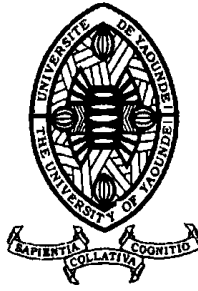


Université de Yaoundé I

University of Yaoundé I



Faculté des Sciences

Faculty of Science

Département de Biologie et Physiologie Animales

Department of Animal Biology and Physiology

Laboratoire de Parasitologie et Ecologie

Laboratory of Parasitology and Ecology

**Taxonomie et génétique des populations de
Biomphalaria spp. dans quelques régions du
grand Sud-Cameroun**

THESE

Présentée et soutenue en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat/Ph.D

en Biologie des Organismes Animaux

Option : Parasitologie et Ecologie



Devant le jury :

Par :

Président : FOMENA Abraham, Pr., UYI ;

TCHAMI MBAGNIA Mureille Carole

Rapporteur : NJIOKOU Flobert, Pr., UYI ;

Matricule : 10Q0942

Membres : KEKEUNOU Sévilor, Pr., UYI ;

Master ès-Sciences

Antonio NKONDJIO Christophe, HDR, Maître de

Sous la direction de

Recherche, OCEAC ;

NJIOKOU Flobert

LEKEUFACK FOLEFACK Guy B, MC., UYI.

Professeur

Année 2024

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTE DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET
PHYSIOLOGIE ANIMALES

BP 812 – Tél : (237) 222-56-59
Fax : (237) 233-46-96
CAMEROUN

ATTESTATION DE CORRECTION

Conformément à l'autorisation de soutenance de la thèse de Doctorat/Ph.D N°242967/UYI/VR-EPDTIC/DAAC/DA-AAC/DRD/SR/AIc du 13 novembre 2024 de Monsieur le Recteur de l'Université de Yaoundé I, la thèse intitulée « **Taxonomie et génétique des populations de *Biomphalaria* spp. dans quelques régions du grand Sud-Cameroun** » a été présentée et soutenue publiquement le **12 décembre 2024** par l'étudiante **TCHAMI MBAGNIA Mureille Carole**, Matricule **10Q0942**. Le document final a été corrigé suivant les recommandations du jury.

En foi de quoi la présente attestation est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé, le

18 DEC 2024

Le Président du Jury


A. FONENA

Les Examineurs


G. LEKEUFACK


Le Chef de Département



Pr. Sévilor KEKEUNO
Faculté des Sciences
Université de Yaoundé I

18 DEC 2024

LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DES SCIENCES

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

ANNÉE ACADEMIQUE 2024/2025

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 30 septembre 2024

ADMINISTRATION

1. **DOYEN** : OWONO OWONO Luc Calvin, *Professeur*
2. **VICE-DOYEN / DPSAA**: NDJIGUI Paul-Désiré, *Professeur*
3. **VICE-DOYEN / DSSE** : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*
4. **VICE-DOYEN / DRC** : NOUNDJEU Pierre, *Maître de Conférences*
5. **Chef Division Administrative et Financière** : NDOYE FOE Florentine Marie Chantal, *Maître de Conférences*
6. **Chef Division des Affaires Académiques, de la Recherche et de la Scolarité**
DAARS : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (44)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1.	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2.	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3.	KANSCI Germain	Professeur	En poste
4.	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
5.	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6.	NGUEFACK Julienne	Professeur	En poste
7.	NJAYOU Frédéric Nico	Professeur	En poste
8.	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9.	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10.	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
11.	ATOGHO Barbara MMA	Maître de Conférences	En poste
12.	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste

13.	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	<i>Chef DAF / FS</i>
14.	DAKOLE DABOY Charles	Maître de Conférences	En poste
15.	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Maître de Conférences	En poste
16.	DJUIDJE NGOUNOUÉ Marceline	Maître de Conférences	En poste
17.	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Maître de Conférences	En poste
18.	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	<i>VD/FS/Univ Ebwa</i>
19.	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
20.	KENGNE NOUEMSI Anne Pascale	Maître de Conférences	En poste
21.	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
22.	LUNGA Paul KEILAH	Maître de Conférences	En poste
23.	MANANGA Marlyse Joséphine	Maître de Conférences	En poste
24.	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Maître de Conférences	En poste
25.	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	<i>Doyen FS / UDs</i>
26.	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
27.	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
28.	Palmer MASUMBE NETONGO	Maître de Conférences	En poste
29.	PECHANGOU NSANGO Sylvain	Maître de Conférences	En poste
30.	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

31.	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
32.	BEBOY EDJENGUELE Sara N.	Chargé de Cours	En poste
33.	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
34.	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Chargé de Cours	En poste
35.	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Chargé de Cours	En poste
36.	MBOUCHE FANMOE Marceline J.	Chargé de Cours	En poste
37.	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
38.	WILFRED ANGIE ABIA	Chargé de Cours	En poste

39.	BAKWO BASSOGOG Christian Bernard	Assistant	En Poste
40.	ELLA Fils Armand	Assistant	En Poste
41.	EYENGA Eliane Flore	Assistant	En Poste
42.	MADIESSE KEMGNE Eugénie Aimée	Assistant	En Poste
43.	MANJIA NJIKAM Jacqueline	Assistant	En Poste
44.	WOGUIA Alice Louise	Assistant	En Poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (50)

1.	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>DAARS/FS</i>
----	--------------------------	------------	-----------------

2.	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3.	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
4.	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
5.	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>CD et Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>
6.	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	<i>Chef de Département</i>
7.	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
8.	NOLA Moïse	Professeur	En poste
9.	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
10.	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service / Coord.Progr./MINSANTE</i>
11.	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste

12.	ALENE Désirée Chantal	Maître de Conférences	<i>Vice Doyen/ Uté Ebwa</i>
13.	ATSAMO Albert Donatien	Maître de Conférences	En poste
14.	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
15.	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
16.	GOUNOUE KAMKUMO Raceline épouse FOTSING	Maître de Conférences	En poste
17.	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
18.	KANDEDA KAVAYE Antoine	Maître de Conférences	En poste
19.	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
20.	MAHOB Raymond Joseph	Maître de Conférences	En poste
21.	MBENOUN MASSE Paul Serge	Maître de Conférences	En poste
22.	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
23.	MOUNGANG Luciane Marlyse	Maître de Conférences	En poste
24.	NOAH EWOTI Olive Vivien	Maître de Conférences	En poste
25.	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
26.	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Maître de Conférences	En poste
27.	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
28.	NGUEMBOCK	Maître de Conférences	En poste
29.	TAMSA ARFAO Antoine	Maître de Conférences	En poste
30.	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

31.	AMBADA NDZENGUE GEORGIA ELNA	Chargé de Cours	En poste
32.	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
33.	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
34.	FEUGANG YOUMSSI François	Chargé de Cours	En poste
35.	FOKAM Alvine Christelle Epse KENGNE	Chargé de Cours	En poste
36.	FOSSI TANKOUA Olivia Epse DJEUTCHOUANG SAYANG	Chargé de Cours	En poste (transfert Uté de Dla)
37.	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
38.	KOGA MANG DOBARA	Chargé de Cours	En poste

39.	LEME BANOCK Lucie	Chargé de Cours	En poste
40.	MAPON NSANGOU Indou	Chargé de Cours	En poste
41.	METCHI DONFACK MIREILLE FLAURE EPSE GHOUMO	Chargé de Cours	En poste
42.	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
43.	NJUA Clarisse YAFI	Chargée de Cours	<i>Chef Div. Uté Bamenda</i>
44.	NWANE Philippe Bienvenu	Chargé de Cours	En poste
45.	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
46.	YEDE	Chargé de Cours	En poste
47.	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste

48.	KODJOM WANCHE Jacguy Joyce	Assistante	En poste
49.	NDENGUE Jean De Matha	Assistant	En poste
50.	ZEMO GAMO Franklin	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (32)

1.	AMBANG Zachée	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
3.	MBOLO Marie	Professeur	En poste
4.	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5.	NDONGO BEKOLO	Professeur	En poste
6.	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7.	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8.	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9.	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Maître de Conférences	En poste
10.	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11.	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	<i>DAAC /UDla</i>
12.	NGALLE Hermine BILLE	Maître de Conférences	En poste
13.	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	<i>CT / MINRESI</i>
14.	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
15.	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
16.	ONANA JEAN MICHEL	Maître de Conférences	En poste

17.	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
-----	------------------------	-----------------	----------

18.	GONMADGE CHRISTELLE	Chargé de Cours	En poste
19.	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
20.	MANGA NDJAGA JUDE	Chargé de Cours	En poste
21.	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
22.	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
23.	NSOM ZAMBO EPSE PIAL ANNIE CLAUDE	Chargé de Cours	<i>En détachement/UNESCO MALI</i>
24.	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Chargé de Cours	En poste
25.	KABELONG BANAHOU Louis- Paul-Roger	Chargé de Cours	En poste
26.	KONO Léon Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
27.	LIBALAH Moses BAKONCK	Chargé de Cours	En poste
28.	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Chargé de Cours	En poste
29.	TAEDOUNG Evariste Hermann	Chargé de Cours	En poste
30.	TEMEGNE NONO Carine	Chargé de Cours	En poste
31.	DIDA LONTSI Sylvere Landry	Assistant	En poste
32.	METSEBING Blondo-Pascal	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (27)

1.	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Mission PR</i>
2.	NANSEU NJIKI Charles Péguy	Professeur	En poste
3.	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
4.	NENWA Justin	Professeur	En poste
5.	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
6.	NJIOMOU C. épse DJANGANG	Professeur	En poste
7.	NJOYA Dayirou	Professeur	En poste

8.	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
9.	EMADAK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
11.	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
12.	KENNE DEDZO GUSTAVE	Maître de Conférences	En poste
13.	MBEY Jean Aime	Maître de Conférences	En poste
14.	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	<i>Chef de Département</i>
15.	NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	<i>Sénatrice/SENAT</i>

16.	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste
17.	PABOUDAM GBAMBIÉ AWAWOU	Maître de Conférences	En poste
18.	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste
19.	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Maître de Conférences	<i>Chef Service/ ENS Bertoua</i>
20.	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Maître de Conférences	En poste
21.	KOUOTOU DAOUDA	Maître de Conférences	En poste

22.	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
23.	NCHIMI NONO KATIA	Chargée de Cours	En poste
24.	NJANKWA NJABONG N. Eric	Chargé de Cours	En poste
25.	PATOUOSSA ISSOFA	Chargé de Cours	En poste
26.	SIEWE Jean Mermoz	Chargé de Cours	En Poste
27.	BOYOM TATCHEMO Franck W.	Assistant	En Poste

6- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (33)

1.	Alex de Théodore ATCHADE	Professeur	<i>DEPE/Univ. Bertoua</i>
2.	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/FSE/UIYI</i>
3.	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de Département UDS</i>
4.	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Recteur UBertoua/ Chef de Département</i>
5.	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste
6.	MKOUNGA Pierre	Professeur	En poste
7.	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
8.	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
9.	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste
11.	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
12.	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
13.	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule MINRESI</i>
14.	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<i>C.E.A/ MINESUP</i>
15.	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>Dir ENS/Uté Bertoua</i>
16.	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
17.	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
18.	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
19.	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Maître de Conférences	En poste
20.	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

21.	MESSI Angélique Nicolas	Chargé de Cours	En poste
22.	MUNVERA MFIFEN Aristide	Chargé de Cours	En poste
23.	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
24.	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
25.	NONO NONO Éric Carly	Chargé de Cours	En poste
26.	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Chargée de Cours	En poste
27.	SIELINOU TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
28.	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
29.	TSAFFACK Maurice	Chargé de Cours	En poste
30.	TSAMO TONTSA Armelle	Chargé de Cours	En poste
31.	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste
32.	NDOGO ETEME Olivier	Assistant	En poste
33.	NGUEMDJO CHIMEZE Valery Wilfried	Assistant	En poste

6- DEPARTEMENT DES ENERGIES RENOUVELABLES (ER) (1)			
	BODO Bertrand	Professeur	<i>Chef de Département</i>

7- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (22)			
--	--	--	--

1.	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef de Division des SI/ MINESUP</i>
2.	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Inspecteur Général Académique/ MINESUP</i>

3.	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4.	TSOPZE Norbert	Maître de Conférences	En poste

5.	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	<i>Chef de Cellule MINFOPRA</i>
6.	AMINOU HALIDOU	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
7.	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
8.	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
9.	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10.	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Chargé de Cours	En poste
11.	HAMZA Adamou	Chargé de Cours	En poste
12.	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Chargé de Cours	En poste
13.	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
14.	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
15.	MESSI NGUELE Thomas	Chargé de Cours	En poste
16.	MONTHÉ DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste

17.	NZEKON NZEKO'O ARMEL JACQUES	Chargé de Cours	En poste
18.	OLLE OLLE Daniel Claude Georges Delort	Chargé de Cours	<i>Directeur Adjoint ENSET Ebolowa</i>
19.	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste

20.	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
21.	MAKEMBE. S. Oswald	Assistant	<i>Directeur CUTI</i>
22.	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (34)

1.	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	<i>Chef de Département</i>
----	-----------------------	------------	----------------------------

2.	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
3.	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
4.	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	<i>Chef de Division/ENSPY</i>
5.	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	<i>Chef de Département de modélisation et applications industrielles/ENSPY</i>
6.	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>VDRC/FS/UYI</i>
7.	TAKAM SOH Patrice	Maître de Conférences	En poste
8.	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	<i>Directeur/AIMS Rwanda</i>
9.	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

10.	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINEPAT</i>
11.	BOGSO ANTOINE Marie	Chargé de Cours	En poste
12.	BITYE MVONDO Esther	Chargé de Cours	En poste
13.	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
14.	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
15.	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
16.	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
17.	KOKOMO AYISSI Eric Brice	Chargé de Cours	En poste (transfert de l'université de Douala)
18.	LOUMNGAM KAMGA Victor	Chargé de Cours	En poste
19.	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
20.	MBATAKOU Salomon Joseph	Chargé de Cours	En poste
21.	MENGUE MENGUE David Joël	Chargé de Cours	<i>Chef Dpt /ENS Université d'Ebolowa</i>

22.	MBIAKOP Hilaire George	Chargé de Cours	En poste
23.	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
24.	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
25.	OGADOA AMASSAYOGA	Chargée de Cours	En poste
26.	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
27.	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Chargé de Cours	En poste
28.	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
29.	TETSADJIO TCHILEPECK M. Eric.	Chargé de Cours	En poste
30.	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
31.	GUIDZAVAI KOUCHERE Albert	Assistant	En poste
32.	MANN MANYOMBE Martin Luther	Assistant	En poste
33.	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
34.	NYOUMBI DLEUNA Christelle	Assistant	En poste
9- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (24)			

1.	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>Vice-Doyen / DSSE</i>
3.	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Professeur	En poste

4.	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5.	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste
6.	KOUITCHEU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
7.	MUNE MUNE Martin Alain	Maître de Conférences	En poste
8.	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
9.	NJIKI BIKOÏ Jacky	Maître de Conférences	En poste
10.	TCHIKOUA Roger	Maître de Conférences	<i>Chef de Service de la Scolarité</i>

11.	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
12.	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
13.	MEYIN A EBONG Solange	Chargé de Cours	En poste
14.	MONI NDEDI Esther Del Florence	Chargé de Cours	En poste
15.	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
16.	NKOUÉ TONG Abraham	Chargé de Cours	En poste
17.	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargé de Cours	En poste
18.	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Chargé de Cours	En poste

19.	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste
20.	EZO'O MENGO Fabrice Télésfor	Assistant	En poste
21.	EHETH Jean Samuel	Assistant	En poste
22.	MAYI Marie Paule Audrey	Assistant	En poste
23.	NGOUEMAM Romial Joël	Assistant	En poste
24.	NJAPNDOUNKE Bilkissou	Assistant	En poste

10. DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PHY) (42)

1.	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2.	BIYA MOTTO Frédéric	Professeur	<i>DG/HYDRO Mekin</i>
3.	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
4.	EKOBENA FOUA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré</i>
5.	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
6.	EYEBE FOUA Jean sire	Professeur	En poste
7.	HONA Jacques	Professeur	En poste
8.	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
9.	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
10.	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
11.	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
12.	SAIDOU	Professeur	<i>Chef de centre/IRGM/MINRESI</i>
13.	SIMO Elie	Professeur	En poste
14.	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen FSUniv/Bda</i>
15.	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
16.	WOAFO Paul	Professeur	En poste
17.	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste

18.	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Maître de Conférences	<i>Chef de Division de la formation continue et à distance/ENSPY</i>
19.	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
20.	FOUEJIO David	Maître de Conférences	<i>Chef Cell/ MINADER</i>
21.	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
22.	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Maître de Conférences	En poste
23.	MEL'I Joelle Larissa	Maître de Conférences	En poste
24.	MVOGO ALAIN	Maître de Conférences	En poste
25.	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
26.	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27.	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste

28.	WAKATA née BEYA Annie Sylvie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UYI</i>
29.	WOULACHE Rosalie Laure	Maître de Conférences	<i>En stage depuis février 2023</i>
30.	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31.	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
32.	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
33.	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargée de Cours	En poste
34.	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
35.	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Chargé de Cours	En poste
36.	LAMARA Maurice	Chargé de Cours	En poste
37.	NGA ONGODO Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
38.	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	<i>Directeur Unité de production des réactifs/IMPM</i>
39.	TEYOU NGOUPO Ariel	Chargé de Cours	En poste
40.	TOGUEU MOTCHEYO Alain Bertrand	Chargé de Cours	En poste
41.	WANDJI NYAMSI William	Chargé de Cours	En poste
42.	SOUFFO TAGUEU Merimé	Assistant	En poste

11- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (34)

1.	EKOMANE Emile	Professeur	<i>Chef Div./Uté Ebolowa</i>
2.	GANNO Sylvestre	Professeur	En poste
3.	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	<i>Vice-Doyen /DPSAA</i>
4.	NGOS III Simon	Professeur	En poste
5.	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
6.	ONANA Vincent Laurent	Professeur	<i>Chef de Département/Uté. Eb.</i>
7.	YENE ATANGANA Joseph Q.	Professeur	<i>Chef Div. /MINTP</i>

8.	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Chef de Département</i>
9.	Elisé SABABA	Maitre de Conférences	En poste
10.	EYONG John TAKEM	Maître de Conférences	En poste
11.	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT(ai)</i>
12.	MBIDA YEM	Maitre de Conférences	En poste

13.	MBESSE Cécile Olive	Maitre de Conférences	En poste
14.	METANG Victor	Maître de Conférences	En poste
15.	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
16.	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	<i>CEA/MINRESI</i>
17.	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
18.	TCHAKOUNTE Jacqueline épouse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef. Cell /MINRESI</i>
19.	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20.	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
21.	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

22.	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
23.	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
24.	MAMDEM TAMTO Lionelle Estelle, épouse BITOM	Chargée de Cours	En poste
25.	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
26.	NGO'O ZE ARNAUD	Chargé de Cours	En poste
27.	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
28.	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargée de Cours	En poste
29.	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
30.	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
31.	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
32.	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste

33.	KOAH NA LEBOGO Serge P.	Assistant	En poste
34.	TENE DJOUKAM Joëlle Flore, épouse KOUANKAP NONO	Assistante	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	08 (01)	22 (13)	08 (03)	06 (04)	44 (20)
BPA	11 (01)	19 (09)	16 (05)	03 (01)	49 (16)
BPV	06 (01)	10 (02)	14 (07)	02 (00)	32 (10)
CI	07 (01)	14 (03)	05 (01)	01 (00)	27 (05)
CO	06 (01)	14 (05)	11 (03)	02 (00)	33 (09)
ER	01 (00)		/	/	01 (0)
IN	02 (00)	02 (00)	15 (01)	03 (00)	22 (01)
MAT	01 (00)	08 (00)	20 (01)	05 (01)	34 (02)
MIB	03 (01)	07 (03)	09 (05)	05 (02)	24 (11)
PHY	17 (01)	12 (04)	12 (01)	01 (00)	42 (06)
ST	07 (00)	14 (03)	11 (03)	02 (01)	34 (07)
Total	69 (07)	122 (42)	121 (30)	30 (09)	342 (88)

Soit un total de **342 (88)** dont :

- Professeurs **69 (07)**
- Maîtres de Conférences **123 (41)**
- Chargés de Cours **120 (30)**
- Assistants **30 (09)**

() = Nombre de Femmes **88**

ENSEIGNANTS SOUS CONTRAT DE COLLABORATION

1.	BELL JOSEPH MARTIN	547019U	17/06/1957	Sakbayeme	M	10/11/1986	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
2.	DJOUFAC WOUMFO EMMANUEL	547069Z	09/01/1957	Ngaoundéré	M	04/05/1990	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
3.	ELIMBI ANOINE.	546958X	30/11/1955		M		RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
4.	FOMENA ABRAHAM	546778X	10/11/1958	Batcham	M	01/12/1986	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
5.	GHOGOMU TIH RAPH	547004-K	23/12/1956	BAMBALANG	M	13/10/1982	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
6.	KAMTCHOU ING PIERRES	143299X	13/09/1955	Nkongsamba	M	01/10/1988	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
7.	LAMINSI SAMUEL	143149J	30/12/1953		M		RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
8.	NGADJUI TCHALEU BONAVENTURE	546959-G	15/09/1953	FONTSIGA	M	12/08/1982	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
9.	NGO BILONG ANASTASIE épse TIH	546164-I	27/12/1955	MBANGA	F	28/07/2000	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	MC
10.	NKENGFAC K EPHRAIM AUGUSTIN	546948-F	17/06/1955	YAOUNDE	M	01/09/1983	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
11.	NDIKONTA R MAURICE KOR	169784G	09/05/1958	Mbaa	M	10/01/1991	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION- EN COURS DE SIGNATURE	PR
12.	NJIOKOU FLOBERT	547321H	11/06/1958	Nkongsamba	M	03/05/1993	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION- EN COURS DE SIGNATURE	PR
13.	BENG NEE NINTCHOM PENLAP VERONIQUE	546643B	07/01/1957	Melong I	F	02/10/1992	RETRAITE-CONTRAT DE COLLABORATION	PR
14.	FOKOU ELIE	546725J	08/06/1957	Fiéla- Bamendjinda	M	01/04/1988	RETRAITE-CONTRAT DE COLLABORATION EN COURS DE FINALISATION	PR
15.	TCHOUANK EU JEAN CLAUDE	547295-E	06/01/1959	Douala	M	01/12/1989	RETRAITE-CONTRAT DE COLLABORATION EN COURS DE FINALISATION	PR
16.	BOYOMO ONANA						CONTRATS TRAITES LORS DU CONSEIL D'UNIVERSITE DU 12 JUILLET 2024	MC
17.	WANDJI JEAN	162242M	09/06/1958	Bangou	M			UYI
18.	YOUMBI EMMANUEL	547332Z	12/02/1959	Bangou	M	Bangou		PR
19.	NGODO MELINGUI JEAN	500475X	05/09/1958	Endoum		20/10/2005		MC
20.	KOFANE TIMOLEON CREPIN							PR
21.	NGAMENI EMMANUEL	547277-C	24/04/1959	Mbanga	M			PR
22.	BITOM DIEUDONNE	547050X	23/11/1958	Ambam	M			PR

DEDICACE

A

Mon adorable fils Vladimír Gamiel.

*Ne vous inquiétez de rien ; mais en toute chose faites connaître vos besoins à Dieu par des prières et des supplications, avec des actions de grâces.
(Philippiens 4:6).*

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au Laboratoire de Parasitologie et Ecologie de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I (Yaoundé, Cameroun) d'une part et au "Centre for Research in Infectious Diseases (CRID, Cameroun)" d'autre part. Mes remerciements vont à l'endroit de tous ceux qui m'ont apporté un soutien pendant l'accomplissement de ces travaux de recherche. Je pense particulièrement aux personnes suivantes :

- **Pr. NJIOKOU Flobert**, Directeur de cette thèse dont l'expertise, la patience, la disponibilité et les encouragements ont été indispensables pour la mise sur pied et la réalisation de ce travail. Je lui témoigne toute ma reconnaissance pour avoir cru en moi ; qu'il en soit infiniment remercié ;
- **Pr. WONDJI Charles Sinclair** qui m'a chaleureusement ouvert les portes de son centre de recherche à chaque fois qu'il a fallu résoudre les problèmes de séquençage, et pour tous les conseils et orientations reçus pour la mise en œuvre de mes travaux. Je lui témoigne toute ma gratitude ;
- les enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales, particulièrement les **Professeurs BILONG BILONG Charles Félix** de regrettée mémoire, **FOMENA Abraham**, **TCHUEM TCHUENTE Louis Albert**, **NOLA Moïse**, **MIMPFOUNDI Rémy** et **KEKEUNOU Sévilor** pour leurs précieux conseils et enseignements ;
- **Dr MELACHIO Trésor** qui en tant qu'aîné m'a tenu la main durant toutes les étapes de ces travaux. Il n'a ménagé aucun effort pour trouver des solutions à mes difficultés et m'encourager à chaque fois qu'un obstacle se présentait. Je lui témoigne ma gratitude ;
- **Dr NANA DJEUNGA Hugues**, sa simplicité et sa bonne humeur font de lui une personne très humble, toujours disponible à chaque fois que mes camarades et moi sollicitons son aide. Ses encouragements et conseils ont été très capitaux pour moi lors de la rédaction de mon premier article. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde considération ;
- tous mes aînés et camarades de laboratoire, notamment Docteurs **KENGNE Alvine**, **LABOU Judith**, **TSAGMO Jean Marc**, **KAME NGASSE Ginette**, **NGAMBIA François Sougal** et **JUPSA Stéphanie** de regrettée mémoire; Madame **FADILATOU Bakari** ; Messieurs **NOUMBOUSSIE Sylvain** et

FEUDJIO Stève pour leurs encouragements, conseils, remarques et suggestions pour parfaire le travail qui est rendu aujourd'hui ;

- tous mes camarades de promotion, particulièrement Docteurs **NGADJEU Sandra**, **DOUMBE Patricia** et **BASGA Parfait** ;
- la Lab Manager du CRID Madame **WONDJI Murielle** et tous les techniciens du laboratoire de biologie moléculaire dont elle a la charge ;
- mes amies mesdames **JOUEGO Francine** et **MBIAMI Ghislaine**, pour le soutien moral qu'elles n'ont jamais cessé de m'accorder ;
- mes parents Monsieur **TCHAMI Robert** et Madame **TCHAMI** née **KOUAMEN Charlotte** pour tous les sacrifices consentis ;
- mon oncle Monsieur **FOGA Patrick** pour le soutien moral et financier ;
- mon cher époux Monsieur **KOWA Ghislain** pour son amour et le soutien financier ;
- ma tante Madame **LAKOUNDJI** née **KAMWA Nadine** pour son attention ;
- mes frères et sœurs : **TCHAMI HOUDJA Rostand**, **TCHAMI HEUMEN Arnold**, Madame **NGATCHA** née **TCHAMI WANDJI Christelle**, **TCHAMI NZOUAMI Cynthia**, **TCHAMI NKUIMI Sandra** et **TCHAMI NJIKE Luna** pour leur soutien moral et spirituel ;
- mes cousins et cousines : **DJAMEN Jores**, **TCHAMI Duval**, **HOUMI Arthur**, Madame **NYA** née **NJIKE Laurence**, **TONDJAP Naëlle** et **YIMGA Archange** pour tous les bons moments passés ensemble ;
- ma belle tante Madame **FOGA** née **NGANGSOP Caroline** pour ses conseils et encouragements ;
- ma belle-famille, pour tous les encouragements reçus ; un merci particulier à ma belle-mère Madame **WATAT** née **MBIEDA Idelecte** et à ma belle-sœur Madame **PAMEN** née **YANZE Georgette** ;
- la famille **TCHANA** pour son hospitalité ;
- la famille **HOUDJA** pour son encadrement ;
- la grande famille **Mbeu Toukam** pour son attention.

SOMMAIRE

LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DES SCIENCES	i
DEDICACE.....	xv
REMERCIEMENTS	xvii
SOMMAIRE	xix
LISTE DES FIGURES.....	xxi
LISTE DES TABLEAUX.....	xxiii
LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES	xxiv
RESUME.....	xxv
ABSTRACT	xxvii
INTRODUCTION.....	2
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE.....	7
I-1- Schistosomes et bilharzioses humaines	8
I-1-1- Historique des bilharzioses	8
I-1-2- Taxonomie des schistosomes	9
I-1-3- Cycle évolutif de <i>Schistosoma mansoni</i>	11
I-1-4- Schistosomiase intestinale à <i>Schistosoma mansoni</i>	12
I-2- Généralités sur le genre <i>Biomphalaria</i>	17
I-2-1- Position taxonomique des <i>Biomphalaria</i> spp.	17
I-2-2- Identification spécifique des <i>Biomphalaria</i> spp.	18
I-2-3- Appareil reproducteur et système de reproduction des <i>Biomphalaria</i> spp.	21
I-2-4- Bio-écologie des <i>Biomphalaria</i> spp.	24
I-3- Généralités sur la génétique des populations	25
I-4- Marqueurs microsatellites	26
CHAPITRE II : CADRE GEOGRAPHIQUE, MATERIEL ET METHODES.....	30
II-1- Cadre géographique et description des sites	31
II-1-1- Cadre géographique	31
II-1-2- Description des sites de l'étude	31
II-2- Matériel et Méthodes	37
II-2-1- Echantillonnage et conservation des spécimens de <i>Biomphalaria</i> spp.	37
II-2-2- Test d'émission cercarienne	38
II-2-3- Identification morphologique et morphométrique des mollusques	38
II-2-4- Identification moléculaire des mollusques	39

II-2-5- Génotypage des loci microsatellites	42
II-2-6- Analyse des données.....	45
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	53
III-1- Résultats.....	54
III-1-1- Répartition des mollusques collectés, dans les différentes expérimentations	54
III-1-2- Niveau d'infestation des <i>Biomphalaria</i> spp. par les larves de trématodes.....	54
III-1-3 - Caractéristiques morphologiques et morphométriques des <i>Biomphalaria</i> spp..	55
III-1- 4- Caractéristiques moléculaires des taxons de <i>Biomphalaria</i> spp.	64
III-1-5- Révélation de la structure génétique des populations de <i>Biomphalaria</i> spp. à l'aide de marqueurs d'ADN microsatellites	72
III-1-6- Estimation des effectifs efficaces et des taux de migration dans les sous- populations de <i>Biomphalaria</i> spp.....	89
III-2- Discussion.....	91
III-2-1- Niveau d'infestation des <i>Biomphalaria</i> spp. par les schistosomes	91
III-2-2- Taxons de <i>Biomphalaria</i> spp. identifiés.....	92
III-2-3- Génétique des populations de <i>Biomphalaria</i> spp., révélée par les marqueurs ADN microsatellites	96
CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES	100
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	103
ANNEXES	104

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle biologique de <i>Schistosoma mansoni</i>	12
Figure 2 : Espaceur interne transcrit (ITS) de l'ADN ribosomique.....	20
Figure 3 : Appareil génital d'un Planorbidae : <i>Biomphalaria pfeifferi</i>	22
Figure 4 : Carte du Cameroun montrant les différents sites de collecte des <i>Biomphalaria</i> spp.	37
Figure 5 : Techniques de mensuration sur la coquille des mollusques récoltés.....	39
Figure 6 : Photo d'une monocercaire émise par <i>Biomphalaria camerunensis</i> et fixée au lugol.....	55
Figure 7 : Dessins et photos des coquilles des espèces de <i>Biomphalaria</i> adultes collectées ...	56
Figure 8 : Variation de la largeur de l'ouverture des coquilles des <i>Biomphalaria</i> spp. dans les différents sites de collectes	58
Figure 9 : Variation de l'ouverture de l'ombilic des coquilles des <i>Biomphalaria</i> spp. dans les différents sites de collecte.....	59
Figure 10 : Variation de la hauteur de la coquille des <i>Biomphalaria</i> spp. dans les différents sites de collecte	60
Figure 11 : Variation du diamètre de la coquille des <i>Biomphalaria</i> spp. dans les différents sites de collecte	61
Figure 12 : Variation du nombre de tours de spire chez <i>Biomphalaria</i> spp. dans les différents sites de collecte	62
Figure 13 : Variation du rapport diamètre/ouverture de l'ombilic chez <i>Biomphalaria</i> spp. dans les différents sites de collecte.....	62
Figure 14 : Variation du rapport diamètre/hauteur chez <i>Biomphalaria</i> spp. dans les différents sites de collecte	63
Figure 15 : Analyse en composante principale sur la corrélation entre toutes les mensurations de la coquille chez <i>Biomphalaria</i> spp.	64
Figure 16 : Analyse en composante principale sur la corrélation entre les trois valeurs les plus discriminantes	64
Figure 17 : Photo du gel d'agarose 2% montrant les bandes d'amplification de la région ITS2 des <i>Biomphalaria</i>	65
Figure 18 : Photo d'un gel de polyacrylamide 8% montrant les profils RFLP obtenus après digestion avec l'enzyme <i>Hpa</i> II	66
Figure 19 : Photo d'un gel de polyacrylamide 8% montrant les profils RFLP obtenus après digestion avec l'enzyme <i>Taq</i> I	67

Figure 20 : Carte montrant la répartition des espèces dans les sites prospectés	68
Figure 21 : Arbre Phylogénétique construit avec les séquences ITS2 de <i>Biomphalaria</i> spp... 69	69
Figure 22 : Réseaux d'haplotypes pour <i>Biomphalaria camerunensis</i> (a) et <i>B. pfeifferi</i> (b).....	70
Figure 23 : Différents sites mutationnels des haplotypes obtenus et les numéros d'accession de leurs séquences dans GenBank.....	70
Figure 24 : Variation du F_{IS} en fonction des loci dans les populations de <i>B. camerunensis</i> ...	79
Figure 25 : Variation des valeurs de F_{IS} en fonction du nombre de géotypes homozygotes nuls	81
Figure 26 : Variation des valeurs de F_{IS} des allèles en fonction de leurs tailles	82
Figure 27 : Variation du F_{IS} en fonction du nombre de sites par localité	82
Figure 28 : Relation entre distance génétique et distance géographique entre les populations de <i>Biomphalaria camerunensis</i> étudiées	86
Figure 29 : Dendrogramme exprimant la distance génétique entre les sous populations de <i>Biomphalaria camerunensis</i> étudiées	88

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Caractères distinctifs des espèces de schistosomes anthropophiles africains	10
Tableau II : Quelques caractéristiques des différents couples d’amorces utilisés	43
Tableau III : Répartition des mollusques collectés dans les différentes expérimentations	54
Tableau IV : Valeurs des différents paramètres morphométriques des mollusques collectés .	57
Tableau V : Diversités haplotypiques et nucléotidiques entre les populations de <i>Biomphalaria camerunensis</i> et <i>Biomphalaria pfeifferi</i>	71
Tableau VI : Indice de fixation (F_{ST}) entre les populations de <i>Biomphalaria camerunensis</i>	72
Tableau VII : Indice de fixation (F_{ST}) entre les populations de <i>Biomphalaria pfeifferi</i>	72
Tableau VIII : Echantillons analysés pour la structure génétique des populations de <i>Biomphalaria</i> spp.	73
Tableau IX : Nombre d’individus amplifiés par marqueur microsatellite	74
Tableau X : Nombre d’allèles par locus et par échantillon prélevé	75
Tableau XI : Richesse allélique par locus et par échantillon	76
Tableau XII : Diversité génétique par locus et par échantillon de <i>Biomphalaria</i> spp	77
Tableau XIII : Hétérozygoties et coefficient de consanguinité par locus	78
Tableau XIV : Fréquences de l’allèle nul, du génotype homozygote nul et nombres observés et attendus d’individu de génotypes homozygotes nuls au locus Bpf5	80
Tableau XV : Comparaison entre la valeur moyenne de F_{IS} d’un point de collecte et de celle de l’ensemble des points de collecte de la localité	83
Tableau XVI : Valeurs de F_{ST} entre les paires de populations de <i>Biomphalaria</i> <i>camerunensis</i>	85
Tableau XVII : Distances génétiques harmoniques entre les différentes populations de <i>Biomphalaria camerunensis</i>	87
Tableau XVIII : Echantillons utilisés pour la détermination des effectifs efficaces des populations de <i>Biomphalaria</i> spp.....	89
Tableau XIX : Effectifs efficaces (N_e) estimés par les déséquilibres de liaison.....	90
Tableau XX : Effectifs efficaces et taux de migration estimés par la méthode du maximum de vraisemblance	91

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNr : Acide DésoxyriboNucléique ribosomique

ITS : “Internal Transcribed Spacer” (Espaceur Interne Transcrit)

CTAB : “Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide”

dNTPs : désoxyriboNucléoside 5'-TriPhosphates

EDTA : “Ethylene Diamine Tetraacetic Acid”

BET : Bromure d’Ethidium

Taq : *Thermus aquaticus*

TBE : Tris-Borate-EDTA

Tris : Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane

pb : paire de bases

PCR : “Polymerase Chain Reaction” (Réaction de Polymérisation en Chaîne)

RFLP : “Restriction Fragment Length Polymorphism” (Polymorphisme de Longueur de Fragments de Restriction)

ACP : Analyses en Composantes Principales

GPS : “Global Positioning System” (Système de Positionnement)

PNLSHI : Programme National de Lutte contre la Schistomiase et les Helminthiases Intestinales.

RESUME

Les gastéropodes Basommatophores du genre *Biomphalaria* sont des hôtes intermédiaires de *Schistosoma mansoni*, agent de la schistosomose intestinale en zone intertropicale. La schistosomose intestinale est présente dans pratiquement toutes les régions du Cameroun. Malgré la réduction de la morbidité à la suite du traitement de masse au praziquantel, la transmission de la schistosomose intestinale demeure très dynamique et hétérogène. La lutte contre les gastéropodes hôtes intermédiaires serait le moyen le plus efficace pour atteindre l'élimination. Pour cela, il faudrait améliorer les connaissances sur l'identification, la biologie et la variabilité génétique de ces hôtes. Nous avons donc entrepris de mener une étude sur la taxonomie et la structure génétique au sein de quelques populations de *Biomphalaria* échantillonnées en majorité dans le grand Sud du Cameroun. Les mollusques collectés en deux campagnes d'échantillonnage, ont été répartis en 3 lots ; chaque lot était destiné à une étude précise. Les espèces de *Biomphalaria* ont été identifiées sur la base de leur morphologie, de la mensuration de leur coquille, et à l'aide d'un outil de taxonomie moléculaire (PCR-RFLP). Les paramètres morphométriques de 490 spécimens ont été analysés et les statistiques univariées et multivariées ont été réalisées. Les parasites présents chez des spécimens de mollusques (225 individus) vivants ont été identifiés en faisant un test de l'émission cercarienne à l'état naturel pendant 30 jours post-échantillonnage. Les allèles microsatellites ont été révélés chez 698 mollusques. L'étude de la diversité génétique et l'analyse des paramètres démographiques ont été faites au sein des populations de *Biomphalaria* dûment identifiées. Au total 1231 et 435 mollusques ont été collectés respectivement lors du premier et du second échantillonnage. Les résultats ont révélé la présence des trématodes du genre *Echinostoma* (13,77%) uniquement dans certaines populations de *B. camerunensis*. Bien que l'analyse en composantes principales n'ait pas permis de faire une distinction claire entre *B. pfeifferi* et *B. camerunensis*, les statistiques univariées ont révélé trois caractéristiques clés qui pourraient être utilisées pour les différencier. La PCR-RFLP a permis de distinguer *B. camerunensis* de *B. pfeifferi*. Les analyses phylogénétiques, ont révélé la présence de six haplotypes pour *B. camerunensis* et de trois haplotypes pour *B. pfeifferi*. Le niveau de flux de gènes révélé avec le marqueur ITS2 était faible et les populations de *Biomphalaria* n'étaient pas en expansion démographique selon les tests de neutralité (D de Tajima et F de Fu). Les loci microsatellites utilisés se sont avérés peu polymorphes, avec un total de 28 allèles pour les 8 marqueurs étudiés. La richesse allélique moyenne a été de 2,053 et de 1,965 respectivement chez *B. camerunensis* et chez *B.*

pfeifferi. Le niveau de diversité génétique H_s a été très faible, les valeurs moyennes obtenues ayant été de 0,289 et de 0,192 respectivement dans les populations de *B. camerunensis* et de *B. pfeifferi*. Les valeurs moyennes de l'hétérozygotie observée H_o se sont révélées très faibles (0,075 chez *B. camerunensis* et 0,053 chez *B. pfeifferi*). De plus, nous avons enregistré des valeurs significativement positives du coefficient de consanguinité F_{IS} , avec une moyenne de 0,742 dans les populations de *B. camerunensis* et de 0,726 dans celles de *B. pfeifferi*, traduisant un déficit apparent en hétérozygotes ; la cause majeure étant la dominance des allèles courts aux loci utilisés. Les populations de *Biomphalaria* spp. étudiées ont été considérées comme étant en équilibre de Hardy Weinberg.

L'indice de fixation (F_{ST}) moyen obtenu sur l'ensemble des loci a été de 0,456 et de 0,117 respectivement dans les populations de *B. camerunensis* et de *B. pfeifferi*. Nous avons cependant noté par l'analyse hiérarchique des F , une différenciation entre les échantillons de *B. camerunensis* issus de différents sites ($F_{sites/ville} = 0,3284$, $P = 0,001$), et aussi entre ceux issus de différentes villes ($F_{villes/Région} = 0,2336$, $P = 0,001$), donc entre les échantillons issus des différentes Régions ($F_{Régions/Total} = -0,0322$, $P = 0,016$). La structuration a également été significative entre les deux échantillons de *B. pfeifferi* provenant des sites différents dans une même ville ($F_{sites/ville} = 0,2611$, $P = 0,001$). Le F_{ST} par paires a montré que tous les échantillons en étude sont significativement différents ($P < 0,00055$ et $P = 0,001$ respectivement pour *B. camerunensis* et *B. pfeifferi*). Toutefois, les différenciations entre les échantillons ne sont pas corrélées avec la distance géographique qui existe entre les sites de récolte de l'espèce *B. camerunensis*. Les paramètres démographiques ont montré que les populations de *Biomphalaria* spp. collectées à des dates différentes, ont un faible pouvoir de dispersion et qu'on serait en présence d'une dérive génétique, d'autant plus que les valeurs de l'effectif efficace ont été très faibles dans l'ensemble avec un taux de migration presque nul. Ces informations montrent que si la lutte antivectorielle est effectuée maintenant, elle entraînerait une diminution rapide de la densité de populations de *Biomphalaria* spp.

Mots clés : *Biomphalaria* spp., identification morphologique et moléculaire, marqueurs ADN ribosomique et microsatellites, structure génétique intra et interpopulationnelle, lutte antivectorielle, Sud Cameroun.

ABSTRACT

Basommatophore gastropods of the genus *Biomphalaria* are intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*, one of parasites responsible of intestinal schistosomiasis in the intertropical zone. The disease is endemic in all administrative regions of Cameroon. Despite the reduction in morbidity due to mass drug administration of praziquantel, its transmission remains very dynamic and heterogeneous. Vector control seem to be the most effective way to achieve elimination. For this, it is necessary to improve the knowledge on the species identification, biology and genetic diversity of these vectors. We therefore undertook to conduct a study on the taxonomy and genetic structure of few *Biomphalaria* spp. populations mainly sampled in the Southern part of Cameroon. Snails collected during two sampling campaigns were divided into 3 groups destined to the 3 main study experiments. *Biomphalaria* species were identified based on their morphology, shell measurement, and molecular (PCR-RFLP) method. The morphometric parameters of 490 specimens were analyzed and univariate and multivariate statistics were performed. The parasites present in living mollusc specimens (225 individuals) were identified by performing a natural cercarial shedding test during 30 days. Microsatellite alleles were revealed in 698 snails, followed by the study of the genetic diversity and the analysis of the demographic parameters within well identified *Biomphalaria* spp. populations. A total of 1231 and 435 snails were collected respectively at the first and at the second sampling campaigns. Cercarial emission revealed the presence of *Echinostoma* (Trematoda) larva in 13.77% of snails from only few *B. camerunensis* populations. Although principal component analysis failed to make a clear distinction between *B. pfeifferi* and *B. camerunensis*, univariate statistics revealed three key features that could be used to differentiate them. PCR-RFLP method could easily distinguish *B. camerunensis* from *B. pfeifferi*. Phylogenetic analyzes revealed the presence of six and three haplotypes respectively in *B. camerunensis* and in *B. pfeifferi* samples. Analysis of ITS molecular diversity revealed a low gene flow among *Biomphalaria* populations. These snail samples were not demographically expanding according to neutrality tests (D from Tajima and F from Fu). The study of 8 microsatellite markers showed a very poor level of polymorphism with only 28 alleles revealed. The average allelic richness being 2.053 and 1.965 respectively in *B. camerunensis* and in *B. pfeifferi* samples. The level of genetic diversity H_s was also very low, the average values being 0.289 and 0.192 respectively in *B. camerunensis* and *B. pfeifferi* populations. Observed heterozygosity H_o were also found to be very low (0.075 and 0.053) respectively in *B. camerunensis* and in *B. pfeifferi* samples. In addition, we recorded significant positive values of the F_{IS} inbreeding coefficient, with an

average of 0.742 for *B. camerunensis* and 0.726 for *B. pfeifferi* populations, suggesting a high level of apparent heterozygote deficits in the various studied populations. The major cause was the short allele dominance of the loci used. Populations of *Biomphalaria* spp. studied were then considered to be in Hardy Weinberg equilibrium. The mean fixation index (F_{ST}) obtained across all loci was 0.456 and 0.117 in *B. camerunensis* and *B. pfeifferi* populations. We noticed by the hierarchical analysis of the F , a significant differentiation between samples of *B. camerunensis* from different sites ($F_{sites/city} = 0.3284$, $P = 0.001$), different cities ($F_{city/Region} = 0.2336$, $P = 0.001$) and different Regions ($F_{Regions/Total} = -0.0322$, $P = 0.016$). Patterning was also significant between the two samples of *B. pfeifferi* from different sites in the same city ($F_{sites/city} = 0.2611$, $P = 0.001$). Pairwise F_{ST} estimates between all samples were significantly different ($P < 0.00055$ and $P = 0.001$ respectively for *B. camerunensis* and *B. pfeifferi*). However, the level of divergence between samples of *B. camerunensis* were not correlated with the geographical distance existing between the collection sites. Demographic parameters have shown that *Biomphalaria* populations collected at different dates have a low power of dispersal suggesting a high effect of genetic drift, especially since the values of the effective population have been very low overall, with the migration rate almost null. This *Biomphalaria* spp population structure is favourable for a rapid decrease in the population density if vector control is implemented.

