

Bulinus globosus et B. truncatus (Gastropoda : Planorbidae) : variabilité génétique et implications dans la transmission de Schistosoma haematobium au Cameroun

Félicité Djuikwo-Teukeng

▶ **To cite this version:**

Félicité Djuikwo-Teukeng. Bulinus globosus et B. truncatus (Gastropoda : Planorbidae) : variabilité génétique et implications dans la transmission de Schistosoma haematobium au Cameroun. Santé publique et épidémiologie. Université de Limoges, 2011. Français. NNT : 2011LIMO310H . tel-01288710

HAL Id: tel-01288710
https://unilim.hal.science/tel-01288710

Submitted on 15 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.

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE « SCIENCES POUR L'ENVIRONNEMENT » (ED 523)

N° [1]

THÈSE

Préparée en cotutelle avec

L'UNIVERSITE DE YAOUNDE I- CAMEROUN

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES
FACULTE DES SCIENCES

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

et le Doctorat/PhD de l'Université de Yaoundé I

Spécialité : **Parasitologie**

Présentée et soutenue publiquement par

Félicité Flore Djuikwo Nouboué, Epouse Teukeng

Le 07 janvier 2011

Bulinus globosus et *B. truncatus* (Gastropoda : Planorbidae) : variabilité génétique et implications dans la transmission de *Schistosoma haematobium* au Cameroun

Sous la direction de : Monsieur Gilles Dreyfuss, Professeur,
Monsieur Albert Samé- Ekobo, Professeur
et
Monsieur Flobert Njiokou, Maîtres de Conférences

Composition du Jury :

Mme Marie-Laure Dardé	Professeur, CHU Limoges (France)	Présidente
M. Koffi Adoubryn	Maitre de Conférences Agrégé, Université de Bouaké (Côte-d'Ivoire)	Rapporteur
M. Jerôme Dépaquit	Professeur, Université de Reims (France)	Rapporteur
M. Gilles Dreyfuss	Professeur, Université de Limoges (France)	Directeur de thèse
M. Albert- Samè Ekobo	Professeur, CHU Yaoundé (Cameroun)	Directeur de thèse
M. Flobert Njiokou	Maitre de Conférences, Université de Yaoundé I(Cameroun)	Directeur de thèse
M. Bertrand Courtioux	Maitre de Conférences, Université de Limoges (France)	Examinateur

Année 2011

"Un homme sans objectif est comme un navire sans gouvernail"

Thomas Carlyle

Dédicace

A mes enfants, Kevin, Boris et Daniella,

A mon époux, Roger,

Qui ont enduré avec moi ces longs mois d'absence.

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés en cotutelle sous la direction :

- d'une part, de M. le Professeur Albert Samé Ekobo (Laboratoire de Parasitologie, du Centre Hospitalier Universitaire de Yaoundé) et de M. le Professeur Flobert Njiokou (Laboratoire de Biologie Générale, Faculté des Sciences) de l'Université de Yaoundé I (Cameroun),

- d'autre part, de M. le Professeur Gilles Dreyfuss (Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges).

Ces recherches ont bénéficié de plusieurs subventions du Conseil Régional du Limousin (France).

Je tiens tout d'abord à remercier mes co-directeurs de thèse :

- M. le Professeur Albert Samè Ekobo pour m'avoir initié à la parasitologie et accepté de diriger cette thèse. Ses connaissances sur les parasitoses en général et les schistosomoses en particulier de même que les discussions constructives que j'ai eues avec lui ont été d'un grand apport dans ce travail.

- M. le Professeur Flobert Njiokou pour m'avoir attribué ce sujet de thèse. Ses conseils et Ses encouragements ont suscité en moi un intérêt pour les études de génétique des populations sur les Gastéropodes d'eau douce. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude, en particulier pour le rôle précieux qu'il a joué lors de la publication du premier article de ce travail.

- M. le Professeur Gilles Dreyfuss, dont les qualités humaines et professionnelles m'ont marquées. Qu'il reçoive l'expression de mes remerciements sincères pour l'accueil que j'ai reçu dans son laboratoire, pour la confiance qu'il m'a accordée, pour son soutien et pour ses conseils précieux qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je remercie sincèrement tous les membres de mon jury. Je suis heureuse et fière de pouvoir leur présenter mes travaux de thèse :

- Mme le Professeur Marie-Laure Dardé de l'université de Limoges. Je suis très sensible à l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider ce jury. Qu'elle veuille accepter l'expression de mon profond respect.

- M. le Professeur Koffi Adoubryn de l'université de Bouaké (Côte d'Ivoire). Je le remercie sincèrement d'avoir accepté d'être l'un des rapporteurs de ce travail. Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

- M. le Professeur Jérôme Dépaquit de l'université de Reims. Je suis très sensible à l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail.

- M. le Docteur Bertrand Courtioux. J'ai passé deux années enrichissantes à ses côtés et je lui dis merci pour toutes les discussions fructueuses que j'ai eues à son contact et pour sa grande disponibilité.

J'adresse également mes remerciements à :

- M. le Professeur Pierre-Marie Preux de la Faculté de Médecine de Limoges pour l'accueil chaleureux que j'ai eu au sein de l'équipe EA 3174 « Neuro-parasitologie et Neuroépidémiologie tropicale ».

- M. le Docteur Thierry de Meeûs, de l'Institut pour la Recherche et le Développement (UMR 177, Montpellier). Je lui exprime ma gratitude pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée dans l'analyse des données sur les microsatellites et la rédaction de l'article sur *Bulinus truncatus.*

- Mme le Docteur Anne Blondeau Da Costa pour son aide précieuse dans les analyses statistiques.

- Mme le Docteur Cook–Moreau pour ses commentaires sur la version anglaise de mes articles.

- Mme le Docteur Marie Claire Baclet de l'unité de séquençage.

- M. le Professeur Thomas Njiné, pour les conseils qu'il n'a cessés de me donner durant toutes ces années.

- M. le Docteur Daniel Ajzenberg, pour ses conseils et les discussions que nous avons eues à maintes reprises dans l'interprétation de mes résultats.

- M. le Docteur Champlain Djieto pour ses encouragements et ses conseils qu'il m'a apportés durant ces années.

M. le Docteur Gustave Simo de L'université de Dschang pour son aide dans l'initiation à l'outil moléculaire

- M. le Docteur Daniel Rondelaud. Ses remarques, Ses corrections et sa rigueur dans le travail m'ont permis de me dépasser et de produire le présent mémoire. Je lui suis reconnaissante.

- M. le Docteur Philippe Vignoles pour sa disponibilité.

- Tous les membres de l'équipe EA 3174 sans oublier les sympathiques secrétaires (Elisabeth, Nicole, Pascale et Valérie).

Que M. le Recteur de l'Université de Yaoundé I et M. le Doyen de la Faculté des Sciences reçoivent l'expression de ma sincère reconnaissance pour avoir facilité la procédure de mon inscription en thèse en cotutelle entre notre Université et celle de Limoges.

Je dis aussi un grand merci à M. le Professeur Charles-Félix Bilong Bilong, Chef du Département de Biologie et de Physiologie Animales à la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, pour la célérité dont il a fait preuve et la rigueur qu'il a apportée dans le traitement des affaires académiques au niveau du département.

Mes remerciements vont également à l'ensemble du corps enseignant du Département de Biologie et de Physiologie Animales de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, pour la formation solide que j'ai reçue.

Il m'est également agréable de pouvoir remercier les personnes (scientifiques ou non) qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à la réalisation de ce travail :

- Le service de la scolarité à la Faculté de Pharmacie de Limoges, en particulier Mesdames Brulatout et Subileau et Mademoiselle Mathilde Leconte de l'école doctorale pour toutes les informations que vous m'avez données avec beaucoup de sourires.

- Mes amis du quatrième étage de la Faculté de Médecine de l'Université de Limoges : Aurélien Mercier pour l'aide précieuse et l'initiation à l'utilisation des marqueurs génétiques ; Laurent Mardivirin, Florentina Rafael, Luce Perrine Yemadje, Zhou Zhou, de même que ceux du sous-sol : Henri Bonnabau, Maëlenn Guerchet, Mouss Noël Parïso, sans oublier Marie-Claude Lise au deuxième.

J'adresse également un merci spécial à ma précieuse collaboratrice Mlle le Docteur Nkengazong Lucia, de l'université de Yaoundé I pour l'aide dans la collecte des échantillons.

Un merci spécial :

- Aux personnes qui ont partagé mon quotidien durant ces années de thèse, notamment Sylvie Delebassée, Gaëlle Gaine, Martine Gatet et Roselyne Mouzet.

- Aux étudiants de Master 2 avec lesquels j'ai travaillé durant ces deux années : Patrick Abuiboro, Yanick Bangui, Fred Collinet, Doudou Diouf, Imène Guellouz, Ryma Machou, Jennifer Pagano et Patrick Kadjeu.

- A Gislain Madiba, mon ami de toujours qui m'a fortement encouragée à passer une seconde thèse. Merci pour ton soutien.

Merci infiniment à vous : Olivier Ngassa, Rémy Tadonléke, Jean-Jacques Dikongé, Serge et Yvonne Mpacko, Françoise Essome, Claude Lonstsi, Joseph Kemmegne, Aline Assona, Christine Suajuan, Soeur Martine Zébe, Godwin Tatah, Marieta Soupi, Félicité Hermann et aux familles Duval et Wandji pour leur soutien moral.

Un merci particulier à Gabriel Pathalé pour la disponibilité et l'aide précieuse dans la collecte des échantillons.

J'adresse une pensée particulière à ma famille, à ma belle-famille et à tous mes amis de Limoges qui ont été présents à mes côtés dans tous les moments importants.

Un merci chaleureux à tous ceux qui viendront à la soutenance. Je serai heureuse et fière de partager cet instant avec eux.

Résumé :

Les schistosomoses constituent encore un problème de santé publique au Cameroun. La forme urinaire due à *S. haematobium* est la plus répandue et est transmise à l'homme par des mollusques hôtes intermédiaires dont les plus importants sont *Bulinus truncatus* et *B. globosus*. Pour tenter d'expliquer la diversité observée dans le fonctionnement des foyers de schistosomoses urinaires, une étude de la structure génétique des populations de *B. truncatus* et de *B. globosus* a été menée en utilisant le polymorphisme de plusieurs loci microsatellites.

Dans les populations de *B. truncatus,* la diversité génétique à certains loci est relativement élevée mais aucun hétérozygote n'a été observé, expliqué probablement par un taux d'autofécondation très élevé. Une forte structuration génétique a été observée entre les populations, pouvant résulter des actions combinées de l'autofécondation, de la dérive génétique et d'un faible taux de migration.

Dans les populations de *B. globosus*, le niveau de variabilité est plus faible mais certains loci ont une diversité génétique élevée. On note la présence des hétérozygotes mais en proportion insuffisante si bien que toutes les populations sont en déséquilibre de Hardy-Weinberg. Une corrélation positive et significative est observée entre les distances géographiques et génétiques si bien que les paires de populations éloignées sont structurées alors que les paires rapprochées ne le sont pas.

La structuration des populations, forte chez *B. truncatus* et moyenne chez *B. globosus* a pu être à l'origine d'évolutions différentielles des populations de bulins, pouvant expliquer la diversité observée dans les schémas de transmission de la schistosomose urinaire dans les foyers de cette endémie au Cameroun.

Mots clés : Schistosomose urinaire- *Bulinus truncatus*- *Bulinus globosus*-microsatellites-structure génétique- *Schistosoma haematobium.*

Abstract

Schistosomiasis is still a public health problem in Cameroon. Urinary form caused by S. haematobium is the most widespread and is transmitted to humans by snails which serve as intermediate host *Bulinus truncatus* and *B. globosus* being the most important. In an attempt to explain the observed diversity in the functioning of urinary schistosomiasis foci, a genetic study *of B. truncatus* and *B. globosus* population's structure was conducted using microsatellite markers.

In *B. truncatus* populations, genetic diversity at some loci is relatively high but no heterozygotes were observed, probably due to a very high rate of self-fertilization. A strong genetic structure was observed between populations, it may results from the combined actions of self-fertilization, genetic drift, and low migration rate.

In *B*. globosus populations, the level of variability is lower, but some loci have a high genetic diversity. Heterozygotes are present, but in law proportion so that all populations are in Hardy-Weinberg disequilibrium. A significant positive correlation was observed between geographic and genetic distances. While the distant population's pairs are structured, the close ones are not.

The level of population structure is high in *B. truncatus* and average in *B. globosus*. This could be at the origin of the differential development in *Bulinus* populations and may explain the observed diversity in patterns of urinary schistosomiasis transmission in the endemic foci in Cameroon.

Keywords: urinary schistosomiasis, *Bulinus truncatus*, *Bulinus globosus*, microsatellites, *Schistosoma haematobium*-genetic structure.

Sommaire

Remerciements 1
Résumé : 5
Abstract 6
Sommaire 7
Table des Figures 9
Liste des tableaux 10
Liste des abréviations 12
Introduction générale 13
CHAPITRE I : ETAT DES CONNAISSANCES 17
I-1-Généralités sur les bulins 18
I-1-1- La systématique de *Bulinus sp.* 18
I-1-2- La bio-écologie de *B. globosus* et de *B. truncatus* 20
I-1-3- L'appareil reproducteur 21
I-2- Les schistosomes 21
I-2-1- Données générales sur les bilharzioses humaines 21
I-2-2- Schistosoma haematobium 26
I-2-3- La bilharziose urinaire au Cameroun 33
I-2-4- La bilharziose urinaire 36
I-3- Les bulins et leur variabilité génétique 38
I-3-1- Généralités 38
I-3-2- Les systèmes de reproduction 40
I-3-3- Un modèle de référence en génétique des populations : Le modèle de Hardy-Weinberg 41
I-3-4- Les méthodes pour mesurer le flux de gènes 41
I-3-5- Les marqueurs 43
I-3-6- Problématique 47
CHAPITRE II : SITES D'ETUDE, MATERIEL ET METHODES 51
II-1- Les sites d'échantillonnage de *B. truncatus* 52
II-1-1- Barombi-kotto 52
II-1-2- Bertoua 52
II-1-3- Dschang 52

II-1-4- Loum 52
II-1-5- Kékem 55
II-1-6- Mokolo 55
II-1-7- N'Gaoundéré 55
II-2- Les sites de récolte pour *B. globosus* 55
II-2-1- Moutourwa 55
II-2-2- Yagoua 56
II-2-3- Toukou 56
II-2-4- Les villages en amont du barrage de Lagdo 56
II-3- Matériel biologique 59
II-4-Méthodologie 59
II-4-1- Partie biologique 59
II-4-2- Partie génétique 59
II-4-3- Analyse des données 65
CHAPITRE III : RESULTATS 67
III-1- Structure génétique des populations de *B. truncatus* 68
III-1-1- Description de la variabilité génétique 68
III-1-2- Structure génétique des populations et estimation du nombre de migrants 70
III-2- Structure génétique des populations de *B. globosus* 76
III-2-1- Description de la diversité génétique 76
III-2-2- Structure génétique des populations et estimation du nombre de migrants 78
CHAPITRE IV : DISCUSSION- CONCLUSION PERSPECTIVES 85
IV-1- Synthèse 86
IV-2- Discussion 87
IV-2-1- *Bulinus truncatus* 87
VI -2-2- *Bulinus globosus* 90
VI-3- Conclusions générales et perspectives 96
Références bibliographiques 98
ANNEXES 110
Annexe 1 : Glossaire 111
Annexe 2 : Photos de gel d'agarose, de polyacrilamide et d'analyse des fragments 113
Annexe 3: Article 1 115
Annexe 4 : Article 2 116

Table des Figures

		Page
Figure 1 :	La systématique des bulins africains	19
Figure 2 :	L'appareil reproducteur des bulins	22
Figure 3 :	La carte de répartition de la bilharziose urinaire dans le monde	24
Figure 4 :	Le cycle de la bilharziose urinaire	27
Figure 5 :	la dermatite cercarienne	29
Figure 6	Les urines avec hématurie	30
Figure 7	Les différentes zones écologiques du Cameroun	35
Figure 8	La carte de répartition de la bilharziose urinaire au Cameroun	37
Figure 9	Les sites de récolte des échantillons de mollusques	54
Figure 10	La présentation des différents sites en amont du barrage de Lagdo.	57
Figure 11	La droite de régression de la distance de la diversité génétique des échantillons *B. truncatus* en fonction du logarithme népérien de la distance géographique entre les sites de récolte	72
Figure 12	L'arbre de divergence des échantillons de *B. truncatus* récoltés en septembre-octobre 2009	75
Figure 13	La droite de régression de la distance de la diversité génétique des populations de *B. globosus* en fonction du logarithme népérien de la distance géographique entre les sites de récolte	81
Figure 14	Le dendrogramme des échantillons de *B. globosus* récoltés en octobre 2009	82
Figure 15 :	La carte satellitaire des différents points de récoltes de *B. globosus*	83

Liste des tableaux

Tableau I :	La distribution géographique des bilharzioses	25
Tableau II :	Les marqueurs génétiques, biochimiques et moléculaires utilisés dans la caractérisation des bulins par différents auteurs africains	49
Tableau III :	Les caractéristiques physiques des localités étudiées	53
Tableau IV :	La date de récolte et le nombre de mollusques utilisés pour l'étude de la structure génétique	58
Tableau V :	Les amorces utilisées pour *B. truncatus*	61
Tableau VI :	Les amorces utilisées pour *B. globosus*	62
Tableau VII :	Le polymorphisme des loci chez les populations de *B. truncatus*	68
Tableau VIII :	Les paramètres décrivant la variabilité génétique des loci étudiés à l'intérieur des populations de *B. globosus* du Cameroun	69
Tableau I X :	Les valeurs de F_{ST}, de la probabilité de signification, des distances géographiques du nombre de migrants entre les paires d'échantillons de *B. truncatus*	70
Tableau X :	La représentation des valeurs de F_{ST} entre les paires d'échantillons de *B. truncatus* récoltés en juillet-octobre 2009 et leur degré de signification.	71
Tableau XI :	L'estimation moyenne de la N_em à partir des résultats de MLNe	74
Tableau XII :	Le polymorphisme des loci chez les populations de *B. globosus*	76
Tableau XIII :	Les paramètres décrivant la variabilité génétique des loci étudiés à l'intérieur des populations de *B. globosus* du Cameroun	77
Tableau XIV :	Les paramètres d'étude de la variabilité génétique intra populationnelle chez *B. globosus* du Cameroun	78
Tableau XV :	Les valeurs de F_{ST}, de la probabilité de signification, des distances géographiques du nombre de migrants entre les paires d'échantillons de *B. truncatus*	79

Tableau XVI : La représentation des valeurs de F_{ST} entre les paires d'échantillons de *B. globosus* récoltés en octobre 2009 et leur degré de signification 80

Tableau XVII : L'estimation temporelle de la taille effective de trois populations de *B. globosus.* 84

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AE : Tampon d'élution (Elution Buffer)

AL: Tampon de lyse (Lysis Buffer).

APS : Persulfate d'ammonium

ATL : Tampon de lyse tissulaire (Tissue Lysis Buffer)

AW1 : Tampon de lavage 1 (Washer Buffer 1).

AW2 : Tampon de lavage 2 (Washer Buffer 2)

BET : Bromure d'éthidium.

DNTP : Mélange des quatre désoxyribonucléotides triphosphate, dATP (désoxy adénine triphosphate), dCTP (désoxy cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy guanine tri-phosphate), dTTP (désoxy thymine tri-phosphate)

GPS : Global position system

mM : Micromolaire

MSA : Microsatellite analyzer

Pb : Paire de bases

PBS : Tampon phosphate salin **(**phosphate buffered saline).

POP : Performance Optimized Polymer

TBE : Tampon de migration d'électrophorèse (Tris, Borate, EDTA).

UV : Ultra-violets

µL : Microlitre

Introduction générale

Les relations hôtes-parasites sont des interactions durables marquées par une coévolution entre les deux entités. En effet, elles sont d'un grand intérêt car tous les êtres vivants y sont impliqués soit en tant que hôtes, soit en tant que parasites. De même, elles permettent de mieux comprendre certaines problématiques :

- *i)* en biologie évolutive, elles peuvent entraîner des phénomènes de spéciation (Jarne et Théron, 2001).

- *ii)* En écologie, car elles favorisent la compréhension des processus de compétition et d'exclusion ainsi que le maintien de la diversité spécifique (Pedersen et Fenton, 2007). Par conséquent, elles permettent une meilleure compréhension du succès ou de l'échec dans les programmes d'éradication des maladies parasitaires (Rondelaud *et al.* 2000).

Une des relations hôtes-parasites les plus étudiées est celle du couple Mollusques-Trématodes. En effet, elle est caractérisée par une grande spécificité car le Trématode a besoin du mollusque pour réaliser une partie ou la totalité de son cycle de vie (Combes, 1991). Cependant, plusieurs facteurs de l'écologie du mollusque comme ceux qui influencent sa capacité à survivre, le système de reproduction, la migration, la dépression de consanguinité et l'hétérozygotie peuvent agir sur la survie du trématode (Andrews, 1999 ; Puurtinen *et al.,* 2004).

Nous nous sommes intéressés dans cette thèse au couple : *Bulinus sp*. (Gastropoda : Planorbidae) / *Schistosoma haematobium* (Trematoda : Schistosomatidae) responsable de la bilharziose urinaire.

Les schistosomes sont des endoparasites responsables d'importants dommages chez l'Homme. Les maladies qu'ils provoquent sont classées en second après le paludisme, notamment dans les pays tropicaux où elles constituent un véritable problème de santé publique. Elles sont endémiques dans 76 pays avec 600 millions de personnes exposées et plus de 200 millions parasitées (Chitsulo *et al.,* 2000). La mortalité due aux bilharzioses est estimée à 200 000 personnes environ par an (Organisation mondiale de la santé, 2002). Il existe cinq espèces de schistosomes parasitant l'homme. Cependant, seules trois d'entre elles

sont rencontrées en Afrique, à savoir *Schistosoma haematobium, S. intercalatum* et *S. mansoni*. Elles sont transmises à l'homme par des mollusques gastéropodes d'eau douce (bulins) de la famille des Planorbidae.

Parmi ces trois espèces, *S. haematobium* est celle qui est la plus répandue dans le monde, avec 112 millions de personnes infectées dont 80 millions sous sa forme morbide et 150 000 décès par an (The partnership for parasite control, 2002). C'est une parasitose à cycle dixène qui fait intervenir deux hôtes obligatoires, l'un définitif (un vertébré) et l'autre intermédiaire (un mollusque du genre *Bulinus*).

Les études réalisées sur la compatibilité entre les mollusques hôtes et les schistosomes à œuf à éperon terminal ont mis en évidence une forte variabilité entre les différentes populations de bulins (Frandsen, 1979 ; Southgate *et al.,* 1985 ; Vera *et al*., 1990). De même, l'existence de populations de *S. haematobium,* adaptées à une espèce de bulin, a été confirmée aussi bien par les études expérimentales sur la compatibilité entre les deux partenaires que par les enquêtes malacologiques (Vera *et al.,* 1990 ; Djuikwo-Teukeng, 2005).

Au Cameroun, la bilharziose est une endémie parasitaire importante. Brooker *et al.,* (2000) estiment à environ 1,7 millions le nombre de personnes infectées. Les trois formes de schistosomoses humaines y sont représentées de façon inégale :

- la bilharziose intestinale due a *S. mansoni* très répandue en zone tropicale, et est transmise par deux hôtes intermédiaires : *Biomphalaria pfeifferi* Krauss, 1848 et *Biomphalaria camerunensis* Boettger, 1941 ;

- la bilharziose rectale, due à *S. intercalatum,* très localisée en zone équatoriale et dont l'hôte intermédiaire est *Bulinus forskalii* Ehrenberg, 1831 ;

- la bilharziose urinaire dont l'agent est *S. haematobium*, est la forme la plus ancienne et la plus répandue aussi bien en zone équatoriale qu'en zone tropicale avec plus d'un million de cas (Brooker *et al.,* 2000).

Quatre mollusques hôtes intermédiaires assurent la transmission de cette dernière forme : *i) Bulinus truncatus* Audouin, 1827 que l'on retrouve aussi bien en zone équatoriale que tropicale (Greer *et al.,* 1990), *ii) Bulinus globosus* Morelet, 1866 et *Bulinus senegalensis* Müller, 1781, plus fréquents en zone tropicale, et *iii) Bulinus camerunensis* Mandahl-Barth, 1957 qui vit dans deux lacs de cratère en zone équatoriale (Barombi Kotto et Debunscha).

Des foyers mixtes de *S. haematobium* et *S. intercalatum* ont été décrits dans la région de Loum (Sougathe *et al*., 1982). De même que des foyers mixtes de *S. intercalatum* et de *S. mansoni* ont été découverts à Kinging Ndjabi et à Nkolmebanga (Ratard et Greer, 1991).

La bilharziose urinaire est représentée de façon inégale dans toutes les provinces du Cameroun (Brooker *et al.,* 2000). De nombreuses études ont mis en évidence un fonctionnement hétérogène des différents foyers, notamment :

- les enquêtes épidémiologiques réalisées chez l'homme révèlent que la prévalence varie selon les provinces et les catégories socioprofessionnelles. Elle est, en particulier, assez élevée chez les cultivateurs et les écoliers (Ratard *et al.,* 1990 ; Brooker *et al.,* 2000).
- La transmission est assurée par quatre espèces de bulins (Greer *et al.*, 1990). En plus des fluctuations qui existent dans le taux de l'infestation naturelle par *S. haematobium* chez ces quatre bulins, des études récentes ont montré qu'il existait aussi des différences dans leur sensibilité à l'infestation expérimentale (Njiokou *et al.,* 2004 ; Djuikwo-Teukeng, 2005).

Il en résulte de nombreuses questions sur l'origine de cette hétérogénéité. Celles-ci sont à rechercher aussi bien dans la variabilité génétique du parasite que dans celle du mollusque hôte ou encore celle du vertébré.

Plusieurs marqueurs ont déjà été utilisés pour étudier cette hétérogénéité au Cameroun. Les marqueurs morphologiques et anatomiques ont été utiles pour identifier les espèces de bulins (Samè Ekobo, 1984) mais ils se sont révélés peu discriminants lorsque des études intraspécifiques ont été réalisées. Les isoenzymes (Mimpfoundi, 1991) et les marqueurs biologiques comme la compatibilité mollusque/schistosome (Njiokou *et al.,* 2004 ; Djuikwo-Teukeng, 2005) ont montré un polymorphisme relativement faible chez *B. globosus* et *B. truncatus,* ce qui ne permet pas d'expliquer leur variabilité génétique. Une meilleure caractérisation génétique aussi bien des populations de mollusques hôtes que des souches parasitaires est donc importante pour comprendre ces interactions afin de réduire, si possible, la morbidité causée par ces parasites.

Des marqueurs plus polymorphes ont été utilisés pour étudier la structure génétique de populations animales. C'est le cas des microsatellites qui sont des séquences d'ADN d'une à cinq paires de bases répétées en tandem, très polymorphes et largement distribuées dans le génome (Macedo *et al.,* 2001). Ils ont permis de décrire la structure génétique des

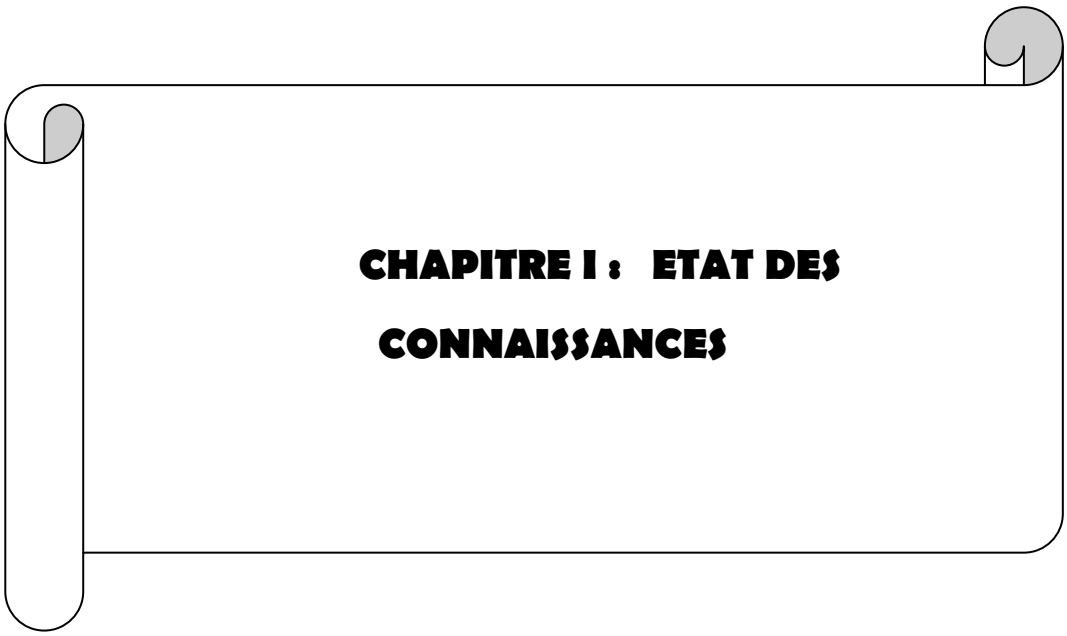
schistosomes (Shrivastava *et al.,* 2005 ; Criscoine et Blouin, 2006) et des mollusques hôtes comme *B. forskalii* (Gow *et al.,* 2004) et *Galba truncatula* (Meunier *et al.,* 2004). Ils ont été utilisés chez les *B. truncatus* de Côte d'Ivoire et du Niger (Viard *et al.,* 1996) et chez les *B. globosus* du Zimbabwe (Wilkinson *et al.,* 2007), ce qui a montré l'existence d'un polymorphisme bien plus élevé que celui qui avait été observé avec les isoenzymes. Aucune étude génétique par les microsatellites n'avait encore été réalisée sur les *B. globosus* et les *B. truncatus* du Cameroun.

L'objectif principal de ce travail est de mettre en évidence les relations entre la structure génétique des bulins hôtes intermédiaires et l'hétérogénéité du fonctionnement des foyers de schistosomose urinaire au Cameroun. Il s'agit spécifiquement de :

- Analyser la diversité et la structure génétiques à l'intérieur et entre les populations de *B. truncatus* originaires de plusieurs zones biogéographiques

- Déterminer la diversité et la structure génétiques à l'intérieur et entre les populations de *B. globosus* en zone tropicale au Nord du Cameroun

- Analyser les implications de la structure génétique sur la transmission des schistosomoses.



CHAPITRE I : ETAT DES CONNAISSANCES

I-1-Généralités sur les bulins

I-1-1- La systématique de *Bulinus sp.*

Le genre *Bulinus* représente le groupe de gastéropodes d'eau douce le plus fréquent en Afrique (Brown, 1994). Ils sont d'un grand intérêt car ils sont les hôtes intermédiaires de la bilharziose, parasitose qui touche plus particulièrement les populations d'agriculteurs et de pêcheurs. Les plus fréquentes sont *B. truncatus* Audouin, 1827 et *B. globosus* Morelet, 1806.

Bulinus truncatus et *B. globosus* appartiennent à l'embranchement des Mollusca, à la classe des Gastropoda, à la sous-classe des Pulmonata, à la superfamille des Planorboidea, à l'ordre des Basommatophora, à la famille des Planorbidae et à la sous-famille des Bulininae.

La famille des Planorbidae est l'une des familles les plus importantes sur le plan médical. Les espèces de ce groupe sont caractérisées par des coquilles discoïdes, senestres et parfois globuleuses. Les tentacules sont longs, filiformes et cylindriques. La structure du système pénien est très variable. Ils possèdent une pseudo-branchie bien vascularisée sur le coté gauche. Leur hémolymphe contient de l'hémoglobine à l'origine de la couleur rouge de leur sang (Brown, 1994).

La sous-famille des Bulininae est caractérisée par une coquille senestre, ovoïde et globuleuse. Les 37 espèces du genre *Bulinus* (Doumenge *et al.,* 1987 ; Brown, 1994) ont été reparties en quatre groupes spécifiques (Fig. 1) suivant la ploïdie, à savoir le nombre de chromosomes (Jelnes, 1985), les allozymes (Biocca *et al.,* 1979 ; Jelnes, 1986) et les techniques plus récentes de biologie moléculaire (Stothard et Rollinson, 1997a).

- ✓ Le groupe *B. africanus* Krauss, 1848 : Ce sont les plus gros bulins. Ils sont caractérisés par la troncature et la courbure de la partie interne de leur coquille (Brown et Kristensen, 1993). C'est dans ce groupe que l'on trouve *B. globosus* (Fig. 1). Leur coquille est ovale, les spires sont modérément hautes et les plis columellaires bien développés plus ou moins tronqués. L'organe de copulation possède un petit pénis gainé plus court et plus étroit que la gaine du prépuce. Ce sont des hôtes intermédiaires de *Schistosoma haematobium*.

- ✓ Le groupe *B. truncatus /tropicus* : Leur taille est assez grande. La coquille est assez lisse et on ne note pas de troncature. Les espèces appartenant à ce groupe sont *B. truncatus*, *B. tropicus* Krauss, 1848 et *B. natalensis* Kuster, 1841. Elles assurent le développement larvaire de *S. haematobium* et de *S. bovis*.

