), 18S, 28S et ITS ne générant pas d'incongruences significatives, ils ont été fusionnés afin de maximiser le nombre de caractères informatifs et d'améliorer les valeurs de bootstrap. La matrice combinée étudiée contient 40 séquences de bulins (générées dans le cadre de cette étude), se rapportant aux sept espèces étudiées et à une séquence de taxon externe (*Indoplanorbis exustus*). Les méthodes de maximum de vraisemblance (ML), la parcimonie maximale (MP) et la Neighbor-Joining (NJ) se sont montrées largement cohérentes. Le résultat de l'analyse phylogénétique est présenté dans la Figure 14 (page suivante).

Au niveau infra-générique, le regroupement des haplotypes est significatif dans l'arbre phylogénétique **(Figure 13)**. Les bulins sont divisés en deux clades : clade (A) avec *B. truncatus, B tropicus, B. globosus* et *B. umbilicatus*, et clade (B) avec *B. senegalensis, B. forskalii* et *B. camerunensis*.

Le premier clade (A) se divise en deux sous-clades soutenus à 94 % ; (C) regroupe *B. truncatus* et *B. tropicus*. Les haplotypes égyptiens différent des haplotypes camerounais par une mutation. Le deuxième sous-clade (D) regroupe *B. globosus* et *B. umbilicatus*.

Le second clade (B) se divise également en deux sous-clades supportés à 99 %. (E) qui regroupe *B. forskalii* et *B. camerunensis,* et (F) regroupe les populations de *B. senegalensis*. Dans ce dernier sous-clade (F), *B. senegalensis* se divise en deux groupes, le premier avec les haplotypes camerounais et le second avec les haplotypes sénégalais.

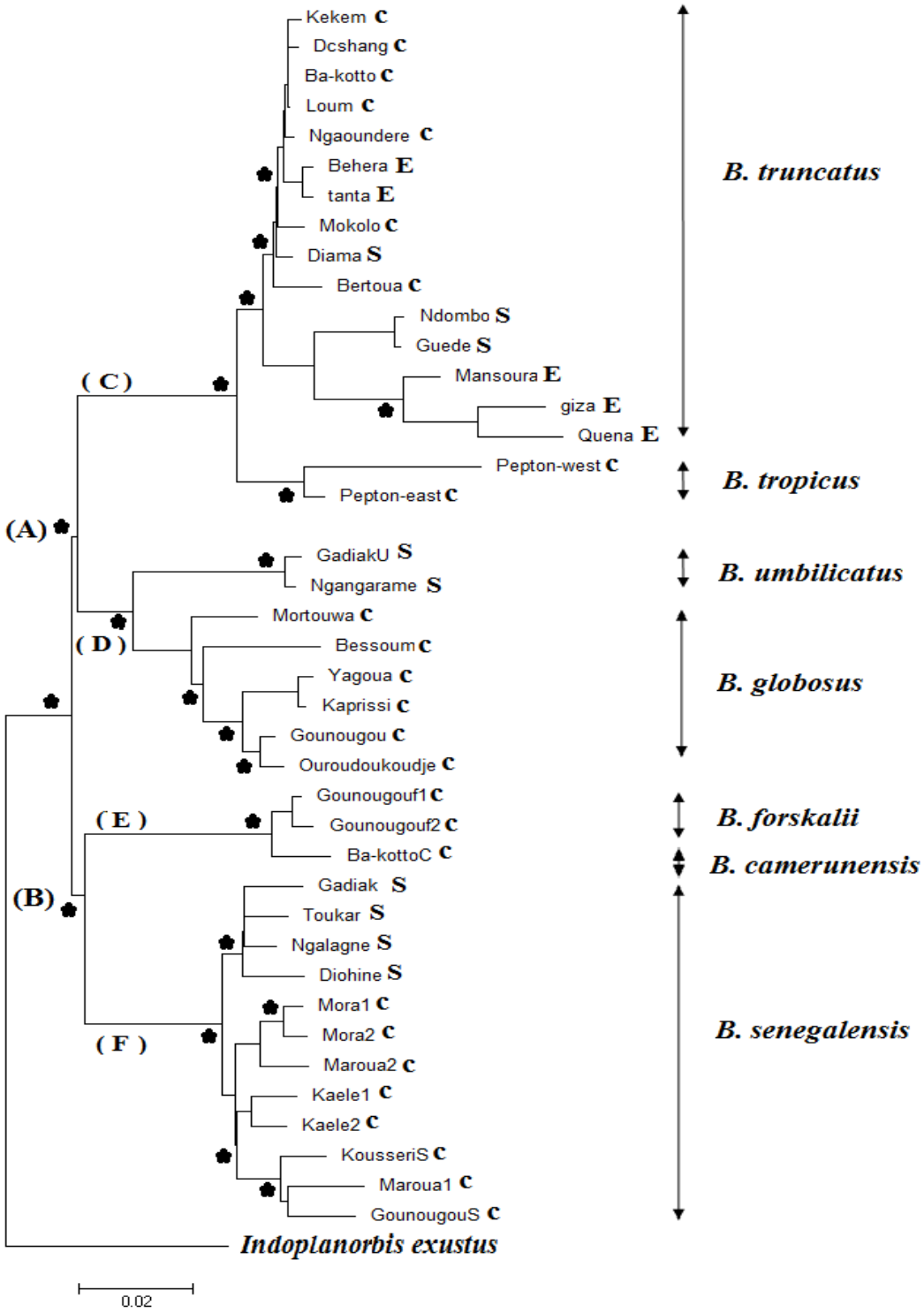


Figure 13. Vue détaillée des sept espèces de bulins avec les estimations du maximum de vraisemblance (1000 répliques bootstrap), en utilisant la matrice de données combinées (TVM + Γ comme modèle choisi). Un astérisque indique le support de nœud ≥ 80 % pour toutes les méthodes utilisées (MP, NJ, et ML), avec *Indoplanorbis exustus* comme outgroup. La barre d'échelle indique deux substitutions pour 100 sites. Chaque branche terminale de l'arbre est marquée à l'aide d'un code ; une lettre représentant chaque pays (C : Cameroun, E : Egypte, et S : Sénégal). Chaque branche interne représente des groupes monophylétiques.

2. Gène mitochondrial

Les deux matrices Cox1 (régions Folmer et Asmit) étudiées contiennent 132 séquences de bulins, se rapportant à sept espèces, et une séquence de taxon externe (*Indoplanorbis*). Ces deux matrices ont été soumises à FindModel pour identifier le modèle d'évolution moléculaire décrivant au mieux les données. La topologie moyenne pondérée, basée sur la totalité des modèles, indique que tous les clades reçoivent un support de 1. Ils sont donc stables et faiblement influencés par le choix du modèle. Le résultat de l'analyse phylogénétique et les valeurs de *bootstrap* sont présentés dans la Figure 15 (page suivante).

A l'échelle infra-générique à laquelle nous nous plaçons, la région Cox1 est porteuse d'un fort signal phylogénétique (80 caractères informatifs sur 518). Il confirme la monophylie du genre *Bulinus* (98,3 %) et scinde les bulins en deux grands clades ayant la même topologie trouvée avec la matrice de données combinées. Cependant, la région Cox1 fournit plus de résolution que la matrice de donnés combinées, et est capable de regrouper les individus de la même espèce en fonction de leur pays d'origine.

Chez *B. truncatus*, les individus se sont regroupés en trois sous-clades : le premier sous-clade est constitué d'haplotypes égyptiens, le second d'haplotypes camerounais et le troisième d'haplotypes sénégalais. Les haplotypes provenant du même pays se regroupent donc dans le même sous-clade.

Le même cas de figure se retrouve également chez les populations de *B. senegalensis* où les haplotypes sont divisées en deux lignées, la première originaire du Cameroun et l'autre du Sénégal **(Figure 14)**.

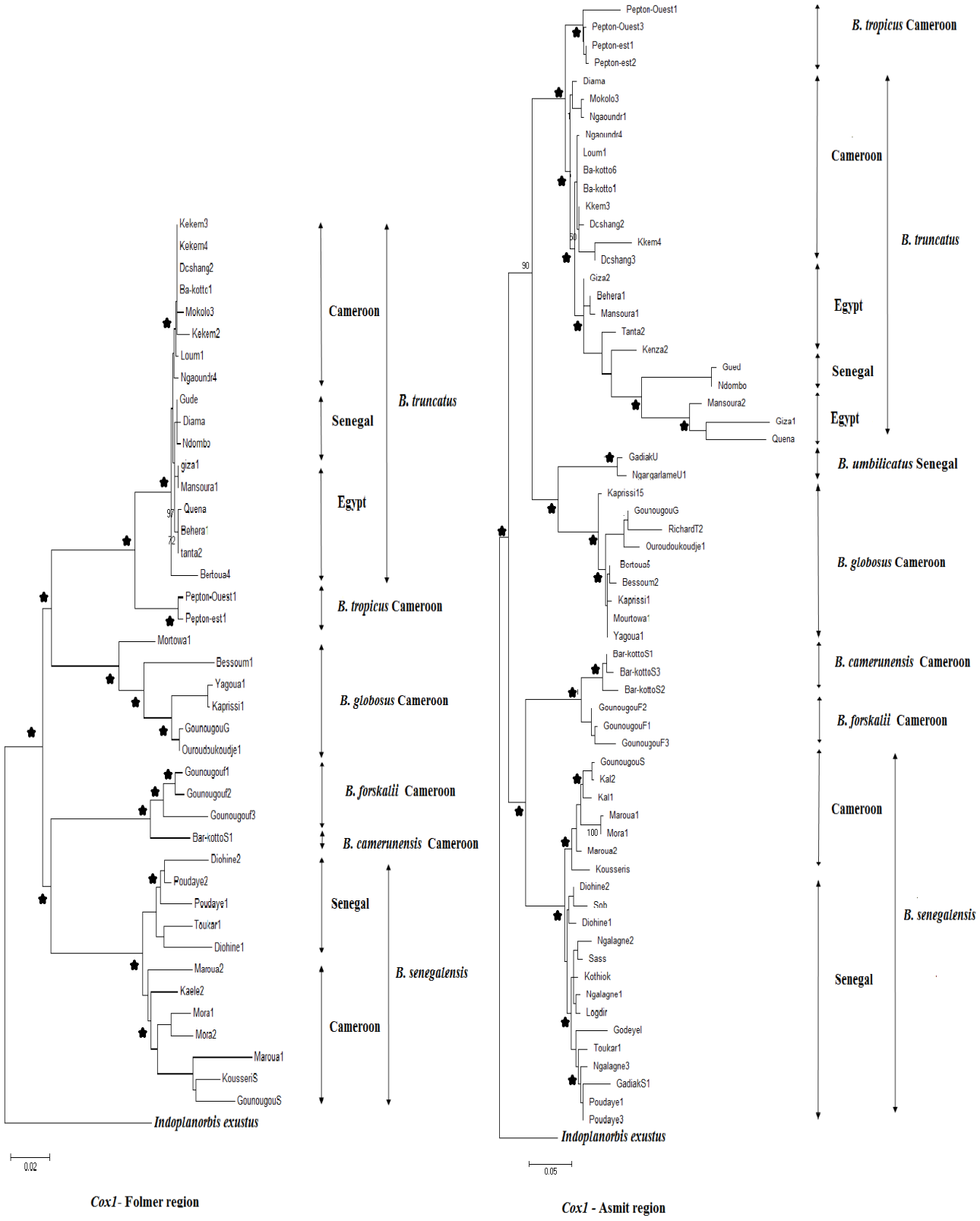


Figure 14. Vue détaillée des sept espèces de bulins avec les estimations du maximum de vraisemblance (1000 répliques bootstrap), en utilisant la Cox1-région Folmer et Asmit (avec GTR + Γ comme modèle choisi). Un astérisque indique le support de nœud ≥ 80 % pour toutes les méthodes utilisées (MP, NJ, et ML), avec *Indoplanorbis exustus* comme outgroup. La barre d'échelle indique deux substitutions pour 100 sites pour la région Folmer et cinq pour celle de l'Asmit.

3. Gènes ribosomaux

Les résultats des 3 gènes ribosomaux seront présentés dans cette partie.

1. Le gène 18S

La matrice de 18S étudiée contient 40 séquences de bulins, se rapportant à six espèces, et une séquence de taxon externe (*Indoplanorbis exustus*). L'ajout de ce taxon porte le nombre de caractères informatifs de 11 à 14, pour une matrice de 974 sites nucléotidiques. Le résultat de l'analyse phylogénétique est présenté dans la Figure 16 (page suivante). L'utilisation du 18S confirme les groupes définis par le Cox1, et améliore leurs valeurs de soutien **(Figure 15)**.

2. Le gène 28S

La matrice de 28S étudiée contient 40 séquences de bulins, se rapportant à six espèces, et une séquence de taxon externe (*Indoplanorbis exustus*). Le résultat de l'analyse phylogénétique est présenté dans la Figure 16 (page suivante). L'utilisation du 28S confirme les groupes définis par la Cox1 et 18S, et améliore leurs valeurs de soutien ; cependant elle permet de différencier les quatre groupes étudiés **(Figure 15)**.

3. Le gène ITS

La matrice d'ITS étudiée contient 17 séquences de bulins, se rapportant à cinq espèces, et une séquence de taxon externe (*Biomphalaria helophila*). L'ajout de ce taxon porte le nombre de caractères informatifs de 65 à 78, pour une matrice de 650 sites nucléotidiques. Le résultat de l'analyse phylogénétique est présenté dans la Figure 16 (page suivante). L'utilisation d'ITS confirme les groupes définis par la Cox1, 18S et 28S, améliore leurs valeurs de soutien, et permet de différencier les quatre groupes étudiés.

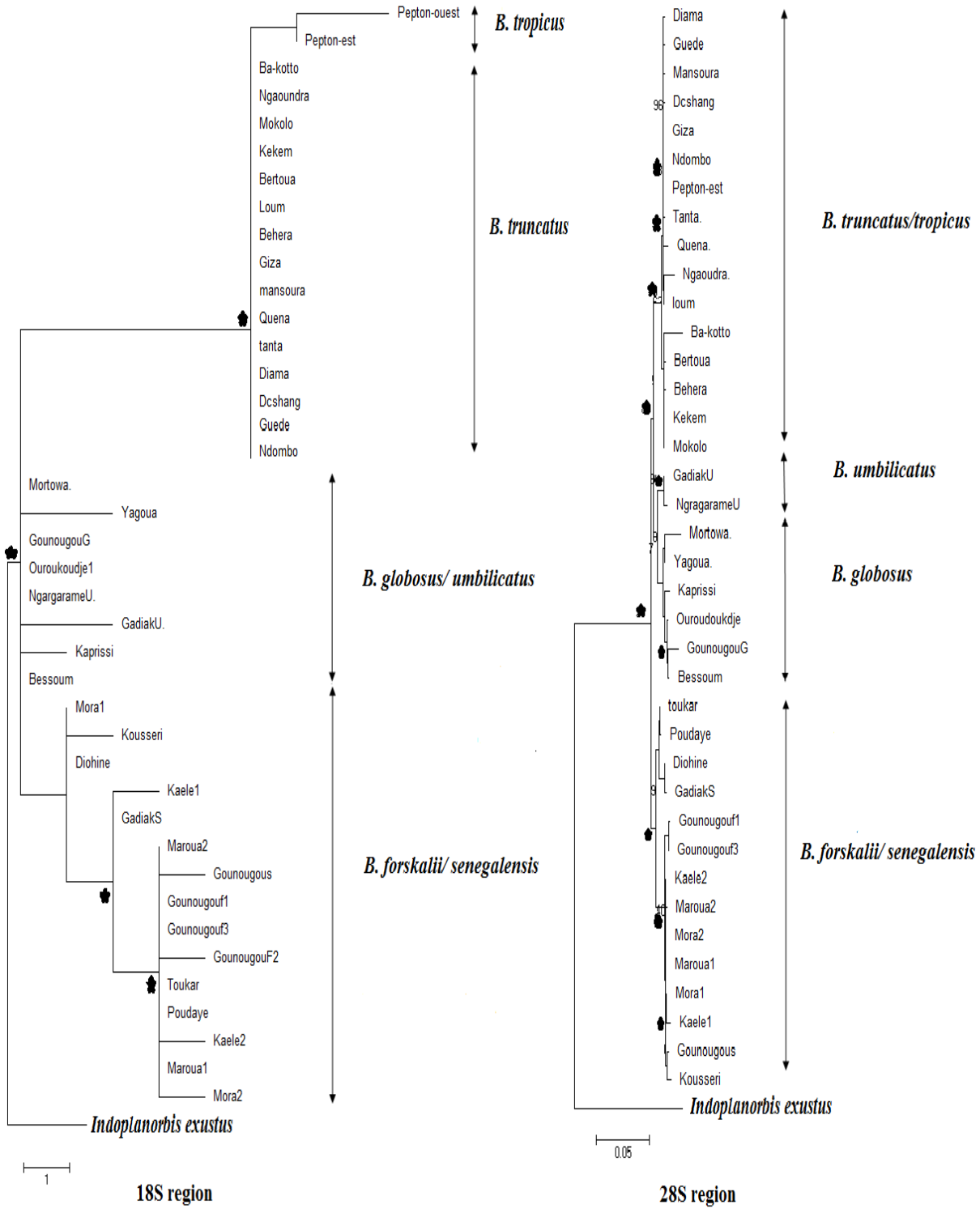


Figure 15. Vue détaillée des sept espèces des bulins avec les estimations du maximum de vraisemblance (1000 répliques bootstrap) en utilisant 18S et 28S (avec GTR + G comme modèle choisi). Un astérisque indique support de nœud ≥ 80 % pour toutes les méthodes utilisées (ML, NJ, MP), avec *Indoplanorbis exustus* comme outgroup. La barre d'échelle indique 5 substitutions pour 100 sites pour la région 28S.