Key words: *Biomphalaria* spp., morphological and molecular identification, ribosomal DNA and microsatellite markers, intra and interpopulation genetic structure, vector control, South Cameroon.

INTRODUCTION

La schistosomiase est une parasitose chronique considérée comme deuxième endémie parasitaire mondiale après le paludisme (Mazigo *et al.*, 2010). Elle est provoquée par des vers plats (trématodes) du genre *Schistosoma* Weiland, 1858. L'homme s'infeste au contact de l'eau contenant des mollusques parasités. Sa transmission est avérée dans 78 pays (WHO, 2015). On estime à environ 779 millions le nombre de personnes exposées (Tchuem Tchuente *et al.*, 2017 ; WHO, 2022) et à près de 280 000 décès chaque année en Afrique (Savioli *et al.*, 2017). Au Cameroun, en 2005 plus de 5 millions de personnes étaient exposées aux risques d'infestation soit 33% de la population, et près de 2 millions de personnes soit 13% étaient parasitées (PNLSHI, 2005). La nouvelle feuille de route (2021-2030) sur les Maladies Tropicales Négligées (MTN), adoptée par l'Organisation Mondiale de la Santé, fixe comme objectifs mondiaux l'élimination de la schistosomiase en tant que problème de santé publique (WHO, 2021).

La lutte contre la schistosomiase est effective depuis plus de trois décennies et a été basée essentiellement sur le contrôle de la morbidité de la maladie (Ratard *et al.*, 1990). Les résultats de cette lutte permettent de noter d'une part une baisse du niveau général des prévalences et intensités parasitaires et d'autre part une constance dans la transmission des schistosomes et la découverte de nouveaux foyers (Tchuem Tchuente *et al.*, 2012 , 2013). Cette situation épidémiologique nécessite la mise en place de stratégies nouvelles ; notamment l'amélioration du mode d'administration du traitement, l'aménagement des infrastructures, et un accent particulier sur la lutte contre les mollusques hôtes intermédiaires des schistosomes. Cette dernière forme de lutte reste peu appliquée en Afrique, pourtant le contrôle des populations des vecteurs serait le moyen le plus efficace pour réduire à long terme la prévalence de la schistosomiase (Sokolow *et al.*, 2016). La question de recherche que nous posons est celle de savoir comment implémenter et accélérer la lutte antivectorielle pour une élimination durable de la schistosomiase ? A cet effet, notre hypothèse stipule que sa mise en place requiert une bonne identification spécifique morphologique et moléculaire des mollusques hôtes intermédiaires, l'étude de la compatibilité mollusque/schistosome et la structure génétique des populations des mollusques vecteurs. Les travaux de cartographie des schistosomiasis de 2011 révèlent que la schistosomiase intestinale à *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 est la forme de bilharziose la plus répandue dans la zone équatoriale du Cameroun (Tchuem-Tchuente *et al.*, 2012 , 2013) mais il n'est pas fait mention de l'hôte intermédiaire responsable de la transmission dans les foyers jusqu'ici étudiés.

L'étude de la morphologie reste le moyen dominant de groupement et de classification des espèces (Doyle *et al.*, 2018). En étudiant la répartition des mollusques d'eau douce au

Cameroun, Same Ekobo (1984) a identifié deux espèces de mollusques hôtes intermédiaires de *Schistosoma mansoni* lesquels sont très semblables morphologiquement, à savoir *Biomphalaria pfeifferi* (Krauss, 1848) et *Biomphalaria camerunensis* (Boettger, 1941). L'étude a été répétée et la taxonomie fournie a été confirmée par Greer *et al.* (1990). Les deux études ont permis de conclure que l'identification de ces deux espèces pouvait se faire à l'aide des caractéristiques de la coquille, de la radula et du système génital (Brown, 1980 ; 1994), mais cette méthode est très lourde. Selon Mandahl-Barth (1957), l'analyse des caractéristiques de la coquille suffirait à distinguer les différentes espèces du genre *Biomphalaria* (Preston, 1910). Puis, Wrigth (1965) a réalisé une analyse des paramètres morphométriques de la coquille sur un échantillon prélevé à Bambalang dans la Région du Nord-Ouest du Cameroun, en définissant le rapport « diamètre maximum / diamètre de l'ombilic » et le rapport « diamètre maximum / hauteur de la coquille » ; cela a abouti à la confirmation de la sous-espèce *Biomphalaria camerunensis camerunensis* Mandahl-Barth, 1957. Les informations morphologiques peuvent être utilisées pour comparer des populations ou des espèces à l'aide de statistiques multivariées (Rolf et Marcus, 1993 ; Adams *et al.*, 2004). Ces méthodes ont été adoptées pour l'analyse morphologique de nombreux groupes d'invertébrés marins, tels que les bivalves (Sheratt *et al.*, 2016) et les gastéropodes (Primost *et al.*, 2016). Au cours des deux dernières décennies, des outils moléculaires ont été évalués à la fois pour l'identification des mollusques et les études phylogénétiques (Knight *et al.*, 1991 ; Vidigal *et al.*, 1996; Pires *et al.*, 1997). La réaction de polymérisation en chaîne et l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PCR-RFLP) de la région de l'espaceur interne transcrit (ITS) de l'ADN ribosomique (ADNr) et l'analyse de la sous-unité 1 du cytochrome c oxydase de l'ADN mitochondrial se sont avérées efficaces pour l'identification de plusieurs espèces de *Biomphalaria* (Caldeira *et al.*, 1998 ; 2000 ; Vidigal *et al.*, 2002). Plus récemment, la technique PCR-RFLP de la région ITS2 a été utilisée pour distinguer les espèces de *Biomphalaria* présentes au Brésil et elle apparaît comme un outil moléculaire complémentaire à leur identification morphologique (Vidigal *et al.*, 2004). Aucune étude similaire n'a encore été réalisée au Cameroun.

La compatibilité du couple *Biomphalaria*/schistosome reste très peu étudiée. Cependant, le modèle le plus étudié jusqu'ici est celui de *Biomphalaria glabrata*/*S. mansoni* (Rollison *et al.*, 1998 ; Haggag et El-sherbiny, 2006) ; *B. glabrata* est un mollusque que l'on retrouve en Amérique du Sud et aux Antilles. En Afrique en général et au Cameroun en particulier, l'espèce *S. mansoni* présenterait une meilleure compatibilité avec *Biomphalaria pfeifferi* qu'avec *B. camerunensis* (Mandahl-Barth *et al.*, 1973 ; Ripert *et al.*, 1978 ; Greer *et al.*, 1990,

Tchuem Tchuenté *et al.*, 1999). Toutefois, les études expérimentales menées par Kengne-Fokam *et al.* (2018) révèlent que certaines populations de *B. camerunensis* seraient un risque réel d'expansion de la schistosomose intestinale au Cameroun. Il a été montré que la susceptibilité mollusque hôte intermédiaire/schistosome a une base génétique (Richards et Merritt, 1972 ; Richard, 1975 ; Mulvey et Vrijenhoek, 1982) ; en conséquence, l'étude de la structure génétique des populations de *Biomphalaria* est un préalable à la compréhension de la variabilité des caractéristiques épidémiologiques entre les différents foyers de bilharziose intestinale au Cameroun. Cette variabilité génétique, révélée par l'analyse du polymorphisme enzymatique dans les populations de gastéropodes, a été généralement faible avec des valeurs moyennes d'hétérozygotie de l'ordre de 0,0179 pour *B. camerunensis* et 0,0051 pour *B. pfeifferi* (Mimpfoundi, 1990). L'écologie et les systèmes de reproduction de ces mollusques seraient à l'origine de ces faibles taux (Selander et Ochman, 1983 ; Mulvey *et al.*, 1988a ; Njiokou, 1992 ; Charbonnel *et al.*, 2000 ; Campbell *et al.*, 2010). Les espèces allofécondes (espèces qui pratiquent un mode de reproduction croisée) ont un niveau d'hétérozygotie supérieur à celui des espèces autofécondes (espèces possédant à la fois le gamète male et le gamète femelle et pouvant se reproduire en l'absence de partenaires sexuels). Ainsi *Biomphalaria camerunensis*, espèce préférentiellement alloféconde, a présenté un niveau d'hétérozygotie de l'ordre de 0,011 (Mimpfoundi, 1990) supérieur à celui de *Biomphalaria pfeifferi* (0,002), espèce autoféconde (Mimpfoundi et Greer, 1990b).

Les marqueurs microsatellites ont été utilisés à Madagascar et au Sénégal pour étudier la structure génétique de *Biomphalaria pfeifferi* et ils ont révélé un niveau de polymorphisme plus élevé comparé à l'utilisation des isoenzymes. Aucune étude de génétique par les microsatellites n'a encore été réalisée sur les populations de *Biomphalaria* spp. du Cameroun.

L'objectif général de ce travail est de contribuer à la lutte contre la schistosomiase intestinale à *Schistosoma mansoni* par un approfondissement de l'analyse de la diversité génétique des populations de *Biomphalaria* spp. hôtes intermédiaires de ce parasite.

Plus spécifiquement il s'est agi de :

- analyser l'apport des marqueurs morphologiques et moléculaires dans l'identification des taxons de *Biomphalaria* spp. du grand sud-Cameroun ;
- révéler les allèles aux loci microsatellites et analyser la structure génétique des populations de *Biomphalaria* spp. du grand sud-Cameroun.

Les travaux menés sont présentés en 03 chapitres entourés d'une introduction et d'une conclusion. Le premier chapitre traite de la revue de littérature ; le second chapitre présente le

cadre géographique, le matériel et les méthodes utilisés ; le troisième chapitre expose les différents résultats obtenus et la discussion.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

I-1- Schistosomes et bilharzioses humaines

Les schistosomes ou bilharzies sont des vers plats à symétrie bilatérale, gonochoriques, hématophages dont les adultes vivent en couple dans le système circulatoire de l'homme mais aussi de certains rongeurs ou bovins (Bonnard *et al.*, 2000).

Les schistosomoses ou bilharzioses constituent un problème de santé publique ; les estimations montrent qu'au moins 251,4 millions de personnes dans 78 pays ont eu besoin d'un traitement préventif en 2021, et une proportion de 80 à 90 % d'entre elles vit en Afrique (WHO, 2023). Ce sont des maladies parasitaires causées par des vers plats (schistosomes), dont les œufs sont éliminés par voies urinaire ou fécale, faisant intervenir des hôtes intermédiaires (mollusques d'eau douce) et dont la symptomatologie est le reflet des lésions provoquées par la migration ou l'embolisation des œufs. Elles sont directement liées au développement agricole et à l'augmentation des réseaux d'irrigation (eaux), et sévissent en foyers sur un mode endémo-épidémique.

I-1-1- Historique des bilharzioses

Les bilharzioses atteignent l'homme depuis des millénaires, mais elles sont devenues un problème inquiétant à l'aube de l'histoire, lorsque les grandes communautés d'êtres humains ont commencé à se former (Golvan, 1983). C'est ainsi que le papyrus Ebers décrit en détail les manifestations cliniques de la maladie telle qu'elle est observée en Egypte. En 1910, Ruffer décrit des œufs typiques de schistosomes retrouvés dans l'appareil urinaire de deux momies égyptiennes datant de 1250 et 1000 ans avant Jésus Christ. Dès le moyen-âge, les Arabes savaient que les caravaniers qui traversaient le Sahara du Nord et du Sud présentaient souvent des hématuries. Les chirurgiens de l'armée de Bonaparte eurent à soigner de nombreux cas d'une maladie appelée par le baron Larrey l'«hématurie d'Egypte». En 1845, le médecin Japonais Fugi décrit remarquablement les symptômes qu'il observait chez ses patients. Mais c'est en 1851 que l'Allemand Bilharz découvre au Caire, le parasite par suite d'une autopsie réalisée dans les vaisseaux du petit bassin des vers qu'il nomme *Distomum haematobium* ; il observe tout de même que la forme des œufs varie selon l'organe où ils se rencontrent et affirme dès lors que ces œufs appartiennent à deux espèces différentes. En 1903, Manson confirme l'appartenance à deux espèces de ces œufs, l'une à manifestations surtout urinaire (*Schistosoma haematobium*) présente en Afrique et en Asie et l'autre à symptomatologie essentiellement digestive (*Schistosoma mansoni*) rencontrée en Afrique et aussi en Amérique tropicale. En 1904, Katsurada au Japon met en évidence *Schistosoma japonicum* chez le rat et chez l'homme. Trois principales espèces de schistosomes sont

désormais connues à savoir : *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1952), *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 et *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904); c'est plus tard en 1934 qu'une quatrième espèce est découverte *Schistosoma intercalatum* (Fischer, 1934). Les chercheurs japonais élucidèrent les grandes étapes du cycle complexe des schistosomes :

- en 1910, la notion d'infection par voie transcutanée est désormais acquise et on découvre alors les larves nageuses infestantes ;
- en 1912, Miyangawa fait remarquer que ces larves sont des organismes très complexes et évolués, et il conclut qu'elles ont dû subir une maturation dans un organisme aquatique ;
- en 1913, Miyairi et Suzuki bouclent complètement le cycle de ces larves en suivant toute leur évolution chez le mollusque du genre *Onchomelania*.

I-1-2- Taxonomie des schistosomes (Kiarie, 2009)

La position systématique des schistosomes est la suivante :

Règne : Animalia (organismes mobiles et eucaryotes)

Embranchement : Plathelmintha (vers plats non segmentés)

Classe : Trematoda (aplatis dorso-ventralement et en forme de feuille)

Sous-classe : Digenea (appareil digestif avec caecum)

Ordre : Strigeaeta (ventouses ventrale et buccale)

Famille : Schistosomatidae (la particularité est de produire des cercaires libres)

Genre : *Schistosoma* Weiland, 1858.

Le genre *Schistosoma* regroupe plus de vingt espèces de schistosomes (Brown, 1994) parmi lesquelles treize sont retrouvées en Afrique, dont neuf hébergées par des animaux (espèces zoophiles : *Schistosoma rodhaini* Brumpt, 1931, *Schistosoma margrebowiei* Le Roux, 1933, *Schistosoma leiperi* Le Roux, 1955, *Schistosoma mattheei* Veglia et Le Roux, 1929, *Schistosoma kisumuensis* n. sp. Hanelt *et al.*, 2009, *Schistosoma curassoni* Brumpt, 1931, *Schistosoma bovis* Sonsino, 1876, *Schistosoma hippopotami* Thurston, 1963, *Schistosoma edwardiense* Thurston, 1964) et quatre (04) parasitent l'homme (espèces anthropophiles).

D'après Rollinson et Southgate (1989), les espèces anthropophiles sont : *Schistosoma guineensis* (Pages, 2003), qui autrefois était considérée comme espèce jumelle de *Schistosoma intercalatum* Fischer, 1934 mais qui est reconnue de nos jours comme une espèce à part, toutes deux responsables de la schistosomiase rectale, *Schistosoma haematobium* causant la schistosomiase urogénitale et *Schistosoma mansoni* agent de la schistosomiase intestinale et hépatique. Cette dernière forme est très répandue en zone tropicale. Le tableau I regroupe

quelques caractères distinctifs des schistosomes anthropophiles (ANOFEL, 2014 ; Aubry et Gaüzère, 2019).

Tableau I : Caractères distinctifs des espèces de schistosomes anthropophiles africains

Espèces Caractères	<i>Schistosoma haematobium</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma intercalatum</i> / <i>Schistosoma guineensis</i>
Localisation des Parasites	Plexus veineux uro-génital et/ou rectal	Veine mésentérique Inférieure	Plexus veineux péri rectal
Voie d'élimination des œufs	Vessie	Côlon	Rectum
Nombre d'œufs pondus par ver par jour	20 à 200	100 à 300	Inconnu
Forme et taille des œufs	Ovalaire à éperon terminal 150/60 µm	Ovalaire à éperon latéral 140/60 µm	Ovalaire à éperon terminal 200/65µm
Prélèvements pour diagnostic direct	Urines, biopsies vésicales et rectales	Selles, biopsies rectales	Selles, biopsies rectales
Répartition	Afrique noire, Madagascar (ouest), vallée du Nil (Egypte), Moyen-Orient (Arabie Saoudite, Yémen)	Afrique (est et sud), Madagascar (est), Moyen-Orient (Yémen), Amérique latine (Brésil, Venezuela), Antilles (Sainte-Lucie)	Afrique (<i>S. intercalatum</i> en RDC ; <i>S. guineensis</i> au Cameroun, Gabon, Guinée Équatoriale, Nigeria et Sao Tomé et Principe)
Hôte intermédiaire	<i>Bulinus</i> spp., <i>Physopsis</i> spp.	<i>Biomphalaria</i> spp.	<i>Bulinus</i> spp.

I-1-3- Cycle évolutif de *Schistosoma mansoni*

Le cycle biologique de *Schistosoma mansoni* fait intervenir deux hôtes obligatoires : un hôte définitif vertébré (l'Homme ou un rongeur) chez lequel se déroule la reproduction sexuée, et un hôte intermédiaire mollusque pulmoné d'eau douce du genre *Biomphalaria* où se déroule la multiplication asexuée des larves (figure 1).

L'Homme s'infeste par simple contact avec les eaux douces (lacs, fleuves, rivières, mares) contenant des furcocercaires émises par des *Biomphalaria* infestés.

I-1-3-1- Chez l'hôte définitif

Après pénétration transcutanée de la cercaire, le schistosomule est entraîné en quatre jours, par les vaisseaux lymphatiques (et parfois veineux), vers les veines caves puis les poumons. Ensuite, il emprunte les artères pulmonaires avant de s'arrêter dans les capillaires pulmonaires. A cet endroit, la larve subit une transformation afin de devenir filiforme pour ensuite poursuivre son périple migratoire vers le cœur gauche, l'aorte, les artères mésentériques et le foie en 10 à 20 jours. Dans le foie, les schistosomules deviennent adultes et sexués en 3 semaines environ, tout en se nourrissant de sang. Ceux qui se perdent dans d'autres organes restent immatures. Puis, les adultes s'accouplent dans le système veineux porte à la quatrième semaine après l'infestation. Les femelles remontent à contre-courant la veine mésentérique inférieure et les plexus péri-coliques. A la fin de cette migration, les femelles pondent des œufs caractérisés par leur éperon latéral qui ont la propriété de cheminer dans l'organisme de l'homme. Ainsi, une moitié d'œufs reste dans le tissu et une réaction granuleuse (formation d'un granulome bilharzien) se forme autour d'eux. L'autre moitié parvient dans la lumière intestinale. Ces œufs sont alors évacués dans les selles en provoquant des micro-lésions dont la confluence entraîne les symptômes de la maladie.

I-1-3-2- Chez l'hôte intermédiaire

L'Homme (hôte définitif) élimine les œufs du parasite dans le milieu extérieur via les selles. Dans l'eau douce à 25°C et à forte luminosité, les œufs éclosent et libèrent une larve embryonnaire ciliée, le miracidium. Ce miracidium part alors à la recherche du planorbe (*Biomphalaria*). En cas de rencontre entre le miracidium et le mollusque, la pénétration chez le mollusque se fait à travers le pied. Une fois à l'intérieur, le miracidium perd son revêtement et passe par différentes phases larvaires (sporocystes) en se multipliant. Cette phase permet d'obtenir en quatre semaines de nombreuses formes larvaires terminales appelées cercaires. Les cercaires sont ensuite évacuées du mollusque et nagent librement dans l'eau ; elles ne

survivent que quelques heures si elles ne rencontrent pas rapidement l'hôte définitif. Les cercaires sont attirées par les sécrétions cutanées humaines. Elles se fixent sur l'épiderme grâce à leur ventouse munie d'épines. La pénétration se fait par des phénomènes mécaniques et chimiques (sécrétion d'enzymes kératolytiques) en une dizaine de minutes.

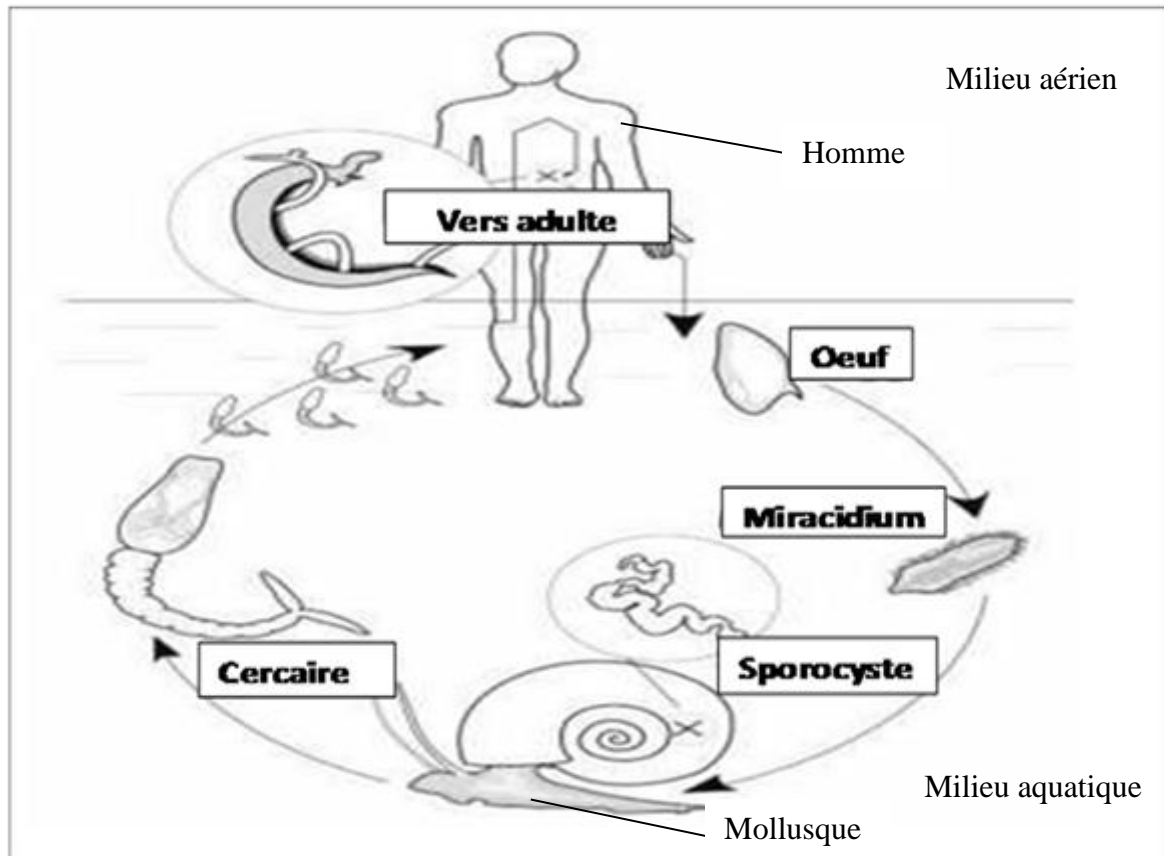


Figure 1 : Cycle biologique de *Schistosoma mansoni* (Théron *et al.*, 1992)

I-1-4- Schistosomiase intestinale à *Schistosoma mansoni*

Les bilharzioses sévissent dans les zones tropicales et intertropicales où la température varie de 26 à 30°C, mais celle causée par *S. mansoni* est très fréquente en zone tropicale (Ratard *et al.*, 1990).

I-1-4-1- Données épidémiologiques et distribution de la maladie

La schistosomiase intestinale à *S. mansoni* est la forme la plus répandue dans le monde ; elle est endémique dans 53 pays et les zones d'infection sont, pour la plupart, des zones de grands aménagements hydro-agricoles. Particulièrement rencontrée en Afrique (surtout à l'Est et au Sud), à Madagascar (Est), au Moyen orient (Yémen), en Amérique latine (Brésil,

Venezuela) et aux Antilles (Sainte Lucie) (Aubry et Gauzère, 2019), elle est à l'origine de près de 130 000 décès par an et 54 millions de personnes en sont infestées (OMS, 2013).

I-1-4-2- Situation au Cameroun

La bilharziose intestinale à *Schistosoma mansoni* est connue au Cameroun depuis plus de 80 ans (Deschiens *et al.*, 1968), et ses foyers sont beaucoup plus étendus aussi bien dans le Sud que dans le Nord du pays (Samé Ekobo, 1984), toutefois elle est plus répandue dans la partie équatoriale.

La schistosomiase intestinale est la forme la plus observée dans les régions du Centre, de l'Est et de l'Ouest du pays avec une inégale répartition et des prévalences hétérogènes (Tchuem Tchuente *et al.*, 2012).

Dans la région du Centre, 3 départements sont particulièrement concernés par cette parasitose il s'agit : *i*) du département du Mbam et Inoubou qui est la zone la plus affectée avec plusieurs foyers situés à Makénéne (Aloho-Bekong *et al.*, 2011 ; Tchuem Tchuente *et al.*, 2013) ; à Bafia (Ratard *et al.*, 1990), à Yoro (Moyou *et al.*, 2003 ; Essomba, 2013) et à Kédia (Tchami Mbagnia, 2015), *ii*) du département de la Lekié qui abritait autrefois deux foyers à Minkama et à Nalassi (Ripert *et al.*, 1978), *iii*) et du département du Mfoundi qui malgré une croissance de l'assainissement de l'environnement et de l'urbanisation, regorge encore quelques foyers avec de faibles prévalences dans la ville de Yaoundé (Mazeufouo, 2010 ; Dongmo Noumedem, 2010 ; Kengne Fokam *et al.*, 2018).

A l'Est, deux foyers ont été identifiés, dont l'un à Bertoua dans le département du Lom et Djérem (Ratard *et al.*, 1990) et l'autre à Batouri dans le département de la Kadeï (Deschiens *et al.*, 1969).

I-1-4-3- Transmission et manifestations cliniques

La transmission se produit quand les patients souffrant de schistosomiase contaminent les sources d'eau douce avec leurs excréments ; elle nécessite deux éléments essentiels, d'une part la dissémination des œufs dans le milieu aquatique et d'autre part le contact entre l'homme et le parasite, qui se fait par l'intermédiaire des différentes activités menées dans les cours d'eaux insalubres (bains, pêches, lessive...).

On note 4 phases d'évolution de la schistosomiase (ANOFEL 2014) :

- Phase de contamination

Elle correspond à la pénétration des furcocercaires. Elle passe souvent inaperçue, mais peut entraîner un tableau de "dermatite des nageurs" (érythème cutané allergique) survenant 15 à 30 minutes après le bain infestant.

- Phase d'invasion toxémique

Elle est contemporaine de la migration et de la maturation des schistosomules dans la circulation sanguine et dans les vaisseaux portes intra hépatiques. Elle peut être marquée par un malaise général : asthénie, fièvre, céphalées, anorexie (fièvre des safaris) accompagné de troubles d'ordre allergique : prurit (démangeaisons), arthralgie (douleurs articulaires), myalgie (douleurs musculaires), poussée d'urticaire (éruption cutanée).

- Phase d'état

Elle est en rapport avec la localisation des pontes des femelles. La symptomatologie est dominée par une perturbation du transit alternant des crises diarrhéiques d'intensité variable (épisodes dysentériques) et constipation accompagnée de ballonnements post-prandiaux (ballonnements après le repas) et de douleurs coliques, et d'une pathologie intestinale souvent plus bruyante dominée par des rectorragies (émission du sang par l'anus).

- Phase de complications

Elle correspond à la rétention des œufs ; en cas d'infestations massives et répétées, la schistosomiase peut connaître des complications graves et engendrer une pathologie hépatosplénique et encore plus une embolisation massive d'œufs vivants au niveau des anastomoses portocave. On peut également observer une cirrhose du foie, une bronchopneumonie, une hypertension artérielle pulmonaire, une tuberculose mésentérique et des troubles nerveux et cardiaques (Golvan, 1983). Des complications telles que l'hémorragie intestinale, les syndrômes de malabsorptions à la suite de l'obstruction des voies lymphatiques par les bilharziomes peuvent subvenir.

I-1-4-4- Diagnostic

Le diagnostic se fait par la détection des œufs dans les selles. Des antigènes de *S. mansoni* présents dans les échantillons de selles sont également des indicateurs de l'infection (OMS, 2013). Notons que les méthodes de diagnostic varient au cours du cycle et on a : le diagnostic parasitologique (ou direct) et le diagnostic immunologique (ou indirect).

I-1-4-4-1- Diagnostic parasitologique

Généralement, le diagnostic de la bilharziose est parasitologique et se fait 2 à 3 mois après l'infection. Il consiste à mettre en évidence des œufs du parasite dans les excréta d'un

porteur. Néanmoins les œufs peuvent aussi être retrouvés par une biopsie rectale, hépatique et vésicale ou dans les liquides biologiques (crachats) (ANOFEL, 2011).

En cas de schistosomiase intestinale, on met en évidence les œufs à éperon latéral dans les échantillons de matières fécales au moyen de la technique de concentration de Kato-Katz (Katz *et al.*, 1970) recommandée pour les études épidémiologiques (Stothard *et al.*, 2013) ; d'autres techniques peuvent encore être citées telles que la technique de concentration de Ritchie (Cheesbrough, 1991), les techniques directes simples grâce à une solution physiologique et au lugol (composition chimique : 1 gramme d'Iode, 2 grammes d'Iodure de potassium et 100 mL d'eau).

I-1-4-4-2- Diagnostic immunologique

Son but est de révéler la présence d'antigènes bilharziens et les réactions immunologiques à médiation humorale (anticorps) ou cellulaire. La réaction de Volgel et Minning, l'immunofluorescence indirecte, l'immunoélectrophorèse, la réaction d'Olivier Gonzales et la technique d'ELISA sont utilisées pour ce diagnostic (Ambroise *et al.*, 1981; OMS, 1998) ; toutefois, la CCA (Circulating Cathodic Antigen) et la CAA (Circulating Anodic Antigen) sont les principaux tests couramment utilisés pour détecter les antigènes de *S. mansoni* dans les urines (Polman *et al.*, 1995 ; Standley *et al.*, 2010 ; Tchuem-Tchuente *et al.*, 2012 ; Mezajou-Mewamba *et al.*, 2021).

I-1-4-5- Contrôle de la maladie

I-1-4-5-1- Traitement

Le traitement de référence est le praziquantel (Biltricide®) qui est une cyclohexyl-isoquinoléine dont le point d'impact principal est la plaque motrice du parasite (Lechat et Calvo, 1990) ; c'est le seul médicament actif sur tous les schistosomes. Il se présente sous forme de comprimés quadri-sécables à 600 mg. Il agit sur les schistosomules âgés de 2 jours et les vers adultes. Entre ces deux stades, son efficacité est très réduite. Administré très précocement, avant le 28^{ème} jour, le praziquantel est inefficace.

Quelques échecs au praziquantel ont été récemment constatés pour *S. mansoni*. Dans cette situation, il est recommandé d'associer au Biltricide®, l'artéméther (ARTENAM®) (Aubry et Gaüzère, 2019).

I-1-4-5-2- Stratégies de lutte

La prévention de cette parasitose repose sur deux grandes stratégies :

- une lutte au niveau de la population humaine, qui vise à éliminer la dissémination des œufs dans la nature ; elle s'effectue au moyen d'une chimiothérapie de masse, d'une éducation sanitaire de la population et d'un assainissement de l'environnement humain.
- une lutte au niveau du mollusque hôte intermédiaire du parasite, par des moyens physiques, chimiques et biologiques.

I-1-4-5-2 -1- Lutte au niveau de la population humaine

- Chimiothérapie de masse : elle consiste en un traitement de masse des populations à l'aide du praziquantel (WHO, 2006). Au Cameroun, seuls les enfants d'âge scolaire vivant dans les zones d'endémie, où la prévalence moyenne par district est supérieure ou égale à 10% bénéficient de ce traitement une fois par an (PNLSHI, 2005).

- Education sanitaire de la population : c'est une étape de sensibilisation. Il est indispensable que les gens apprennent à reconnaître les sites où la maladie risque le plus d'être transmise, tels que les collections d'eau douce couramment utilisées pour la lessive, les baignades, et la pêche ; il est nécessaire d'informer la population sur le risque qu'elle joue dans la transmission de la schistosomose en contaminant les plans d'eau par les matières fécales et les urines. C'est ainsi que MOTT (1984) disait : *«c'est l'homme qui cause la schistosomose et non le mollusque porteur ; admettre cette idée transformerait radicalement la lutte contre la maladie.»*

- Assainissement de l'environnement humain : la lutte par l'assainissement de l'environnement, consiste à limiter les contacts entre la population et l'eau contaminée, en améliorant par exemple les sources d'approvisionnement en eau, tels que la construction massive des puits et des forages, et en insistant sur l'utilisation généralisée des latrines (Golvan, 1983).

I-1-4-5-2-2- Lutte au niveau du mollusque hôte intermédiaire

La destruction des mollusques qui abritent les formes larvaires du parasite, est un moyen efficace de rompre leur cycle de développement et prévenir par conséquent l'infestation humaine. Cette intervention requiert 3 méthodes, pouvant être utilisées de manière isolée ou en combinaisons variées en fonction des circonstances locales (Golvan, 1983). Il s'agit des méthodes suivantes :

- la méthode physique ; elle consiste à un contrôle écologique, c'est à dire à une modification de l'environnement rendant moins favorable la dissémination des mollusques ; pour ce faire, il est important de mettre un accent particulier sur la construction des canaux

d'irrigation et de drainage, le contrôle des inondations, le désherbage et un assèchement périodique des différents biotopes ;

- la méthode chimique ; elle est basée uniquement sur l'utilisation des molluscicides chimiques ou synthétiques (Niclosamide, Sodium Pentachlorophenate, Frescon) et végétales ou naturels (l'Endod, extraits éthanoliques des fruits de *Piper guineense*) (Ukwandu *et al.*, 2011);
- la méthode biologique ; elle constitue certainement une voie d'avenir, elle utilise des processus naturels tels que la pathogénicité, la compétition (Mandsen, 1984), et la prédation (Pointier *et al.*, 1989), pour réduire la densité des populations de mollusques vecteurs à un seuil relativement bas, entraînant un risque presque nul de transmission de la maladie. Parmi les prédateurs ayant déjà montré leur efficacité nous pouvons citer les insectes aquatiques, les sangsues, les poissons et les canards ; et parmi les compétiteurs les plus prometteurs, nous avons les espèces de gastéropodes *Marisa cornuarietis* (Linnaeus, 1758) et *Helisoma duryi* Wetherby, 1879 (Dazo, 1984).

La lutte contre la schistosomiase s'est montrée efficace lorsque le contrôle des mollusques hôtes intermédiaires a été implémenté (Sokolow *et al.*, 2016). Toutefois, ce contrôle reste très peu appliqué dans les pays en voie de développement à cause du coût très élevé de l'implémentation. Cependant, une meilleure identification des mollusques vecteurs, leur répartition, leur biologie et une connaissance plus approfondie sur la génétique de ces hôtes seraient importants dans une lutte antivectorielle efficace et durable.

I-2- Généralités sur le genre *Biomphalaria*

I-2-1- Position taxonomique des *Biomphalaria* spp. (Brown, 1994)

La position systématique du genre *Biomphalaria* Preston, 1910 est la suivante :

Règne : Animalia

Embranchement : Mollusques (métazoaires triploblastiques coelomates hyponeuriens à corps mou habituellement couvert de coquille)

Classe : Gastropoda

Sous-classe : Pulmonata

Ordre : Basommatophora

Superfamille : Planorboidea

Famille : Planorbidae

Sous famille : Planorbinae

La sous-famille des Planorbinae comprend 20 espèces en Amérique et 12 espèces en Afrique réparties en quatre groupes (le groupe Pfeifferi, Choanomphala, Alexandrina et

Sudanica) selon des caractères morpho-anatomiques et biochimiques (Brown, 1994). *Biomphalaria pfeifferi* (Krauss, 1848) et *Biomphalaria camerunensis* (Boettger, 1941) sont les deux espèces couramment rencontrées au Cameroun ; ils appartiennent respectivement au groupe Pfeifferi et au groupe Sudanica (Brown, 1994).

➤ Le groupe Pfeifferi comprend plusieurs formes, la coquille adulte a un diamètre inférieur à 15mm avec au plus 5 tours de spire qui sont convexes ou angulaires.

➤ Le groupe Sudanica regroupe les plus grands *Biomphalaria*. La coquille peut atteindre 22mm et comprend de 5,5 à 6,5 tours de spire très serrée, de forme aplatis ou angulaires.

I-2-2- Identification spécifique des *Biomphalaria* spp.

Les études antérieures sur l'identification des Planorbidae au Cameroun, ont porté essentiellement sur l'étude de la coquille, de l'anatomie (Brown, 1980 ; Same-Ekobo, 1984 ; Greer *et al.*, 1990) et du polymorphisme iso enzymatique (Mimpfoundi, 1990).

I-2-2-1- Identification morpho-anatomique

B. pfeifferi et *B. camerunensis* présenteraient des différences au niveau de la forme du dernier tour de spire, du nombre de tours de spire et du diamètre de la coquille adulte (Brown et Kristensen, 1993).

La coquille de *B. pfeifferi* n'excède pas 17 millimètres ; elle possède environ 5 tours et demi de spire à croissance lente et aux côtés arrondis, avec le dernier tour de spire plus large et rebondi. Celle de *B. camerunensis* peut atteindre 22 millimètres de diamètre et le dernier tour de spire est aplati (Brown, 1965 ; 1980).

Il existerait une différence dans le rapport diamètre de l'ombilic sur diamètre de la coquille entre ces deux espèces ; cependant, les avis sont contradictoires concernant la stabilité de ces paramètres dans les différentes populations étudiées (Same Ekobo, 1984 ; Brown, 1994 ; Peka Sangou, 2012 ; Mvogo-Ndongo, 2012).

L'anatomie des deux espèces a révélé des différences au niveau des premières dents latérales de la radula. La première dent latérale de la radula a des mésocônes triangulaires non pointus chez *B. pfeifferi*, tandis qu'ils sont pointus chez *B. camerunensis*. Malgré ces différences chez l'adulte, il demeure difficile de distinguer un jeune *B. camerunensis* d'un jeune *B. pfeifferi* et même d'un *B. pfeifferi* adulte. La présence de grandes variations intra/inter spécifiques dans les caractères morpho-anatomiques rend cette méthode insuffisante pour une bonne identification (Mandahl-Barth, 1958).

I-2-2-2- Identification iso enzymatique

Le polymorphisme des isoenzymes révélé par la technique d'électrophorèse sur gel d'amidon, a été utilisé pour distinguer *B. pfeifferi* de *B. camerunensis* (Mimpfoundi, 1990). Parmi les 15 systèmes enzymatiques étudiés par Mimpfoundi (1990), seule la nucléoside phosphorylase (NP), a permis d'observer une nette différence entre les deux espèces. Les autres loci analysés se sont montrés très polymorphes au sein des espèces d'une part et d'autre part la migration dans les deux espèces était identique, rendant difficile le diagnostic de ces espèces.

I-2-2-3- Identification moléculaire

Chaque espèce est dotée d'un patrimoine génétique qui est transmis d'une génération à une autre et est codé par son acide désoxyribonucléique (ADN). Il serait donc important de rechercher les différences entre deux espèces proches au niveau de cet ADN. L'un des grands défis de la biologie moderne est de développer des technologies précises et fiables pour un criblage de la variation de la séquence d'ADN.

L'identification moléculaire est centrale pour la taxonomie et l'épidémiologie des maladies. Ces dernières années, une variété d'approches basées sur l'ADN ont été développées pour l'identification des individus dans une myriade de groupes taxonomiques (Zehner *et al.*, 1998 ; Wolf *et al.*, 1999). Une évaluation critique de plusieurs méthodes a été présentée en se concentrant sur leur pouvoir discriminatoire, leur reproductibilité et convivialité ; ayant à l'esprit que la tendance actuelle est de développer des dispositifs à petite échelle qui offrent de grandes possibilités pour l'identification des espèces (Pereira *et al.*, 2008).

La PCR (Polymerase Chain Reaction) associée à la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), semble la méthode idéale dans le procédé d'identification moléculaire. Cette technique offre un triple avantage : *i*) elle fournit une quantité d'information considérable et est facilement reproductible d'un laboratoire à un autre, *ii*) le coût des équipements et des réactifs nécessaires pour sa réalisation est modéré, et *iii*) elle est très apte dans la détection des espèces associées (Pereira *et al.*, 2008).

La technique de la PCR-RFLP a été utilisée pour analyser le polymorphisme de la région ITS2 de l'ADN ribosomique (ADNr) des *Biomphalaria* afin de différencier les espèces présentes en Amérique du sud (Vidigal *et al.*, 2004).

Chez la plupart des eucaryotes, les gènes de l'ADN ribosomique (ADNr) se localisent sur différents chromosomes (Long & Dawid, 1980) et se présentent en plusieurs copies dans le génome nucléaire (Cassidy *et al.*, 1984). L'ADNr est constitué d'une répétition en tandem

de séquences d'ADN transcrites en ARN ribosomique, séparées par des régions intergéniques variables.

L'espaceur intergénique transcrit (ITS) s'étend entre les régions des gènes de l'ARNr 18S et 28S ; il contient le gène 5,8S encadré par l'ITS1 et l'ITS2 (figure 2). Cette région ITS est bien conservée au sein d'une espèce mais présente suffisamment de variabilité interspécifique pour l'identification correcte des espèces apparentées (Knight *et al.*, 1991; Webster *et al.*, 2006). La nature conservée des régions flanquantes de cette région ITS permettant de construire des amorces conservées explique leur popularité dans les analyses phylogénétiques entre espèces et populations étroitement apparentées (Hillis & Dixon, 1991).

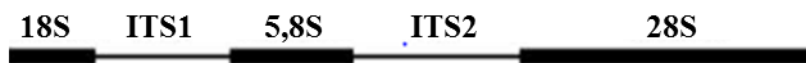


Figure 2 : Espaceur interne transcrit (ITS) de l'ADN ribosomique

Le procédé de la PCR-RFLP consiste à amplifier la région cible par PCR et à la soumettre à une digestion enzymatique grâce à une enzyme de restriction (endonucléase) ; les produits de la digestion sont révélés et visualisés soit sur un gel d'agarose, soit sur un gel de polyacrylamide.

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) mise au point en 1985 par Mullis, est utilisée dans le but d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Les réactions de PCR sont constituées de plusieurs « cycles PCR » permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin. Ainsi, les produits PCR obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle. Ces réactions se déroulent en trois étapes : *i*) la dénaturation (séparation des matrices doubles brins en simples brins), *ii*) le bornage ou hybridation des amorces (pour cibler l'amplification sur la région ADN souhaitée à l'aide d'amorces PCR spécifiques), *iii*) et l'amplification PCR (étape de polymérisation du brin complémentaire).

Les enzymes de restriction sont des protéines capables de couper un fragment d'ADN au niveau d'une séquence de nucléotides caractéristique appelée site de restriction. Les sites de restriction correspondent à de courtes séquences de 4 à 8 nucléotides, qui sont pour la plupart palindromiques, c'est-à-dire qu'ils sont composés de séquences nucléotidiques identiques sur les deux brins mais en orientations antiparallèles.

Ces enzymes sont synthétisées par des bactéries pour se protéger des infections de virus (bactériophages). C'est le Suisse Werner qui découvre en 1962, que des enzymes

bactériennes sont capables de couper l'ADN du phage (virus). En 1970, l'Américain Smith purifie la première enzyme de restriction à partir de la bactérie *Haemophilus influenzae*. L'année suivante, son compatriote Nathans l'utilise pour découper l'ADN du virus SV40. En faisant des différentes enzymes de restriction de véritables ciseaux moléculaires, ces trois chercheurs ont doté la biologie moléculaire d'un de ses outils les plus indispensables.

Le nom d'une enzyme de restriction indique son origine par exemple *Sau3A* provient de *Staphylococcus aureus* 3A, *EcoRI* provient de *Escherichia coli*, *HpaII* provient de *Haemophilus parainfluenzae* et *TaqI* provient de *Thermus aquaticus*.

L'analyse du polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) est largement utilisée pour la détection de la variation interspécifique au niveau de la séquence d'ADN.

Elle consiste en la génération de profils de bandes spécifiques à l'espèce par la digestion de l'ADN avec une ou plusieurs enzymes de restrictions ou endonucléases (Botstein *et al.*, 1980). Ces enzymes de restriction clivent la molécule d'ADN et sont à l'origine d'un ensemble de fragments avec différentes longueurs, qui pourraient être séparés selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel conventionnelle.

Les fragments RFLP pourraient être visualisés en les hybridant avec une sonde marquée dans un support solide (par Southern blot) ou en traitant le gel électrophorétique avec du bromure d'éthidium ou une coloration à l'argent. Le profil RFLP distinctif de chaque espèce est le résultat de la distribution génomique unique des sites de reconnaissance (générés ou supprimés par des substitutions à base unique) et de la distance entre eux (qui varie en raison des réarrangements génomiques, tels que les translocations, les éléments transposables ou duplications en tandem) (Pereira *et al.*, 2008). Aucune étude d'identification moléculaire des *Biomphalaria* n'a encore été réalisée au Cameroun.

I-2-3- Appareil reproducteur et système de reproduction des *Biomphalaria* spp.

I-2-3- 1- Appareil reproducteur

Chez les Pulmonés, certaines espèces peuvent se distinguer par la morphologie de l'appareil génital et plus particulièrement de l'organe copulateur.

L'appareil génital d'un Planorbidae (figure 3) comprend une glande génitale hermaphrodite (ovotestis) assez volumineuse qui se prolonge par un canal hermaphrodite comportant plusieurs vésicules séminales dans sa partie supérieure. Ce canal se divise ensuite en une partie mâle (canal spermatique) et une partie femelle formée de l'oviducte et de la glande à albumine.