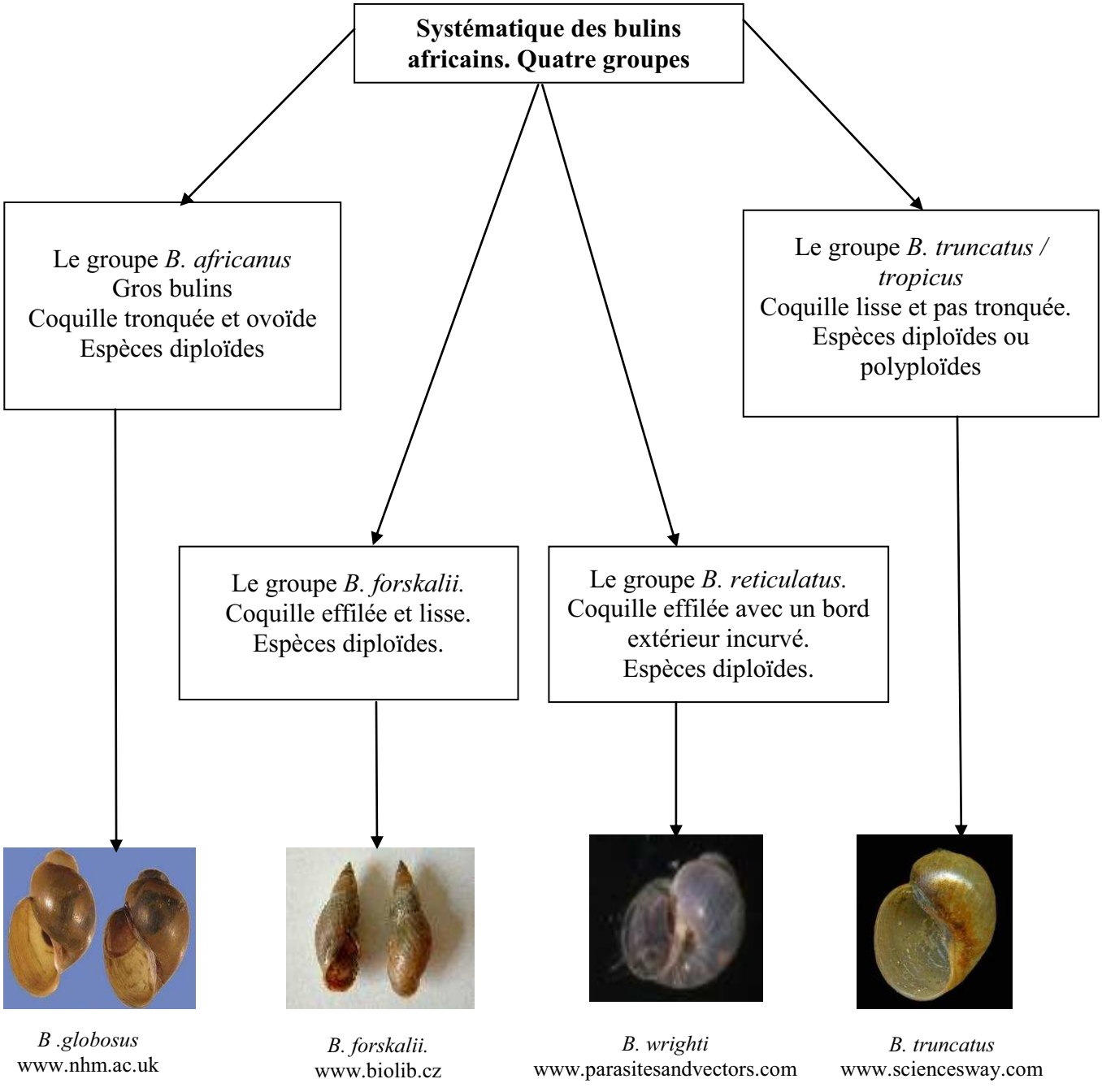


Figure 1 : La systématique des bulins africains (d'après Brown, 1994).

✓ Le groupe *B. forskalii* : La coquille est effilée et lisse. Ce groupe comprend *B. forskalii*, *B. senegalensis* et *B. camerunensis*. Les espèces de ce groupe assurent la transmission de *S. intercalatum*, de *S. haematobium* et de *S. bovis*.

✓ Le groupe *B. reticulatus* : Ce groupe comprend deux espèces. La première est *B. reticulatus* Brown, 1980 en Afrique de l'Est. La deuxième espèce est *B. wrighti.* C'est l'hôte intermédiaire de *S. haematobium* dans le sud du Yémen.

I-1-2- La bio-écologie de *B. globosus* et de *B. truncatus*

Les deux espèces de bulins ont une large distribution géographique. Leur aire de répartition recouvre l'Afrique et s'étend à toute la région méditerranéenne, le Proche-Orient, le Moyen-Orient et les îles de l'Océan indien (Madagascar et Maurice). Ils occupent divers types d'habitats comme les collections d'eau naturelles (lacs, mares résiduelles, mares temporaires) et les gîtes artificiels tels que les barrages et les étangs de pisciculture (Brown, 1994). Ce sont des espèces herbivores et ovipares. Ils effectuent leur ponte sur des pierres, des végétaux et les coquilles de leurs congénères. Ces mollusques pulmonés à coquille globuleuse et à ouverture senestre ont la possibilité, lorsque le gîte s'assèche, de s'enfoncer dans la boue humide et d'y rester en diapause jusqu'à la prochaine saison des pluies. Ce dernier point explique la présence des bulins et de la bilharziose uro-génitale dans les régions à longue saison sèche.

Cependant, ces deux espèces se distinguent par leur ploïdie (Jelnes, 1985) et leur système de reproduction (Tompa, 1984). La ploïdie d'une cellule caractérise le nombre de chromosomes. Le nombre chromosomique de base dans le groupe des bulins est de 2n = 36 (Brown, 1994). *B. truncatus* est une espèce tétraploïde et sa garniture chromosomique est de 2 n = 72 (Brown, 1994). L'observation des divalents à la méiose (Goldman *et al.,* 1983) ainsi que la ségrégation disomique des loci enzymatiques (Njiokou *et al.*, 1993b) montre qu'il s'agit d'une espèce allotétraploïde due à l'hybridation de deux génomes différents. Les deux génomes parentaux pourraient être ceux de *B. tropicus* et de *B. natalensis,* espèces appartenant au même groupe taxonomique que *B. truncatus*. Quant à *B. globosus,* c'est une espèce diploïde à 2n= 36 chromosomes (Brown, 1994).

I-1-3- L'appareil reproducteur

Chez *B. truncatus* et *B. globosus*, l'appareil reproducteur est bâti sur le plan général défini chez les Basommatophores par de Larambergue (1939) et Paraense (1955). Il est constitué de trois parties essentielles (Fig. 2, page suivante) :

- une partie hermaphrodite constituée *i)* de la gonade (ovotestis) qui fabrique les deux types de gamètes, *ii)* des vésicules séminales dans lesquelles est stocké l'autosperme, et *iii)* du canal hermaphrodite par lequel transitent l'autosperme, l'allosperme et les ovules.

- une partie femelle constituée *i)* de l'oviducte par lequel passent l'allosperme et les œufs fécondés, *ii)* des glandes femelles, *iii)* du vagin et *iv)* de la spermathèque.

- une partie mâle constituée *i)* du spermiducte par lequel transite l'autosperme, *ii)* de la prostate qui synthétise les fluides séminaux, *iii)* du vas deferens et *iv)* du complexe pénien.

Certains individus, dits aphalliques que l'on retrouve chez *B. truncatus* n'ont pas d'organe copulateur. Ceux-ci peuvent se reproduire aussi bien par autofécondation que par allofécondation en tant que femelles. Les individus euphalliques, quant à eux, peuvent se reproduire par autofécondation et par allofécondation par les voies mâles et femelles.

I-2- Les schistosomes

Les éléments à l'origine de cette synthèse proviennent de sites internet se rapportant à l'Organisation Mondiale de la Santé (Organisation Mondiale de la Santé, 2002, 2010). Certaines informations ont été vérifiées à l'aide des livres suivants : Gentilini et Duflo, 1986 ; Nozais *et al.*, 1996 ; Ripert, 1996.

I-2-1- Données générales sur les bilharzioses humaines

I-2-1-1- Les données épidémiologiques

Les bilharzioses humaines sont un véritable problème de santé publique surtout en zone tropicale et subtropicale, notamment :

- *i)* par leur fréquence car elles sont la seconde endémie parasitaire au monde après le paludisme et sont présentes dans 76 pays avec 600 millions de personnes exposées et 200 millions de personnes infectées dans le monde (85 % vivent en Afrique).

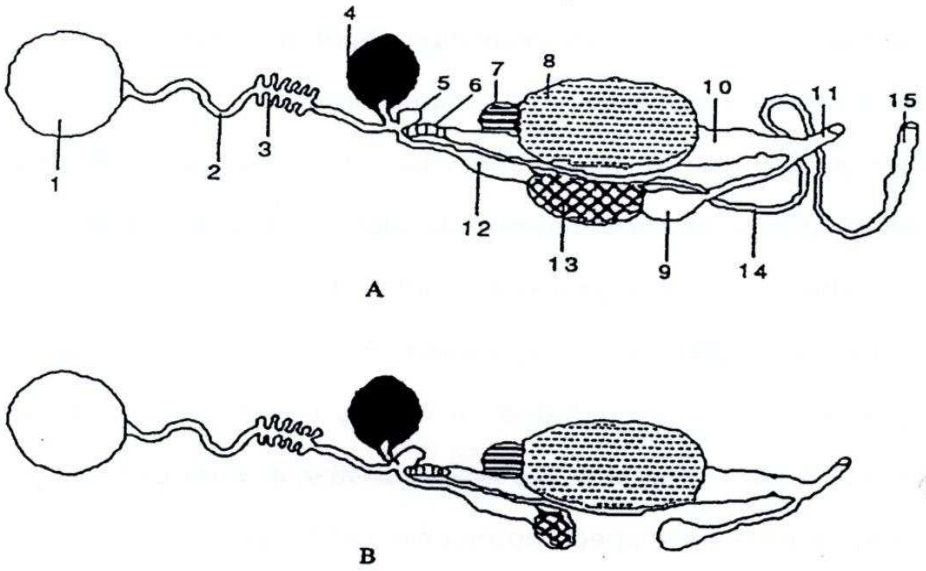


Figure 2 : Appareil reproducteur des bulins (d'après Duncan, 1975 ; Geraerts et Joosse, 1984). A. *Bulinus* normal ; B. *Bulinus* aphallique.

Partie hermaphrodite: 1. ovotestis, 2. spermiducte, 3. vésicules séminales.
Partie femelle : 4. glande de l'albumen, 5. carrefour, 6. pars contorta, 7. glande mucipare, 8. glande de l'oothèque, 9. spermathèque, 10. utérus, 11. vagin.
Partie mâle : 12. spermiducte, 13. prostate, 14. vas deferens, 15. complexe pénien.

- *ii)* par leur gravité avec de graves séquelles urogénitales et hépatospléniques (20 000 personnes par an dans le monde).

- *iii)* de plus, elles constituent un obstacle au développement car ce sont des affections liées à l'eau. Leur extension est favorisée par les projets hydro-agricoles (construction de barrage, irrigation) qui affectent particulièrement les agriculteurs et les enfants d'âge scolaire.

Elles sont causées par un Trématode de la famille des Schistosomatidae. Cette famille se distingue par son cycle dixène avec pénétration directe de la cercaire chez l'hôte définitif (un Vertébré). *Schistosoma* est l'un des genres les plus importants de cette famille.

Il existe principalement cinq espèces de schistosomes humains (Rollinson et Southgate, 1987 ; Brown, 1994). Ces espèces se distinguent par leur distribution géographique, les caractères morphologiques des parasites adultes, la forme des œufs, l'espèce de mollusque hôte intermédiaire, la prévalence des infestations (Southgate *et al.*, 1982), la chronobiologie des émissions cercariennes (Véra *et al.*, 1990 ; Mouchet *et al.,* 1992) et les marqueurs moléculaires (Zhang *et al.,* 2001).

I-2-1-2- La position systématique du genre *Schistosoma*

Ce genre appartient à l'embranchement des Plathelmintha (vers plats non segmentés), à la classe des Digenea (appareil digestif avec caecum), à l'ordre des Strigeaeta (ventouses ventrale et buccale) et à la famille des *Schistosomatidae* dont la particularité est de produire des cercaires libres. Il comporte dix-huit espèces dont cinq sont pathogènes chez l'homme.

I-2-1-3-Les schistosomes pathogènes chez l'homme

Les cinq espèces sont indiquées ci-dessous en fonction de leur fréquence par ordre décroissant :

- *S. haematobium*, (Bilharz, 1852) agent de la bilharziose uro-génitale. Cette maladie touche 54 pays d'Afrique, y compris Madagascar et l'île Maurice, et le Moyen-Orient. Elle est transmise par un Pulmoné du genre *Bulinus.* Cent douze millions de personnes seraient infectées par ce ver à travers le monde, dont 80 millions sous sa forme morbide, causant 150 000 décès par an. (Fig. 3)

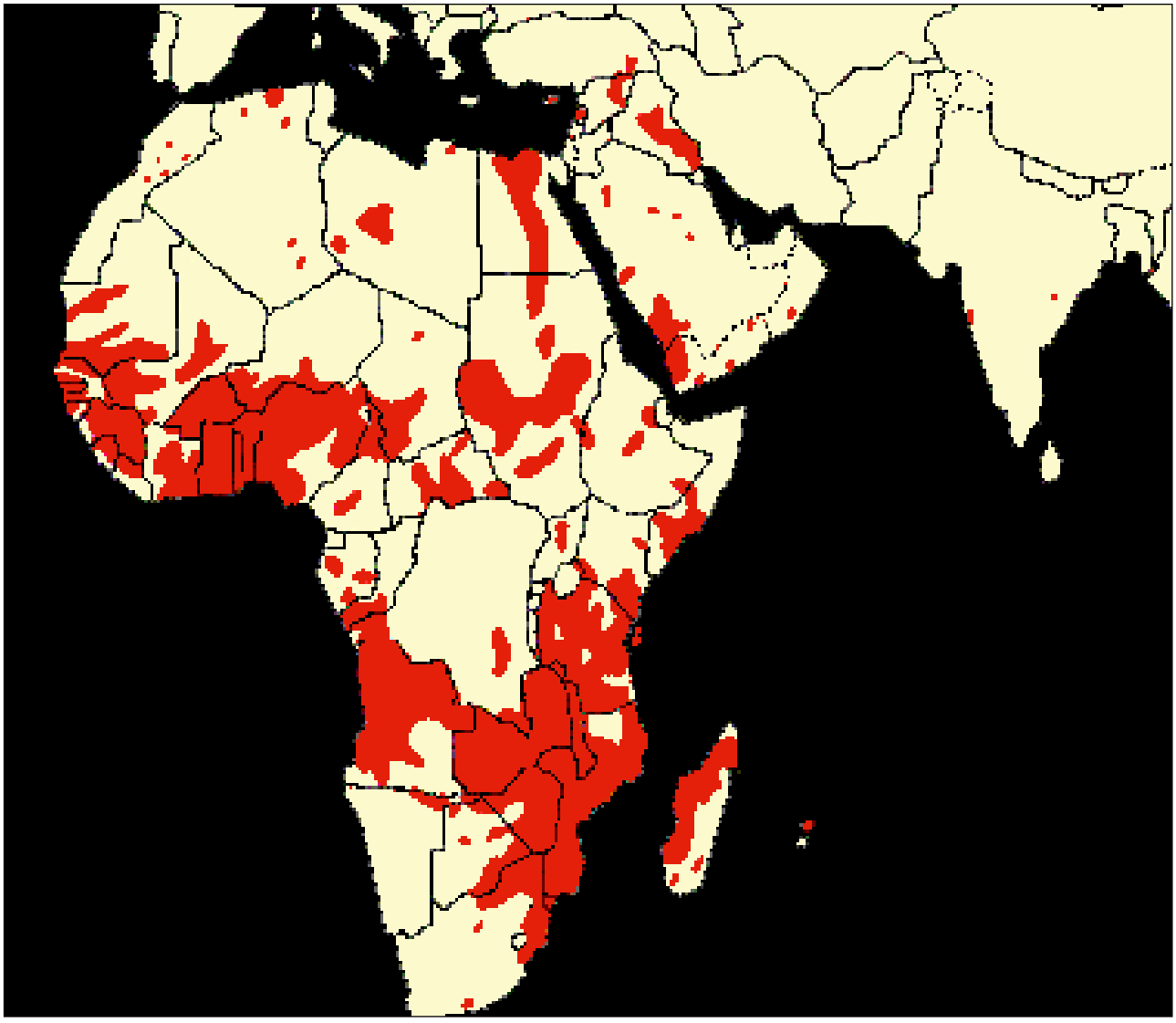


Figure 3 : Répartition de la bilharziose urinaire dans le monde (Organisation Mondiale de la Santé, 2010). Les pays où elle se rencontre sont représentés en couleur rouge.

➢ *S. mansoni* (Sambon, 1907), responsable de la bilharziose intestinale. Neuf millions de personnes souffrent de ses conséquences morbides, ce qui entraîne 130 000 décès chaque année. Elle a une aire de répartition très étendue qui couvre toute l'Afrique intertropicale, l'île de Madagascar, les pays situés autour de la Méditerranée orientale, les îles Caraïbes et l'Amérique du Sud. Son hôte intermédiaire principal est un Gastéropode Pulmoné du genre *Biomphalaria*.

➢ S. *japonicum* (Katsurada, 1904), responsable de la bilharziose hépatosplénique. Celle-ci sévit en Chine, en Corée, au Japon et aux Philippines. Son hôte intermédiaire est un Prosobranche du genre *Oncomelania.*

➢ *S. mekongi* (Voge, Bruckner et Bruce, 1978) est également un agent de la bilharziose intestinale avec des complications artério-veineuses. On retrouve cette parasitose le long du fleuve Mékong, au Sud du Laos, au Cambodge et en Thaïlande. Elle est transmise par un Prosobranche du genre *Neotricula.*

➢ *S. intercalatum* (Fischer, 1934) provoque la bilharziose rectale. Elle est très localisée au niveau des pays de l'Afrique Centrale (Cameroun, Congo, Gabon, Guinée Equatoriale, République Centrafricaine, Sao-Tomé-Et-Principe) de même qu'au Zaïre et au Nigeria. Elle est transmise par un Pulmoné du genre *Bulinus.*

Tableau I : Distribution géographique des bilharzioses
(Organisation Mondiale de la Santé, 2010)

Espèce	Distribution géographique
S. haematobium	Afrique noire, vallée du Nil, Moyen-Orient, Madagascar (ouest)
S. mansoni	Afrique (surtout à l'est et au sud), Proche-Orient, Madagascar (est), Amérique latine (Brésil, Venezuela), certaines îles des Antilles
S. japonicum	Chine, Philippines, Indonésie
S. mekongi	Cambodge, Laos
S. intercalatum	Afrique équatoriale

Notre travail de thèse a porté essentiellement sur l'espèce *S. haematobium* car elle est la plus répandue aussi bien dans le monde qu'au Cameroun.

I-2-2- Schistosoma haematobium

Ce parasite est responsable de la bilharziose urinaire. C'est une maladie hydrique très fréquente en zone tropicale. Le cycle de *S. haematobium* (Fig. 4) fait intervenir deux hôtes obligatoires, à savoir un vertébré chez lequel s'effectue la reproduction sexuée et un mollusque d'eau douce du genre *Bulinus* où se déroule la multiplication asexuée des larves. Les manifestations de la maladie dépendent de la phase de développement des parasites chez l'hôte définitif. Non traitée, cette parasitose peut être à l'origine de cancers de la vessie.

I-2-2-1- Le cycle biologique du parasite

a- Chez l'hôte définitif

La cercaire pénètre chez l'hôte définitif en se fixant au début sur la peau. Elle traverse ensuite les couches supérieures en quelques minutes à l'aide de sa ventouse antérieure munie d'épines (grâce à des mouvements vibratoires) et à la sécrétion d'enzymes protéolytiques par les glandes céphaliques. Au bout de 10 minutes, la pénétration est complète : la cercaire perd alors sa queue bifide et devient une schistosomule. Celle-ci quitte le derme et gagne la lumière d'une veine ou d'un vaisseau lymphatique pour arriver en quatre jours au cœur ou aux poumons grâce au flux sanguin. Elle accède ensuite aux veinules porte intra-hépatiques et y poursuit son développement jusqu'à sa différenciation en parasite adulte et l'acquisition de la maturité sexuelle (en trois semaines environ).

Les parasites adultes sont de couleur blanchâtre, à sexes séparés et ont un dimorphisme sexuel prononcé. Le mâle aplati mesure 10 à 15 mm de long sur 1 mm de large alors que la femelle est plus longue en mesurant 15 à 20 mm sur 1 mm. Le mâle possède un canal gynécophore dans lequel se loge la femelle. Leur durée de vie est de plusieurs années. Dans les veinules porte intra-hépatiques, les parasites adultes accouplés se déplacent à contre-courant vers les lieux de ponte.

La femelle quitte le mâle, s'engage dans les fines ramifications veineuses de la paroi vésicale et remonte jusqu'à la sous-muqueuse où elle commence sa ponte. Trois cents œufs en moyenne sont pondus par jour avant d'être disséminés dans divers organes internes, notamment la vessie où les vaisseaux sanguins se rétrécissent.

Ces œufs, dont la taille varie entre 120 et 150 µm sur 50 à 60 µm, sont ovoïdes, allongés et pourvus d'un éperon terminal de 15 µm. Environ 50 % des œufs produits percent, à l'aide d'enzymes lytiques, la paroi veineuse et les tissus péri-vasculaires pour atteindre la cavité vésicale et être disséminés dans la nature par le biais des urines.

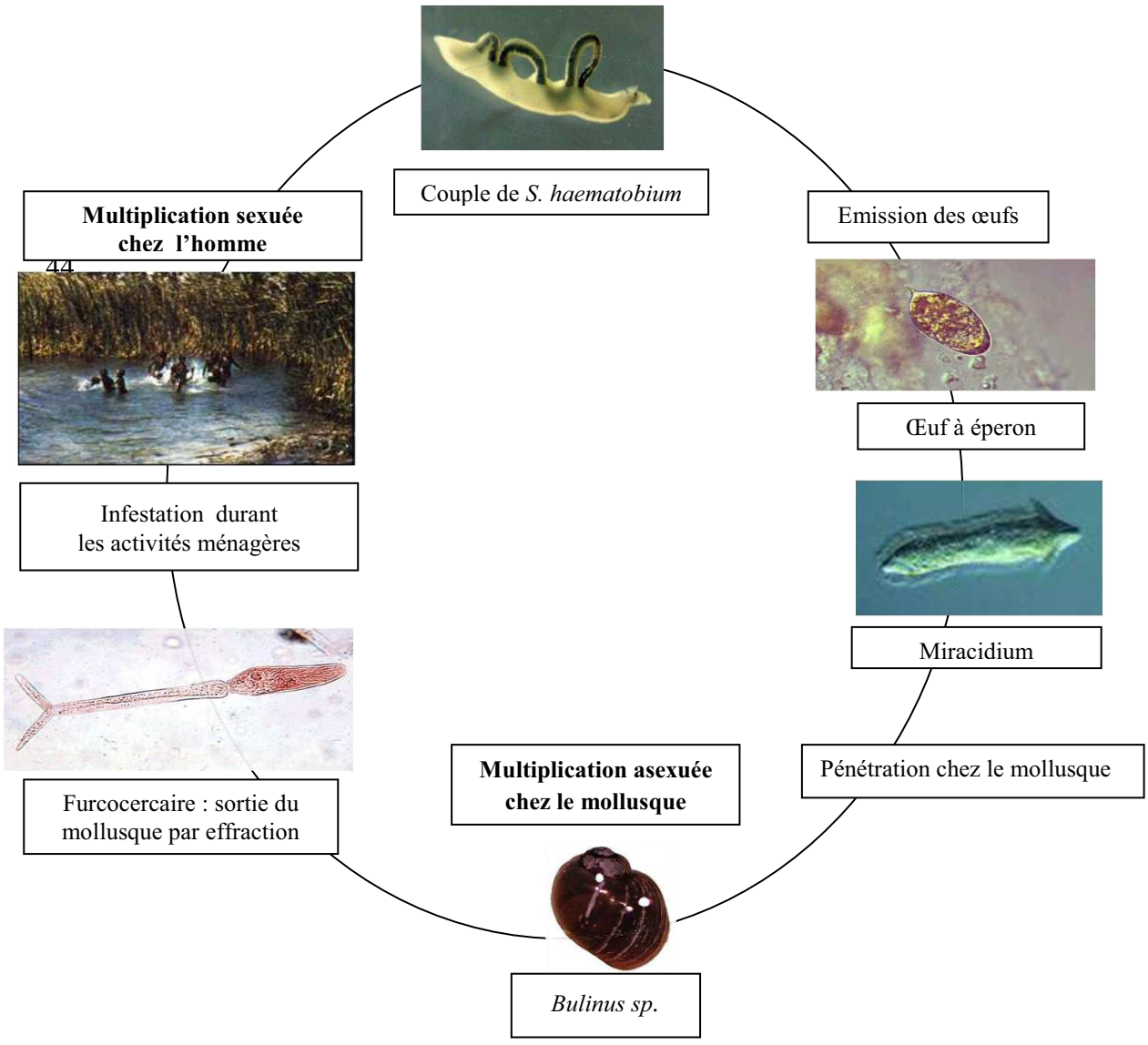


Figure 4: Cycle de la bilharziose urinaire. Original.

Le reste se trouve bloqué et est la cible d'une forte réaction inflammatoire désignée sous le terme de "réaction granulomateuse". En effet, les œufs sont responsables de la plupart des lésions anatomo-pathologiques et induisent la formation d'un granulome bilharzien et, plus tard, d'un bilharziome (accumulation locale de granulomes). L'ensemble évolue vers la sclérose et la calcification (Gentilini et Duflo, 1986).

b- Chez l'hôte intermédiaire

Les œufs sont éliminés par les urines. Ils vont éclore dans l'eau douce si les conditions favorables (température à 25°-30° C, ensoleillement, pH neutre) sont réunies et libèrent chacun une petite larve ciliée et mobile, appelée miracidium. Ce dernier est long de 150 à 180 μm et son corps est recouvert de nombreuses rangées de cils, ce qui lui permet de se déplacer très rapidement dans l'eau. Le miracidium assure la phase de dispersion du parasite. Il ne dispose que de 24 heures au maximum pour se fixer à cet hôte intermédiaire très spécifique et y entrer par un mécanisme enzymatique.

La pénétration dans le mollusque se fait à travers le pied ou le manteau. A l'intérieur du mollusque, le miracidium perd son revêtement et se transforme en sporocyste de premier ordre au voisinage du lieu de pénétration. Ces sporocystes mères donnent, par reproduction asexuée, de nombreux sporocystes de deuxième ordre qui sont des larves vermiformes de 150 à 250 μm. Celles-ci sont transportées par l'hémolymphe du mollusque jusqu'à la glande digestive où elles forment d'autres larves, appelées cercaires : c'est la deuxième forme de dispersion.

La cercaire est une larve ciliée, longue de 400 à 600 μm et possède un corps et une queue bifide, d'où l'appellation de "furcocercaire"**.** Un seul miracidium peut être à l'origine de plusieurs milliers de cercaires. L'émission de celles-ci à partir des mollusques est périodique et dépend de la lumière : entre 9 h et 14 h (Jourdane, 1982). Elles quittent le bulin par effraction et nagent à la recherche de l'hôte définitif. Elles ne disposent que de quelques heures pour trouver leur cible. L'homme s'infecte lors de ses activités dans l'eau lorsque celle-ci est contaminée par les parasites.

I-2-2-2- Les manifestations cliniques de la bilharziose urinaire

La transmission se fait lors des bains et des travaux ménagers (rivières, marigots) pendant les périodes chaudes de la journée entre 14 et 16 heures.

Les manifestations cliniques reflètent les stades de développement du parasite adulte et sont des réponses de l'hôte à des substances toxiques ou antigéniques provenant de ce dernier ou de ses œufs.

- La phase initiale ou d'infestation correspond au passage transcutané des cercaires et passe généralement inaperçue : c'est la dermatite cercarienne, caractérisée par une éruption d'érythèmes prurigineux de 1 mm de diamètre (Fig.5). Elle est souvent discrète, voire inapparente. Elle apparaît deux heures après le bain infestant et dure 1 à 2 jours.



Figure 5 : la dermatite cercarienne (www. univ-nantes.fr)

- La phase d'invasion ou de dissémination larvaire est due à la migration et à la transformation des schistosomules dans la circulation sanguine. Elle se caractérise par un état infectieux avec fièvre, allergies, céphalées, sueurs, toux et, parfois, des diarrhées sont fréquentes durant cette période. Ce syndrome peut être accompagné d'une hépato-splénomégalie. Elle dure environ 5 à 6 semaines et la recherche d'œufs dans les urines est négative.

• La phase d'état ou de focalisation viscérale est marquée par une hématurie (Fig. 6) due à la sortie des œufs dans les urines. A ce stade, la recherche des œufs dans les urines est positive.

Des complications peuvent survenir, notamment une cystite par surinfection bactérienne, des granulomes bilharziens au niveau de la muqueuse vésicale et peut-être à l'origine de cancers de la vessie. Parfois, l'embolisation des adultes dans une artériole pulmonaire ou dans les vaisseaux cérébraux et médullaires peut entraîner une bilharziose pulmonaire ou une bilharziose du système nerveux respectivement (Ibahioin *et al.,* 2004).

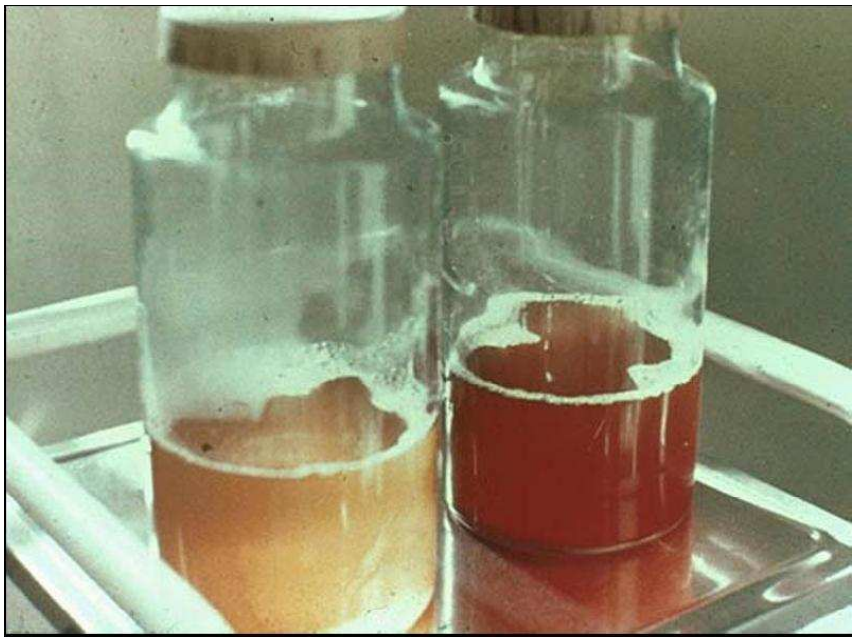


Figure 6 : Urines avec hématurie (couleur rouge) (www.mefanet.upol.cz)

I-2-2-3- Le diagnostic

Il existe plusieurs méthodes de diagnostic qui ne sont pas équivalentes.

- Le diagnostic d'orientation : il est basé sur la notion d'un séjour et de bains pris en eau douce dans une région d'endémie. Il consiste en un examen sanguin et l'hémogramme montre une hyperéosinophilie et une hyperleucocytose.

- Le diagnostic de présomption, quant à lui, est basé sur l'utilisation des bandelettes imprégnées de réactifs chimiques tels que Sangur-test® ou Hemastix® (Bayer). Cette méthode très pratique et adaptée aux enquêtes de masse permet de situer les niveaux

d'hématurie (faible, moyenne ou forte). La technique consiste à tremper pendant une seconde la zone réactive de la bandelette dans les urines. On l'égoutte, on attend 1 minute et on lit la bandelette en la tenant près de l'échelle colorimétrique (Mott *et al.,* 1983).

- Le diagnostic de certitude ou "diagnostic direct" : il permet la mise en évidence des œufs dans les urines (les œufs sont éliminés 2 à 3 mois après le bain infestant). Deux techniques sont utilisées :

- La technique de sédimentation : dix millilitres d'urine fraîche sont prélevés dans un tube conique en verre qu'on agite avant de le centrifuger. Ensuite, on récupère le culot à l'aide d'une pipette Pasteur flambée et l'on monte ce dernier entre lame et lamelle. Enfin, on recherche la présence des œufs au microscope (AdouBryn *et al.*, 1997).

- La technique de filtration (Plouvier *et al*., 1975) : cette technique nécessite des filtres en nylon, en polycarbonate ou en papier montés sur un porte-filtre Millipore Swinnex 13®, de diamètre variable. On prélève un échantillon de 10 mL d'urine à la seringue et on le passe à travers le filtre. Les filtres sont colorés au lugol et observés au microscope.