IV. Discussion

Le but de cette étude était triple : i) détecter la diversité génétique des populations de bulins dans plusieurs pays Africains, ii) étudier l'impact de cette diversité sur la transmission du parasite, iii) clarifier la phylogéographie du genre *Bulinus.*

A. Diversité génétique des populations

Les séquences d'ADN mitochondrial étudiées ont montré une diversité haplotypique et nucléotidique élevée. Un nombre élevé d'haplotypes différents a été trouvé, ce qui indique que pour chaque groupe de trois à quatre individus échantillonnés, un mollusque a un haplotype différent. Ce niveau de diversité génétique est plus élevé que celui trouvé par Nalugwa *et al*., (2010) chez les populations camerounaises de *B. truncatus* et *B. forskalii* (du Cameroun), où pour chaque groupe de six à sept individus, on a un haplotype différent d'ADN mitochondrial.

En revanche, les séquences de 18S ont montré très peu de variations pour les sept espèces. Par conséquence, un faible niveau de variation nucléotidique a été détecté en utilisant ce gène par rapport à 28S qui a montré un niveau intermédiaire de variations au niveau des nucléotides. Ces résultats sont comparables à ceux trouvés par (Jørgensen *et al*., 2011). En effet, ils ont également observé une variation inférieure pour la 18S par rapport à la 28S chez 26 bulins provenant de différents pays africains et représentant les quatre groupes d'espèces actuellement reconnues. Malgré cette faible diversité nucléotidique dans les deux gènes 18S et 28S, la diversité des haplotypes était élevée et comparable à celle observée avec le marqueur Cox1.

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cette diversité haplotypique détectée à tous les locus.

i) **La première est la spéciation allopatrique** qui serait probablement le facteur le plus commun. En effet, les populations de bulins utilisées dans la présente étude sont originaires de plusieurs pays géographiquement éloignés, ce qui limite le flux de gènes. Cet isolement reproductif aurait pu permettre une évolution indépendante, une divergence de ces populations et l'apparition des lignées distinctes avec de nouveaux haplotypes. En effet, nos résultats ont montré que, au sein d'une espèce donnée, les haplotypes du même pays sont regroupés et forment des lignés bien différenciées **(figure 14)**.

ii) **Le système de reproduction**, les bulins sont hermaphrodites et peuvent se reproduire à la fois par la allofécondation ou par autofécondation (Jarne *et al.*, 1993), et chacune de ces modalités induit des conséquences génétiques différentes (Jarne et Charlesworth, 1993). Les populations de *B. globosus* (Wilkinson *et al.*, 2007), se reproduisent par les deux modes et par conséquent, il apparaît des niveaux plus élevés de variabilité génétique par rapport à *B. truncatus* qui est préférentiellement autofécond (Viard *et al.*, 1994 ; Djuikwo-Teukeng *et al.*, 2011) car la diversité augmente avec les recombinaisons génétiques entre les individus, assurées par la fécondation croisée.

iii) **Les taux de mutation élevés dans la région de l'ADNmt**

La diversité génétique peut également être liée aux taxons dans certains groupes ayant une grande variabilité en raison d'un taux de mutation rapide (Frankham *et al.*, 2002). Une diversité haplotypique élevée a été détectée chez les différentes espèces étudiées et a été en partie attribuée au taux de mutation élevé de la région de contrôle de l'ADNmt. Par conséquent, la grande diversité génétique observée chez les sept espèces dans cette étude serait en partie influencée par celui-ci au sein de ce genre.

B. Diversité génétique des bulins et compatibilité avec le parasite

La relation entre le schistosome et les bulins est très spécifique et varie selon l'origine géographique, l'espèce du bulin et la souche du parasite (Vera *et al.*, 1992 ; Sène *et al.*, 2004). En effet, cette étude a été réalisée dans des régions où la schistosomose est endémique. En général, la prévalence des infections naturelles des bulins est faible, même dans les zones où la schistosomose humaine est endémique (Minchella et Loverde, 1983). Cela peut être dû à des taux élevés de mortalité chez les populations des mollusques infectés, et à la durée de la période de latence de l'infection. Les schistosomes peuvent s'adapter pour mieux infecter les populations locales des bulins (Manning, 1995). En effet, une perte de la variation génétique chez l'hôte intermédiaire peut augmenter la susceptibilité au parasitisme et par la suite l'intensité des épidémies (Schmid-Hempel et Stauffer, 1998 ; Coltman *et al.*, 1999).

- **Au Cameroun**

Six espèces différentes ont été collectées dans plusieurs sites endémiques, de la zone tropicale sèche où la prévalence de l'infection humaine par *S. haematobium* varie de 20 % à 100 %, à la zone équatoriale où les foyers sont très localisés (prévalence, 50-100 %). Parmi ces six espèces, quatre sont responsables de la transmission de cette maladie, à savoir *B. camerunensis, B. globosus, B. senegalensis* et *B. truncatus*, ce qui n'est pas le cas pour *B.*

forskalii et *B. tropicus* soumis aussi bien à des infestations naturelles qu'expérimentales (Greer *et al*., 1990 ; Ndassa et Mimpfoundi, 2010).

Au vu de nos résultats, la diversité génétique est plus faible chez *B. truncatus* que dans les groupes *forskalii* et *africanus*. Cela pourrait expliquer le fait que les populations de *B. truncatus* soient plus susceptibles d'être infecté par *S. haematobium* que les espèces des deux autres groupes. En effet, des infestations expérimentales réalisées chez *B. globosus* et *B. truncatus* avec différents isolats de miracidiums suggèrent que *B. truncatus* est potentiellement plus impliqué que *B. globosus* dans la transmission de la schistosomose urinaire au Cameroun (Njiokou *et al.,* 2004), Cette hypothèse a été confirmée par la faible diversité et la forte structuration génétique détectées chez ces populations au Cameroun en utilisant des marqueurs microsatellites (Djuikwo-Teukeng *et al.,* 2011).

B. forskalii, principal hôte intermédiaire de *S. intercalatum*, est une espèce ubiquitaire au Cameroun et il est souvent présent en association avec *B. senegalensis* (Gow *et al.,* 2004). Les résultats rapportés dans la présente étude ont révélé des niveaux très élevés de diversité génétique chez cette espèce. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Gow *et al*. (2004) qui ont détecté, en utilisant des marqueurs microsatellites, un niveau élevé de polymorphisme et de la diversité génétique au sein de ces populations au Cameroun. En parallèle, selon Tchuem Tchuenté *et al.,* (2003), on assiste à une disparition progressive des foyers à *S. intercalatum* au Cameroun. Cette extinction pourrait être influencée par les niveaux élevés de diversité génétique détectés au sein des populations de *B. forskalii*.

- **En Egypte**

En Egypte, une seule espèce, *B. truncatus, est* responsable de la transmission de la schistosomose urinaire (El Koubby *et al.,* 2006), répandue le long de la vallée du Nil à partir de la région du Delta (Egypte Nord) jusqu'à la Haute-Egypte (Egypte Sud). El-Khoubby (2000) a noté une diminution de la prévalence de *S. haematobium* en Egypte au cours des dernières années. Un des facteurs pouvant expliquer cette réduction pourrait être la diversité génétique relativement élevée au sein des ces populations du fait que l'augmentation de variabilité génétique chez l'hôte intermédiaire induit une diminution de la susceptibilité au parasitisme (Schmid-Hempel et Stauffer, 1998 ; Coltman *et al.,* 1999).

- **Au Sénégal**

Les quatre espèces des bulins (*B. globosus*, *B. senegalensis*, *B. umbilicatus* et *B. truncatus*), ont été collectées dans la zone sahélo-soudanienne. Les trois premières espèces

sont confirmées comme hôte intermédiaire de *S. haematobium* (Diaw *et al.,* 1990 ; Sène *et al.,* 2002), tandis que *B. truncatus* est impliqué dans la transmission des formes hybrides de *S. haematobium* et *S. bovis* (Huyse *et al.,* 2009). Nos résultats ont détecté une diversité génétique plus élevée chez les populations sénégalaises de *B. truncatus* que celle trouvée en Egypte et au Cameroun. En effet, nos échantillons ont été collectés dans une zone géographique limitée. Des échanges de gène liés au déplacement des mollusques et aux mouvements des populations humaines pourraient expliquer cette diversité et conduire à la coexistence d'un grand nombre d'haplotypes dans cette zone (Brouwer *et al.,* 2001). De plus, plusieurs études ont montré qu'un seul hôte intermédiaire peut être infecté par un certain nombre de parasites ayant des génotypes différents, ce qui affecte significativement la diversité génétique des parasites en augmentant les échanges de gènes (Minchella *et al.,* 1995 ; Davies *et al.,* 1999).

C. Phylogéographie des bulins en relation avec la schistosomose

La transmission de la schistosomose dépend du rôle actif de l'hôte intermédiaire. La maladie est étroitement liée au développement rural des ressources en eau (Kloos et Thompson, 1979). Donc, nous ne pouvons pas parler de la distribution du parasite sans faire référence à la répartition de son hôte intermédiaire. Les résultats présentés dans notre étude ont montré une diversité génétique inférieure au sein des populations égyptiennes de *B. truncatus* par rapport à celles originaires de l'Afrique sub-saharienne à tous les locus. Ceci pourrait suggérer la présence plus récente de *B. truncatus* en Egypte : la schistosomose serait apparue plus tôt en Afrique subsaharienne avant d'apparaître en Egypte.

Selon Tamura *et al.* (2004), une distribution d'haplotypes reflète en partie les déplacements historiques des populations. Par conséquent, la présence de la schistosomose en Egypte pourrait s'expliquer par l'abandon progressif du Sahara au cours de son assèchement, ou de la marge du Sahara méridional, au profit d'une migration vers la vallée fertile du Nil, avec une économie de plus en plus nomade basée sur l'élevage dans les zones concernées (Barker, 1981). Ces facteurs pourraient être à l'origine de la propagation de la schistosomose et des bulins en Afrique du Nord, et en Egypte. Les mollusques vivants auraient été transportés par les chasseurs, les agriculteurs et les nomades pendant leur voyage, dans des conteneurs d'eau, ou par les oiseaux (Kloss et Thompson, 1979). Adamson (1976) a suggéré que la schistosomose serait entrée en Egypte pendant les périodes pharaoniques le long des routes commerciales du sud et, par la suite, se serait répandue dans tout le Moyen-Orient. De plus, la diffusion de la schistosomose du Cameroun ou du Sénégal vers l'Egypte et les autres

foyers aurait été favorisée par les trafics d'esclaves africains. En outre, selon Webster *et al.*, (2012), le même haplotype de *S. haematobium* (H1) circule au Cameroun et au Sénégal ce qui signifie qu'il provient le même ancêtre. Par contre, les haplotypes égyptiens de *S. haematobium* se distinguent de l'haplotype principal H1 par une mutation unique.

V. Conclusion du chapitre

En conclusion à ce chapitre, nous faisons un point sur les éléments de réponse apportés aux questions initialement posées. Au cours de ce travail, nous avons examiné la diversité génétique et la phylogéographie de 45 populations de bulins. Cet important effort d'échantillonnage a été possible notamment grâce à la constitution d'un réseau de collaborations avec des chercheurs étrangers sur l'ensemble des régions étudiées (Cameroun, Egypte et Sénégal). Nous avons mené pour cela plusieurs approches en parallèle, visant à (1) étudier la diversité génétique des différentes populations appartenant à sept espèces des bulins, (2) améliorer notre compréhension de l'histoire évolutive des espèces actuelles du genre *Bulinus* (phylogénie moléculaire), (3) identifier les catégories d'éléments transposables potentiellement impliquées dans la transmission de la schistosomose et analyser à l'échelle de cette région l'impact structural de cette diversité sur la distribution de la maladie.

Ces approches ont fait intervenir différentes techniques moléculaires (extraction d'ADN, amplification par PCR, séquençage, électrophorèse capillaire), plusieurs méthodes de phylogénie et d'évolution moléculaire, et d'analyses bioinformatiques (annotation, génomique comparative). Les deux jeux de données provenant de gènes mitochondriaux (Cox1) et de gènes nucléaires répétés (famille des gènes ribosomaux) et ont permis de clarifier les relations phylogénétiques entre plusieurs lignées dont les positions étaient mal résolues.

En premier lieu, une diversité haplotypique et nucléotidique élevée a été détectée chez toutes les populations de bulins, et dont les haplotypes mitochondriaux forment des clades fortement différenciés. Les populations locales de la même espèce dans une région ont évolué indépendamment de celles de leurs régions d'origine, ayant semble-t-il donné lieu à la formation de nouveaux haplotypes, qui pourraient être spécifiques à la région. Ces pays constituent donc une zone riche et diversifiée, jouant un rôle important dans la diversité génétique de ces espèces. Ces ensembles constituent des unités, qui pourront servir de base à l'élaboration de plans de gestion de la transmission de la schistosomose, car nos résultats ont mis en évidence une diminution de la prévalence de la schistosomose dans les zones où il y'a

une diversité génétique élevée au sein des populations de bulins. En outre, les analyses réalisées ont permis de détecter une diversité génétique plus élevée au sein des populations des bulins en Afrique Sub-saharienne (Cameroun et Sénégal), ce qui suggère que les haplotypes dans cette partie de l'Afrique sont plus anciens de ceux de l'Afrique du Nord (Egypte).

Comme perspective, il conviendrait de compléter ce travail par l'analyse d'échantillons provenant d'un grand nombre de pays africains afin de savoir l'origine du bulin et par conséquent celle du parasite. L'étude de la diversité des bulins devrait être poursuivie, approfondie et couplée à celle de la diversité génétique du parasite. De même, il serait intéressant d'étudier la compatibilité entre différentes haplotypes des bulins avec la même souche parasitaire et par la suite, analyser le taux d'infestation, et détecter les gènes de susceptibilité à l'infection.