La partie distale de l'oviducte (utérus) débouche dans le vagin qui s'ouvre sous le bord du manteau, sur le côté gauche de l'animal. Le canal spermatique se poursuit par un canal déférent qui aboutit à l'organe copulateur. Celui-ci est composé dans sa partie supérieure d'un fourreau entourant le pénis, et dans sa partie inférieure d'un prépuce plus large.

L'organe copulateur est rétractile et s'ouvre sous le tentacule droit des mollusques à coquille dextre ; sa forme et les proportions relatives du fourreau et du prépuce, sont utilisés en systématique (Lévêque, 1980).

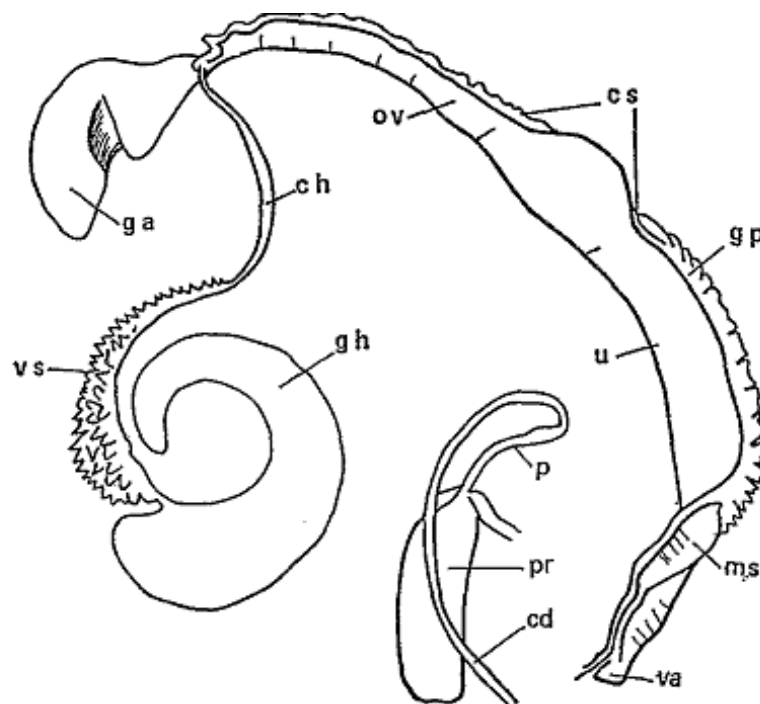


Figure 3 : Appareil génital d'un Planorbidae : *Biomphalaria pfeifferi* (Mandahl-Barth, 1958)

Légende : cd : canal déférent ; ch : canal hermaphrodite ; cs : canal spermatique ; ga : glande de l'albumine ; gh : glande hermaphrodite ; gp : glande prostatique ; ov : oviducte ; p : fourreau du pénis ; pr : prépuce ; rs : réceptacle séminal ; u : utérus ; va : vagin ; vs : vésicules séminales.

I-2-3-2- Système de reproduction des *Biomphalaria* spp.

Le système de reproduction joue un rôle fondamental dans la structuration spatiale et temporelle de la diversité génétique au sein et entre les populations (Holsinger, 2000). C'est un facteur déterminant majeur de la valeur sélective surtout chez les organismes hermaphrodites (Jarne et Charlesworth, 1993 ; Charlesworth et Charlesworth 1999). Les *Biomphalaria* sont hermaphrodites et pratiquent deux modes de reproduction à savoir l'autofécondation et l'allofécondation.

I-2-3-2-1- Autofécondation

L'autofécondation est un système de reproduction qui permet de se reproduire même en l'absence de partenaires sexuels. Les gamètes mâles et femelles impliqués dans la fécondation proviennent donc d'un seul et même individu. En effet, les individus à maturité sexuelle déposent des pontes autofécondées.

Elle confère aux individus la possibilité de coloniser un grand nombre d'habitats, car un seul individu est capable de reconstituer toute une population. En plus de cette disponibilité de l'hôte, l'autofécondation sélectionnée chez les populations sensibles à un parasite garantit une compatibilité du parasite avec les générations successives de mollusques. Deux forces maintiennent l'autofécondation chez les êtres vivants :

- la force génétique qui veut que le patrimoine génétique soit transmis automatiquement et intégralement du parent aux descendants (assurance reproductive). Cette force favorise ainsi la purge des gènes délétères du génome de la population au profit de ceux les mieux adaptés à l'habitat des individus ; elle défavorise la diversité génétique et augmente par conséquent le nombre de loci homozygotes (Tuan et Simões, 1998).

- la force écologique qui veut que lorsque la disponibilité en partenaires sexuels est limitée ou lorsque la densité de la population est faible, les individus adoptent l'autofécondation pour assurer leur reproduction. Ainsi, chez les mollusques d'eau douce, l'instabilité de l'habitat (bouchons d'étranglement répétés, sécheresse, pollution humaine) favorise la sélection de l'autofécondation comme mode de reproduction (Jarne *et al.*, 2010).

Cependant, l'autofécondation présente des limites. En effet, les populations autofécondes courent le risque de présenter des descendants uniformes dont la valeur sélective est faible, entraînant ainsi une faible aptitude à survivre lorsque les conditions environnementales (Escobar *et al.*, 2011) changent (température de l'habitat, abondance des compétiteurs pour la même niche écologique, attaque des pathogènes).

I-2-3-2- 2- Allofécondation

La reproduction ayant un coût comme toute fonction physiologique, la plupart des animaux pluricellulaires adoptent un système de reproduction procurant à leur descendance une meilleure valeur sélective et par conséquent une meilleure survie : c'est le cas de l'allofécondation (Tsitrone, 2001).

L'allofécondation est le mode de reproduction sexuée par fécondation croisée. C'est un système de reproduction dans lequel la fécondation est réalisée à partir des gamètes mâles et femelles provenant de deux individus différents et qui offre une meilleure adaptabilité des

descendants dans un environnement variable. L'accouplement est nécessaire pour permettre cette reproduction.

En rendant possible le brassage génétique au cours de la méiose ; l'allofécondation favorise la création de nouvelles combinaisons génétiques mieux aptes à résister aux changements environnementaux. Elle accentue aussi la « sélection naturelle » causée par la difficulté de reproduction, ce qui élimine les moins aptes et favorise le croisement des meilleurs individus.

Cependant, le partenaire doit souvent être recherché, ce qui peut être difficile ou dangereux, par exemple les mâles de la même espèce doivent souvent se battre entre eux pour conquérir les femelles. En cas d'accouplement, il y a un risque d'échange d'agents infectieux (bactéries, virus, champignons, divers parasites). La reproduction peut ainsi demander un surcroît de ressources en termes de recherche de partenaires sexuels et de mise en place des structures attractives (Charlesworth et Charlesworth, 1987), une baisse de vigilance vis-à-vis des prédateurs, parfois des blessures/infections ou la mort.

La copulation est unilatérale chez les *Biomphalaria*. Le mucus de *Biomphalaria glabrata* contient des phéromones qui permettent aux individus de la même espèce de se reconnaître (Townsend, 1974).

I-2-4- Bio-écologie des *Biomphalaria* spp.

Les *Biomphalaria* occupent divers types d'habitats tels que les collections d'eaux naturelles (mares, lacs, cours d'eau à courant lent) et les gîtes artificiels (étangs de pisciculture) (Brown, 1994), mais peuvent également vivre en estivation pendant quelques mois lorsque ces derniers sont asséchés ; ils sont herbivores, et se nourrissent d'algues, de biofilms bactériens et de macrophytes en décomposition en milieux naturels et de laitue en conditions d'élevage.

Les espèces de ce genre sont ovipares, la maturité sexuelle est atteinte autour de 8 semaines ; elles effectuent leur ponte sur des pierres, des végétaux et les coquilles de leurs congénères. Les œufs pondus sont contenus dans des capsules gélatineuses aplaties, vaguement circulaires et de couleur jaunâtre ; le nombre d'œufs à l'intérieur des capsules est variable selon les espèces, mais aussi selon la taille des individus dans une même espèce (Lévêque, 1980). L'espérance de vie est estimée à 18 mois environ dans les conditions naturelles et peut atteindre 24 mois en laboratoire (Sullivan & Cheng, 1974).

- *Biomphalaria pfeifferi*

Biomphalaria pfeifferi est présent en Afrique sub-Saharienne et également dans un pays de l'Afrique du Nord (Algérie) (Stensgaard *et al.*, 2013). En dehors de la plaine côtière et des zones montagneuses bordant l'ouest, cette espèce présente une large répartition au Cameroun et y constitue le principal hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni* (Greer *et al.*, 1990) ; elle ne tolère pas des températures extrêmes et sa température optimum de vie avoisine 26°C, les sites ombragés se sont révélés si défavorables pour cette espèce et pourraient constituer un moyen potentiel de contrôle biologique (Loreau & Baluku, 1987). Elle a une préférence marquée pour les eaux calmes des étangs, des mares ou des ruisseaux à courant lent sur fond de vase et de sable pendant la saison sèche (Samé Ekobo, 1984) mais elle est plus fréquente dans les points d'eau permanents (Mimpfoundi, 1990). Son cycle de reproduction dure environ deux mois (Mimpfoundi, 1992 ; Tian-bi *et al.*, 2008).

- *Biomphalaria camerunensis*

Biomphalaria camerunensis est principalement rencontré en Afrique centrale à partir du Ghana à l'ouest à la République Démocratique du Congo à l'est (Stensgaard *et al.*, 2013 ; WHO, 2017). Au Cameroun, il a été retrouvé, jusqu'en 2018, en deçà de 6°N exclusivement dans la partie sud (Mimpfoundi, 1990). Récemment, une population de cette espèce a été récoltée pour la première fois dans la partie septentrionale du pays (Fadilatou, 2019). Cette espèce, considérée comme l'hôte intermédiaire secondaire de *S. mansoni* (Ripert *et al.*, 1978 ; Frandsen, 1979 ; Kengne-Fokam *et al.*, 2018) reste très peu étudiée. Elle a montré une nette préférence pour des collections d'eau permanentes (Greer *et al.*, 1990).

I-3- Généralités sur la génétique des populations

La génétique des populations étudie l'évolution des fréquences alléliques dans le temps et dans l'espace, sous l'effet des pressions sélectives telles que la dérive génétique, la sélection génétique, la mutation et la migration (Hartl et Clark, 1997). Elle est également modelée par le système de reproduction.

Les études menées en génétique reposent sur plusieurs modèles mathématiques, parmi lesquels le plus utilisé est le modèle de Hardy-Weinberg. Ce modèle permet de déterminer les fréquences génotypiques et phénotypiques en fonction des fréquences alléliques, dans une population idéale (population panmictique et de taille très grande). Cependant, des conditions doivent être réunies pour son application, ainsi que la simplification des calculs : la population doit être de très grande taille, supposée infinie, les organismes étudiés doivent être diploïdes et pratiquer l'allofécondation, les croisements se faisant au hasard (panmixie), les générations doivent être non chevauchantes et la fréquence des allèles ne doit pas être modifiée d'une

génération à l'autre par des pressions sélectives (mutation, sélection et migration). L'intérêt d'étudier la structure génétique d'une population repose sur la nécessité de connaître les variations génétiques qui peuvent exister entre des espèces sauvages, les caractères liés à l'épidémiologie d'une maladie et la dynamique de transmission dans les différents foyers. Les gastéropodes sont d'excellents modèles pour étudier la variabilité génétique, car ils sont largement distribués et peuvent à la fois se reproduire par autofécondation et par allofécondation (Stardler et Jarne, 1997).

I-4- Marqueurs microsatellites

Définition et structure des microsatellites

Les microsatellites ou SSR (« Simple Sequence Repeats »), STR (« Short Tandem Repeat ») ou encore VNTR (« Variable Number of Tandem Repeats »), sont des séquences présentes dans les génomes et sont très utilisées comme marqueurs moléculaires de par leur simplicité et leur répartition dans le génome des espèces eucaryotes mais aussi de certains procaryotes (Jarne et Lagoda, 1996 ; Vaughan et Lloyd, 2003). Ils sont constitués par la répétition en tandem d'un motif de base simple d'ADN d'un à six nucléotides (Tautz, 1993; Ellegren, 2000).

La particularité des microsatellites vient de leur utilisation pour la recherche de polymorphisme entre individus. La structure particulière de ces séquences les rend très susceptibles à la mutation. C'est-à-dire que les taux de mutation des séquences microsatellites sont souvent très élevés et, en conséquence, leur polymorphisme en populations naturelles est lui aussi élevé en général ($10^{-3}, 10^{-4}$) (Ellegren, 2004). Plusieurs mécanismes sont à l'origine de ces mutations :

- le SSM (ou « Slipped Strand Mispairing ») qui est caractérisé par le glissement d'un brin d'ADN sur l'autre lors de la réplication ou en dehors de celle-ci (Levinson et Gutman, 1987) ; ceci survient à cause du dérapage de l'ADN polymérase (« Slippage ») dû à des problèmes de translocation de l'enzyme sur le brin d'ADN matrice à recopier ; suivant le sens du décalage induit par ce glissement, il peut avoir insertion ou délétion d'une ou de plusieurs unités de répétition au niveau du locus concerné ;

Encadré 1

Définition de quelques notions importantes en génétique des populations (Nei, 1987 ; Harlt, 1980 ; De Meeûs, 2012)

- **ADN** : support de l'information génétique
- **Génome** : ensemble du matériel génétique présent dans un jeu de chromosomes.
- **Gène** : fragment d'ADN non recombinant, qui peut être codant ou non.
- **Allèle** : ce terme représente l'état d'un gène sur un chromosome. Chez les organismes diploïdes, un gène possède deux allèles, chacun sur l'un des deux chromosomes homologues. Si les deux copies sont identiques, l'individu est dit homozygote ; si les deux copies sont différentes, l'individu est hétérozygote.
- **Hétérozygotie** : mesure de la variation génétique dans une population, par rapport à un locus ; cela représente aussi la fréquence d'hétérozygotes à ce locus
- **Locus** : emplacement d'un gène sur le chromosome
- **Population** : ensemble d'individus de la même espèce occupant le même espace géographique dans lequel les croisements sont libres.
- **Sous-population** : subdivision de la population.
- **Échantillon** : groupe d'individus prélevés au hasard dans une population ou dans une sous population.
- **Taille effective** d'une population (Wright 1931, 1938) : taille (en nombre d'individus) d'une population idéale, non soumise à la migration, ayant les mêmes propriétés que la population naturelle étudiée ou encore nombre d'individus capables de transmettre les allèles à la génération suivante. Symbole conventionnel : N_e .
- **Dérive génétique** : c'est une force évolutive qui traduit l'échantillonnage aléatoire des allèles de la population parentale qui seront représentés dans la descendance. Elle est directement liée à la taille finie des populations naturelles : plus les populations seront de taille restreinte, plus l'influence de la dérive génétique sera importante. Elle agit en faveur de l'augmentation de la différenciation entre populations.
- **Flux de gènes** : il regroupe toutes les formes de migration des gamètes, des individus ou de groupes d'individus d'une sous-population à une autre. Cette force s'oppose à la dérive génétique et favorise l'homogénéisation des populations.
- **Diversité génétique** : degré de variabilité génétique dans une population. Elle dépend du polymorphisme allélique et est estimée par la fréquence des hétérozygotes attendus dans la population.
- **Énoncé de Hardy-Weinberg** : population de taille infinie, non soumise à aucune force évolutive (mutation, migration, sélection) au sein de laquelle la rencontre des gamètes se fait au hasard (panmixie) sans qu'il y ait chevauchement de générations.

- la recombinaison entre molécules d'ADN (Richard et Paques, 2000) ; la recombinaison intra chromosomique peut potentiellement altérer la taille des microsatellites de deux manières notamment par les crossing-over inégaux ou par la conversion génique (processus dans lequel l'appariement des nucléotides entre deux gènes suffisamment homologues s'accompagne de l'excision de tout ou une partie de la séquence des nucléotides de l'autre gène) (Ellegren, 2000).

Le polymorphisme observé correspond donc à une variation dans le nombre de copies du motif de base et non à la séquence proprement dite. Par exemple à un locus donné d'un génome, un individu A aura 6 répétitions du motif AG alors que l'individu B aura 10 répétitions (voir encadré 2). Les deux séquences microsatellites auront cependant les mêmes séquences flanquantes et pourront donc être révélées par le même couple d'amorces. Afin de déterminer ces nombres de répétitions à un locus donné, il faut spécifiquement amplifier par PCR ce motif à partir de l'ADN génomique des individus A et B. Il est donc nécessaire de connaître les séquences flanquantes de cette répétition afin de concevoir les amorces entourant le motif microsatellitaire. De plus, les fragments régénérés ne diffèrent que par quelques bases, ce qui nécessite une séparation par électrophorèse sur un gel très résolutif. Le locus microsatellite est donc défini par un couple d'amorces PCR qui amplifie une région unique du génome contenant un motif répété.

Les séquences microsatellites sont très répandues dans le génome de différentes espèces, bien conservées au sein d'une espèce et entre les taxons proches (Stallings, 1995 ; Primmer *et al.*, 1996 ; Schlötterer *et al.*, 1998) ; en plus, leur transmission est mendélienne et se fait sur le mode codominant. Ces arguments font des marqueurs microsatellites des outils de choix, sinon les meilleurs, pour les études de génétique de populations, notamment dans l'évaluation de la diversité génétique d'une population, de la structuration des populations, l'étude des systèmes de reproduction, des inférences des paramètres démographiques et de dispersion des populations (De Meeûs *et al.*, 2007).

Encadré 2

Les marqueurs microsatellites

(Viard *et al.*, 1996; Jarne & Lagoda, 1996)

Définition :

Séquences d'ADN répétées en tandem d'un motif de deux à six paires de bases.

5' GCCACGATGGTTTCG.....**AGAGAGAGAGAG**.....CGTCCAAGTACGATC 3'
séquence flanquante **6 répétitions** séquence flanquante

Les amorces de PCR correspondant à des séquences uniques (soulignées) sont déterminées dans les régions adjacentes aux répétitions (séquences flanquantes).

Structure :

Les marqueurs microsatellites peuvent être classés en trois familles selon leur structure interne.

Purs (parfaits)	AGAGAGAGAG
Composés	AGAGAGCTCTCT
Interrompus	AGAGAGTTAGAGAGTTAGAG

Exemple :

Individus	Nombre de répétitions	Fragment amplifié
A	6	ρρρρ AGAGAGAGAGAG ρρρρ
B	10	ρρρρ AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG ρρρρ

ρ = séquences flanquantes ; **AG**=motif microsatellite répété chez deux individus appartenant à la même espèce

CHAPITRE II : CADRE GEOGRAPHIQUE, MATERIEL ET METHODES

II-1- Cadre géographique et description des sites

II-1-1- Cadre géographique

Cette étude concerne quatre régions du grand Sud (Centre, Sud, Est et Ouest) et une région du grand Nord (Extrême Nord : population témoin) du Cameroun. Le Cameroun est un pays d'Afrique Centrale ouvert sur l'océan Atlantique et situé au fond du Golfe de Guinée, entre les 2^{ème} et 13^{ème} degrés de latitude Nord, et entre les 8^{ème} et 16^{ème} degrés de longitude Est. Il est limité au Nord par le Lac Tchad, au Nord-est par la République du Tchad, au Sud par les Républiques du Gabon, de la Guinée équatoriale et du Congo, à l'Est par la République Centrafricaine et à l'Ouest par la République Fédérale du Nigéria (Atlas du monde, 2016).

Le climat camerounais est du type équatorial (chaud et humide) dans le Sud et sur les côtes (3890 mm), avec des pluies abondantes d'avril à novembre, et presque toute l'année dans les montagnes du Sud-Ouest (10000 mm/an). Il est du type tropical (chaud et sec) dans le Nord, où la saison sèche dure d'octobre à avril (700 mm sur le plateau central). Le Nord-Ouest est semi-aride (380 mm/an). Les températures moyennes varient entre le Sud (25°C), le plateau central (21,1°C) et le Nord (32,2°C) (Atlas du monde, 2016).

II-1-2- Description des sites de l'étude

Les sites mentionnés dans les études précédentes ont été visités (Samè Ekobo, 1984 ; Greer *et al.*, 1990 ; Mvogo Ndongo, 2012 ; Azegue, 2016 ; Kengne-Fokam *et al.*, 2018), et des sites additionnels ont été choisis dans des zones favorables à la survie des mollusques d'eau douce (Figure 4).

II-1-2-1- Sites de la région du Centre

Le climat de la région du Centre est de type subéquatorial avec de nombreuses nuances et caractérisé par quatre saisons. On y distingue deux saisons de pluies : une petite qui s'étend de mi-mars à juin et une grande qui s'étend de septembre à mi-novembre ; elles sont séparées par deux saisons sèches : une grande qui s'étend de mi-novembre à mi-mars et une petite qui s'étend de juillet à août. Cette région reçoit plus de 1000 mm de pluies par an et la température moyenne annuelle est d'environ 25°C (Suchel, 1987). Dans cette région, nous avons récolté les mollusques dans les points d'eaux situés dans les villes de Yaoundé, Minkama, Nalassi, Mbandjock et Nkoteng.

➤ Les sites de Yaoundé

- La rivière Afeme à Ekorezok (03°53'327''N, 011°27'412''E)

Le village Ekorezok est situé dans le département du Mfoundi, l'arrondissement de Yaoundé VII, précisément à Nkolbisson. Sa population est constituée en majorité d'autochtones « Beti » qui pratiquent essentiellement la culture du manioc, du maïs et des arachides. Cette population n'a pas de connexion au réseau d'adduction en eau potable et le forage présent chez le chef du village est non fonctionnel. Les points de ravitaillement en eau sont donc les puits et la rivière Afeme qui traverse le village. Dans cette rivière on retrouve les bulins et les mollusques de l'espèce *B. pfeifferi*.

- Le lac de l'ex-carrière de Ngoa-Ekellé

Le lac de l'ex-carrière de Ngoa-Ekellé est situé à 03°51' de latitude Nord et 11°30' de longitude Est dans la ville de Yaoundé, arrondissement de Yaoundé 3^{ème}, département du Mfoundi. La végétation des berges est essentiellement constituée de l'espèce *Pennisetum purpureum* ; la faune malacologique y est riche en bulins et planorbes (Njiokou *et al.*, 2004).

➤ Les sites de Minkama

Les mollusques ont été récoltés dans trois collections d'eau du village Minkama. Il est situé sur la route nationale n°1 entre les villes d'Obala et Batchenga dans le département de la Lekié, arrondissement d'Obala. Les habitants de Minkama sont membres de la tribu « Eton » et pratiquent essentiellement l'agriculture (cacao, manioc, arachides). La Biouno est une rivière qui traverse tout le village d'est en ouest et se jette dans la Sanaga. Plusieurs petites collections d'eau se forment de cette rivière parmi lesquelles la mare Mounassi située du côté ouest de la nationale n°1, la rivière Kédé et la mare Yana Messina situées du côté est.

- La mare Mounassi (4°12'14.1" N et 11°35'00.2" E) est située à une centaine de mètres des habitations dans les bas-fonds d'une cacaoyère (la mare était divisée en deux au moment de la collecte. Mounassi Amont et Mounassi Aval ont été utilisés pour désigner ces deux points de collecte). Cette mare est recouverte de fougères et entourée des espèces de plantes *Chromolaena odorata* et *Axonopus compressus* ; les planorbes du genre *Biomphalaria* y sont abondants.
- La rivière Kédé (04°12'6''N, 011°35'6''E) est l'un des cours d'eau le plus important du village Minkama, étant donné sa proximité avec les habitations. Les riverains utilisent l'eau de cette rivière pour des travaux ménagers. Kédé, entouré de fougères, de bananiers et de l'espèce végétale *Costus afer*, coule en aval de deux collines à 04°12' de latitude Nord et 11°35' de longitude Est non loin de la route nationale n°1. En amont et en aval de la rivière, on trouve des planorbes du genre *Biomphalaria*.

- La mare Yana Messina (04° 2'1''N, 011° 35'3''E) est située à une trentaine de mètres des habitations en contrebas des plantations. Le niveau de l'eau fluctue grandement en fonction des saisons même si l'eau est toujours présente. Cette mare est fortement perturbée pendant les saisons sèches par les habitants qui l'aménagent pour avoir de l'eau propre afin de pouvoir arroser leurs cultures maraîchères.

➤ Site de Nalassi

Nalassi est une localité de la commune de Batchenga située dans le département de la Lekie à 62 kilomètres de Yaoundé ; la petite ville est traversée d'un bout à l'autre par la route nationale N°1. La schistosomiase intestinale y est endémique avec une prévalence supérieure à 20% (Ripert *et al.*, 1978). L'agriculture est la principale activité pratiquée dans la commune. La production agricole est très variée, notamment des tubercules comme le manioc, l'igname ainsi qu'une large gamme de produits maraîchers. L'enquête malacologique s'est déroulée dans la rivière Nalassi à la station de coordonnées 04°16'49.1"N 011°37'58.1"E.

➤ Les sites de Mbandjock

Mbandjock est une ville située à 120 km de Yaoundé sur l'axe Yaoundé-Bertoua dans la zone de transition entre la forêt et la savane. C'est une ville cosmopolite, avec des possibilités d'emploi rattachées à la présence d'une grande exploitation sucrière : SOSUCAM.

Les rivières Mekono et Mengolo sont les deux principales rivières qui traversent la ville. Les riverains utilisent l'eau de ces deux rivières pour des baignades, la pêche et la lessive. Les mollusques présents dans cette localité sont des pulmonés, des prosobranches et des lamellibranches. Ils appartiennent à 5 familles différentes : Planorbidae, Lymnaeidae, Pilidae, Ferrissidae et Sphaeridae (Takougang *et al.*, 1993). Nous avons effectué des collectes aux stations de coordonnées 04°27'04.5"N 011°54'46.5"E pour la rivière Mekono et 04°26'36.9"N 011°53'40.3"E pour la rivière Mengolo.

➤ Site de Nkoteng

La localité de Nkoteng est située dans le département de la Haute-Sanaga, arrondissement de Nkoteng à environ 136 kilomètres au nord-est de Yaoundé. La région est drainée par le fleuve Sanaga ainsi que par plusieurs rivières moyennes et ruisseaux qui sont ses affluents, parmi lesquels la rivière Mendibi.

- La rivière Mendibi (05°34'53.3"N 010°35'23.0"E) coule dans l'arrondissement de Nkoteng. La végétation environnante est constituée de plusieurs arbres dont les palmiers à huile et les palmiers à raphia, et de nombreuses autres espèces de plantes dont les fougères. Les planorbes du genre *Biomphalaria* y sont présents.

II-1-2-2- Sites de la région du Sud

Le climat de cette région est subéquatorial de type « guinéen » et caractérise la forêt du bassin du Congo. Ce climat guinéen chaud et humide comprend quatre saisons : deux saisons des pluies et deux saisons sèches. La grande saison sèche s'étend de mi-novembre à mi-mars, elle est suivie de la petite saison des pluies qui dure quatre mois ; soit de mi-mars à fin juin. La petite saison sèche moins homogène couvre les mois de juillet et août. La grande saison des pluies dure trois mois de septembre à mi-novembre avec une température qui varie peu entre 25° à 35°C. La végétation typique du plateau sud-camerounais est la forêt dense humide (Letouzey, 1985) dégradée par des cacaoyères. Nous avons effectué les prospections malacologiques à Sangmélina et à Ebolowa.

- La ville de Sangmélina est arrosée par deux rivières : l'Afamba et la Lobo, elles-mêmes alimentées par de nombreux ruisseaux (Mimpfoundi, 1990). La rivière Bissono prend naissance dans l'Afamba, qui coule dans le talweg séparant le quartier administratif et le quartier Akon au nord-est et se jette dans la Lobo après avoir traversé la ville. La récolte des mollusques s'est déroulée sur les bords de Bissono (02°56'28.6"N 011°58'55.0"E) près des bureaux de la Gendarmerie, situés au quartier du même nom. La végétation autour de ce site était constituée des espèces *Acroceras zizanioides* et *Pteridium aquilinum*.
- La ville d'Ebolowa est une communauté urbaine située au cœur de la forêt équatoriale, reliée à Yaoundé via Mbalmayo par un axe routier de 168 km. C'est la capitale historique et traditionnelle des pays boulo ; elle connaît son apogée et son déclin avec la culture du cacao. Aux environs d'Ebolowa, de nombreuses petites rivières coulent vers le sud pour rejoindre la Mvilla à une vingtaine de kilomètres au sud-sud ouest de la ville. La collecte des mollusques s'est déroulée dans la rivière Ebengue (02°54'42.4"N 011°10'33.0"E) située à Essinguili à la périphérie de la ville ; là-bas, les parties de pêches au barrage se multiplient le long du cours d'eau. Les planorbes y sont présents.

II-1-2-3- Sites de la région de l'Est

Situé dans le Sud-Est du pays, le chef-lieu de la région de l'Est est Bertoua. La majorité de son territoire est couverte de forêt de type équatorial (Letouzey, 1985). Cette région est bordée par celles du Sud, de l'Adamaoua et du Centre. Bertoua étant la plus grande région forestière du Cameroun, sa situation géographique fait d'elle le principal pôle de développement de la région. Cette localité occupe une partie du plateau sud camerounais,

vaste pénéplaine dont l'altitude varie entre 400 - 900 m. Elle est drainée du nord au sud par le cours d'eau dénommé Djadlombe. Son climat est de type subtropical à trois saisons : une grande saison sèche qui va de décembre à mi-mars, une petite saison de pluies de mi-mars à mi-mai et une grande saison de pluies de mi-mai à novembre. La température y est élevée tout au long de l'année, avec un maximum de 30°C, la moyenne oscille entre 23°C et 25°C. Les précipitations y sont relativement abondantes et varient de 1500 à 2000 mm de pluies par an (Suchel, 1987). Nous avons collecté les mollusques à Monou II, au quartier Italie et à Mokolo I.

- Les étangs de pisciculture de Monou II sont situés au voisinage du point de coordonnées 04°34' de latitude Nord et 13°41' de longitude Est derrière les concessions du quartier Monou dans l'arrondissement de Bertoua 2°. L'eau claire de ces étangs, dans laquelle poussent les plantes de l'espèce *Halopegia azurea*, est aussi recouverte de l'espèce végétale *Nenuphar alba*. La faune malacologique dans ces étangs est constituée des *Biomphalaria*, des bulins, des lymnées et des bivalves.
- Au quartier Italie, les mollusques du genre *Biomphalaria* ont été collectés dans une rigole, près d'un puit d'eau à la station de coordonnées N04°34'35.9" E013°41'43.4" ; la végétation environnante était constituée des espèces *Paspalum conjugatum* et de *Chromolaena odorata*.
- Au quartier Mokolo I, l'enquête malacologique a été effectuée dans une zone marécageuse située dans les bas-fonds des maisons d'habitations (N04°35'18.4" E013°40'48.1") et non loin des plantations de cannes à sucre et de cultures vivrières. La faune malacologique dans ces étangs était constituée des *Biomphalaria*, des bulins et des lymnées.

II-1-2-4- Sites de la région de l'Ouest

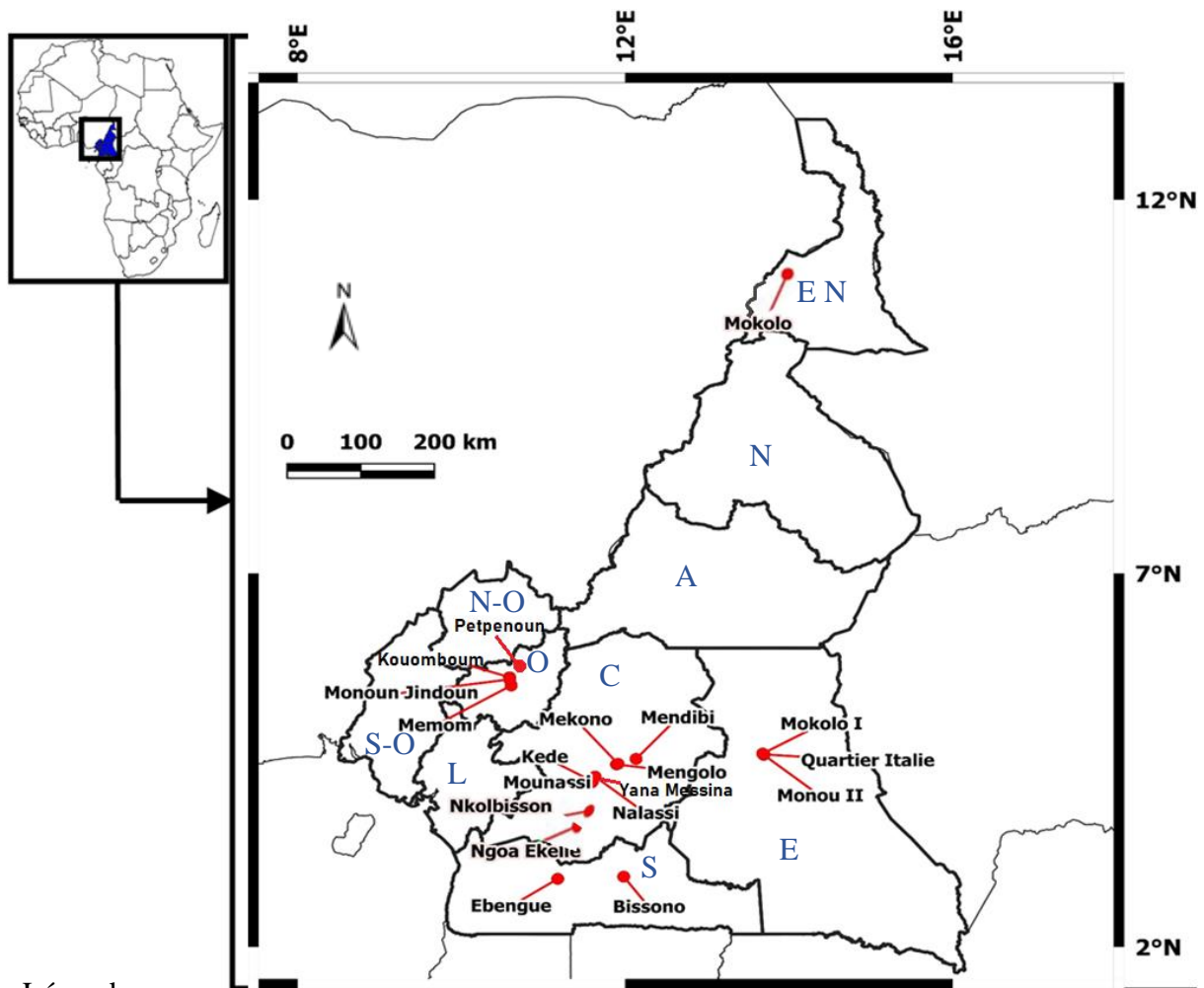
Dans cette région, règne un climat équatorial de mousson de montagne avec deux saisons (Suchel, 1987) : une saison des pluies qui s'étend de mars à octobre, soit 8 mois, et une saison sèche de quatre mois de novembre à février. Le relief crée de fortes variations pluviométriques et abaisse les températures qui oscillent entre 19°C et 22°C. La végétation caractéristique est de type savane arbustive. La récolte des mollusques s'est effectuée dans le département du Noun uniquement, dans les lacs Monoun Njindoun et Petpenoun, ainsi que dans la rivière Memom et une petite rivière de Kouomboum.

- Le lac Monoun Njindoun est un lac de cratère, long de 1400 m, et situé sur la ceinture camerounaise de volcans actifs Oku à 05°34' de latitude Nord et 10°35' de longitude Est sur les montagnes du village Njindoun, dans l'arrondissement de Kouoptamo. Lors de la récolte des mollusques, nous avons recensé des bulins, des lymnés, des planorbes et des potadoma (prosobranches). Les espèces végétales les plus abondantes comprennent les espèces *Nenuphar alba* et *Pennisetum purpureum*.
- Le lac Petpenoun est situé à 05°38' de latitude Nord et 10°37' de longitude Est, arrondissement de Kouoptamo, à une altitude de 1120m sur une superficie de 30ha. La récolte des mollusques a été effectuée sur les berges de ce plan d'eau riche en graminées. La faune malacologique est riche en bulins, lymnés et planorbes.
- Kouomboum est un petit village situé dans l'arrondissement de Kouoptamo. L'enquête s'est déroulée dans une rivière du village à la station de coordonnées N05°36'33" E010°35 '17". Nous y avons récolté des mollusques du genre *Biomphalaria*.
- La rivière Memom (N05°29'57.0" E010°36'30.4") est située à Mangoum dans l'arrondissement de Foubot. Lors de l'enquête malacologique les gastéropodes étaient abondants, nous y avons recensé des *Biomphalaria* et des bulins.

II-1-2-5- Site de la région d'Extrême-Nord

Le climat de cette région est de type tropical soudano-sahélien avec deux saisons caractérisées par des précipitations limitées. Les températures sont élevées et la saison sèche dure 8 mois. Le réseau hydrographique est essentiellement constitué de points d'eau permanents (représentés par des barrages) et par des mares d'eau temporaires (« mayo ») qui tarissent dès le début de la saison sèche. Les prospections malacologiques ont été effectuées à Mokolo.

L'arrondissement de Mokolo est le chef-lieu du département du Mayo Tsanaga. La bilharziose intestinale y est endémique avec une prévalence de 9% (Brooker *et al.*, 2000). Les mollusques du genre *Biomphalaria* ont été collectés au niveau du barrage d'Ouro-Tada (N10° 44' 0", E 13° 46' 4"). La figure 4, montre les différents sites de collecte des *Biomphalaria* au Cameroun.



Légende

● Site de collecte

EN : Région de l'Extrême Nord ; N : Région du Nord ; A : Région de l'Adamaoua ; C : Région du Centre, S : Région du Sud ; E : Région de l'Est ; O : Région de l'Ouest, L : Région du Littoral, N-O : Région du Nord-Ouest, S-O : Région du Sud-Ouest

Figure 4 : Carte du Cameroun montrant les différents sites de collecte des *Biomphalaria* spp. (extrait de carte topographique INC)

II-2- Matériel et Méthodes

II-2-1- Echantillonnage et conservation des spécimens de *Biomphalaria* spp.

La récolte des mollusques a été effectuée en deux périodes. La première phase s'est étendue de juin à août 2017 dans 21 populations (11 au Centre, 2 au Sud, 4 à l'Ouest, 3 à l'Est et 1 à l'Extrême Nord ayant servi de population témoin) et la deuxième phase, destinée à l'analyse des paramètres démographiques s'est étalée de juin à juillet 2019 seulement dans 7 populations sur 21. Munis des gants et des bottes de protection, les mollusques sauvages ont

été récoltés dans plusieurs sites de chacune des régions ci-dessus indiquées à l'aide d'une époussette à long manche, par peignage systématique de la végétation aquatique (Cucherat & Demuynck, 2008). Les mollusques retenus par les mailles de l'époussette ou fixés sur les supports flottants ont été ramassés soit à la main (Mimpfoundi, 1990), soit à l'aide de pinces souples.

A la fin de chaque récolte, les mollusques ont été divisés de manière aléatoire en deux lots dont l'un destiné à l'étude parasitologique et conservé dans des pots en plastique contenant de l'eau du site de récolte et quelques tiges de végétations (Mimpfoundi, 1990). Les spécimens du deuxième lot devant servir aux études morphologiques, morphométriques et moléculaires ont été immédiatement fixés individuellement dans des tubes bien étiquetés contenant de l'éthanol à 95°. Les coordonnées GPS de chaque point de récolte ont été ensuite enregistrées. Les différents échantillons récoltés ont été transportés au laboratoire de Parasitologie et Ecologie de l'Université de Yaoundé I. Les spécimens vivants ont été mis en boîtes d'élevage au molluscarium alors que ceux conservés dans de l'éthanol à 95° ont été stockés au congélateur à -20°C jusqu'à utilisation.

II-2-2-Test d'émission cercarienne

Cette partie de l'étude consistait à contrôler l'infestation naturelle des mollusques par les schistosomes. Pour chaque population, des individus maintenus vivants ont été mis en élevage, au molluscarium, dans des bacs en plastique contenant de l'eau minérale et nourris pendant trente jours avec des feuilles de laitues fraîches. Durant cette période, le contrôle de l'infestation naturelle des mollusques a été fait tous les trois jours en exposant individuellement ces derniers, introduits dans des piluliers contenant un peu d'eau minérale, à une source lumineuse pendant 3h (11h-14h) de temps ; chaque pilulier a ensuite été examiné sous une loupe binoculaire pour identifier les cercaires de schistosomes (Samè Ekobo, 1984 ; Kengne, 2019). Ces dernières sont reconnues par leur tête piriforme allongée et à leur queue bifide.

II-2-3-Identification morphologique et morphométrique des mollusques

Une première approche de l'identification des espèces de *Biomphalaria* au moment du prélèvement s'est effectuée à partir de la morphologie générale de la coquille suivant les critères définis par Brown (1994). Une fois au laboratoire, nous avons affiné l'identification en effectuant sur ces dernières (les mollusques contenus dans l'alcool) des études morphométriques (Figure 5).

Après nettoyage à l'eau distillée, nous avons réalisé un dessin de chaque coquille sous une loupe binoculaire WILD M5A équipée d'une chambre claire à l'objectif 6X. Sur chaque dessin et selon la méthode décrite par Mandahl-Barth (1958), nous avons mesuré les paramètres suivants : plus grand diamètre de la coquille (AD), largeur de l'ouverture (AB), diamètre de l'ombilic (BC) et hauteur du dernier tour de spire (CD = hauteur de la coquille) (figures 5.2 et 5.3) ; nous avons calculé le nombre de tours de spire (NT) (figure 5.1). Nous avons également calculé le rapport "diamètre maximum (AD) / diamètre de l'ombilic (BC)" et le rapport "diamètre maximum (AD) / hauteur de la coquille (CD)". Pour confirmer ou infirmer cette identification, nous avons fait recours à l'identification moléculaire.

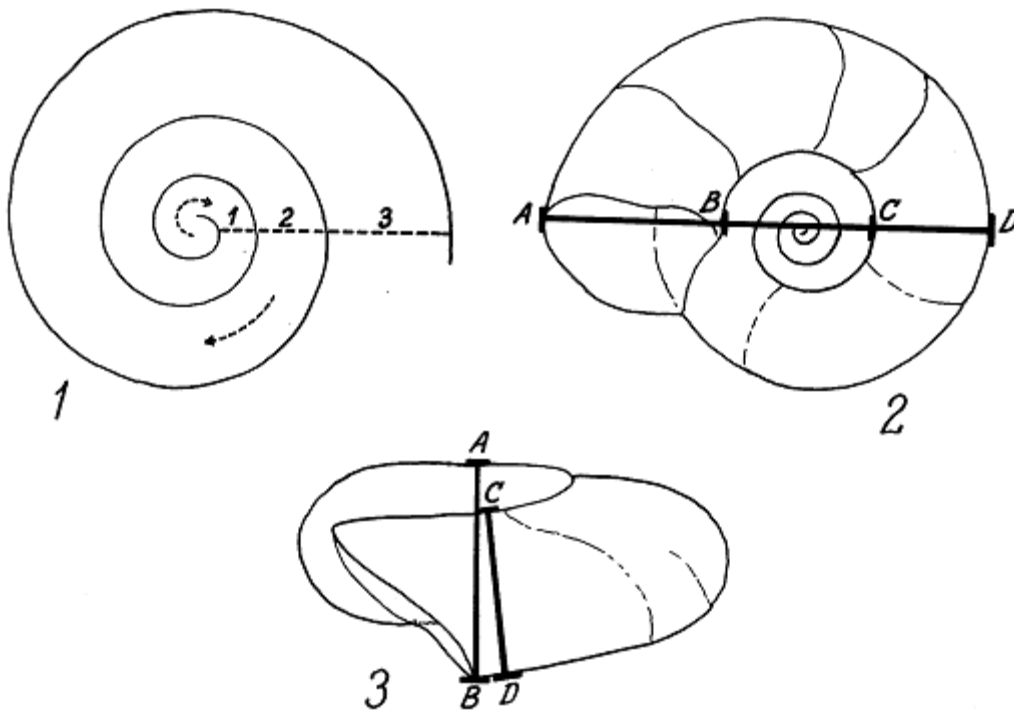


Figure 5 : Techniques de mensuration sur la coquille des mollusques récoltés (Mandahl-Barth, 1958).

II-2-4-Identification moléculaire des mollusques

Après l'identification morphologique, nous avons procédé à une identification moléculaire afin de confirmer ou infirmer l'appartenance à l'espèce des individus de chaque population de mollusques. Pour ce faire, le polymorphisme de la région ITS2 du génome des *Biomphalaria* a été étudié grâce à la technique de la PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) selon le protocole de Vidigal *et al.* (2004). Cette technique a consisté à extraire l'ADN du pied du mollusque, à amplifier par PCR la région ITS2 de

l'ADN ribosomique, à digérer le produit d'amplification à l'aide de deux enzymes de restriction (*HpaII* et *TaqI*) et à visualiser les produits de la digestion après séparation sur un gel de polyacrylamide.