- Le diagnostic indirect : il s'applique aux formes chroniques de la bilharziose et repose sur la mise en évidence d'anticorps. Ces méthodes sont assez complexes à réaliser car elles nécessitent l'entretien du cycle parasitaire au laboratoire afin d'avoir des antigènes provenant d'organismes vivants. Cependant, il existe des kits de diagnostic indirect tels que les kits Hemaglutination et Elisa.

Comme la ponte ne débute que vers la sixième semaine après l'infestation de l'hôte définitif, aucun diagnostic parasitologique direct n'est possible en période d'invasion (Gentilini et Duflo, 1986).

I-2-2-4- Le contrôle de la maladie

Le Comité OMS de Lutte contre les Schistosomoses (Organisation Mondiale de la Santé, 1985) a adopté une stratégie mondiale de réduction de la morbidité due à cette maladie. Les indicateurs de succès font appel à des opérations de lutte dans le système des soins périphériques et dans les communautés pour augmenter les chances de succès et de pérennisation. Plusieurs méthodes de lutte peuvent être appliquées :

a- Le traitement médical

Le praziquantel (Biltricide®) est le seul médicament disponible, efficace sur toutes les formes de bilharziose. Il est actif sur les femelles et les schistosomules de moins de 15 jours. Il se présente sous forme de comprimés sécables de 600 mg. Il se prescrit à la posologie de 40 mg/kg en une seule prise orale. La recherche des œufs dans les excrétas doit se faire 3 à 12 mois après le traitement. Toutefois, des séquelles peuvent persister selon l'ancienneté et la gravité des lésions. Un traitement chirurgical peut être alors proposé, notamment en cas d'atteinte de l'urètre ou de la vessie.

b- Le contrôle et la prophylaxie

L'éducation sanitaire est le premier moyen. Des efforts importants sont à faire pour modifier les connaissances, les attitudes et les perceptions sur la transmission de la maladie, le diagnostic et la lutte contre la bilharziose dans les zones d'endémie. Pour ce faire, une éducation sanitaire des populations concernées est nécessaire. Elle doit notamment porter *i*) sur les comportements qui permettent de réduire le risque d'infestation en limitant les contacts entre l'homme et l'eau infestée, notamment, éviter de se baigner dans les eaux stagnantes, conseiller le port de bottes et gants dans les rizières et *ii*) sur l'introduction d'une hygiène fécale ou urinaire. Cependant, la diminution de la fréquence des contacts homme-eau passe par l'amélioration de la fourniture en eau saine réservée à l'usage domestique, par la multiplication des forages, des puits, des bornes-fontaines et par l'utilisation de l'eau courante dans les habitations.

La lutte chimique est basée essentiellement sur l'utilisation de molluscicides. Ceux-ci sont, soit d'origine chimique (Niclosamide, ou Bayluscide®), soit d'origine végétale tel que l'Endod. Pour être efficaces, ils doivent répondre à trois critères (Organisation Mondiale de la Santé, 1985), à savoir être dépourvus de toxicité vis-à-vis d'autres organismes aquatiques, ne pas déterminer des effets indésirables inacceptables et être conservés dans de bonnes conditions de stabilité.

La lutte biologique utilise des gastéropodes soient compétiteurs (Madsen, 1984), soient prédateurs (Pointier *et al.,* 1989) afin de pouvoir interrompre le cycle parasitaire par la destruction des principaux mollusques hôtes des schistosomes.

La lutte physique par différentes méthodes comme l'assèchement périodique des biotopes ou le nettoyage des cours d'eau.

Des essais vaccinaux contre la bilharziose urinaire sont en cours : vaccin Bilhvax en phase 3.

I-2-3- La bilharziose urinaire au Cameroun

La revue de cette maladie dans les diverses provinces du Cameroun ne peut être faite sans qu'une description des caractéristiques géographiques ne soit réalisée. C'est la raison pour laquelle nous présentons les principaux traits du Cameroun et les différentes zones écologiques dans les deux premiers paragraphes.

I-2-3-1- Les caractéristiques générales du pays

D'une superficie de 475 000 km^2, le Cameroun s'étire entre le 2^e et le 13^e degrés de latitude Nord d'une part, et entre le 8^e et le 16^e degrés de longitude Est d'autre part. De forme triangulaire haute de 1 200 km avec une base de 800 km, il est limité au nord par le Lac Tchad, au nord-est par la République du Tchad, au sud par la République du Congo, la République Gabonaise et la République de Guinée Équatoriale, à l'est par la République Centrafricaine et à l'ouest par la République Fédérale du Nigéria. Il est bordé au sud-ouest par l'Océan Atlantique sur une longueur de 364 km (Letouzey, 1985).

C'est un pays caractérisé par un relief assez contrasté. La dorsale camerounaise constituée par des massifs de l'Ouest et des hauts plateaux de l'Adamaoua, subdivise le pays en deux ensembles distincts :

- Le sud comprend le plateau sud-camerounais d'une altitude moyenne variant de 650 à 900 m. Le climat y est de type équatorial avec quatre saisons distinctes ;

- Le nord est caractérisé par de vastes plaines et pénéplaines qui s'étendent des hauts plateaux de l'Adamaoua aux rives du lac Tchad. Le climat y est de type tropical (soudano-sahélien à soudano-guinéen) et est caractérisé par l'alternance d'une saison des pluies et d'une saison sèche.

Le réseau hydrographique est essentiellement constitué de quatre grands ensembles en fonction des points d'aboutissement de cours d'eau : *i*) les fleuves qui se jettent dans le bassin du Congo comme la Sangha, le Dja, la Ngoko et la Kadéi, *ii*) ceux qui vont directement dans le golfe de Guinée comme la Sanaga, le Mungo, le Wouri, le Nkam, la Dibamba, le Nyong, la

Lokoundjé et la Lobé, *iii*) les tributaires du bassin du Niger que sont la Bénoué, le Kébi et le Faro, et *iv*) ceux qui se jettent dans le Lac Tchad comme le Logone**,** le Mbéré, le Chari et la Vina du Nord**.**

I-2-3-2- Les différentes zones écologiques

a- La zone soudano-sahélienne

Elle se rencontre au nord du pays entre le 8^{e} et le 13^{e} degrés de latitude nord, de l'Adamaoua au lac Tchad. Le climat est de type tropical sec. Elle est marquée par une pluviométrie moyenne variant de 500 à 1000 mm, répartie essentiellement sur quatre mois (juillet-octobre). Les températures moyennes annuelles sont voisines de 28° C. Le réseau hydrographique est constitué de rivières temporaires, appelés "mayos", de fleuves permanents comme la Bénoué et de nombreuses retenues d'eau comme les barrages de Lagdo et d'Ourou-Tada. Les formations végétales, que l'on y rencontre, sont des steppes à épineux**,** de vastes prairies périodiquement inondées, des savanes soudaniennes boisées et des forêts soudaniennes claires et sèches.

b-La zone soudano-soudanienne

Elle se situe entre le 4^{e} et le 8^{e} degrés de latitude nord. Elle couvre la province de l'Adamaoua et une partie des provinces de l'Est et du Centre. Le climat est de type tropical humide avec l'alternance d'une saison des pluies et d'une saison sèche de durée plus ou moins égale. Les températures moyennes oscillent entre 22° et 24° C. Sa végétation est essentiellement constituée de galeries forestières, de savanes d'altitude et de savanes basses**.**

c- La zone des hauts-plateaux de l'ouest et du nord-ouest

Cette zone, située entre le 5^{e} et le 7^{e} degrés de latitude nord, correspond aux provinces de l'Ouest et du Nord-ouest. Elle est marquée par un climat tropical montagneux avec une longue saison des pluies (mars-novembre) et une courte saison sèche de 2 à 4 mois. Les précipitations annuelles varient en moyenne selon le relief : de 1500 à 2 600 mm. La température moyenne annuelle est de l'ordre de 20° C. Les formations végétales sont essentiellement des forêts galeries et des forêts de raphia.

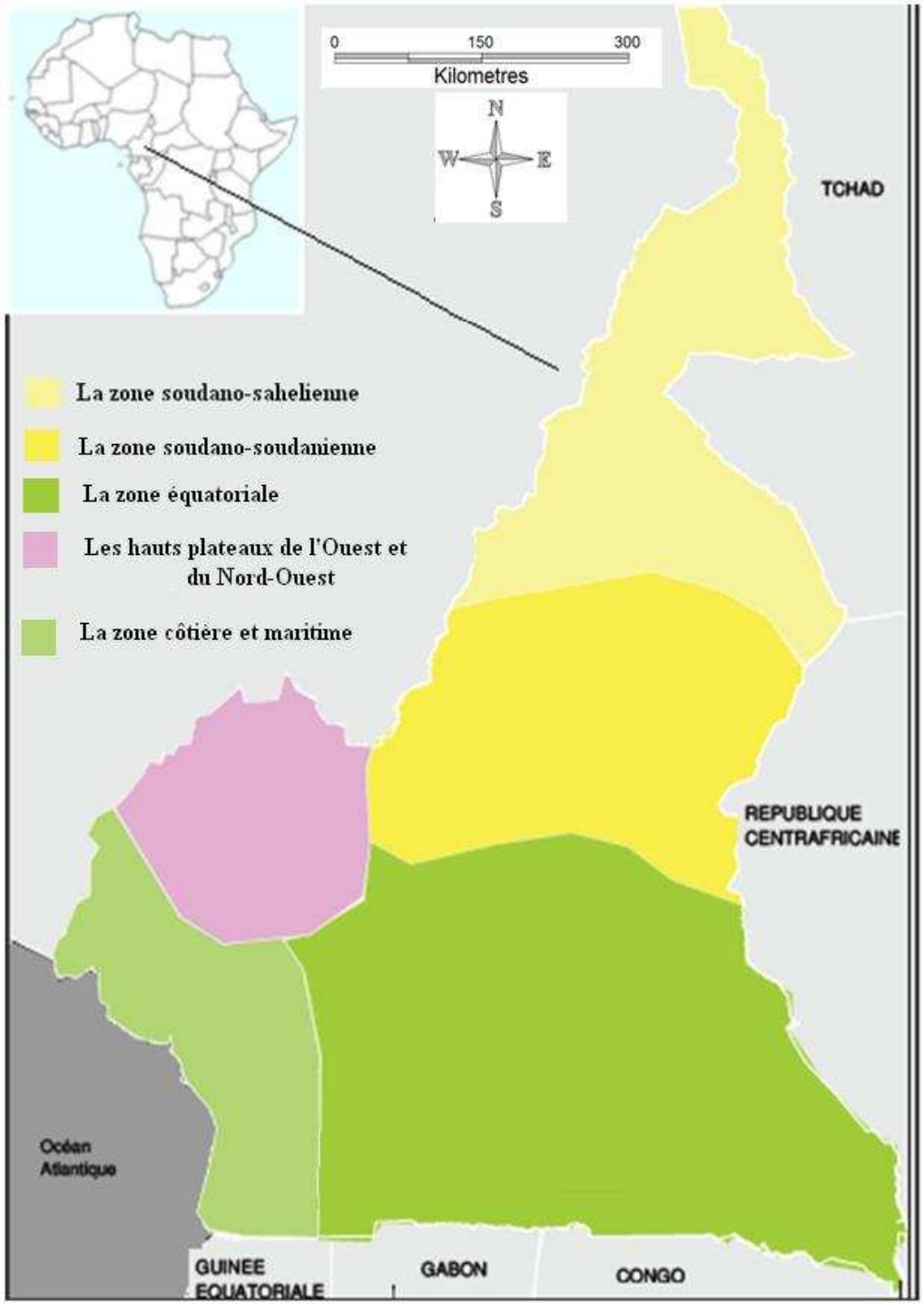


Figure 7 : Les différentes zones écologiques du Cameroun. (Division géographique du Ministère des affaires étrangères)

d- La zone côtière et maritime

Elle couvre les provinces du Littoral et du Sud-ouest. On y trouve de nombreux estuaires et des forêts de mangrove. Cette zone est soumise à un climat tropical très humide avec une saison de pluies intenses de mars à octobre et une saison sèche de novembre à février. Les précipitations moyennes se situent autour de 4000 mm par an avec un record de 11.000 mm au Mont Cameroun. Les températures moyennes sont, quant à elles, assez stables, de l'ordre de 25° C tandis que l'humidité relative se maintient à des valeurs supérieures à 70 % ou à 80 % pratiquement toute l'année.

e- La zone des forêts équatoriales

Elle s'étend entre le 2^{e} et le 4 ^{e} degré de latitude nord. Elle couvre une grande partie des provinces du Centre, du Sud et de l'Est. Elle est caractérisée par un climat équatorial avec deux saisons sèches alternant avec deux saisons de pluies : *i*) une petite saison sèche de juillet à août, *ii*) une grande saison des pluies de septembre à novembre, *iii*) une grande saison sèche de décembre à février, et *iv*) une petite saison de pluies de mi-mars à juin. La pluviométrie moyenne varie de 1 500 à 2 000 mm sur dix mois. La température moyenne annuelle est relativement constante : de 23° à 27° C. L'humidité relative est supérieure à 80 %. Le couvert végétal est constitué, d'une part, par la forêt dense sempervirente et, d'autre part, par la forêt dense humide semi décidue.

I-2-4- La bilharziose urinaire

C'est la plus répandue avec plus d'un million de personnes infectées (Brooker *et al.,* 2000). C'est la parasitose la plus ancienne car les deux premiers foyers ont été découverts en 1949 et 1951 (Delas et Mouchet, 1968, *dans* Doumenge *et al.*, 1987) dans la partie sud-ouest du pays avec une prévalence de 76 % chez les pêcheurs du lac Barombi Kotto et de 91 % chez ceux du lac Barombi Mbo. Un troisième foyer a été signalé en 1960 dans la province du Littoral à Loum (27,9 %), dans la province de l'Ouest à Kékem et dans la province du Nord avec une prévalence allant de 15 à 20 % (Delas et Mouchet, 1968, *dans* Doumenge *et al.*, 1987).

C'est un grand problème de santé publique, surtout dans les zones septentrionales. Une étude récente sur la répartition géographique de la bilharziose urinaire (Brooker *et al.,* 2000) montre que sous le climat tropical sahélien, le taux d'infestation est d'environ 80 % (Fig. 8, page suivante). La prévalence est faible dans l'Adamaoua (5 %).

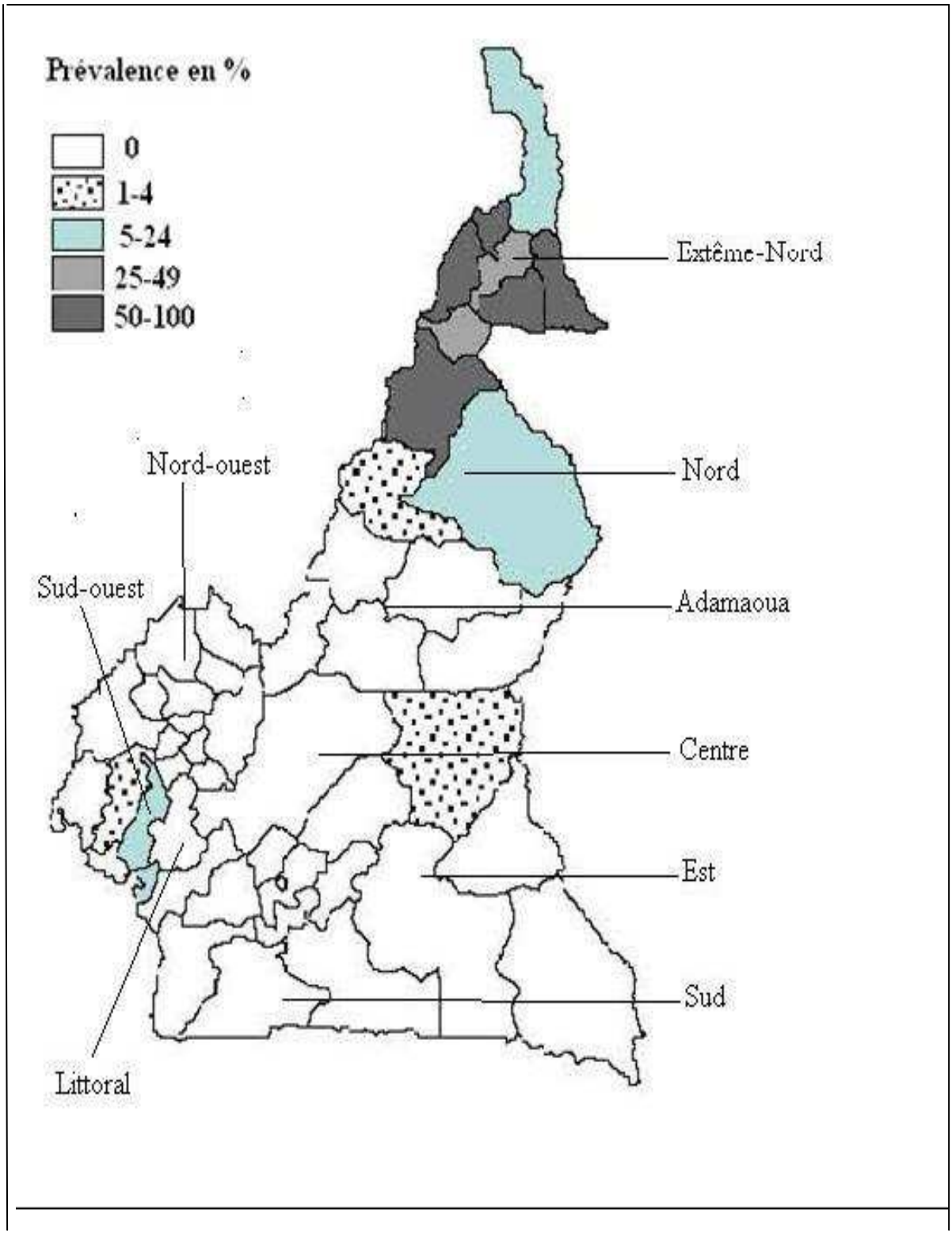


Figure 8 : Répartition de la bilharziose urinaire dans les différentes régions du Cameroun (Brooker *et al.,* 2000)

On note également d'importants foyers endémiques en zone équatoriale, notamment dans la province de l'Est (Bertoua, prévalence de 5 à 20 % : Brooker *et al*., 2000), dans la province du Littoral (Loum, 62,8 % : Tchuem Tchuente *et al*., 2003), dans le sud-ouest (Barombi-Kotto, 69,5 % : Nkengazong *et al*., 2009) et dans l'ouest (Kékem, de 1 à 4 % : Brooker *et al.,* 2000).

Au Cameroun, quatre mollusques hôtes potentiels assurent la transmission de *S. haematobium* :

- *B. truncatus* que l'on retrouve aussi bien en zone tropicale qu'en zone équatoriale. Cependant, il est plus présent dans cette dernière où il colonise les cours d'eau permanents ainsi que les étangs de pisciculture créés par l'homme. Ses habitats se rencontrent à une altitude variant entre 100 et 2 000 m. *B. truncatus* est l'hôte intermédiaire qui assure la transmission de *S. haematobium* dans la plupart des foyers (Greer *et al*., 1990).

- *B. globosus* est plus répandu en zone tropicale. Il colonise beaucoup plus les cours d'eau temporaires que les permanents. Sa distribution s'étend depuis le nord de Maroua jusqu'à N'Gaoundéré à une altitude variant de 150 à 1.000 m. En zone équatoriale, on note sa disparition en raison de l'anthropisation des sites (Yaoundé) ou de l'abandon (Bafia). C'est le principal hôte intermédiaire de *S. haematobium* dans la province de l'Extrême-Nord (Ratard *et al*., 1990).

- *B. senegalensis* est peu fréquent. On l'observe dans la zone tropicale où il colonise beaucoup plus les cours d'eau temporaires que permanents. Ses habitats se situent dans les régions où l'altitude varie de 150 à 1000 m.

- *B. camerunensis*, très localisé, est encore moins répandu. Il est présent au Cameroun à une altitude de 400 m sous un climat de type équatorial. On connaît deux localisations : les lacs de cratère de Barombi Kotto et de Debunscha où cette espèce est le principal hôte intermédiaire de *S. haematobium* (Greer *et al.*, 1990).

I-3- Les bulins et leur variabilité génétique

I-3-1- Généralités

La génétique des populations étudie l'évolution des fréquences alléliques sous l'effet des pressions sélectives (la mutation, la dérive, la migration et la sélection génétique d'après Hartl et Clark, 1997). Ceux-ci ne se déroulent pas de la même façon dans le temps et dans l'espace (Slatkin, 1985). La structure génétique des populations n'est pas uniquement modelée par l'action des pressions évolutives mais aussi par le système de reproduction.

La dérive génétique résulte des variations aléatoires des fréquences des allèles au sein des populations. Quant au flux de gènes, il est lié à toutes les formes de migration des gamètes, des individus ou de groupes d'individus d'une sous-population à une autre. Pendant que la dérive génétique contribue à la divergence entre les populations, la migration permet d'homogénéiser les fréquences alléliques entre les sous-populations (de Meeûs *et al.,* 2007***)***. Ces deux composantes sont influencées par des facteurs écologiques et évolutifs (Pollack, 1987 ; Slatkin, 1987). Quelques définitions en génétique des populations sont proposées en annexe 1

L'intérêt porté à l'étude de la structure génétique d'une population a augmenté au cours des dernières années en raison des points suivants :

- la nécessité d'élargir les connaissances sur la variation génétique des espèces "sauvages",

- son impact considérable sur le nombre de caractères liés à l'épidémiologie des maladies de même que sur la dynamique des foyers de transmission.

- la compréhension des mécanismes de transmission de la maladie en vue d'engager un programme de lutte biologique.

Les mollusques gastéropodes d'eau douce sont d'excellents modèles (Stadler et Jarne, 1997) pour étudier cette variabilité génétique et ceci pour plusieurs raisons :

- Ils sont largement distribués dans divers types d'habitats comme les canaux d'irrigation, les barrages de retenues, les rivières ou des mares naturelles. Dans ces gîtes, la disponibilité en eau varie dans le temps en raison des cycles climatiques saisonniers entraînant des goulots d'étranglement réguliers (Brown, 1994).

- Les bulins sont des organismes hermaphrodites pouvant se reproduire par autofécondation ou par allofécondation (Jarne et *al.,* 1991).

- Ce sont les hôtes intermédiaires principaux de *S. haematobium* (Brown, 1994). Cependant, malgré leur importance médicale, il y a relativement peu d'études sur leur biologie et la génétique de leurs populations.

I-3-2- Les systèmes de reproduction

Ce sont des facteurs déterminants majeurs de la valeur sélective surtout chez les organismes hermaphrodites (Jarne et Charlesworth, 1993 ; Charlesworth et Charlesworth 1999). Les systèmes de reproduction jouent un rôle fondamental dans la structuration spatiale et temporelle de la diversité génétique au sein et entre les populations (Holsinger, 2000). Tous les Pulmonés sont hermaphrodites (Duncan, 1975). Une des principales conséquences de l'hermaphrodisme est la possibilité pour ces individus de pratiquer deux types de reproduction, à savoir l'autofécondation et l'allofécondation (de Larambergue, 1939 ; Tompa, 1984).

L'autofécondation permet de se reproduire même en l'absence de partenaires sexuels. En effet, les jeunes individus encore vierges, arrivés à maturité sexuelle, déposent des pontes autofécondées. C'est un mécanisme de reproduction qui défavorise la diversité génotypique et affecte la capacité d'adaptation d'une espèce en augmentant le nombre de loci homozygotes (Tuan et Simões, 1998). L'autofécondation est le mode de reproduction le plus pratiqué chez *B. truncatus* (Jarne, 1991 ; Viard *et al*., 1996 ; Hamza *et al.*, 2005).

L'allofécondation est le mode de reproduction sexuée par fécondation croisée. Il se fait par copulation unilatérale chez les bulins. L'individu fertilisé peut jouer le rôle d'inséminateur juste après le premier appariement. Un même individu peut être fertilisé par plusieurs partenaires successivement. Plusieurs individus placés ensemble peuvent copuler en chaîne, les individus intermédiaires jouant le rôle de mâle vis-à-vis d'un partenaire et le rôle de femelle vis-à-vis d'un autre (Njiokou, 1992a). Les spermatozoïdes étrangers de partenaires multiples peuvent être stockés et restés viables plusieurs mois après la copulation (Rudolph et Bailey, 1985). L'avantage de la reproduction sexuée est de créer la diversité génétique par recombinaison (Maynard Smith, 1978 ; Paland et Lynch, 2006).

Chez *B. globosus*, l'analyse des systèmes de reproduction au laboratoire montre que l'allofécondation est le mode le plus courant (Rudolph, 1983 ; Jarne *et al.*, 1991), ce qui a été confirmé par l'étude du polymorphisme enzymatique (Jelnes, 1986 ; Njiokou *et al.*, 1992b).

Suivant le système de reproduction effectué, la transmission des gènes d'une génération à la suivante est très différente.

I-3-3- Un modèle de référence en génétique des populations : Le modèle de Hardy-Weinberg

L'équilibre de Hardy-Weinberg, encore appelé équilibre pancmitique, concerne les fréquences alléliques d'un gène pouvant s'exprimer sous forme de deux allèles A et B dans une population diploïde idéale. C'est le modèle théorique central de la génétique des populations. Une population est dite idéale quand elle est soumise aux conditions suivantes :

- *i)* est de taille infinie (c'est-à-dire très grande afin de minimiser les variations d'échantillonnage).

- *ii)* est pancmitique (les couples se forment au hasard) et leurs gamètes se rencontrent au hasard (pangamie).

- *iii)* ne doit pas y avoir de sélection, de mutation ou de migration et il n'y a pas de croisement entre les générations différentes. Tout écart observé par rapport à ce modèle peut être analysé en fonction des modèles théoriques élaborés et les facteurs influençant l'évolution des populations étudiées.

I-3-4- Les méthodes pour mesurer le flux de gènes

Deux types de méthodes sont généralement utilisés pour mesurer les flux de gènes et les migrations entre les populations. Ce sont :

I-3-4-1 La méthode directe

Elle est réalisée en observant la mobilité des individus et les flux migratoires. Elle a été appliquée sur les oiseaux (Nichols, 1996), mais également chez les mollusques d'eau douce (Woolhouse, 1988). La technique la plus utilisée est celle de la capture-marquage-recapture décrite par Lebreton *et al*. (1992). Les animaux sont capturés, marqués et repris de nombreuses fois par un échantillonnage répétitif. Ce modèle permet d'estimer la capacité de dispersion des individus dans les espèces étudiées. Cette méthode est très utilisée chez les oiseaux. Malheureusement, les mesures directes de la migration sont très difficiles et sont sujettes à des biais tels que la dispersion à de longues distances très difficile à observer.

I-3-4-*2* - Les méthodes indirectes.

En raison des problèmes évoqués ci-dessus, d'autres méthodes dites indirectes ont été développées. Elles utilisent les données de fréquence des gènes afin d'évaluer indirectement l'ampleur des flux de gènes dans les populations naturelles (Slatkin, 1985, 1987**)**. Cette méthode utilise des modèles mathématiques afin de rapprocher l'observation brute du flux de gènes**.**

La méthode la plus utilisée est celle de la F-statistiques mise au point par Sewal Wright, 1951, 1965). Elle décrit la répartition de la variabilité génétique dans une population subdivisée à partir des données issues de populations naturelles (Weir et Cockerham, 1984 ; Neigel, 2002). De plus, elle permet de mieux comprendre comment certains systèmes de reproduction influent sur la structuration et l'évolution de la diversité génétique des populations.

Son modèle considère une métapopulation composée par une infinité de sous-populations de taille égale à N. A chaque génération, une sous-population contient : (1-m) Nm individus résidents. Dans cette formule, m est le taux de migration et Nm le nombre d'individus provenant des autres sous-populations. Elle repose sur trois paramètres (F_{IS}, F_{ST} et F_{IT}).

- F_{ST} est un indice de diversification des populations. Cet indice prend les valeurs comprises entre 0 et 1 : la valeur 0 est obtenue lorsque les groupes sont identiques, c'est-à-dire lorsqu'ils ont les mêmes fréquences alléliques (pas de différenciation génétique). La valeur 1 est obtenue lorsque les fréquences alléliques aux loci étudiés diffèrent significativement entre les sous-populations. Ceci est attendu lorsque les sous-populations sont restées isolées entre elles pendant de longues périodes.

- F_{IS} mesure la consanguinité entre des individus, due à l'union aléatoire des gamètes au sein de chaque sous-population. Ces valeurs sont comprises entre -1 et + 1. Lorsque les gamètes s'unissent de façon aléatoire, Fis = 0. Quand Fis est négatif, il exprime un excès en hétérozygotes et quand il est positif, il exprime un déficit en hétérozygotes.

- F_{IT} mesure la consanguinité au niveau de toute la métapopulation. Les valeurs varient entre -1 et + 1. La valeur - 1 indique que tous les individus de toutes les sous-populations sont hétérozygotes pour les mêmes allèles et la valeur + 1 signifie que tous les individus sont homozygotes pour ces mêmes allèles.

-

Ces statistiques sont reliées entre elles par l'équation suivante (Wright, 1951) :

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})\,(1 - F_{ST})$$

- La différence entre F_{IS} et F_{IT}, encore appelée effet Wahlund, est due à une différence de fréquences alléliques entre les différentes populations.

Plusieurs estimateurs ont également été développés parmi lesquels la F_{ST} de Nei (1977) et ceux de Weir et Cockerham (1984) qui dépendent de la taille de l'échantillon.

La similarité génétique entre les individus ou les populations peut être déterminée en utilisant un certain nombre de techniques statistiques. La méthode classique pour quantifier les flux de gènes (F_{ST}) consiste en une estimation indirecte du nombre de migrants (Nm) échangés par génération entre les populations (Neigel, 1997) à partir de la formule suivante :

$$Nm = (1 - F_{ST}) / 4 \times F_{ST}$$

Elle permet d'évaluer si les paires de populations sont génétiquement différentes et de déterminer s'il existe une relation statistiquement significative entre les distances génétiques et la distance géographique.

Plusieurs marqueurs ont été utilisés afin d'étudier les flux de gènes entre les populations. On distingue deux grands groupes.

I-3-5- Les marqueurs

L'estimation du flux de gènes a été faite d'abord par l'électrophorèse enzymatique (Pasteur *et al.,* 1987). Les isoenzymes correspondent à différentes formes d'une même enzyme catalysant la même réaction, mais les propriétés physico-chimiques comme la charge électrique et la taille sont différentes. Leur analyse par électrophorèse montre que, pour chaque molécule de protéine entière, il existe différents états alléliques en fonction du nombre d'isoenzymes. Certains sont spécifiques d'un locus et sont appelés des allozymes. Les marqueurs enzymatiques présentent plusieurs avantages et des inconvénients (Murphy *et al*., 1990 ; Buth et Murphy, 1999).

Comme avantages, ils ont un pouvoir de discrimination plus élevé que les marqueurs morphologiques. Ils sont utilisés comme marqueurs pour les gènes qui les codent, ils sont neutres et ils peuvent être révélés dans plusieurs organes à différents stades de

développement. Toutefois, leurs inconvénients majeurs sont la faiblesse du nombre moyen d'allèles révélés et la variabilité génétique limitée aux loci codants. La technicité requise est relativement faible et le coût peu élevé.

Ils ont été utilisés pour caractériser les mollusques du genre *Bulinus* (Wright *et al.,* 1966) et pour étudier la structure de leurs populations (Jelnes,1979 ; Rollinson et Wright, 1984). Des travaux ont été réalisés sur des populations de *B. globosus* et *B. truncatus* en Côte-d'Ivoire et au Niger (Njiokou *et al.,* 1992a, 1993a, b), celles de *B. cernicus* en Mauritanie (Rollinson et Wright, 1984), celles de *B. truncatus* et *B. forskalii* au Cameroun (Mimpfoundi et Greer, 1990a, b). Elles ont permis de révéler un polymorphisme nul ou très faible.