Ce travail a fait l'objet d'une communication orale au 6ème Congrès International de Parasitologie à Dakar. Un article scientifique résumant les résultats obtenus est soumis à la revue *BMC Evolutionary Biology*.

Chapitre 4 :

Structure génétique des populations égyptiennes de *B. truncatus*

I. Introduction

La génétique des populations est une discipline qui est née au début du XX^{ème} siècle suite à la synthèse des théories de Mendel, de Darwin et des biométriciens, notamment Ronald A. Fisher, Sewall Wright et John Haldane. Cette discipline se base sur la mesure de la variation génétique faite à différents niveaux hiérarchiques en utilisant des formalisations mathématiques. Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux méthodes actuelles d'étude de la diversité génétique au niveau intra et inter populationnelle, notamment sur les populations égyptiennes de *B. truncatus* à l'aide des marqueurs microsatellites.

Après avoir défini la structuration génétique, et présenté quelques aspects relatifs à son estimation, nous ferons une petite introduction sur *B. truncatus*, nous aborderons la problématique et le but de cette étude. Ensuite nous expliquerons la méthodologie utilisée et enfin nous discuterons les résultats obtenus.

A. La diversité génétique

a) Définition

La diversité génétique est la variation des gènes au sein et entre les populations. Elle est définie par le niveau de similarité ou de différences dans la composition génétique des individus et des populations. La mesure de cette variabilité génétique au sein d'une population peut être établie à partir de différentes sources d'information (phénotypique ou génotypique). Chacune de ces deux approches présente des avantages et des inconvénients. L'utilisation des données phénotypiques (standard, caractères morphologiques simples) semble évidente compte tenu de la disponibilité de ces informations à grande échelle (Lebreton *et al.*, 2009). Par contre, l'approche génotypique (ou moléculaire), relativement récente, utilise les informations portées par l'ADN. Elle permet l'étude de la diversité au sein et entre les populations.

b) Les facteurs influençant la dynamique de la diversité

Plusieurs facteurs biologiques peuvent modifier la variation génétique au sein et entre les populations, soit en augmentant la divergence entre populations telles que la mutation, la dérive génétique et la sélection naturelle, soit en tendant à produire une homogénéité génétique, notamment la migration et la sélection (Hartl et Clark, 1997).

- Facteurs créant une divergence :

- La mutation : c'est une modification irréversible et héréditaire de l'information génétique contenue dans un génome.

- La dérive génétique : c'est la modification de la fréquence d'un allèle ou d'un génotype, due à des tailles de populations finies.

- La sélection naturelle : c'est le processus qui permet d'isoler et de multiplier une mutation dans le but d'améliorer une espèce.

- Facteurs créant une homogénéité génétique :

- La migration : c'est la migration des gamètes, des individus ou de groupes d'individus d'une sous-population à une autre qui contribue aux flux de gènes entre populations.

- La sélection : elle favorise une plus forte diversité intra-population (cas de la sélection balancée).

c) Etude de la diversité génétique des populations

La diversité génétique permet de déterminer la variation des gènes au sein des espèces qui sont subdivisées souvent en populations dont les fréquences alléliques et génotypiques divergent d'une région à l'autre (Davis, 2007). Par conséquent, l'objet de la génétique des populations est la mesure de cette variation et son origine, mais également la dynamique de cette diversité, afin de comprendre les mécanismes de son évolution, notamment à l'aide d'approches théoriques basées sur des modèles mathématiques. La variation génétique au sein d'une espèce peut être déterminée à deux niveaux :

1. Diversité intra-populationnelle

Cinq paramètres sont utilisés pour décrire la variabilité génétique intra-populationnelle, à savoir :

Le taux de polymorphisme *(P)*

C'est le pourcentage des locus polymorphes dans l'échantillon étudié. La probabilité d'observer au moins deux allèles à un même locus dépend des fréquences respectives de ceux-ci et de la taille de l'échantillon.

La richesse allélique *(A)*

C’est le nombre moyen d’allèles par locus. Il est défini pour **ni** allèles au locus **i** et pour **L** locus comme :

$$A = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^{L} ni$$

L’hétérozygotie observée *(Ho)*

C'est la moyenne des fréquences des hétérozygotes observées à chacun des locus étudiés (diversité génétique de Nei, 1973). Elle peut être calculée à partir de la fréquence mesurée des hétérozygotes (nombre des individus hétérozygotes divisé par le nombre total des individus de l'échantillon).

L’hétérozygotie attendue *(He)*

C’est la fréquence théorique des hétérozygotes à un locus dans une population panmictique (diversité génétique de Nei, 1973). Elle est calculée à partir des fréquences alléliques. S'il y a **n** allèles avec les fréquences **f1**, **f2**, **f3**, ...**fn**, la fréquence théorique des hétérozygotes sera :

$$He = 1 - (f12 + f_2^2 + f_3^2 + \ldots. f_n^2) = 1 - \sum_{n=1}^{n} fn2$$

Dans le cas où plusieurs locus sont considérés, l’hétérozygotie moyenne (He), représentant la moyenne des taux d’individus hétérozygotes par population, sera la moyenne arithmétique de toutes les valeurs de He :

$$He = (\sum He) / L,$$ avec L = nombre de locus

Indice de fixation (*Fis)*

C’est le coefficient de consanguinité qui mesure la réduction de l’hétérozygotie des individus à l’intérieur d’une sous-population (Wright, 1969). Il permet de mesurer le déficit local moyen d’hétérozygotes par apport à la structure de Hardy-Weinberg. Il varie de -1 à +1 et permet de connaître le déficit en hétérozygotes par population, par locus et pour l'ensemble des locus :

Fis = 1 : fixation complète (cas d'autofécondation),

Fis > 0 : déficit en hétérozygotes par rapport à l'équilibre panmictique,

Fis = 0 : population en équilibre de Hardy-Weinberg,

Fis < 0 : hétérozygotie excédentaire.

Taux d'auto-fécondation (S) :

Il est calculé selon la formule suivante :

$$S = 2F_{IS} / (1+F_{IS})$$

2. La diversité inter-populationnelle

Deux paramètres permettent de quantifier la variabilité génétique inter-population :

2.1 Paramètres de différenciation

- **L'indice de diversification *(Fst)***

Cet indice représente la corrélation entre deux gamètes tirés au hasard dans deux sous-populations différentes. Il reflète la différenciation des individus entre les sous-populations et donne indirectement une idée des flux de gènes entre populations (Wright, 1978). Soit **T**, un ensemble formé de **S** populations dont chacune est composée de **I** individus. La différenciation des populations par rapport au total (Fst) est calculée en fonction des paramètres **Fis** (différenciation des individus à l'intérieur des populations) et **Fit** (différenciation des individus par rapport au total). Ils sont liés par la relation :

$$\mathbf{Fst = 1 - \frac{(1-Fit)}{(1-Fis)}}$$

D'après Wright (1978), il tend à augmenter sous l'effet de la dérive, et à diminuer sous l'effet des migrations.

- **L'indice de diversification *(Gst)***

C'est un indice de différenciation décrit par (Nei, 1973) ; il prend en compte les distances génétiques entre les individus. La mesure de diversité utilisée est alors :

$$\mathbf{Gst = (H_T - H_S) / H_T = 1 - (H_S / H_T)}$$

Hs étant la diversité moyenne au sein des populations.

HT étant la diversité totale des populations étudiées.

S'ils sont utilisés, HS et HT deviennent les moyennes (sur l'ensemble des locus) des diversités précédentes. Dans la littérature, (HT - HS) est parfois remplacé par DST (diversité entre les populations). Ainsi, on aura :

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T$$

- **Flux de gènes (Nm)**

C'est le nombre de migrants effectifs par génération qui peut être mesuré indirectement à l'aide du G_{ST}. L'expression de N_m devient alors selon Frank and Slatkin (1990) :

$$\mathbf{Nm} = \frac{(1-Gst)}{4\,Gst\,(\frac{n}{n-1})2}$$ avec n = nombre de populations

Plus la valeur de Nm est supérieure à 1, plus l'échange de gènes est important.

2.2 Distance génétique D

Cet indice permet d'évaluer le degré de ressemblance ou de dissemblance génétique des populations. La distance de Nei (1978) est calculée ainsi qu'il suit. Soit un locus donné où x_i est la fréquence du i^{ème} allèle dans la population **X** et y_i celle du même allèle au même locus dans la population **Y**. L'indice d'identité de Nei entre les deux populations (sur la base du locus considéré) est :

$$I = P_{xy} / (P_x P_y)^{1/2}$$

P_x : est la probabilité d'identité des deux allèles pris au hasard au sein de la population X, et **Py** celle de la population Y.

$P_x P_Y$: est la probabilité d'identité des deux allèles pris au hasard, l'un dans X et l'autre dans Y.

Pour plusieurs locus, on calcule la moyenne des probabilités sur l'ensemble des locus étudiés.

La distance génétique est :

$$D = - \text{Log } I$$

Les populations étudiées sont représentées graphiquement sur un dendrogramme, de telle sorte que les plus proches génétiquement se regroupent.

B. *Bulinus truncatus*

a) Taxonomie

Bulinus truncatus (Audouin, 1827), appartient à l'embranchement des Mollusca, à la classe des Gastropoda, à la famille des Planorbidae, à la sous-famille des Bulininae, au genre *Bulinus* et à l'espèce *truncatus*.

b) Morphologie et caractérisation

La coquille est généralement de couleur jaunâtre clair, de 10 mm de haut, mais celle de *B. truncatus* de l'Egypte peut atteindre 20 mm **(Figure 16)**. Les premiers tours ne présentent pas de sculpture particulière chez la plupart des formes ; toutefois, on observe une costulation plus ou moins marquée. Chez certaines, la columelle est normalement droite mais quelquefois légèrement torse (Brown, 1994). L'animal est blanchâtre ou grisâtre, avec des taches noires sur le manteau.



Figure 16. *Bulinus truncatus* d'Egypte (Ciao Pierlu, 2007)

c) Distribution et habitat

Bulinus truncatus est retrouvé dans la plupart des pays d'Afrique et quelques îles de la Méditerranée où il occupe différents types d'habitats d'eau douce, comme les rivières, les étangs et les systèmes d'irrigation (Brown, 1994).

Les habitats sont soumis à des cycles annuels de sécheresse et d'inondations avec de grandes fluctuations de taille de la population et de surface de l'eau disponible pour les espèces d'eau douce (Vera *et al.,* 1992).

d) Système de reproduction

Bulinus truncatus est hermaphrodite ; il se caractérise par un taux élevé d'autofécondation (Jarne *et al.,* 1993 ; Djuikwo-Teukeng *et al.,* 2011). Des individus euphalliques purs, des individus aphalliques purs, ainsi que des populations mixtes peuvent se retrouver au sein des individus de *B. truncatus* (Larambergue, 1993).

e) Variabilité génétique

Certaines caractéristiques écologiques (habitat, climat) et biologiques (système de reproduction, tétraploïdie) peuvent influencer la variabilité génétique des populations de *B. truncatus* (Brown, 1994). Plusieurs techniques ont été utilisées pour étudier la variabilité au sein de cette espèce :

i) Les **marqueurs biochimiques** basés sur les iso-enzymes, qui a révélé un polymorphisme intra-populationnel très faible ainsi qu'une faible variation géographique de certains allèles au sein des populations camerounaises de *B. truncatus* (Mimpfoundi et Greer, 1990), de même que celles de Côte d'Ivoire et du Niger (Njiokou *et al*., 1993b).

ii) **Les marqueurs moléculaires** ont été utilisés au vu des limites des précédents outils parmi lesquels :

- La RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) qui a détecté un faible polymorphisme entre les espèces de *B. globosus* / *B. umbilicatus* et *B. africanus* / *B. nasutus* (Stothard *et al.,* 1997b ; Raahauge et Kristensen, 2000).

- La PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) pour étudier la structure génétique des populations de *B. truncatus*. Une diversité de cet hôte a été détectée au Sénégal et au Mali (Sène *et al.,* 2004).

Ces deux marqueurs ont montré peu de polymorphisme génétique au niveau des populations de bulins. Plus récemment, deux études utilisant des marqueurs microsatellites pour étudier la variabilité génétique de *B. truncatus* ont trouvé un faible polymorphisme de *B. truncatus* au Maroc (Chlyeh *et al.,* 2003). Par contre, Djuikwo-Teukeng *et al.,* (2011) ont détecté un fort polymorphisme au sein des populations de *B. truncatus* au Cameroun. D'où notre intérêt d'utiliser ces marqueurs pour étudier la diversité génétique des populations égyptiennes de *B. truncatus*.

C. But, problématiques abordés et objectifs

Malgré le fait que la schistosomose urinaire soit un réel problème de santé publique, en Egypte, et *Bulinus truncatus* l'hôte intermédiaire unique, aucune étude sur la structure génétique de cet hôte a été réalisée dans ce pays. Compte tenu des observations ci-dessus, les trois questions suivantes se posent : quel est le statut génétique des populations de *B. truncatus* en Egypte ? Existe-t-il des variations génétiques entre ces populations ? Y a-t-il un lien entre la structure génétique de ces populations et la transmission de *S. haematobium* ? Le but est de contribuer à l'évaluation des risques génétiques et à la conception d'une gestion efficace et de stratégies de lutte contre la transmission de la schistosomose urinaire.

L'objectif principal de notre travail est donc d'analyser la diversité génétique de dix populations égyptiennes de *B. truncatus* en utilisant un ensemble de six marqueurs microsatellites, avec comme objectifs spécifiques :

(i) étudier la diversité génétique de *B. truncatus* en Egypte,

(ii) étudier la structuration génétique de ces populations dans la zone d'étude.

II. Matériels et Méthodes

Nous décrirons dans cette partie la méthodologie utilisée, depuis la collecte des échantillons, l'extraction d'ADN, l'amplification, le séquençage, l'électrophorèse capillaire, jusqu'à l'évaluation des séquences et leur traitement en vue de leur utilisation dans les analyses phylogénétiques et génomiques.

A. Sites de collection

Notre échantillonnage a été réalisé en Juillet 2012, elle couvre la quasi-totalité des biotopes en Egypte, dont les caractéristiques sont données dans le tableau 8. Il inclut dix populations naturelles représentatives des différents groupes des bulins le long du Nil. Pour chaque population, les individus ont été collectés de façon à éviter l'effet de Wahlund **(tableau 7, Figure 17)**.

Tableau 7 : Caractéristiques des différents sites étudiés en Egypte

Sites	Latitude et longitude	N
Delta du Nil		
1. Kafer el Zayat	30° 48' 08" N, 30° 48' 06" E	25
2. Tanta	30° 45' 32" N, 31° 00' 07" E	25
3. Behera	30° 33' 28" N, 30° 42' 14" E	30
Egypte centrale		
4. Kenesa	30° 09' 39" N, 31° 10' 09" E	25
5. Mansoura Grand	30° 08' 29" N, 31° 04' 37" E	25
6. Markaz Nasim	30° 06' 27" N, 31° 05' 12" E	25
7. Masaken Haram	30° 01' 09" N, 31° 07' 26" E	26
8. Mansouria	30° 00' 28" N, 31° 12' 07" E	30
Haute Egypte		
9. Quena	26° 10' 23" N, 32° 09' 58" E	30
10. Naej Hemadi	26° 05' 48" N, 32° 14' 25" E	25
Total		266

N = nombre d'individus analysés



Figure 17. Sites de collection de bulins en Egypte (Google earth)

B. Matériel biologique

Les échantillons des bulins ont été récoltés dans les canaux d'irrigation secondaires. Les échantillons ont été conservés dans l'éthanol à 70 % jusqu'à l'analyse génétique.

C. Locus choisis

Dans ce travail, nous avons utilisé six marqueurs microsatellites pour élucider la variabilité génétique.