II-2-4-1- Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait individuellement des tissus du pied du mollusque isolé à l'aide d'une pince. Chez une trentaine d'individus pris de manière aléatoire par population, issus du lot stocké au préalable dans l'éthanol à 95°, l'extraction de l'ADN s'est faite à l'aide de la technique du CTAB (Cethyl-Trimethyl-Ammonium-Bromide) suivant le protocole de Maniatis *et al.* (1982). Le protocole suivi se décline comme suit : les tubes Eppendorf contenant les échantillons ont été ouverts et mis à température ambiante pendant 1h jusqu'à évaporation complète de l'éthanol à 95° ; dans chacun des tubes, 600 µL de tampon CTAB (Composition : CTAB 2%; 0.1 M TRIS/pH 8; 0.02 M EDTA/pH 8; 1.4 M NaCl) ont été ajoutés puis à l'aide d'un piston, le pied a été dilacéré et le mélange a été incubé au bain-marie, à 60°C pendant 30 minutes ; ensuite 600 µL d'une solution contenant un mélange de chloroforme et d'alcool isoamylique dans les proportions 24:1 respectives ont été ajoutés dans chaque tube puis, homogénéisés délicatement pendant 10 minutes et portés à centrifugation à 8000 tours par minute pendant 15 minutes : trois phases se distinguent ; la phase aqueuse contenant l'ADN, qui est supérieure (environ 450 µL) a été prélevée et transvasée dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 µL portant la même étiquette que l'ancien ; un volume de 450µL d'isopropanol a été ajouté et le mélange a été homogénéisé, incubé à -20°C pendant 30 minutes au moins, pour la précipitation des acides nucléiques, puis centrifugé à 13000 tours par minute pendant 20 minutes et à 4°C, pour permettre à l'ADN de se tasser en un culot au fond du tube ; le liquide surnageant a été évacué et le culot a été lavé avec 1mL d'éthanol à 70°, puis centrifugé à 13000 tours par minute pendant 15 minutes à 4°C ; l'alcool a été évacué et le culot d'ADN séché et suspendu dans 20 µL d'eau stérile puis conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

II-2-4-2- Amplification par PCR et révélation sur gel d'agarose

Après obtention de l'ADN des différents individus, la région ITS2 des *Biomphalaria* a été amplifiée en utilisant les amorces ITS2F (5'-CGTCCGTCTGAGGGTCGGTTTGC-3') (Caldeira *et al.*, 2000) et ETTS1R (5'-TGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') (Kane et Rollinson, 1994) hybridant dans les régions conservées des gènes 5,8S et 28S de l'ADN ribosomique. Le mélange réactionnel pour effectuer la PCR a été préparé sous une hotte à l'abri de toute contamination ; ce mélange d'un volume final de 20µL était constitué pour un échantillon : du

couple d'amorce ITS2F/ETTS1R (0,8 µL de chaque amorce), du Tampon Tris Borate EDTA 10X (TBE, 2 µL), de la Taq polymérase (0,06 µL), des dNTPS (0,4 µL), et de l'eau stérile (13,94 µL). Une quantité de 2 µL d'ADN dilué au 1/10^e a été ajoutée dans chaque tube prévu pour un échantillon ; un contrôle négatif de PCR a été inclut dans toutes les expériences. L'amplification proprement dite s'est faite dans un thermocycleur de marque Techne TC412 suivant le programme ci-après : une dénaturation initiale de l'ADN total à 95°C pendant 3 minutes et 30 secondes, puis 35 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une étape d'hybridation des amorces à 60°C pendant 30 secondes, et une étape d'élongation à 72°C pendant 30 secondes, suivie d'une extension finale à 72°C pendant 10 minutes. Les produits d'amplification ainsi que la qualité de l'extraction ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% (obtenu en chauffant 2 grammes d'agarose dans 100mL de tampon TBE 0,5X) dans lequel on y a ajouté 3µl de bromure d'éthidium (révélateur rendant fluorescent les bandes d'ADN) ; l'observation des gels s'est faite sous rayons UV.

II-2-4-3 - Choix des enzymes de restriction

Les séquences ITS présentes dans la banque génomique universelle (GENBANK) de *B. pfeifferi* (Okeke et Ubachukwu, 2017) et de *B. camerunensis* (Dejong *et al.*, 2001) ont été soumises à des RFLP in silico à l'aide de l'outil en ligne Restriction Mapper (<http://www.restrictionmapper.org/>), pour choisir des enzymes de restriction qui permettraient de distinguer clairement les deux espèces de *Biomphalaria*. Deux enzymes ont été retenues : l'enzyme *HpaII* et l'enzyme *TaqAI*. Ces enzymes ont déjà été utilisées pour identifier les espèces de *Biomphalaria* présentes en Amérique du sud (Vidigal *et al.*, 2004).

II-2-4-4- Digestion enzymatique et révélation sur gel de polyacrylamide

Les échantillons positifs à la PCR, ont été digérés à 37°C au bain marie pendant 1h30 mn dans un volume réactionnel de 26 µL pour chacun des produits de PCR contenant : 18 µL d'eau stérile, 1µL d'enzyme de restriction, 5µL de tampon (cutsmart buffer) et 2 µL d'ADN. Les produits digérés ont été séparés sur gel de polyacrylamide 8% (révélés dans du bromure d'éthidium) et observés sous rayons UV.

II-2-4-5- Purification et séquençage de l'ADN

Quelques produits PCR de chaque type de profil RFLP obtenu ont été retenus. La purification s'est faite par PCR enzymatique avec l'exonucléase I (ExoI) et la phosphatase alcaline de crevette (SAP) (New England Biolabs, Boston, MA, USA), qui offre un moyen

facile d'éliminer les amorces restantes et dNTPs laissés par la réaction de PCR. La concentration d'ADN a ensuite été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) et les échantillons conformes à la concentration minimale (ng / µl) ont été soumis au séquençage dans une entreprise commerciale (GENEWIZ, Liverpool, UK).

II-2-5- Génotypage des loci microsatellites

Pour cette étude, nous avons fait un *screening* sur 24 couples d'amorces. Ces couples d'amorces ont été choisis pour leur polymorphisme et schémas d'amplification simples à réaliser.

Les séquences d'ADN microsatellites ont été amplifiées par PCR (Polymerase Chain Reaction) à l'aide de 11 couples d'amorces permettant de révéler les allèles aux loci microsatellites correspondants. Ces marqueurs dont quelques caractéristiques sont regroupées dans le tableau II ont été utilisés pour l'espèce *B. pfeifferi* à Madagascar (Charbonnel *et al.*, 2000) et au Sénégal (Campbell *et al.*, 2010), et pour l'espèce *B. glabrata* en Amérique du Sud (Jones, 1999) ; les deux espèces étant très proches phylogénétiquement de *B. camerunensis*. Cette partie du travail a été réalisée uniquement chez les individus dont l'identification spécifique a été confirmée.

II-2-5-1 Amplification des séquences microsatellites

L'amplification s'est faite en trois phases suivant le programme ci-après : une dénaturation initiale de l'ADN total à 95°C pendant 3 minutes et 30 secondes, puis 35 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une étape d'hybridation des amorces à 56°C pendant 30 secondes (cette température est fonction de l'amorce choisie), et une étape d'élongation à 72°C pendant 30 secondes, et enfin une élongation à 72°C pendant 10 minutes. Le contrôle de l'amplification des séquences cibles s'est fait sur gel d'agarose 2%.

Tableau II : Quelques caractéristiques des différents couples d'amorces utilisés

Couples d'amorces	Séquence 5' - 3'	Température d'hybridation	Taille du produit	Auteurs
Bpf1F	TCCTATCCTTGTAACCTTCTCCAC	56°C	207	Charbonnel <i>et al.</i> , 2000
Bpf1R	CGAAACCATGCAAATCAG			
Bpf2F	GCAGCTTCATTCAACATTCC	56°C	153	
Bpf2R	AAATTAACATTTTCGCTGAAACAG			
Bpf5F	TGTATGCTGACACTTAAAGAAACC	56°C	187	
Bpf5R	GCTACGCCACTGCTTATGAC			
Bpf10F	TGTCCAGCATGTCCAGTTC	56°C	259	
Bpf10R	CAGAGATGATATTGCAGTCAGG			
Bpf11F	GAAGTGCTTGCCATTCTTC	48°C	106	
Bpf11R	GTCAACTATCACGTGACAGG			
Bpf12F	GACACAAAGAAAGAGATAAGCA	56°C	327	
Bpf12R	GTCGACCTCCCCTCTTC			
Bpf3F	CAGTATTTCCCGTGACTGCTC	56°C	211	
Bpf3R	CTTCCCTTGTTTCGATACCATAC			
Bpf8F	GGTTC CATAGCATA CAGTGC	48°C	189	
Bpf8R	GGCTTACAAAGAAACAGGCATAC			
Bpf9F	GTGAGGGAGAAGTACCTTGACAC	48°C	246	
Bpf9R	GATCTAGTTAGAGAAGATAG			
Bgμ15F	AGGTTTGTATGTCTTGCTG	56°C	182	Jones <i>et al.</i> , 1999
Bgμ15R	GGTTC ACTCAGATA CATCC			
μBg1F	TTAATTCTACTGGACTCACATGG	56°C	200	
μBg1R	CTGCCAATGTTTACATGCTG			

II-2-5-2 Migration des produits d'amplification

Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8%, révélés par le bromure d'éthidium et observés sous rayons UV.

- Préparation du gel de polyacrylamide 8%

Le gel de polyacrylamide 8% a été obtenu en mélangeant dans 41 mL d'eau distillée, 12 mL d'Acrylamide /bis Acrylamide 40%, 6 mL de TBE 10X, 930 µL APS 10% et de 70 µL du Temed. Le mélange ainsi obtenu a été agité à l'aide d'un barreau magnétique introduit dans un *erlenmeyer* posé sur un agitateur magnétique et coulé entre deux plaques de verre montées en moule et munies d'un peigne pour la formation des puits ; l'une des plaques étant pleine et l'autre avec une encoche qui permettra le dépôt des échantillons à migrer. Les deux plaques superposées sont séparées par deux espaceurs et maintenues par des serre-joints. Le gel coulé entre les plaques a été laissé à température ambiante environ 45 minutes pour sa polymérisation. Ensuite, il a été monté dans le générateur d'électrophorèse Licor® et du tampon TBE 1X a été ajouté dans la cuve de l'appareil.

➤ Migration proprement dite

Après polymérisation du gel, le peigne a été délicatement et soigneusement retiré. Les puits formés ont été rincés à l'aide d'une seringue et du tampon TBE 1X pour éliminer le reste d'acrylamide non polymérisé. Puis a suivi une étape de pré-électrophorèse pendant 15 minutes, par la suite nous avons introduit 6 µL de chaque amplicon mélangé à 1 µL du tampon de dépôt (Bleu de Bromophénol) dans les puits et les échantillons ont été mis à migrer. Les marqueurs de poids moléculaire ont également été introduits dans les puits réservés à cet effet. La migration a été faite à 300 volts, 300 milliampères, 150 watts et 20°C pendant 4 à 6 heures de temps en fonction du marqueur utilisé. A la fin de la migration, le gel a été démoulé et trempé dans une solution de bromure d'éthidium (1 µg/ml) pendant 20 minutes, puis observé sous ultraviolet et photographié.

➤ Identification des allèles

Un allèle B (séquence microsatellite) possédant plus d'unités de répétition qu'un autre A, a un produit d'amplification qui migre plus lentement que A et cela s'est traduit sur le gel de polyacrylamide par des bandes situées à des hauteurs différentes, allant du point de dépôt des échantillons sur le gel. Les individus qui présentaient deux bandes différentes sur le gel (et donc deux tailles d'allèles différentes) étaient considérés de génotypes hétérozygotes et ceux qui n'en présentaient qu'une de génotypes homozygotes. Cette étude étant pionnière au Cameroun, nous n'avions ni de contrôle positif ni d'amorces synthétisées. Pour avoir la taille exacte des différents allèles obtenus, l'ADN des individus ayant présenté des bandes à différentes tailles a été séquencé. A la suite de cette opération, qui a été répétée pour tous les marqueurs, nous avons conçu une base de données contenant les génotypes de tous les individus à tous les loci (génotypes multilocus).

II-2-6- Analyse des données

Les différentes données collectées ont été analysées pour répondre à des questions précises. A cet effet, plusieurs programmes informatiques ont été utilisés.

II-2-6-1- Gestion des données issues de la morphométrie

Le logiciel Past version 3.16 nous a permis d'analyser les variations intra populationnelles, et aussi de calculer la moyenne ainsi que l'erreur standard des valeurs mesurées à savoir : plus grand diamètre de la coquille (AD), largeur de l'ouverture (AB), diamètre de l'ombilic (BC) et hauteur du dernier tour de spire (CD = hauteur de la coquille) et nombre de tours de spire (NT) selon les formules ci-après (Schwartz, 1983) :

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

où \bar{x} est la moyenne, n l'effectif ou taille de l'échantillon, s l'écart type, $\sum x_i$ la somme des valeurs de x et $\sum (x_i - \bar{x})^2$ est la somme des écarts quadratiques à la moyenne \bar{x} du groupe.

Nous avons également testé l'indépendance de ces variables en calculant le coefficient de corrélation de Pearson selon la formule ci-après (Lamotte, 1967) :

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_j - \bar{y})}{n s_x s_y}$$

où x_i est la valeur du paramètre placé en abscisse et \bar{x} la valeur moyenne des x ; y_j est la valeur du paramètre placé en ordonnée et \bar{y} la valeur moyenne des y ; s_x est l'écart type des x et s_y l'écart type des y , n le nombre de couples d'observations et r le coefficient de corrélation calculé.

Le seuil de signification a été fixé à 0,05.

Toujours à l'aide du logiciel Past version 3.16, nous avons effectué des analyses en composantes principales (A.C.P.) avec les valeurs mesurées et calculées (plus grand diamètre de la coquille, largeur de l'ouverture, diamètre de l'ombilic et hauteur du dernier tour de spire (hauteur de la coquille) et nombre de tours de spire, rapport "diamètre maximum de la coquille / diamètre de l'ombilic" et le rapport "diamètre maximum de la coquille / hauteur de la coquille"). Les A.C.P. permettent d'explorer les relations entre les variables et les similarités entre les individus (Gonzalez, 2005). Il s'agit d'une méthode multivariée qui transforme les variables liées entre-elles en nouvelles variables non liées les unes aux autres, appelées composantes principales ou axes principaux.

II-2-6-2- Gestion des données issues de l'identification moléculaire

Les séquences obtenues ont été visualisées et éditées à l'aide du logiciel BioEdit, puis confirmées par leur alignement sur des séquences similaires à l'aide de l'outil nucléotide BLAST sur GENBANK avec l'algorithme ClustalW (Hall, 1999) pour les analyses phylogénétiques.

Les analyses ont porté sur 44 séquences nucléotidiques de 424 pb plus deux séquences nucléotidiques de référence, une pour *B. pfeifferi* obtenu au sud-est du Nigeria (Okeke and Ubachukwu, 2017) et une pour *B. camerunensis* obtenu à Sangmelima au Cameroun (Dejong *et al.*, 2001). L'histoire évolutive a été déduite en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance basée sur le modèle de Jukes-Cantor (Jukes et Cantor, 1969). Les valeurs de Bootstrap prenant en charge les nœuds ont été calculées comme étant le pourcentage d'arbres dans lesquels les taxons associés se sont regroupés.

Des analyses évolutives ont été réalisées grâce au programme informatique MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). L'estimation de la diversité génétique, y compris les sites polymorphes (S), la diversité des haplotypes (Hd), la diversité des nucléotides (π), a été réalisée en utilisant le logiciel DnaSP5.10.01 (Librado et Rozas, 2009). La diversité haplotypique a été considérée comme la probabilité que deux allèles échantillonnés au hasard soient différents, et la diversité nucléotidique π a été considérée comme le nombre moyen de différences nucléotidiques par site dans les comparaisons par paires entre les séquences d'ADN (Nei, 1987).

$$Hd = \frac{n}{n-1} (1 - \sum p_i^2)$$

Où n est le nombre d'individu, p_i la fréquence du i ème haplotype

$$\pi = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j<i} p_i p_j d_{ij}}{L}$$

Où k est le nombre d'haplotype, p_i la fréquence de l'haplotype i , p_j la fréquence de l'haplotype j , L nombre de loci

La différenciation génétique entre les populations (F_{ST}), les statistiques F_s de F_u et les valeurs D de Tajima (Tajima, 1989) ont également été estimées à l'aide du logiciel DnaSP 5.10.01 (Librado et Rozas, 2009). Pour mieux visualiser les relations phylogénétiques entre les haplotypes, un réseau d'haplotypes a été construit parmi les haplotypes définis en utilisant le logiciel TCS v1. 21 (Clement *et al.*, 2000) et les étapes de mutations ont été générées en utilisant les logiciels DnaSP 5.10.01 (Librado et Rozas, 2009) et MEGA7 (Jukes et Cantor, 1969).

II-2-6-3- Gestion des données issues du génotypage microsatellite

➤ Le logiciel Excel® de la suite Microsoft Office® nous a permis d'établir la base de données utilisée au cours de cette étude. Cette base de données comportait pour chaque mollusque son numéro d'identification, le nom spécifique, le site de récolte et son génotype multilocus. Pour les analyses de génétique des populations, les données ont été formatées (vers les formats adaptés à différents logiciels) à l'aide du logiciel CREATE version 1.1 55 (Coombs *et al.*, 2008).

➤ Le logiciel *Fstat* version 2.9.4 (Goudet, 2003) a permis d'estimer la diversité génétique et d'analyser les paramètres de la structure génétique des populations.

- Estimation de la diversité génétique

La variabilité génétique au sein des populations de *Biomphalaria* échantillonnées a été évaluée par divers paramètres : le nombre d'allèles par locus, l'hétérozygotie observée (H_o), l'hétérozygotie attendue (H_s) qui représente la diversité génétique, la diversité allélique par locus et par population, l'adéquation à l'équilibre de Hardy-Weinberg.

- le polymorphisme des marqueurs a été obtenu, à travers la détermination par simple décompte du nombre d'allèles par locus et par échantillon et de la richesse allélique par locus et par échantillon ; la richesse allélique (R_s) est une estimation non biaisée du nombre d'allèles par locus, dans laquelle le biais causé par la taille de l'échantillon est corrigé, de telle sorte qu'une comparaison entre plusieurs échantillons de tailles différentes soit possible ; cette grandeur a été estimée à l'aide de l'indice de raréfaction de Hurlbert (1971) adapté pour la génétique des populations par El Mousadik et Petit (1996).

$R_s = \sum (1 - \frac{c_{2n}^{2N-N_i}}{c_{2N}^{2N}})$. Cette formule permet d'estimer le nombre d'allèles attendu dans un sous-échantillon de taille $2n$ pris dans un échantillon de $2N$ allèles ; le logiciel *Fstat* fixe alors n comme étant la taille de l'échantillon qui a le plus petit nombre d'individus génotypés à un locus, N_i étant le nombre d'allèles de type i obtenus (Goudet, 2003) ; on considère en général qu'un locus est polymorphe lorsque la fréquence de l'allèle le plus représenté ne dépasse pas 95% ($P_{95\%}$) ou 99% ($P_{99\%}$) ;

- l'hétérozygotie observée a été déterminée par le calcul direct de la proportion des hétérozygotes ;

- l'hétérozygotie attendue (H_s) représente la proportion théorique des génotypes hétérozygotes des populations échantillonnées, et peut être calculée pour un locus i : $H_{s_i} = 1 - \sum_j P_j^2$, où P_j représente la fréquence de l'allèle j au locus i . Pour l'ensemble des loci étudiés : $H_s = \sum H_{s_i} / L$ où L est le nombre total de locus étudiés ;

- l'adéquation à l'équilibre de Hardy-Weinberg a été vérifiée. Ce modèle suppose que les populations sont des entités infinies et panmictiques (la fécondation se fait au hasard) et qu'elles ne soient soumises à aucune pression évolutive (mutation, sélection, migration). D'après la loi de Hardy-Weinberg, si dans une population, un locus possède deux allèles A et B, en fréquences respectives p et q ($p = 1 - q$), les fréquences théoriques des génotypes seront p^2 , q^2 et $2pq$ respectivement pour AA, BB et AB.

- Analyse des paramètres de la structure génétique des populations

L'importance de la variabilité génétique dans une même population et de la divergence génétique entre les populations de *Biomphalaria* spp. ont été mises en évidence grâce aux indices de Wright (1978), F_{IS} et F_{ST} respectivement.

- Le F_{IS} (ou coefficient de consanguinité) : c'est une grandeur définie par Wright (1965) qui mesure l'écart des fréquences génotypiques d'une population, par rapport à celles observées dans une population panmictique. Ses valeurs sont comprises entre -1 et 1 ; les valeurs négatives traduisent un excès d'hétérozygotes (-1 pour une fixation des hétérozygotes) tandis que les valeurs positives traduisent un déficit en hétérozygotes (1 pour la fixation des homozygotes) ; la valeur 0 désigne une panmixie parfaite dans la population. Les valeurs de F_{IS} significativement différentes de 0 pourraient traduire un phénomène biologique ou écologique chez la population concernée.

Le coefficient de consanguinité $F_{IS} = 1 - \frac{H_o}{H_s}$, où H_o désigne l'hétérozygotie observée et H_s la diversité génétique ; ce coefficient de consanguinité a été déterminé à l'aide de l'estimateur non biaisé f de Weir et Cockerham (1984), qui corrige le biais de la taille des échantillons. Cet estimateur est basé sur la variance des fréquences alléliques et on a : $f = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_b^2 + \sigma_w^2}$ où σ_w^2 et σ_b^2 désignent respectivement les variances intra- et interindividuelle des fréquences alléliques au sein d'une même sous population. Etant donné que f mesure l'écart des fréquences génotypiques par rapport à celles attendues dans une population sous l'équilibre de Hardy Weinberg, la signification de cet écart a été testée, en randomisant les allèles entre les individus au sein des différentes sous-populations 10000 fois et en calculant f à chaque fois (procédure automatique dans le logiciel *Fstat*). La probabilité de signification (P) de ce type de test est alors la proportion du nombre de fois que la valeur de f estimée dans les répliques formés par randomisations est supérieure ou égale à la valeur réelle de f obtenue (ou inférieure ou égale lorsque la valeur réelle est négative). Chez les organismes hermaphrodites, il peut être utilisé pour évaluer le taux d'autofécondation (s) : $s = 2F_{IS}/(1+F_{IS})$; si $s = 0$ il y a équilibre de Hardy-weinberg (De Meeus *et al*, 2007).

- Le F_{ST} (ou indice de fixation) est une grandeur définie par Wright (1965), il mesure l'écart des fréquences génotypiques entre deux populations par rapport à deux populations entre lesquelles les flux de gènes sont libres et réguliers. Cet indice prend des valeurs comprises entre 0 et 1 ; la valeur 0 traduit la similarité génétique des sous-populations étudiées suggérant un flux de gènes important et fréquent entre ces sous-populations ; la valeur 1 traduit la différenciation totale des sous-populations (aucun allèle en commun aux loci étudiés), suggérant une absence totale de flux de gènes entre elles.

L'indice de fixation $F_{ST} = 1 - \frac{H_s}{H_T}$ où H_s désigne la valeur moyenne de la diversité génétique sur l'ensemble des sous-populations analysées et H_T la diversité génétique attendue s'il y avait panmixie globale dans l'ensemble de ces sous-populations. Cet indice a été déterminé à l'aide de l'estimateur non biaisé θ de Weir et Cockerham (1984), qui est aussi basé sur la variance des fréquences alléliques ; $\theta = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_b^2 + \sigma_w^2}$ où σ_a^2 désigne la variance des fréquences alléliques entre les différentes sous-populations analysées. Etant donné que θ mesure l'écart des fréquences génotypiques entre deux populations par rapport à celles de deux populations entre lesquelles les flux de gènes sont libres et réguliers, la signification de cet écart a été testée en randomisant 10000 fois les génotypes multilocus entre les différents échantillons (les allèles n'ont pas été randomisés comme précédemment parce que l'on ne pouvait être sûr de leur indépendance au sein des échantillons). A chaque réplication, des tables de contingence des allèles par sous échantillon sont générées et le test du maximum de vraisemblance G (Goudet *et al.* 1996) a été appliqué. La probabilité de signification de ce test correspond à la proportion de fois que la valeur de G calculée dans chaque réplica est supérieure ou égale à la valeur réelle observée dans l'échantillon d'origine. Ces tests sont faits individuellement pour chaque locus donc la valeur consensus de P a été calculée en appliquant la correction dite de Bonferroni (Rice, 1989). Cette procédure est aussi automatique dans le logiciel *Fstat*, qui donne alors le nouveau seuil corrigé de signification du test.

- La détermination du niveau de structuration des populations a été faite à l'aide de l'analyse hiérarchique des F_{ST} , en considérant plusieurs niveaux hiérarchiques dont les sites de collecte dans une ville ($F_{sites/ville}$), les villes dans une Région ($F_{villes/Région}$) et les Régions entre elles ($F_{Régions/Total}$). Cette étude a été faite à l'aide du package HierFstat version 0.04-4 du logiciel R (Goudet, 2005) selon la procédure décrite par De Meeûs et Goudet (2007). Les différentes valeurs de F_{ST} obtenues ont été testées à l'aide du test G décrit ci-dessus.

- L'observation d'un f élevé (significativement supérieur à 0) traduit un déficit en hétéro

zygotes ; ce déficit peut être dû d'une part au système de reproduction (l'autofécondation chez les hermaphrodites) et d'autre part à la présence de l'effet Wahlund (mélange de populations aux compositions génotypiques différentes), des allèles nuls, de la dominance des allèles courts, du déséquilibre de liaison...

- **La présence de l'effet Wahlund** (phénomène qui traduit un déficit d'hétérozygotes causé par l'analyse d'un échantillon composite, c'est-à-dire comprenant plusieurs sous-populations de compositions alléliques et génotypiques différentes) a été étudiée à l'aide de deux approches : la première était la régression linéaire des F_{IS} (f) en fonction du nombre de sites de collecte des différents échantillons par localité et une corrélation positive significative était attendue en cas d'effet Wahlund. Et la deuxième approche consistait à considérer tous les échantillons issus des différents sites de collecte d'une même localité comme une seule et même population : les valeurs de la richesse allélique (R_s), de la diversité génétique (H_s) et de l'indice de consanguinité (f) ont été comparées entre quatre localités, constituées respectivement des échantillons provenant des villes de Minkama (Kédé Aval, Mounassi Amont, Yana Messina), Bandjock (Mengolo, Mekono), Bertoua (Quartier Italie, Monou II, Mokolo I) et Kouoptamo (Monoun Njindoun, Kouomboum, Petpenoun) ; ceci a été fait en randomisant 1000 fois les individus entre les localités et en recalculant à chaque fois les trois paramètres cités ci-dessus, à l'aide de Fstat. Par la suite, les valeurs de f ainsi calculées ont été comparées à celles du F_{IS} global obtenu en considérant chaque site de collecte comme une population ; la corrélation a été testée à l'aide du logiciel Past 3.16 ; en cas d'effet Wahlund, la valeur de f serait plus grande dans l'échantillon obtenu en mélangeant les échantillons d'une même localité que lorsque chaque échantillon est considéré comme une population ; et une corrélation positive significative était attendue.

- **La recherche des allèles nuls** a été faite à l'aide du logiciel Micro-Checker version 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) : pour chaque locus, la fréquence d'allèles nuls requise pour expliquer le déficit en hétérozygotes observé a été estimée dans les échantillons de grande taille de *B. camerunensis*, par la seconde méthode de Brookfield (1996). Cette fréquence a été utilisée pour calculer le nombre de génotypes homozygotes nuls (aucune amplification) attendus sous panmixie (en multipliant le carré de cette fréquence par le nombre total d'individus analysés). Ce nombre d'homozygotes nuls attendus pour chaque marqueur a par la suite été comparé avec le nombre d'homozygotes nuls observés, ceci par le test binomial unilatéral sous l'hypothèse alternative d'avoir observé moins d'homozygotes nuls, que ceux attendus.

- **Pour déterminer l'effet de la dominance des allèles courts** sur les déficits en

hétérozygotes, une régression des valeurs de F_{IS} en fonction de la taille des allèles a été effectuée à chaque locus. Pour ce faire, le F_{IS} de chaque allèle a été déterminé, et pour éviter l'effet des allèles rares qui pourraient significativement changer le résultat, à chaque point de cette régression a été affecté le coefficient $NP_i(1-P_i)$ (De Meeûs, 2012), pour donner plus de poids aux allèles dont la fréquence est proche de 0,5 et qui sont les plus représentés dans les loci les plus polymorphes (dans ce coefficient, N désigne le nombre d'individus génotypés pour le marqueur considéré et P_i la fréquence de l'allèle i). La régression utilisée a été le modèle généralisé suivant un polynôme d'ordre 2 qui se rapproche plus de notre type de matrice de données que la régression linéaire (De Meeûs, 2012) ; elle a été effectuée à l'aide du logiciel Excel® et la corrélation a été testée à l'aide du logiciel R.

- **L'effet des déséquilibres de liaison** qui peuvent aussi expliquer les écarts à la panmixie a été déterminé, à l'aide du test G (Goudet *et al.*, 1996) conseillé comme meilleur pour ce type d'analyse (De Meeûs *et al.*, 2009). Les allèles ont été aléatoirement réassociés entre paires de loci, 1000 fois sur l'ensemble de l'échantillon (procédure automatique dans le logiciel F_{stat}). A chaque fois, la statistique G est calculée et la probabilité de signification du test est la proportion du nombre de fois que la valeur de G obtenue dans les réplicas randomisés est supérieure ou égale à la valeur réelle observée.

- Pour mieux apprécier les flux génétiques entre les différentes populations de *B. camerunensis*, un dendrogramme a été construit à partir des distances génétiques harmoniques de Cavalli-Sforza et Edwards (1967) qui donnent de meilleurs résultats que ceux obtenus avec d'autres types de distances génétiques, pour ce type d'analyse (Takezaki et Nei, 1996 ; Kalinowski, 2002). Cet arbre a été construit par la méthode du « *Neighbour Joining* » (Saitou et Nei, 1987) à l'aide du logiciel MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Les populations de *B. pfeifferi* ont été utilisées comme groupe externe. Les distances génétiques ont été elles-mêmes calculées à l'aide du logiciel MSA version 4.05 (Dieringer et Schlotterer, 2002).

- La corrélation entre les distances génétiques et les distances géographiques a été étudiée à l'aide du test de Mantel (Mantel, 1967), avec la méthode décrite par Rousset (1997). En effet, deux matrices de données ont été constituées : l'une contenait une mesure harmonisée de la différenciation génétique entre paires d'échantillons (ou d'individus) $(\frac{\theta}{1-\theta})$ et l'autre le logarithme népérien de la distance géographique. Cette corrélation nous a permis d'étudier l'isolement génétique des populations par la distance géographique, étant donné que

le niveau de différenciation génétique entre deux sous-échantillons est une fonction linéaire du logarithme népérien de la distance géographique qui les sépare :

$\frac{\theta}{1-\theta} \approx b \cdot \ln G_d + a$ (Rousset, 1997). Dans cette équation, θ est l'estimateur du F_{ST} , $\ln G_d$ le logarithme népérien de la distance géographique entre les échantillons et la pente b est directement liée aux paramètres démographiques des populations étudiées, au moment de l'échantillonnage.

➤ Les effectifs efficaces des populations (qui correspondent aux nombres d'individus qui dans chaque population participent effectivement à l'élaboration de la génération suivante) et les taux de migrations (m) ont été estimés dans les échantillons récoltés dans un même site en 2017 et en 2019 : i) par la méthode basée sur les déséquilibres de liaison de Hill (1981), Wapples (2006) et Wapples et Do (2010) implémentée dans logiciel NeEstimator V2.01 (Do *et al.*, 2014) ; et ii) par la méthode basée sur le maximum de vraisemblance à l'aide du logiciel ESTIM1.2 (Vitalis et Couvet, 2001).

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III-1- Résultats

III-1-1- Répartition des mollusques collectés dans les différentes expérimentations

Deux campagnes d'échantillonnage des populations de *Biomphalaria* spp. ont été réalisées dans cette étude. La première campagne menée de juin à août 2017 a permis de collecter 1231 individus dans 21 populations. La deuxième campagne d'échantillonnage, réalisée de juin à juillet 2019 dans 7 populations sur 21, a permis de récolter 435 spécimens de *Biomphalaria* spp. Le Tableau III présente la distribution des mollusques collectés dans les différentes analyses effectuées.

Tableau III : Répartition des mollusques collectés dans les différentes expérimentations

Campagne d'échantillonnage	Nombre d'échantillons	n ₁ Parasitologie	n ₂ Morphométrie	n ₃ Moléculaire	Effectif total récolté (N)
C1: Juin-Août 2017	21	225	490	516	1231
C2 : Juin-Juillet 2019	7	210	/	225	435

n_{1,3} = nombre de mollusques examinés pour chaque étude, C1 et C2 = campagne 1 et 2 respectivement

III-1-2- Niveau d'infestation des *Biomphalaria* spp. par les larves de trématodes

Sur 225 mollusques issus du premier échantillonnage, et utilisés dans le test d'émission cercarienne, seules des monocercaires se rapprochant de par leur morphologie (queue avec une seule fourche, tête en forme de poire) à des cercaires d'Echinostomes (Figure 6) ont été observées ; ces cas d'émission ont été notés chez quelques individus appartenant à 07 populations de *B. camerunensis* à savoir : Mounassi (2 individus positifs/15 individus exposés), Kédé (17/30), Monou II (1/15), Mokolo I (1/15), Memom (5/15), Kouomboum (2/15) et Monoun Njindoun (3/20) soit un taux d'émission global de 13,77%.

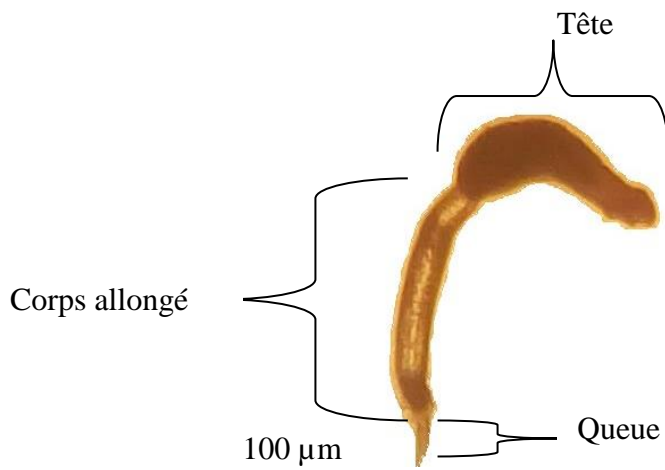
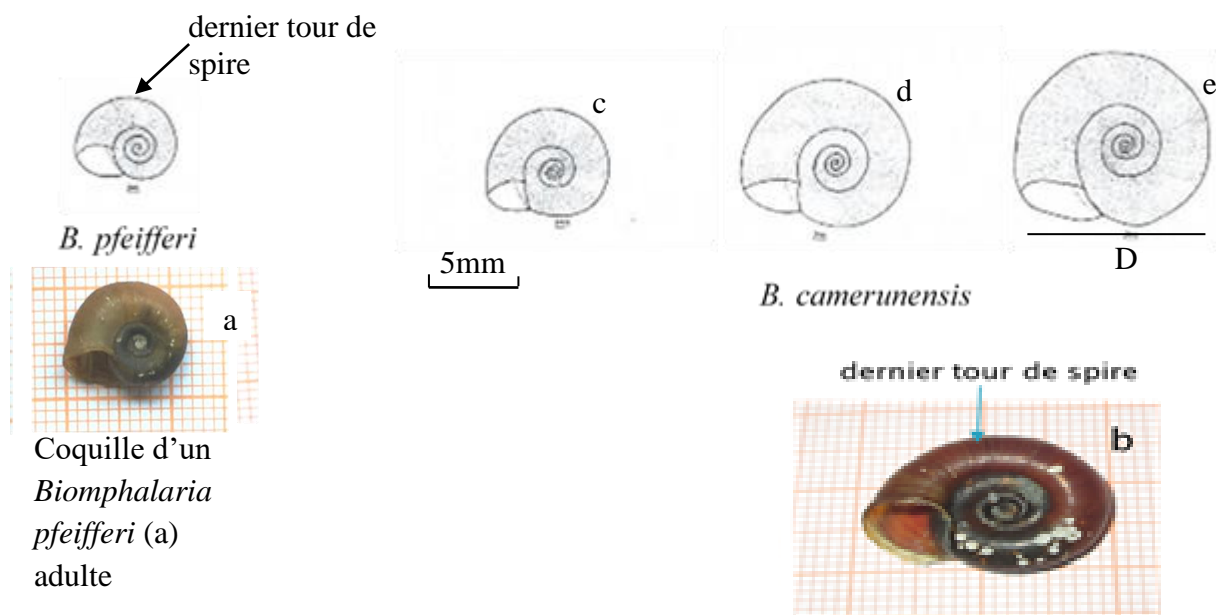


Figure 6 : Photo d'une monocercaire émise par *Biomphalaria camerunensis* et fixée au lugol

III-1-3 - Caractéristiques morphologiques et morphométriques des *Biomphalaria* spp.

III-1- 3 -1- Caractéristiques morphologiques

L'identification morphologique a concerné 1666 mollusques issus des deux campagnes d'échantillonnage. De manière générale, deux espèces de gastéropodes du genre *Biomphalaria* ont été mises en évidence et leurs individus ont tous présenté une coquille discoïde avec un enroulement senestre ayant 4 à 5 tours de spire dont la taille augmente au fur et à mesure que l'animal grandit. A l'œil nu, les individus de l'espèce *B. pfeifferi* (7,20%) ont présenté une coquille avec le dernier tour de spire plus large et rebondi que les autres et ceux de l'espèce *B. camerunensis* (89,20%) ont présenté une coquille avec le dernier tour de spire aplati et l'enroulement des spires bien plus organisé (Figure,7). Les stries ont été retrouvées sur la surface externe des coquilles ; et autour de l'ouverture, la coquille est claire et très fragile. Les couleurs des coquilles variaient du brun clair au brun sombre. Nous avons eu un souci au niveau de l'identification spécifique des individus de la population de Nalassi située au Centre, car les individus de cette population étaient de très petite taille ; la taille de la coquille était semblable à celle de *B. pfeifferi* alors que sa forme rappelait celle de *B. camerunensis*.



Variations d
Biomphalaria camerunensis

Figure 7 : Dessins et photos des coquilles des espèces de *Biomphalaria* adultes

Légende : D : plus grand diamètre de la coquille ; a, b : photos des coquilles des espèces de *Biomphalaria* adultes

III-1- 3 -2- Caractéristiques morphométriques

Au total, 490 coquilles de mollusques ont été dessinées ; le tableau IV résume les statistiques univariées des données obtenues à partir des mesures des paramètres suivants : plus grand diamètre de la coquille (AD), largeur de l'ouverture (AB), diamètre de l'ombilic (BC) et hauteur du dernier tour de spire (CD = hauteur de la coquille) et du calcul du nombre de tours de spire (NT). Sur les coquilles de *B. pfeifferi* de Ngoa Ekellé, les valeurs des paramètres variaient de 3,16 à 4,66 mm pour AB, de 1,91 à 4mm pour BC, de 1,88 à 3 mm pour CD, de 7,91 à 11,5 mm pour AD, et de 2,87 à 4,65 mm pour NT. Les sept autres populations sont celles de *B. camerunensis* ; dans ces populations, les valeurs des paramètres enregistrées variaient ainsi qu'il suit : 2,83 à 5,92 mm pour AB, 3 à 7,83 mm pour BC, 1,83 à 4,25 pour CD, 8,16 à 20 pour AD, et 3,84 à 5,86 mm pour NT.

Tableau IV : Valeurs des différents paramètres morphométriques des mollusques collectés

Populations	Paramètres	AB	BC	CD	AD	NT
Sangmelima N=62	Min	3	4,08	1,83	10	4,05
	Max	5,92	7	4,25	17	5,14
	Moy	4,06	5,24	3,01	12,34	4,57
	<i>s</i>	0,68	0,8	0,5	1,79	0,31
Monou II N=60	Min	3,66	5,83	3,16	13,5	4,12
	Max	5,33	7,66	4,16	20	5,63
	Moy	4,74	6,53	3,6	15,05	4,9
	<i>s</i>	0,42	0,45	0,26	1,39	0,38
Quartier Italie N=64	Min	2,83	3	2	8,16	3,84
	Max	4,33	5,16	3,33	12,5	4,86
	Moy	3,51	4,45	2,79	10,79	4,47
	<i>s</i>	0,49	0,54	0,38	1,14	0,28
Kédé N=60	Min	4,5	5	2,5	12,16	4,12
	Max	5,66	7,83	4,5	17,66	5,84
	Moy	5,01	6,48	3,88	15,37	4,96
	<i>s</i>	0,35	0,77	0,51	1,43	0,37
Memom N=60	Min	3,5	3,16	2,83	10	3,9
	Max	5	6,5	4	15,16	5,6
	Moy	4,17	5,72	3,4	13,26	5
	<i>s</i>	0,36	0,71	0,28	1,08	0,39
Monoun Njindoun N=60	Min	3,33	5,16	2,66	11,92	4,83
	Max	5	6,83	3,83	15	5,79
	Moy	4,3	6,11	3,34	13,75	5,1
	<i>s</i>	0,49	0,44	0,26	0,79	0,22
Mounassi N=60	Min	2,5	3,83	2,5	9,16	4,06
	Max	5,83	8,33	4,5	20	5,86
	Moy	4,81	6,47	3,86	15,26	5,18
	<i>s</i>	0,75	1,08	0,53	2,37	0,39
Ngoa Ekellé N=64	Min	3,16	1,91	1,83	7,91	2,87
	Max	4,66	4	3	11,5	4,65
	Moy	4,06	2,81	2,51	9,43	3,28
	<i>s</i>	0,39	0,44	0,28	0,79	0,36

s : écart type, Min : valeur minimale, Max : valeur maximale, Moy : valeur moyenne

Les coquilles de Monou II, Kédé et Mounassi ont en moyenne des ouvertures plus larges que celles des autres populations. L'ouverture la plus large est observée sur une coquille de *B. camerunensis* de Sangmelima. Bien que la plus petite largeur de l'ouverture ait été observée à Mounassi, la population de *B. camerunensis* du quartier Italie présentait en moyenne les plus petites ouvertures (Figure 8).

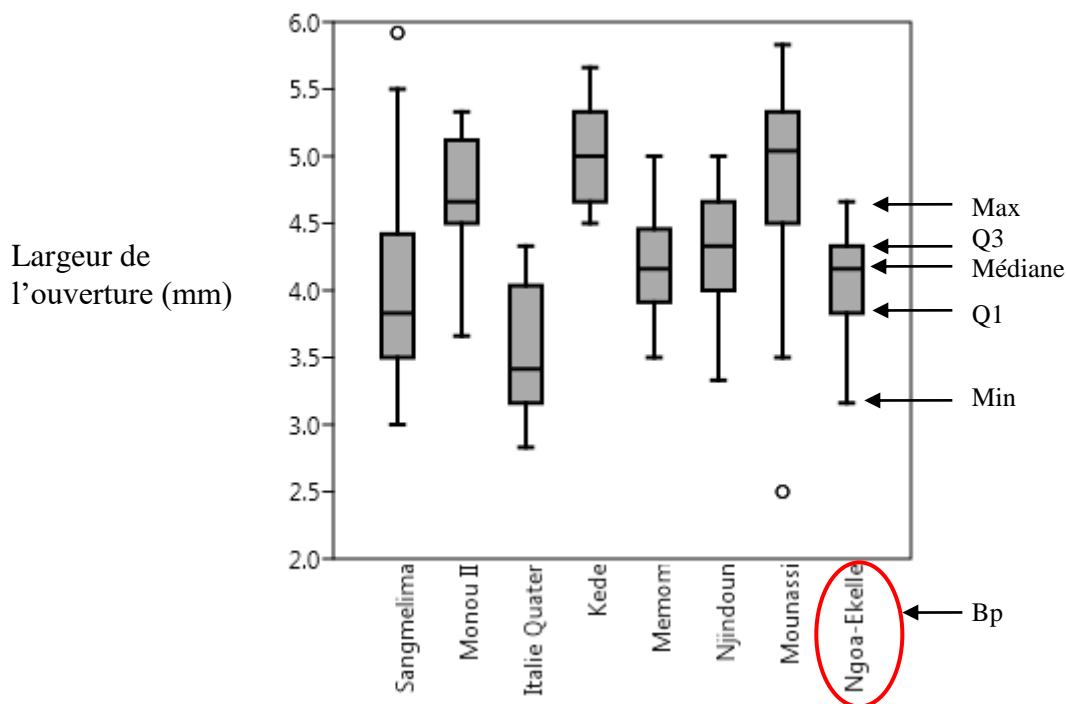


Figure 8 : Variation de la largeur de l'ouverture des coquilles des *Biomphalaria* spp. dans les différents sites de collectes

Légende : Min : valeur minimale de la largeur de l'ouverture de la coquille (AB) pour chaque boîte à moustache dans un site donné, Q1 : premier quartile, Q3 : troisième quartile, Max : valeur maximale, Bp : *Biomphalaria pfeifferi*.

L'ouverture de l'ombilic (BC) était plus grande dans les populations de *Biomphalaria camerunensis* tandis que les coquilles de *Biomphalaria pfeifferi* de Ngoa Ekelle semblaient distinctes avec des valeurs de BC plus petites (Figure 9).

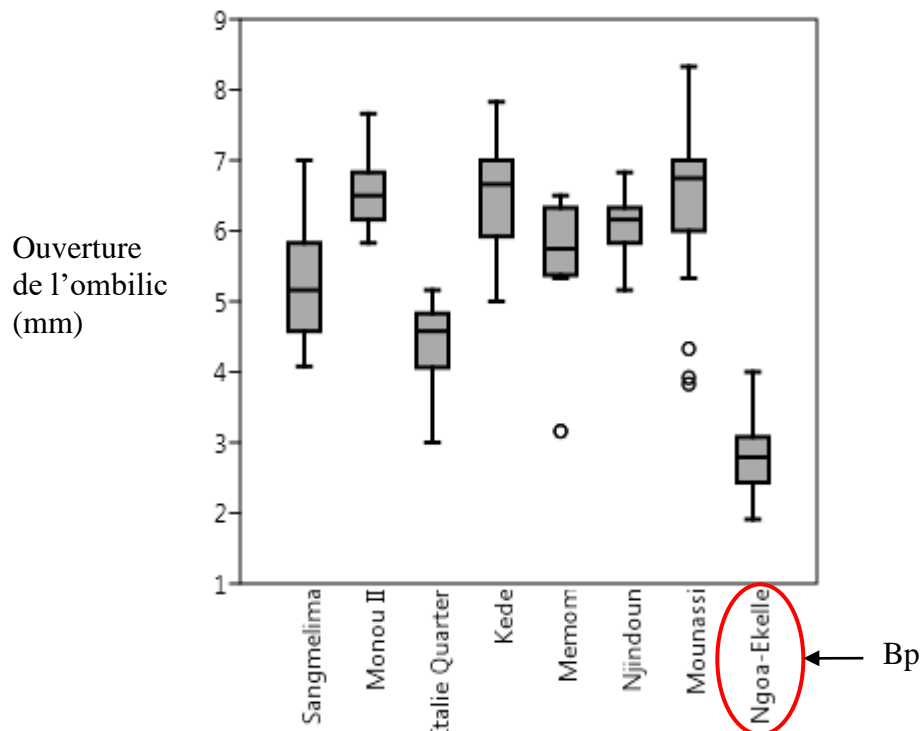


Figure 9 : Variation de l'ouverture de l'ombilic des coquilles des *Biomphalaria* spp. dans les différents sites de collectes

Légende : Bp : *Biomphalaria pfeifferi*

Les coquilles de *B. camerunensis* étaient plus hautes que celles de *B. pfeifferi* de Ngoa Ekellé, les échantillons de Kédé et Mounassi étant les plus gros. Les coquilles les plus larges sont également les plus hautes. La hauteur de *B. pfeifferi* de Ngoa Ekellé était nettement faible (Figure 10).