I-3-5-1- Les marqueurs moléculaires

Un marqueur moléculaire est une séquence d'ADN polymorphique, dépendant d'un locus spécifique localisé à un endroit précis du génome. Les techniques issues de la biologie moléculaire permettent de rechercher les variations dans les séquences nucléotidiques de l'ADN grâce à la technique de la PCR mise au point par Mullis en 1985. Ce sont les marqueurs les plus couramment utilisés pour étudier la structure génétique des populations. Plusieurs marqueurs moléculaires ont été utilisés comme marqueurs génétiques des bulins d'Afrique parmi lesquels on peut citer :

a- Le polymorphisme de taille des fragments de restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism ou RFLP)

Cette technique consiste à scinder un ADN cible en plusieurs fragments par une ou plusieurs endonucléases (enzymes de restriction) spécifiques de certains sites de restriction. Le nombre de ces sites et leurs positions diffèrent en fonction de l'individu. On a donc un polymorphisme de longueur des fragments de restriction (Botstein *et al.,* 1980). Il est possible d'amplifier certains fragments régénérés par PCR, et on parle de PCR-RFLP. Cette méthode a été utilisée pour étudier la structure génétique des populations de *B. truncatus* à Madagascar (Stothard *et al,* 2001) ou celles du Sénégal (Sène *et al.,* 2004).

b- L'amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (Random Amplification of Polymorphic DNA ou RAPD)

Cette technique consiste à réaliser une amplification PCR du DNA génomique avec *i)* des amorces d'environ 10 paires de bases définies de façon aléatoire et *ii)* une

température d'hybridation très basse. Les bandes obtenues sont séparées sur gel d'agarose. C'est un marqueur polymorphe mais dominant. Cette technique a l'avantage d'être rapide avec un coût peu élevé (Rafalski et Tingey, 1993). Elle a été utilisée chez les bulins africains (Langand *et al*., 1993), chez les *B. globosus* du Zimbabwe (Davies *et al*., 1999), chez le groupe *B. africanus* au Zanzibar (Stothard et Rollinson, 1997b) et chez le groupe *B. forskalii* (Jones *et al*., 1997) et pour caractériser les populations du groupe *Africanus* du Kenya (Raahauge et Kristensen, 2000). C'est malheureusement une technique très peu reproductive.

c- Le polymorphisme nucléotidique simple (Single Nucleotide Polymorphisms ou SNP)

Ce sont des variations communes d'une seule base au niveau d'une séquence d'ADN entre les individus d'une même espèce. Ces variations sont très fréquentes. Environ 0,1 % de notre génome (soit 3 millions de paires de bases) varie d'un individu à l'autre. Ils affectent une seule paire de bases, soit par substitution (remplacement d'un nucléotide par un autre), soit par délétion ou insertion d'une base. Un des avantages majeurs des SNP est leur capacité à être typés de façon rapide et semi-automatique. La majorité des SNP n'ont que deux allèles. Ils ont été utilisés pour identifier les bulins de l'Afrique de l'Est (Stothard *et al.,* 2002).

d- Le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (Amplified Fragment-Length Polymorphism ou AFLP)

C'est une combinaison des RFLP et des RAPD. L'ADN est tout d'abord digéré par des enzymes de restriction, puis des adaptateurs seront fixés aux deux bouts des produits de digestion (Vos *et al.,* 1995). Une PCR est ensuite effectuée à l'aide d'amorces qui s'hybrident avec les adaptateurs et qui amplifient de façon sélective des fragments cibles (Hillis *et al*., 1996). Des études à l'aide de cette technique ont été faites sur les bulins africains (Rollinson *et al.,* 2001).

e- Les séquences répétées en tandem (Variable Number Tandem Repeat ou VNTR)

Il existe dans le génome de très nombreux organismes, des séquences nucléotidiques répétées en tandem les unes à la suite des autres. Le nombre de répétitions est extrêmement variable entre les individus, d'où leur nom de VNTR (Variable Number of Tandem Repeats).

Cette variation du nombre de répétitions est à l'origine d'un important polymorphisme dans les populations naturelles. On distingue deux grands types de séquences répétées:

- Les minisatellites : ce sont des répétitions en nombre ou des répétitions de motif ayant 10 à 60 paires de bases (Jeffreys *et al.,* 1985). Ils peuvent être détectés par RFLP en utilisant des enzymes de restriction qui coupent le génome un grand nombre de fois et permettent de révéler un polymorphisme de longueur de fragments par l'existence d'un nombre de répétitions qui diffère entre les individus, ce qui produit des fragments de tailles différentes.

- Les microsatellites : dans le génome de tous les organismes vivants, il existe des régions particulières, appelées microsatellites, constituées de répétitions de motifs ayant 1 à 6 paires de bases (pb) : par exemple, ATATATATATATATAT, soit (AT) n variables entre des individus ; CAGACAGA CAGACA, soit (CAGA) n. 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. Pour un locus donné, il existe un polymorphisme de longueur importante correspondant à un nombre variable de motifs répétés. La variabilité interindividuelle recherchée est la variabilité du nombre de répétitions en tandem. Il s'agit donc d'évaluer un polymorphisme de taille des allèles aux loci microsatellites. Ce polymorphisme est d'autant plus grand que le microsatellite est long.

Pour mettre en évidence le polymorphisme des microsatellites, il faut tout d'abord amplifier par PCR la séquence d'ADN comprenant ce microsatellite. La spécificité de l'amplification d'un microsatellite est déterminée par l'hybridation de deux amorces oligonucléotidiques correspondantes à une portion de chacune des deux régions flanquantes du locus (forward–reverse). Pour chaque locus, l'amorce forward est couplée à un fluorochrome, ce qui permet de détecter les locus sur les microsatellites après migration dans un polymère de séquenceur automatique.

L'intérêt d'utiliser des microsatellites plutôt que d'autres marqueurs moléculaires pour l'analyse des structures génétiques de population est multiple, tout d'abord, ils sont très polymorphes et donc très résolutifs pour l'analyse 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 d'après Jarne et Lagoda (1996). De plus, ils ont l'avantage d'être spécifiques, c'est-à-dire d'être utilisables dans une seule ou quelques espèces proches, ce qui

permet de limiter les contaminations par d'autres organismes. Ce sont des marqueurs codominants : les deux allèles d'un hétérozygote sont détectables, ce qui permet de distinguer les individus homozygotes et hétérozygotes. Enfin, ces marqueurs sont insensibles aux effets du milieu, indépendants du stade ou de l'organe analysé, et sont supposés évolutivement neutre à l'opposé des marqueurs enzymatiques, longtemps utilisés en génétique des populations (Jarne et Lagoda, 1996).

A l'aide de la technique des microsatellites, plusieurs études ont été faites sur la structure génétique des populations de *B. truncatus* de Côte d'Ivoire et du Niger (Viard *et al.*, 1996) de même que chez ceux du Maroc (Chlyeh *et al*., 2002). D'autres investigations ont été réalisées chez les *B. forskalii* de plusieurs régions d'Afrique (Gow *et al.,* 2004) et chez les *B. globosus* du Zimbabwe (Wilkinson *et al.*, 2007).

I-3-6- Problématique

La relation entre les schistosomes et leurs hôtes intermédiaires est très spécifique et la compatibilité diffère sur de petites étendues géographiques (Rollinson *et al.*, 2001 ; Stothard *et al*., 2002 ; Njiokou *et al*., 2004). L'étude de la structure génétique des populations de bulins est nécessaire pour comprendre la distribution de la diversité génétique à l'intérieur et entre les populations. La connaissance de cette structure génétique permettra de mieux cerner le rôle de ces mollusques hôtes intermédiaires dans l'épidémiologie des schistosomoses, notamment d'éclairer la co-évolution entre les relations hôtes-parasites et les différences locales dans les taux de sensibilité. Plusieurs critères (Tableau II) ont été utilisés afin de pouvoir déterminer la structure génétique des bulins en Afrique :

- *i*) Les caractères morphologiques sont les plus anciens à être utilisés (Paraense, 1975). Ils fournissent des renseignements de façon directe par lecture du phénotype et ont été utilisés chez cinq espèces du groupe *B. africanus* (Kristensen *et al*., 1987) et chez les *B. globosus* et *B. nasutus* de Zanzibar (Stothard et Rollinson, 1997a). Ils ont permis une classification à partir de la coquille et de la taille des spires.

- *ii*) Les caractères biochimiques tels que les isoenzymes ont été utilisés pour caractériser les mollusques du genre *Bulinus* (Wright *et al.,* 1966) dans un but taxonomique (Henricksen et Jelnes, 1980) et pour étudier la structure de leurs populations (Rollinson et Wright, 1984 ; Mimpfoundi et Greer, 1990a,b ; Njiokou *et al.,* 1993a,b)

iii) Les caractères biologiques tels que la compatibilité hôte-parasite (Combes, 1985) ont été aussi utilisés. En effet, cette compatibilité est une donnée essentielle pour caractériser les mollusques dans les foyers de transmission (Vera, 1990). Celles réalisées avec les bulins et les schistosomes à œuf à éperon terminal ont montré une forte variabilité de la compatibilité (Frandsen, 1979 ; Southgate *et al*., 1985 ; Vera, 1990 ; Manning *et al.,* 1995 ; Stothard *et al*., 2001).

Tableau II : Les marqueurs biochimiques et moléculaires utilisés dans la caractérisation des bulins par différents auteurs africains

Technique	Espèces (pays)	Résultats	Matériel étudié	Références
Isoenzymes	*B. globosus* et *B. truncatus* (Côte d'Ivoire et Niger)	Faible polymorphisme	Enzymes	Njiokou *et al.*, 1992a, 1993a
	B. forskalii, B. globosus et *B. truncatus* (Cameroun)	Faible polymorphisme	Enzymes	Mimpfoundi et Greer, 1990a, b
	B. africanus et *B. forskalii* (Kenya)	Faible polymorphisme	Enzymes	Jelnes, 1979
	B. africanus (Tanzanie)	Faible polymorphisme	Enzymes	Rollinson et Southgate, 1979.
	B. cernicus (Mauritanie)	Faible polymorphisme	Enzymes	Rollinson et Wright, 1984
PCR- RFLP	*B. truncatus* (Sénégal, Mali)	Aucune différence entre les deux groupes	ARN ribosomal	Sène *et al.*, 2004
	Les 4 groupes de bulins	Différence entre les différents groupes	ADN ribosomal	Rollinson et Kane, 1991 ; Stothard *et al.*, 1996
	B. globosus, B. nasutus (Zanzibar)	Importante différence entre les deux espèces	ADN mitochondrial	Stothard et Rollinson, 1997a
RAPD	*B. forskalii* (Cameroun, Côte d'Ivoire, Guinée Equatoriale), *B. globosus* (Côte d'Ivoire), *B. umbilicatus* (Niger)	Différence entre *B. globosus* et *B. umbilicatus* Faible polymorphisme entre les diverses populations de *B. forskalii*	ADN nucléaire	Langand *et al.,* 1993
	B. africanus group (Zanzibar)	Variation génétique importante entre les deux groupes	ADN nucléaire	Stothard *et al.*, 1997b
	B. africanus, B. nasutus, *B. nasutus productus* (Kenya)	Faible polymorphisme entre les espèces	ADN ribosomal	Raahauge et Kristensen, 2000
SNP	*B. nasutus* et *B. globosus* (Kenya)	Identification des deux espèces	ADN mitochondrial	Stothard *et al.*, 2002
Microsatellites	*B. truncatus* (Niger, Côte d'Ivoire)	Faible polymorphisme	ADN nucléaire	Viard *et al*., 1996
	B. truncatus (Maroc)	Faible polymorphisme	ADN nucléaire	Chlyeh *et al*., 2002
	B. fosrkalii (différentes populations d'Afrique)	Fort polymorphisme	ADN génomique	Gow *et al.,* 2004
	B. globosus (Zanzibar)	Fort polymorphisme	ADN génomique	Wilkinson *et al.,* 2007

En effet, ces études ont révélé qu'il existait une variation géographique de ce caractère chez les mollusques vecteurs de schistosomes et on constate généralement une meilleure adaptation des populations de *S. haematobium* à leur mollusque local (Vera, 1990).

Malgré l'intérêt épidémiologique de ces marqueurs, ils ne permettent pas de comprendre les différences génétiques entre les diverses populations de mollusques ou de parasites. Des études utilisant des microsatellites ont montré que les populations naturelles de *B. truncatus* (Viard *et al.,* 1996 ; Chlyeh et *al.,* 2002) et de *B. globosus* (Wilkinson *et al*., 2007) présentent des variations génétiques significatives, d'où l'importance d'utiliser des microsatellites pour évaluer cette variabilité génétique.

Au Cameroun, aussi bien les marqueurs morphologiques (Samè Ekobo, 1984) que les marqueurs biochimiques tels que les isoenzymes (Mimpfoundi, 1990 ; Mimpfoundi et Greer, 1990a), utilisés sur les populations de *B. globosus* et de *B. truncatus* ont montré une faible variabilité génétique. En effet, sur les 15 loci isoenzymatiques utilisés chez *B. globosus*, seuls deux présentaient des variations interpopulationnelles. Chez les populations de *B. truncatus*, ces marqueurs n'ont montré aucun polymorphisme dans les 20 populations examinées pour 14 loci isoenzymatiques (Mimpfoundi, 1990).

Les marqueurs biologiques tels que la compatibilité ont été les derniers à être utilisés. En travaillant sur huit populations de bulins (*B. globosus* et *B. truncatus*) d'origine géographique différente, infestées par trois souches différentes de *S. haematobium*, Djuikwo-Teukeng (2005) a montré que la compatibilité bulin-schistosome présente un niveau de polymorphisme relativement élevé au sein d'un échantillon de mollusques, entre différentes populations de bulins exposés à la même souche parasitaire, et aussi entre les mollusques de la même population lorsqu'ils sont exposés à plusieurs souches parasitaires. De même, la compatibilité de *B. truncatus* à différents génotypes de *S. haematobium* semble plus large que celle de *B. globosus* (Njiokou *et al.,* 2004)

Ces différents travaux ont permis de révéler un polymorphisme génétique au sein de ces populations. Cependant, une classification des différents variants géographiques ou écologiques des mollusques permettrait une meilleure compréhension et une meilleure prévention de la parasitose. Ceci justifie l'utilisation de marqueurs plus polymorphes comme les microsatellites pour expliquer l'hétérogénéité de la transmission de la bilharziose urinaire au Cameroun.

CHAPITRE II :

SITES D'ETUDE, MATERIEL ET METHODES

II-1- Les sites d'échantillonnage de *B. truncatus* (Fig. 9)

II-1-1- Barombi-kotto (4° 28' 4" N, 9° 15' 2" E)

Cette localité est située à environ 33 km de la ville de Kumba, dans la province du Sud-ouest du Cameroun et dans le département de la Mémé. Sa population est d'environ 15.000 habitants. Sa particularité est liée à la présence d'un lac de cratère d'environ 1,3 km de diamètre. On note une absence totale de points d'eau dans ce site. C'est la raison pour laquelle la plupart des activités humaines nécessitant de l'eau (lessive, baignade, pêche) se déroulent sur le lac. Ce dernier abrite *B. truncatus* et *B. camerunensis* (Duke et Moore, 1976 ; Moyou *et al*., 1987). La bilharziose urinaire y est endémique avec une prévalence de 68,9 % (Nkengazong *et al*., 2009).

II-1-2- Bertoua (4° 35' 20" N, 13° 40' 52" E)

Cette ville est située dans la province de l'Est et dans le département du Lom-et-Djerem. Sa population est d'environ 700 000 habitants. Deux formes de bilharzioses y sont endémiques : la bilharziose intestinale à *S. mansoni* avec une prévalence assez faible (2 %) et la bilharziose urinaire avec une prévalence de 43,3 % (Ratard *et al*., 1990). Les *B. truncatus* de cette zone ont été récoltés dans le cours d'eau situé derrière l'hôtel Mansa.

II-1-3- Dschang (5° 26' 43" N, 10° 4' 1" E)

C'est une ville située dans une zone montagneuse de la province de l'Ouest et dans le département de la Menoua. Sa population est d'environ 200 000 habitants. La prévalence de la bilharziose urinaire dans cette zone varie de 1 à 4 % (Brooker *et al*., 2000). Les *B. truncatus* ont été récoltés dans un étang de pisciculture à l'intérieur du campus universitaire.

II-1-4- Loum (4° 42' 58" N, 9° 44' 11" E)

C'est une ville localisée dans la province du Littoral et dans le département du Moungo. Sa population est d'environ 140 000 habitants. La rivière Mbette, qui coule à travers la ville, crée des ruisseaux qui circulent entre les habitations et les champs, formant ainsi des points d'eau stagnants, temporaires ou permanents exploités par les hommes pour les activités agricoles et ménagères. Ces sites sont propices à l'installation des mollusques d'eau douce. La bilharziose urinaire y est endémique avec une prévalence de 62,8 % (Tchuem Tchuente *et al*., 2003). Dans cette région, les *B. truncatus* ont été récoltés au niveau du quartier Bonkeng.

Tableau III : Les caractéristiques physiques des localités étudiées.

Localité	Altitude (m)	Pluviométrie annuelle (mm)	Tem.moyenne annuelle (°C)	Type de collection d'eau	Végétation
Site de la zone équatoriale avec 4 saisons deux saisons de pluies et deux saisons sèches					
Barombi-Kotto	400	2 000-4 000	25	Lac de cratère	Forêt équatoriale
Bertoua	670	1 500-2 000	23-25	Cours d'eau permanent	Forêt dégradée
Sites de la zone tropicale humide avec deux saisons une longue saison de pluies et une courte saison sèche					
Dschang	1400	1500-2000	16-21	Etang de pisciculture	Forêt semi-décidue. Cultures agricoles
Loum	180	1 250-3 000	25	Cours d'eau permanent	Forêt sémi-décidue
Kékem	730	1 100	27	Cours d'eau permanent	Forêt sémi-décidue
Sites de la zone tropicale sèche avec deux saisons, une longue saison sèche et une courte saison de pluies					
Mokolo	858	800-1 000	28	Barrage	Steppes
Ngaoundéré	1116	1 400	22	Cours d'eau semi-permanent	Graminées, arbustes
Yagoua	550	830	29	Cours d'eau temporaire	Steppes à épineux
Toukou	545	830	29	Barrage	Steppes à épineux
Mourtouwa	478	810	29	Cours d'eau temporaire	Steppes à épineux
Gounougou	220	600-1 400	30	Cours d'eau permanent	Palmiers-rôniers et doumiers
Bessoum	229	600-1 400	30	Cours d'eau temporaire	Palmiers-roniers et doumiers
Djalingo	233	600-1 400	30	Cours d'eau temporaire	Palmiers-roniers et doumiers
Ouroudou-koudje	225	600-1 400	30	Cours d'eau permanent	Palmiers-roniers et doumiers

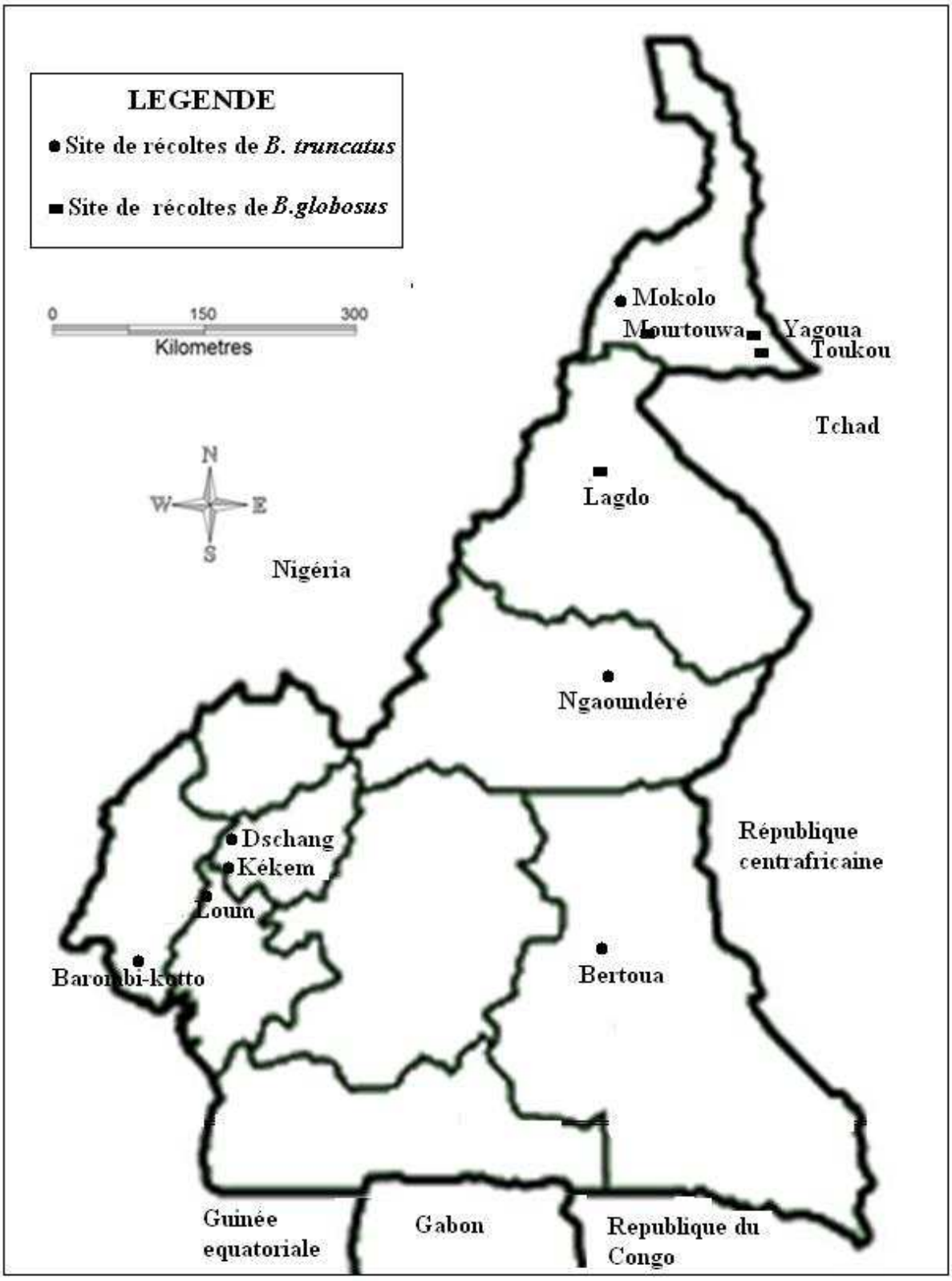


Figure 9 : Les sites de récolte des échantillons de mollusques

II-1-5- Kékem (5° 09' 47" N, 10° 0' 37" E)

C'est une ville située dans une zone marécageuse de la province de l'Ouest et dans le département du Haut-Nkam. La population est d'environ 30 000 habitants. Le réseau hydrographique est constitué de sources provenant de collines environnantes. Il y a formation de nombreux point d'eau stagnante à partir de ces ruisseaux. Dans cette région, les mollusques hôtes sont *B. forskalii*, *B. globosus* et *B. truncatus*. La bilharziose urinaire est présente avec une prévalence comprise entre 1 et 4 % (Brooker *et al*., 2000). Les bulins ont été récoltés au niveau du petit Nkam.

II-1-6- Mokolo (10° 44' 0" N, 13° 46' 4" E)

Cette ville est située à l'Extrême-Nord du Cameroun. C'est le chef lieu du département du Mayo Tsanaga. Sa population est d'environ 30 000 habitants. Son réseau hydrographique est essentiellement constitué de points d'eau permanents (représentés par les barrages) et par des mares d'eau temporaires (« mayo ») qui disparaissent dès le début de la saison sèche. Les bilharzioses intestinale et urinaire y sont endémiques avec des prévalences respectives de 9 % et de 25-49 % (Brooker *et al*., 2000). La récolte de *B. truncatus* a été effectuée au niveau du barrage d'Ouro-Tada.

II-1-7- N'Gaoundéré (7° 18' 59" N, 13° 35' 22" E)

Chef-lieu du département de la Vina dans la province de l'Adamaoua, c'est une ville de transition entre le Sud et le Nord Cameroun. Sa population est d'environ 700 000 habitants. Deux formes de bilharzioses y sont présentes : la bilharziose intestinale avec une prévalence de 16,2 % (Ratard *et al.,* 1990) et la bilharziose urinaire qui est plus faiblement représentée variant entre 1% et 4 % (Brooker *et al*., 2000). Les *B. truncatus* ont été récoltés dans le cours d'eau qui coule derrière l'hôpital provincial près de l'école publique "Soum-Soum".

II-2- Les sites de récolte pour *B. globosus*

II-2-1- Moutourwa (10° 12' 42" N, 14° 11' 28" E)

C'est un village situé à 50 km de la ville de Maroua dans le département du Mayo-Kani et dans la province de l'Extrême-Nord. Sa population est d'environ 15 000 habitants. Le réseau hydrographique est essentiellement constitué de mares d'eau temporaires qui disparaissent dès le début de la saison sèche. Les bilharzioses intestinale et urinaire y sont

endémiques avec des prévalences respectives de 9 % et de 50 à 100 % (Brooker *et al*., 2000). *B. globosus* a été récolté au niveau du lac de retenue du quartier Bonglori.

II-2-2- Yagoua (10° 20' 58" N, 15° 13' 55" E)

Chef-lieu du département du Mayo-Danay, dans la province de l'Extrême-Nord, cette ville se situe dans le "bec de canard" sur la carte du Cameroun. Son nombre d'habitants est d'environ 70 000. Dans cette région, les cours d'eau sont temporaires et disparaissent dès le début de la saison sèche. La bilharziose urinaire y est endémique avec une prévalence variant de 25 à 49 % (Brooker *et al.,* 2000). Les *B. globosus* ont été récoltés dans le cours d'eau qui coule dans la mare d'eau temporaire située derrière le marché au bétail.

II-2-3- Toukou (10° 23' 53" N, 15° 15' 11" E)

C'est une zone rurale située à 8 km au nord de Yagoua, d'environ 5000 habitants. On y rencontre de nombreuses mares temporaires, mais seuls les canaux aménagés pour la riziculture (par l'ancienne Semry : Société de production de riz) hébergent des populations de *B. globosus.* La récolte des mollusques s'est faite sur le canal d'irrigation. La prévalence de la bilharziose urinaire est comprise entre 25 et 49 % (Brooker *et al.,* 2000).

II-2-4- Les villages en amont du barrage de Lagdo (Fig.10)

Gounougou (9° 4' 33" N, 13° 42' 25" E), Ouroudoukoudje (9° 5' 53" N, 13° 43' 22" E), Bessoum (9° 7' 30" N, 13° 15' 11" E) et Djalingo (9° 9' 24" N, 13° 45' 14" E) sont des villages riverains en amont du barrage de Lagdo (Fig. 9). La retenue de Lagdo située à 200 m d'altitude prend est située sur le fleuve Bénoué à 70 km au nord-est de la ville de Garoua (Province du Nord). Dans cette région peuplée d'environ 30 000 habitants, la construction du barrage a provoqué l'irrigation de nombreux périmètres pour la culture du riz. En conséquence, les biotopes de développement des hôtes intermédiaires se sont multipliés. En 1968, la prévalence de la bilharziose urinaire était de 15 %, mais, deux ans après la création du barrage, elle est passée à 43 % (Doumengue *et al.,* 1987). Cette prévalence est restée élevée : 53,3 % en 1995 (Dogmo, 1995). En 2001, les prévalences de la bilharziose urinaire sont de 78,8 % à Gounougou, de 57,3 % à Ouroudoukoudje, de 77,2 % à Bessoum et de 83,6 % à Djalingo (Cunin *et al.,* 2001). A Gounougou, on assiste à un remplacement de *B. truncatus* par *B. globosus* dans le canal d'irrigation secondaire. Les sites de Gounougou et Ouroudoukoudje appartiennent au canal principal et sont continus**.** En aval, se retrouvent les sites de Bessoum et de Djalingo qui sont deux cours d'eau indépendants.

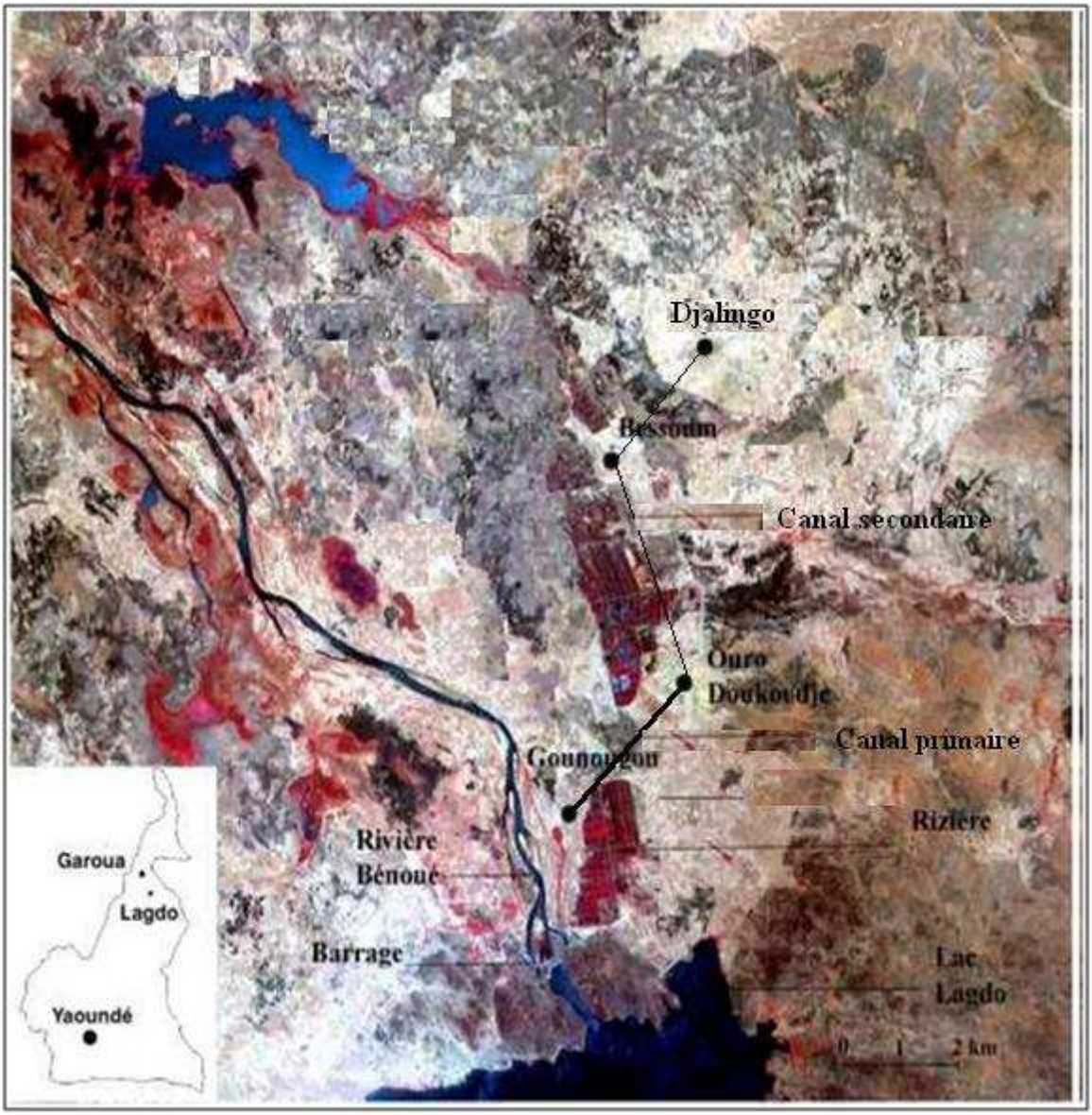


Figure 10 : La présentation des différents sites en amont du barrage de Lagdo (Image HRV/XS de SPOT du 27-02-1999 d'après Cunin *et al.* (2003).

Tableau IV: La date de récolte et le nombre de mollusques utilisés pour l'étude de la structure génétique

Localité	Date de récolte	Saison	Nombre de mollusques
B. globosus			
Yagoua	Octobre 2009	Début de la saison sèche	30
Toukou	Octobre 2009	Début de la saison sèche	30
Mourtouwa	Juillet 2008	Début de la saison sèche	30
	Octobre 2009	Saison des pluies	30
Gounougou	Janvier 2008	Saison sèche	30
	Juillet 2008	Saison des pluies	30
	Octobre 2009	Début de la saison sèche	30
Ouroudoukoudje	Janvier 2008	Saison sèche	30
	Juillet 2008	Saison des pluies	30
	Octobre 2009	Début de la saison sèche	30
Djalingo	Octobre 2009	Début de la saison sèche	30
Bessoum	Octobre 2009	Début de la saison sèche	30
Total	-		**360**
B. truncatus			
Barombi-kotto	Janvier 2008	Saison sèche	30
	Octobre 2008	Saison des pluies	26
	Octobre 2009	Début de la saison sèche	26
Kékem	Juillet 2008	Saison sèche	30
	Octobre 2008	Saison des pluies	21
	Octobre 2009	Début de la saison sèche	24
Mokolo	Juillet 2008	Saison des pluies	30
	Juillet 2009	Saison des pluies	25
Ngaoundéré	Janvier 2008	Saison sèche	30
	Juillet 2009	Saison des pluies	32
Loum	Octobre 2009	Début saison sèche	30
Dschang	Octobre 2009	Début saison sèche	30
Bertoua	Septembre 2009	Saison des pluies	30
Total	-		**364**

II-3- Matériel biologique

Les bulins utilisés pour cette étude (tableau IV) ont été récoltés de janvier 2008 à octobre 2009. Nous avons utilisé pour la récolte des mollusques, une épuisette à manche, une pince longue, des pots en plastique, des boîtes de pétri, une paire de bottes et une paire de gants afin d'éviter tout contact avec l'eau infestée.

La plupart des mollusques ont été prélevés à l'aide d'une épuisette en balayant la végétation aquatique. Les mollusques fixés aux plantes flottantes ont été décollés à l'aide d'une pince longue. Tous sont placés dans des pots en plastique contenant de l'eau du site et un peu de végétation. La durée de la récole était d'environ 20 mn par site.

II-4-Méthodologie

II-4-1- Partie biologique

Cette partie du travail s'est déroulée au Laboratoire de Biologie Générale à la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I (Cameroun).

Les mollusques rapportés au laboratoire ont été placés individuellement dans des piluliers contenant de l'eau de source et ont été exposés à la lumière du jour pour le contrôle de l'émission cercarienne. Chaque pilulier a été examiné sous une loupe binoculaire pour identifier les cercaires de schistosomes. Ces dernières ont été reconnues à leur tête piriforme allongée et à leur queue bifide. Les mollusques émettant ou non des cercaires ont été conservés dans de l'éthanol à 70°C pour l'étude de la variabilité génétique.