Les Microsatellites : définition et choix des marqueurs

Les microsatellites sont des régions polymorphes du génome constituées de motifs de 2 à 6 paires de bases répétés en tandem (Kashi *et al.*, 1997). La longueur de ces séquences, c'est-à-dire le nombre de répétitions, est variable d'une espèce à l'autre, d'un individu à l'autre et d'un allèle à l'autre chez un même individu. Les microsatellites sont bordés par des régions flanquantes stables qui déterminent la spécificité du locus. Leur amplification par PCR se réalise avec des amorces spécifiques, complémentaires des séquences flanquantes du locus microsatellite. Cela peut révéler pour chaque microsatellite des allèles différents entre individus, mettant ainsi en évidence le polymorphisme intra ou inter-populationnel. La variabilité inter-individuelle recherchée concerne le nombre de répétitions en tandem. Il s'agit donc d'évaluer un polymorphisme de taille aux locus microsatellites. Les microsatellites présentent la plupart des caractéristiques d'un « bon » marqueur génétique (Jarne et Lagoda, 1996 ; Blouin, 2003), d'où l'intérêt de les utiliser préférentiellement pour l'analyse génétique des populations.

1. Ils sont polymorphes et donc très résolutifs pour les analyses de la diversité génétique. Cette caractéristique leur est conférée par un taux de mutation élevé (10^{-3} à 10^{-5} mutations par locus et par génération ; Jarne et Lagoda, 1996).

2. Ils sont spécifiques c'est-à-dire utilisables dans une seule ou quelques espèces proches, ce qui permet de limiter les contaminations par d'autres organismes.

3. Ils sont codominants ; les deux allèles d'un hétérozygote sont détectables, ce qui rend les individus homozygotes et hétérozygotes distinguables, à l'opposé des marqueurs enzymatiques (Jarne et Lagoda, 1996).

4. Ils peuvent être utilisés sur des espèces considérées comme génétiquement "pauvres" (espèces clonales ou autogames).

5. Ils sont utilisés pour réaliser une analyse fine de la structure génétique des populations, très sensible au régime reproducteur : variabilité allélique et génique (recombinaison et brassage) ; recombinaison entre locus (déséquilibres de liaison).

D. Extraction d'ADN et amplification de microsatellites

Les échantillons préservés dans l'alcool ont été disséqués. Le pied de chaque mollusque a été rincé avec du PBS sous agitation pendant 30 min pour éliminer toute trace d'alcool. L'extraction d'ADN est ensuite réalisée grâce au kit QiAamp DNA Mini Kit (Qiagen®,Courtaboeuf, France) suivant les indications du fournisseur **(cf. annexe 1)**

L'ADN extrait a été amplifié en utilisant six marqueurs microsatellites décrits par Jarne *et al.,* (1994). Les détails techniques concernant ces locus sont donnés en **annexe 3**.

Les réactions d'amplification ont été effectuées en utilisant le kit Qiagen PCR multiplex (Qiagen®, France) dans un volume total de 25 µL contenant 0,5 µL de chaque amorce (20 ng/µL), 12,5 µL de Master Mix et une concentration standard de 500 ng/µL d'ADN. Les conditions du programme du thermocycleur sont présentées en **annexe 3**. A la fin de chaque PCR, une électrophorèse sur gel d'agarose a été faite pour vérifier la présence d'amplicons.

E. Génotypage

La taille des amplicons a été déterminée par une électrophorèse capillaire, dont le principe repose sur une solution POP-7 (Performance Optimized Polymer). La fluorescence émise par les fluorochromes contenus dans les amorces est captée par une caméra, puis analysée par un système d'acquisition et d'analyse des données. Les produits d'amplification des différents marqueurs sont distingués les uns des autres, soit par leur taille, soit par la couleur du marquage de leurs amorces. Cette technique se déroule en 4 étapes :

- Préparation du mix

Le mix comprend 23,5 µL de Hi-Di® formamide (Sigma®) et 0,5 µL de réactif d'étalonnage ROX (GeneScan® - 500 AB) pour chaque échantillon. Un volume de 24 µL de mélange est déposé dans chaque puits de la plaque (Well Plates RNAse-Free polypropylène, Corning Incorporated).

- Préparation des produits de PCR

Les produits de PCR ont été dilués en fonction de l'intensité des bandes visualisées sur le gel d'électrophorèse. Les échantillons sont utilisés, soit purs, soit dilués au 1/ 5, au 1/10 ou au 1/20 avec du Hi-Di™ Formamide Deionized (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

- Dépôt des produits

Un volume de 1 µL de chaque échantillon d'ADN (dilué ou non) a été déposé dans chaque puits de la plaque. Le volume final de chaque puits est donc de 25 µL. La plaque couverte est ensuite placée à l'incubateur à 95 ºC pendant 5 minutes, puis immédiatement

posée dans la glace afin d'éviter l'hybridation de l'ADN. La plaque est alors prête pour l'analyse par l'automate.

- Analyse par le séquenceur

Les échantillons sont ensuite analysés par un séquenceur automatique (Hitachi 3130x1, Applied Biosystems) qui reconnaît la fluorescence. Le logiciel GeneMapper Software, version 4.0 (Applied Biosystem) retranscrit les données enregistrées par le séquenceur automatique en calculant la taille des fragments analysés en nombre de paires de bases (pb). Les résultats sont représentés sous forme de graphiques avec un profil génotypique spécifique à chaque échantillon.

F. Analyse des données

Malgré le fait que *B. truncatus* soit une espèce allo-tétraploïde, la co-amplification des locus n'a jamais été observée si bien qu'ils ont été analysés comme des diploïdes (Viard *et al.*, 1996). Les données ont été saisies sur fichier Excel et analysées par des logiciels spécifiques de la génétique de population.

- **Les locus microsatellites**

Nous avons testé l'indépendance génotypique des six locus utilisés, l'hypothèse d'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE) et les erreurs de génotypage ou de fixation des amorces afin de déterminer si certains locus devaient être éliminés de l'analyse.

- **Analyse de la diversité génétique intra-populationnelle**

Nous avons calculé la richesse allélique (A), le taux de polymorphisme (P), l'hétérozygotie observée et attendue (Ho, H_E), et la diversité génétique (Hs) pour chaque locus et sur l'ensemble des locus à l'aide du logiciel GENETIX 4.03 (Dawson et Belkhir, 2001) et Genepop v 4.0.7 (Raymond et Rousset, 1995).

L'hypothèse de panmixie au sein des échantillons a été également testée par les estimations des F_{IS} selon Weir et Cockerham (1984) en utilisant la procédure de permutation des allèles à l'intérieur de chaque population à l'aide du logiciel GENETIX (1000 permutations). La significativité des valeurs observées par rapport à celles attendues a été testée au seuil de 5 % sous GENEPOP (Raymond et Rousset, 1995).

Afin de détecter des réductions récentes de tailles efficaces (*i.e.* goulot d'étranglement) dans les populations de *B. truncatus*, nous avons utilisé le logiciel BOTTLENECK v 1.2.0.2 (Piry *et al.* 1999). Ce programme teste si l'hétérozygotie observée est plus importante que l'hétérozygotie attendue compte tenu du nombre d'allèles au locus sous l'hypothèse d'un équilibre mutation-dérive (la taille efficace est restée constante au cours des dernières années).

- **Analyse de la diversité génétique inter-populationnelle**

Plusieurs approches ont permis une étude globale de la structure des populations sur la zone d'étude. Tout d'abord, nous avons calculé les valeurs de F_{ST} global, et par paires, des sites à l'aide du logiciel GENETIX selon la formule de Weir and Cockerham (1984). La significativité des valeurs observées a été testée par un Test exact de Fisher (1000 répétitions, $P<0.05$).

L'isolement par la distance (IBD) a été testé. Pour chaque site échantillonné nous avons enregistré les coordonnées géographiques grâce à un système d'information géographique et nous avons calculé la distance séparant chaque paire de sites (en considérant la plus courte distance entre eux). La distance génétique entre chaque paire de sites a été estimée grâce à la statistique Fst/(1 – Fst) (Rousset, 1997). Les corrélations entre les matrices de distances génétiques et géographiques ont été évaluées par des tests de Mantel et la significativité du coefficient de Pearson (r) a été établie en effectuant 1000 permutations.

L'effet de la distance géographique sur la distance génétique a été déterminée en effectuant une analyse en composantes principales (ACP) mis en œuvre dans l'ensemble de R "adegenet" (Jombart, 2008). Les points ont été *a posteriori* regroupés en fonction de l'emplacement sélectionné et coloré en fonction chacune de trois régions étudiées (Delta du Nil, Egypte Centrale et Haute Egypte).

Les distances génétiques (CFE) de Cavalli-Sforza et Edwards ont été estimées en GENETIX puis importées dans R pour construire un arbre phylogénétique (NJ) en utilisant le logiciel R (ape).

Enfin, nous avons estimé la distance de Nei (1978) et le flux de gènes (N_m) entre les sites étudiées via le logiciel GENEPOP (Raymond et Rousset, 1995).

- **Assignation des individus à des populations génétiques**

L'estimation de la plupart des paramètres génétiques notamment les F-statistiques s'appuie sur la définition préalable de groupes naturels d'individus appartenant à la même population génétique. La délimitation de ces populations n'est pas forcément reflétée dans la proximité géographique des individus puisque des individus proches géographiquement peuvent correspondre à des populations génétiques différentes et une même population génétique peut être représentée par des individus à répartition géographique très large. Afin de partir sans *a priori*, une approche multi-locus bayesienne a été utilisée pour déterminer le nombre le plus probable (K) de populations génétiquement différenciées dans l'échantillonnage étudié et la probabilité (Q) d'assignation de chaque individu à chacune des K populations sur la base de 6 locus microsatellites. Elle a été appliquée par le logiciel

STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.,* 2000) sous les modèles de mixité ou admixture 9 et de fréquences alléliques corrélées. Chaque analyse a consisté en une « phase d'allumage » (Burn-in period) de 8.106 chaînes de Markov Monte Carlo (MCMC) et une phase stationnaire de 8.105 MCMC. Les estimations du log de vraisemblance, c'est-à-dire la probabilité d'observer les données sachant le nombre de groupes K [Ln P(D) ou Pr(X K)] ont été calculées pour des valeurs de K allant de 1 à 11 avec 5 répétitions pour chacune afin de tester la reproductibilité des résultats. La meilleure estimation de K est la valeur de K maximale avant le plateau de la courbe représentant Ln P(D) en fonction de K (Pritchard *et al.*, 2000).

III. Résultats

L'objectif de cette section est d'une part de présenter les jeux de données des marqueurs microsatellites qui serviront par la suite aux traitements statistiques et, d'autre part, d'étudier la diversité génétique globale des populations de *B. truncatus*, et mettre en évidence d'éventuelles différences entre les divers sites analysés en Egypte.

Notre pool de données microsatellites comprend au total 266 échantillons de *B. truncatus* pour six locus microsatellites. Aucun déséquilibre de liaison significatif n'a été détecté entre les différents locus sur l'ensemble des échantillons ($p>0.05$), témoignant l'indépendance de l'information apportée par chacun.

A. Diversité intra populationnelle

- ***Le taux de polymorphisme (P)***

Les 6 locus microsatellites utilisés se sont révélés polymorphes dans notre pool d'échantillons allant de 3 allèles pour Bt1 à 8 allèles pour Bt6, ce qui implique une diversité allélique élevée **(Tableau 8)**, les allèles les plus fréquents étant presque identiques dans la plupart des populations.

Tableau 8 : Bilan de la répartition par taille des allèles pour chaque locus microsatellite

	Bt1	**Bt4**	**Bt6**	**Bt12**	**Bt13**	**Bt23**
Nombre total d'allèles	3	6	8	6	7	7
Allèle de taille minimale	176	126	120	234	277	234
Allèle de taille maximale	186	145	142	244	326	248
Taux de réussite	90%	87%	88%	82%	93%	88%

Taux de réussite : c'est le pourcentage d'individus pour lesquels la taille des allèles a pu être déterminée avec succès.

- ***La richesse allélique (A)***

La distribution du nombre moyen d'allèles par locus semble être homogène pour l'ensemble des populations, allant de 1,5 allèle par locus en moyenne pour la population de Tanta jusqu'à 2,5 allèles par locus en moyenne pour la population de Mansoura-Grand **(Tableau 9)**.

Tableau 9 : Estimation de la diversité génétique sur l'ensemble des locus pour les dix populations étudiées.

Site de collecte	Ns	Ni	Npol	P	A
Delta du Nil					
1. Kafr el Zayat	25	14	4	0,66	2,0 (±1,56)
2. Tanta	25	22	2	0,33	1,5 (±0,61)
3. Behera	30	10	5	0,83	2,1 (±1,54)
Egypte centrale					
4. Kenesa	25	7	5	0,83	2,3 (±1,65)
5. Mansouria Grand	25	1	6	1,00	2,5 (±1,65)
6. Markaz Nasim	25	10	5	0,83	2,0 (±1,51)
7. Masaken Haram	26	5	5	0,83	2,3 (±1,62)
8. Mansouria	30	13	5	0,83	2,2 (±1,59)
Haute Egypte					
9. Quena	30	1	5	0,83	2,4 (±1,61)
10. Naej Hemadi	25	11	5	0,83	2,0 (±1,52)

Ns = nombre d'individus par population ; **Ni** = Nombre de génotypes multilocus identiques ; **Npol** = nombre des locus polymorphes ; **P =** proportion des locus polymorphes ; **A** = nb moyen d'allèles sur l'ensemble des locus, avec l'écart type.

- ***La diversité génétique (Hs) et l'hétérozygotie (Ho et He)***

L'analyse du polymorphisme pour chaque site d'échantillonnage sur l'ensemble des 6 locus montre un faible taux d'hétérozygotie observé Ho dans pratiquement toutes les populations et les zones géographiques étudiées. La valeur de Ho varie de 0,04 pour la population de Behera à 0,18 pour la population de Kenesa (**Tableau 10**). Quant à la diversité génétique, elle va de 0,17 pour Tanta à 0,56 pour Mansoura-Grand (**Tableau 10**).

- ***L'indice de consanguinité (Fis)***

Nous avons remarqué une déviation significative par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg et des valeurs de F_{is} élevées ($0,40<F_{is}<0,89$) pour toutes les populations, et qui ne semble pas être caractéristique d'une zone géographique particulière (**Tableau 10**). Par ailleurs, le génotypage de près de 10 % des individus n'a pu identifier de façon claire la présence des deux allèles hétérozygotes. Cette situation évoque la possible présence d'un ou plusieurs allèles nuls.

- ***Le taux d'autofécondation (S)***

Les taux d'autofécondation estimés sont très élevés pour toutes les populations étudiées, allant de 0,58 pour la population de Tanta à 0,98 pour celle de Kenesa justifiant ainsi une descendance complètement autoféconde (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Paramètres décrivant la diversité génétique à l'intérieur des populations étudiées sur l'ensemble de six locus utilisés

Population	*Ns*	*Hs*	H_O	H_E	*Fis*	*S*
Kafer-zayat	25	0,33	0,17	0,32	0,50	0,67
Tanta	25	0,17	0,10	0,16	0,41	0,58
Behera	30	0,37	0,04	0,37	0,90	0,95
Kenesa	25	0,43	0,01	0,49	0,97	0,98
Mansouria-Grand	25	0 ,57	0,07	0,56	0,88	0,94
Markaz-Nasim	25	0,33	0,17	0,33	0,48	0,65
Masaken-Haram	26	0,46	0,11	0,45	0,77	0,87
Mansouria	30	0,38	0,05	0,38	0,87	0,93
Quena	30	0,50	0,07	0,49	0,87	0,93
Nahej-Hemadi	25	0,40	0,15	0,39	0,63	0,77

Ns = nombre d'individus par population **; Hs =** diversité génétique **; Ho** = hétérozygotie observée ; **He** = hétérozygotie attendue ; **Fis** = indice de consanguinité ; **S** = taux d'autofécondation

- ***Le test de bottleneck***

Les résultats du test de bottleneck indiquent que la plupart des populations égyptiennes de *B. truncatus* ont subi un effet de goulot d'étranglement au cours des dernières générations (p = 0,02) **(Tableau 11).**

Tableau 11 : Tests de bottleneck chez les populations de *B. truncatus*.