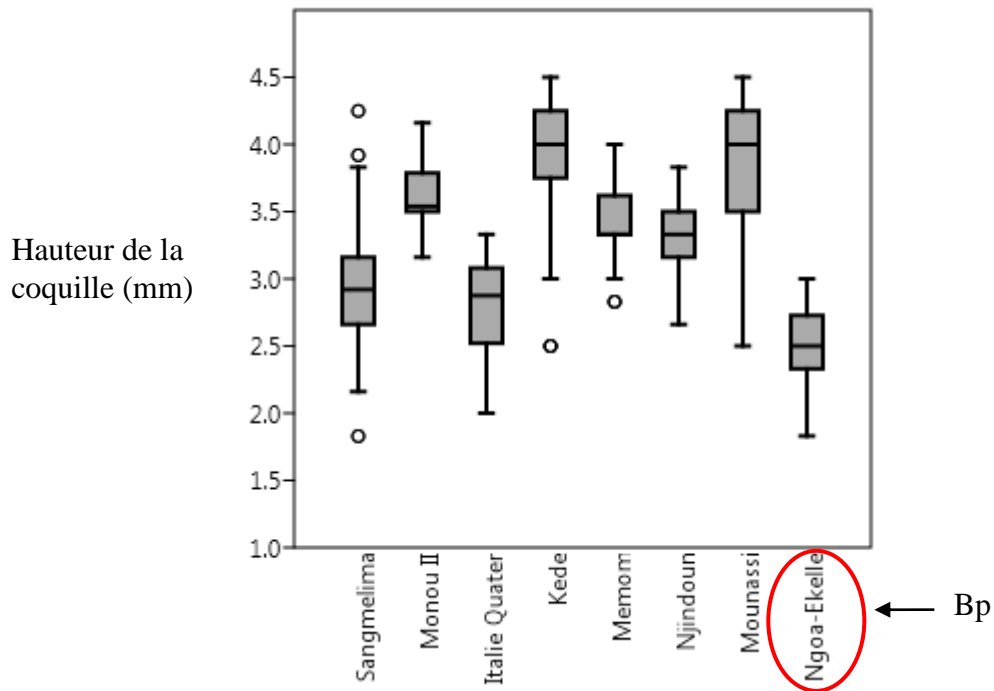


Figure 10 : Variation de la hauteur de la coquille des *Biomphalaria* spp. dans les différents sites de collectes

Légende : Bp : *Biomphalaria pfeifferi*

Les coquilles de *B. pfeifferi* de Ngoa Ekellé étaient plus petites que celles des populations de *B. camerunensis* ; seules les coquilles du quartier Italie avaient une largeur plus petite parmi les populations de *B. camerunensis* de la présente étude (Figure 11).

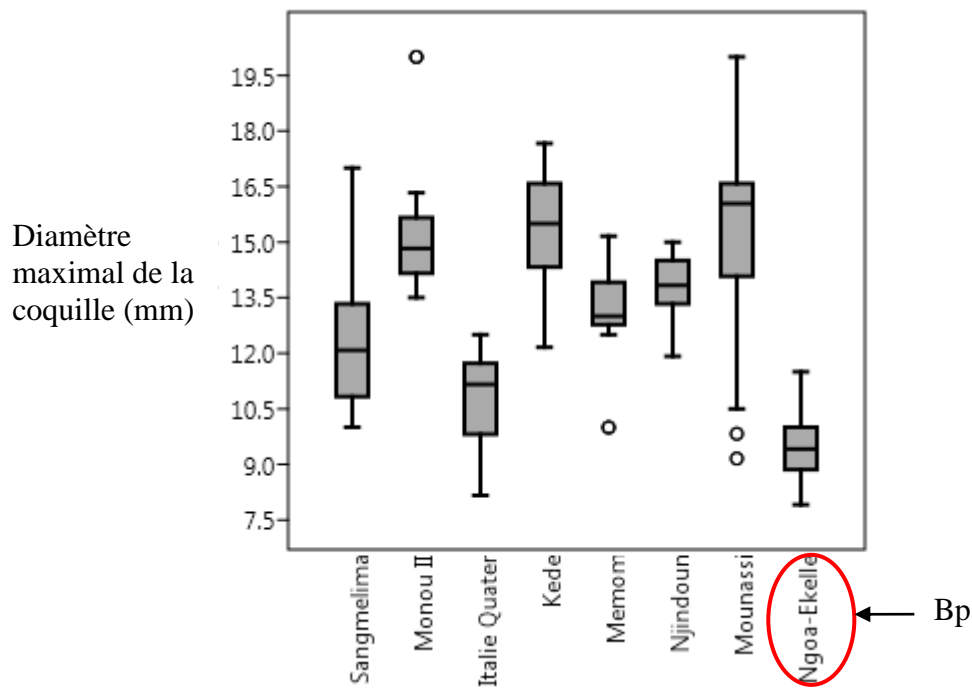


Figure 11 : Variation du diamètre de la coquille chez *Biomphalaria* spp. dans les différents sites de collectes

Légende : Bp : *Biomphalaria pfeifferi*

Le nombre de tours de spire était nettement plus petit chez *B. pfeifferi* de Ngoa Ekellé et élevé dans toutes les populations de *B. camerunensis* (Figure 12).

Afin d'évaluer le schéma de croissance des coquilles, certains paramètres ont été utilisés pour calculer des ratios importants : largeur/ouverture de l'ombilic (AD/BC) (Figure 13) et largeur/hauteur (AD /CD) (Figure 14). Les valeurs du premier rapport (AD/BC) n'ont pas montré de variation significative entre les populations de *B. camerunensis* et étaient plus petites par rapport à la valeur obtenue dans l'échantillon de *B. pfeifferi* de Ngoa Ekellé avec un rapport plus important. Bien que des valeurs plus élevées aient été obtenues dans l'échantillon de Sangmelima, le rapport AD/CD ne variait pas considérablement d'une population à l'autre.

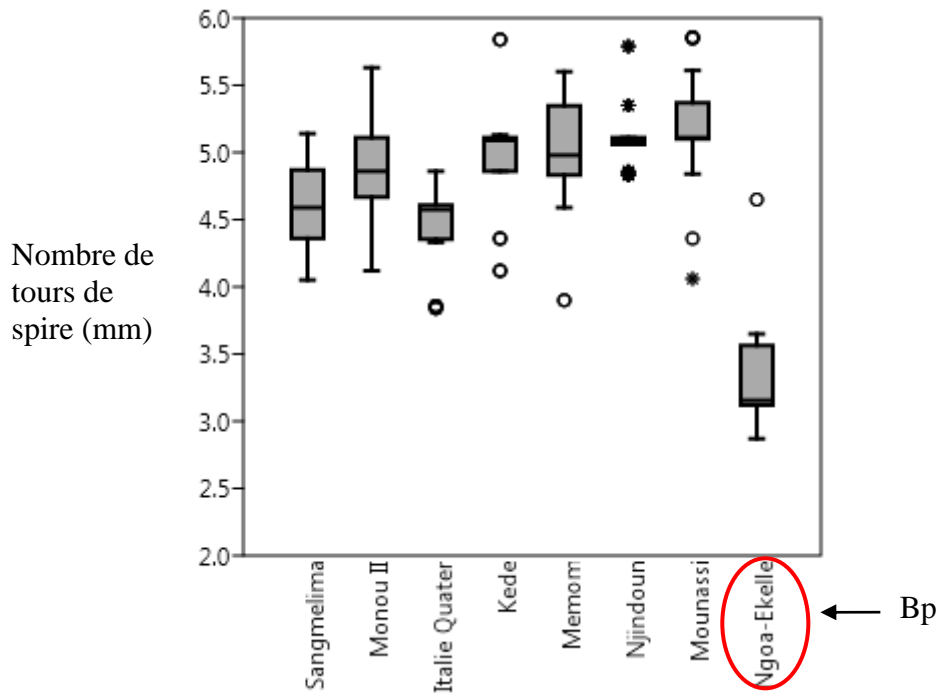


Figure 12 : Variation du nombre de tours de spire chez *Biomphalaria* spp. dans les différents sites de collectes

Légende : Bp : *Biomphalaria pfeifferi*

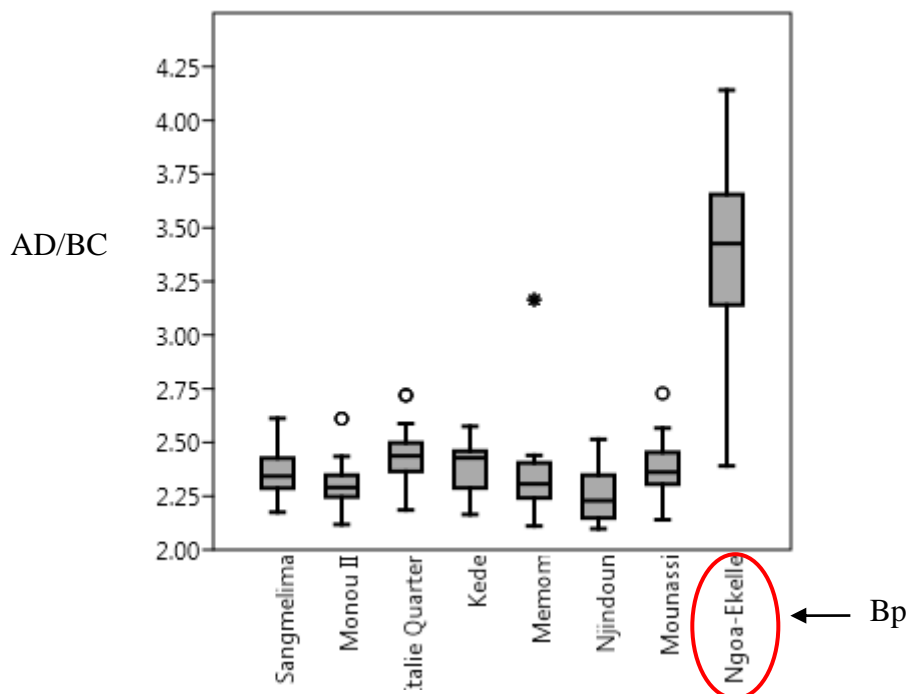


Figure 13 : Variation du rapport diamètre/ouverture de l'ombilic chez *Biomphalaria* spp. dans les différents sites de collectes

Légende : Bp : *Biomphalaria pfeifferi*, AD/BC : Diamètre maximal de la coquille / Ouverture de l'ombilic de la coquille

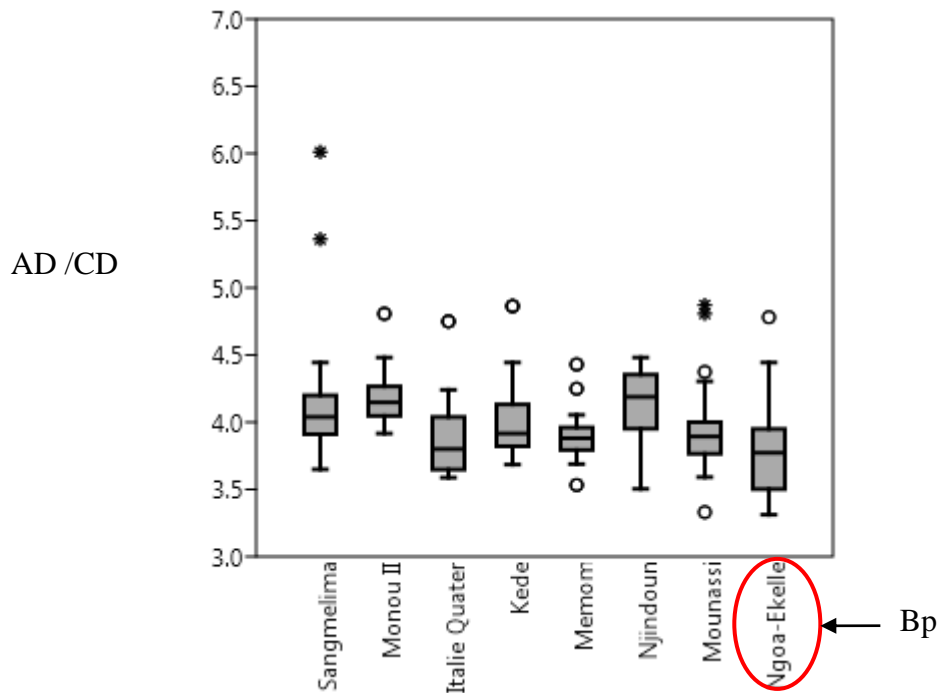


Figure 14 : Variation du rapport diamètre/hauteur chez *Biomphalaria* spp. dans les différents sites de collectes

Légende : Bp : *Biomphalaria pfeifferi*, AD/CD : Diamètre maximal de la coquille / Hauteur de la coquille

L'analyse en composantes principales a été réalisée sur la matrice de corrélation dérivée des mesures des coquilles de 490 escargots, sur la base des variables : plus grand diamètre de la coquille AD, largeur de l'ouverture AB, diamètre de l'ombilic BC, hauteur de la coquille CD, nombre de tours de spire NT et les rapports (AD/BC) et (AD/CD). Un tracé du facteur 1 (64,83%) contre le facteur 2 (18,59%) ne nous a pas permis, par inspection visuelle, de différencier clairement les deux espèces définies ci-dessus. Nous avons noté des points de rencontre entre les deux espèces, ainsi qu'une très grande variation intra spécifique au sein de l'espèce *B. camerunensis* (Figure 15). Les statistiques univariées ont montré que trois valeurs (le rapport AD/BC, BC et NT) peuvent être utilisées pour différencier les deux espèces, l'analyse ACP faite avec ces paramètres semble confirmer l'hypothèse mais on note tout de même quelques points de rencontre ainsi que des individus qui n'appartiennent à aucune espèce (Figure 16). D'où l'importance de l'analyse moléculaire.

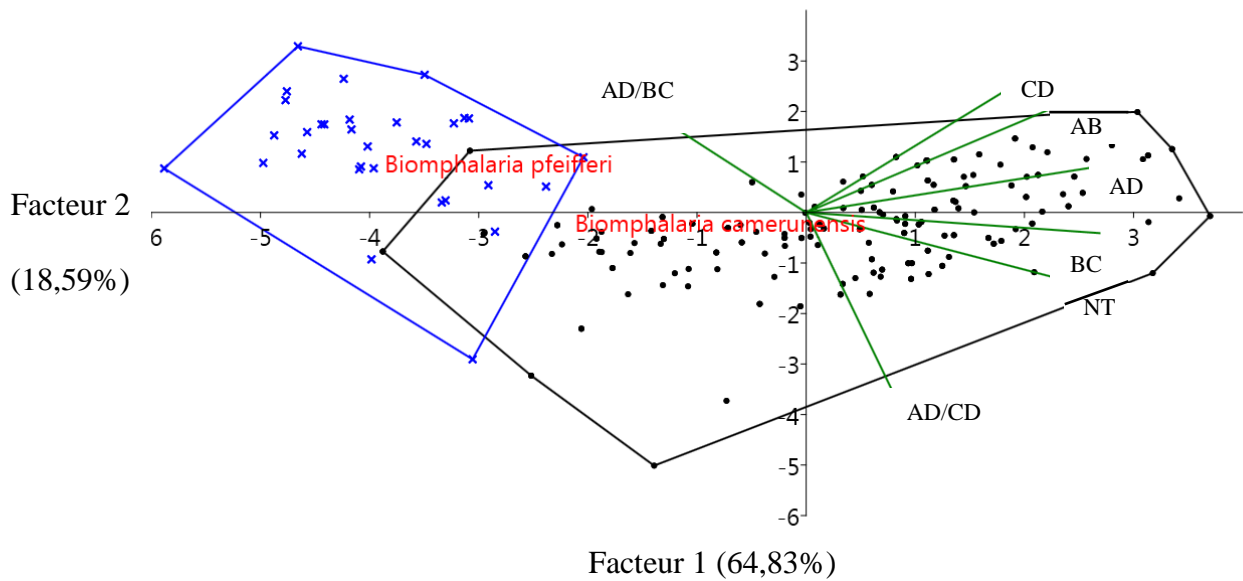


Figure 15 : Analyse en composante principale sur la corrélation entre toutes les mensurations de la coquille chez *Biomphalaria* spp.

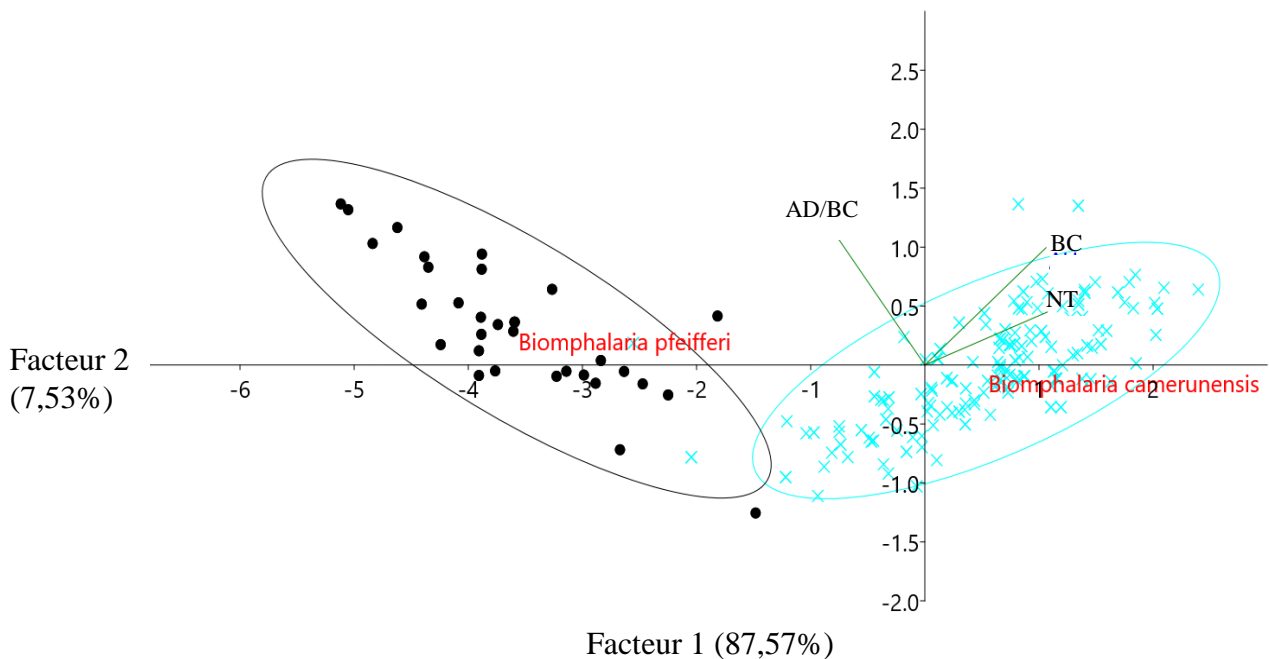


Figure 16 : Analyse en composante principale sur la corrélation entre les trois valeurs les plus discriminantes (AD/BC, BC, NT)

III-1- 4- Caractéristiques moléculaires des taxons de *Biomphalaria* spp.

L'objectif de cette étude visait à distinguer sur la base du polymorphisme de la région ITS2 de l'ADN ribosomique des *Biomphalaria*, les différentes espèces récoltées à l'aide de la

technique PCR-RFLP afin de confirmer ou infirmer l'identification morphologique faite précédemment. Cette partie de travail a porté sur 741 mollusques provenant des deux séries d'échantillonnages.

III-1-4-1- Révélation de l'amplification de la région ITS2 sur gel d'agarose 2% et séquençage

Le produit de l'amplification de la région ITS2 des *Biomphalaria* a montré une bande unique autour de 490 paires de base (pb) pour tous les individus examinés (Figure 17). Après séquençage et alignement sur une séquence de référence, quatre tailles d'amplicons ont été obtenues : 478 pb et 485 pb pour *B. camerunensis* ; 486 pb et 497 pb pour *B. pfeifferi*.

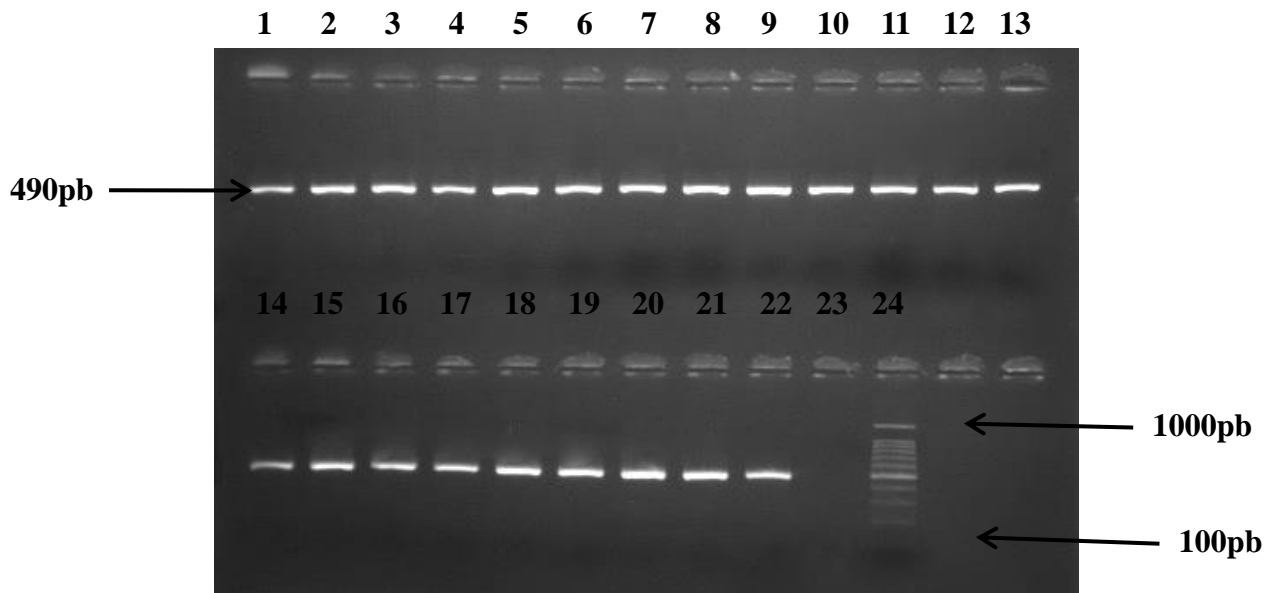


Figure 17 : Photo du gel d'agarose 2% montrant les bandes d'amplification de la région ITS2 des *Biomphalaria*

Légende : 1-22 : échantillons ; 23 : control négatif ; 24 : marqueur de poids moléculaire 100 pb

III-1-4-2- Révélation des produits de la digestion enzymatique sur gel de polyacrylamide

La digestion des produits de PCR à l'aide d'enzymes de restriction (*HpaII* et *TaqI*) a révélé des profils différents pour les deux espèces de *Biomphalaria*.

Les individus de l'espèce *B. camerunensis* ont présenté deux profils, chacun avec deux bandes : le profil 1 (Bc-HpaII-1 : bandes de 212 pb et 139 pb) était commun à tous les sites d'échantillonnage ; le profil 2 (Bc-HpaII-2 : bandes de 212 pb et 189 pb) n'a été observé que sur les spécimens du lac Monoun Njindoun dans la région de l'Ouest. Ce profil a été observé

chez environ 90% des individus de ladite population. Les individus de *B. pfeifferi* présentaient également deux profils, chacun avec deux bandes : le profil 1 (Bpf-HpaII-1 : bandes de 211 pb et 128 pb), était commun dans tous les points d'échantillonnage de *B. pfeifferi* ; alors que le profil 2 (Bpf-HpaII-2 : bandes de 289 pb et 128 pb) n'a été observé qu'à Mokolo (Extrême Nord Cameroun) et était présent chez 95 % des individus échantillonnés (Figure 18).

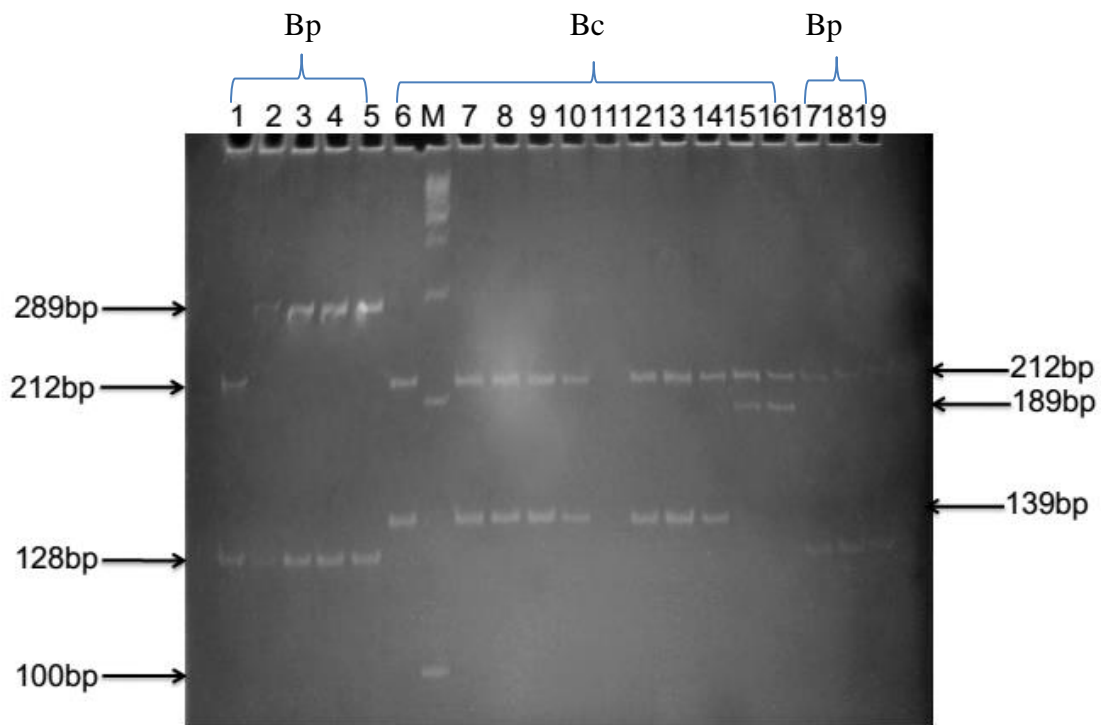


Figure 18 : Photo d'un gel de polyacrylamide 8% montrant les profils RFLP obtenus après digestion avec l'enzyme *Hpa II*

Légende : 6 à 10 et 12 à 14 : *Biomphalaria camerunensis* (Bc) profil 1 ; 15 et 16 : *Biomphalaria camerunensis* profil 2 ; 1 et 17 à 19 : *Biomphalaria pfeifferi* (Bp) profil 1 ; 2 à 5 : *Biomphalaria pfeifferi* profil 2 ; M : marqueur de poids moléculaire 100 paires de base (bp) ; 11 : absence d'amplicon

La Figure 19 montre les différents profils obtenus pour les deux espèces de *Biomphalaria* après la digestion des amplicons ITS2 avec l'enzyme *TaqαI*. Les individus de l'espèce *B. camerunensis* présentaient deux profils, chacun représenté sur le gel par trois bandes : le profil 1 (Bc-TaqαI-1 : 243-pb, bandes de 136 pb et 118 pb) était commun dans tous les sites d'échantillonnage ; tandis que le profil 2 (Bc-TaqαI-2 : bandes de 244 pb, 136 pb et 99 pb) n'a été observé que dans les échantillons du lac Monoun Njindoun (notons que ce sont les mêmes individus qui ont affiché le profil 2 avec l'enzyme *HpaII*). Tous les individus de *B. pfeifferi* présentaient un profil à trois bandes (242 pb, 135 pb et 107 pb).

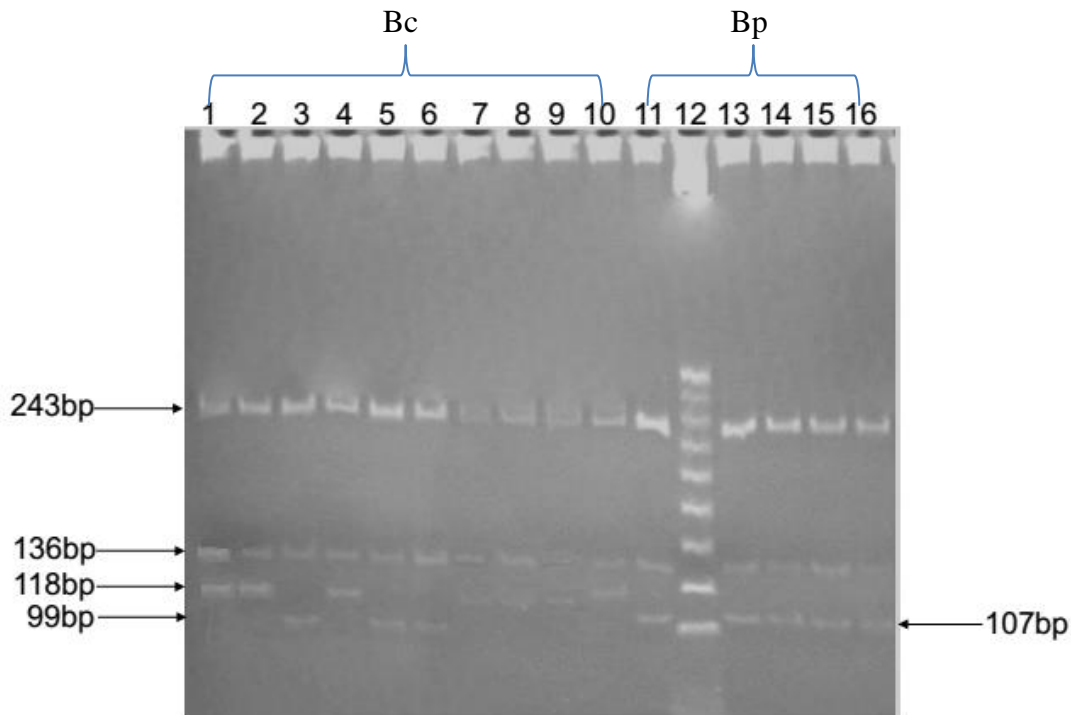


Figure 19 : Photo d'un gel de polyacrylamide 8% montrant les profils RFLP obtenus après digestion avec l'enzyme *TaqI*

Légende : 1, 2, 4 et 7 à 10 : *Biomphalaria camerunensis* (Bc) profil 1 ; 3, 5 et 6 : *Biomphalaria camerunensis* profil 2 ; 11 et 13 à 16 : *Biomphalaria pfeifferi* (Bp); 12 : marqueur de poids moléculaire 25 paires de base (bp)

La figure 20 présente la répartition des espèces dans les différents sites prospectés, après l'identification moléculaire des espèces. Les individus de la population de Nalassi ont pu être identifiés comme appartenant à l'espèce *B. camerunensis*. Ainsi, l'espèce *B. pfeifferi* a été identifiée et récoltée dans trois sites et l'espèce *B. camerunensis* a été identifiée et récoltée dans dix-huit sites.

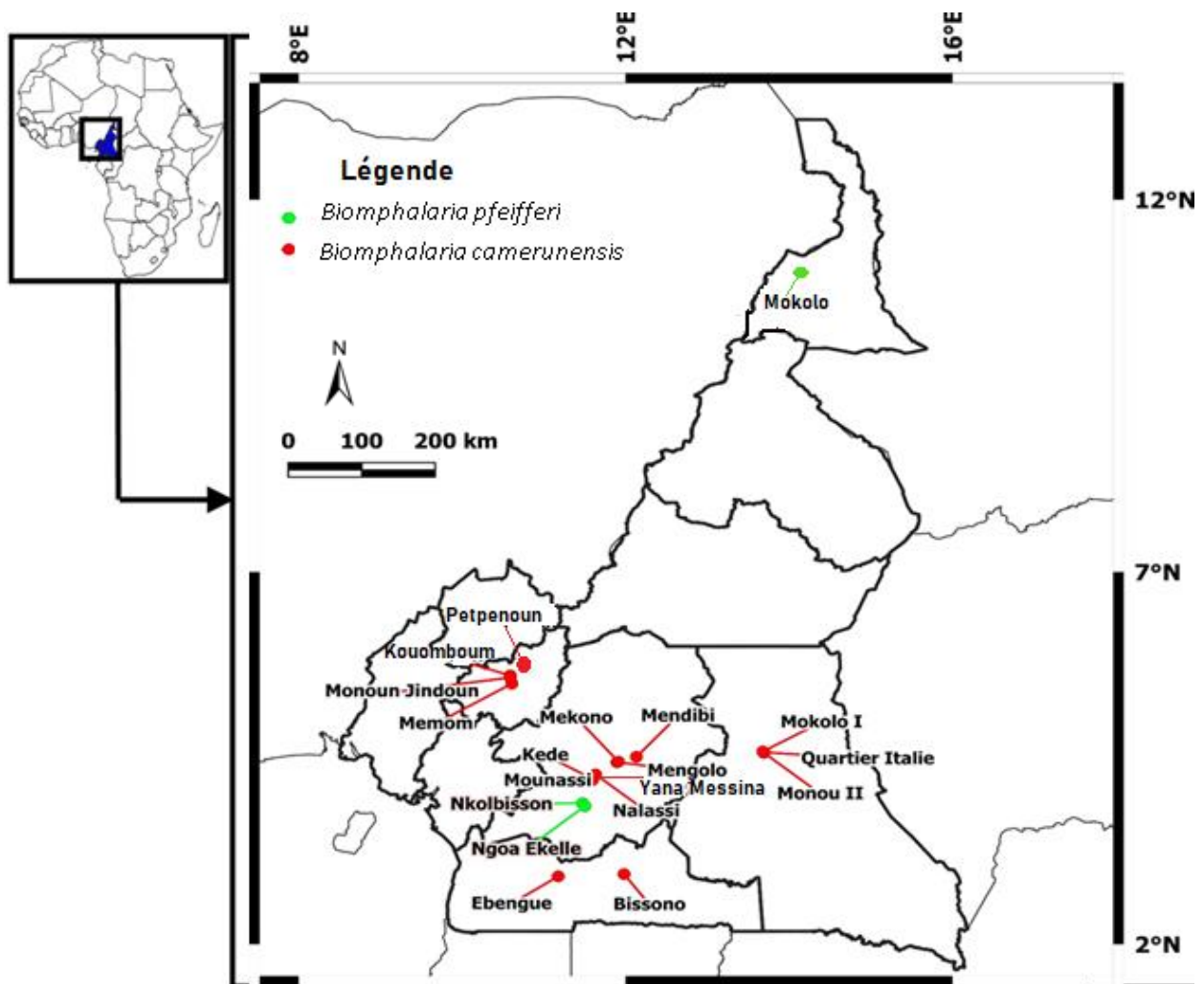


Figure 20 : Carte montrant la répartition des espèces dans les sites prospectés

III-1-4-3- Analyses phylogénétiques

Les analyses phylogénétiques ont montré une nette ségrégation des deux espèces de *Biomphalaria* (Bootstrap 100). Un groupe comprenait l'espèce *B. pfeifferi* de Mokolo dans la région de l'Extrême-Nord, de Nkolbisson et de Ngoa Ekellé dans la région du Centre, et un autre groupe comprenait l'espèce *B. camerunensis* de Mounassi dans la région du Centre, de Sangmélima dans la région du Sud, de Monou II dans la région de l'Est, de Monoun Njindoun et de Memom dans la région de l'Ouest (Figure 21).

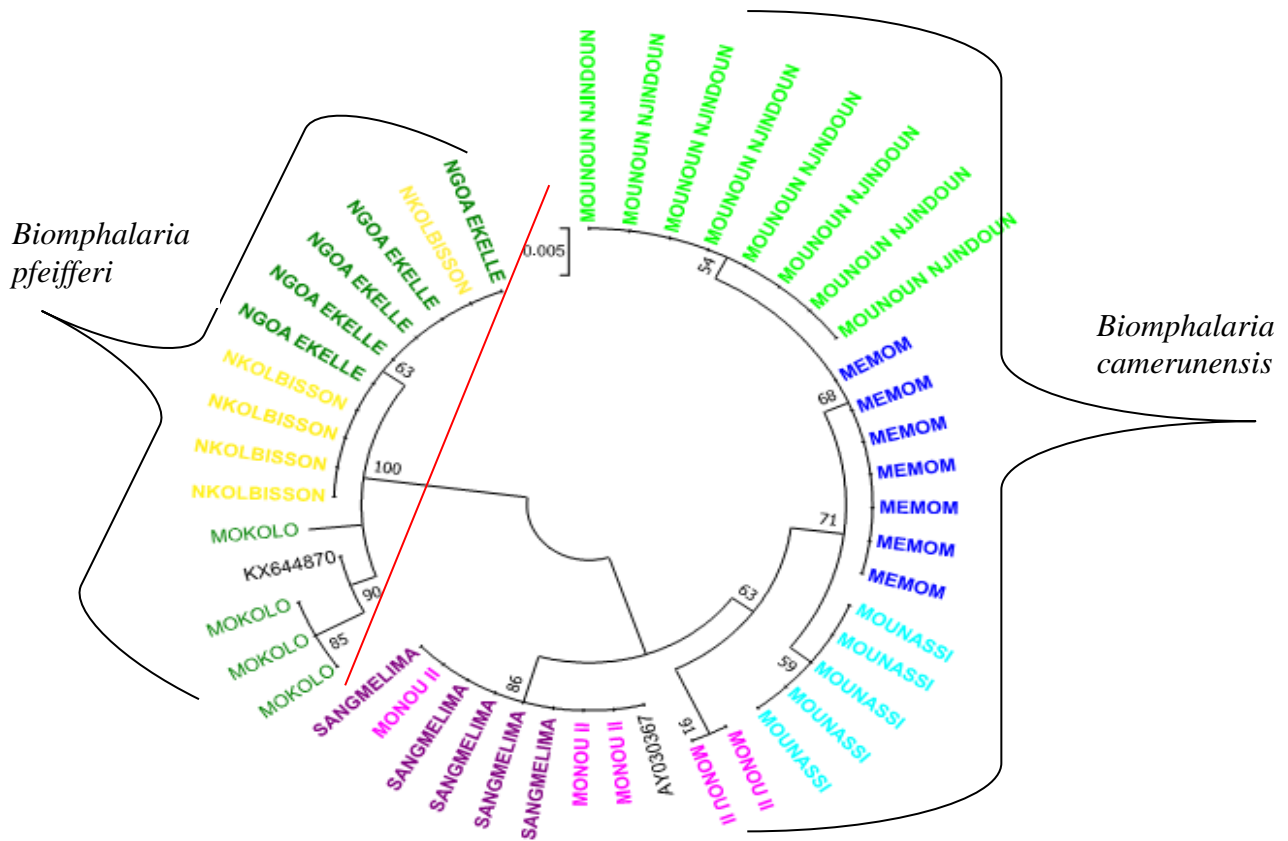


Figure 21 : Arbre Phylogénétique construit avec les séquences ITS2 de *Biomphalaria* spp.

Légende : AY030367 : numéro d'accèsion de la séquence ITS2 de *B. camerunensis* de Sangmélima au Cameroun ; KX644870 : numéro d'accèsion de la séquence ITS2 de *B. pfeifferi* du Sud Est du Nigéria

Au total, neuf haplotypes ont été détectés dans les différentes populations étudiées dont six pour *B. camerunensis* et trois pour *B. pfeifferi*. En général, les haplotypes de chaque espèce étaient fortement liés avec un maximum de 5 et 8 sites mutationnels respectivement dans les populations de *B. pfeifferi* et celles de *B. camerunensis* (Figure 22). L'haplotype H4 qui a été trouvé uniquement à Monoun Njindoun dans la région de l'Ouest et par ailleurs isolé des autres haplotypes de *B. camerunensis*, était différent de la séquence de référence du Cameroun avec 22 sites mutationnels (Figure 23). Lors de la comparaison des haplotypes des deux espèces, 30 sites mutationnels ont été enregistrés, confirmant la ségrégation de ces espèces (Figure 23).

positives dans les échantillons des deux espèces, montrant que les populations étudiées n'étaient pas en expansion (Tableau V).

Tableau V : Diversités haplotypiques et nucléotidiques entre les populations de *Biomphalaria camerunensis* et *Biomphalaria pfeifferi*

Population	n	Paramètres de la diversité génétique					
		H	S	Hd	Π	D	Fu's F_s
<i>Biomphalaria camerunensis</i>							
Monou II	5	2	6	0,600	0,008	1,718	3,967
Sangmelima	5	1	0	0,000	0,000	–	–
Mounassi	5	1	0	0,000	0,000	–	–
Monoun Njindoun	8	1	0	0,000	0,000	–	–
Memom	7	1	0	0,000	0,000	–	–
Total	30	5	1 0	0,798	0,008	0,934	3,190
<i>Biomphalaria pfeifferi</i>							
Nkolbisson	5	1	0	0,000	0,000	–	–
Ngoa Ekellé	5	1	0	0,000	0,000	–	–
Mokolo	4	2	5	0,500	0,006	-0,796	2,59
Total	14	3	6	0,473	0,004	-0,139	2,301

n : nombre d'individus analysés, H : nombre d'haplotypes, S : nombre de sites polymorphes, Hd : diversité haplotypique, Π : diversité nucléotidique, D : test D de Tajima, Fu's F_s : test F_s de Fu

- Structure génétique des populations de *Biomphalaria*

La structure génétique des populations de *Biomphalaria* spp. avec le marqueur ITS2, a été analysée en effectuant des calculs des F_{ST} par paires entre les cinq populations de *B. camerunensis* d'une part et entre les trois populations de *B. pfeifferi* d'autre part. Les valeurs de F_{ST} étaient élevées et significatives ($P < 0,01$) entre les paires des populations de *B. camerunensis* de Sangmelima, Monou II, Monoun Njindoun et Memom mais faibles et non significatives entre les populations de Sangmelima dans la région du Sud et de Monou II dans la région de l'Est ($P = 0,25$) (Tableau VI). Dans les populations de *B. pfeifferi*, les valeurs de F_{ST} n'étaient significatives qu'entre les échantillons de la Région du Centre (Nkolbisson, Ngoa Ekellé) et celui de l'Extrême Nord (Mokolo) ($P < 0,001$) (Tableau VII).

Tableau VI : Indice de fixation (F_{ST}) entre les populations de *Biomphalaria camerunensis*

Localités	Mounassi	Monoun Njindoun	Memom	Monou II	Sangmelima
Mounassi (n = 5)	–				
Monoun Njindoun (n = 8)	1**	–			
Memom (n = 7)	1**	1***	–		
Monou II (n = 5)	0,7**	0,7**	0,7**	–	
Sangmelima (n = 5)	1**	1***	1**	0,25	–

$n =$ nombre d'individus analysés ; **P < 0,01; ***P < 0,0001

Tableau VII : Indice de fixation (F_{ST}) entre les populations de *Biomphalaria pfeifferi*

Localités	Ngoa-Ekellé	Nkolbisson	Mokolo
Ngoa Ekellé (n = 5)			
Nkolbisson (n = 5)	0		
Mokolo (n = 4)	0,6**	0,6**	-

$n =$ nombre d'individus analysés ; **P < 0,01

III-1-5- Révélation de la structure génétique des populations de *Biomphalaria* spp. à l'aide de marqueurs d'ADN microsatellites

III-1-5-1- Echantillons analysés

L'étude de la structure génétique macrogéographique des populations de *Biomphalaria* spp. a porté sur 20 échantillons sauvages prélevés dans quatre Régions au Cameroun (Tableau VIII). L'analyse de la structure microgéographique complète des populations a porté uniquement sur les échantillons sauvages de *B. camerunensis* car le nombre de populations de *B. pfeifferi* que nous disposions étaient insuffisant pour effectuer certaines analyses.

Tableau VIII : Echantillons analysés pour la structure génétique des populations de *Biomphalaria* spp.