II-4-2- Partie génétique

Cette partie du travail s'est déroulée au Laboratoire de Parasitologie à la Faculté de Pharmacie de Limoges (France) au sein de l'équipe EA 3174.

II-4-2- 1- L'extraction de l'ADN génomique

Nous avons travaillé uniquement sur les mollusques n'émettant pas de cercaires. Ceux-ci sont disséqués afin de 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'extraction de l'ADN a été réalisée grâce au kit QiAamp DNA Mini Kit» (Qiagen®, Courtaboeuf, France) en suivant les indications du fournisseur du kit :

- *Lyse des échantillons* : chaque pied de mollusque subit une protéolyse à l'aide d'un mélange contenant 20 µL de protéinase et de 180 µL d'ATL (Tissue Lysis Buffer). Cette digestion enzymatique s'effectue dans un incubateur à 56° C toute une nuit jusqu'à lyse complète des masses molles. Le lysat est ensuite mélangé à l'aide d'un vortex pendant 15 sec et centrifugé 1 min à 8 000 tours/min. Puis, on ajoute 200 µL d'AL (Lysis Buffer) en prenant soin de bien mélanger pendant 15 secondes. Les tubes sont placés à l'incubateur à 70° C pendant 10 minutes.

- *Précipitation du lysat à l'éthanol* : on retire les tubes du bain–marie, on agite au vortex pendant 15 sec et on centrifuge 1 min à 8 000 tours/min. On procède à la précipitation de l'ADN en ajoutant 200 µL d'éthanol à 100° C avant d'homogénéiser le mélange et de soumettre l'ensemble à une nouvelle centrifugation à 8 000 tours/min pendant 1 min. Le mélange est transféré ensuite dans une colonne de filtration (QiaAmp), elle-même positionnée sur un tube de collecte de 2 mL. Le contenu du tube est ensuite centrifugé à 8 000 tours/min pendant 1 min et on remplace le tube collecteur.

- *Lavages* : on ajoute 500 µL de tampon AW1 (Washer Buffer 1) dans la colonne et l'on procède à une nouvelle centrifugation du mélange à 8000 tours/min pendant 1 min, puis on jette le culot. La même opération est effectuée avec 500 µL de tampon AW2 (Washer Buffer 2) mais la centrifugation qui s'ensuit, se déroule à 14 000 tours/min pendant 3 minutes afin de bien éliminer toute trace de tampon résiduel. L'ADN est ainsi purifié et fixé sur la colonne d'alcool.

- *Elution de l'ADN* : la colonne est placée dans un nouveau tube collecteur. On procède alors à l'élution de l'ADN en ajoutant 200 µL d'AE (Elution Buffer) préalablement préchauffé à 70° C. On laisse reposer sous la hotte pendant 5 minutes, puis on effectue une centrifugation à 8 000 tours/min pendant 1 minute. On jette la colonne et on récupère l'éluât que l'on place soigneusement dans des tubes nommés et numérotés. Avant leur conservation à - 4° C, la concentration de l'ADN est évaluée par spectrophotométrie UV à 260 nm.

II-4-2- 2- L'amplification des microsatellites par PCR

La "Polymerase Chain Reaction " ou PCR est une technique de réplication *in vitro*. Elle permet d'obtenir, à partir d'une infime quantité d'ADN, d'importants stocks d'ADN spécifique et de longueur définie. Le protocole a été adapté à l'espèce étudiée.

Tableau V : Les amorces utilisées pour *B. truncatus* (Jarne *et al*., 1994*)*

Amorces	Température d'hybridation	Répétition de séquences	Séquence
Bt 1	50° C	$(CA)_4$ (GA) $(CA)_7$ $(GA)_4$	6- Fam CGTGGGGACTGTTTACTTTAC CCCCCTAAAAGTTTGGTCTAG
Bt 6	50° C	$(GA)_{31}$	Ned-GAACTCGGTCTATCCACC CTGCACATTAGGGATCA
Bt 12	52° C	$(GATA)_{36}$	Hex- TGAAACATGTTTTACGATTG ACATACGGCTAACAATTTGTATTAC
Bt 13	59° C	$(GATA)_{33}$	6-Fam-CACAAGATGGACAGGTACCACATGG CAAGTTTACAATTGCCTTGCATTTC

a- Cas de *B. truncatus*

L'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel de 25 µL. Le mélange contient 1 µL de $MgCl_2$ à 1,5 mM, 2,5 µL de tampon 1X, 0,5 µL de dNTP à 0,2 mM, 0,2 µL de Taq 0,5 U/µL, 2,5 µL d'amorces à 0,5 uM et 4 µL d'ADN. Nous avons ensuite ajusté avec de l'eau RNAse-free pour obtenir 25 µL.

Pour chaque PCR réalisée, un tube témoin négatif (sans ADN) permet de s'assurer de l'absence de contamination. Les tubes sont placés dans un thermocycleur Perkin-Elmer 2700 (Applied Biosystem). Le programme est identique pour toutes les amorces et seule la température d'hybridation varie (Tableau V).

De manière simplifiée, il comprend *i*) une dénaturation initiale à 94° C pendant 4 min, suivie *ii*) de 30 cycles comprenant chacun une dénaturation à 94° C pendant 30 sec, une hybridation de 30 sec dont la température varie suivant les amorces et une élongation à 72° C pendant 30 sec, et *iii*) une élongation finale à 72° C pendant 10 min.

b- Cas de *B. globosus*

Les amplifications ont été également réalisées dans un volume réactionnel de 25 µL. Le mélange contient 1 µL de $MgCl_2$ à 1,5 mM (la quantité varie suivant les amorces) ; 2,5 µL de tampon 1X, 0,5 µL de dNTP à 0,2 mM, 0,2 µL de Taq 0,5 U/µL, 2,5 µL d'amorces

µM 0,5 et 4 µL d'ADN. On complète avec de l'eau RNAse-free pour obtenir 25 µL. Comme ci-dessus, un tube témoin négatif est réalisé. Les tubes sont placés dans le même thermocycleur.

Le programme de PCR (Tableau VI) est identique pour toutes les amorces Bgz 1 et Bgz 2 : Il comprend une dénaturation initiale à 94° C pendant 5 min, suivie de 40 cycles comprenant chacun une dénaturation à 94° C pendant 30 sec, une hybridation à 53° C pendant 30 sec et une élongation à 72° C pendant 30 sec, et une extension finale à 72° C pendant 10 min. Pour les amorces Bgz 4 et Bgz 5, le programme comprend une dénaturation initiale à 94° C pendant 5 min, suivie de 10 cycles comportant chacun une dénaturation à 94° C pendant 30 sec, une hybridation à 60° C pendant 30 sec et une élongation à 72° C pendant 30 sec et 25 cycles comprenant une dénaturation à 94° C pendant 30 sec, une hybridation à 50° C pendant 30 sec et une élongation à 72° C pendant 30 sec, terminés par une élongation terminale de 5 min à 72° C.

A la fin de chaque PCR, une électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % est effectuée pour vérifier la présence d'amplicons.

Tableau VI : Les amorces utilisées pour *B. globosus* (Emery *et al.,* 2003)

Amorce	**Température d'hybridation**	**Répétition de séquences**	**Séquence**
Bgz 1	53° C	$(TG)_{12}$ GGTGGG$(TG)_{13}$	6-Fam-AACACTTATTTATACGGCTACA TTTGTGGCTATTTCGGAGT
Bgz 2	53° C	$(AC)_9$ TC$(AC)_4$ TC$(AC)_7$ TC$(AC)_3$	6-Fam-TTTCTTCTTCTGGTTGGTTTG ATTTTTAGATACATTGAAGTGGA
Bgz 4	50°-60° C	$(CA)_4$ AG$(CA)_6$ G$(CA)_8$	Tet-CTGACCAGAACCTTTAATGG GACATACGAGGAACGTATTGT
Bgz 5	50°-60° C	CA_{13}	Hex-CTGTAAAGCAAACCCTCAA GATCAAAATGTCAACAGTCAG

II-4-2- 3- L'électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %

Cette technique est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation est fonction de la taille des fragments.

La première étape consiste en la préparation d'un gel d'agarose à 2 % dans du tampon TBE 1X (Biorad, Munich, Allemagne) contenant 5 µL de bromure d'éthidium (Invitrogen®, Carlsbad, USA). Le gel est ensuite déposé dans une cuve "Thermo Minicel Primo EC 320" (Electrophoretic Gel System) sur laquelle on a déposé des peignes de 14 puits.

La seconde étape est le dépôt des échantillons. Après avoir centrifugé les tubes PCR, 4 µL de chaque échantillon sont mélangés à 1,5 µL de bleu de charge (Gel Loading Solution type I : Sigma®, Saint-Louis, Missouri, USA) et déposés dans chaque puits du gel avec une micropipette en prenant soin de ne pas dégrader le 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. La migration se fait grâce à un générateur Apelex ps202, réglé à 110 V et 6-7 mA.

La troisième étape est la photographie du gel dans une chambre photographique à ultra-violets. Les résultats sont enregistrés sur le logiciel GELSMART 7.0 Clara Vision. 8). (Annexe 2a).

Les produits d'amplification sont conservés à - 20° C avant d'être analysés sur un séquenceur automatique.

II-4-2-4 - L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10 %

Elle est également basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation est fonction de la taille des fragments. Cependant, il a un pouvoir de résolution plus grand que le gel d'agarose et permet de différencier les individus homozygotes des individus hétérozygotes. (Annexe 2b)

La première étape consiste en l'assemblage des plaques dans le système de coulage. On précède ensuite à la préparation du gel de polyacrylamide à 10 %. Il est constitué *i)* d'un mélange d'acrylamide et de bisacrylamide (N, N'-méthylènebisacrylamide) à 40 % conservé à 4° C, *ii)* d'une solution de persulfate d'ammonium à 10 % dans de l'eau distillée et *iii)* du (N, N, N', N'-Tétraméthyléthylènediamine). Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un vortex et le gel est directement coulé entre les plaques, on introduit un peigne de façon à éviter la

formation des bulles à la base des puits. On laisse polymériser environ 45 min à température ambiante. Les plaques sont ensuite transférées dans la cuve à électrophorèse (Biorad) dans laquelle on a mis du tampon TBE 1X.

La seconde étape est le dépôt des échantillons. Après avoir centrifugé les tubes PCR, 20 µL de chaque échantillon sont mélangés à 1,5 µL de bleu de charge et déposés dans chaque puits du gel avec une micropipette en prenant soin de ne pas dégrader le gel. La même opération est réalisée avec 1 µL de marqueur de poids moléculaire (Marker 4 : phiX174/Hae III digest).

La troisième étape est la photographie du gel dans une chambre photographique à ultra-violets. Les résultats sont enregistrés sur le logiciel GELSMART 7.0 Clara Vision. 8 (Annexe 2b).

II-4-2-5- L'analyse de la taille des fragments amplifiés

Le principe repose sur une migration par électrophorèse capillaire dans une solution POP-7 (Performance Optimized Polymer). La fluorescence émise par les fluorochromes contenus dans les amorces est alors captée par une caméra, puis analysée par un système d'acquisition et d'analyse des données.

La première étape est la préparation d'un mélange comprenant 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 du mélange est déposé dans chaque puits de la plaque à 96 puits (Well Plates Rnase / Dnase-free polypropylène, Corning Incorporated).

La seconde étape est la dilution des produits PCR obtenus en fonction de l'intensité des bandes visualisées sur le gel d'électrophorèse. Les échantillons sont utilisés, soit purs, soit dilués au 1/5^{e}, au 1/10^{e} ou au 1/20^{e} avec du Hi-Di™ Formamide Deionized (Sigma- Aldrich, St Louis, USA).

La dernière étape est le dépôt de 1 µL de chaque échantillon d'ADN (dilué ou non) dans un 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° C pendant 5 minutes, puis immédiatement posée sur de la glace afin d'éviter l'hybridation de l'ADN. La plaque est alors prête à l'analyse par l'automate.

Les échantillons sont ensuite analysés par un séquenceur automatique (Hitachi 3130xl, Applied Biosystems) qui reconnaît la fluorescence. Le logiciel GeneMapper Software, version

4.0 (Applied Biosystems) 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 (Annexe 2c).

II-4-3- Analyse des données

Les données ont été transformées avec le logiciel CREATE V 1.1 (Coombs *et al.,* 2008) dans un format approprié en fonction des utilisations. L'absence de déséquilibre de liaison entre les paires de loci a été calculée entre les sous-populations en utilisant le test G de randomisation génotypique (de Meeûs *et al.,* 2009).

La structure des populations a été évaluée par la statistique de F.de Wright (Wright, 1965) : F_{IS} et F_{ST} sont calculés avec les estimateurs sans biais de Weir et Cockerham (Weir et Cockerham, 1984).

F_{IS} mesure la consanguinité de même que l'écart par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Il varie de - 1 (une classe de hétérozygotes fixes) à + 1 (tous les individus sont homozygotes avec au moins deux allèles par sous-populations). Il est nul lorsque les conditions de Hardy-Weinberg (HW) sont remplies. Chez les espèces autofécondes, il peut être utilisé pour évaluer le taux d'autofécondation *S* (de Meeûs *et al*., 2007) :

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

F_{ST} mesure la consanguinité des sous-populations par rapport à celle de la population totale. Lorsque le polymorphisme est trop prononcé en raison d'un fort taux de mutations comme c'est le cas, par exemple, pour les microsatellites, la valeur maximale estimée de F_{ST} est donnée par $(1 - H_S)$ où H_S est l'estimateur sans biais de la diversité génétique (Nei et Chesser, 1983) et une version standard de F_{ST} (Hedrick, 2005 ; de Meeûs *et al.,* 2007) peut être évaluée par la formule suivante :

$$F_{ST'} = F_{ST} / (1 - H_S)$$

L'isolement par la distance a été estimé en utilisant la régression de F_{ST} : (F_{ST} / [1 - F_{ST}] : Rousset, 1997) et le logarithme népérien de la distance géographique entre deux sites.

F_{ST} a été calculé aussi pour des paires d'échantillons récoltés dans le même intervalle de trois mois, soit 24 valeurs. Tous ces calculs ont été effectués avec le logiciel 2.9.4 de

Goudet (Goudet, 1995). Certains échantillons ont été prélevés à plusieurs reprises et à des dates différentes, ce qui nous a permis d'estimer la taille effective des populations par la méthode de Moment de Waples (Waples *et al.,* 1989) avec le logiciel NeEstimateur (Peel *et al.,* 2004).

La méthode du maximum de vraisemblance a été utilisée avec le logiciel MLNe (Wang et Whitlock, 2003), ce qui permet d'estimer aussi le taux de migration (m). MLNE est un programme qui permet de calculer les estimations du maximum de vraisemblance pour la taille de la population (Ne) et le taux de migration à partir des différences des fréquences temporelles et spatiales observées. Dans les deux cas, nous avons considéré le développement de trois générations par année (Brown, 1994).

La méthode de la double identité entre les allèles à l'intérieur et entre les loci (Vitalis et Couvet, 2001b, c) a été employée avec le logiciel Estim (Vitalis et Couvet, 2001a), ce qui permet d'estimer une valeur du produit Nem. Nous avons également estimé Ne avec *i)* la méthode de déséquilibre de liaison de Bartley (Bartley *et al*., 1992) avec le logiciel NeEstimator, et *ii)* celle de Waples (Waples et Do, 2008) que l'on calcule avec le logiciel LDNe.

Pour donner un aperçu graphique de la structure de la population, des arbres de divergence (NJTree) ont été construits avec le logiciel MEGA 3.1 (Kumar *et al.,* 2004) à partir de distances matricielles (Cavalli-Sforza et Edwards, 1967) construites en utilisant le logiciel MSA (Microsatellite Analyzer : Dieringer et Schlötterer, 2002).

CHAPITRE III :

RESULTATS

III-1- Structure génétique des populations de *B. truncatus*

L'objectif de la première partie du travail est de déterminer la structure génétique des populations de *B. truncatus* provenant de différentes zones bioclimatiques en vue d'expliquer l'hétérogénéité qui existe dans la transmission de la bilharziose urinaire au Cameroun. Ce travail a fait l'objet d'une publication acceptée dans le journal : *Infection, Genetics and Evolution*. "Strong genetic structure in Cameroonian populations of *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae) intermediate host of *Schistosoma haematobium* " (Annexe 3).

Dans cette partie, trois cent soixante-quatre bulins au total ont été analysés.

III-1-1- Description de la variabilité génétique

L'étude a porté sur quatre loci microsatellites. Le locus Bt 1(183) est monomorphe dans toutes les populations alors que les loci Bt 6 (145-161), Bt 12 (236-296) et Bt 13 (299-375) ont permis de mettre évidence 5, 7 et 14 allèles respectivement dans l'ensemble des populations étudiées (tableau VII).

Tableau VII : Le polymorphisme des loci chez les populations de *B. truncatus*

	Loci			
Paramètres génétiques	**Bt 1**	**Bt 6**	**Bt 12**	**Bt 13**
Intervalle de taille des allèles (pb)	183	145-161	236-296	299-375
Nombre d'allèles	1	5	7	14
Richesse allélique	1	4,9	6,2	11,1

pb : paires de base

Le tableau VIII met en évidence la variabilité des différents paramètres étudiés pour chaque population et pour chaque locus utilisé. La valeur de Ho (hétérozygotie observée) est de 0 pour tous les loci dans les populations étudiées témoignant de l'absence totale d'individus hétérozygotes, preuve d'un mode de reproduction dominé par l'autofécondation. Quant à la valeur de la He (diversité génétique de Nei), celle-ci est nulle pour les deux premières amorces (Bt 1 et Bt 6) alors qu'elle varie de 0,148 à 0,683 pour les loci Bt 12 et Bt 13. Si l'on considère tous les loci, aucun n'est en équilibre de Hardy-Weinberg dans les populations étudiées. Enfin, il faut noter qu'il n'y a pas de déséquilibre de liaison entre les loci.

Tableau VIII: Les paramètres décrivant la variabilité génétique des loci étudiés à l'intérieur des populations de *B. truncatus*

		Bar Jan 08	Ndé Jan 08	Kek Jui 08	Mok Jui 08	Kek Oct 08	Bar Oct 08	Mok Jui 09	Ndé Jui 09	Ber Sept 09	Dsc Oct 09	Lou Oct 09	Kek Oct 09	Bar Oct 09
Loci	Para géné													
Bt 1														
	N	30	26	27	30	20	24	23	30	30	28	30	22	24
	Nall	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Vpb	183	183	183	183	183	183	183	183	183	183	183	183	183
	He	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bt 6														
	N	25	28	29	25	21	24	24	30	29	28	30	22	24
	Nall	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Vpb	145	155	159	161	159	145	161	155	149	159	145	159	145
	He	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bt 12														
	N	27	28	28	26	20	24	22	29	28	26	24	22	23
	Nall	2	1	3	1	2	2	1	1	3	2	2	3	3
	Vpb	288-292	296	288-296	236	288-292	288-292	236	296	288-296	288-292	264-270	288-296	288-296
	He	0	0,646	0	0,653	0,507	0	0	0	**0,68**	**0,148**	0,431	0,652	0,474
Bt 13														
	N	28	28	30	27	21	26	22	30	28	28	25	24	25
	Nall	2	2	3	1	3	3	1	3	4	1	2	2	3
	Vpb	345-357	369-371	371-375	325	371-375	341-357	325	349-369	295-307	371	329-333	371-375	341-357
	Ho	0												
	He	0,423	0,349	0,625	0	0,60	0,628	0	0,646	**0,683**	0	**0,333**	0,431	0,673

He : diversité génétique, **N** : Nombre d'individus, **N all** : nombre d'allèles, **Para géné** : Paramètres génétiques, **Vpb** : variation des paires de base.

Les trois premières lettres de chaque échantillon (Bar, par exemple) correspondent à l'origine géographique du site dans lequel les bulins ont été récoltés (Barombi-Kotto dans l'exemple précité). Les deux suivantes indiquent le mois de récolte et les deux chiffres correspondent à l'année où les échantillons ont été récoltés. (Pour Jan08, correspond à janvier 2008).

III-1-2- Structure génétique des populations et estimation du nombre de migrants

Les valeurs de F_{ST} ont été calculées uniquement entre des paires d'échantillons séparés de moins de quatre mois. Ils varient entre 0,45 (pour la paire Dschang- Kékem distante de 30 km) et 0,87 (pour la paire Mokolo- Ngaoundéré séparée de 380 km) (Tableau IX), ce qui témoigne d'une forte structuration génétique entre les populations. La différenciation génétique est importante entre toutes les paires d'échantillons quelle que soit la distance géographique, ce que confirme l'analyse statistique avec les valeurs de $P = 10^{-4}$. Comme les valeurs de Nm sont inférieures à 1, on peut en déduire qu'il y a très peu d'échanges de gènes entres les populations.

Tableau IX : Les valeurs de F_{ST}, de la probabilité de signification, des distances géographiques et du nombre moyen de migrants entre les paires d'échantillons de *B. truncatus*

La distance géographique est obtenue par conversion des points GPS à partir du convertisseur Lexigolos.

Site de récolte (par paires) *	Distance géographique (Km)	Log distance	F_{ST}	Valeur de *P*	F_{ST} (1-F_{ST})	Nm
Bar Jan08- Ndé Jan 08	580	6,36	0,81	10^{-4}	4,33	0,06
Kek Jui08 - Mok Jui 08	750	6,62	0,77	10^{-4}	3,52	0,06
KekOct08 - Bar Oct 08	110	4 ,70	0,55	10^{-4}	1,24	0,18
MokJui09 - Ndé Jui 09	**380**	5,94	**0,87**	10^{-4}	7,13	**0,04**
Ber Sep09 - Dsc Oct09	410	6,01	0,72	10^{-4}	2,59	0,09
Ber Sep09 - Lou Oct09	440	6,08	0,64	10^{-4}	1,78	0,14
Ber Sep09 - Kek Oct09	410	6,01	0,56	10^{-4}	1,29	0,19
Ber Sep09 - Bar Oct09	140	4,94	0,53	10^{-4}	1,14	0,22
Dsc Oct09 - Lou Oct09	90	4,49	0,85	10^{-4}	5,77	**0,04**
Dsc Oct09 - Kek Oct09	**30**	3,40	**0,45**	10^{-4}	0,84	0,3
Dsc Oct09 - Bar Oct09	140	4,94	0,73	10^{-4}	2,79	0,09
Lou Oct09 - Kek Oct09	60	4,09	0,69	10^{-4}	2,26	0,11
Lou Oct09 - Bar Oct09	60	4,09	0,52	10^{-4}	1,09	**0,23**
Kek Oct09 - Bar Oct09	110	4,70	0,59	10^{-4}	1,47	0,17

* Les deux premières lettres de chaque échantillon (Ba, par exemple) correspondent à l'origine géographique du site dans lequel les bulins ont été récoltés (Barombi-Kotto dans l'exemple précité). Les deux suivantes indiquent le mois de récolte et les deux chiffres correspondent à l'année où les échantillons ont été récoltés. (Pour Ja08, correspond à janvier 2008).

Le tableau X nous donne une représentation des valeurs de F_{ST} comparées par paires de sites et leur degré de signification. Toutes les paires de sites sont différentes entre elles.

Tableau X : la représentation des valeurs de F_{ST} entre les paires d'échantillons récoltés en juillet- octobre 2009 et leur degré de signification.

Valeurs de F_{ST} entre paires de sites						
	Mok Jui 09	Nde Jui 09	Ber sept 09	Dsc Oct 09	Lou Oct 09	Kek Oct 09
Mok Jui 09	0					
Nde Jui 09	0,87 *	0				
Ber sept 09	0,75 *	0,66 *	0			
Dsc Oct 09	0,97*	0,86 *	0,72 *	0		
Lou Oct 09	0,86 *	0,76 *	0,64 *	0,85 *	0	
Kek Oct 09	0,81 *	0,65 *	0,56 *	0,45 *	0,69 *	0
Bar oct09	0,80 *	0,7 *	0,53 *	0,73 *	0,52 *	0,59 *

* $P < 10^{-4}$

La figure 11 présente le graphe de l'isolement par la distance obtenue par la régression de $F_{ST}/(1-F_{ST})$ en fonction du logarithme népérien de la distance géographique qui existe entre les habitats des bulins. L'isolement par la distance ne donne qu'une valeur marginale non significative (P = 0,069 ; la pente b = 0,7362). Si nous admettons que cela est dû à la faible puissance du test utilisé, nous pouvons estimer la taille du voisinage (Nb) d'un individu, tel que Nb = 1/b, soit 1,36 individu, de même que la quantité $D_e\sigma^2 = 1 / (4\pi b)$, soit 0,108, où D_e est la densité effective des individus dans chaque voisinage et σ la distance moyenne entre les adultes reproducteurs et leurs parents (Rousset, 1997).

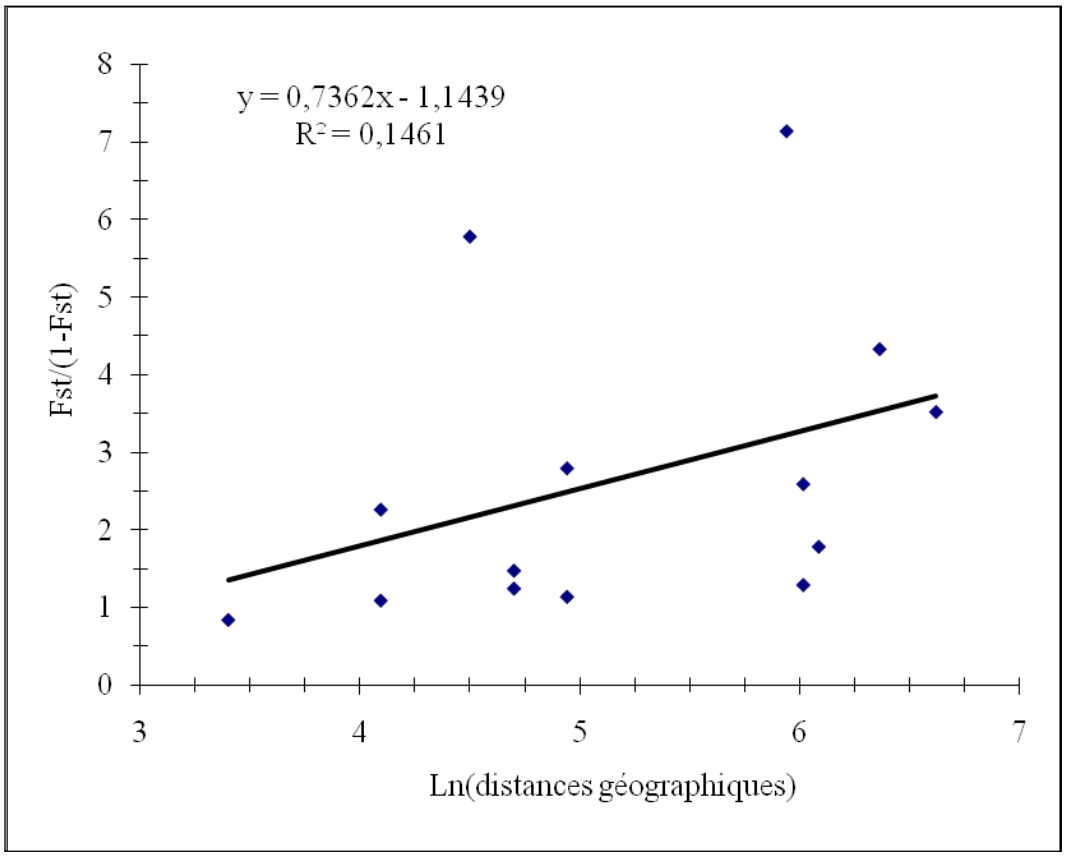


Figure 11: La droite de régression de la distance de la diversité génétique des échantillons de *B. truncatus* en fonction du logarithme népérien de la distance géographique entre les sites de récolte.

L'estimation moyenne de Nem sur les résultats des analyses par les méthodes MLNe et Estim est présentée dans le tableau XI. Si l'on utilise la méthode de régression par l'isolement en fonction des distances géographiques, la valeur de Nem est très proche de la valeur estimée. Avec un taux de migration moyenne de 0,05, nous avons obtenu une taille effective de la population de Ne ≈ 4. Si nous admettons que la surface moyenne couverte par l'échantillonnage (S =100 m^2) correspond à la surface moyenne du voisinage, nous pouvons calculer la quantité de mollusques par mètre carré de site et la dispersion de ceux-ci par génération.

Quantité : $D_e = N_e / S = 0{,}04$ mollusque/m²

Dispersion $\sigma = \sqrt{\frac{Nb}{4\pi D_e}} = 1{,}64$ / génération, ce qui est faible.

Le déséquilibre de liaison n'a pu être calculé qu'entre les loci Bt_{12} et Bt_{13}. Il n'est significatif dans aucune population.

L'arbre de divergence (Fig. 12) correspond aux échantillons de *B. truncatus* récoltés en septembre et octobre 2009. Il met en évidence la forte structuration de ces populations malgré les faibles distances géographiques entre les sites. On note une divergence entre les populations de Barombi-kotto et celle de Loum, de même qu'entre Kékem et Dschang. Par contre, les populations de Bertoua semblent isolées.

Tableau XI: L'estimation de N_em à partir des résultats de MLNe.

Méthode	Logiciel	Site de récolte	N_em	N_e	m
Maximum de vraisemblance	MLNe	Kékem	0,197	2	0,0915
		Barombi-Kotto	0,129	1	0,0976
		Mokolo	0,000	1	0,0002
		Ngaoundéré	0,105	3	0,0395
Moment	MLNe	Kékem	0,000	25	0,0000
		Barombi-Kotto	0,211	2	0,1075
		Ngaoundéré	0,117	2	0,0631
Un et deux loci identiques	Estimation	Kékem	0,374	7	0,0516
		Barombi-Kotto	NA	0	NA
		Barombi-Kotto	0,180	16	0,0112
		Barombi-Kotto	0,458	16	0,0291
Déséquilibre de liaison	Estimateur de Ne	Kékem	_	59	_
		Barombi-Kotto	_	8	_
Déséquilibre de liaison	LDNe	Kékem	_	245	
		Loum	_	4	
Moment	Estimateur de Ne	Kékem	_	13	_
		Kékem	_	22	_
		Barombi-Kotto	_	2	_
		Barombi-Kotto	_	6	_
Moyenne			0,197	22	0,0491

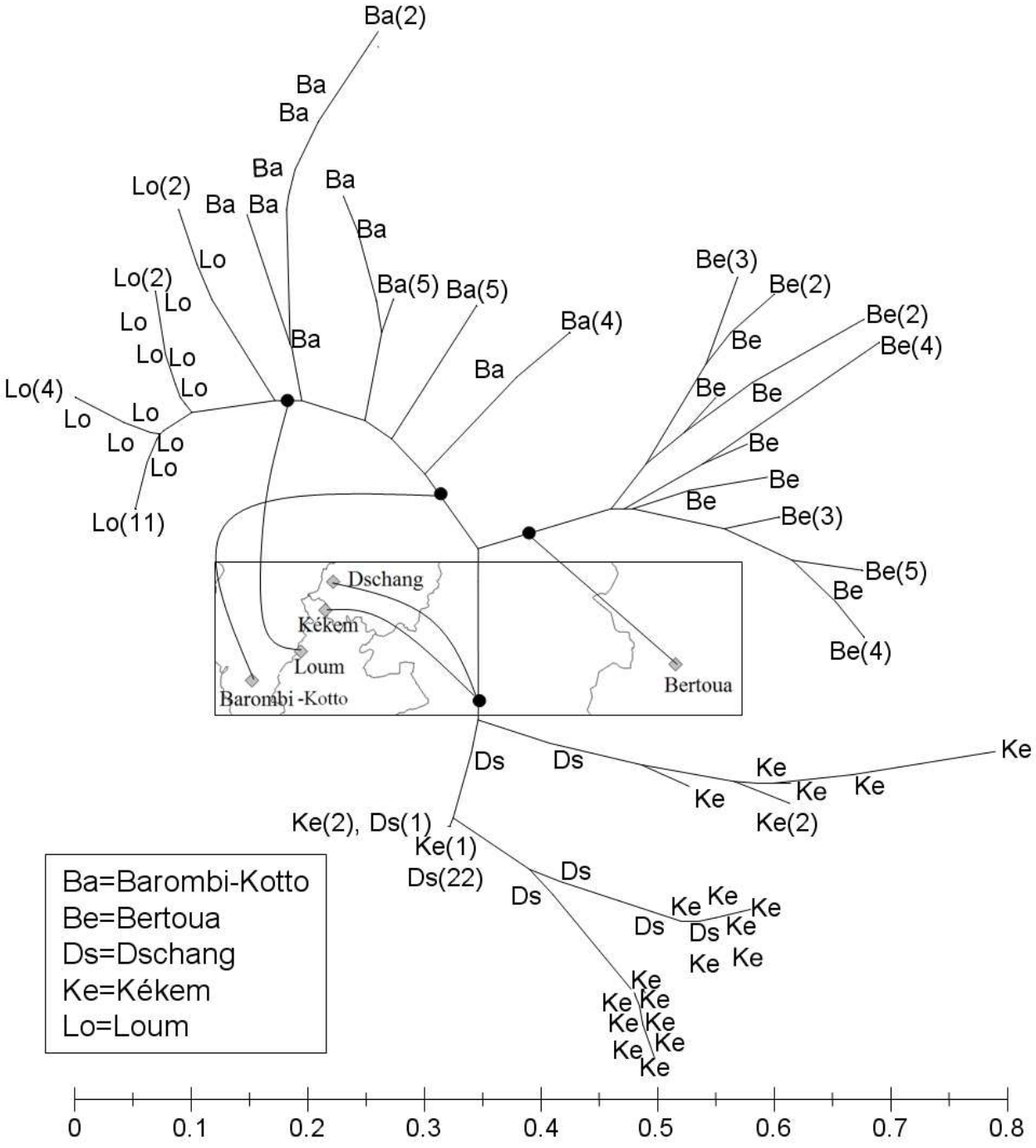


Figure 12 : Arbre de divergence des échantillons de *B. truncatus* récoltés en septembre-octobre 2009. Le nombre de génotypes multilocus est indiqué entre parenthèses.