Sites de collecte	**IAM**		**TPM**		**SMM**	
	P1	**P2**	**P1**	**P2**	**P1**	**P2**
Kafer el Zayat	0,13		0,13		0,19	
Tanta	0,25		0,25		0,25	
Behera	0,07	0,03 (E)	0,07	0,03 (E)	0,07	0,03 (E)
Kenesa	0,03	0,02 (E)	0,03	0,02 (E)	0,09	0,04 (E)
Mansouria Grand	0,03	0,02 (E)	0,05	0,02 (E)	0,44	
Markaz Nasim	0,03	0,02 (E)	0,06	0,03 (E)	0,63	
Masaken Haram	0,03	0,02 (E)	0,03	0,02 (E)	0,22	
Mansouria	0,03	0,02 (E)	0,03	0,02 (E)	0,03	0,02 (E)
Quena	0,03	0,02 (E)	0,03	0,02 (E)	0,16	
Naej Hemadi	0,03	0,02 (E)	0,03	0,02 (E)	0,06	0,03 (E)

P1 = *P-value* de tets de Wilcoxon (one tail) ; P2 = *P-value* de test de Wilcoxon (two tails) ; **E** = excès en hétérozygote

B. Diversité inter populationnelle

- *L'indice de diversification (Fst)*

La Fst de Weir et Cockerham (1984) a été estimée par paires de populations **(Tableau 12)**. Toutes les valeurs sont comprises entre 0,1 et 0,6 avec une valeur moyenne de 0, 32 (IC à 95 % [0,183 – 0,418], ce qui témoigne d'une forte structuration génétique entre les populations égyptiennes de *B. truncatus* en Egypte.

Trois niveaux de différenciation génétique apparaissent, traduits par 3 gammes de valeurs de F_{ST} :

- $F_{ST} > 0,25$: populations très éloignées quelle que soit la zone géographique
- $0,15 > F_{ST} > 0,25$: populations relativement éloignées quelle que soit la zone géographique.
- $F_{ST} < 0,15$: populations génétiquement proches quelle que soit la zone géographique.

Les populations de Kenesa (Egypte centrale) et Markaz-Haram (Egypte centrale) distantes de 15 km, sont les plus proches génétiquement (Fst = 0,06) ; par contre celles de Tanta (Egypte du nord) et Naej-Hemadi (Egypte du sud) séparées de 670 km semblent être les plus éloignées entre elles (Fst = 0, 60), et par rapport à toutes les autres populations étudiées (Fst > 0,27).

Tableau 12 : Estimation des valeurs de Fst par paires de populations

	K.Z	**Tan**	**Beh**	**Ken**	**M.N**	**M.H**	**Man**	**M.G**	**Que**
Tan	0 ,22* (22 km)								
Beh	0,41** (60 km)	0,54** (80 km)							
Ken	0,31** (95 km)	0,37** (90km)	0,18* (40 km)						
M.N	0,45** (105 km)	0,52** (87 km)	0,44 (160 km)	0,27** (10 km)					
M.H	0,22* (110 km)	0,36** (93 km)	0,23* (170 km)	0,06 (15 km)	0,28** (10 km)				
Man	0,29** (90 Km)	0,46** (99 km)	0,13 (127 km)	0,15 (25 km)	0,39** (35 km)	0,11 (40 km)			
M.G	0,28** (93 Km)	0,38** (100 km)	0,26** (174 km)	0,13 (26 km)	0,310 (37 km)	0,148 (45 km)	0,202 (10 km)		
Que	0,27** (680 km)	0,28** (660 km)	0,24* (732 km)	0,17* (670 km)	0,36** (661 km)	0,20* (123 km)	0,23* (594 km)	0,15 (597 km)	
N.H	0,48** (690 km)	0,60** (670 km)	0,48** (742 km)	0,43** (680 km)	0,45** (670km)	0,37** (135 km)	0,41** (610 km)	0,36** (610 km)	0,37** (15 km)

Populations : **Beh** : Behera, **Man** : Mansouria, **Ken** : Kenesa, **M.H** : Masaken-Haram, **Que** : Quena, **K.Z :** Kafr-Zayat, **Tan :** Tanta, **N.H** : Naej-Hemadi, **M.N** : Markaz-Nasim, **M.G** : Mansouria-Grand. Entre parenthèses est représentée la distance géographique. *** *p* < 0.05 ; ** *p* < 0.001**

- ***Le flux de gènes (Nm)***

Le nombre efficace de migrants par paire des populations étudiées est compris entre 0,16 et 3,74 **(Tableau 13)**. La valeur de Nm est plus élevée entre les populations du centre de l'Egypte (Nm > 1). La valeur de la P-Value est significative pour tous les locus selon la méthode de Fisher.

Tableau 13 : Estimation du flux génétique Nm entre les paires de populations

	Tan	Beh	Ken	M.G	M.N	M.H	Man	Que	N.H
K.Z	**0,87**	**0,35**	**0,57**	**0,63**	**0,30**	**0,87**	**0,61**	**0,68**	**0,27**
Tan		**0,22**	**0,43**	**0,41**	**0,23**	**0,44**	**0,29**	**0,64**	**0,16**
Beh			**1,13**	**0,72**	**0,32**	**0,85**	**1,74**	**0,80**	**0,27**
Ken				**1,72**	**0,69**	**3,74**	**1,43**	**1,20**	**0 ,33**
M.G					**0,56**	**1,44**	**0,99**	**1,39**	**0,45**
M.N						**0,66**	**0,39**	**0,45**	**0,30**
M.H							**1,99**	**0,97**	**0,43**
Man								**0,84**	**0,36**
Que									**0,42**

Populations : **Beh** : Behera, **Man** : Mansouria, **Ken** : Kenesa, **M.H** : Masaken-Haram, **Que** : Quena, **K.Z :** Kafr-Zayat, **Tan :** Tanta, **N.H** : Naej-Hemadi, **M.N** : Markaz-Nasim, **M.G** : Mansouria-Grand.

- Test de Mantel

Le test de Mantel effectué n'a pas révélé de corrélation entre la distance géographique et la distance génétique (Z = 49,87, r = 0,305) : il n'y a pas d'isolement par la distance **(Figure 18)**. Ceci confirme la structuration globale forte des populations de *B. truncatus* en Egypte. À l'intérieur des populations nous avons testé également les patrons d'IBD uniquement pour les populations d'Egypte centrale du fait qu'elles sont très proches sur le plan géographique, mais nous n'avons pas mis en évidence de corrélation significative entre les distances génétiques et géographiques pour cette zone (r = 0,32).

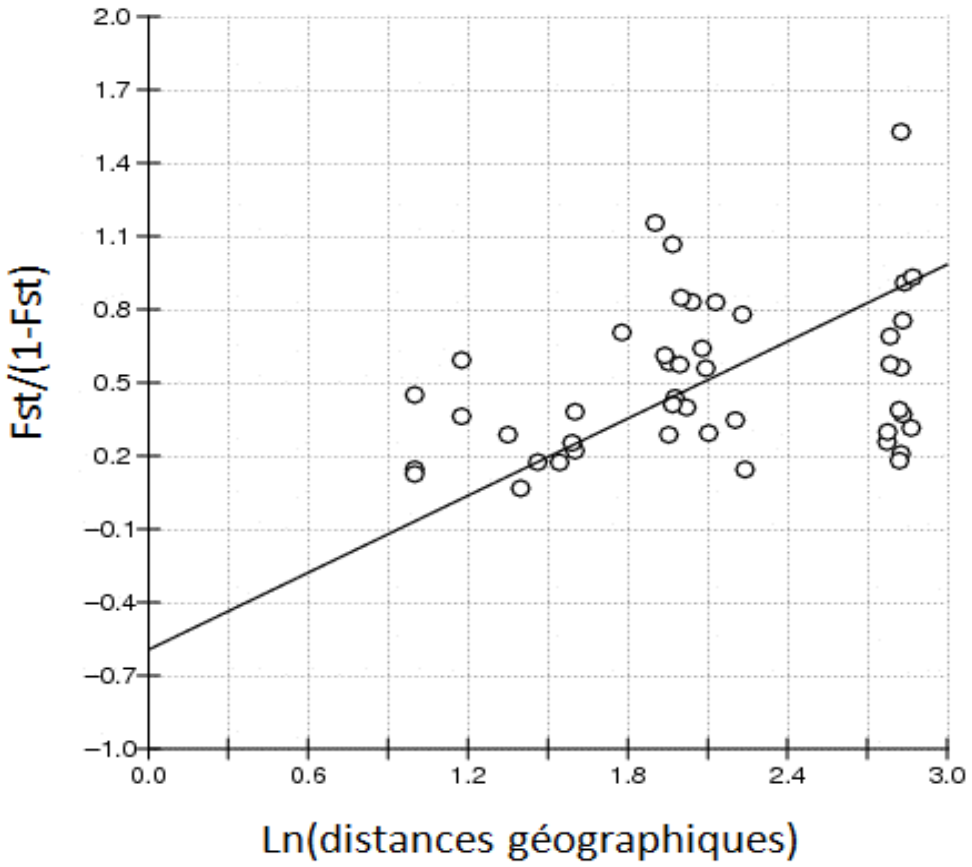


Figure 18 : La droite de régression de la distance de la diversité génétique des échantillons de *B. truncatus* en fonction du logarithme népérien de la distance géographique entre les sites de récolte

L'analyse en composantes principales spatialisée (ACPs), effectuée sur les 266 individus **(Figure 19),** a permis de définir quatre entités génétiques (4 clusters) :

- La première entité regroupe les populations de Tanta et Kafer-Zayat séparés de 23 km.
- La deuxième entité, celle de Behera située dans l'Ouest du Delta, et distante de 80 km de Tanta et 60 km de Kafer-Zayat.
- La troisième entité rassemble les populations du centre (Ken, M.N, M.H, Man, M.G) et Quena.
- Par contre la dernière est constituée d'une seule population Naej-Hemadi.

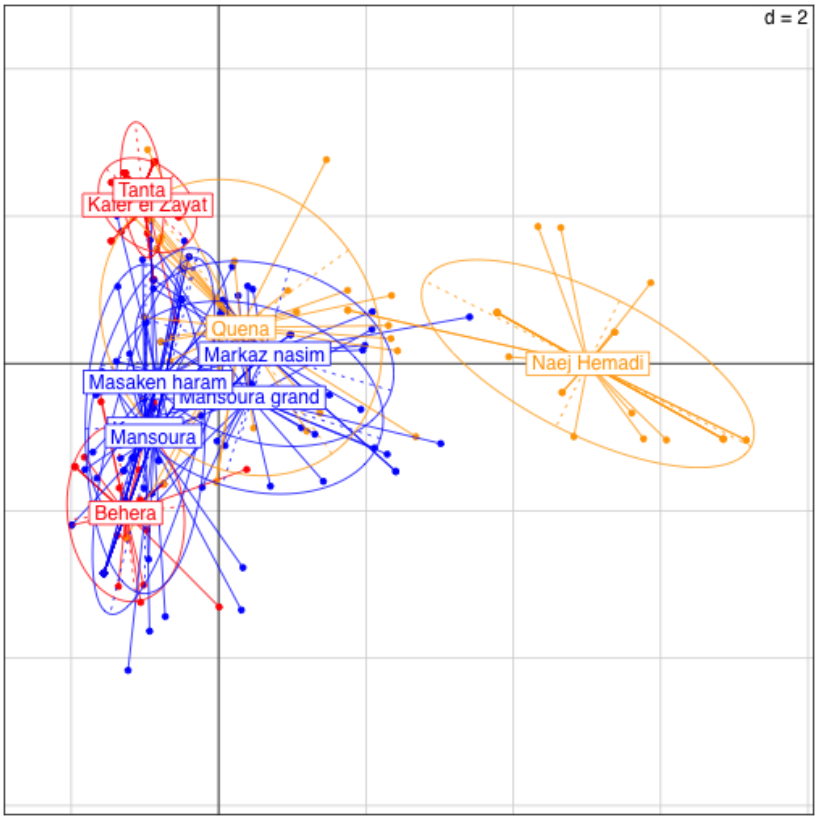


Figure 19 : Analyse en composantes principales spatialisée (ACPs) en utilisant 266 échantillons de *B. truncatus* sur les six marqueurs microsatellites. Les noms des sites sont colorés en fonction de la région (Delta de Nil, Egypte Centrale et Haute Egypte).

IV. Discussion

L'étude génétique de dix populations de *B. truncatus* originaires d'Egypte au moyen de marqueurs microsatellites a permis la caractérisation de la diversité génétique intra et inter-populationnelle de cette espèce.

A. Diversité intra populationnelle

a) Le taux de polymorphisme (P)

Le nombre d'allèles par locus microsatellite détecté dans cette étude (3 à 8 allèles/locus) est comparable à celui obtenu par Viard *et al.* (1996) chez les populations de *B. truncatus* de Côte d'Ivoire et du Niger, de même que celui détecté par Djuikwo-Teukeng *et al.* (2011). Il est par contre très supérieur à celui noté par Chlyeh *et al.* (2002) sur les échantillons marocains. Le fait que le nombre de sites étudiés (10) soit supérieur à celui de l'étude de Chlyeh avec 4 sites, constitue un élément de réponse. En effet, l'augmentation du nombre de sites échantillonnés, favorise la chance de détecter un nombre plus important d'allèles. En revanche, les valeurs que nous avons observées sont beaucoup plus faibles que celles observées chez *B. globosus* (16 à 22 allèles/locus) (Nyakaana *et al.,* 2013). Ces résultats sont en accord avec le système de reproduction : en effet *B. globosus* est une espèce préférentiellement allo-féconde (Wilkinson *et al.,* 2007). Ce type de reproduction a l'avantage de varier le bagage génétique, en augmentant ainsi la variabilité génétique.

b) La richesse allélique (A)

Le nombre moyen d'allèles par population détecté sur l'ensemble de six locus microsatellites est ($1,5<A<2,5$). En effet, la richesse allélique globale est relativement importante et chaque population étudiée présente un grand nombre d'allèles différents, ce qui indique une variabilité relativement élevée au sein de ces populations. Ces résultats sont en accord avec les travaux effectués sur *B. truncatus* au Niger (Viard *et al.,* 1996), et au Cameroun (Djuikwo-Teukeng *et al.,* 2011), qui ont étudié la structure génétique de *B. truncatus,* et ils ont détecté un niveau relativement élevé de polymorphisme génétique en utilisant des marqueurs microsatellites.

c) L'hétérozygotie et la diversité génétique

Nous avons observé un déficit d'hétérozygotie dans pratiquement tous les sites de la zone d'étude ($0,04<H_O<0,18$), et un déficit significatif d'hétérozygotes ($0,41<F_{IS}<0,91$). Malgré ce déficit en hétérozygotes, nous avons détecté un niveau relativement élevé de polymorphisme et de diversité génétique ($0,17<H_S<0,56$), indiquant une grande variabilité génétique au sein de ces dix populations. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés chez *B. truncatus* du Cameroun (Djuikwo-Teukeng *et al.,* 2011), du Maroc (Chlyeh *et al.,* 2002), et du Niger (Viard *et al.,* 1996). Une diversité génétique relativement plus élevée a été trouvée chez les populations camerounaises de *B. forskalii* (Gow *et al.,* 2001) malgré le fait que les deux espèces soient préférentiellement autofécondes. En revanche, la diversité détectée dans certaines de nos populations (Man) est comparable à celle détectée chez l'espèce allo-féconde *Biomphalaria glabrata* au Venezuela (Mavarez *et al.,* 2002).