Régions	Villes	Sites	Espèces collectées	Effectifs
Centre	Minkama	Kédé Aval	Bc	29
		Kédé Amont	Bc	30
		Mounassi Aval	Bc	30
		Mounassi Amont	Bc	33
		Yana Messina	Bc	6
	Nalassi	Nalassi	Bc	30
	Bandjock	Mengolo	Bc	9
		Mekono	Bc	30
	Nkoteng	Mendibi	Bc	4
	Yaoundé	Nkolbisson	Bp	28
Ngoa Ekellé		Bp	32	
Ouest	Kouoptamo	Monoun Njindoun	Bc	30
		Kouomboum	Bc	29
		Petpenoun	Bc	31
	Foumbot	Memom	Bc	31
Sud	Ebolowa	Ebengue	Bc	6
	Sangmélima	Bissono	Bc	30
Est	Bertoua	Monou II	Bc	30
		Mokolo I	Bc	27
		Quartier Italie	Bc	30
			Total	505

Bc : *Biomphalaria camerunensis*, Bp : *Biomphalaria pfeifferi*

III-1-5-2- Sensibilité et polymorphisme des marqueurs microsatellites

Parmi les 24 couples d'amorces testés sur des spécimens dans les 20 populations étudiées, 13 n'ont pas pu amplifier les séquences microsatellites de *Biomphalaria* spp. et 3 marqueurs (Bpf8, Bpf9 et Bpf3) ont révélé les allèles uniquement chez quelques individus parmi les 698 (505 individus + 193 individus issus respectivement du premier et du second

échantillonnage) mollusques analysés (10,46%) ; par ailleurs, 8 marqueurs ont permis de révéler des allèles aux loci microsatellites correspondants (Bpf1, Bpf2, Bpf5, Bpf10, Bpf11, Bpf12, μ Bg1 et Bg μ 15) dans toutes les populations étudiées avec un pourcentage moyen d'amplification d'environ 98,01%. Le nombre d'individus amplifiés par marqueur est récapitulé dans le Tableau IX. Les analyses ont porté uniquement sur les 8 marqueurs qui ont montré un pourcentage d'amplification supérieur à 90%.

Tableau IX : Nombre d'individus amplifiés par marqueur microsatellite

Loci	Bpf1	Bpf2	Bpf5	Bpf10	Bpf11	Bpf12	Bgu15	μBg1
n. testés	698	698	698	698	698	698	698	698
n. amplifiés	687	669	688	691	693	688	684	673
Pourcentage (%)	98,42	95,84	98,57	99	99,28	98,57	98	96,42

n. = nombre d'individus

Au total, 28 allèles ont été obtenus pour les 8 marqueurs microsatellites utilisés, avec pour chacun de ces marqueurs un nombre d'allèles compris entre 2 et 5 (Tableau X).

Tableau X : Nombre d'allèles par locus et par échantillon prélevé

Echantillons	Marqueurs microsatellites							
	BPF1	BpF2	BpF5	µbg1	BpF10	BGµ15	BpF12	BpF11
Kédé Aval	1	1	1	1	2	1	2	2
Kédé Amont	2	1	1	2	2	3	3	2
Quartier Italie	2	3	1	2	2	4	4	5
Mounassi Aval	2	2	1	2	2	1	2	3
Monoun Njindoun	2	1	2	3	2	2	3	3
Kouomboum	2	3	1	2	2	3	5	3
Memom	2	3	2	1	2	3	1	5
Mounassi Amont	2	1	1	2	2	3	2	1
Nalassi	2	2	2	1	1	4	1	2
Ebengue	2	1	1	1	1	2	2	2
Yana Messina	2	1	1	1	2	2	1	1
Nkolbisson	1	2	2	2	2	3	3	2
Sangmélina	2	2	1	3	2	3	1	2
Monou	2	3	1	2	2	3	3	3
Mengolo	1	3	1	1	2	3	2	1
Mekono	1	2	2	1	3	3	3	3
Mokolo I	1	2	1	2	3	4	2	2
Ngoa Ekellé	2	1	2	2	2	3	1	2
Mendibi	1	1	1	1	2	1	1	2
Petpenoun	1	1	1	2	1	3	1	1
Total	2	3	3	3	3	4	5	5

NB : Le total désigne le nombre total d'allèles pour chaque marqueur

Les richesses alléliques correspondantes ont été estimées sur un effectif d'au moins 22 individus diploïdes chez *B. camerunensis* (autrement dit, seules les populations ayant un effectif supérieur ou égal à 22 individus ont été retenues pour la suite des analyses) et de 25 individus chez *B. pfeifferi* ; les résultats obtenus sont contenus dans le tableau XI. Les valeurs de richesse allélique allaient de 1 à 4,785 avec une moyenne de 2,053 dans les populations de

B. camerunensis, et de 1 à 3 avec une moyenne de 1,965 dans les populations de *B. pfeifferi* (Ngoa Ekellé et Nkolbisson).

Tableau XI : Richesse allélique par locus et par échantillon

Echantillons	Loci							
	BpF1	BpF2	BpF5	µbg1	BpF10	BGµ15	BpF12	BpF11
Kédé Aval	1,000	1,000	1,000	1,000	1,945	1,000	2,000	2,000
Kédé Amont	2,000	1,000	1,000	1,932	2,000	3,000	2,996	2,000
Quartier Italie	2,000	2,945	1,000	2,000	2,000	3,932	3,916	4,662
Mounassi Aval	2,000	2,000	1,000	1,932	2,000	1,000	2,000	2,932
Monoun Njindoun	2,000	1,000	1,996	3,000	2,000	1,984	2,786	3,000
Kouomboum	2,000	2,999	1,000	1,957	2,000	3,000	4,785	3,000
Memom	2,000	2,629	2,000	1,000	2,000	3,000	1,000	4,129
Mounassi Amont	2,000	1,000	1,000	2,000	2,000	2,990	2,000	1,000
Nalassi	2,000	2,000	1,945	1,000	1,000	3,996	1,000	1,932
Sangmélina	2,000	2,000	1,000	3,000	2,000	2,928	1,000	2,000
Monou	2,000	3,000	1,000	2,000	2,000	3,000	2,992	3,000
Mekono	1,000	2,000	1,786	1,000	2,984	2,983	3,000	2,996
Mokolo I	1,000	2,000	1,000	2,000	3,000	3,968	2,000	2,000
Petpenoun	1,000	1,000	1,000	1,995	1,000	3,000	1,000	1,000
Total Bc	2,000	3,000	1,509	2,995	2,702	3,949	3,521	4,954
Ngoa Ekellé	1,000	1,999	2,000	1,990	2,000	3,000	3,000	1,990
Nkolbisson	1,955	1,000	2,000	1,965	1,955	2,955	1,000	1,955
Total Bp	1,662	1,687	2,000	1,894	2,661	3,000	2,963	2,324

Bc : *Biomphalaria camerunensis*, Bp : *Biomphalaria pfeifferi*, le total désigne la richesse allélique par marqueur et par espèce.

III-1-5-3- Diversité génétique et coefficient de consanguinité

Dans tous les échantillons analysés, la diversité génétique (H_s) sur tous les loci utilisés et sur l'ensemble des populations de *Biomphalaria* spp. a varié de 0 à 0,683 avec une moyenne de 0,289 dans les populations de *B. camerunensis* et de 0 à 0,627 avec une moyenne

de 0,192 dans les populations de *B. pfeifferi*. Le tableau XII regroupe les valeurs de la diversité génétique par marqueur utilisé et par population prospectée.

Tableau XII : Diversité génétique par locus et par échantillon de *Biomphalaria* spp.

<i>Hs</i>								
Loci								
Echantillons Bc	BpF1	BpF2	BpF5	µbg1	BpF10	BGµ15	BpF12	BpF11
Kédé Aval	0,000	0,000	0,000	0,000	0,069	0,000	0,468	0,500
Kédé Amont	0,497	0,000	0,000	0,067	0,515	0,421	0,559	0,424
Quartier Italie	0,434	0,474	0,000	0,186	0,497	0,686	0,586	0,401
Mounassi Aval	0,489	0,513	0,000	0,067	0,497	0,000	0,405	0,447
Monoun Njindoun	0,517	0,000	0,129	0,649	0,452	0,098	0,256	0,607
Kouomboum	0,519	0,292	0,000	0,071	0,500	0,567	0,627	0,595
Memom	0,414	0,096	0,181	0,000	0,396	0,445	0,000	0,374
Mounassi Amont	0,452	0,000	0,000	0,434	0,504	0,436	0,484	0,000
Nalassi	0,370	0,455	0,069	0,000	0,000	0,632	0,000	0,067
Sangmélima	0,426	0,515	0,000	0,562	0,508	0,189	0,000	0,515
Monou	0,491	0,573	0,000	0,517	0,508	0,571	0,291	0,674
Mekono	0,000	0,241	0,036	0,000	0,323	0,247	0,437	0,522
Mokolo I	0,000	0,205	0,000	0,519	0,683	0,574	0,507	0,498
Petpenoun	0,000	0,000	0,000	0,123	0,000	0,634	0,000	0,000
Bp								
Nkolbisson	0,000	0,077	0,325	0,071	0,389	0,627	0,500	0,071
Ngoa Ekellé	0,063	0,000	0,312	0,065	0,061	0,522	0,000	0,063

Bc= *Biomphalaria camerunensis*; Bp= *Biomphalaria pfeifferi*

Les valeurs moyennes de l'hétérozygotie observée (*Ho*) sur tous les loci et sur l'ensemble des échantillons, étaient de 0,075 et 0,053 respectivement au sein des populations de *B. camerunensis* et celles de *B. pfeifferi*.

Chez *B. camerunensis*, les valeurs de F_{IS} à tous les loci, de même que les valeurs du taux d'autofécondation (s moyen =0,857) sont toutes supérieures à zéro, indiquant des déficits significatifs ($P = 0,0001$) en hétérozygotes. Chez *B. pfeifferi*, seul le locus BpF5 possède des valeurs négatives de F_{IS} et du taux d'autofécondation ; ces valeurs sont fortement positives pour les autres loci (s moyen =0,793) montrant également un déficit important en hétérozygotes (Tableau XIII).

Tableau XIII : Hétérozygoties et coefficient de consanguinité par locus

Loci	H_o (Bc/Bp)	H_s (Bc/Bp)	F_{IS} (Bc/Bp)	P (Bc/Bp)	s (Bc/Bp)
BPF1	0,060/0	0,329/0,031	0,819/1	0 ,0001/0	0,9/1
BpF2	0,088/0	0,240/0,038	0,635/1	0 ,0001/0	0,777/1
BpF5	0,003/0,390	0,030/0,318	0,914/-0,224	0 ,0001/0,9008	0,955/-0 ,577
μ bg1	0,021/0	0,228/0,068	0,907/1	0 ,0001/0	0,951/1
BpF10	0,013/0,031	0,389/0,225	0,967/0,861	0 ,0001/NA	0,983/0,925
BG μ 15	0,123/0	0,393/0,574	0,687/1	0 ,0001/NA	0,814/1
BpF12	0,052/0	0,330/0,249	0,843/1	0 ,0001/NA	0,915/1
BpF11	0,246/0	0,402/0,067	0,387/1	0 ,0001/0	0,558/1
Total	0,076/0,053	0,293/0,196	0,742/0,732	0 ,0001/NA	

H_o =hétérozygotie observée, H_s =hétérozygotie attendue, F_{IS} = coefficient de consanguinité, P= probabilité de signification, s=taux d'autofécondation, Bc=*Biomphalaria camerunensis*, Bp= *Biomphalaria pfeifferi*, NA== Non applicable

Le coefficient de consanguinité obtenu dans chaque échantillon a été supérieur à 0, et significatif entre les échantillons d'une même espèce ($P=0,00045$ pour *B. camerunensis* et $P=0,00313$ pour *B. pfeifferi*). Sur l'ensemble des échantillons, des valeurs moyennes du F_{IS} (f) obtenues ont été de 0,742 et 0,726 respectivement dans les populations de *B. camerunensis* et celles de *B. pfeifferi*. De manière générale, les valeurs de F_{IS} observées variaient d'un locus à un autre dans les populations de *Biomphalaria camerunensis* (Figure 24) ; les données n'étaient pas suffisantes pour calculer les intervalles de confiance chez *Biomphalaria pfeifferi*.

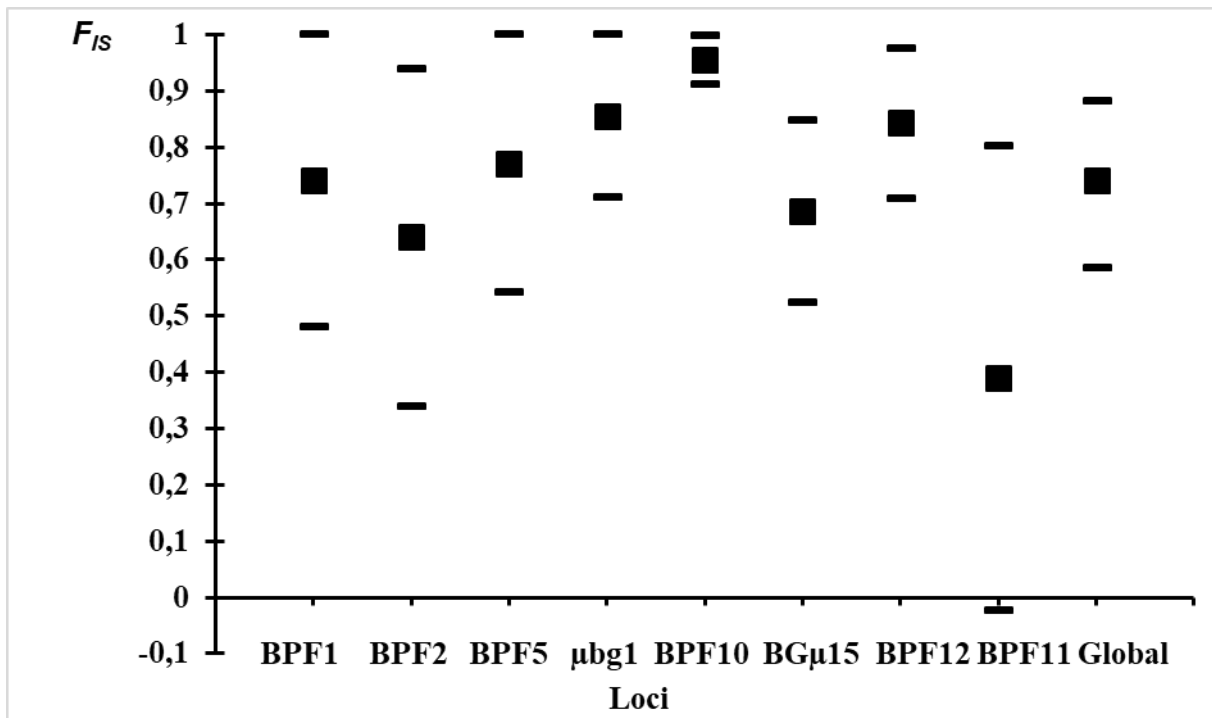


Figure 24 : Variation du F_{IS} en fonction des loci dans les populations de *B. camerunensis*

Les carrés représentent les valeurs moyennes des F_{IS} pour chaque locus, et le carré global désigne le F_{IS} moyen sur l'ensemble des loci étudiés ; les traits représentent l'intervalle de confiance (calculés à l'aide des écarts types obtenus par « Jackknife » sur les populations pour les valeurs de F_{IS} des loci et par « bootstraps » pour le F_{IS} moyen global)

III-1-5-4- Interprétation du coefficient de consanguinité

Les valeurs positives du F_{IS} obtenues et significativement supérieures à 0 matérialisent un déficit significatif en hétérozygotes au sein des échantillons. Le déficit en hétérozygotes peut avoir plusieurs origines dont les principales sont la présence des allèles nuls, la dominance des allèles courts, l'effet Wahlund (échantillon composé d'individus appartenant à plusieurs populations de compositions génétiques différentes), et le déséquilibre de liaison. L'implication de chacun de ces facteurs dans les déficits en hétérozygotes observés dans les populations étudiées a été vérifiée selon qu'il suit.

III-1-5-4-1- Contribution des allèles nuls dans les déficits en hétérozygotes observés

Dans l'ensemble, chaque locus microsatellite utilisé a révélé des génotypes homozygotes nuls (c'est-à-dire que chez ces derniers la séquence microsatellite n'a pas pu être amplifiée) pour expliquer les valeurs de F_{IS} élevées et significativement différentes de la valeur 0 attendue dans une population panmictique.

Pour un échantillon donné, chacun des loci utilisés n'a pas toujours révélé des génotypes homozygotes nuls (voir Tableau XIV pour le locus Bpf5 par exemple). La probabilité de signification au seuil 5% du test binomial de comparaison des nombres observés et attendus d'individus au génotype homozygote nul (l'hypothèse alternative formulée est : **Nuls observés** < **Nuls attendus**) a été significatif ($P < 0,000000002$) pour tous les loci étudiés, ce qui ne justifie pas suffisamment l'implication des allèles nuls dans les valeurs de F_{IS} élevées obtenues (NB : la présence des allèles nuls n'explique pas le F_{IS} élevé quand cette probabilité est inférieure à 0,05).

Tableau XIV : Fréquences de l'allèle nul, du génotype homozygote nul et nombres observé et attendu d'individu de génotypes homozygotes nuls au locus Bpf5

Echantillons	PB2	PB2 carré	N	Nuls obs.	Nuls att.
Kédé Aval	0	0	29	0	0
Kédé Amont	0	0	30	0	0
Quartier Italie	0	0	30	0	0
Mounassi Aval	0	0	30	0	0
Monoun Njindoun	0,1107	0,0122	30	0	0,37
Koumboum	0	0	29	0	0
Memom	0,1488	0,0221	31	0	0,69
Mounassi Amont	0	0	33	0	0
Nalassi	0,2078	0,0432	30	1	1,3
Sangmélina	0	0	30	0	0
Monou II	0	0	30	0	0
Mekono	0,2527	0,0639	30	2	1,917
Mokolo I	0,1925	0,0371	27	1	1,0017
Petpenoun	0	0	31	0	0
Total		0,1785	420	4	5,2787

PB2 désigne la fréquence attendue de l'allèle nul trouvée par la méthode de Brookfield (1996), **PB2 carré** de la fréquence attendue du génotype homozygote nul, **N** la taille de l'échantillon, **Nuls obs.** le nombre observé d'individus de génotype homozygote nul, **Nuls att.** Le nombre attendu d'individus de génotype homozygote nuls.

De plus, la régression des valeurs de F_{IS} en fonction du nombre de génotypes homozygotes nuls observé a montré une corrélation faible, positive (dont le coefficient de corrélation R^2 est 0,001) mais non significative ($P=0,3903$) de ces deux paramètres pour l'ensemble des loci étudiés (Figure 25). Cette observation montre que la présence des allèles nuls ne serait donc pas à l'origine des déficits en hétérozygotes observés.

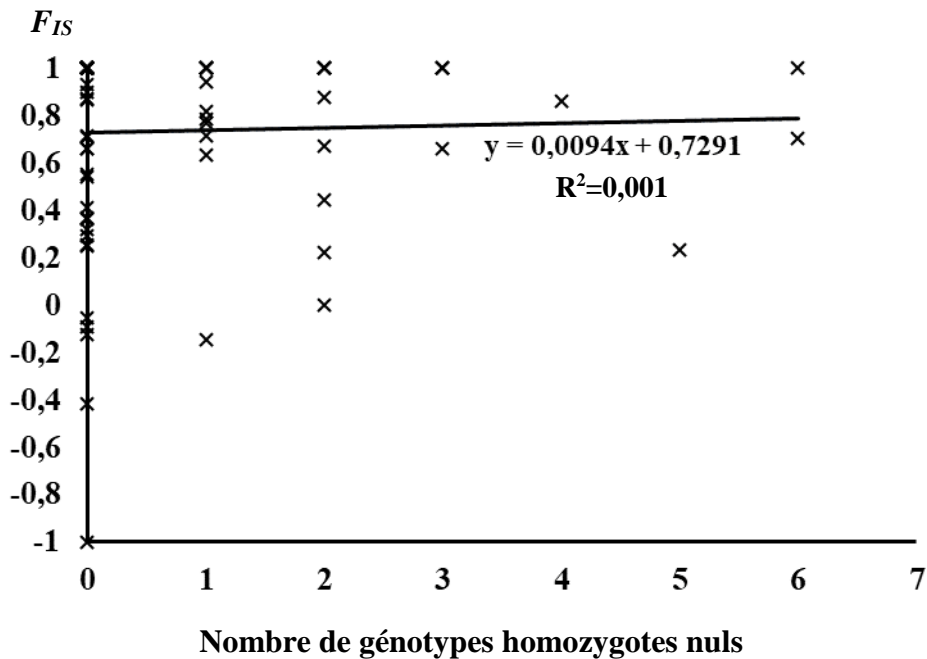


Figure 25 : Variation des valeurs de F_{IS} en fonction du nombre de génotypes homozygotes nuls

III-1-5-4-2- Contribution de la dominance des allèles courts dans les déficits en hétérozygotes

En testant la dominance des allèles courts à un locus donné (BG μ 15 par exemple), on note une corrélation positive et significative ($P = 0,0308$) entre les valeurs de F_{IS} des différents allèles et la taille de ces derniers. La régression entre la valeur de F_{IS} d'un allèle et sa taille montre qu'il existe alors une liaison négative entre ces deux paramètres (Figure 26). La taille des allèles contribue donc aux déficits en hétérozygotes observés.

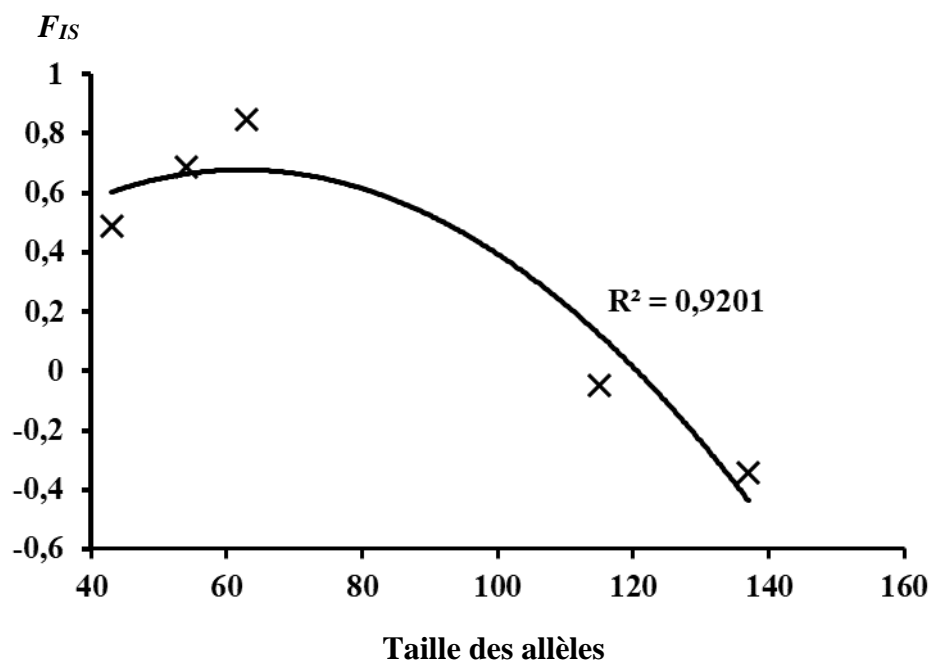


Figure 26 : Variation des valeurs de F_{IS} des allèles en fonction de leurs tailles

III-1-5-4-3- Contribution de l'effet Wahlund dans les déficits en hétérozygotes

- Variation du F_{IS} en fonction du nombre de sites par localité

La corrélation entre les F_{IS} et les sites de collecte a été négative et pas statistiquement significative avec $R = -0,1585$ et $P = 0,6837$ (Figure 27) ce qui montre une absence d'effet wahlund dans les échantillons étudiés.

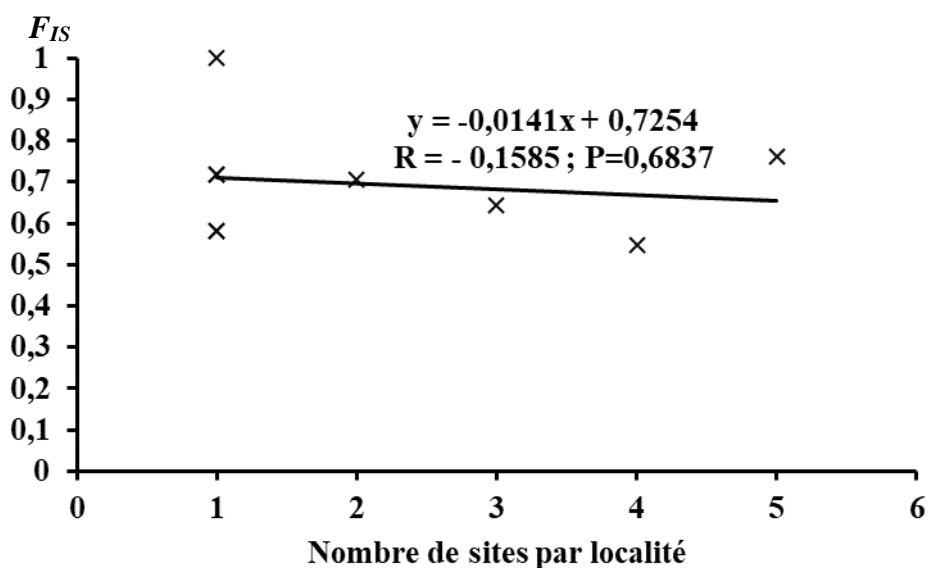


Figure 27 : Variation du F_{IS} en fonction du nombre de sites par localité

- **Estimation de la contribution de l'effet Wahlund aux déficits en hétérozygotes en considérant tous les points de collecte d'une même localité comme une population**

Dans les échantillons de *B. camerunensis* étudiés pour l'analyse micro géographique, nous avons choisi les localités ayant plus d'un site ; les valeurs moyennes de richesse allélique, de diversité génétique et de F_{IS} ont été respectivement de 1,542, 0,254 et 0,746 dans la localité de Minkama ; de 1,648, 0,226 et 0,577 à Mbandjock ; de 2,054, 0,414 et 0,766 à Bertoua et de 1,753, 0,267 et 0,784 à Kouoptamo. Toutefois les valeurs de ces trois paramètres n'ont pas été significativement différentes dans les quatre localités et les valeurs de P ont été respectivement de 0,122, 0,191 et 0,583. En comparant les valeurs de F_{IS} uniquement aux valeurs de F_{IS} moyen en considérant chaque point de collecte d'une localité comme une population, on note également une corrélation négative $R = -0,447$ et non significative ($P = 0,552$) (tableau XV). Ces résultats confirment une fois de plus l'absence de l'effet Wahlund dans les échantillons de *B. camerunensis* étudiés.

Tableau XV : Comparaison entre la valeur moyenne de F_{IS} d'un point de collecte et de celle de l'ensemble des points de collecte de la localité

Valeurs F_{IS} Localités	F_{IS} moyen par localité	F_{IS} en considérant tous les sites de collecte d'une localité comme une population	Différence
Minkama	0,763	0,746	0,017
Mbandjock	0,706	0,577	0,129
Bertoua	0,643	0,766	-0,123
Kouoptamo	0,549	0,784	-0,235
R/P			-0,447/0,552

R = Corrélation/P = seuil de signification

III-1-5-4-4- Déséquilibre de liaison

Sur les 392 paires de loci testés (8 loci, donc 28 paires x 14 populations de *B. camerunensis*), 19 paires se sont avérées significativement et statistiquement associées, soit un pourcentage de 4,85% d'associations observées ; pourcentage inférieur à 5 % ($P = 0,5878$) seuil au-delà duquel ces associations entre loci ne sont plus négligeables. Cinquante-six paires

de loci ont été testés pour les 2 populations de *Biomphalaria pfeifferi*, 2 paires se sont avérées significativement et statistiquement associées pour un pourcentage de 3,57% également inférieur à 5 % ($P=0,7767$). Ces résultats ont montré que le déséquilibre de liaison ne serait pas à l'origine des déficits en hétérozygotes observés dans les populations de *Biomphalaria* spp. étudiées.

III-1-5-5- Différenciation génétique entre populations et sous-populations de *Biomphalaria* spp.

La différenciation génétique a été élevée dans les échantillons des espèces en étude. L'indice de fixation (F_{ST}) moyen obtenu sur l'ensemble des loci a été de 0,456 dans les populations de *B. camerunensis* et les valeurs de F_{ST} par paires de populations ont été significativement différentes ($P < 0,00055$) (Tableau XVI). De même, dans les populations de *B. pfeifferi* (Nkolbisson et Ngoa Ekellé) le F_{ST} moyen a été de 0,117 et le F_{ST} par paires de populations ($F_{ST} = 0,0119$) a également montré une différence significative ($P = 0,001$). De plus, nous avons noté par l'analyse hiérarchique des valeurs de F , une structuration significative entre les échantillons de *Biomphalaria camerunensis* issus de différents sites dans une même ville ($F_{sites/ville} = 0,3284$, $P = 0,001$) ou aussi entre ceux issus de différentes villes dans une même région ($F_{villes/Région} = 0,2336$, $P = 0,001$) ; donc entre les échantillons issus des différentes Régions ($F_{Régions/Total} = -0,0322$, $P = 0,016$). Nous avons aussi noté une différenciation significative entre les deux échantillons de *B. pfeifferi* provenant des sites différents dans une même ville ($F_{sites/ville} = 0,2611$, $P = 0,001$).

Tableau XVI : Valeurs de F_{ST} entre les paires de populations de *Biomphalaria camerunensis*

	Kédé Amont	Quartie r Italie	Mounass i Aval	Monou n Njindou n	Kouomb oum	Memo m	Mounassi Amont	Nalassi	Sangméli ma	Monou	Mekono	Mokolo I	Petpeno un
Kédé Aval	0,2057*	0,5507*	0,2570*	0,5083*	0,5135*	0,6920*	0,3067*	0,5280*	0,5955*	0,5422*	0,6845*	0,5467*	0,7725*
Kédé Amont		0,4299*	0,1426*	0,4091*	0,3360*	0,5522*	0,0679*	0,2508*	0,3880*	0,3597*	0,5426*	0,4311*	0,6240*
Quartier Italie			0,3901*	0,2751*	0,2314*	0,4602*	0,4182*	0,5002*	0,2957*	0,1722*	0,3866*	0,2472*	0,4634*
Mounassi aval				0,2158*	0,2972*	0,4719*	0,1746*	0,3456*	0,4466*	0,3844*	0,5779*	0,4218*	0,6514*
Monoun Njindoun					0,2449*	0,3732*	0,4141*	0,5012*	0,3973*	0,3392*	0,5728*	0,3756*	0,6695*
Kouombo um						0,4270*	0,4039*	0,3509*	0,1393*	0,1547*	0,5200*	0,3207*	0,5961*
Memom							0,5435*	0,5992*	0,5198*	0,4771*	0,6390*	0,5825*	0,7226*
Mounassi Amont								0,3610*	0,4507*	0,4007*	0,4934*	0,4431*	0,6108*
Nalassi									0,3816*	0,3894*	0,7091*	0,5551*	0,6652*
Sangméli ma										0,1038*	0,5142*	0,3848*	0,6084*
Monou II											0,4079*	0,1850*	0,4473*
Mekono												0,4745*	0,7100*
Mokolo I													0,4978

* P<0,00055

III-1-5-6- Isolement des populations de *Biomphalaria camerunensis* par la distance géographique et inférence de paramètres démographiques

La régression $F_{ST}/1-F_{ST}$ en fonction du logarithme népérien de la distance géographique montre une corrélation très faible, positive et non significative ($R=0,0244$; $P=0,78$) entre le niveau d'isolement des paires de populations de *Biomphalaria camerunensis* étudiées et la distance géographique ; ce qui signifie que la divergence génétique observée entre paires de populations n'est pas due essentiellement à la distance géographique entre elles.

La droite de régression obtenue présente une pente $b = 0,0161$, avec un intervalle de confiance (IC) à 95% de $[-0,1778$ à $0,04383]$ (Figure 28).

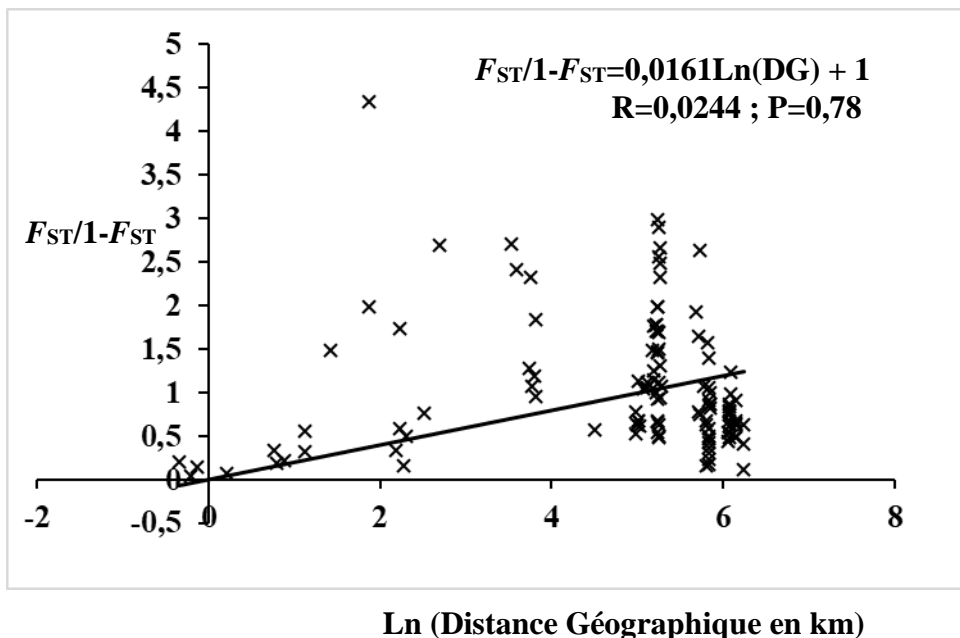


Figure 28 : Relation entre distance génétique et distance géographique entre les populations de *Biomphalaria camerunensis* étudiées

$F_{ST}/1-F_{ST}$: mesure de la distance génétique entre les populations ; Ln : logarithme népérien ; R : coefficient de corrélation.

III-1-5-7- Similarité génétique des populations de *Biomphalaria camerunensis* étudiées

La matrice de distances génétiques harmoniques de Cavalli-Sforza et Edwards entre paires de sous populations de *B. camerunensis* calculée à partir des loci microsatellites est consignée dans le tableau XVII. On note dans ce tableau que la plus petite distance génétique se situe entre les populations de Mounassi et Kédé (0,11247) et la plus grande entre celles de Mengolo et Nalassi (0,57235).

Tableau XVII : Distances génétiques harmoniques entre les différentes populations de *Biomphalaria camerunensis*

	Kouom boum	Mekono	Memom	Mokolo I	Monou II	Monoun Njindou n	Mounass i Amont	Nalassi	Petpenou n	Quartie r Italie	Sangmelim a	Mengol o
Kédé Aval	0,30522	0,41329	0,38878	0,3782	0,34897	0,38569	0,11247	0,30808	0,36701	0,28306	0,36238	0,43564
Kouomboum		0,40801	0,33296	0,3097	0,23857	0,29212	0,33744	0,37809	0,36863	0,1675	0,22973	0,3772
Mekono			0,37441	0,4754	0,43036	0,46886	0,40318	0,54062	0,56602	0,41279	0,4814	0,24033
Memom				0,48892	0,4696	0,24851	0,38224	0,42273	0,47841	0,35336	0,47365	0,3744
Mokolo I					0,25758	0,36299	0,36456	0,47585	0,39522	0,26079	0,3335	0,44019
Monou II						0,41511	0,39209	0,39112	0,35213	0,23107	0,21598	0,38452
Monoun N							0,3577	0,4496	0,5324	0,2994	0,40763	0,47871
Mounassi Amont								0,32338	0,35227	0,30139	0,39601	0,40814
Nalassi									0,18556	0,40181	0,26635	0,57235
Petpenoun										0,38047	0,32915	0,49991
Quartier Italie											0,30427	0,37697
Sangmelima												0,48027

Les distances génétiques obtenues, ont permis de construire un dendrogramme (Figure 29), lequel montre des valeurs de distances génétiques faibles entre les sous populations de *B. camerunensis* d'un même foyer. Les populations de Mbandjock (bootstrap : 97) et de Minkama (bootstrap : 81) sont regroupées chacune sur un seul et même cluster. La population de Petpenoun est plus éloignée génétiquement des deux autres populations de Kouoptamo (Monoun Njindoun et Kouomboum) ; la même observation a été faite à Bertoua où la population du quartier Italie est génétiquement éloignée de celles de Monou II et de Mokolo. Ces populations ainsi que celles des autres localités sont distribuées sur différents clusters. Les populations de *Biomphalaria pfeifferi* (BP) de Yaoundé (Ngoa Ekellé et Nkolbisson) utilisées ici comme «outgroups», forment un cluster séparé des autres (bootstrap : 99).

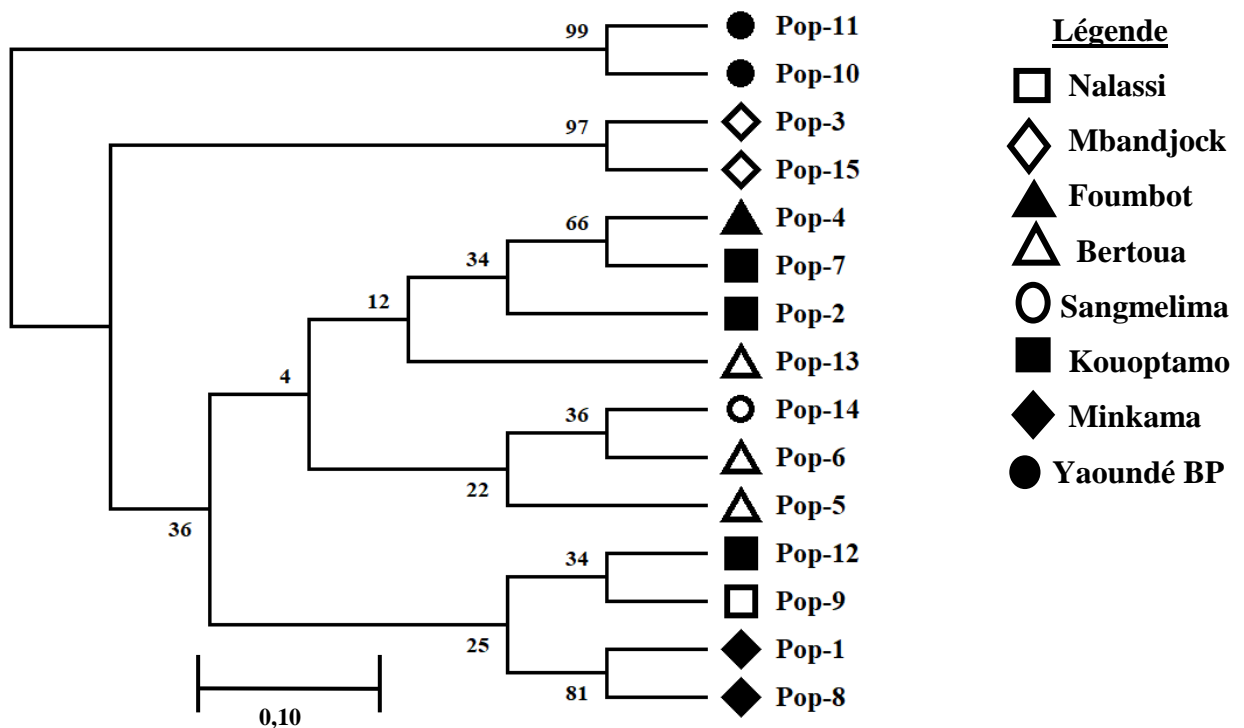


Figure 29 : Dendrogramme exprimant la distance génétique entre les sous populations de *Biomphalaria camerunensis* étudiées

La distance horizontale entre deux nœuds est proportionnelle à la distance génétique entre des populations reliées par ces nœuds ; les valeurs de « bootstraps » sont inscrites sur les différents nœuds. Pop=population ; Pop-1=Kédé Aval, Pop-2=Kouomboum, Pop-3=Mekono, Pop-4=Memom, Pop-5=Mokolo I, Pop-6=Monou II, Pop-7=Monoun Njindoun, Pop-8=Mounassi Amont, Pop-9=Nalassi, Pop-10=Ngoa Ekellé, Pop-11=Nkolbisson, Pop-12=Petpenoun, Pop-13= Quartier Italie, Pop-14=Sangmelima, Pop-15=Mengolo.

III-1-6- Estimation des effectifs efficaces et des taux de migration dans les sous-populations de *Biomphalaria* spp.

Pour l'estimation des effectifs efficaces des différentes sous-populations étudiées, les échantillons de *Biomphalaria* spp. utilisés étaient constitués chacun des collectes d'un même site sur deux années différentes et pendant la même période (Tableau XVIII).

Tableau XVIII : Echantillons utilisés pour la détermination des effectifs efficaces des populations de *Biomphalaria* spp.

Echantillons (année de collecte)	Espèces	N
Kédé Aval (2017)	Bc	29
Kédé Aval (2019)	Bc	30
Mounassi Amont (2017)	Bc	33
Mounassi Amont (2019)	Bc	27
Monoun Njindoun (2017)	Bc	30
Monoun Njindoun (2019)	Bc	30
Memom (2017)	Bc	30
Memom (2019)	Bc	31
Sangmelima (2017)	Bc	30
Sangmelima (2019)	Bc	30
Monou II (2017)	Bc	30
Monou II (2019)	Bc	15
Ngoa Ekellé (2017)	Bp	32
Ngoa Ekellé (2019)	Bp	30

N= nombre d'individus examinés ; Bc= *Biomphalaria camerunensis* ; Bp= *Biomphalaria pfeifferi*.

Le Tableau XIX contient les valeurs des effectifs efficaces (N_e) estimées à partir de la méthode basée sur les déséquilibres de liaison. Les valeurs moyennes de N_e sont de 3,08 et 1,25 respectivement chez *Biomphalaria camerunensis* et *Biomphalaria pfeifferi* (la valeur infinie n'a pas été prise en compte dans le calcul de la moyenne).

Le Tableau XX contient les valeurs des effectifs efficaces et du taux de migration de chaque population, estimés à partir du maximum de vraisemblance. Les moyennes de N_e sont

respectivement de 16,131 et 0 chez *B. camerunensis* et *B. pfeifferi*, avec un taux de migration presque nul.

Les moyennes des effectifs efficaces ont varié dans les différentes régions en fonction de la méthode utilisée :

- au Centre, *Ne* a varié de 1 à 14,44 chez *B. camerunensis* (la population de Kédé aval a présenté le plus grand effectif efficace : 54,25) et de 1,25 à 0 chez *B. pfeifferi* ;
- à l'Ouest, *Ne* a varié de 3,3 à 23,71 chez *B. camerunensis*, avec un effectif efficace plus grand à Monoun Njindoun (94,82) ;
- au Sud, *Ne* a varié de 0,6 à 1,065 chez *B. camerunensis* ;
- à l'Est, *Ne* a varié de 7,75 à 3,3 chez *B. camerunensis*.

Tableau XIX : Effectifs efficaces (*Ne*) estimés par les déséquilibres de liaison

Région (espèces)	Echantillon (année de collecte)	<i>Ne</i>	IC à 95%
Centre (Bc)	Kédé Aval (2017)	∞	$[\infty ; \infty]$
	Kédé Aval (2019)	2,1	$[0 ; \infty]$
	Mounassi Amont (2017)	0,7	$[0,3 ; 1,6]$
	Mounassi Amont (2019)	1,2	$[0,1 ; 24,7]$
Ouest (Bc)	Monoun Njindoun (2017)	1,7	$[0,8 ; 4,6]$
	Monoun Njindoun (2019)	7,4	$[0,8 ; \infty]$
	Memom (2017)	3,1	$[1 ; 21,5]$
	Memom (2019)	1	$[0,6 ; 1,7]$
Sud (Bc)	Sangmelima (2017)	0,5	$[0,2 ; 0,8]$
	Sangmelima (2019)	0,7	$[0,4 ; 1,4]$
Est (Bc)	Monou II (2017)	2	$[1,1 ; 4,9]$
	Monou II (2019)	13,5	$[1,7 ; \infty]$
Centre (Bp)	Ngoa Ekellé (2017)	1,2	$[0 ; 43,2]$
	Ngoa Ekellé (2019)	1,3	$[0,6 ; 2,7]$

∞ = Infini ; *Ne* = effectif efficace ; IC = intervalle de confiance ; Bc = *Biomphalaria camerunensis* ; Bp = *Biomphalaria pfeifferi*.

Tableau XX : Effectifs efficaces et taux de migration estimés par la méthode du maximum de vraisemblance

Région (espèces)	Echantillon (Année de collecte)	Ne	IC à 95%	m	IC à 95%
Centre (Bc)	Kédé Aval (2017)	54,25	[6,82 ; ∞]	0,0014	[- ; 0,016]
	Kédé Aval (2019)	∞	[8,32 ; ∞]	-	[- ; 0,011]
	Mounassi Amont (2017)	0	[0 ; 7,29]	-	[0,023 ; -]
	Mounassi Amont (2019)	3,52	[0 ; ∞]	0,017	[- ; -]
Ouest (Bc)	Monoun Njindoun (2017)	0	[0 ; 3,07]	-	[0,0705 ; -]
	Monoun Njindoun (2019)	94,82	[4,70 ; ∞]	0,002	[- ; 0,045]
	Memom (2017)	∞	[3,76 ; ∞]	-	[- ; 0,060]
	Memom (2019)	0	[0 ; 0]	-	[- ; -]
Sud (Bc)	Sangmelima (2017)	0	[0 ; 0]	-	[- ; -]
	Sangmelima (2019)	2,13	[0 ; 10,70]	0,124	[0,178 ; -]
Est (Bc)	Monou II (2017)	0	[0 ; 3,01]	-	[-0,178 ; -]
	Monou II (2019)	6,59	[0 ; ∞]	0,056	[- ; -]
Centre (Bp)	Ngoa Ekellé (2017)	∞	[35,02 ; ∞]	-	[- ; 0,003]
	Ngoa Ekellé (2019)	0	[0 ; ∞]	-	[- ; -]

Bc = *Biomphalaria camerunensis* ; Bp = *Biomphalaria* ; Ne = effectif efficace ; IC = intervalle de confiance ; - = Non applicable ; ∞ = Infini ; m = taux de migration

III-2- Discussion

III-2-1- Niveau d'infestation des *Biomphalaria* spp. par les schistosomes

Nous avons noté dans certaines populations de *B. camerunensis* des cas d'émission de monocercaires, semblables aux larves d'échinostomes, étant donné leur morphologie. Nos études corroborent celles de Mvogo Ndongo (2012). Une identification moléculaire de ces monocercaires à l'aide d'amorces spécifiques, permettrait de dire spécifiquement à quelle espèce elles appartiennent.