III-2- Structure génétique des populations de *B. globosus*

La seconde partie de ce travail consistait à analyser la structure génétique des populations de *B. globosus* provenant de la zone tropicale en vue de rechercher les relations possibles entre cette structure génétique et l'épidémiologie de la schistosomose urinaire. "Genetic structure in Cameroonian populations of *Bulinus globosus* (Gastropoda: Planorbidae) intermediate host of *Schistosoma haematobium* " (Article soumis) Annexe 4.

Trois cent soixante bulins ont été analysés pour cette étude.

III-2-1- Description de la diversité génétique

Les différents loci utilisés montrent une variabilité génétique limitée, avec le nombre d'allèles par locus variant de 3 (Bgz 2) à 6 (Bgz 1, Bgz 4 et Bgz 5) et le nombre moyen d'allèles par locus variant de 2 (Bgz 2 et Bgz 4) à 3,14 (Bgz 5). Le Tableau XII résume la variation de la taille, le nombre d'allèles de même que la richesse allélique pour chaque locus.

Tableau XII : Le polymorphisme des loci chez les populations de *B. globosus*

	Loci			
Paramètres génétiques	**Bgz 1**	**Bgz 2**	**Bgz 4**	**Bgz 5**
Intervalle de taille des allèles (pb)	104-120	180-184	120-138	190-204
Nombre d'allèles	6	3	5	5
Richesse allélique	3	2	2	3,14

Au tableau XIII, nous présentons les paramètres de la diversité génétique en tenant compte des loci chez les différentes populations de *B. globosus.*

La population de Bessoum est monomorphe pour les loci Bgz 2 et Bgz 4. Toutes les autres populations sont polymorphes pour tous les loci. Un déficit en hétérozygote a été trouvé dans 18 des 26 combinaisons-loci de la population. Les tests de probabilité combinés sur tous les loci ont révélé un écart important par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg pour toutes les populations ($P < 0{,}005$). Il faut cependant noter un déséquilibre de liaison significatif entre Bgz 1 et Bgz 4 et ceci uniquement dans les populations de Toukou et de Yagoua.

Tableau XIII: Les paramètres décrivant la variabilité génétique des loci étudiés à l'intérieur des populations de *B. globosus* du Cameroun

		Gou Ja 08	Gou Jui 08	Our Jan 08	Our Jui 08	Mour Jui 08	Gou Oct 09	Mou Oct 09	Our Oct 09	Bes Oct09	Kap Oct 09	Ya Oct 09	Tou Oct 09
Loci	Para géné												
Bgz 1													
	N	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
	Nall	4	3	3	4	4	3	3	3	4	2	3	3
	Vpb	106-120	106-120	106-120	106-120	104-108	106-120	104-108	106-120	106-120	106-110	106-110	106-110
	Ho	0,5	0,46	0,64	0,433	0,5	0,433	0,167	0,4	0,3	0,633	0,5	0,433
	He	0,69	0,58	0,23	0,645	0,419	0,609	0,155	0,58	0 ,611	0,495	0,543	0,585
	Hw	**0,000**	**0 ,000**	**0,000**	**0,0000**	1	**0,003**	1	**0,000**	**0,000**	0,263	**0,031**	**0,000**
Bgz 2													
	Nall	3	2	3	3	1	2	2	3	1	2	2	2
	Vpb	180-184	180-184	180-184	180-184	180	180-184	180-184	180-184	180	180-184	180-184	180-184
	Ho	0,233	0,3	0,2667	0,366	0	0,167	0,133	0,20	0		0,167	0,267
	He	0,445	0,29	0,571	0,62	0	0,153	0,124	0,384	0	0,180	0,153	0,231
	Hw	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	-	1	1	**0,000**	-	**0,000**	1	1
Bg z 4													
	N all	2	2	2	2	2	2	2	2	1	3	2	2
	Vpb	128-134	128-134	128-134	128-134	134-138	128-134	134-138	128-134	134	120-134	134-136	134-136
	Ho	0,266	0,233	0,3	0,1667	0,6	0,167	0,467	0,267	0	0,267	0	0
	He	0,444	0,40	0,544	0,375	0,42	0,486	0,480	0,444	0	0,638	0,480	0,498
	Hw	**0,001**	**0,001**	**0 ,001**	**0,001**	**0,03**	**0,000**	1	0,039	-	**0,000**	**0,000**	**0,000**
Bgz 5													
	N all	3	3	3	3	4	3	4	3	4	4	2	2
	Vpb	198-204	198-204	198-204	198-204	190-204	198-204	190-204	198-204	198-204	190-204	198-200	198-200
	Ho	0,37	0,633	0,4667	0,4	0,23	0,5	0,33	0,50	0,133	0,367	0,2	0,233
	He	0,52	0,64	0,6161	0,63	0,715	0,67	0,73	0,663	0,651	0,750	0,18	0,433
	Hw	**0,008**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,002**	**0,000**	**0,000**	1	**0,014**

He : diversité génétique ; **Ho** : Hétérozygotie observée ; **Hw** : probabilité de signification du test d'adéquation à l'équilibre de Hardy-Weinberg ; le caractère gras est mis pour les valeurs de p <0,05 N : Nombre d'individus, **N all** : nombre d'allèles, **Para géné** : paramètres génétiques, **Vpb** : variation des paires de base. Les trois premières lettres de chaque échantillon (Gou) correspondent à l'origine géographique du site dans lequel les bulins ont été récoltés (Gounougou dans l'exemple précité). Les deux suivantes indiquent le mois de récolte et les deux chiffres correspondent à l'année où les échantillons ont été récoltés. (Pour Ju08, correspond à juillet 200

Les paramètres décrivant la diversité et la structure génétiques à l'intérieur des populations de *B. globosus* sont présentés au tableau XIV. Toutes les populations montrent une diversité génétique assez élevée avec une variation de la valeur d'He de 0,315 (Bessoum) à 0,518 (Ouroudoukoudje). Le taux d'hétérozygotie observé est assez faible allant de 0,108 (Bessoum) à 0,342 (Ouroudoukoudje) indiquant un déficit en hétérozygotes. Le taux d'autofécondation S est relativement élevé allant de 0,43 (Moutourwa) à 0,80 (Bessoum). De la même façon, les valeurs de F_{IS} sont toutes positives, comprises entre 0,27 (Moutourwa) et 0,67 (Bessoum), confirmant des déficits en hétérozygotes.

Tableau XIV : Les paramètres d'étude de la variabilité génétique intra populationnelle chez *B. globosus* du Cameroun. Les valeurs des écarts types (colonnes 2, 3 et 4) et des intervalles de confiance (IC) sont indiquées entre parenthèses.
Valeurs moyennes aux quatre loci de Ho, He, Fis et S dans les populations de *B. globosus* étudiées

Population	Ho	He	Rall	F_{IS} (IC 95 %)	S
Gounougou	0,317 (0,175)	0,479(0,234)	2,5 (0,577)	0,35 (0,16-0,52)	0,52
Moutourwa	0,275 (0,155)	0,373 (0,293)	2,75(0,957)	0,27 (0,07-0,44)	0,43
Ouroudoukoudje	0,342 (0,134)	0,518 (0,129)	2,75(0,500)	0,35 (0,16-0,50)	0,52
Bessoum	0,108 (0,142)	0,315 (0,365)	2,50(1,73)	0,67 (0,52-0,82)	0,80
Djalingo	0,317 (0,262)	0,516 (0,251)	2,75(0,95)	0,4 (0,25-0,54)	0,57
Yagoua	0,217 (0,208)	0,339 (0,204)	2,25(0,5)	0,37 (0,23-0,48)	0,54
Toukou	0,233 (0,178)	0,437 (0,153)	2,25(0,5)	0,48 (0,32-0,6)	0,64

$F_{IS,}$ coefficient de consanguinité ; He, diversité génétique ; Ho, hétérozygotie observée ; Rall, Richesse allèlique ; S, taux d'autofécondation.

III-2-2- Structure génétique des populations et estimation du nombre de migrants

Les valeurs de F_{ST}, de leur probabilité de signification, la distance géographique et du nombre de migrants estimés sont présentées au tableau XV. Une différenciation génétique a été observée entre les paires de populations étudiées. Les valeurs de F_{ST} entre les paires d'échantillons varient de 0,01 à 0,47, la moyenne étant de 0,255 avec l'intervalle de confiance (95%) compris entre [0.175 à 0.309]. Les sous-échantillons sont fortement différenciés ($P < 10^{-3}$), à l'exception *i)* des sites de Gounougou et d'Ouroudoukoudje, et *ii)* de ceux situés à Toukou et à Yagoua respectivement distants de 3,02 km et 5,88 km (tableau XV). On remarque également une grande variabilité du nombre de migrants (Nm) car les valeurs vont de 0,31 (pour la paire Djalingo-Toukou) à 40,8 (pour la paire Gounougou-Ouroudoukoudje).

Tableau XV : Les valeurs de Fst, de la probabilité de signification, des distances géographiques et du nombre moyen de migrants entre les paires d'échantillons de *B. globosus*

Site de récolte (par paires) *	**Distance (Km)**	**Log_n distance**	**F_{ST}**	**Valeur de *P***	**$F_{ST}(1-F_{ST})$**	**Nm**
Gou Jui08 - Mou Jui 08	137	4,92	0,29	10^{-3}	0,42	0,59
Gou Jui 08 - Our Jui 08	3	1,10	**0,06**	**NS**	0,06	3,96
Mou Jui 08- Our Jui 08	132	4,89	0,29	10^{-3}	0,40	0,61
Gou Oct09 - Mou Oct09	137	4,92	0,28	10^{-3}	0,39	1,25
Gou Oct09- Our Oct09	3,02	1,10	**0,01**	**NS**	0,006	40,81
Gou Oct09- Bes Oct09	6,35	1,84	**0,16**	10^{-3}	0,18	2,53
Gou Oct09 - Kap Oct09	10,36	2,3	0,19	10^{-3}	0.24	2,03
Gou Oct09 - Yag Oct09	219,7	5,39	0,31	10^{-3}	0,44	1,1
Gou Oct09- Tou Oct09	224,33	5,41	0,21	10^{-3}	0,26	1,82
Mou Oct09- Our Oct09	134,05	4,9	0,23	$10^{—3}$	0,28	1,69
Mou Oct09- Bes Oct09	130,71	4,87	**0,44**	10^{-3}	0,76	0,64
Mou Oct09- Kap Oct09	126,72	4,84	0,22	10^{-3}	0,38	1,77
Mou Oct09- Yag Oct09	114,9	4,75	0,47	10^{-3}	0,87	0,56
Mou Oct09- Tou Oct09	118,01	4,77	0,36	10^{-3}	0,56	0,87
Our Oct09 - Bes Oct09	3,35	1,20	0,18	10^{-3}	0,21	2,21
Our Oct09- Kap Oct09	7,56	1,99	0,17	10^{-3}	0,20	2,37
Our Oct09- Yag Oct09	216,14	5,37	0,31	10^{-3}	0,44	1,10
Our Oct09- Tou Oct09	221,4	5,39	0,21	10^{-3}	0,44	1,90
Bes Oct09- Kap Oct09	4,01	1,39	0,31	10^{-3}	0,45	1,07
Bes Oct09- Yag Oct09	213,07	5,36	0,29	10^{-3}	0,37	1,19
Bes Oct09- Tou Oct09	218,31	5,38	0,19	10^{-3}	0,44	2,13
Kap Oct09 - Yag Oct09	209,35	5,34	0,37	10^{-3}	0,59	0,83
Kap Oct09- Tou Oct09	214,6	5,37	0,27	10^{-3}	0,37	0,31
Yag Oct09- Tou Oct09	5,88	1,77	**0,02**	**NS**	0,02	17,38

* Les trois premières lettres de chaque échantillon (Gou) correspondent à l'origine géographique du site dans lequel les bulins ont été récoltés (Gounougou dans l'exemple précité). Les deux suivantes indiquent le mois de récolte et les deux chiffres correspondent à l'année où les échantillons ont été récoltés. (PourJui08, correspond à juillet 2008).

Tableau XVI : La représentation de valeurs de F_{ST} entre les paires d'échantillons de *B. globosus* récoltés en octobre 2009 et leur degré de signification

Valeurs de F_{ST} entre paires de sites							
	Gou9	Mou9	Our9	Bes9	Kap9	Yag9	Tou9
Mou9	0,285 *						
Our9	0,012 NS	0.227 *					
Bes9	0,165 *	0,435 *	0,184 *				
Kap9	0,197 *	0,219 *	0,173 *	0,316 *			
Yag9	0,312 *	0,468 *	0,310 *	0,294 *	0,374 *		
Tou9	0,214 *	0,364 *	0,207 *	0,190 *	0,275 *	0,02 NS	

* $P < 10^{-3}$

Le tableau XVI présente les valeurs de F_{ST} et leur degré de signification. Il existe une différenciation génétique entre toutes les paires de populations. Deux exceptions sont à relever : il s'agit des paires de populations Gounougou/Ouroudoukoudje d'une part, et Yagoua/Toukou d'autre part.

La figure 13 montre la distribution des échantillons de *B. globosus* par rapport au logarithme népérien de la distance géographique qui existe entre les habitats des bulins. La régression F_{ST} (1-F_{ST}) en fonction du logarithme népérien de la distance géographique montre une corrélation positive et significative (pente b, = 0,576, *P* = 0,0067) entre le niveau d'isolement des paires de populations et la distance géographique.

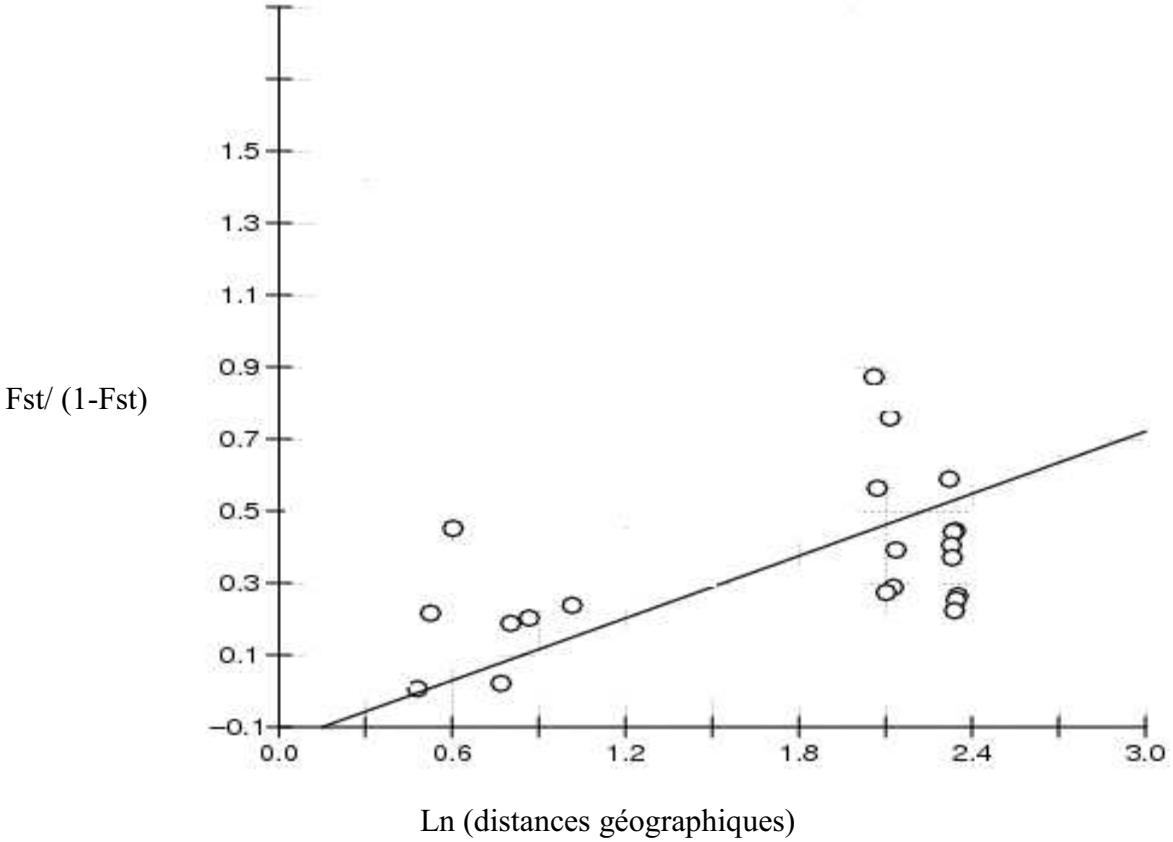


Figure 13 : la droite de régression de la distance de la diversité génétique des échantillons de *B. globosus* en fonction du logarithme népérien de la distance géographique entre les sites de récolte.

Le dendrogramme (Fig. 14) a été établi à partir des génotypes microsatellites et correspond aux échantillons de *B. globosus* récoltés en octobre 2009. Le dendrogramme montre que les distances génétiques sont relativement faibles car il s'agit des échantillons appartenant à la même espèce. On peut y distinguer deux grands groupes, Moutourwa et Djalingo d'une part et les autres d'autre part ; ces autres populations sont regroupées en 2 autres blocs, Yagoua et Toukou d'une part, Gounougou, Ouroudoukoudje et Bessoum d'autre part. Les populations Gounougou et Ouroudoukoudje d'une part et Yagoua et Toukou d'autre part ont une très grande similarité génétique. La figure 15 présente l'image satellitaire des différents sites de récoltes de *B. globosus*.

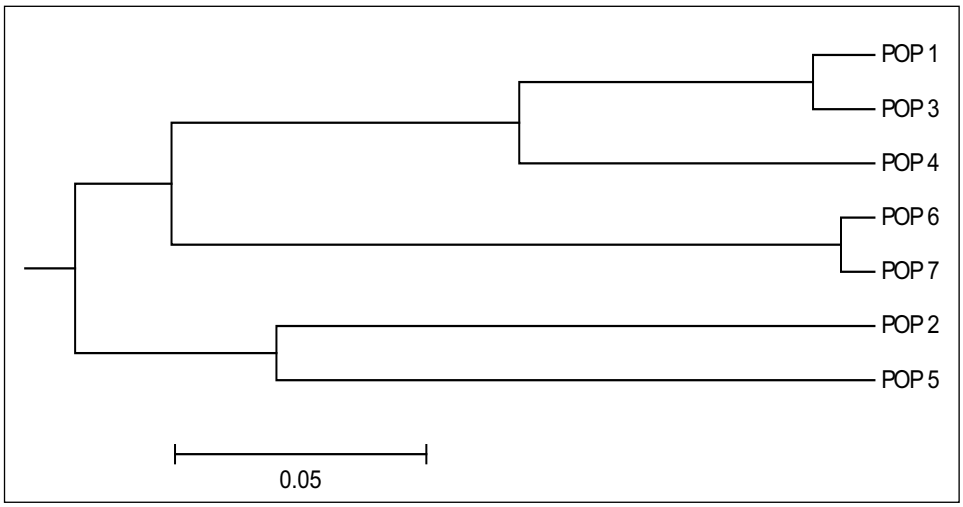


Figure 14 : Le dendrogramme des échantillons de *B. globosus* récoltés en octobre 2009. Populations (POP) : 1- Gounougou ; 2- Moutourwa ; 3- Ouroudoukoudje ; 4- Bessoum ; 5- Djalingo ; 6- Yagoua ; 7- Toukou.

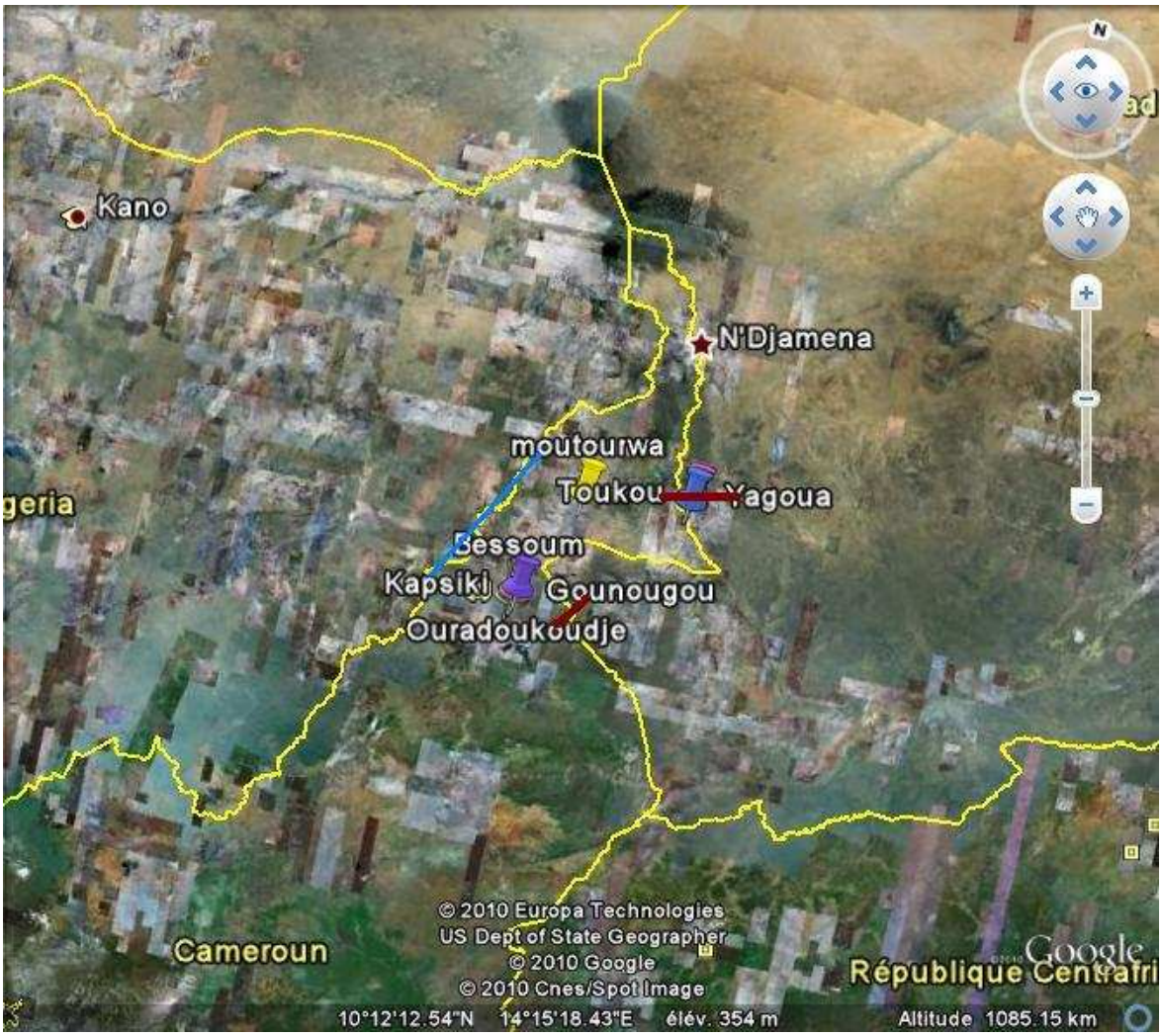


Figure 15 : La carte satellitaire des différents points de récoltes de *B. globosus* (en trait rouge est soulignée la proximité des sites de Gounougou et Ouroudoukoudje, de même que les sites de Yagoua et Toukou, et en trait bleu les sites Moutourwa-Djalingo) (Google Earth, 2010).

Une étude temporelle a été réalisée à partir de trois populations récoltées à différents moments (Gounougou, Moutourwa et Ouroudoukoudje) afin d'estimer la taille effective de la population (Ne) en tenant compte de trois générations par an (Brown, 1994). Les estimations temporelles de la taille effective de la population ont donné des résultats assez similaires pour les deux estimateurs utilisés (méthode des moments et la méthode en fonction du maximum de vraisemblance); les estimations vont de 7,4 à 34,1 (tableau XVII). Un intervalle de confiance 95% (CI) a été estimée en utilisant les valeurs de Ne. Il permet de quantifier le taux de perte de diversité génétique.

Tableau XVII : L'estimation temporelle de la taille effective de trois populations de *B. globosus* selon les méthodes de Wang (2001) et celle de Waple (1989) en tenant compte de trois générations par an

Méthode	Logiciel	Site de récolte	Ne [IC 95 %]
Maximum de vraisemblance	MLNE	Gounougou Moutourwa Ouroudoukoudje	12,49 [5,5-24,3] 14,24 [7,3-39,9) 14,24 [9,7-51,7]
Moment	Estimateur de Ne	Gounougou Moutourwa Ouroudoukoudje	13,3 [3,3-35,3] 7,4 [1,7-23,1] 31,7 [6,0-133,1]

IC : intervalle de confiance.

CHAPITRE IV :

DISCUSSION- CONCLUSION

PERSPECTIVES

Les objectifs de notre travail étaient doubles :

- D'une part, il était utile de déterminer la structure génétique des populations de *B. truncatus* provenant de différentes zones bioclimatiques afin d'expliquer l'hétérogénéité qui existe dans la transmission de la bilharziose urinaire au Cameroun.

- D'autre part, il était nécessaire d'analyser la structure génétique des populations de *B. globosus* provenant de la zone tropicale en vue de rechercher les relations possibles entre la structure génétique des mollusques hôtes intermédiaires et l'épidémiologie de la schistosomose urinaire dans cette zone.

Le premier temps de cet exposé correspond à une synthèse de nos résultats. La discussion sera consacrée d'abord aux populations de *B. truncatus*, puis à celles de *B. globosus.*

IV-1- Synthèse

Chez *B. truncatus*, les résultats obtenus suite à la révélation des loci microsatellites montrent qu'il existe un polymorphisme plus important que celui révélé avec l'utilisation des isoenzymes. On note également une absence totale d'hétérozygote, ce qui suggère que l'auto-fécondation est le mode de reproduction le plus fréquent chez cette espèce. De plus, la diversité génétique dans les populations est faible. Malgré cela, on constate une forte structuration des populations et un très faible flux de gènes entre elles indépendamment des distances géographiques.

Chez *B. globosus*, on note un polymorphisme faible mais plus important que celui trouvé avec les isoenzymes. Toutefois, il existe une plus grande diversité génétique dans les populations de *B. globosus* comparées à celles de *B. truncatus*. Des hétérozygotes ont été observés en relation avec un déficit en hétérozygotes moins prononcé que celui observé chez *B. truncatus*. On note une différenciation génétique importante entre les populations. Toutefois, certaines paires peuvent être considérées comme provenant d'un seul ascendant (il y a un flux de gènes plus important chez celles-ci).

IV-2- Discussion

IV-2-1- *Bulinus truncatus*.

Dans ce paragraphe, les résultats correspondant à chaque paramètre seront discutés séparément par rapport à la littérature.

IV-2-1-1 Le niveau de polymorphisme des loci microsatellites

Malgré le fait que *B. truncatus* soit une espèce allotétraploïde, la co-amplification des loci n'a jamais été observée si bien qu'ils ont été analysés comme des diploïdes (Viard *et al.,* 1996). Le niveau relativement élevé de polymorphisme que nous avons détecté dans ces populations indique qu'il existe une grande variabilité au sein de ces populations. Il est nettement plus important que celui qui a été trouvé chez *B. truncatus* lorsqu'on utilise des isoenzymes. En effet, plusieurs auteurs ont montré un nombre moyen des allèles compris entre 1 et 1,07 (Mimpfoundi et Greer, 1990a ; Jarne, 1995). Cette discordance montre l'importance des marqueurs microsatellites pour caractériser la structure génétique des populations, où le système de reproduction, notamment l'autofécondation et les grandes fluctuations dans la taille des populations entraîne une diminution de la taille effective de la population et, par la suite, une réduction du polymorphisme comme celle que Gow *et al.* (2004) ont trouvée chez *B. forskalii*.

Cependant, ce polymorphisme est inégal entre les loci ; le locus Bt 1 est fixé dans l'ensemble des échantillons tandis que les loci Bt 6, Bt 12 et Bt 13 montrent respectivement 5, 7 et 14 allèles. De même, les loci Bt 1 et Bt 6 sont monomorphes dans tous les échantillons alors que les Bt 12 et Bt 13 se révèlent polymorphes avec respectivement 7 et 14 allèles.

Ce niveau de polymorphisme corrobore les résultats de Chlyeh *et al.* (2002) qui ont noté l'existence de deux loci microsatellites polymorphes (sur un total de six étudiés) chez les populations marocaines de *B. truncatus,* mais cela est inférieur à celui que Viard *et al.* (1997) ont trouvé sur un échantillon de 37 populations originaires du Niger et de la Côte d'Ivoire. Ce degré important de polymorphisme inter populationnel peut également suggérer différents niveaux de flux de gènes.

IV-2-1-2- l'absence d'hétérozygotie- la diversité génétique et la taille effective

Nous n'avons trouvé aucun individu hétérozygote, ce qui est en accord avec les travaux que Mimpfoundi et Greer (1990) ont effectués sur les mêmes populations camerounaises en utilisant les isoenzymes. Cependant, la diversité génétique, même si elle est faible, est nettement plus élevée lors de notre étude que celle rapportée par les deux auteurs précités.

L'absence totale d'hétérozygotes chez les populations, que nous avons étudiées, suggère, en plus, que les taux d'autofécondation sont nettement plus élevés dans cette étude que dans les populations de *B. truncatus* étudiées par Viard *et al.* (1997) au Niger et en Côte d'Ivoire, ou dans celles suivies par Chlyeh *et al.* (2002) au Maroc. Dans ces dernières populations, l'hétérozygotie observée a varié de 0 à 0,24 et de 0 à 0,017 respectivement. Nos résultats sont en accord avec ceux de Njiokou *et al.* (1992b) qui ont montré chez les *B. globosus* du Niger et de la Côte d'Ivoire que le système de reproduction pouvait varier en fonction des populations.

Le déséquilibre de liaison n'a pu être étudié qu'entre les loci Bt 12 et Bt 13 avec un résultat non significatif. Cette absence de déséquilibre n'est pas conforme à la forte structuration de la population totale et témoigne ici de l'existence d'une autofécondation. Il est possible que cela soit dû à un effet inverse de l'effet Wahlund caractérisé dans ce cas par un excès d'homozygotes par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg comme celui qui a été décrit par Prugnolle et de Meeûs (2010) pour les populations de parasites fortement autofécondes.

Le calcul de la taille effective de la population (Ne) permet de résumer les effets de la dérive génétique, et de quantifier le taux de perte de la diversité génétique. Elle est généralement affectée par des périodes de forte réduction de la taille de la population (Caballero et Martinez 1994; Hartl et Clark 1997). La valeur de Ne chez les populations camerounaises de *B. truncatus* est d'environ 4. Elle est relativement faible, et est en accord avec les valeurs de Ne (de 4 à 37) trouvées chez l'espèce autoféconde *Lymnaea (Galba) truncatula* (Meunier et *al., 2004*). Par contre, il existe une discordance entre nos valeurs et celles rapportées par Arnaud et Laval (2004) chez l'espèce alloféconde *Helix aspersa* (valeurs de Ne allant de 6 à ∞) avec les mêmes méthodes de calcul. Chez les espèces autofécondes, la

taille effective de la population est réduite par rapport à celle notée chez les espèces allofécondes (Jarne 1995; Tachida 1996), ce qui renforce ainsi l'effet de la dérive génétique.

IV-2-1-3- La structuration des populations

D'après nos résultats, les différenciations entre les échantillons ne sont pas corrélées avec la distance géographique qui existe entre les sites de récolte. En fait, tout se passe comme s'il n'y avait pas d'échange de migrants entre les différents sites échantillonnés ou si cet échange était rare et se produisait de façon très aléatoire avec une Nm très faible. Nos résultats indiquent que les populations de *B. truncatus* étudiées dans le cadre de ce travail ne peuvent pas être considérées comme provenant d'un seul ascendant. En effet, elles sont proches sur le plan géographique mais elles semblent différenciées sur le plan génétique (Prugnole *et al., 2005*). Ce dernier point suggère que la dispersion des individus constituant une population serait très limitée dans l'espace chez *B. truncatus* et cette hypothèse se confirme avec les résultats de Viard *et al.* (1997) sur les populations correspondantes du Niger et de Côte d'Ivoire. La même observation est faite par d'autres auteurs chez *Lymnea (Galba) truncatula* (Meunier *et al.,* 2001) et chez *Biomphalaria pfeifferi* (Charbonnel *et al.,* 2002a).

Le fait que le flux génique est limité dans l'espace est en accord avec l'observation d'un modèle d'isolement par la distance comme celui qui a été décrit par Mavarez *et al.* (2002b) chez *Biomphalaria glabrata*.