Le déficit en hétérozygotes observé dans nos résultats peut résulter de divers facteurs, dont certains sont biologiques, et d'autres sont reliés aux allèles nuls (Pemberton *et al.,* 1995) et à l'effet Wahlund (Hartl et Clark, 1997). Cependant, ces deux derniers facteurs ont une probabilité faible de se produire de manière uniforme sur l'ensemble des locus et des échantillons. Par conséquent, ce déficit est probablement plus lié aux facteurs biologiques tels que le système de reproduction et le goulot d'étranglement.

- Le système de reproduction

Du point de vue fondamental, connaître quels sont les effets des différents systèmes de reproduction sur les valeurs de différenciation intra-populationnelle permet de mieux comprendre comment fonctionnent et évoluent les populations d'espèces à systèmes de reproduction mixtes, et c'est le cas de *B. truncatus* (Butlin, 2003 ; Richards, 2003).

Bulinus truncatus est une espèce fortement autoféconde (Viard *et al.,* 1997a,b ; Djuikwo-Teukeng *et al.,* 2011). L'autofécondation est connue pour abaisser la fraction de génotypes hétérozygotes dans les populations (Morgan et Charlesworth, 1993), car elle augmente drastiquement la consanguinité. Des résultats similaires de déficit en hétérozygotes ont été trouvés chez l'espèce autoféconde *B. forskalii* au Cameroun ($0,67<F_{IS}<0,95$)(Gow *et al.,* 2004). Par contre, un excès en hétérozygotes a été observé chez l'espèce allo-féconde *B. glabrata* (Mavarez *et al.,* 2002). Pourtant la diversité génétique de cette espèce était comparable à celle détectée dans nos échantillons. Ce déficit en hétérozygotes n'est pas bénéfique pour une population de taille réduite car la consanguinité peut être un problème

préoccupant lorsqu'elle conduit à l'accumulation d'allèles désavantageux, les moins adaptés aux conditions environnementales.

- Le goulot d'étranglement

Une perte drastique de la taille d'une population accompagnée d'une réduction des échanges de gènes conduit en général à une augmentation de la consanguinité globale et à la fixation de certains allèles (Luikart et Cornuet, 1998). Ces appariements consanguins diminuent souvent l'aptitude phénotypique de la descendance, et augmentent le taux d'homozygotie dans la population (Leberg, 1993). En effet, nos résultats ont montré que la plupart des populations égyptiennes de *B. truncatus* ont subi un goulot d'étranglement, ce qui peut expliquer ce déficit en hétérozygotes au sein de ces populations.

Plusieurs facteurs locaux pourraient être la cause de cette baisse brusque de l'effectif de la population égyptienne de *B. truncatus*.

i) Facteurs environnementaux : nos populations ont été collectées pendant la saison sèche où il y'avait une baisse drastique du niveau de l'eau, ce qui a entrainé une faible densité de la population de *B. truncatus* dans nos sites de récolte, et donc de forts goulots d'étranglement.

ii) Facteurs écologiques : l'utilisation régulière des molluscicides a pour conséquence une diminution sévère des populations de mollusques, et pourrait justifier les goulots d'étranglement détectés dans nos populations.

B. Structuration des populations de *B. truncatus* en Egypte

Les valeurs de la *Fst* indiquent une différenciation génétique importante entre les dix populations égyptiennes de *B. truncatus* (F_{ST} = 0,34), suggérant à première vue un taux faible de flux génétique entre les sites.

En revanche, le modèle de structuration détecté ici ne serait pas dû à l'isolement par la distance, mais à la dynamique des métapopulations. Des résultats similaires ont été également trouvés chez les espèces autofécondes *Galba trunculata* (Meunier *et al.*, 2001), *Biomphalaria pfeifferi* (Charbonnel *et al.*, 2002a et b), et *B. forskalii* (Gow *et al.*, 2004).

En effet, l'instabilité démographique influe fortement sur la répartition de la variance génétique entre les populations, et certains modèles d'extinction et de recolonisation augmentent la différenciation entre celles-ci (Wade et McCauley, 1988). Par conséquent, un

modèle de métapopulation d'extinction et de recolonisation, dans lequel la dispersion passive est importante peut expliquer ces niveaux élevés de diversité génétique maintenue chez les populations de *B. truncatus* malgré les niveaux élevés de différenciation entre elles.

Nous avons remarqué que les populations du centre (M.H, M.N, Man, M.G et Ken) ont un niveau de différenciation plus faible, ce qui est en faveur d'un taux de migration de gènes plus important. Ces populations semblent agir comme sources de migrants vers les autres populations **(Figure 19)**, alors que celle de N.H semble être isolée. Ces résultats doivent être complétés par l'utilisation des marqueurs phylogénétiques afin de vérifier nos hypothèses et mieux comprendre la dynamique de ces populations en Egypte.

C. Relation *B. truncatus/ S. haematobium* en Egypte

L'isolement plus ou moins important des populations de *B. truncatus* en Haute Egypte (Nahej-Hemadi) a conduit celles-ci à évoluer génétiquement de manière distincte, suivant la taille de la population, le niveau de la migration entre les populations et des événements stochastiques. La faible diversité génétique détectée chez certaines populations pourrait favoriser la susceptibilité de *B. truncatus* d'être infecté par une souche locale de *S. haematobium*, et par la suite augmenter la prévalence de la maladie dans les sites d'études. En effet, le taux de prévalence de la schistosomose urinaire est plus élevé en Haute Egypte qu'au Delta (Hussein *et al.*, 2006). Il faudrait étudier la susceptibilité de *B. truncatus* du Delta avec les souches de *S. haematobium* provenant de la Haute Egypte, pour voir s'il y a des variations géographiques dans la compatibilité vis-à-vis de *S. haematobium* en Egypte.

V. Conclusion du chapitre

En conclusion de ce chapitre, 266 échantillons de *B. truncatus* d'Egypte, ont été génotypés par 6 locus microsatellites, ce qui nous a permis d'étudier la diversité génétique intra et inter populationnelle de ces populations.

Nos résultats ont mis en évidence un certain nombre de caractéristiques et de particularités génétiques de ces populations dans la zone d'étude.

i) En premier lieu, les populations de *B. truncatus* sont caractérisées par un déficit en hétérozygotie avec une diversité génétique moyenne et un taux d'autofécondation très élevé.

ii) Une forte structuration génétique a été notée, marquée par un faible taux de migration entre les populations. Cependant, pour bien comprendre la structure génétique de *B. truncatus*, il faut garder à l'esprit que la coévolution hôte/parasite est un processus hautement dynamique. En effet, les fluctuations temporelles du mollusque ont une forte influence sur la transmission du parasite.

En guise de perspective, nous pouvons dire que l'utilisation de marqueurs mitochondriaux pourrait compléter les informations fournies par les microsatellites afin de clarifier la diversité génétique de *B. truncatus* et l'histoire de son introduction en Egypte d'une part, et d'autre part procéder à des infestations expérimentales croisées entre différentes populations de *B. truncatus* et plusieurs isolats de *S. haematobium* d'Egypte. Ceci nous permettrait de mieux appréhender la transmission de cette parasitose.

Ce travail a fait l'objet d'un article scientifique résumant les résultats obtenus et sera soumis à la revue *Molecular Ecology*.

Conclusion générale et perspectives de recherche

La diversité actuelle des organismes résulte de multiples interactions au cours du temps entre les espèces et leur environnement. L'étude de la structure génétique et de la phylogéographie intervient dans ce cadre, car elle permet de déduire les scénarios ayant mené à la structuration génétique actuelle.

À travers nos travaux de thèse, nous avons abordé l'étude du genre *Bulinus* à l'aide d'approches génétiques et phylogéographiques. Au cours de ce travail, dans un premier temps, nous nous sommes fixée pour objectif d'étudier la diversité génétique et de reconstruire l'histoire de sept espèces de bulins provenant de trois pays africains. Il s'agissait notamment d'étudier la diversité haplotypique et nucléotidique, et de préciser les liens phylétiques entre ces espèces. Ce travail nous a permis d'appréhender l'évolution du genre *Bulinus* à différents niveaux, depuis l'histoire des organismes constituant les principales lignées de ce genre extrêmement diversifié (plusieurs dizaines d'espèces distribuées sur différents pays africains, et occupant une grande diversité de milieux), jusqu'à la dynamique individuelle des séquences (histoire du genre *Bulinus*). Ces données, qui permettent une meilleure compréhension des mécanismes accompagnant la spéciation et l'adaptation, pourront également être nécessaires dans le cadre de lutte contre la schistosomose urinaire.

Dans un deuxième temps, nous avions pour objectif d'étudier la structure génétique de *B. truncatus*, l'hôte intermédiaire principal de *S. haematobium* en Egypte. Il s'agissait de déterminer la diversité intra et inter populationnelle de cette espèce en relation avec la transmission de la schistosomose urinaire. Ce travail nous a permis d'avoir une idée sur la structuration de ce bulin en Egypte : i) un taux d'hétérozygotie très faible témoignant un système de reproduction auto-fécond, ii) une structuration génétique forte témoignant un flux de gènes limité entre ces populations.

A l'avenir, il serait également intéressant d'augmenter le nombre des espèces étudiées ainsi que le nombre des pays échantillonnés afin de mieux comprendre la phylogénie de ce genre.

Afin de valoriser les résultats obtenus lors de cette étude, deux articles scientifiques ont été rédigés pour chaque partie :

- le premier visant à présenter l'étude de la phylogéographie de sept espèces de bulins provenant de plusieurs pays africains,
- le deuxième traitant la diversité spatiale et temporelle de *B. truncatus* en Egypte.

Références Bibliographiques

Adamson, P.B. 1976. Schistosomiasis in antiquity. *Med. Hist*. 2, 176-188.

Adou-Bryn, K.D., Allah-Kouadio, E., Penali, L.., Ouhon, J., Kone, M. 1997. Prévalence des porteurs d'oeufs de *Schistosoma haematobium* chez des patients hématuriques en Cote d'Ivoire. *Médécine Afr. Noire*. 44, 8-9

Agola, L.E., Steinauer, M.L., Mburu, D.N., Munqai, B.N., Mwangi, I.N., Maqoma, G.N., Loker, E.S., Mkoji, G.M. 2009. Genetic diversity and population structure of *Schistosoma mansoni* within human infrapopulations in Mwea, central Kenya assessed by microsatellite markers. *Acta Trop*. 111, 219-225.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol*. 215, 403-410.

Álvarez, I., Wendel, J.F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol*. 29, 417-434.

Ambroise-Thomas, P., Loizzo, T., Desgeorges, P.T. 1981. Human schistosomiasis due to *Schistosoma mansoni, S. haematobium* and *S. japonicum*. Serological diagnosis by ELISA, immunofluorescence and indirect hemagglutination. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop*. 61, 379-392.

Ayeb, H. 1990. La nécessaire révolution hydraulique en Egypte. *Tiers-Monde,* 31,73-90.

Badran, R.A., 1996. The interactive effect of some molluscicides on the intermediate host of human bilharziasis and their associated zoosporic fungi in the river Nile, Egypt. *Bull. Soc. Pathol. Exot*. 89, 227-231.

Baldwin, B.G., Crawford, D.J., Francisco-Ortega, J., Kim, S.C., Sang, T., Stuessy, T.F. 1998. Molecular Phylogenetic Insights on the Origin and Evolution of Oceanic Island Plants. Molecular Systematics of Plants II. *Springer US*. 410-441.

Barabe, P., Guigon, B., Capdevielle, P., Charles, D., Delmarre, B. 1984. Diagnosis of bilharziasis from *Schistosoma mansoni* in the early stage: apropos of 77 cases. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 77, 491-498.

Barker, L.F. 1981. History of internal medicine. *Md. State Med. J.* 30, 43-48.

Bernard, H., Negroni, L., Chatel, J.M., Clement, G., Adel-Patient, K., Peltre, G., Creminon, C., Wal, J.M. 2000. Molecular basis of IgE cross-reactivity between human beta-casein and bovine beta-casein, a major allergen of milk. *Mol. Immunol.* 37, 161-167.

Biocca, E., Bullini, L., Chabaud, A., Nascetti, G., Orecchia, P., Paggi, L. 1979. Subdivisione su base morfologica e genetica del genere *Bulinus* in tre generi: *Bulinus* Muller, Physopsis Krausse *Mandahlbarthia* gen. nov. rendiconti della classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali. *Accademia Nationle dei Lincei.* 66, 276-282.

Blouin, M.S., 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends Ecol. Evol*. 18, 503-511.

Bowe, L.M., dePamphilis, C.W. 1996. Effects of RNA editing and gene processing on phylogenetic reconstruction. *Mol. Biol. Evol.* 13, 1159-1166.

Bowles, J., Blair, D., McManus, D.P. 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol. Biochem. Parasitol*. 54, 165-173.

Brooker, S., Donnelly, C.A., Guyatt, H.L. 2000. Estimating the number of helminthic infections in the Republic of Cameroon from data on infection prevalence in schoolchildren. *Bull. World Health Org*. 78, 1456-1465.

Brown, D.S. 1994. Freshwater snails of Africa and their medical importance. 687.

Buckler, E.S., Gaut, B.S., McMullen, M.D. 2006. Molecular and functional diversity of maize. *Curr. Opin. Plant Biol*. 9, 172-176.

Cesari, I.M., Diana, E.B., Mendoza, L., Ferrer, Alain., Pointier, J.P., Kombila M., Richard-Lenoble, D., Théron, A. 2010. Immunoblot analysis of membrane antigens of *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma intercalatum*, and *Schistosoma haematobium* against *Schistosoma*-infected patient sera. *Parasitol. Res*. 106, 1225-1231.

Charbonnel, N., Angers, B., Razatavonjizay, R. 2022a. The influence of mating system, demography, parasites and colonization on the population structure of *Biomphalaria pfefferi*. *Mol. Ecol*. 11, 2213-2228.

Chipaux, J.P. 2000. La lutte contre les schistosomoses en Afrique de l'Ouest. *Institut Rech. Pour Dév.* 290

Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A., Savioli, L. 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop*. 77, 41-51.

Chlyeh, G., Henry, P.Y., Jarne, P. 2003. Spatial and temporal variation of life-history traits documented using capture-mark-recapture methods in the vector snail *Bulinus truncatus. Parasitology*, 127, 243-251.

Coltman, D.W., Smith, J.A., Bancorf, D.R., Pilkington, J., MacColl, A.D., Clutton-Brock, T.H., Pemberton, J.M. 2010. Density-dependent variation in lifetime breeding success and natural and sexual selection in Soay rams. *Am. Nat*. 6, 730-746.

Criscione, C.D., Poulin, R., Blouin, M.S. 2005. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Mol.Ecol*. 14, 2247-2257.

Cronn, R., Small, R.L., Haselkorn, T., Wendel, J.F. 2003. Cryptic repeated genomic recombination during speciation in *Gossypium gossypioides*. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 57, 2475-2489.

Cunin, P., Rudant, J.P., Poste, B., Djibrilla, K., Martin, M.V. 2002. Apports de la télédetection dans l'étude des schistosomes dans le Nord Cameroun: cas de l'aval du barrage de Lagdo. *Éditions Sci*. 3, 177-185.

Darlu, P., Tassy, R. 2004. La reconstruction phylogénétique, in: La Reconstruction Phylogénétique. 241.

Davies, C.M., Webster, J.P., Krüger, O., Munatsi, A., Ndamba, J., Woolhouse, M.E.J. 1999. Host-parasite population genetics: a cross-sectional comparison of *Bulinus globosus* and *Schistosoma haematobium. Parasitology*, 119, 295-302.

Djuikwo-Teukeng, F.F., Njiokou, F., Nkengazong, L., De Meeûs, T., Ekobo, A.S., Dreyfuss, G. 2011. Strong genetic structure in Cameroonian populations of *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae), intermediate host of *Schistosoma haematobium*. *Infect. Genet. Evol.* 11, 17-22.