Nous n'avons pas observé d'émission de furcocercaires ; Ripert *et al.* (1978) n'avaient pas non plus observé de mollusques en émission de furcocercaires à Mounassi, et avaient dû recourir à la dissection pour observer 2 planorbes sur 139 hébergeant des furcocercaires à l'état naturel. Ce

faible pourcentage de mollusques parasités et l'absence de furcocercaires dans notre étude pourraient être dus à la faible intensité de parasites circulant dans les localités où les mollusques ont été collectés ou alors à la faible sensibilité de la technique utilisée pour mettre en évidence ces parasites. En effet, Hamburger *et al.* (1991) avaient déjà fait recours aux techniques moléculaires pour détecter la présence de *Schistosoma mansoni* (souche égyptienne) chez l'espèce *Biomphalaria glabrata* en condition expérimentale. Ces techniques moléculaires sont couramment utilisées au Cameroun pour mettre en évidence des parasites dans d'autres groupes d'organismes ; à l'instar de l'identification des trypanosomes chez les glossines (Melachio Tanekou, 2018 ; Tchouomene Labou, 2020).

III-2-2- Taxons de *Biomphalaria* spp. identifiés

III-2-2-1- Identification morphologique

Biomphalaria camerunensis et *Biomphalaria pfeifferi* sont les deux hôtes intermédiaires connus de *Schistosoma mansoni* au Cameroun (Samè Ekobo, 1984 ; Greer *et al.*, 1990). De nombreuses autres études sur l'identification de ces espèces au Cameroun se sont principalement basées sur l'électrophorèse des iso-enzymes et n'ont pas mis l'accent sur les caractéristiques conchyliologiques qui pourraient aider à différencier les deux espèces (Mimpfoundi, 1990 ; Mimpfoundi et Greer, 1990).

Les caractéristiques conchyliologiques des mollusques sont souvent utilisées pour différencier les populations ou les espèces du même genre (Sesen, 2004). Les coquilles de pulmonés d'eau douce offrent un grand nombre de caractères utiles à la taxonomie et à l'identification des espèces (Mandahl-Barth, 1962).

Les coquilles des deux espèces sont discoïdes, les individus matures ayant quatre à cinq tours de spire et présentant des stries à leur surface. Ces stries pourraient sûrement représenter le modèle de croissance de la coquille. La variation de la couleur de la coquille du brun clair au brun foncé pourrait être due à la nature du substrat dans lequel les mollusques ont été récoltés car Brown (1980 ; 1994) avait remarqué qu'elle pouvait être liée à des facteurs écologiques même si des facteurs génétiques sont également impliqués (Urabe, 2000).

Les populations de mollusques du quartier Italie et de Ngoa Ekélle semblaient plus petites en taille et en largeur par rapport aux autres populations de la présente étude. L'ouverture de la coquille était en moyenne plus large dans les populations de *B. camerunensis* de Monou II, Kédé

et Mounassi (mais l'ouverture la plus large a été observée sur un coquillage appartenant à la population de Sangmélina). Ces populations présentaient également des coquilles plus grosses en termes de largeur de coquille ; cela implique que les coquilles plus larges ont des ouvertures plus larges. Ces deux paramètres sont fortement corrélés et semblent croître ensemble.

Le diamètre de l'ombilic (BC), le nombre de tours de spire (NT) et le rapport diamètre maximum de la coquille (AD) / diamètre de l'ombilic n'ont pas varié significativement entre les populations de *B. camerunensis*, mais semblaient différents chez *B. pfeifferi* ; BC et NT étant plus petits et AD/BC plus grands chez ces derniers. La faible variation observée pour le nombre de tours de spire pourrait indiquer que ces mollusques d'eau douce éclosent avec un nombre donné de spire qui ne varie pas tout au long de la vie de l'animal ; la coquille pourrait alors grossir sans augmenter considérablement le nombre de tours de spire. Cela montre que ces paramètres peuvent être utilisés comme caractéristiques clés pour distinguer les deux espèces de mollusque d'eau douce hôtes intermédiaires de *S. mansoni* au Cameroun.

La hauteur et la largeur de l'ouverture de la coquille étaient plus petites dans les populations de *B. camerunensis* de Sangmelima et du Quartier Italie et dans la population de *B. pfeifferi* de Ngoa Ekellé. Malgré le fait que *B. pfeifferi* soit généralement plus petit que *B. camerunensis*, cela peut être lié à l'âge des mollusques collectés.

Pour presque tous les paramètres, les coquilles de *B. camerunensis* du Quartier Italie semblaient différentes des autres populations de la même espèce, mais ressemblaient beaucoup à *B. pfeifferi*. Bien que la petitesse des coquilles du Quartier Italie puisse être due au type de plan d'eau et au substrat dans lequel ces mollusques ont été collectés, cette étude montre que certaines populations de *B. camerunensis* peuvent être identifiées à tort, sur la base des paramètres de la coquille, comme *B. pfeifferi*. Par conséquent, il semble insuffisant de s'appuyer sur la seule analyse conchyliologique pour différencier ces deux espèces.

Comme aucun groupe taxonomique n'a pu être facilement identifié par l'analyse morphométrique de la coquille par Analyse en Composantes Principales, il semblerait qu'il y ait peu ou pas de mesures conchyliques qui pourraient être utilisées pour identifier de façon précise ces espèces. Il reste également difficile d'évaluer la contribution de l'environnement aux variations observées sur les coquilles étudiées.

A partir de ce constat, il serait important d'utiliser souvent l'identification morphologique et l'analyse conchyliologique en complément d'outils d'identification plus précis tels que les techniques de biologie moléculaire.

III-2-2-2- Identification moléculaire

L'identification morphologique des espèces du genre *Biomphalaria* est difficile car leurs coquilles sont très similaires en forme et en couleur. De plus, les caractères morphologiques et anatomiques varient selon les populations comme c'est le cas à Sangmélina et Nkoteng (Peka Sangou, 2011 ; Mvogo Ndongo, 2012).

L'identification des deux espèces de *Biomphalaria* spp. est délicate, mais utile pour l'établissement de données de référence, avant une campagne de lutte antivectorielle. Afin de fournir plus d'outils pour atteindre cet objectif, nous avons conçu un test de diagnostic qui facilitera l'identification morphologique de *B. pfeifferi* et *B. camerunensis* au Cameroun et contribuera à améliorer le contrôle de ces espèces.

III-2-2-2-1- Plan taxonomique

Sur le plan taxonomique, le protocole PCR-RFLP utilisé a clairement distingué l'espèce *B. camerunensis* (profils Bc-HpaII-1 et Bc-HpaII-2) de l'espèce *B. pfeifferi* (profils Bpf-HpaII-1 et Bpf-HpaII-2) comme ce fut le cas pour les espèces de *Biomphalaria* présentes au Brésil (Vidigal *et al.*, 1998). La même technique s'était déjà avérée utile pour l'identification d'autres espèces et complexes d'espèces comme le complexe *Anopheles gambiae* (Fanello *et al.*, 2002). Ce protocole nous a permis d'identifier les individus de la population de Nalassi qui n'ont pas pu l'être par la morphologie car étant une population constituée d'individus de très petite taille, dont la taille la rapprochait à l'espèce *B. pfeifferi* et la forme faisait penser à l'espèce *B. camerunensis*. Ces derniers ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *B. camerunensis*, bien que des études antérieures signalassent la présence de l'espèce *Biomphalaria pfeifferi* dans cette localité (Ripert *et al.*, 1978). Ce résultat fait penser à un remplacement de l'espèce *Biomphalaria pfeifferi* par l'espèce *B. camerunensis*, suscitant ainsi une attention particulière envers cette espèce dont le rôle d'hôte intermédiaire était autrefois négligé (Greer *et al.*, 1990). De plus, la technique PCR-RFLP a révélé une variation intraspécifique, caractérisée par l'apparition de deux ribotypes dans chaque

espèce de *Biomphalaria*. Comme aucun profil intermédiaire n'a été trouvé entre les ribotypes, une investigation plus approfondie est nécessaire pour vérifier leur statut taxonomique (sous-espèce ou variante simple). L'existence d'une variation intraspécifique est en accord avec l'observation d'un polymorphisme élevé dans la sensibilité des populations de *B. camerunensis* à *S. mansoni* (Kengne Fokam *et al.*, 2018). Ce niveau de polymorphisme est attendu chez une espèce alloféconde comme *B. camerunensis* (Kengne Fokam *et al.*, 2016).

L'arbre phylogénétique construit avec les séquences ITS2 a clairement séparé les individus des deux espèces, confirmant ainsi leur divergence ; cependant, au sein de chaque espèce, les deux principales branches apparentées de l'arbre correspondent aux deux profils différents obtenus et sont révélatrices d'une variation intraspécifique. La phylogénie moléculaire a déjà aidé à la classification de plusieurs taxons de mollusques comme les bivalves (Adamkewicz *et al.*, 1997), elle constitue alors une valeur ajoutée pour les études taxonomiques.

III-2-2-2-2- Diversité moléculaire et dynamique des populations

Des études phylogénétiques ont montré que presque tous les haplotypes obtenus au sein de chaque espèce, quelle que soit leur origine géographique, étaient étroitement liés. Parmi les cinq populations de *B. camerunensis*, la population de Monou II présentait la plus grande diversité haplotypique et une faible diversité nucléotidique, ce qui indique une croissance rapide de la population à partir d'une population ancestrale de petite taille. C'est une population au sein de laquelle le temps n'a pas été suffisant pour trouver une forte diversité entre les haplotypes (Salducci *et al.*, 2004).

Les faibles valeurs de H_d et π obtenues dans les populations de *B. pfeifferi* sont indicatives d'un goulot d'étranglement sévère et prolongé ; cependant, d'autres investigations sont nécessaires pour confirmer ces suggestions. De plus, les F_{ST} par paires entre les échantillons des différentes régions étudiées étaient élevées et significatives, ne montrant aucun signe de flux de gènes entre ces populations. Néanmoins, le manque du polymorphisme dans le marqueur génétique utilisé pourrait conduire à une estimation moins précise de ce paramètre. La faible diversité génétique observée dans les populations étudiées pourrait résulter de leur système de reproduction ou de leur écologie ; elle est sévère dans les populations subdivisées avec des variations saisonnières d'abondances (Brown, 1980).

Les faibles tailles effectives des populations et les fluctuations régulières de leurs densités pourraient contribuer grandement à la perte de variabilité génétique des populations à habitats subdivisées comme celles des *Biomphalaria* (Selander, 1976).

Les valeurs positives des tests de neutralité du D de Tajima et du F_s de Fu montrent que toutes les populations étudiées ne sont pas actuellement en expansion. Ces informations montrent que la lutte antivectorielle effectuée maintenant entraînerait une diminution rapide de la densité de populations de *Biomphalaria* spp., mais d'autres études utilisant d'autres marqueurs polymorphes nucléaires ou mitochondriaux sont nécessaires pour fournir des paramètres démographiques plus précis.

III-2-3- Génétique des populations de *Biomphalaria* spp., révélée par les marqueurs ADN microsatellites

III-2-3-1- Amplification des loci microsatellites utilisés

Huit loci microsatellites ont permis d'étudier la structure génétique des populations de *Biomphalaria* spp. ; notons que sept couples d'amorces suffisent pour une étude de génétique des populations (De Meeûs, 2012). Les amorces qui ont permis l'amplification de ces séquences microsatellites avaient été développées et utilisées pour les espèces *Biomphalaria glabrata* d'une part et *Biomphalaria pfeifferi* d'autre part (Jones, 1999 ; Charbonnel *et al.*, 2002).

La grande sensibilité obtenue lors de l'amplification de ces séquences d'ADN microsatellites témoigne d'une très bonne conservation des zones flanquant ces microsatellites, chez plusieurs espèces de *Biomphalaria* ; par ailleurs le défaut d'amplification de certains spécimens de *Biomphalaria* spp. au cours de notre étude témoigne de la présence d'un polymorphisme dans cette zone de fixation des amorces, chez certains individus ; ce polymorphisme, empêche la fixation des amorces et donc, l'amplification de la séquence d'ADN microsatellite concernée donnant lieu ainsi à la formation de l'allèle dit « nul ». Les locus étudiés ont présenté deux à cinq allèles, ce qui corrobore les résultats de Tian-Bi *et al.* (2013) qui avaient utilisé les mêmes marqueurs chez l'espèce *Biomphalaria pfeifferi* en Côte d'Ivoire.

II-2-3-2- Diversité génétique des populations de *Biomphalaria* spp. et hétérozygotie observée

Les loci microsatellites utilisés ont montré un niveau de variabilité relativement faible au

sein des populations des deux espèces étudiées. Cette faible variabilité confirme le résultat obtenu avec le marqueur ITS2 utilisé plus haut et ceci pourrait se justifier par le système de reproduction mixte (auto-allofécondation) et de l'écologie des *Biomphalaria* spp. (Charbonnel *et al.*, 2000 ; Campbell *et al.*, 2010). De plus, les populations de mollusques d'eau douce connaissent également des cycles de sécheresse et d'inondation, dont l'amplitude dépend des caractéristiques de l'habitat. La stochasticité environnementale peut entraîner des goulots d'étranglement et des extinctions répétés (Städler et Jarne, 1997 ; Keller et Douglas, 2008) ; ce qui réduit considérablement la diversité génétique au sein d'une population. Le niveau de diversité génétique observé au sein des populations de *Biomphalaria* spp. du grand sud Cameroun est relativement faible (avec des valeurs moyennes de 0,289 et de 0,192 respectivement dans les populations de *B. camerunensis* et celles de *B. pfeifferi*), comparé à la valeur 0,83 obtenue par Charbonnel *et al.* (2000) chez l'espèce *B. pfeifferi* de Madagascar en utilisant les mêmes marqueurs, probablement dû à l'histoire évolutive différente de ces populations de *Biomphalaria* spp. Ce faible niveau de diversité génétique des marqueurs microsatellites est largement supérieur à ceux enregistrés par Mimpfoundi (1990) (0,0179 chez *B. camerunensis* et 0,0051 chez *B. pfeifferi*) en utilisant les isoenzymes sur les mêmes espèces au Cameroun. Les valeurs moyennes de l'hétérozygotie observée (0,075 et 0,053 respectivement pour *B. camerunensis* et *B. pfeifferi*) montrent toutes un déficit en hétérozygotes. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Mimpfoundi (1990) chez *B. camerunensis* (0,011) et chez *B. pfeifferi* (0,002).

Les valeurs du coefficient de consanguinité F_{IS} estimées (F_{IS} moyen : 0,742 et 0,726 respectivement pour *B. camerunensis* et *B. pfeifferi*) ainsi que les valeurs du taux d'autofécondation (s moyen : 0,857 pour *B. camerunensis* et 0,793 pour *B. pfeifferi*) ont été positives et largement supérieures à 0 dans presque toutes les populations étudiées ; le système de reproduction pourrait avoir favorisé ces fortes valeurs. En effet, l'autofécondation réduit l'hétérozygotie simultanément à tous les loci polymorphes contrairement à la présence d'allèles nuls ou la dominance de l'allèle court qui dépendraient des locus affectés. Ces résultats sont en accord avec ceux des études précédentes chez d'autres populations de *Biomphalaria* spp. à l'aide de marqueurs isoenzymatiques (Bandoni *et al.*, 1990 ; Mimpfoundi et Greer, 1990), et microsatellites (Charbonnel *et al.*, 2002a). Un taux élevé d'autofécondation réduirait la diversité génétique lorsque le système de reproduction est le facteur le plus important affectant la taille effective des populations (Charbonnel *et al.*, 2002a). Dans notre étude, les valeurs du F_{IS} ont

révélé une variation significative entre les populations étudiées, suggérant une fois de plus que le système de reproduction et l'écologie pourraient être à l'origine du faible niveau de variabilité génétique observé. Les investigations menées pour rechercher l'origine de ce déficit en hétérozygotes ont en général été en faveur de la dominance des allèles courts ; ce phénomène plus connu dans le cas des ADN minisatellites (Batanian *et al.*, 1990 ; Deka *et al.*, 1992 ; Armour *et al.*, 1996) a été également observé avec les loci microsattellites chez la tique *Ixodes scapularis* (De Meeûs *et al.*, 2019). Notons que la dominance des allèles courts peut survenir plus ou moins fréquemment en fonction du modèle biologique étudié (Wattier *et al.*, 1988 ; De Meeûs *et al.*, 2004). La logique étant que si par un mécanisme qui reste à mettre en évidence, une compétition pour la *Taq* polymérase existe au cours de la PCR, entre les deux portions d'ADN correspondant aux deux allèles d'un même locus devant être amplifiés, alors il semble juste que ce soit l'allèle le plus court qui sera le mieux amplifié ; ce qui peut conduire à une mauvaise interprétation des individus hétérozygotes comme homozygotes pour l'allèle le plus court (De Meeûs *et al.*, 2007). Dans le cas de l'étude en cours, cela peut être dû au fait que les amorces utilisées soient synthétisées pour des espèces phylogénétiquement proches de *B. camerunensis*, chez qui on ne s'attendrait pas à avoir un déficit en hétérozygotes car étant une espèce préférentiellement alloféconde. Ou encore au fait que la concentration en ADN soit trop faible pour l'amplification (Chapuis et Estoup, 2007) et aussi aux conditions environnementales qui ne sont pas les mêmes pour *B. pfeifferi*. Ce résultat montre que les populations de *Biomphalaria* spp. en étude seraient donc en équilibre de Hardy Weinberg. La variabilité génétique a été très réduite dans les populations de *B. camerunensis* et celles de *B. pfeifferi* étudiées dans le cadre de ce travail, confirmant les résultats obtenus dans les populations de *B. pfeifferi* de Madagascar (Charbonnel *et al.*, 2002a ; 2002b) et celles de la Côte d'Ivoire (Tian-Bi *et al.*, 2013). Le dendrogramme montre une nette divergence entre les deux espèces et aussi que la distance génétique entre les sous-populations de *B. camerunensis* étudiées est relativement faible, car il s'agit bien des individus appartenant à la même espèce. Toutefois, les différenciations entre les échantillons ne sont pas significativement corrélées avec la distance géographique qui existe entre les sites de récolte des populations de *Biomphalaria* spp. En fait, tout se passe comme s'il n'y avait pas d'échange des migrants entre les différents sites échantillonnés ou si cet échange était rare et se produisait de façon très aléatoire.

Les résultats obtenus indiquent que les populations des deux espèces ne proviennent pas d'un seul ascendant. En effet, elles sont proches sur le plan géographique mais elles semblent différenciées sur le plan génétique (Prugnolle *et al.*, 2005). Ce dernier point suggère que la dispersion des individus de *Biomphalaria* spp. constituant une population serait très limitée dans l'espace. Ces résultats ont déjà été observés par plusieurs auteurs chez d'autres espèces de gastéropodes d'eau douce telles que *B. pfeifferi* à Madagascar (Charbonnel *et al.*, 2002a) et *Bulinus truncatus* au Cameroun (Djuikwo, 2011).

Les valeurs de F_{ST} par paires de population de chacune des deux espèces ont été très significatives dans l'ensemble, indiquant une structuration très marquée des populations étudiées. Notons qu'une variabilité limitée et une forte différenciation génétique des populations sont des modèles typiques des espèces autofécondes (Jarne, 1995 ; Charlesworth, 2003), comme c'est le cas chez *Biomphalaria* spp. Cela peut être dû à une taille de population effective plus faible ou encore à un taux de migration effectif très faible lorsque la migration se produit au stade diploïde (Jarne, 1995 ; Charlesworth, 2003).

Nous avons obtenu un fort déficit en hétérozygotes, nous avons travaillé uniquement avec les méthodes indépendantes de l'hétérozygotie. Le calcul de la taille effective d'une population donnée (N_e) permet de résumer les effets de la dérive génétique et aussi 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 (Hartl et Clarck, 1997). Les valeurs moyennes de N_e basée à la fois sur le déséquilibre de liaison (3,08 et 1,25 respectivement chez *B. camerunensis* et *B. pfeifferi*) et sur le maximum de vraisemblance (16,131 et 0 respectivement chez *B. camerunensis* et *B. pfeifferi*) dans les populations en étude ont donné des résultats presque similaires. Ces valeurs sont très faibles avec un taux de migration presque nul dans l'ensemble des populations étudiées ; elles sont presque similaires aux valeurs obtenues chez d'autres espèces de gastéropodes au Cameroun comme *Bulinus truncatus* (Djuikwo, 2011) ; ce constat renforce ainsi l'effet de la dérive génétique au sein des populations de *Biomphalaria* spp. Nos résultats diffèrent de ceux obtenus dans certains groupes d'organismes tels que les glossines, chez qui on note de fortes valeurs de taille effective (valeur moyenne de N_e basée sur le déséquilibre de liaison = 714,15) lorsque la taille de la population étudiée est grande (Melachio Tanekou, 2018).

**CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSION

Notre travail avait pour objectif de contribuer à la lutte, voire l'élimination des schistosomoses intestinales en améliorant l'identification spécifique des hôtes intermédiaires *Biomphalaria* spp. et en étudiant leur génétique des populations, préalables à l'implémentation d'une lutte antivectorielle efficace.

Bien que l'évaluation morphologique reste le moyen dominant de regroupement et de classification des espèces, l'étude menée ici a montré que l'étude morphométrique seule n'est pas suffisante pour une identification évidente des espèces du genre *Biomphalaria*. L'identification moléculaire basée sur la révélation du polymorphisme des séquences ITS2 de l'ADN ribosomique a permis de distinguer clairement les deux espèces de *Biomphalaria* présentes au Cameroun, caractérisées par des ribotypes absolument différents.

Les loci microsatellites utilisés au cours de cette étude se sont avérés peu polymorphes (2 à 5 allèles par locus). En conséquence, la diversité génétique a été très faible. Malgré l'observation à tous les loci étudiés d'un déficit apparent en hétérozygotes, probablement expliqué par le phénomène de dominance des allèles courts, les populations de *B. camerunensis* ont été considérées comme des entités panmictiques. Les populations de *B. camerunensis* sont apparues très structurées indépendamment des distances génétiques qui les séparent, confirmant le faible effectif efficace et le faible taux de migration connus dans les populations subdivisées à fort taux de fluctuation des effectifs suite aux effets de la sécheresse et des inondations. La divergence génétique élevée entre les populations de *Biomphalaria* pourrait expliquer l'hétérogénéité dans la transmission de la schistosomiase intestinale au Cameroun, surtout dans les foyers où *B. camerunensis* est le principal hôte intermédiaire.

La bonne identification spécifique et la meilleure connaissance des paramètres génétiques et démographiques des populations de *Biomphalaria* spp. sont de bons atouts pour planifier et évaluer la lutte contre ces hôtes intermédiaires de schistosomoses intestinales.

RECOMMANDATIONS

Pour une lutte efficace et durable contre la schistosomiase intestinale au Cameroun, nos recommandations sont à deux niveaux :

Au programme national de lutte

- Prendre en compte la lutte contre les mollusques hôtes intermédiaires dans la stratégie d'élimination des schistosomoses au Cameroun
- Actualiser la carte de distribution des gastéropodes hôtes intermédiaires de schistosomoses au Cameroun, préalable à une lutte antivectorielle efficace.

PERSPECTIVES

Les limites enregistrées lors de nos travaux, nous font penser à :

- identifier d'un point de vue moléculaire les différents trématodes hébergés par les *Biomphalaria* et évaluer le risque de transmission de la schistosomiase intestinale dans les différents foyers ;
- approfondir les études de structure génétique sur un nombre plus important de populations de *Biomphalaria pfeifferi* à l'aide des marqueurs microsatellites ;
- étudier la structure génétique des *Biomphalaria* spp. à l'aide des marqueurs mitochondriaux ;
- actualiser la carte de répartition des mollusques du genre *Biomphalaria* au Cameroun.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A-

- Adams D.C., Rohlf F.J. & Slice D.E. (2004).** Geometric morphometrics: ten years of progress following the ‘revolution’. *Italian Journal of Zoology*, 71: 5–16.
- Adamkewicz S.L., Harasewych G., Blake J., Saudek D., Bult C.J. (1997).** A molecular phylogeny of the Bivalve mollusks. *Molecular Biology and Evolution*. 14: 619–29.
- Aloho-Bekong D., Agbor G., Nkengazong L. (2011).** Oxidative stress in school children co-infection with *Schistosoma mansoni* and soil-transmitted helminths. *Health Science Disease*, 12(3): 109-126.
- Ambroise T.P., Loizzo T., Desgeorges P.T. (1981).** Bilharzioses humaines à *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* et *Schistosoma japonicum*. Sérodiagnostic par ELISA, immunofluorescence et hémmagglutination indirecte. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 61(3) : 379-392.
- ANOFEL. (2011).** Bilharzioses, Ankylostomoses, Ascariidoses. Université numérique francophone des sciences de la santé et du sport, 16p.
- ANOFEL. (2014).** Bilharzioses. *Université Médicale Virtuelle Francophone*.
- Armour J.A.L., Crosier M., Jeffreys A.J. (1996).** Distribution of tandem repeat polymorphism within minisatellite MS621 (D5S110). *Annals of Human Genetics*, 60: 11–20.
- Aubry P. & Gaüzère B.A. (2019).** Schistosomoses ou bilharzioses. Actualités 2022, *Médecine Tropicale*, 10p.
- Azegue A.R. (2016).** Etudes morphologiques sur la population de *Biomphalaria camerunensis* (Boettger, 1941) de Mendibi (Nkoteng-Cameroun). Mémoire de Master, Université de Yaoundé I, 32p.

B-

- Bandoni, S. M., Mulvey, M, Koech, D. K. & Loker, E. S. (1990).** Genetic structure of Kenyan populations of *Biomphalaria pfeifferi* (Gastropoda: Planorbidae). *Journal of Molluscan Studies*, 56: 383-391.
- Batanian J.R., Ledbetter S.A., Wolff R.K., Nakamura Y., White R., Dobyns W.B., Ledbetter D.H. (1990).** Rapid diagnosis of Miller–Dieker, syndrome and isolated lissencephaly sequence by the polymerase chain reaction. *Human Genetics*, 85: 555–559.
- Bonnard P., Kalach N., Candranel J-F., Remoué F., Riveau G., Capron A. (2000).** Manifestations digestives et hépatiques de la bilharziose. In : «Gastroentérologie clinique et biologique», Masson, Paris, France, pp. 409- 419.
- Botstein, D., White, R.L., 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.
- Brooker S., Donnelly C.A., Guyatt H.L. (2000).** Estimating the number of helminthic infections in the Republic of Cameroon from data on infection prevalence in schoolchildren. *Bulletin of the World Health Organisation*, 78: 1456–1465.
- Brookfield J.F.Y. (1996).** A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5: 453–455.
- Brown D. S. (1965).** Freshwater gastropod Mollusca from Ethiopia. *Bulletin of the British Museum, Natural History Zoology*, 12: 37–94.
- Brown D.S. (1980).** Freshwater snails of Africa and their medical importance. Ed 1. London: Taylor & Francis Ltd., 487p.
- Brown D.S. (1994).** Fresh water snails of Africa and their medical importance. 2^{nde} ed. London: Taylor and Francis Ltd.
- Brown D.S. & Christensen T.K. (1993).** A field guide to African freshwater snails. I. West

African species. *Monograph of the Danish Bilharziasis Laboratory, USA*, 55p.

C-

Caldeira R.L., Vidigal T.H.D.A., Paulinelli S.T., Simpson A.J.G., Carvalho O.S. (1998).

Molecular identification of similar species of the genus *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae) determined by PCR-RFLP. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93:219–25.

Caldeira R.L., Vidigal T.H.D.A., Martinela L., Simpson A.J.G., Carvalho O.S. (2000).

Identification of planorbids from Venezuela by polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 171–7.

Campbell G., Noble L.R., Rollinson D., Southgate V.R., Ebster J.P. & Jones C.S. (2010).

Low genetic diversity in a snail intermediate host (*Biomphalaria pfeifferi* Krauss, 1848) and schistosomiasis transmission in the Senegal River Basin. *Blackwell Publishing Ltd*.

Cassidy J.R., Moore D., Lu B.C., Pukkila P.J. (1984). Unusual organization and lack for recombination in the ribosomal RNA genes of *Coprinus cinereus*. *Current genetics*, 8: 607-613.

Cavalli-Sforza L.L., Edwards A.W.F. (1967). Phylogenetic analysis: model and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, 19: 233±257.

Chapuis M.P., Estoup A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 621-631.

Charbonnel N., Angers B., Razatavonjizay R., Bremond P. & Jarne P. (2000). Microsatellite variation in the freshwater snail *Biomphalaria pfeifferi*. *Blackwell Science Ltd, Molecular Ecology*, 9: 993 –1011.

Charbonnel N., Angers B., Rasatavonjizay R., Remond P.B., Debain C., 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., Remond P.B., Debain C., Jarne P. (2002b).** Evolutionary aspects of the metapopulation dynamics of *Biomphalaria pfeifferi*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Evolution and Biology* 15: 248-261.
- Charbonnel N., Quesnoit M., Razatavonjizay R., Bremond P., Jarne P. (2002c).** A spatial and temporal approach to microevolutionary forces affecting population biology in the freshwater snail *Biomphalaria pfeifferi*. *American Naturalist*, 160: 741-755.
- Charbonnel N., Rasatavonjizay R., Sellin E., Bremond P., Jarne P. (2005).** The influence of genetic factors and population dynamics on the mating system of the hermaphroditic snail *Biomphalaria pfeifferi*. *Oikos*, 108: 283-296.
- Charlesworth D. (2003).** Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. *Philosophical Transactions for the Royal Society of London: Biological Sciences*, 358: 1051–1070.
- Charlesworth D. & Charlesworth B. (1987).** Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual & Review of Ecology and Systematic*, 18: 237-268.
- Charlesworth D. & Charlesworth B., (1999).** The genetic basis of inbreeding depression. *Genetic Research*, 74: 329-340.
- Cheesbrough B.W.H.M. (1991).** ELBS with Tropical Health Technology 2nd ed. 1: 605-606.
- Clement M., Posada D., Crandall K. (2000).** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657–60.
- 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.
- Cucherat X. & Demuynck S. (2008).** Les plans d'échantillonnage et les techniques de prélèvements des mollusques continentaux. *Journal électronique de la malacologie continentale française*, 5 : 244-253.

D-

- Dazo B.C. (1984).** Vector control of snail-mediated human trematode infections. *Drug Research*, 34: 1234-1236.
- Deka R., De Croo S., Yu L.M., Ferrell R.E. (1992).** Variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphism at locus D17S5 (YNZ22) in four ethnically defined human populations. *Human Genetics*, 90: 86–90.
- De Meeûs T. (2012).** Initiation à la génétique des populations naturelles, Application aux parasites et à leurs vecteurs. *IRD éditions, collection Didactiques*, Marseille, France, 338p.
- De Meeûs T., Chan C.T., Ludwig J.M., Tsao J.I., Patel J., Bhagatwala J. and Beati L. (2019).** Deceptive combined effects of short allele dominance and stuttering: an example with *Ixodes scapularis*, the main vector of Lyme disease in the U.S.A.
- De Meeûs T. & Goudet J. (2007).** A step-by-step tutorial to use HierFstat to analyse populations hierarchically structured at multiple levels. *Infection, Genetics and Evolution* 7: 731–735.
- 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: 443-10.
- De Meeûs T., Humair P.F., Grunau C., Delaye C., Renaud F. (2004).** Non-Mendelian transmission of alleles at microsatellite loci: an example in *Ixodes ricinus*, the vector of Lyme disease. *International Journal of Parasitology*, 34: 943-950.
- De Meeûs T., McCoy K.D., Prugnolle F., Chevillon C., Durand P., Hurtrez-Boussès S. (2007).** Population genetics and molecular, epidemiology or how to “debusquer la bête”. *Infection, Genetics and Evolution*, 7: 308-332.
- Dejong R.J., Morgan J.A., Paraense W.L., Pointier J.P., Amarista M., Ayeh-Kumi P.F. et al. (2001).** Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda:

Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Molecular Biology and Evolution*; 18: 2225–39.

Deschiens R., Delas A., Poirier A., Galle Edimo N. (1968). La bilharziose à *Schistosoma intercalatum* au Cameroun (note préliminaire). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 61 : 222-223.

Dieringer D., Schlötterer C. (2003). Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*, 3: 167-169.

Djuikwo Nouboué F.F. (2011). *Bulinus globosus* et *B. truncatus* (Gastropoda : Planorbidae) : variabilité génétique et implications dans la transmission de *Schistosoma haematobium* au Cameroun. Thèse de Doctorat/Ph.D, Université de Yaoundé I, 152p.

Do C., Waples R.S., Peel D., Macbeth G.M., Tillett B.J., Ovenden J.R. (2014). NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*, 14: 209–214.

Doyle D., Gammell M.P., Nash R. (2018). Morphometric methods for the analysis and classification of gastropods: a comparison using *Littorina littorea*. *Journal of Molluscan Studies*, 84: 190-197.

E-

El Mousadik A., Petit R. J. (1996). High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) skeels] endemic to morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 832-839.

Ellegren H. (2000). Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nature Genetics*, 24 (4): 400-402.

Ellegren, H. (2004). Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5: 435-445.

Escobar S.J., Auld J.R., Correa A.C., Alonso A.C., Bony Y.K., Coutellec M-A., Koene J.M., Pointier J.P., Jarne P., David P. (2011). Patterns of mating-system evolution in hermaphroditic animals: correlations among selfing rate, inbreeding depression, and the timing of reproduction. *Evolution*, 65(5): 1233–53.

Essomba A. (2013). Epidémiologie des schistosomoses et des géohelminthes dans quelques foyers de transmission de la région du centre. Mémoire de Master, Université de Yaoundé I. 51p.

F-

Fadilatou Foule B. (2019). Compatibilité expérimentale des populations de *B. camerunensis* à *S. mansoni* au Cameroun. Mémoire de Master II en Biologie des Organismes Animaux Option : Parasitologie, Université de Yaoundé I, 63p.

Fanello C., Santolamazza F., Della Torre A. (2002). Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Medical and Veterinary Entomology*, 16: 461–4.

Frandsen F. (1979b). Discussion of the relationships between *Schistosoma* and their intermediate hosts. Assessment of the degree of host-parasite compatibility and evaluation of schistosome taxonomy. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 58: 275- 296.

G-

Golvan Y.J. (1983). Eléments de parasitologie médicale : schistosomiasés. *Ed Flammarion*, 4ème édition, 160-188.

Gonzalez P-L. (2015). Cours sur l'Analyse en Composantes Principales (ACP) , 37p.

Goudet J., Raymond M., De Meeüs T., Rousset F. (1996). Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*, 144: 1933–1940.

Goudet J. (2003). Fstat (version 2.9.4), a program (for Windows 95 and above) to estimate and test population genetics parameters. Updated from Goudet (1995).

Goudet J. (2005). HIERFSTAT, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5: 184–186.

Greer G.J., Mimpfoundi R., Malek A.E., Joky A., Ngonseu E., Ratard R.C. (1990). Human schistosomiasis in Cameroon II. Distribution of the snail hosts, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42(6): 573-580.

H-

Haggag S.H. and El-Sherbiny M. (2006). Molecular markers associated with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in the *Biomphalaria glabrata* snails. *Biotechnology*, 5(4): 404-412.

Hall TA. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Serie*, 4: 95–8.

Hamburger J., Turetski T., Kapeller I., Deresiewicz R. (1991). Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species-specific probe. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 44: 73 – 80.

Hanelt B., Brant S., Steinauer M., Maina G., Kinuthia J., Agola L. et al. (2009). *Schistosoma kisuamuensis* n. sp. (Digenea: Schistosomatidae) from murid rodents in the Lake Victoria Basin, Kenya and its phylogenetic position within the *S. haematobium* species group. *Parasitology*, 136(9) : 987-1001.

Hartl D.L. (1980). Principles of Population Genetics. *Sinauer Associates, INC Publishers, Sunderland, Massachusetts.*

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

Hill W.G. (1981). Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetics Research*, 38: 209–216.

Holsinger K.E. (2000). Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 7037-7042.

Hurlbert S.H. (1971). The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology*, 52: 577-586.

J-

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 Ecology Evolution and Systematics*, 24: 441-466.

Jarne P. & Lagoda J.L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecology Evolution* 11(10): 128-144.

Jarne P., Pointier J.P., David P., Koene J.M. (2010). Basommatophoran Gastropods. In A Cordoba-Aguilar and J. L. Leonard, Eds. The evolution of primary sexual characters in animals. Oxford Univ. Press, New York, 173–196.

Jones C.S., Lockyer A.E., Rollinson D., Piertney S.B. and NOBLE L.R. (1999). Isolation and characterization of microsatellite loci in the freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. Blackwell Science Ltd, *Molecular Ecology*, 8: 2141–2152.

Jukes T.H., Cantor C.R. (1969). Evolution of protein molecules. In: Munro HN, editor. Mammalian protein metabolism. New York: Academic Press, p. 21–132.

K-

Kalinowski S. T. (2002). Evolutionary and statistical properties of three genetic distances. *Molecular Ecology*, 11: 1263-1273.

Kane R.A. & Rollinson D. (1994). Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheei*. *Molecular Biochemistry and Parasitology*, 63: 153–6.

- Katz N., Coelho P. M. Z., Pellegrino J. (1970).** Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human faeces. *Journal of Parasitology*, 56: 1032-1033.
- Keller S.R., Douglas R.T. (2008).** History, chance and adaptation during biological invasion: separating stochastic phenotypic evolution from response to selection. *Ecology Letters*, 11: 852–866.
- Kengne A.C. (2019).** Biologie et compatibilité à *Schistosoma mansoni* Sambon, 1909 de *Biomphalaria pfeifferi* (Krauss, 1848) et *Biomphalaria camerunensis* (Boettger, 1941) au Cameroun. Thèse de Doctorat/Ph.D, Université de Yaoundé, 132p.
- Kengne-Fokam A.C., Nana-Djeunga H.C., Djuikwo-Teukeng F.F., Njiokou F. (2016).** Analysis of mating system, fecundity, hatching and survival rates in two *Schistosoma mansoni* intermediate hosts (*Biomphalaria pfeifferi* and *Biomphalaria camerunensis*) in Cameroon. *Parasites and Vectors*, 9, 10.
- Kengne-Fokam A.C., Nana-Djeunga H.C., Bagayan M. & Njiokou F. (2018).** *Biomphalaria camerunensis* as a viable alternative intermediate host for *Schistosoma mansoni* in southern Cameroon. *Parasites and vectors*, 11, 181.
- Kiarie N. P. (2009).** Evaluation of passive immunity to schistosomiasis in mice transfused with hyper-immune baboon serum. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the award of the degree of Master of Science (medical biochemistry) of Kenyatta University, 84p.
- Knight M., Brindley P.J., Richards C.S., Lewis F.A. (1991).** *Schistosoma mansoni*: use of a cloned ribosomal RNA gene probe to detect restriction fragment length polymorphisms in the intermediate host *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology*, 73: 285–94
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. (2016).** MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870–4.
- L-**
- Lamotte M. (1967).** *Initiation aux méthodes statistiques en biologie*. Masson et Cie, 144p.

- Lechat P., Calvo F., De Cremoux P., Giroud J.P., Lagier G., Lechat P., Rouveix B., Weber S. (1990).** Pharmacologie médicale. *Masson*, 222p.
- Letouzey M. (1985).** Notice sur la carte phytogéographique du Cameroun au 1: 500000. Document NRA (Herbier National) Yaoundé, Cameroun, I.C.I.V Toulouse, France.
- Levinson G. & Gutman G.A. (1987).** Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 4 : 203-221.
- Lévêque Christian (1980).** Flore et faune aquatiques de l'Afrique Sahélo-soudanienne : tome Paris : ORSTOM, (44), 389 : 283-305.
- Librado P, Rozas J. (2009).** DNASP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451–2.
- Long E.O. & Dawid I.B. (1980).** Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, 49: 727-764.
- Loreau M. & Baluku B. (1987).** Population dynamics of the freshwater snail *Biomphalaria pfeifferi* in eastern Zaire. *Journal of Molluscan Studies*, 53: 249–265.
- M-**
- Madsen H. (1984).** The effect of water conditioned by either *Helisoma duryi* or *Biomphalaria camerunensis* on the growth and reproductive of juvenile *B. camerunensis* (Pulmonata, Planorbidae). *Journal of Applied Ecology*, 21: 757-772.
- Mandahl-Barth G. (1957).** Intermediate hosts of *schistosoma*. African *Biomphalaria* and *Bulinus*. II. *Bulletin of the World Health Organization*, 17(1): 1-65.
- Mandahl-Barth G. (1958).** Intermediate hosts of *schistosoma*. African *Biomphalaria* and *Bulinus*. *Bulletin of the World Health Organization*, 22: 265-273.

- Mandahl-Barth G. (1962).** Key to the Identification of East and Central African Freshwater Snails of Medical and Veterinary Importance. *Bulletin of the World Health Organization*, 27:135-150.
- Mandahl-Barth G. (1973).** Description of new species of African freshwater mollusks. *Proceedings of the Malacological Society London*, 40: 277-286.
- Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. (1982).** Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, New York.
- Mantel N. (1967).** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27 : 209-220.
- Mazeufouo C. (2010).** Situation de la schistosomose dans les environs de la mare de l'ex-carrière de Ngoa-Ekellé (Yaoundé). Mémoire de Master, Université de Yaoundé I. 52P.
- Mazigo H.D., Waihenya R., Mkoji G.M., Zinga M., Ambrose E.E., Jahanpour O.F., Bahemana E., Mnyone L.L., Kweka E.J., Lwambo N.J.S. (2010).** Intestinal schistosomiasis: prevalence, knowledge, attitude and practices among school children in an endemic area of North Western Tanzania. *Journal of Rural and Tropical Public Health*, 9: 53–60.
- Mewamba E.M., Tiofack A.A.Z., Kamdem C.N., Ngassam R.I.K., Mbagnia M.C.T., Nyangiri O., et al. (2021).** Field assessment in Cameroon of a reader of POC-CCA lateral flow strips for the quantification of *Schistosoma mansoni* circulating cathodic antigen in urine. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15:e0009569.
- Mélachio Tanékou T.T. (2018).** Structure génétique et compétence vectorielle des populations de *Glossina palpalis palpalis* Robineau-Desvoidy, 1830 dans quelques foyers de trypanosomose humaine africaine du Cameroun. Thèse de Doctorat/Ph.D, Université de Yaoundé I, 130p.
- Mimpfoundi R. (1990).** Variations génétiques intra et inter populationnelles chez les Planorbidae tropicaux : le polymorphisme enzymatique dans les genres *Biomphalaria* (Preston, 1910) et

- Bulinus* (Müller, 1781) au Cameroun. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Yaoundé, 187p.
- Mimpfoundi R. & Greer G.J. (1990a).** Allozyme variation among populations of *Bulinus forskalii* (EHRENBERG, 1831) (Gastropoda: Planorbidae) in Cameroon. *Journal of Molluscan Studies*, 56: 363-371.
- Mimpfoundi R. & Greer J.G. (1990b).** Allozyme variation among populations of *Biomphalaria pfeifferi* (Krauss, 1848) (Gastropoda: Planorbidae) in Cameroon. *Journal of Molluscan Studies*, 56 : 461-467.
- Mimpfoundi R. & Greer J.G. (1990b).** Allozyme variation among populations of *Biomphalaria camerunensis* (Boettger, 1941) (Gastropoda: Planorbidae) in Cameroon. *Journal of Molluscan Studies*, 56 : 373-381.
- Mott K.E. (1984).** Schistosomiase : nouveaux objectifs. Santé du monde, Déc., 3-4.
- Moyou Somo R., Kouemini L.E., Ndjamen B., Ngogang J., Dongla R., Longang-Tchatchouang V., Hassimi M. (2003).** A new focus of *Schistosoma mansoni* in Yorro village, Mbam and Inoubou Division, Cameroon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69(1): 74-77.
- Mulvey M. & Vrijenhoek R.C. (1982).** Population structure in *Biomphalaria glabrata*, examination of a hypothesis for the patchy distribution of susceptibility to schistosomes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 31: 1195-1200.
- Mulvey M., Newman M.C. & Woodruff D.S. (1988a).** Genetic differentiation among West Indian populations of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata*. *Malacologia*, 29: 309-317.
- Mvogo Ndongo P. (2012).** Etudes conchyliologiques et génétique des populations de *Biomphalaria camerunensis* (Boettger, 1941) de Minkama. Mémoire de Master en Biologie et physiologie animale option : parasitologie, Université de Yaoundé I.

N-

Nei M. (1987). Molecular evolutionary genetics. New York: Colombia University Press; p. 512.

Ngonseu E., Greer G.J., Mimpfoundi R. (1992). Dynamique des populations de *Bulinus truncatus* et *Bulinus forskalii* par les larves de schistosomes en zone soudano-sahélienne au Cameroun. *Annale de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 72 : 311-320.

Njiokou F. (1992). Génétique et biologie des populations de deux hôtes intermédiaires de Schistosomes à œuf à éperon terminal *Bulinus globosus* Morelet, 1866 et *Bulinus truncatus* Audouin, 1927 ; conséquences épidémiologiques. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, France, 206P.

Njiokou F., Teukeng F., Bilong Bilong C.F., Njiné T. & Samé Ekobo A. (2004). Etude expérimentale de la compatibilité entre *Schistosoma haematobium* et deux espèces de bulins au Cameroun. *Bulletin of the Society of Pathology Exotic*, 97(1): 43-46.

O-

Okeke O.C., Ubachukwu P.O. (2017). Trematode infections of the freshwater snail *Biomphalaria pfeifferi* from a south-east Nigerian community with emphasis on cercariae of *Schistosoma*. *Journal of Helminthology*, 91: 295–301.

OMS (1998). Lutte contre la schistosomiase et les parasitoses intestinales. *Rapport de la consultation informelle de l'OMS sur la lutte contre la schistosomiase* ; Genève, 5 : 2-4.

OMS (2006). Lutte contre les parasitoses Intestinales. *Séries de rapports techniques*, N° 987: 26.