Malgré les résultats que nous avons rapportés dans cette étude, il serait utile d'approfondir les recherches sur la structure des populations camerounaises car cela pourrait expliquer :

- *i)* comment le polymorphisme peut se maintenir dans chaque site malgré une petite taille apparente de chaque population et une forte autofécondation,

- *ii)* pourquoi il existe une faible diversité génétique au sein de ces populations.

Ces questions suggèrent qu'un flux génétique restreint joue un rôle important dans le maintien de la différenciation dans les foyers de transmission de la bilharziose urinaire au Cameroun, ce qui pourrait conduire à une adaptation particulière et locale entre les populations de *S. haematobium* et celles de leurs mollusques hôtes.

En fonction des résultats individuels fournis par la NJTree, chaque site serait colonisé par des individus très hétérogènes sur le plan génétique, même si les bulins sont regroupés en

fonction de l'emplacement géographique de leur habitat, avec des distances très importantes entre leurs milieux de vie. Cependant, l'utilisation d'autres loci plus polymorphes permettrait de mieux confirmer cette hypothèse.

Cette solide structuration génétique dans les populations de *B. truncatus* est très favorable au développement d'une relation profonde avec une souche locale de schistosomes conduisant à une co-évolution hôte-parasite, ce qui pourrait expliquer les variations géographiques que plusieurs auteurs (Vera *et al.,* 1990 ; Njiokou *et al.,* 2004) ont observées dans leur compatibilité vis-à-vis de *S. haematobium*

VI -2-2- *Bulinus globosus*

VI -2-2-1- Le niveau de polymorphisme dans les populations de *B. globosus* étudiées

Les marqueurs microsatellites utilisés dans cette étude sont d'un polymorphisme assez limité par rapport à ceux trouvés chez d'autres Gastéropodes d'eau douce comme *B. truncatus* et *B. glabrata* (Viard *et al.,* 1996, 1997 ; Mavarez *et al.,* 2002a). En effet, la richesse allélique varie peu (3 à 5 allèles). Malgré ce dernier point, le polymorphisme est plus important que celui que Mimpfoundi et Greer (1990) ont trouvé sur les mêmes populations en utilisant les isoenzymes. En effet, sur les 15 loci isoenzymatiques utilisés chez *B. globosus*, seuls deux présentaient des variations interpopulationnelles.

Le niveau de polymorphisme, que nous avons noté dans le cadre de ce travail, est en accord avec celui que Wilkinson *et al.* (2007) ont rapporté chez des populations de *B. globosus* provenant du Zimbabwe en utilisant les mêmes marqueurs. Plusieurs facteurs peuvent permettre d'expliquer ce niveau de polymorphisme, comme les systèmes de reproduction, la dérive génétique ou le taux de migration. Des résultats similaires ont été trouvés chez *Biomphalaria pfeifferi* de Madagascar (Charbonnel *et al.,* 2002a). Il est plus faible chez les populations de Bessoum avec deux loci qui se sont révélés totalement monomorphes. Cette population a montré un taux d'autofécondation important (0,8). L'autofécondation est reconnue pour diminuer le nombre d'hétérozygotes, mais aussi de faire baisser la variabilité car elle amplifie l'action de la dérive génétique (Charlesworth, *et al.,* 1993).

De plus, la perte de polymorphisme peut être due aux expériences de sécheresse et d'inondations qui affectent considérablement les habitats des mollusques et par conséquent la

taille des populations (Brown, 1994) entraînant ainsi une diminution de la taille effective de la population et, par la suite, une réduction du polymorphisme.

VI -2-2-2- Le déficit en hétérozygotes et la diversité génétique

Notre étude met en évidence un important déficit en hétérozygotes et ceci peut résulter de divers phénomènes comme des croisements non aléatoires, l'autofécondation, l'existence de goulots d'étranglement ou des fluctuations annuelles drastiques pour certaines populations. Cette dynamique drastique des populations peut s'appliquer ainsi aux *B. globosus* vivant dans la zone tropicale sèche du Cameroun (Ngonseu *et al.,* 1992, Tsafack, 1997). Si l'on considère la littérature sur le déficit en hétérozygotes chez les Planorbidae, on constate que notre résultat corrobore celui que Wilkinson *et al.* (2007) ont trouvé chez les *B. globosus* du Zimbabwe. D'autres travaux vont dans le même sens comme ceux de Viard *et al.* (1996, 1997) chez les *B. truncatus* de Côte d'Ivoire et du Niger, ceux de Chyleh *et al.* (2002) chez la même espèce au Maroc, ou encore ceux de Charbonnel *et al.* (2002a) et d'Angers *et al.* (2003) chez les *Biomphalaria pfeifferi* de Madagascar où les taux d'autofécondations sont très élevés.

Malgré le faible polymorphisme relevé, on note une diversité génétique importante chez les populations camerounaises de *B. globosus* et cette dernière est plus élevée que celle que l'on prévoit pour une espèce lorsqu'elle occupe divers types d'habitats assez instables (Pollak, 1987 ; Cutter et Payseur, 2003). La diversité génétique est un phénomène important dans les processus de co-évolution et elle joue un rôle important pour la sélection, l'adaptation et ou la divergence conduisant à la spéciation des espèces. Plusieurs facteurs, peuvent l'affecter telles que la dérive génétique, la sélection, la migration et la dynamique des populations, la diversité (Barton et Whitlock 1997; Pannell et Charlesworth 2000*)*

En effet, ce niveau de diversité chez *B. globosus* a été déjà noté chez des Mollusques d'eau douce à reproduction croisée comme *Physella acuta* (où He est de 0,43 d'après Bousset *et al.* en 2004) ou *B. truncatus,* espèce très autoféconde (où He moyen est de 0,35 d'après Viard *et al.* en 1996). Dans le même sens, Mavalrez *et al.* (2002a) ont noté une He moyenne égale à 0,6 chez l'espèce alloféconde *B. glabrata*. Cependant, ce n'est pas toujours le cas car Wilkinson *et al.* (2007) ont trouvé une He variant de 0,134 à 0, 298 (donc nettement plus faible) chez les *B. globosus* du Zimbabwe.

Comme on peut le constater ci-dessus, la diversité génétique entre les espèces est difficile à comparer en raison du taux de mutation très variable des marqueurs microsatellites.

Les taux d'autofécondation élevés peuvent réduire la diversité génétique des populations (Holsinger, 2000). Ceci a été prouvé chez les populations de Bessoum avec un

taux élevé d'autofécondation 0,8, et une He = 0,31. Cependant, le système de reproduction ne semble pas être le seul facteur réduisant la diversité génétique ; les goulots d'étranglement peuvent également la réduire. On note une diversité génétique faible chez les populations de Moutourwa et Yagoua, en effet ces deux sites sont des mares temporaires qui connaissent des phénomènes d'extinction et de colonisation subissant une forte variation démographique de leurs populations en accord avec les travaux réalisés chez les Mollusques d'eau douce des zones tropicales (Städler et Jarne 1997; Viard *et al.* 1996)

Cependant, la forte variation des valeurs d'He peut être une preuve indirecte de l'instabilité des habitats dans le temps. En effet, les variations quantitatives des Gastéropodes d'eau douce ont un effet plus important sur la variabilité de la diversité génétique que le système de reproduction comme cela a été décrit chez *B. pfeifferi* (Charbonnel *et al.,* 2002a, b).

Un déséquilibre de liaison a été observé entre la paire de loci Bgz 1 et Bgz 4 chez les populations de Yagoua et Toukou. Cela peut-être la conséquence de plusieurs facteurs tels que la taille effective de la population finale, la migration ou le système de reproduction (Hedrick, 1985) notamment le taux d'autofécondation. Chez ces deux populations, on note un important flux de gènes entre les deux sites (Nm= 17,3). De plus, ils occupent des milieux temporaires et sont sujets à des variations démographiques de leur population, en fonction de la permanence de la quantité d'eau dans les sites (Jarne, 1995; Städler et Jarne 1997). Des observations antérieures ont montré que des phénomènes d'extinction et de re-colonisation des habitats au fil du temps (Vareille-Morel *et al.,* 2002) et ces événements pourraient aussi expliquer en partie l'ampleur du déséquilibre de liaison qui existe entre les paires de loci chez les populations qui connaissent des forts goulots d'étranglement tels que ceux dont les habitats sont les mares temporaires.

VI -2-2-3- Le taux d'autofécondation et la taille effective de la population

En règle générale, les mollusques d'eau douce sont soit préférentiellement autoféconds ou alloféconds et ont tendance à ne pas adopter les deux stratégies de reproduction (Jarne et Städler, 1995). Chez les *B. globosus* du Cameroun, la valeur du taux d'autofécondation trouvée dans notre étude est de 0,57 et ce chiffre est en accord avec ceux de Wilkinson *et al.* (2007) chez les *B. globosus* du Zimbabwe. Notre valeur est faible par rapport aux taux trouvés chez des espèces essentiellement autofécondes comme les *B. truncatus* du Cameroun (S = 1, voir le chapitre trois) ou ceux de Côte d'Ivoire et du Niger (S = 0,89 d'après Viard *et al.* en

1996 et 1997). Chez *B. pfeifferi*, le taux varie de 0,86 à 0,94 (Charbonnel *et al.,* 2002a, b) et est de 0,95 chez *Lymnea (Galba) truncatula* (Meunier *et al.,* 2001). A l'inverse, notre valeur est nettement plus élevée que celles trouvées chez *Biomphalaria glabrata* (0,04 à 0,05 d'après Malvarez *et al.* en 2002a, b).

Un taux d'autofécondation élevé est généralement associé à une faible diversité génétique comme chez *B. truncatus* et *B. pfeifferi* (Viard *et al.,* 1996, 1997 ; Charbonnel *et al.,* 2002a). A l'inverse, une diversité génétique importante s'observe avec un taux faible d'autofécondation comme chez *B. glabrata* (Malvarez *et al*., 2002a, b). Cependant ce n'est pas le cas de nos populations où les valeurs sont dans la moyenne. Un taux d'autofécondation intermédiaire a déjà été noté chez *P. acuta* (Bousset *et al.,* 2004). Ce taux moyen d'autofécondation chez *B. globosus* suggère qu'il serait un hermaphrodite partiellement autofécond. Cette hypothèse s'appuie sur les travaux de Wilkinson *et al.* (2007) sur les *B. globosus* du Zimbabwe. D'après ces auteurs, cette dernière espèce est partiellement autoféconde mais elle pratique également l'allofécondation comme le montre l'étude de Jarne *et al.* (1991).

De plus, les tests de probabilité combinée sur tous les loci ont révélé un écart important par rapport aux attentes de Hardy-Weinberg pour toutes les populations ($P < 0{,}005$). Comme *B. globosus* est une espèce hermaphrodite, ces résultats peuvent s'expliquer par l'autofécondation partielle décrite chez cette espèce (Jarne *et al.,* 1991), contrairement aux travaux chez l'espèce alloféconde *B. glabrata* où on note un écart plus important ($P < 0{,}0001$) (Mavarez et *al.,* 2002a).

L'autofécondation et les fluctuations probables de la taille de la population peuvent contribuer à des variations de la diversité génétique et par là celle de la taille effective de la population. Nos valeurs de Ne trouvées varient de 7,4 à 34, et sont faibles. Ceci est en accord avec celles trouvées chez l'espèce autoféconde *G. truncatula* (Meunier *et al.,* 2004) et celles décrites chez les populations camerounaises de *B. truncatus* (cf. première partie de la discussion). Les grandes différences de Ne peuvent apparaître si des événements d'extinction / re-colonisation sont fréquents.

VI -2-2-4-La structuration des populations

Les différents niveaux de différenciation génétique observés chez *B. globosus* indiquent que trois populations de cette espèce sont structurées alors que les quatre autres (Gounougou, Ouroudoukoudje, Toukou, Yagoua) ne le sont pas.

Même si les trois premières populations sont proches les unes des autres sur le plan géographique, elles apparaissent génétiquement différenciées. Ces résultats confirment le niveau élevé de différenciation qui est prévu lorsque des populations sont autofécondes et qu'il y a des goulots d'étranglement, ce qui augmente l'impact de la dérive génétique sur la structure correspondante (Viard *et al.,* 1996, 1997 ; Meunier *et al.*, 2001 ; Charbonnel *et al.,* 2002a, b, ; Trouvé *et al.,* 2003). Ces niveaux élevés de différenciation génétique peuvent se justifier par le fait que le flux génique est restreint entre certaines populations, ce qui sous-entend qu'il n'est pas le facteur principal maintenant un niveau élevé de diversité génétique au sein des populations de bulins.

Bulinus globosus occupe des habitats transitoires dans lesquels la disponibilité en eau (volume et surface) varie considérablement d'une saison à l'autre. Des échanges entre les populations peuvent se produire durant les saisons des pluies de sorte que la dynamique des étangs peut expliquer en partie la structuration des populations entre les bassins proches. Gounougou et Ouroudoukoudje sont deux lacs permanents reliés par des cours d'eau continus et séparés de 3 km générant un flux de gènes très important (Nm = 40,99). Une certaine homogénéité a été observée chez ces échantillons qui peuvent être considérés comme une seule population, ce qui est confirmé par l'étude temporelle réalisée (Tableau XV**)** sur les échantillons de Gounougou et Ouroudoukoudje récoltés en 2008, qui ne présente aucune différenciation génétique entre cette paire de site.

On parlera de **contraction –expansion.** De plus, on peut invoquer le remplacement progressif des populations locales de *B. truncatus* par *B. globosus* (observation personnelle) alors que *B. truncatus* était le principal hôte intermédiaire dans ces localités (Njiokou *et al.,* 2004 ; Djuikwo-Teukeng, 2005).

De même la réduction de la taille des mares temporaires (Toukou-Yagoua), qui sont deux sites temporaires séparés d'environ six kilomètres pendant la saison sèche, peut permettre certains contacts entre les populations : on parle **d'extinction et de re-colonisation** processus qui peut être également à l'origine d'un flux de gènes important (Nm = 17,38). On peut émettre l'hypothèse que les bulins vivant dans ces deux sites peuvent être considérés comme venant d'un même pool génétique.

Chez *B. globosus*, la dispersion efficace des mollusques par flottaison et, par suite, de leurs gènes semble se limiter à de petites distances géographiques entre les habitats des bulins et ceci est en accord avec les travaux de Woolhouse, 1988 chez la même espèce et de Malvarez *et al.* (2002a, b) chez *B. pfeifferi*. Il n'est pas rare que ce type de dispersion soit noté

dans des cours d'eau permanents où les populations de mollusques vivent toute l'année (c'est le cas de Gounougou et d'Ouroudoukoudje où les bulins sont moins sujets à des phénomènes d'extinction et de re-colonisation).

La NJTree permet de confirmer les résultats obtenus à partir de la F_{ST} : en effet, les sites de Gounougou et d'Ouroudoukouje sont colonisés par les mêmes populations de même que ceux de Toukou et Yagoua ; de plus, la différenciation génétique est liée à l'isolement par la distance pour toutes les populations.

La structuration génétique de ses deux espèces à savoir *B. truncatus* et *B. globosus* permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle *B. truncatus* serait une espèce implantée depuis longtemps sur le territoire camerounais en raison de la forte structuration génétique entre les populations alors que *B. globosus* serait d'introduction plus récente. Et par là, pourrait expliquer que cette espèce soit l'hôte intermédiaire principal de *S. haematobium* aussi bien en zone tropicale qu'équatoriale (Greer *et al.,* 1990 ; Djuikwo-Teukeng, 2005)

VI-3- Conclusions générales et perspectives

L'étude de la structure génétique aussi bien de l'hôte que du parasite comme l'estimation du flux de gènes entre les populations sont essentielles pour comprendre les interactions entre les deux membres du couple hôte-parasite.

Nous nous sommes intéressés dans ce travail à la structure génétique des populations de deux mollusques d'eau douce, hôtes intermédiaires de *S. haematobium* au Cameroun. En effet, il était intéressant de voir s'il existait une relation entre *i)* la structure génétique des populations naturelles de *B. truncatus* et de *B. globosus,* et *ii)* l'hétérogénéité qui existe dans la transmission de la schistosomose urinaire dans ce pays. Cette analyse a été réalisée grâce à des marqueurs génétiques microsatellites polymorphes.

Dans le cas de *B. truncatus*, nous nous sommes servis de quatre loci microsatellites pour analyser la variabilité de sept populations provenant de diverses zones biogéographiques. Notre travail a permis de montrer une hétérozygotie nulle et un fort taux d'autofécondation, ce qui indique que les populations de *B. truncatus* du Cameroun étudiées sont totalement autofécondes. De plus, cette étude a permis de mettre en évidence : *i*) une forte structuration génétique entre les populations, et *ii*) un flux de gènes très limité. Ces divers facteurs permettent d'expliquer le maintien de la diversité génétique au sein de ces *B. truncatus* et ceci pourrait expliquer l'hétérogénéité existant dans la transmission de la schistosomose urinaire dans les foyers où *B. truncatus* est l'hôte intermédiaire principal. Cette différentiation génétique entre les populations de *B. truncatus* n'étant pas modulée par la distance géographique, mais plutôt par la dérive génétique et l'autofécondation, deux populations hôtes intermédiaires de *S. haematobium* appartenant à des villages rapprochés peuvent sélectionner des gènes différents de sensibilité à ce parasite.

Chez *B. globosus*, nous avons également utilisé quatre loci microsatellites pour analyser sept populations naturelles de la zone tropicale. Malgré le faible polymorphisme des loci, on observe une importante diversité génétique dans les populations**.** L'analyse a montré un déficit en hétérozygotes, ce qui indique que les populations camerounaises pratiquent aussi bien l'autofécondation que l'allo fécondation comme mode de reproduction. Certaines paires de populations sont structurées sur le plan génétique alors que d'autres ne le sont pas. Un important échange de gènes a été mis en évidence entre certains échantillons de *B. globosus*. Chez cette espèce, cette dispersion efficace des mollusques, donc de leurs gènes semble se limiter à de petites distances géographiques entre les habitats des bulins.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'aspect "mollusques" de la co-évolution dans le couple bulins-schistosomes. Il serait judicieux :

- d'étudier la structure génétique des populations de *B. camerunensis* et de *B. senegalensis* car ces deux espèces sont aussi des hôtes intermédiaires de la schistosomose urinaire au Cameroun. Cette première partie pourrait être réalisée dans les six prochains mois, notamment pour l'espèce *B. camerunensis* que l'on retrouve dans deux lacs de cratère avec des prévalences élevées (69,9 %) de schistosomose urinaire.

- de compléter ce travail en analysant les relations entre la structure génétique des populations de mollusques et leur sensibilité à l'infestation expérimentale par *S. haematobium* au laboratoire par l'intermédiaire de trois axes :

- *i*) réaliser des infestations croisées entre les deux partenaires en soumettant des *B. globosus* ou des *B .truncatus* à des isolats de miracidiums provenant de régions géographiques différentes de celles où les mollusques ont été récoltés.

- *ii)* comparer la structure génétique multilocus des individus sensibles ou réfractaires à *S. haematobium.* Cela devrait permettre de vérifier la relation qui existe entre la sensibilité au parasite et la structure génétique du mollusque.

- *iii)* il serait intéressant d'étudier également la structure génétique des populations de *S. haematobium* à l'aide des marqueurs polymorphes.

La connaissance de la variabilité génétique des populations aussi bien des schistosomes que des mollusques hôtes intermédiaires permettraient de proposer une nouvelle voie pour le contrôle de la maladie. La mise en œuvre de nouvelles approches moléculaires sera d'une importance capitale pour évaluer l'impact des stratégies de lutte contre la schistosomose.

Références bibliographiques

Adoubryn, K.D., Allah-Kouadio, E., Penali, L.K., Ouhon, J., Kone, M., 1997. Prévalence des porteurs d'œufs de *Schistosoma haematobium* chez des patients hématuriques en Côte d'Ivoire. *Médecine d'Afrique Noire*, 44, 440-443.

Andrews, S.T., 1999. The life cycle of *Fascioa hepatica*. *In* : Dalton, J.P., éd., *Fasciolosis*. CABI Publishing, Oxon, 1-29.

Angers, B., Charbonnel, N., Galtier, N., Jarne, P., 2003. The influence of demography, population structure and selection on molecular diversity in the selfing freshwater snail *Biomphalaria pfeifferi*. *Genetical Research***,** 81, 193-204.

Arnaud, J.F**.** et Laval, G. 2004. Stability of genetic structure and effective population size inferred from temporal changes of microsatellite DNA polymorphisms in the land snail *Helix aspersa* (Gastropoda: Helicidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 82, 89-102.

Bartley, D., Bagley, M., Gall, G., Bentley, B., 1992. Use of linkage disequilibrium data to estimate effective size of hatchery and natural fish populations. *Conservation Biology* 6, 365–375.

Barton, N. H. et Whitlock, M.C., 1997. The evolution of metapopulations, *in Metapopulation Dynamics: Ecology, Genetics, and Evolution*, edited by I. HANSKI and M. GILPIN. Academic Press, San Diego. 183–210pp.

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* Krauss e *Mandahlbarthia* gen. nov. rendiconti della classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali. *Accademia Nazionale dei Lincei,* 66**,** 276-282.

Botstein, D., White, K.D., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980**.** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32, 314-331**.**

Bousset, L., Henry, P.Y., Sourrouille, P., Jarne, P., 2004. Population biology of the invasive freshwater snail *Physa acuta* approached through genetic markers, ecological characterization and demography. *Molecular Ecology*, 13:2023-2036.

Brooker, S., Donnely, C.A., Gyatt, H.L., 2000. Estimating the number of helmintic infections in the Republic of Cameroon from data on infection prevalence in school children. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé*, 34, 15-18.

Brown, D.S., 1994. *The freshwater snails of Africa and their medical importance*. 2ème édit. Taylor and Françis Ltd, London, 606 p.

Brown, D.S., Kristensen, T.K., 1993. *A field guide to African Freshwater snails. 1. West African species*. Danish Bilharziasis Laboratory, Charlottenlund, 55 p.

Buth, D.G. et Murphy, R.W., 1999. The use of isozyme characters in systematic studies. *Biochemical Systematics and Ecology***,** 27**,** 117-129.

Caballero- Mellado, J., et Martinez –Romero, E., 1994. Limited Genetic Diversity in the Endophytic Sugarcane *Bacterium Acetobacter diazotrophicus*. *Applied and environmental microbiology* ,60, 1532-1537.

Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W.F., 1967. Phylogenetic analysis: model and esti- mation procedures. *American Journal of Human Genetics*, 19, 233–257

Charbonnel, N., Angers, B., Rasatavonjizay, R., Bremond, P., Debain, C. et Jarne, P. 2002a. The influence of mating system, demography, parasites and colonization on the population structure of *Biomphalaria pfeifferi* in Madagascar. *Molecular Ecology* 11, 2213–2228.

Charbonnel, N., Angers, B., Rasatavonjizay, R., Bremond, P. et Jarne, P. 2002b. Evolutionary aspects of the metapopulation dynamics of *Biomphataria pfeifferi*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni. Journal Evolution Biology* 15, 248–261.

Charlesworth, D., Charlesworth, B., 1999. The genetic basis of inbreeding depression. *Genetic Research*. 74:329-340

Charlesworth, B., M. T. Morgan, and Charlesworth D. 1993"The Effect of deleterious mutations on Neutral Molecular Variation." *Genetics,* 34, 1289-1303.

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

Chlyeh, G., Henry, P.H., Sourrouille, P., Delay, B., Khallaayoune, K., Jarne, P., 2002. Population genetics and dynamics at short spatial scale in *Bulinus truncatus*, the intermediate host of *Schistosoma haematobium* in Morocco. *Parasitology*, 125, 349-357.

Combes, C., 1985. L'analyse de la compatibilité schistosomes-mollusques vecteurs. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 78**,** 742-746.

Combes, C., 1991. Evolution of parasite life cycles. *In* :" *Parasite-host association. Coexistence or conflict* "? (Eds C. A. Toft, A. Aeschlimann and L. Bolis). Oxford Science Publications, Oxford, 62-82.

Coombs, J.A., Letcher, B.H., Nislow, K.H., 2008. CREATE: a software to create input files from diploid genotypic data for 52 genetic software programs. *Molecular Ecology Ressources*, 8, 578-580.

Criscione, C.D., Blouin, M.S., 2006. Minimal selfing, few clones, and no among-host genetic structure in a hermaphroditic parasite with asexual larval propagation. *Evolution,* 60, 553-562.

Cunin, P., Poste, B., Djibrilla, K., Martin, P.M.V., 2001. Les schistosomoses dans le bassin de la Bénoué (Nord Cameroun). *Bulletin de Liaison et de Documentation OCEAC* 2001, 34, 15-18.

Cunin, P., Tchuem Tchuente, L.A., Djibrilla, K., Martin, P.M.V., 2003. Interactions between *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni* in humans in north Cameroon. *Tropical Medicine and International Health*, 8, 1110-1117.

Cutter, A.D., Payseur, B.A., 2003. Rates of deleterious mutation and the evolution of sexing Caenorhabditis. *Journal of Evolutionary Biology,* 13, 812-822.

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.

De Meeûs, T., McCoy, K.D., Prugnolle, F., Chevillon, C, Durand, P, Hurtrez-Boussès, S., 2007. Population genetics and molecular, epidemiology or how to "débusquer la bête". *Infection, Genetics and Evolution*, 7, 308-332.

De Meeûs, T., Guégan, J.F., Teriokhin, A.T., 2009. MultiTest V.1.2, a program to binomially combine independent tests and performance comparison with other related methods on proportional data. *BMC Bioinformatics*, 10, 443.

Dieringer, D.,Schlötterer, C.,2002.Microsatellite analyser (MSA): a plat form independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3, 167–169.

Djuikwo Teukeng, F.F., 2005. *Les couples bulins /* Schistosoma haematobium *: compatibilité, chronobiologie cercarienne et action du parasite sur la croissance, la fécondité et l'immunologie des hôtes intermédiaires.* Thèse de Doctorat de 3^{e} cycle. Yaoundé I, 98 p.

Dogmo, A., 1995 - *Impact du barrage de Lagdo sur les bilharzioses humaines*. Mémoire de Maîtrise, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I, 38 pp.

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. Presses Universitaires de Bordeaux, 399pp.

Duke, B.O., Moore, P.J., 1976. The use of molluscicide in conjunction with chemotherapy to control *Schistosoma haematobium* at the Barombi Lake foci in Cameroon. II. Urinary examination methods, the use of niridazole to attack the parasite in man and the effect on transmission from man to snail. *Tropenmedizin und Parasitologie*, 27, 489-504.

Duncan, C.I., 1975. Reproduction. *In* : Fretter, V., Peake, J., eds,. *Pulmonates.* Vol. 1, *Functional Anatomy and Physiology.* Academic Press, London, 309-365.

Emery, A.M., Loxton, N.J., Stothard, R., Jones, C.S., Spinks, J., Llewellyn-Hughes, J., Noble, L.R., Rollinson, D., 2003. Microsatellites in the freshwater snail *Bulinus globosus* (Gastropoda: Planorbidae) from Zanzibar**.** *Molecular Ecology Notes*, 3, 108-110.

Frandsen, F., 1979. Studies on the relationships between *Schistosoma* and their intermediate hosts. II. The genus *Bulinus* and *Schistosomaa haematobium* from Sudan, Zaire and Zambia. *Journal of Helminthology*, 53, 205-212.

Geraerts, W.P.M. et Joosse, J. 1984. Freshwater snails (Basommatophora). In: *The Mollusca. Reproduction* (A. S. Tompa, N. H. Verdonk et J. A. M. van den Biggelaar, eds), pp. 142-208. Academic, London.

Gentilini, M., Duflo, B., 1986. *Médecine Tropicale*. Edition Flammarion, Paris, 839 p.

Goldman, M.A., Loverde, P.T., Chrisman, C.L., 1983. Hybrid origin of polyploidy in fresh-water snails of the genus *Bulinus* (Mollusca: Planorbidae). *Evolution*, 37, 592-600.

Goudet, J., 1995. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86, 485-486.

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. *Molecular Ecology*, 13, 3561-3573.

Greer, G.J, Mimpfoundi, R., Malek, E.A., Joky, A., Ngonseu, E., Ratard, R.C., 1990. Schistosomiasis in Cameroon. II. Distribution of snails hosts. *American Journal of Tropical Medecine and Hygiene,* 42**,** 561-572.

Hamza, F., Jarne, P., Delay, B., Kechemir, N., 2005. Variabilité génétique et systèmes de reproduction chez *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827) d'Algérie. *Haliotis*, 35, 13-18.

Hedrick, P.W., 1985. Genetics of populations. Boston, Jones and Bartlett.

Hedrick, P.W., 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution,* 59, 1633-1638.

Henricksen, U.B., Jelnes, J.E., 1980. Experimental taxonomy of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae). I. Methods for experimental taxonomic studies on *Biomphalaria* carried out by horizontal starch gel electrophoresis and staining of 12 enzymes. *Journal of Chromatography,* 188, 169-176.

Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K., 1996**.** *Molecular systematics*. 2ème édit. Sinauer Associates Inc., Sunderland, 655 p.

Holsinger, K.E. 2000. Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 97: 7037-7042.

Ibahioin, K., Chellaoui, I A., Lakhdar, A., Hilmani, S., Naja, A., Sami, A., Achouri, M., Ouboukhlik, A., El Kamar, A., El Azhari, A., 2004. La bilharziose cérébelleuse : à propos d'un cas. *Neurochirurgie*, 50, 61-65.

Jarne, P., 1995. Selfing rates, bottlenecks and genetic polymorphism in hermaphroditic animals. *Genetical Research*, 65, 193-207.

Jarne, P., Charlesworth, D., 1993. The evolution of the selfing rate in functionally hermaphrodite plants and animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 441-466.

Jarne, P., Lagoda, J.L., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11, 424-429.

Jarne, P., Stadler, T., 1995. Population genetic structure and mating system evolution in freshwater pulmonates. *Experientia*, 51, 482-497.

Jarne, P., Théron, A., 2001. Genetic structure in natural populations of flukes and snails: a practical approach and review. *Parasitology,* 123, S27-S40.

Jarne, P., Finot, L., Delay, B., Thaler, L., 1991. Self-fertilization versus cross-fertilization in the hermaphrodite snail *Bulinus globosus. Evolution*, 45, 1136-1146.

Jarne, P., Viard, F., Delay, B., Cuny, G., 1994. Variable microsatellites in the highly selfing snail *Bulinus truncatus* (Basommatophora: Planorbidae). *Molecular Ecology*, 3, 527-528.

Jeffreys, A. J., Wilson, V., Thein, S.L., 1985. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314, 67-73.

Jelnes, J.E., 1979. Taxonomic studies of *Bulinus* using isoenzyme electrophoresis with special reference to the *africanus* group on the Kano plain, Kenya. *Malacologia*, 18, 147-149.

Jelnes, J.E., 1985. Experimental taxonomy of *Bulinus* - past and future activities. *Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Forening i Kobenhavn*, 146, 85-100.

Jelnes, J.E., 1986. Experimental taxonomy of *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae): the West and North African species reconsidered, based upon an electrophoretic study of several enzymes per individual. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 87, 1-26.

Jones, C.S., Noble, L.R., Lockyer A.E., Brown, D.S., Rollinson, D., 1997.Species-specific primers discriminate intermediate hosts of schistosomes. Unambiguous PCR diagnosis of *Bulinus forskalii* group taxa (Gastropoda: Planorbidae). *Molecular Ecology*, 6:263-269.

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.

Hartl, D., L., et Clark, A. G. 1997. *Principles of population genetics*. 3rd ed. Sunderland, Massachusetts, Sinauer, 540 pp.

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. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150–163.

Langand, J., Barral, V., Delay, B., Jourdane, J., 1993. Detection of genetic diversity within snail intermediate hosts of the genus *Bulinus* by using random amplified polymorphic DNA markers (RAPDs). *Acta Tropica*, 55, 205-215.

Larambergue, M. de, 1939. Etude de l'autofécondation chez les Gastéropodes Pulmonés : recherches sur l'aphallie et la fécondation chez *Bulinus (Isidora) contortus* Michaud. *Bulletin Biologique de France et de Belgique*, 73, 19-23.

Lebreton, J.D., Burnham, K.P., Clobert, J., Anderson, D.R., 1992. Modelling survival and testing biological hypotheses using marked animals: a unified approach with case studies. *Ecological Monographs*, 62**,** 67-118.

Letouzey, R., 1985. *Notice de la carte phytogéographique du Cameroun au 1/1.500.000*. Institut Cartographique International de Toulouse, 6 feuilles, 240 p.

Macedo, A.M., Pimenta, J.R., Aguiar, R.S., Melo, A.I., Chiari, E., Zingales, B., Pena, S.D., Oliveira, R.P., 2001. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,* 96, 407-413.

Madsen, H., 1984. The effect of water conditioned by either *Helisoma duryi* or *Biomphalaria camerunensi*s on the growth and reproductive of juvenile *B. camerunensis* (Pulmonata, Planorbidae). *Journal of Applied Ecology*, 21, 757-772.

Manning, S.D, Woolhouse, M.E.J., Ndamba, J., 1995. Geographic compatibility of the freshwater snail *Bulinus globosus* and schistosomes from the Zimbabwe Highveld *International Journal for Parasitology*, 25, 37-42.