Doumengue, J.P., Mott, K.E., Cheung, C., Villenave, D., Chapuis, O., Perrin, M.F., Reaud-Thomas, G. 1987. Atlas of global distribution of schistosomiasis. World Health Organization, Parasitic Diseases Programme. *Press. Univ. Bordx*. 399.

Doyle, J.J., Gaut, B.S. 2000. Evolution of genes and taxa: a primer. *Plant Mol. Biol*. 42, 1-23.

El-Khoby, T., Galal, N., Fenwick, A., Barakat, R., El-Hawey, A., Nooman, Z., Habib, M., Abdel-Wahab, F., Gabr, N.S., Hammam, H.M., Hussein, M.H., Mikhail, N.N., Cline, B.L., Strickland, G.T. 2000. The epidemiology of schistosomiasis in Egypt: summary findings in nine governorates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 88-99.

Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol*. 17, 368-376.

Felsenstein, J. 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution.* 39, 783.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol*. 3, 294-299.

Frank, S.A., Slatkin, M., 1990. The distribution of allelic effects under mutation and selection. *Genet. Res*. 55, 111-117.

Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. 255.

Gaut, B.S., Muse, S.V., Clegg, M.T. 1993. Relative rates of nucleotide substitution in the chloroplast genome. *Mol. Phylogenet. Evol*. 2, 89-96.

Gentilini, M., Cames, M., Mouchet, J., Duflo, B., Lagardère, B., Richard-Lenoble, D., Brucker, G. 1993. Bilharzioses. Médecine Tropicale. *Flammarion Médecine-Sci*. 221-235.

Gow, J.L., Noble, L.R., Rollinson, D., Jones, C.S. 2001. Polymorphic microsatellites in the African freshwater snail, *Bulinus forskalii* (Gastropoda, Pulmonata). *Mol. Ecol. Notes* 1, 237-240.

Gow, J.L., Noble, L.R., Rollinson, D., Mimpfoundi, R., Jones, C.S. 2004. Breeding system and demography shape population genetic structure across ecological and climatic zones in the African freshwater snail, *Bulinus forskalii* (Gastropoda, Pulmonata), intermediate host for schistosomes. *Mol. Ecol.* 13, 3561-3573.

Greer, G.J., Mimpfoundi, R., Malek, E.A., Joky, A., Ngonseu, E., Ratard, R.C. 1990. Human schistosomiasis in Cameroon. II. Distribution of the snail hosts. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42, 573-580.

Gretillat, S. 1961. Distomiasis and bilharziasis of domestic ruminants. Their prevention by the anti-molluscal campaign. *Rev. Dé. Méd. Vét. Pays Trop*. 14, 293-313.

Hartl, D.L., Clark, A.G. 1997. Principles of population genetics. 542.

Hamed, M.A., Ali, S.A., Aly, H.F., El-Rigal, N.S., Rizk, M.Z., 2010. *Biomphalaria alexandrina* snails as immunogens against Schistosoma mansoni infection in mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 105, 879-888.

Hillis, D.M., Mable, B.K., Larson, A., Davis, S.K., and Zimmer, I.A. 1996. Nucleic acids IV: Sequencing and cloning. 321-381.

Hubendick, B. 1958. A possible method of schistosome-vector control by competition between resistant and susceptible strains. *Bull. World Health Org*. 18, 1113-1116.

Hussein, A.A., Califa, R.M.A., Mas-Coma, S. 2006. Trematode larval stages infecting *Radix natalensis* (Gastropoda: Lymnaeidae) in Qena Governorate, Egypt, with special reference to fasciolid cercariae. *Revis. Ibérica Parasitol*. 66, 69–74.

Huyse, T., Webster, B.L., Geldof, S., Stothard, J.R., Diaw, O.T., Polman, K., Rollinson, D., 2009. Bidirectional Introgressive Hybridization between a Cattle and Human Schistosome Species. *PLoS Pathog*. 5, e1000571.

Jarne, P., Lagoda, P.J., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol*. 11, 424-429.

Gentilini, M. 1993. Bilharzioses. *Médecine Tropicale*. 221-235.

Jelnes, J.E. 1985. Experimental taxonomy of *Bulinus* - past and future activities. Vidensk. Meddelelser Fra Dan. Naturhistorisk Foren. Kobenhavn. 146, 85-100.

Jørgensen, A., Kristensen, T.K., Madsen, H. 2008. A molecular phylogeny of apple snails (Gastropoda, Caenogastropoda, Ampullariidae) with an emphasis on African species. *Zool. Scr*. 37, 245-252.

Jørgensen, A., Madsen, H., Nalugwa, A., Nyakaana, S., Rollinson, D., Stothard, J.R., Kristensen, T.K., 2010. A molecular phylogenetic analysis of Bulinus (Gastropoda: Planorbidae) with conserved nuclear genes. Zool. Ser. 40, 126-136.

Jourdane, J., 1982. Etude des mécanismes de rejet dans les couples mollusque-schistosome incompatibles à partir d'infestations par voie naturelle et par transplantations microchirurgicales de stades parasitaires. *Acta Tropica*, 39, 325-335.

Kane, R.A., Stothard, J.R., Rollinson, D. 2008. Molecular characterization of freshwater snails in the genus *Bulinus*: a role for barcodes? *Parasites vectors*, 1, 15.

Kane, R.A., Rollinson, D. 1994. Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheei. Mol. Biochem. Parasitol*. 63, 153-156.

Kashi, Y., King, D., Soller, M. 1997. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Genet.* 13, 74-78.

Keita, A.D., Dembélé, M., Kané, M., Fongoro, S., Traoré, M., Sacko, M., Diallo, S., Sidibe, S., Traoré, H.A., Doumbo, O., Traoré, I. 2001. Ultrasonographic aspects of urinary schistosomiasis in children of the Dogon plateau and the Niger office; impact of praziquantel treatment. *Bull. Soc. Pathol. Exot*. 94, 335-338.

Kelchner, S.A., Wendel, J.F. 1996. Hairpins create minute inversions in non-coding regions of chloroplast DNA. *Curr. Genet*. 30, 259-262.

Keller, L.F., Waller, D.M. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends ecology & evolution*. 17, 230-241.

Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., Khorana, H.G. 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* 56, 341-361.

Kloos, H., Thompson., K. 1979. Schistosomiasis in Africa: An ecological perspective. *J. Trop. Geogr*. 48, 31–46.

Klotz, F., Guisset, M., Debonne, J.M. 1991. Diarrhée chronique au retour d'Afrique Noire penser à la sprue tropicale. *Méd. Trop*. 51, 467-470.

Kristensen, T.K., Frandsen, F., Christensen, A.G., 1987. *Bulinus africanus*-group snails in East and South-East Africa differentiated by use of biometric multivariate analysis on morphological characters (Pulmonata: Planorbidae). *Revue de Zoologie Africaine*, 101, 55-67.

Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform*. 5, 150-163.

Le, T.H., Blair, D., McManus, D.P. 2000. Mitochondrial genomes of human helminths and their use as markers in population genetics and phylogeny. *Acta Trop*. 77, 243-256.

Leberg, P.L. 1993. Strategies for population reintroduction - effects of genetic-variability on population-growth and size. *Conservation Biology*, 7, 194-199.

Lebreton, J., Nichols, J.D., Barker, R.J., Pradel, R., Spendelow, J.A. 2009. Chapter 3 Modeling Individual Animal Histories with Multistate Capture–Recapture Models, in: Hal Caswell (Ed.), Advances in Ecological Research. Academic Press, pp. 87-173.

Linder, C.R., Riesseberg, L.H. 2004. Reconstructing patterns of reticulate evolution in plants. *Amer. J. Bot*. 91, 1700-1780.

Lockhart, P.J., Steel, M.A., Hendy, M.D., Penny, D. 1994. Recovering evolutionary trees under a more realistic model of sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 11, 605-612.

Luikart, G., Cornuet, J.M. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, 12, 288-237.

Madhina, D., Shiff, C., 1996. Prevention of snail miracidia interactions using *Phytolacca dodecandra* (L'Herit) (endod) as a miracidiacide: an alternative approach to the focal control of schistosomiasis. *Trop. Med. Int. Health.*1, 221-226.

Maning, S.D., Woolhouse, M.E., Ndamba, J. 1995. Geographic compatibility of the freshwater snail *Bulinus globosus* and schistosomes from the Zimbabwe. I*nternational journal for parasitology*, 1, 37-42.

Marti, H.P., Tanner, H.P., DegreÂmont, A.A., Freyvogel, T.A. 1985. Studies on the ecology of *Bulinus globosus*, the intermediate host of *Schistosoma haematobium*, the Ifakara area. *Tanzania. Acta Trop.* 42, 171-187.

Mavarez,, J., Amarista, M., Pointier, P. 2002. Fine-scale population structure and dispersal in *Biomphalaria glabrata*, the intermediate snail host of *Schistosoma mansoni*, in Venezuela. *Mol. Ecol.* 11, 879-889.

Meunier, C., Tirard, C., Hurtrez-Boussès, S. 2001. Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. *Mol. Ecol.* 10, 1333-1340.

Mimpfoundi, R., Greer, G.J., 1990a. Allozyme comparison and ploidy levels among species of the *Bulinus truncatus / tropicus* complex (Gastropoda: Planorbidae) in Cameroon. *Journal of Molluscan Studies*, 56, 63-68.

Montgomery, S. 2010. Schistosomiasis. 3, 87

Morrison, D.A., Ellis, J.T. 1997. Effects of nucleotide sequence alignment on phylogeny estimation: a case study of 18S rDNAs of apicomplexa. *Mol. Biol. Evol*. 14, 428-441.

Nalugwa, A., Kristensen, T., Nyakaana, S., Jørgensen, A. 2009. Mitochondrial DNA Variations in Sibling Species of the *Bulinus truncatus/tropicus* Complex in Lake Albert, Western Uganda. *Zoological Studies,* 49, 515-5222.

Ndassa, A., Mimpfoundi, R., Elizabeth, M. 2007. Molecular phylogeny of diploid *Bulinus* sp. (Gastropoda: Planorbidae) populations in Cameroon crater lakes. *Infect. Genet. Evol*. 7, 103-109.

Ndir, O. 1999. Situation des schistosomoses au Sénégal. *IRD*. 225-236

Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 3321-3323.

Ngnikam, E., Tanawa, E. 2006. Les villes d'afrique face à leurs déchets. 281.

Njiokou, F., Teukeng, F., Bilong Bilong, F., Njine, T., Same Ekobo, A., 2004. Etude expérimentale de la compatibilité entre *Schistosoma haematobium* et deux espèces de bulins au Cameroun. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 97, 43-46.

Ngonseu, E., Greer, G.J., Mimpfoundi, R. 1992. Population dynamics and infestation of *Bulinus truncatus* and *Bulinus forskalii* by schistosomal larvae in the Sudan-Sahelian zone of Cameroon. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop*. 72, 311-320.

Nkengazong, L., Njiokou, F., Teukeng, F., Enyong, P., Wanji, S. 2009. Reassessment of endemicity level of urinary schistosomiasis in the Kotto-Barombi focus (South-west Cameroon) and impact of mass drug administration (MDA) on the parasitic indices. *J. Cell Anim. Biol.* 3, 159-164.

Nyakaana, S., Stothard, J.R., Nalugwa, A., Webster, B., Lange, C., Jørgensen, A., Rollinson, D., Kristensen, T.K. 2013. *Bulinus globosus* (Planorbidae; Gastropoda) populations in the

Lake Victoria basin and coastal Kenya show extreme nuclear genetic differentiation. *Acta Trop.* 128: 226-233.

Olsen, G.J., Woese, C.R. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.* 7, 113-123.

Organisation Mondiale de la Santé, 2010. Aide-mémoire N°115. Mars 2010.

Pace, N.R., Olsen, G.J., Woese, C.R., 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell.* 45, 325-326.

Pemberton, J., Slate, J., Bancroft, D.R., Barrett, J.A. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol. Ecol.* 4, 249-252.

Picquet, M., Ernould, J.C., Vercruysse, J., Southgate, V.R., Mbaye, A., Sambou, B., Niang, M., Rollinson, D. 1996. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene meeting at Manson House. The epidemiology of human schistosomiasis in the Senegal river basin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 90, 340-346.

Plouvier, S., Leroy,, J.C., Colette, J. 1975. A propos d'une technique simple de filtration des urines dans le diagnostic de la bilharziose urinaire en enquête de masse. *Méd. Trop*. 229-230.

Posada, D., Crandall, K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinforma. *Oxf. Engl.* 14, 817-818.

Queller, D.C., Strassmann, J.E., Hughes, C.R. 1993. Microsatellites and kinship. *Trends Ecol. Evol*. 8, 285-288.

Ratard, R.C., Kouemeni, L.E., Bessala, M.M., Ndamkou, C.N., Greer, G.J., Spilsbury, J., Cline, B.L. 1990. Human schistosomiasis in Cameroon. I. Distribution of schistosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 42, 561-572.

Raahauge, P., Kristensen, T.K., 2000. A comparison of *Bulinus africanus* group species (Planorbidae; Gastropoda) by use of the internal transcribed spacer 1 region combined by morphological and anatomical characters. *Acta Tropica,* 75, 85-94.

Raymond, M., Rousset, F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J. Hered*. 86, 248-249.

Ripert, C., Pajot, F., Touratier, L., Magnaval, J., Dorchies, P., Glickman, Glickman, L., Brasseur, P. 1998. Epidémiologie des maladies parasitaires. 2-Helminthoses. Editions médicales internationales. 557.

Rollinson, D. 1986. Reproductive stratigies of some species of *Bulinus*. In proceedings of the Eighth International Malacological Congress, Budapest, 93-98.

Ross, A.G.P., Bartley, P.B., Sleigh, A.C., Olds, G.R., Li, Y., Williams, G.M., McManus, D.P., 2002. Schistosomiasis. *N. Engl. J. Med.* 346, 1212-1220.

Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinforma. *Oxf. Engl*. 19, 2496–2497.

Rudolph, P.H., Bailey, J.B., 1985. Copulation as females and use of allosperm in the freshwater snail genus Bulinus (Gastropoda: Planorbidae). JMoll. Stud. 51, 276-265.

Schmid-hempel, P., Stauffer, R. 1998. Parasites and flower choice of bumblebees. *Anim. Behav*. 4, 819-825.

Senghor, B., Diallo, A., Sylla, S.N., Doucouré, S., Ndiath, M.O., Gaayeb, L., Djuikwo-Teukeng, F.F., Bâ, C.T., Sokhna, C. 2014. Prevalence and intensity of urinary schistosomiasis among school children in the district of Niakhar, region of Fatick, Senegal. *Parasit. Vectors*. 7, 5.

Sène, M., Southgate, V.R., Vercruysse, J., 2004. Bulinus truncatus, hôte intermédiaire de *Schistosoma haematobium* dans le bassin du fleuve Sénégal. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 97, 29-32.

Simpson, A.J., Dias Neto, E., Johnston, D.A., Kaukas, A., Rollinson, D. 1993. Recent molecular approaches to the study of schistosome genetics. *Exp. Parasitol.* 77, 376-379.

Sneatch, P., Sokal, R. 1973. Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification.

Soltis, D.E., Albert, V.A., Leebens-Mack, J., Palmer, J.D., Wing, R.A., dePamphilis, C.W., Ma, H., Carlson, J.E., Altman, N., Kim, S., Wall, P.K., Zuccolo, A., Soltis, P.S., 2008. The Amborella genome: an evolutionary reference for plant biology. *Genome Biol*. 9, 402.

Stothard, J.R., Hughes, S., Rollinson, D., 1996. Variation within the internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA genes of intermediate snail hosts within the genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). *Acta Tropica*, 61, 19-29.

Stothard, J.R., Brémond, P., Andriamaro, L., Sellin, B., Sellin, E., Rollinson, D. 2001. *Bulinus* species on Madagascar: molecular evolution, genetic markers and compatibility with *Schistosoma haematobium*. *Parasitology*. 123, 261-275.

Tchuem Tchuenté, L.A., Momo, S.C., Stothard, J.R., Rollinson, D. 2003. Efficacy of praziquantel and reinfection patterns in single and mixed infection foci for intestinal and urogenital schistosomiasis in Cameroon. *Acta Tro*p. 128, 275-83.

This wormy world , 2001. Global Atlas of Helminth Infections. www.thiswormyworld.org.

Traore, M., Traore, H.A., Kardorff, R., Diarra, A., Landoure, A., Vester, U., Doehring, E., Bradley, D.J. 1998. The public health significance of urinary schistosomiasis as a cause of morbidity in two districts in Mali. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 59, 407–413.

Unicef, 2007. Etude de faisabilité des forages manuels identification des zones potentiellment favorables. 45.

Uwen, C.A., Imoh, A.N., Asa, U.A., 2010. Determinants of wellbeing of fishing households in akwa ibom state, *Nigeria Niger. J. Agric*. 1-7.

Vera, C., Mouchet, F., Bremond, P., Sidiki, A., Sellin, E., Sellin, B. 1992. Natural infection of *Bulinus senegalensis* by *Schistosoma haematobium* in a temporary pool focus in Niger: characterization by cercarial emergence patterns. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 86, 62.

Viard, F., Bremond, P., Labbo, R., Justy, F., Delay, B., Jarne, P. 1996. Microsatellites and the genetics of highly selfing populations in the freshwater snail *Bulinus truncatus. Genetics*, 142, 1237-1247.

Warren, K.S., Domingo, E.O., Cowan, R.B. 1967. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. *Am. J. Pathol*. 51, 735-756.

Webster, B.L., Emerny, J.P., Webster J.P., Gouvars, A., Garba, A., Diaw, O., Seye, M., Tchuente, L.A., Simmoonga, C., Mawanga, J. 20012. Genetic diversity within Schistosoma haematobium: DNA barcoding reveals two distinct groups. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 6, e1882.

Webster, J.P., Gower, C.M., Norton, A.J. 2008. Evolutionary concepts in predicting and evaluating the impact of mass chemotherapy schistosomiasis control programmes on parasites and their hosts. *Evolutionary Applications*. 1, 66-83.

Weir, B.S., Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*. 38, 1358.

Wilkinson, S., Khamis, A.M., Mgeni, A.F., Stothard, J.., Rollinson, D. 2007. Spatial and temporal population genetic survey of *Bulinus globosus* from Zanzibar: an intermediate host of *Schistosoma haematobium*. *J. Zool*. 272, 329-339.

Young, R.H. 2008. Non-neoplastic disorders of the urinary bladder. 317.

Liste des illustrations

A. Liste des figures

		Page
Figure 1 :	Répartition mondiale de la schistosomose	8
Figure 2 :	Cycle biologique de *S. haematobium*	9
Figure 3 :	Collecte des urines pour rechercher la présence des œufs de *S. haematobium*	12
Figure 4 :	Les quatre groupes des bulins	16
Figure 5 :	Les différentes zones écologiques au Cameroun	21
Figure 6 :	Prévalence de la schistosomose urinaire au Cameroun	23
Figure 7 :	Les zones écologiques en Egypte	24
Figure 8 :	Les zones écologiques au Sénégal	26
Figure 9 :	Prévalence de la schistosomose urinaire au Sénégal	28
Figure 10 :	Diagramme représentant un arbre phylogénétique	31
Figure 11 :	Localisation des amorces utilisées pour la Cox1	45
Figure 12 :	Organisation de la région des gènes ribosomaux utilisées	46
Figure 13 :	Vue détaillée des sept espèces de bulins avec les estimations du maximum de vraisemblance en utilisant la matrice de données combiné	63
Figure 14 :	Vue détaillée des sept espèces de bulins avec les estimations du maximum de vraisemblance en utilisant la Cox1	65
Figure 15 :	Vue détaillée des sept espèces de bulins avec les estimations du maximum de vraisemblance en utilisant 18S et 28S	67
Figure 16 :	*Bulinus truncatus* d'Egypte	80
Figure 17	Sites de collection de bulins en Egypte (Google earth	84
Figure 18 :	La droite de régression de la distance de la diversité génétique des échantillons de *B. truncatus* en fonction du logarithme népérien de la distance géographique entre les sites de récolte	95
Figure 19 :	Analyse en composantes principales (ACPs) en utilisant 266 échantillons de *B. truncatus* sur les six marqueurs microsatellites.	96

B. Liste des tableaux

		Page
Tableau 1 :	Prévalence et intensité de l'infection par *S. haematobium* dans les neuf gouvernorats de l'Egypte	25
Tableau 2 :	Caractéristiques des différents sites étudiés dans les trois pays	44
Tableau 3 :	Résumé des données statistiques des matrices COI, ITS, 18S et 28S	53
Tableau 4 :	Diversité de séquences d'ADN étudié de différentes espèces de *Bulinus*	58
Tableau 5 :	L'estimation de l'indice de fixation (Fst) entre les sept espèces en utilisant la matrice de données combinées	60
Tableau 6 :	Estimation de la divergence évolutive moyenne au sein des espèces en utilisant la Cox1 (Folmer et Asmit), 18S, 28S et la matrice de données combinées	60
Tableau 7 :	Caractéristiques des différents sites étudiés en Egypte	83
Tableau 8 :	Bilan de la répartition par taille des allèles pour chaque locus microsatellite	89
Tableau 9 :	Estimation de la diversité génétique sur l'ensemble des locus pour les dix populations étudiées	90
Tableau 10 :	Paramètres décrivant la diversité génétique à l'intérieur des populations étudiées sur l'ensemble de six locus utilisés	91
Tableau 11 :	Tests de bottleneck chez les populations de *B. truncatus*	92
Tableau 12 :	Estimation des valeurs de Fst par paires de populations	93
Tableau 13 :	Estimation du flux génétique Nm entre les paires de populations	94

Annexes

Annexe 1 : Glossaire

1. **Allèle nuls** : C'est une altération par mutation aux sites d'hybridation d'une amorce peut empêcher l'hybridation de ce dernier et par conséquence empêcher l'amplification du fragment d'ADN.
2. **Déséquilibre des liaisons :** c'est une situation dans laquelle deux allèles correspondant a deux loci distincts d'un même chromosome sont plus fréquemment associes en cis dans une population que ne le voudrait le hasard. Le déséquilibre de liaisons suppose à la fois la liaison génétique et le déséquilibre gamétique. Une telle association allélique est favorisée par la proximité physique des loci et le caractère récent de la mutation ayant produit l'un des deux allèles.
3. **Distances évolutives :** c'est la divergence observée entre des pairs de séquences homologues. Plus deux séquences homologues sont différentes, plus la distance évolutive qui les sépare est grande, et donc plus les séquences ont divergé il y a longtemps.
4. **Diversité haplotypique :** C'est la probabilité que deux haplotypes tirés d'une population soient semblables.
5. **Diversité nucléotidique :** Nombre moyen de différences entre deux séquences choisies aléatoirement dans la population.
6. **Ethologie :** c'est l'étude du comportement des diverses espèces animales.
7. **Effet Wahlund :** c'est un excès d'homozygotes (ou un déficit en hétérozygotes) par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg.
8. **Equilibre de Hardy-Weinberg :** C'est le modèle de référence en génétique des populations. Il concerne la distribution des fréquences alléliques dans une population idéale. La population théorique idéale se caractérise par les organismes diploïdes à reproduction sexuée et à générations non chevauchantes (aucun croisement entre les individus de générations différentes). Elle est panmictique c'est-à-dire que la rencontre des gamètes se fait au hasard, et l'effectif de la population est illimité et non soumis à la sélection et à la migration (absence de flux migratoires et de mutation).

9. **Espèces :** c’est une population ou un ensemble de populations dont les individus peuvent effectivement ou potentiellement se reproduire entre eux et engendrer une descendance viable et féconde, dans des conditions naturelles.
10. **Evolution concertée :** C’est la conséquence d’un mécanisme de conversation génique qui au cours de temps remplace une séquence d’ADN (gène) par une autre séquence qui lui est apparenté (une autre copie). On parle d’évolution concertée lorsque dans une même espèce on observe plusieurs copies d’un même gène ayant évolué de la même manière alors qu’a priori elles auraient dû diverger.
11. **Gènes orthologues :** des gènes homologues qui se divergeant par spéciation.
12. **Locus :** c’est un emplacement sur un chromosome.
13. **Haplotypes :** C’est une combinaison donnée de nucléotides polymorphes le long d'une séquence.
14. **Population :** c’est un ensemble des individus de la même espèce, de même niveau de ploïdie, de même mode de reproduction et occupant le même habitat (Baaziz, 2011).
15. **Paralogie :** en biologie de l'évolution, c’est un lien évolutif entre deux gènes issus d'un évènement de duplication.
16. **Panmixie** : c’est le principe qui considère que les individus sont répartis de manière homogène au sein de la population et se reproduisent tous aléatoirement
17. **Mutation :** c’est une modification de l'information génétique dans le génome d'une cellule. C'est donc une modification de la séquence de l'ADN. C'est l'une des causes principales de l'évolution des espèces.
18. **Markovien :** La connaissance du passé du processus n’apporte pas d’information supplémentaire à la prédiction du futur si le présent est connu.
19. **Taxon :** C’est une entité conceptuelle qui est censée regrouper tous les organismes vivants possédant en commun certains caractères taxinomiques bien définis soit des espèces, des populations, des individus ou des gènes.

Annexe 2 : Protocole d'extraction des bulins

Les mollusques sont disséqués pour récupérer leur pied dans du PBS (pH = 7,4). Le pied de chaque échantillon est rincé deux fois avec du PBS dans un tube Eppendorf. Le second lavage se fait sous agitation pendant 30 min afin d'éliminer toute trace d'alcool.
L'ADN a été extrait à l'aide du Kit QiAamp DNA Mini Kit (Qiagen® Courtaboeuf, France) en suivant les indications du fournisseur du Kit. Elle se fait en quatre étapes :

Lyse des échantillons :

Les pieds des mollusques ont été lysés dans un mélange contenant 20 µL de protéinase et de 180 µL d'ATL (Tissue Lysis Buffer), et incubés à 56 °C pendant la nuit jusqu'à la lyse complet des masses molles. Le lysat est ensuite mélangé à l'aide d'un vortex pendant 15 sec et centrifugé pendant 1 min à 8000 tours/min. puis on a ajouté 200 L d'AL (Lysis Buffer), et on incubé les tubes dans un bain-marie à 70 °C pendant 10 min.

Précipitation du lysat à l'éthanol :

Les tubes ont été ensuite mélangés pendant 15 sec et centrifugés pendant 1 min à 8000 tours/min. Puis on a ajouté 200 µL d'éthanol à 100 °C, et on a soumis l'ensemble à une nouvelle centrifugation à 8000 tours/min pendant 1 min. Le mélange est transféré ensuite dans une colonne de filtration (QiaAmp), et le contenu du tube est ensuite centrifugé à 8000 tours/min pendant 1 min.

Lavages :

Puis on a ajouté 500 µL de tampon AW1 (Washer Buffer 1) dans la colonne et on a centrifugé le mélange à 8000 tours/min pendant 1 min, et le culot a été jete. Puis un autre lavage a été effectué avec 500 µL de tampon AW2 (Washer Buffer 2), et suit par une nouvelle centrifugation à 14000 µL pendant 3 min pour éliminer les traces de tampon résiduel.

Elution de l'ADN :

L'ADN purifiée est placée dans un nouveau tube collecteur puis élué en ajoutant 200 µL d'AE (Elution Buffer), pendant 5 min, et ensuite on a procédé à une centrifugation finale à 8000 tours/min pendant 1 min. La concentration de l'ADN a été dose par spectrophotométrie UV à 260 nm.

Annexe 3 : Phylogénie des bulins

- Les amorces utilisées pour l'étude phylogénétique des bulins.

Amorces	Séquence d'amorce	Sens et anti-sens	Source
Cytochrome c oxidase 1			
CO1 (LCI490)	5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'	Sens	(Folmer et al., 1994)
CO2 (HCO2198)	5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'	Anti-sens	
Asmit 1 (ATI)	5'-TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT-3'	Sens	(Bowles et al., 1992)
Asmit 2 (AT2)	5'-TAA AGA AAG AAC ATA ATG AAA ATG-3'	Anti-sens	
ETTS1	5'- TGC TTA AGT TCA GCG GGT -3'	Sens	(Kane and Rollinson, 1994)
ETTS2	5'- TAA CAA GGT TTC CGT AGG TGA A -3'	anti	
Small Subunit rRNA (SSU)			
18SBaso3F	5'-GTG CTC TTC NCT GAG GGT CC-3'	Forward	(Jørgensen et al., 2011)
18SBaso9R	5'-TAC GGA AGC CTT GTT ACG A-3'	Reverse	
Large Subunit rRNA (LSU)			
Baso2600F	5'-GGA ATC CGA CTG TCT AAT TAA AAC-3'	Forward	(Jørgensen et al., 2008)
Baso3600R	5'-CRG ATG GAT GGT AGC YTC GCA CC-3'	Reverse	

- Le programme de thermocycleur pour le Cox 1 (2 Amorces)

Etapes	temps	température
Dénaturation initiale	5 min	94 ºC
Dénaturation	10 sec	95 ºC
Hybridation	30 sec	40ºC
Elongation	1 min	72 ºC
	cycle à 3 étapes (38 x)	
Elongation finale	10 min	72 ºC

- **Le programme de thermocycleur pour 18 S et 28S**

Etapes	temps	température
Dénaturation initiale	5 min	94 ºC
Dénaturation	10 sec	95 ºC
Hybridation	30 sec	55ºC
Elongation	1 min	72 ºC
	cycle à 3 étapes (35 x)	
Elongation finale	10 min	72 ºC

- **Le programme de thermocycleur pour ITS**

Etapes	temps	température
Dénaturation initiale	5 min	94 ºC
Dénaturation	15 sec	95 ºC
Hybridation	30 sec	58ºC
Elongation	90 sec	72 ºC
	cycle à 3 étapes (35 x)	
Elongation finale	10 min	72 ºC

Annexe 4 : Étude de la structure génétique de *B. truncatus* en Égypte

- **Les amorces utilisées pour l'étude génétique de *B. truncatus* (Jarne et al., 1994).**

Amorces	Température d'hybridation	Séquences
Bt1	50° C	6-Fam CGTGGGGACTGTTTACTTTAC CCCCCTAAAAGTTTGGTCTAG
Bt4	57° C	6-Fam CAATCTTGTATCTATAATCCG CCACTCCAGTAAGAAACAAAC
Bt6	50-55° C	Hex- GAACTCGGTCTATCCACC CTGCACATTAGGGATCA
Bt12	52° C	6-Fam TGAAACATGTTTTACGATTG ACATACGGCTAACAATTTGTATTAC
Bt13	59° C	6- Fam CACAAGATGGACAGGTACCACATGG CAAGTTTACAATTGCCTTGCATTTC
Bt23	50° C	Hex CACAAGATGGACAGGTACCACATGG CAAGTTTACAATTGCCTTGCATTTC

- **Le programme de thermocycleur**

Etapes	temps	température
Dénaturation initiale	5 min	94 ºC
	cycle à 3 étapes (30 x)	
Dénaturation	30 sec	94 ºC
Hybridation	90 sec	59ºC —› 49ºC (diminution de 2ºC /5 cycles)
Elongation	30 sec	72 ºC
	cycle à 3 étapes (20 x)	
Elongation finale	10 min	72 ºC