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

Mavarez, J., Pointier, J.P., David, P., Delay, B., Jarne, P., 2002b. Genetic differentiation, dispersal and mating system in the schistosome-transmitting freshwater snail *Biomphalaria glabrata. Heredity*, 89, 258-265.

Maynard Smith, J., 1978. Optimization theory in evolution. *Annual Review* of *Ecology and Systematics*, 9, 31-56.

Meunier, C., Tirard, C, Hurtrez-Boussès, S. Durand P., Bargues M.D., Mas-Coma S.,Pointier J.P., Jourdane J., et Renaud F., 2001. Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. *Molecular Ecology*, 10, 1333-1340.

Meunier, C., Hurtrez-Boussès, S., Jabbour-Zahab, R., Durand, P., Rondelaud, D., Renaud, F., 2004. Field and experimental evidence of preferential selfing in the freshwater mollusc *Lymnaea truncatula* (Gastropoda, Pulmonata). *Heredity,* 92, 316-322.

Mimpfoundi, R., 1991. *Variations génétiques intra- et interpopulationnelles chez les Planorbidae tropicaux : le polymorphisme enzymatique dans les genres* Biomphalaria *Preston, 1910 et* Bulinus *Müller, 1781 au Cameroun*. Thèse de Doctorat d'Etat, Yaoundé I, 219 p.

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.

Mimpfoundi, R., Greer, G.J., 1990b Allozyme variation among populations of *Bulinus forskalii* (Ehrenberg, 1831) (Gastropoda: Planorbidae) in Cameroon. *Journal of Molluscan Studies*, 56, 363-371.

Mott, K.E., Dixon, H., Osei-Tutu, E., England, C.E., 1983. Relation between intensity of *Schistosoma haematobium* infection and clinical haematuria and proteinuria. *The Lancet*, 321, 1005-1008.

Mouchet, F., Théron, A., Bremond, P., Sellin, E., Sellin, B., 1992. Pattern of cercarial emergence of *Schistosoma curassoni* from Niger and comparison with three sympatric species of schistosomes. *Journal of Parasitology*, 78, 61-63.

Moyou-Somo, R., Tagni-Zukam, D., Kouamouo, J., Enyong, P., Ripert, C., 1987. Epidemiologic and radiologic study of urinary bilharziasis in the focus of Barombi Lake (Meme Department), Cameroon. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique,* 80, 813-825.

Murphy, R.W., Sites, J.W., Buth, J.R., Buth, D.G., Haufler, C.H., 1990. Proteins. I. Isozyme electrophoresis. *In* : Hillis, D.M., Moritz, C., eds., *Molecular systematics.* Sinauer Associates Inc., Sunderland, 45-126.

Nei, M., 1977. F-statistics and the analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*, 41, 225-233.

Nei, M., Chesser, R.K., 1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Annals of Human Genetics*, 47, 253-259.

Neigel, J.E., 1997. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Annual Review of Evolution, Ecology and Systematics,* 28, 105-128.

Neigel, J.E., 2002. Is F_{ST} obsolete? *Conservation Genetics*, 3, 167-173.

Ngonseu, E., Greer, G.J., Mimpfoundi, R., 1992. Dynamique des populations et infestation de *Bulinus truncatus* et *Bulinus forskalii* par les larves de schistosomes en zone soudano sahelienne au Cameroun. *Annals of the Belgium Society for Tropical Medicine*, 72, 311-320.

Nichols, J.D., 1996. Sources of variation in migratory movements of animal populations: statistical inference and selective review of empirical results for birds. *In* : Rhodes, O.E., Chesser, R.K., Smith, M.H., eds., *Population dynamics in ecological space and time*. University of Chicago Press, Chicago, 147-197.

Njiokou, F., 1992a. *Génétique et biologie des populations de deux hôtes intermédiaires de schistosomes à éperon terminal :* Bulinus globosus *(Morelet, 1866) et* B. truncatus *(Audouin, 1827). Conséquences epidémiologiques*. Thèse de Doctorat, Montpellier II, 201 p.

Njiokou, F., Bellec, C., Yapi Yapi, G., N'Goran, E., Delay, B., Jarne, P., 1992b. Comparative fitness and reproductive isolation between two *Bulinus globosus* (Pulmonata: Planorbidae) populations. *Journal of Molluscan Studies*, 58, 367-376.

Njiokou, F., Bellec, C., N'Goran, K.E., Yapi Yapi, G., Delay, B., Jarne, P., 1993a. Mating system analysis using protein electrophoresis in the self-fertile hermaphrodite species *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae). *Journal of Molluscan Studies*, 59, 125-133.

Njiokou, F., Bellec, C., Berrebi, P., Delay, B., Jarne, P., 1993b. Do self-fertilization and genetic drift promote a very low genetic variability in the allotetrapoloid *Bulinus truncatus* (Gastropoda, Planorbidae) populations ? *Genetics Research*, 62, 89-100.

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.

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. *Journal of Cell and Animal Biology*, 3, 159-164.

Nozais, J.P., Datry, A., Danis, M., 1996. *Traité de parasitologie médicale*. Editions Pradel, Paris, 817 p.

Organisation Mondiale de la Santé, 1985. *Lutte contre la schistosomiase*. Rapport Technique n° 728, OMS, Genève, 98 p.

Organisation Mondiale de la Santé, 2002. *The control of schistosomiasis*. Second report of the WHO Expert Committee, World Health Organization Technical Report, Geneva, Series, no. 912.

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

Paland, S., Lynch, M, 2006. Transitions to Asexuality Result in Excess Amino Acid Substitutions. Science, 311, 990-992.

Pannell, J.R, Charlesworth, B. 2000. Effects of metapopulation processes on measures of genetic diversity Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences. 355, 1851-1864.

Paraense, W.L., 1955. Self and cross-fertilization in *Australorbis glabratus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,* 53, 285-291.

Paraense, W.L., 1975. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, 55, 105-128.

Pasteur, N., Pasteur, G., Bonhomme, F., Catalan, J., Britton-Davidian, J., 1987. *Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines*. Lavoisier, Paris, 217 p.

Pedersen, A.B., Fenton, A., 2007. Emphasizing the ecology in parasites community ecology. *Trends in Ecology and Evolution,* 22, 133-139.

Peel, D., Ovenden, J.R., Peel, S.L., 2004. NeEstimator Version 1.3: Software for Estimating Effective Population Size. Queens land Government, Department of Primary Industries and Fisheries.

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. *Médecine Tropicale,* 35, 229-230.

Pointier, J.P., Guyard, A., Mosser, A., 1989. Biological control of *Biomphalaria glabrata* and *B. straminea* by the competitor snail *Thiara tuberculata* in a transmission site of schistosomiasis in Martinique, French West Indies. *Annals of Tropical Medecine and Parasitology*, 83, 263-269.

Pollak, E., 1987. On the theory of partially inbreeding finite populations. I. Partial selfing. *Genetics*, 117, 353-360.

Prugnolle, F., de Meeûs, T., 2010. Apparent high recombination rates in clonal parasitic organisms due to inappropriate sampling design. *Heredity***,** 104, 135-140.

Puurtinen, M., Hytonen, M., Knott, K.E., Taskinen, J., Nissinen, K., Kaitala, V., 2004. The effects of mating system and genetic variability on susceptibility to trematodes parasites in a freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*. *Evolution,* 58, 2747-2753.

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.

Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1993. RFLP map of soybean (*Glycine max*) 2n = 40. *In* : O'Brien, S.J., ed., *Genetic maps*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 149-156.

Ratard, R., Kouemeni, L.E., Ekani Bessalla, M.M., Ndamkou Ndamkou, C., Greer, G., 1990. Human schistosomiasis in Cameroon. I. Distribution of schistosomiasis. *American Journal of Tropical Medecine and Hygiene*, 42, 561-572.

Ratard, R. C. et Greer G.J. 1991. A new focus of *Schistosoma haematobium* /*S.intercalatum* hybrid in Cameroon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **45**: 332-338.

Ripert, C., 1996. *Épidémiologie des maladies parasitaires. Protozooses et helminthoses. Réservoirs, vecteurs et transmission.* Tome 2 : *Helminthoses*. Éditions Médicales Internationales, Cachan, 561 p.

Rollinson, D., Kane, R.A., 1991. Restriction enzyme analysis of DNA from species of *Bulinus* (Basommatophora: Planorbidae) using a cloned ribosomal gene probe. *Journal of Molluscan Studies,* 57**,** 93-98.

Rollinson, D., Southgate, V.R., 1979. Enzyme analysis of *Bulinus africanus* group snails (Mollusca: Planorbidae) from Tanzania. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* 73**,** 667-672.

Rollinson, D., Southgate, V.R., 1987. The genus *Schistosoma*. A taxonomic appraisal. *In* : Rollinson, A., Simpson, A.J.G., *The biology of schistosomes from gene to "latrines"*. Academic Press, London, 1-49.

Rollinson, D., Wright, C.A., 1984. Populations studies on *Bulinus cernicus* from Mauritius. *Malacologia.* 25, 447-463.

Rollinson, D., Stothard, J.R., Southgate, V.R., 2001. Interactions between intermediate snail hosts of the genus *Bulinus* and schistosomes of the *Schistosoma haematobium* group. *Parasitology*, 123, Suppl., 245-260.

Rondelaud, D., Dreyfuss, G., Bouteille, B., Dardé, M.L., 2000. Changes in human fasciolosis in a temperate area: about some observations over a 28-year period in Central France. *Parasitology Research*, 86, 753-757.

Rousset, F., 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145, 1219-1228.

Rudolph, P.H., 1983. Copulatory activity and sperm production in *Bulinus globosus* (Gastropoda: Planorbldae). *Journal of Molluscan Studies*, 49, 125-132.

Rudolph, P.H., Bailey, J.B., 1985. Copulation as females and use of allosperm in the freshwater snail genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). *Journal of Molluscan Studies*, 51, 267-275.

Same Ekobo, A., 1984. *Faune malacologique du Cameroun (description, répartition des mollusques dulçaquicoles et foyers de trématodes humains).* Thèse de Doctorat d'Etat, Rennes I. 632pp.

Schwenkenbecher, J.M., Frohlich, C., Gehre, F., Schnur, L.F., Schonian, G., 2004. Evolution and conservation of microsatellite markers for *Leishmania tropica*. *Infection, Genetics and Evolution*, 4, 99-105.

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.

Shrivastava, J., Gower, C.M., Balolong, E.J., Wang, T.P., Qian, Z.B., Webster, J.P., 2005. Population genetics of multi-host parasites-the case for molecular epidemiological studies of *Schistosoma japonicum using* larval stages from naturally infected hosts. *Parasitology*, 131, 617-626.

Southgate, V.R., Rollinson, D., Ross, G.C., Knowles, R.J., 1982. Mating behaviour in mixed infections of *Schistosoma haematobium* and *S. intercalatum*. *Journal of Natural History*, 16, 491-496.

Slatkin, M., 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics***,** 16, 393-430.

Slatkin, M., 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science,* 236, 787-792.

Southgate, V.R., Rollinson, D., Ross, G.C., Knowles, R.J., Vercruysse, J., 1985. On *Schistosoma curassoni*, *S. haematobium* and *S. bovis* from Senegal: development in

Mesocricetus auratus, compatibility with species of *Bulinus* and their enzymes. *Journal of Natural History*, 19**,** 1249-1267.

Städler, T. et Jarne, P., 1997. Population biology, genetic structure, and mating system parame-ters in freshwater snails. In: Streit, B., Städler, T., Lively, C., *Ecology and evolution of freshwater organisms*. Birkhäuser Verlag, Basel, 231-262.

Stothard, J.R., Rollinson, D., 1997a. Partial sequence from cytochrome oxidase subunit (COI) can differentiate *Bulinus globosus* and *B. nasutus*. *Journal of Natural History*, 31, 727-737.

Stothard, J.R., Rollinson, D., 1997b. Molecular characterization of *Bulinus africanus* group snails from Zanzibar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* 91, 353-357.

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.

Stothard, J.R., Lewellyn-Hughes, J., Griffin, C.E., Hubbard, S.J., Kristensen, T.K, Rollinson, D., 2002. Identification of snails within the *Bulinus africanus* group from East Africa by Multiplex SNaPshotä analysis of single nucleotide polymorphisms within the cytochrome oxidase subunit I. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 31-36.

Tachida, H., 1996. Effects of the shape of distribution of mutant effect in nearly neutral mutation models. *Journal of Genetics.* 75, 33-48.

Tchuem Tchuenté, L.A., Behnke, J.M., Gilbert, F.S., Southgate, V.R., Vercruysse, J., 2003. Polyparasitism with *Schistosoma haematobium* and soil-transmitted helminth infections among school children in Loum, Cameroon. *Tropical Medicine and International Health*, 8, 975-986.

The partnership for parasite control, 2002. *The Second Meeting, Roma, 25-26th April 2002*, 41p.

Tompa, A., 1984. Land snails (Stylommatophora). *In* : Tompa, A.S., Verdonk, N.H., Van den Biggelaar, J.A.M., eds. *The Mollusca.* Vol 7 : *Reproduction*. Academic Press, New York, 47-140.

Trouvé, S., Degen, L., Renaud, F., Goudet, J., 2003. Evolutionary implications of a high selfing rate in the freshwater snail *Lymnaea truncatula*. *Evolution*, 57, 2303-2314.

Tsafack, F., 1997. Ecology of schistosome intermediate hosts in the Benoue Upper Valley area. Thèse de Doctorat. Université de Copenhage. 170pp.

Tuan, R., Simões, L.C.G., 1998. Effect of self fertilization on *Biomphalaria tenagophil*a (Orbigny, 1835) (Pulmonata: Planorbidae). *Genetics and Molecular Biology*, 21, 477-478.

Vareille-Morel, C., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., 2002.Experimental colonization of new habitats by *Galba truncatula* O.F. Müller (Gastropoda : Lymnaeidae) in central France and their susceptibility to experimental infection with the trematode *Fasciola hepatica* . *Annales de Limnologie* 38 : 35-40

Vera, C., Jourdane, J., Sellin, B., Combes, C., 1990. Genetic variation in the compatibility between *Schistosoma haematobium* and its potential vectors in Niger. Epidemiological implications. *Tropical Medicine and Parasitology*, 41**,** 143-148.

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.

Viard, F., Doums, C., Jarne, P., 1997. Selfing, sexual polymorphism and microsatellites in the hermaphroditic freshwater snail *Bulinus truncatus. Proceedings of the Royal Society. B : Biological Sciences*, 264, 39-44.

Vitalis, R., Couvet, D., 2001a. ESTIM 1.0: a computer program to infer population parameters from one- and two-locus gene identity probabilities. *Molecular Ecology Notes* 1, 354–356.

Vitalis, R., Couvet, D., 2001b. Estimation of effective population size and migration rate from one- and two-locus identity measures. *Genetics* 157, 911– 925.

Vitalis, R., Couvet, D., 2001c. Two-locus identity probabilities and identity disequilibrium in a partially selfing subdivided population. Genetic Research. 77, 67–81.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Homes, M.**,** Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research,* 23, 4407-4414.

Waples, R.S., 1989. A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics* 121, 379–391.

Waples, R.S., Do, C., 2008. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources*8, 753–756.

Wang, J. 2001. Optimal marker assisted selection to increase the effective size of small populations. *Genetics* 157: 867-874.

Wang, J.L., Whitlock, M.C., 2003. Estimating effective population size and migration rates from genetic samples over space and time. *Genetics* 163, 429–446.

Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.

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

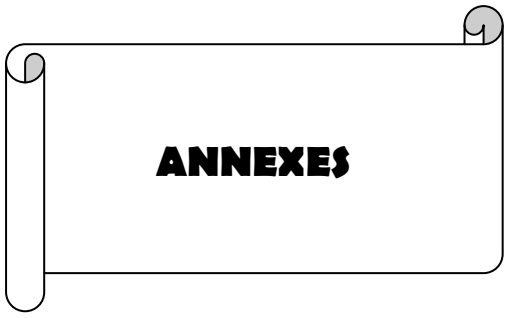
Woolhouse, M.E.J., 1988. Passive dispersal of *Bulinus globosus. Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 82, 315-317.

Wright, S., 1951. The genetical structure of population. *Annals of Eugenics*, 15: 323-354.

Wright, S., 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395-420.

Wright, C.A., Wright, S., File, K., Ross, G.C., 1966. Studies on the enzyme systems of planorbid snails. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology,* 60, 522-525.

Zhang, G., Verneau, O., Qiu, C., Jourdane, J., Xia, M., 2001. Afrique ou Asie, quelle est l'origine évolutive des schistosomes humains ? *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences, III*, 324, 1001-1010.


ANNEXES

Annexe 1 : Glossaire

1-Allèles : Les différentes formes d'un gène.

2-Consanguinité : C'est le fruit de la reproduction sexuée entre deux individus apparentés. Elle augmente ainsi l'homozygotie et a pour conséquence une plus grande homogénéité des individus pour des caractères favorables ou défavorables.

3-Dérive génétique : Ensemble des fluctuations dans la fréquence d'un gêne dues au hasard ou se manifestant à chaque génération. C'est un processus important dans les populations à faible effectif et qui à long terme conduit à la fixation d'un allèle dans une population

4-Déséquilibre de liaison : Situation dans laquelle deux allèles correspondant à deux loci distincts d'un même chromosome sont plus fréquemment associés en cis dans une population que ne le voudrait le hasard. Le déséquilibre de liaison 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.

5-Effet fondateur : Phénomène observé quand un petit nombre d'individus s'individualise, à partir d'une population plus importante. Le patrimoine génétique du sous-groupe est constitué seulement d'une fraction de la diversité génétique de la population mère.

6-Effet Wahlund : C'est un excès d'homozygotes ou déficit en hétérozygotes par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Ceci traduit la subdivision de la population étudiée en plusieurs sous-populations de compositions génétiques différentes.

7-Equilibre de Hardy-Weinberg : Etat d'une population d'organismes diploïdes, de générations non chevauchantes et de taille infiniment grande, dont la fréquence des gènes n'est pas modifiée d'une génération à une autre car les croisements se font au hasard avec absence de forces évolutives telles que la migration, la dérive génétique, la sélection naturelle et la mutation.

8-Espèce : Ensemble d'individus se ressemblant entre eux plus qu'ils ne ressemblent aux autres et qui sont interféconds.

9-Un **Gène** est un fragment d'ADN non recombinant, qui peut être codant ou non. Il est composé de deux allèles chez les organismes diploïdes. Si les deux copies sont

identiques, l'individu est dit **homozygote.** Si les deux copies sont différentes, l'individu est **hétérozygote.**

10-Goulot d'étranglement : elle se produit lorsqu'une population subit une sévère réduction temporaire de sa taille

11-Un locus est une localisation précise d'un gène sur un chromosome.

12-Une **métapopulation** est une grande population subdivisée en sous-populations échangeant régulièrement des migrants. L'équilibre est atteint au niveau de la métapopulation.

13-Une migration ou flux de gènes : Un échange d'individus entre des sous-populations.

14-Mutation : C'est une modification irréversible de l'information génétique et héréditaire contenue dans un le génome.

15-Panmixie : Croisement aléatoire entre des individus dans une population.

16-Pangamie : Rencontre au hasard des gamètes.

17-Polymorphisme : Coexistence de plusieurs allèles pour un gène ou un locus donné dans une population.

18-P**ool génique** : Un ensemble de gènes présents dans une population.

19-Population : Un groupe d'individus de la même espèce, vivant dans une aire géographique suffisamment restreinte pour permettre potentiellement à tout membre de se reproduire avec tout autre individu.

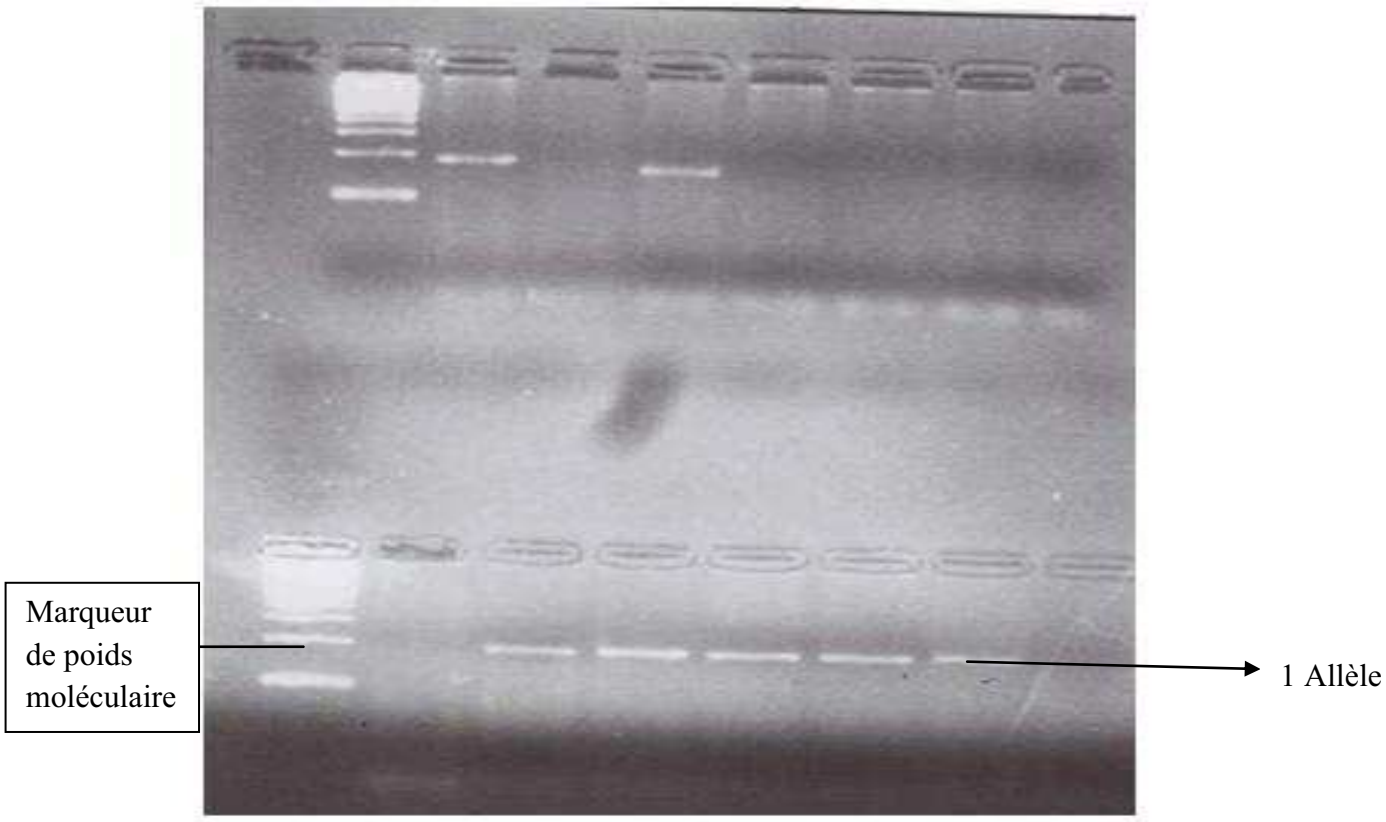
20-Purge génétique : Elimination des allèles délétères récessifs de la population grâce à la consanguinité.

21-Sélection naturelle : C'est un phénomène qui permet d'isoler ou d'identifier des génotypes particuliers dans une population donnée.

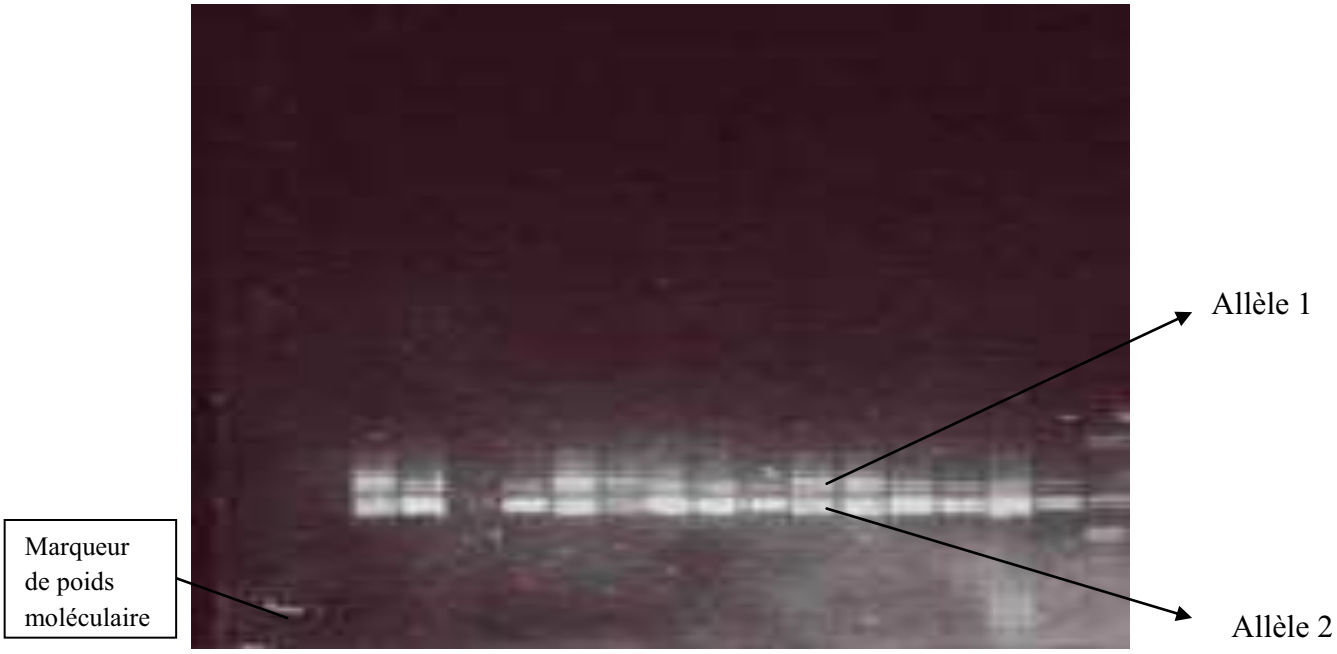
22-Sous-population : une population qu'on isole au sein d'une population plus large afin d'en étudier les caractéristiques propres.

23- Taille efficace : Nombre d'individus participant effectivement à la génération suivante.

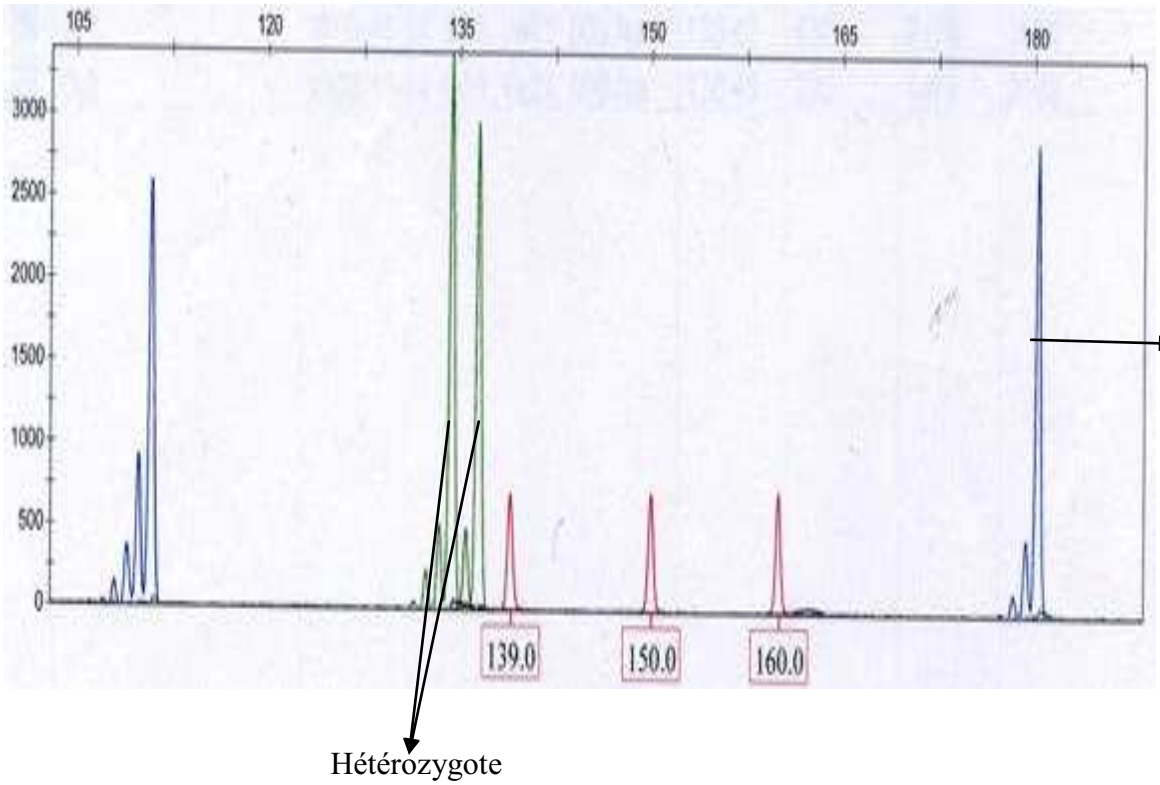
Annexe 2 : Photos de gel d'agarose, de polyacrilamide et d'analyse des fragments



Annexe 2a : Photo de gel d'agarose à 2%, ne permet de distinguer qu'une seule bande



Annexe 2b : Photo de gel sur polyacrilamide à 10% il permet de distinguer deux allèles hétérozygotes



Annexe 2c : Résultats obtenus après analyse des fragments sur genemapper. La couleur des pics est due au fluorchrome contenu dans les amorces. Deux pics représentent des hétérozygotes, et 1 pic pour les homozygotes.

Annexe 3: Article 1

"Strong Genetic structure in Cameroonian populations of *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae), intermediate host of *Schistosoma haematobium*"

Annexe 4: Article 2

"Population genetic structure in the Cameroonian freshwater snail *Bulinus globosus* (Gastropoda: Planorbidae) intermediate host of *Schistosoma haematobium" (*soumis à *Journal of Heredity*)

Bulinus globosus et *B. truncatus* (Gastropoda : Planorbidae) : variabilité génétique et implications dans la transmission de *Schistosoma haematobium* au Cameroun

(**Djuikwo-Nouboué Teukeng Félicité Flore**)

Résumé :

Les schistosomoses constituent encore un problème de santé publique au Cameroun. La forme urinaire due à *S. haematobium* est la plus répandue et est transmise à l'homme par des mollusques hôtes intermédiaires dont les plus importants sont *Bulinus truncatus* et *B. globosus*. Pour tenter d'expliquer la diversité observée dans le fonctionnement des foyers de schistosomoses urinaires, une étude de la structure génétique des populations de *B. truncatus* et de *B. globosus* a été menée en utilisant le polymorphisme de plusieurs loci microsatellites.

Dans les populations de *B. truncatus,* la diversité génétique à certains loci est relativement élevée mais aucun hétérozygote n'a été observé, expliqué probablement par un taux d'autofécondation très élevé. Une forte structuration génétique a été observée entre les populations, pouvant résulter des actions combinées de l'autofécondation, de la dérive génétique et d'un faible taux de migration.

Dans les populations de *B. globosus*, le niveau de variabilité est plus faible mais certains loci ont une diversité génétique élevée. On note la présence des hétérozygotes mais en proportion insuffisante si bien que toutes les populations sont en déséquilibre de Hardy-Weinberg. Une corrélation positive et significative est observée entre les distances géographiques et génétiques si bien que les paires de populations éloignées sont structurées alors que les paires rapprochées ne le sont pas.

La structuration des populations, forte chez *B. truncatus* et moyenne chez *B. globosus* a pu être à l'origine d'évolutions différentielles des populations de bulins, pouvant expliquer la diversité observée dans les schémas de transmission de la schistosomose urinaire dans les foyers de cette endémie au Cameroun.

Mots clés : Schistosomose urinaire- *Bulinus truncatus*- *Bulinus globosus*-microsatellites- structure génétique- *Schistosoma haematobium.*

Abstract

Schistosomiasis is still a public health problem in Cameroon. Urinary form caused by S. *haematobium* is the most widespread and is transmitted to humans by snails which serve as intermediate host. *Bulinus truncatus* and *B. globosus* being the most important. In an attempt to explain the observed diversity in the functioning of urinary schistosomiasis focy, a genetic study *of B. truncatus* and *B. globosus* population's structure was conducted using microsatellite markers.

In *B. truncatus* populations, genetic diversity at some loci is relatively high but no heterozygotes were observed, probably due to a very high rate of self-fertilization. A strong genetic structure was observed between populations, it may results from the combined actions of self-fertilization, genetic drift, and low migration rate.

In *B*. globosus populations, the level of variability is lower, but some loci have a high genetic diversity. Heterozygotes are present in law proportion such that all populations are in Hardy-Weinberg disequilibrium. A significant positive correlation was observed between geographic and genetic distances. While the distant population's pairs are structured, the close ones are not.

Population structure is strong in *B. truncatus* and average in *B. globosus*. This could be at the origin of the differential development in *Bulinus* populations and may explain the observed diversity in patterns of urinary schistosomiasis transmission in the endemic foci in Cameroon.

Keywords: urinary schistosomiasis, *Bulinus truncatus*, *Bulinus globosus*, microsatellites, *Schistosoma haematobium*-genetic structure.