OMS (2013). Schistosomiase (bilharziose). *Aide-mémoire N° 115 Mars 2013*.

P-

Pagès J.R., Jourdane J., Southgate U.R. & Tchuem Tchuente L.A. (2003). Reconnaissance de deux espèces jumelles au sein du taxon *Schistosoma intercalatum* Fisher, 1934, agent de la schistosomose humaine rectale en Afrique. Description de *Schistosoma guineensis n. sp.*

Taxonomie, écologie et evolution des métazoaires parasites. (Livre hommage à Louis EUZET). Tome II. Perpignan France, 139-146.

Peka Sangou M.F. (2011). Etudes conchyliologiques et génétiques dans la population de *Biomphalaria camerunensis* (Boettger, 1941) de Sangmélima. Mémoire de Master II en Biologie et Physiologie Animales option : Parasitologie, Université de Yaoundé I, 41P.

Pereira F., Carneiro J. and Amorin A. (2008). Identification of species with DNA Based Technology: Current Progress and Challenges. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 2: 187-200.

Pires E.R., Vidigal T.H.D.A., Teles H.M.S., Simpson A.J.G., Carvalho O.S. (1997). Specific identification of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria occidentalis* populations by the low stringency polymerase chain reaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92 :101–6.

PNLSHI (2005). Programme National de Lutte contre la Schistosomiase et les Helminthiases intestinales au Cameroun. *Plan stratégique 2005-2010*, 92p.

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 Medicine and Parasitology*, 83: 263-269.

Polman K., Stelma F.F., Gryseels B., Van dam G.J., Talla I., Niang M., Van lieshout L., Deelder A.M. (1995). Epidemiologic application of circulating antigen detection in a recent *Schistosoma mansoni* focus in northern Senegal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53(2): 152-157.

Primmer C.R., Moller A.P. & Ellegren H. (1996a). A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5: 365-378.

Primost M.A., Bigatti G. & Márquez F. (2016). Shell shape as indicator of pollution in marine gastropods affected by imposex. *Marine and Freshwater Research*, 67: 1948–1954.

Prugnolle F., Théron A., Pointier J. P., Jabbour-Zahad R., Jarne P., Durand P., De Meeûs T. (2005). Dispersal in a parasitic worm and its two hosts and its consequences for local adaptation. *Evolution*, 59: 296-303.

R-

Ratard R.C., Koueméni L.E., Ekani Bessala M.M., Ndamkou N.C., Greer G.J., Spilisbury J. & Clivine B.L. (1990). Human schistosomiasis in Cameroon. I. Distribution of schistosomiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42: 561-572.

Raymond M. & Rousset F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.

Rice W.R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223–225.

Richards C.S. & Merritt J.W.Jr. (1972). Genetic factors in susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 21: 425-434.

Richard G.F., Paques F. (2000). Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO Reports*, 1:122-126.

Ripert C., Ambroise-thomas P. & Rousselle-Sauer C. (1978). An epidemiological study of foci of *Schistosoma mansoni* bilharziasis in Minkana and Nalassi (Lekié, Division, Cameroun). *Revue épidémiologique de santé publique*, 26: 403-412. UI: 79158828.

Rohlf F.J. & Marcus L.F. (1993). A revolution morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, 8, 129–132.

Rollinson D. & Southgate V.R. (1989). The genus *Schistosoma*, a taxonomic appraisal. In Rollinson A. et Simpson A.J.G., the biology of *Schistosoma* from gene to latrines. *Academic Press*, 2, 1-49.

Rollinson D., Stothard J.R., Jones C.S., Lockyer A.E. (1998). Molecular characterisation of intermediate snail hosts and the search for resistance genes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 93(1): 111-116.

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

S-

Saitou N., and NEI M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.

Salducci M.D., Martin J., Pech N., Chappaz R., Costedoat C., Gilles A. (2004). Deciphering the evolutionary biology of freshwater fish using multiple approaches - insights for the biological conservation of the Vairone (*Leuciscus souffia souffia*). *Conservation Genetics Ressources*, 5:63–77.

Samè Ekobo A. (1984). Faune malacologique du Cameroun (description, répartition des mollusques dulçaquicoles et foyers des trématodoses humaines). Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Rennes.

Savioli L., Albonico M., Colley D.G., Correa-Oliveira R., Fenwick A., Green W., Kabatereine N., Kabore A., Katz N., Klohe K., Loverde P.T., Rollinson D., Stothard J.R., Tchuem Tchuente L.A., Valse J., Zhou X.N. (2017). Building a global schistosomiasis alliance: an opportunity to join forces to fight inequality and rural poverty. *Infectious Diseases of Poverty*, 6: 65.

Schlötterer C., Ritter R., Harr B. & Brem G. (1998). High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. *Molecular Biology and Evolution*, 15(10): 1269-1274.

Selander R.K. & Ochman H. (1983). The genetic structure of populations as illustrated by mollusks. In: *Isozymes: Current Topics in Biology and Medical Research, Genetic and Evolution*, 10: 93-123.

- Şeşen R.A. (2004).** Study on the Conchological Features of Two Populations of *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Pulmonata) in Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 28: 145-148.
- Sherratt E., Alejandrino A., Kraemer A.C., Serb J.M. & Adams D.C. (2016).** Trends in the sand: directional evolution in the shell shape of recessing scallops (Bivalvia: *Pectinidae*). *Evolution*, 70: 2061–2073.
- Sokolow S.H., Wood C.L., Jones I.J., Swartz S.J., Lopez M., Hsieh M.H., Lafferty K.D., Kuris A.M., Rickards C., De Leo G.A. (2016).** Global Assessment of Schistosomiasis Control Over the Past Century Shows Targeting the Snail Intermediate Host Works Best 10:1371.
- Stallings R.L. (1995).** Conservation and evolution of (CT)_n-(GA)_n microsatellite sequences at orthologous positions in diverse mammalian genomes. *Genomics*, 25: 107-113.
- Standley C.J., Iwambo N.J.S., Lange C.N., Kariuki H.C., Adriko M., Stothard J.R. (2010).** Performance of circulating cathodic antigen (CCA) urine-dipsticks for rapid detection of intestinal schistosomiasis in schoolchildren from shoreline communities of Lake Victoria. *Parasites and Vectors*, 3: 7.
- Städler T. et Jarne, P. (1997).** Population biology, genetic structure, and mating system parameters in freshwater snails. In: Streit, B., Städler, T., Lively, C., *Ecology and evolution of freshwater organisms*. Birkhäuser Verlag, Basel, 231-262.
- Stensgaard A.S., Utzinger J., Vounatsou P., Hürlimann E., Schur N., Saarnak C.F., et al. (2013).** Large-scale determinants of intestinal schistosomiasis and intermediate host snail distribution across Africa: does climate matter? *Acta Tropica*, 128:378–90.
- Stothard J.R., Sousa-Figueiredo J.C., Betson M., Bustinduy A., Reinhard-Rupp J. (2013).** Schistosomiasis in African infants and preschool children: let them now be treated! *Trends Parasitology* 29(4):197–205.
- Suchel J.B. (1987).** Les climats du Cameroun. Thèse Doctorat d'Etat Université Bordeaux III, 1186p.

Sullivan J.T. & Cheng T.C. (1974). Structure and function of the mantle cavity of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata). *Transactions of the American Microscopical Society*, 93:416-420.

Schwartz D. (1983). *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes*. 3^{ème} édition. Flammarion-Medecine, 318p.

T-

Tajima F. (1989). Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–95.

Takezaki N., Nei M. (1996). Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, 144: 389-399.

Takougang Innocent, Tchounwou Paul-Bernard, Philippe Barbazan (1993). Impact des effluents d'un complexe agro-industriel sucrier sur la distribution des mollusques dulçaquicoles à Mbandjock (Cameroun). *Cahiers d'étude et de recherches francophones / Santé*, 3 : 178-82.

Tautz D. (1993). Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. DNA fingerprinting: *State of the sciences*. S.D.J. Pena, R. Chakraborty, J.T. Eppelen & A.J. Jeffreys. Switzerland, *Birkhäuser Verlag Basel*: 21-28.

Tchami Mbagnia M.C. (2015). Prévalence de quelques parasites intestinaux dans deux villages du Département du Mbam et Inoubou, Région du Centre. Mémoire de Master, Université de Yaoundé I. 50p.

Tchouomene Labou J. (2020). Caractérisation génétique des populations de *Glossina palpalis palpalis* (Robineau-Desvoidy, 1830) à l'aide des marqueurs de l'ADN mitochondrial importance dans le développement des stratégies de lutte contre la maladie du sommeil. Thèse de Doctorat/Ph.D, Université de Yaoundé, 113p.

- Tchuem Tchuente L. A., Southgate V. R., Theron A., Jourdane J., LYA. & Gryseels B. (1999).** Compatibility of *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria pfeifferi* in Northern Senegal. *Parasitology*, 118: 595-603.
- Tchuem Tchuente L.A., Kueté Fouodo C.J., Kamwa Ngassam R.I., Sumo L., Dongmo Noumedem C., Kenfack C.M., Feussom Gipwe N., Dankoni Nana E., Russell Stothard J., Rollinson D. (2012).** Evaluation of Circulating Cathodic Antigen (CCA) urine tests for diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in Cameroon. *Plos* volume 6.
- Tchuem Tchuente L.A., Dongmo N.C., Kamwa Ngassam R.I., Kenfack C.M., Feussom G.N., Dankoni E., Tariri A., Zhang Y. (2013).** Mapping of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis in the regions of Littoral, North-West, South and South-West Cameroon and recommendations for treatment. *BMC Infectious Diseases*, 13, 602.
- Tchuem Tchuente L.A., David R., Stothard J.R., David M. (2017).** Moving from control to elimination of schistosomiasis in sub-Saharan Africa: time to change and adapt strategies: time to change and adapt strategies. *Infectious Diseases of Poverty*, 6, 42.
- Théron A., Gérard C. & Moné H. (1992).** Early enhanced growth of the digestive gland of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*: side effect or parasite manipulation? *Parasitology Research*, 78: 445-450.
- Tian-Bi TY-N, Jarne P., Konan KJ-N., Utzinger J., N’Goran (2013).** Contrasting the distribution of phenotypic and molecular variation in the freshwater snail *Biomphalaria pfeifferi*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Heredity*, 110: 466-474.
- Tian-B TY-N., Gbocho Y.F., Coulibaly F.H., Sangare A., N’goran K.E. (2018).** Variation spatiale et temporelle de la susceptibilité de *Biomphalaria pfeifferi*, hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*, Man, ouest Côte d’Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 121: 12181-12191.
- Townsend C.R. (1974).** Mucus trail following by the snail *Biomphalaria glabrata*. *Animal Behavior*, 22(1): 170-7.

Tsitrone A (2001). Conséquences évolutives de la consanguinité : génotype, phénotype, systèmes de reproduction. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II, 99p.

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

U-

Ukwandu N.C., Odaibo A.B., Okorie T.G., Nmorsi O.P.G. (2011). Molluscicidal Effect of *Piper Guineense*. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines* 8(4): 447-451.

Urabe M. (2000). Phenotypic modulation by the substratum of shell sculpture in *Semisulcospira reiniana* (Prosobranchia: Pleuroceridae). *Journal of Molluscan Studies*, 66: 53-59.

V-

Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538.

Vaughan V., Lloyd A. M. (2003). An analysis of microsatellite loci in *Arabidopsis thaliana*: mutational dynamics and application. *Genetics*, 165: 1475-1488

Vera C. (1991). Contribution à l'étude de la variabilité génétique des schistosomes et de leurs hôtes intermédiaires : polymorphisme de la compatibilité entre diverses populations de *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma bovis* et *Schistosoma curassoni* et les bulins hôtes potentiels en Afrique de l'Ouest. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II.

Vera C., Jourdane J., Sellin B. & Combes C. (1990). Genetic variability in the compatibility between *Schistosoma haematobium* and its potential vectors in Niger. *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.
- Vidigal T.H.D.A., Neto E.D., Simpson A.J.G., Carvalho O.S. (1996).** A low stringency polymerase chain reaction approach to identification of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91:739–44.
- Vidigal T.H.D.A., Spatz L., Nunes D.N., Simpson A.J.G., Carvalho O.S., Dias Neto E. (1998).** *Biomphalaria* spp: identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. *Experimental Parasitology*, 89:180–7.
- Vidigal T.H.D.A., Montresor L.C., Simpson A.J.G., Carvalho O.S. (2002).** Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of cytochrome oxidase I used for differentiation Brazilian *Biomphalaria* species intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 47–52.
- Vidigal T.H., Magalhães K.G., Carvalho O.D. (2004).** Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of the ITS2 region for differentiation of Brazilian *Biomphalaria* intermediate hosts of the *Schistosoma mansoni*. *Brazilian Society of Tropical Medicine Review*, 37(4): 351-3.
- Vitalis R., Couvet D. (2001).** Estimation of effective population size and migration rate from one- and two-locus identity measures. *Genetics*, 157, 911-925.
- W-**
- Waples R.S. (2006).** A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conservation Genetics*, 7: 167–184.
- Waples RS, Do C. (2010).** Linkage disequilibrium estimates of contemporary Ne using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolutionary Applications*, 3: 244–262.

- Wattier R., Engel C.R., Saumitou-Laprade P., Valero M. (1998).** Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology*, 7: 1569-1573.
- Webster B.L., Southgate V.R., Littlewood D.T.J. (2006).** A revision of the interrelationships of *Schistosoma* including the recently described *Schistosoma guineensis*. *International Journal of Parasitology*, 36: 947-955.
- Weir B.S. & Cockerham C.C. (1984).** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- WHO. (2006).** Preventive chemotherapy in human helminthiasis: Coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: A manual for health professionals and programme managers. *World Health Organization*, Geneva, 62p.
- WHO. (2015).** Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2013. *Weekly Epidemiological Record*, 90(5): 25–32.
- WHO. (2017).** Field use of molluscicides in schistosomiasis control programmes. An operational manual for programme managers. Geneva: *World Health Organisation*.
- WHO. (2021).** Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: progress report, 2020. *Weekly Epidemiological Record: World Health Organization*, 96 (48): 585 - 596.
- WHO. (2022).** WHO Guideline on Control and Elimination of Human Schistosomiasis. Geneva Switzerland: *World Health Organisation*, 142p.
- WHO. (2023).** Schistosomiasis. Geneva: *World Health Organisation*
- Wolf C, Rentsch J, Hubner P. (1999).** PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1350-1355.
- Wright S. (1931).** Evolution in Mendelian population. *Genetics*, 16: 97-159.

Wright S. (1938). The distribution of gene frequencies in populations of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, 24: 372-7.

Wright C.A. (1965). The freshwater gastropod molluscs of west Cameroon. *Bulletin of the British Museum (National History), Zoology*, 13: 75-98.

Z-

Zehner R, Zimmermann S, Mebs D. (1998). RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. *International Journal of Legal Medicine*, 111: 323-327.

ANNEXES

RESEARCH

Open Access



PCR-based molecular identification of two intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* in Cameroon

Mureille Carole Tchami Mbagnia¹, Tito Trésor Melachio Tanekou^{2,3}, Alvine Christelle Kengne Fokam¹, Daniel Nguiffo Nguete^{2,4}, Charles Sinclair Wondji^{2,5} and Flobert Njiokou^{1,2*}

Abstract

Background: Snails of the genus *Biomphalaria* are intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*, the causative agent of the human intestinal schistosomiasis. Two *Biomphalaria* species (*Biomphalaria pfeifferi* and *Biomphalaria camerunensis*) are involved in the transmission in Cameroon, where the disease is present nationwide. However, difficulty in the identification of both vectors impedes proper assessment of the epidemiological burden caused by each species. To overcome this issue, we designed a PCR-based molecular diagnostic tool to improve the identification of these species.

Methods: We analyzed the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of *Biomphalaria* ribosomal DNA (rDNA) using polymerase chain reaction amplification (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP).

Results: The amplification of the ITS2 region of *Biomphalaria* snails resulted in a 490 bp fragment and produced two profiles for each species after digestion with the restriction enzyme *Hpa* II. The profile 1 (Bc-Hpall-1: 212-bp and 139-bp bands) for *B. camerunensis*, was common in all the sampling points; the profile 2 (Bc-Hpall-2: 212-bp and 189-bp bands), was only observed in the Lake Monoun Njindoun sampling site. *Biomphalaria pfeifferi* profile 1 (Bpf-Hpall-1: 211-bp and 128-bp bands) was common in most of *B. pfeifferi* sampling points; the profile 2 (Bpf-Hpall-2: 289-bp and 128-bp bands) was only observed in Mokolo (Far North Cameroon). The second restriction enzyme *TaqI*, revealed three band profiles, Bc-TaqaI-1 (243-bp, 136-bp and 118-bp bands) and Bc-TaqaI-2 (244-bp, 136-bp and 99-bp) for *B. camerunensis* and Bpf-TaqaI-1 (242-bp, 135-bp and 107-bp bands) for *B. pfeifferi*. Sequencing analysis revealed the occurrence of six haplotypes for *B. camerunensis* and three haplotypes for *B. pfeifferi*. The level of gene flow was low and the *Biomphalaria* populations were not in demographic expansion according to neutrality tests (Tajima's *D* and Fu's *F_s*).

Conclusions: The PCR-RFLP technique revealed genetic diversity in *Biomphalaria* snails, and the combination with the morphological method could improve the identification of *B. pfeifferi* and *B. camerunensis* in Cameroon. This could help focus on the infection to evaluate the transmission risk with respect of the different species and to develop efficient and cost-effective control measures.

Keywords: Molecular taxonomy, *Biomphalaria pfeifferi*, *Biomphalaria camerunensis*, *Schistosoma mansoni*, Vector control, Cameroon

*Correspondence: njiokouf@yahoo.com

¹ Parasitology and Ecology Laboratory, Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Schistosomiasis, a chronic disease caused by trematodes of the genus *Schistosoma*, is an important public health problem in many tropical and subtropical areas of the world [1–3]. Indeed, transmission of schistosomiasis is proven in 78 countries, and in 2018 the total number of people in need of preventive chemotherapy was 229.2 million, of which 124.4 million were school-aged children [4].

In Cameroon in 2009, more than 5 million people were at risk of infection with schistosomiasis, and 2 million were known to be currently infected [5]. Intestinal schistosomiasis is the most widely distributed type of schistosomiasis in the equatorial area. This type is caused by the presence in the intestinal vascular system of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. The Cameroon National Control Programme against schistosomiasis has adopted a periodic large-scale deworming campaign using praziquantel, associated with health education, as control measures. This strategy has considerably reduced morbidity and mortality levels among affected populations. However, most of the old foci remain active, and new foci are observed, likely due to the migration of the infected individuals from endemic areas to schistosomiasis free sites where intermediate hosts are present [6–9]. To overcome this situation and accelerate the progress towards elimination, the Cameroon strategic plan was revised, including the implementation of other control measures such as: (i) access to clean water; (ii) sanitation improvement; and (iii) control of intermediate host populations [10, 11]. This latter control approach requires a better understanding of the distribution, biology and population dynamics of intermediate hosts of schistosomes.

In Cameroon, *S. mansoni* transmission involves two snail species, *Biomphalaria camerunensis* (Boettger, 1941) that has also been recorded in central Africa (from Ghana at the West to the Democratic Republic of Congo at the East) [11, 12] and *Biomphalaria pfeifferi* (Krauss, 1848) that is also present throughout sub-Saharan Africa and also in one country in North Africa (Algeria) [12]. *Biomphalaria pfeifferi* is widely distributed throughout the country and is known as the main intermediate host of *S. mansoni*. Conversely, *B. camerunensis* has until now only been reported under the 6° north latitude and appears to play a minor role in the transmission of *S. mansoni* [13]. However, recent compatibility studies highlighted a relatively high susceptibility and cercarial emission rate in some *B. camerunensis* populations as high as those observed among *B. pfeifferi*, suggesting that they might play a more important role in the transmission of *S. mansoni* [14].

Biomphalaria pfeifferi and *B. camerunensis* are very similar morphologically, which makes their routine

identification difficult. The last study on the distribution of these snail species in Cameroon was performed nearly 30 years ago and the results are not reflective to the current situation, as there have been significant ecological and human changes in the respective foci. A clear distinction of these *Biomphalaria* spp. snails might help sharpen disease mapping and evaluate the transmission risk in localities where they are found. For many decades, the identification of snail intermediate hosts had been mainly based on the comparison of morphological and morphometric characters of shells [15–17]. Although the shell morphology remains an important taxonomic instrument [18, 19], studies employing alternative tools such as molecular identification seem to be more accurate for closely related species [20–25]. In the last two decades, molecular tools have been evaluated for both snail identification and phylogenetic studies [26–29]; the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region of rDNA and the analysis of cytochrome *c* oxidase subunit 1 region of mitochondrial DNA have proven to be cheaper and powerful for the identification of several *Biomphalaria* species [30–35]. More recently, the PCR-RFLP technique has been used to distinguish *Biomphalaria* species in Brazil and it appears to be an alternative molecular tool to their morphological identification [36].

The aim of this study was to test the efficiency of the PCR-RFLP protocol developed for identification of *Biomphalaria* species in South America [34, 36], for the separation of the two main *Biomphalaria* spp. currently found in Cameroon. Furthermore, sequencing of rDNA fragments enabled us to assess the genetic diversity and population structure of both species in Cameroon.

Methods

Snail sampling sites and collection method

Snail sampling was conducted from July to August 2017 in eighteen sites all located in five administrative Regions of Cameroon: nine sites in the Centre, two in the South, three in the West, two in the East and one in the Far North (Table 1, Fig. 1). Sites mentioned in previous studies were visited [13, 14], while new sites were chosen in additional streams favourable to the survival of molluscs. Snails were collected using a long-handled dip net by systematically combing the aquatic vegetation and identified using morphological criteria previously described by Brown [37]. For each sample, some individuals were taken at random and kept alive for further parasites screening, while others were individually fixed in labelled tubes containing 95% ethanol and transferred to the Parasitology and Ecology Laboratory of the University of Yaoundé I, Cameroon, where they were stored at – 20 °C until processing for molecular studies.

Table 1 Description of different sampling sites

Region	Bioclimatic characteristics	Town	Water collection (n)	Geographical coordinates
Centre	Degraded forest, subequatorial climate	Minkama	Mounassi pond (32 <i>Bc</i>)	4°12'14"N, 11°35'0.2"E
			Yana Messina pool (6 <i>Bc</i>)	4°12'1"N, 11°35'3"E
			Kede River (32 <i>Bc</i>)	4°12'6"N, 11°35'6"E
		Nalassi	Nalassi River (50 <i>Bc</i>)	4°16'49"N, 11°37'58"E
			Nkoteng	Mendibi River (6 <i>Bc</i>)
		Mbandjock	Mengolo River (30 <i>Bc</i>)	4°26'37"N, 11°53'40"E
			Mekono River (34 <i>Bc</i>)	4°27'04"N, 11°54'46"E
		Yaoundé	Afeme River (30 <i>Bp</i>)	3°53'38"N, 11°28'20"E
			Ngoa-Ekellé Lake (30 <i>Bp</i>)	3°51'15"N, 11°30'07"E
South	Dense rain forest, Guinean subequatorial climate	Sangmelima	Bissono River (30 <i>Bc</i>)	2°56'28"N, 11°58'55"E
		Ebolowa	Ebengue River (4 <i>Bc</i>)	2°54'42"N, 11°10'33"E
East	Equatorial forest, subtropical climate	Bertoua	Monou II swamp (30 <i>Bc</i>)	4°34'14"N, 13°41'34"E
			Quartier Italie drain (30 <i>Bc</i>)	4°34'35"N, 13°41'43"E
			Mokolo I swamp (30 <i>Bc</i>)	4°35'18"N, 13°40'48"E
West	Shrub savannah, equatorial climate	Kouoptamo	Koupben River (30 <i>Bc</i>)	5°36'33"N, 10°35'17"E
			Mangoum	Memom River (30 <i>Bc</i>)
		Monoun Njindoun	Monoun Njindoun Lake (32 <i>Bc</i>)	5°34'53"N, 10°35'23"E
Far North	Savannah, tropical Sudan-Sahel climate	Mokolo	Lake (4 <i>Bp</i>)	10°44'00"N, 13°46'4"E

Abbreviations: n, number of snails collected; *Bc*, *Biomphalaria camerunensis*; *Bp*, *Biomphalaria pfeifferi*

DNA extraction

Total DNA was extracted from the foot of 470 *Biomphalaria* snails (around thirty individuals per sampling site) using a cethyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)-based protocol as described by Maniatis et al. [38]. Samples were thawed and air-dried; briefly, each snail foot was homogenized with a pestle in 600 µl of CTAB buffer (CTAB 2%; 0.1 M Tris-HCl, pH 8; 0.02 M EDTA, pH 8; 1.4 M NaCl). The homogenized mixture was incubated at 60 °C for 30 min. After this incubation, the DNA was extracted using 600 µl of chloroform/isoamyl alcohol (24/1; V/V) mixture, and then precipitated with isopropanol (V/V). After a centrifugation at 10,000×g for 15 min, the DNA pellet was washed with 70% ethanol, air-dried, and re-suspended in sterile water. DNA samples were stored at – 20 °C until PCR amplification.

PCR amplification of the ITS2 region of *Biomphalaria* spp

The ITS2 region of *Biomphalaria* spp. was amplified by PCR, using the primers ITS2F (5'-CGT CCG TCT GAG GGT CGG TTT GC-3') [30] and ETTS1 (5'-TGC TTA AGT TCA GCG GGT-3') [39] hybridizing in the conserved areas of the 5.8S and 28S ribosomal genes, respectively. The PCR amplification was undertaken in a final reaction volume of 20 µl containing 2 µl of extracted DNA, 2 µl of TBE PCR buffer (10×), 0.8 µl of each primer (10 µM), 0.4 µl of dNTPs mixture (10 mM), 0.06 µl of *Taq* DNA polymerase (5 U/µl) and 13.94 µl of sterile water. DNA was amplified in

a Techne TC-412 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK) thermal cycler under the following cycling conditions: initial denaturation at 95 °C for 3 min 30 s, followed by 35 cycles each at 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s, and a final extension step at 72 °C for 10 min. The amplicons were resolved on 2% agarose gels stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

Purification, sequencing and *in silico* RFLP

Purification of some amplified DNA samples was made using the enzymatic PCR clean up method with Exonuclease I (*ExoI*) and shrimp alkaline phosphatase (SAP) (New England Biolabs, Boston, MA, USA) which offer an easy way to remove the remaining primers and dNTPs left from the PCR reaction. The DNA concentration was then measured using a NanoDrop™ spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) and samples complying with the minimal concentration (ng/µl) were directly sequenced commercially (GENEWIZ, Liverpool, UK). The sequences obtained were visualized and edited using BioEdit software, then confirmed *via* alignment to similar sequences using the nucleotide BLAST tool on GenBank. Once confirmed, the putative *B. pfeifferi* and *B. camerunensis* sequences were subjected to *in silico* RFLP using the Restriction Mapper online tool (<http://www.restrictionmapper.org/>) to choose restriction enzymes which could clearly distinguish the two *Biomphalaria* species.

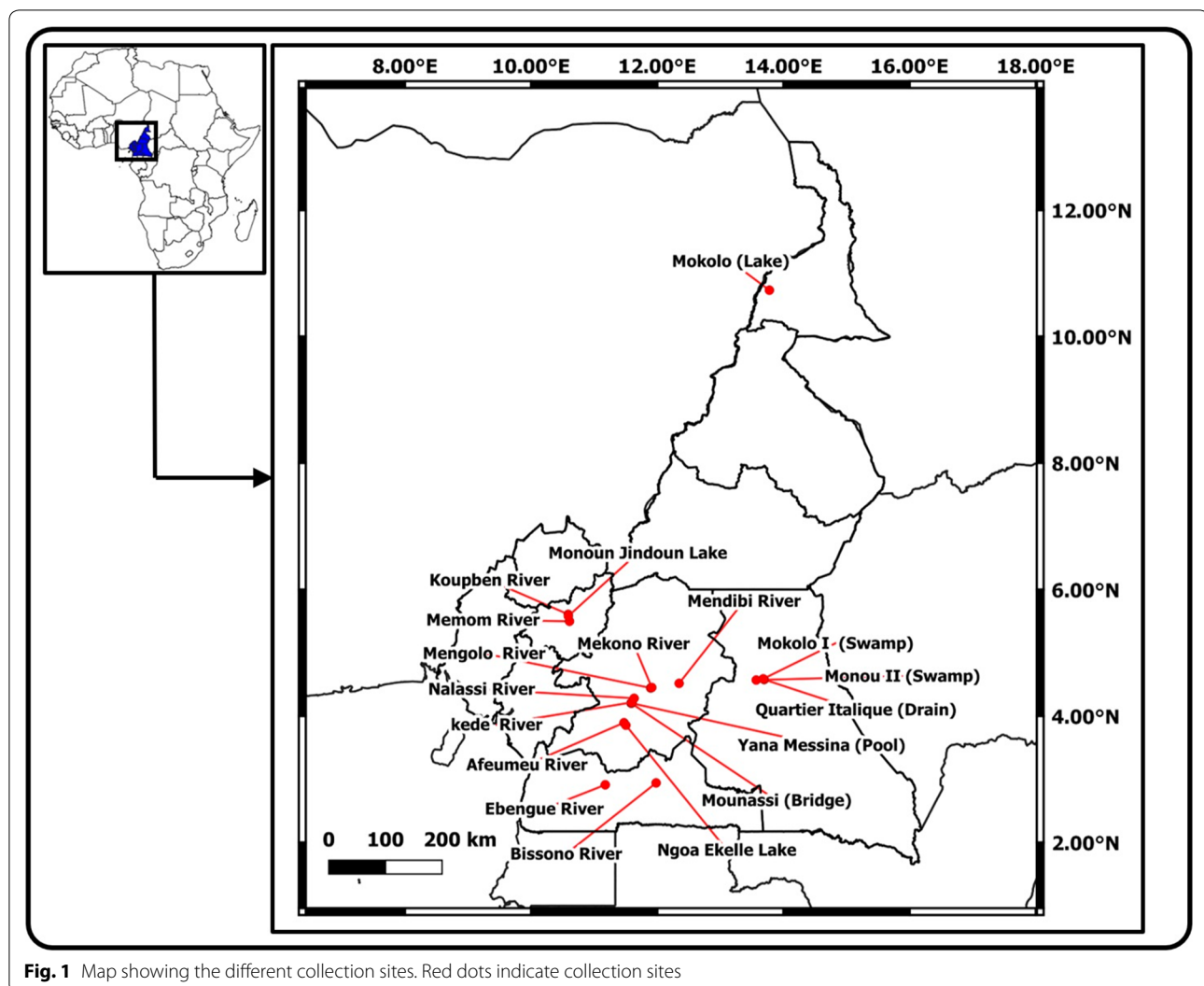


Fig. 1 Map showing the different collection sites. Red dots indicate collection sites

Digestion and revelation of profiles

The two enzymes which exhibited good digestion profiles after *in silico* RFLP (*Hpa*II and *Taq*I) were used for the digestion of the PCR products. The reaction was carried out in a final volume of 25 μ l, containing 2 μ l of amplified DNA, 1 μ l of restriction enzyme, 5 μ l of the manufacturer's buffer and 17 μ l of sterile water, at 37 °C for 2 h. After digestion, the products were resolved on 8% polyacrylamide gel stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

Phylogenetic and population structure analyses

All the sequences were aligned in BioEdit with the ClustalW [40] algorithm for phylogenetic analyses. The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method based on the Jukes-Cantor model [41]. Initial trees for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ

algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood approach, and then selecting the topology with highest log likelihood value. Bootstrap values supporting the nodes were computed as the percentage of trees in which associated taxa clustered together. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 [42].

Estimation of genetic diversity, including polymorphic sites (S), haplotype diversity (Hd), nucleotide diversity (π), were performed using DnaSP5.10.01 [43]. Haplotype diversity was considered as the probability that two randomly sampled alleles are different, and nucleotide diversity was considered as the average number of nucleotide differences per site in pairwise comparisons among DNA sequences [44]. Genetic differentiation among populations (F_{ST}), Fu's F_s statistics and Tajima's D [45] values were also estimated using the software DnaSP 5.10.01 [43]. To better visualize the phylogenetic relationships

among haplotypes, a haplotype network was constructed among the defined haplotypes using TCS v1. 21 software [46] and mutations steps were generated using DnaSP 5.10.01 [43] and MEGA7 [41].

Results

ITS2 amplification and sequencing

The PCR amplification of *Biomphalaria* ITS2 region resulted in a product of 490 bp. After sequencing, editing and aligning to a reference sequence, four amplicon sizes were obtained: 478 bp and 485 bp for *B. camerunensis*; 486 bp and 497 bp for *B. pfeifferi*.

Digestion and revelation of profiles

The digestion of PCR products using restriction enzymes (*HpaII* and *TaqI*) revealed different profiles for the two *Biomphalaria* species.

Biomphalaria camerunensis individuals exhibited two profiles, each with two bands: profile 1 (Bc-*HpaII*-1: 212-bp and 139-bp bands) was common in all the sampling points; profile 2 (Bc-*HpaII*-2: 212-bp and 189-bp bands) was only observed in the Lake Monoun Njindoun sampling site in the West Region and was displayed by ~ 90% of the individuals sampled there. Individuals of *B. pfeifferi*, also presented two profiles, each with two bands: profile 1 (Bpf-*HpaII*-1: 211-bp and 128-bp bands), was common in all *B. pfeifferi* sampling points; whereas profile 2 (Bpf-*HpaII*-2: 289-bp and 128-bp bands) was only observed in Mokolo (Far North Cameroon) and was present in 95% of the sampled individuals (Fig. 2).

Figure 3 shows the different profiles obtained for the two *Biomphalaria* species after the digestion of ITS2

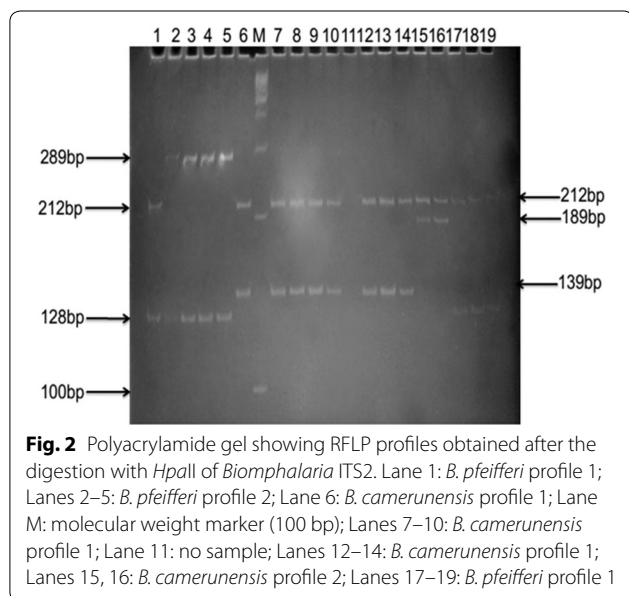


Fig. 2 Polyacrylamide gel showing RFLP profiles obtained after the digestion with *HpaII* of *Biomphalaria* ITS2. Lane 1: *B. pfeifferi* profile 1; Lanes 2–5: *B. pfeifferi* profile 2; Lane 6: *B. camerunensis* profile 1; Lane M: molecular weight marker (100 bp); Lanes 7–10: *B. camerunensis* profile 1; Lane 11: no sample; Lanes 12–14: *B. camerunensis* profile 1; Lanes 15, 16: *B. camerunensis* profile 2; Lanes 17–19: *B. pfeifferi* profile 1

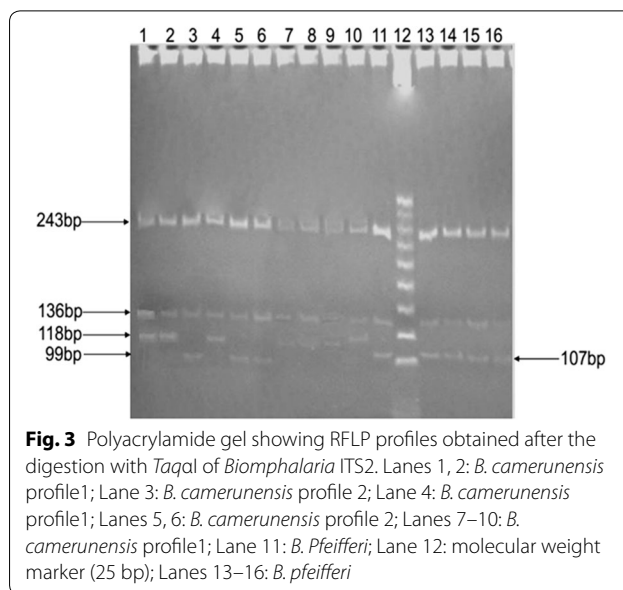
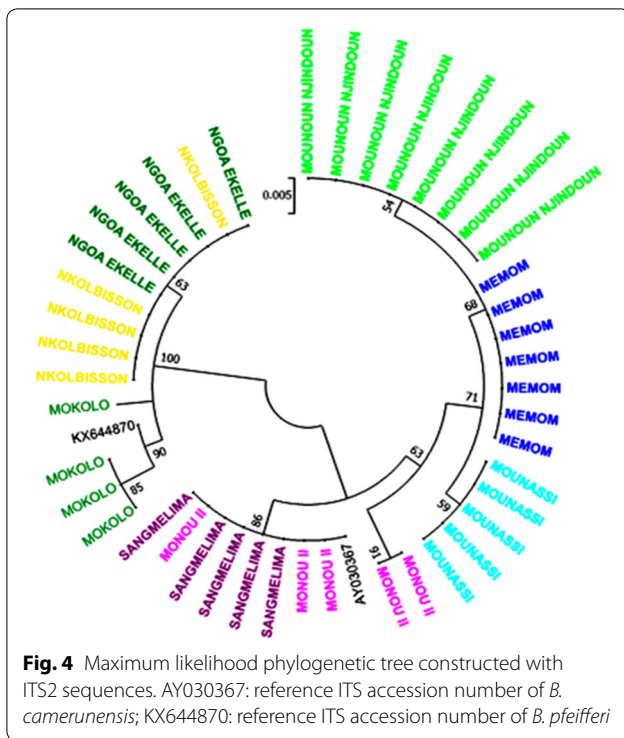


Fig. 3 Polyacrylamide gel showing RFLP profiles obtained after the digestion with *TaqI* of *Biomphalaria* ITS2. Lanes 1, 2: *B. camerunensis* profile1; Lane 3: *B. camerunensis* profile 2; Lane 4: *B. camerunensis* profile1; Lanes 5, 6: *B. camerunensis* profile 2; Lanes 7–10: *B. camerunensis* profile1; Lane 11: *B. Pfeifferi*; Lane 12: molecular weight marker (25 bp); Lanes 13–16: *B. Pfeifferi*

amplicons with *TaqI* enzyme. Individuals of the species *B. camerunensis* showed two profiles, each represented on the gel by three bands: profile 1 (Bc-*TaqI*-1: 243-bp, 136-bp and 118-bp bands) was common in all the sampling sites; while profile 2 (Bc-*TaqI*-2: 244-bp, 136-bp and 99-bp bands) was only observed in samples from Lake Monoun Njindoun (these were the same individuals that displayed profile 2 with the *HpaII* enzyme). All the individuals of *B. pfeifferi* presented a three-band profile (242 bp, 135 bp and 107 bp).

Phylogenetic analyses

The analysis involved 44 nucleotide sequences of 424 bp plus two reference nucleotide sequences, one for *B. pfeifferi* from the South-East of Nigeria [47] and one for *B. camerunensis* from Sangmelima in Cameroon [48]. A clear segregation of the two *Biomphalaria* species (bootstrap 100) was observed. One cluster included *B. pfeifferi* from Mokolo in the Far North Region, Nkolbisson and Ngoa Ekelle in the Centre Region, and another cluster included *B. camerunensis* from Mounassi in the Centre Region, Sangmelima in the South Region, Monou II in the East Region, Monoun Njindoun and Memom in the West Region (Fig. 4). A total of nine haplotypes were detected in the different studied populations including six for *B. camerunensis* and three for *B. pfeifferi*. In general, haplotypes of each species were strongly related with a maximum of 5 and 8 mutational steps in *B. pfeifferi* and *B. camerunensis* populations, respectively (Fig. 5). The haplotype H4 found only in Monoun Njindoun in the West Region was the only haplotype isolated from the other haplotypes of *B. camerunensis* and was different from the



reference sequence from Cameroon with 22 mutational steps (Fig. 6). When comparing the haplotypes of the two species, 30 mutational steps were recorded, confirming the segregation of these species (Fig. 6).

Genetic diversity of Biomphalaria populations

Of the eight populations analysed, six did not display any polymorphism (all the individual having the same haplotype). Haplotype and nucleotide diversities of *B. camerunensis* samples were 0.798 and 0.008, respectively, while in *B. pfeifferi* samples, they were 0.473 and 0.004, respectively. Assessment of demographic expansion of populations, based on neutrality tests gave a negative value for Tajima’s *D* in Mokolo (− 0.796) and a positive value (1.718) in Monou II and these values were not significant; Fu’s *F_s* test values were positive in samples of the two species (Table 2), showing that populations under study were not in expansion.

Population structure

Genetic structure of *Biomphalaria* spp. populations was analyzed by pairwise *F_{ST}* among five populations of *B. camerunensis* and three populations of *B. pfeifferi*. *F_{ST}* values were high and significant (*P* < 0.01) between all *B. camerunensis* pairs from Sangmelima, Monou II, Mounoun Njindoun, and Memom but low and non-significant between the two populations from Sangmelima in the South Region and Monou II in the East Region (*P* = 0.25) (Table 3). In *B. pfeifferi* populations, *F_{ST}* values were only significant between the samples from the Center Region (Nkolbisson, Ngoa-Ekelle) and the one from the Far North Region (Mokolo) (*P* < 10^{−3}) (Table 4).

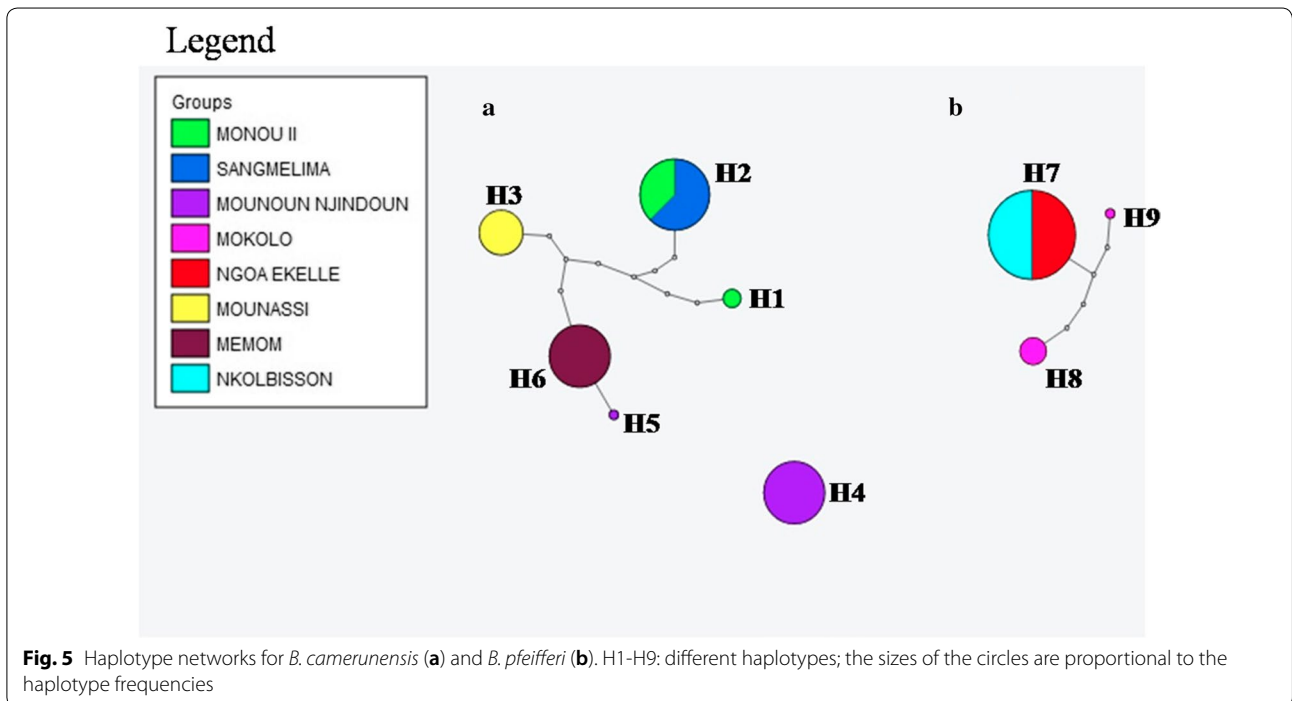


Table 4 Fixation index (F_{ST}) between localities *Biomphalaria pfeifferi* populations

Localities	Ngoa-Ekellé	Nkolbisson	Mokolo
Ngoa-Ekellé (n = 5)			
Nkolbisson (n = 5)	0		
Mokolo (n = 4)	0,6**	0,6**	-

Note: Numbers in parentheses indicate the number of individuals analyzed

** $P < 0.01$

Discussion

Morphological identification of *S. mansoni* vector species of the genus *Biomphalaria* is difficult because shells are very similar in shape and color. Moreover, morphological and anatomical characters were found to vary among populations as shown in Sangmelima and Nkoteng by Peka Sangou (2010, personal communication) and Mvogo Ndongo (2012, personal communication). To scale up the fight against schistosomiasis and achieve elimination, an anti-vector campaign has recently been advocated in addition to MDA which for a very long time had been the only prevention approach [49]. The identification of the two sibling *Biomphalaria* spp. is tricky, but useful for the establishment of baseline data, prior to a vector control campaign. To provide more tools to achieve this goal, we designed a diagnostic assay that will facilitate the morphological identification of *B. pfeifferi* and *B. camerunensis* in Cameroon and help improve the control of these species.

Taxonomic study

The PCR-RFLP-based protocol used has clearly distinguished *B. camerunensis* species (profiles Bc-HpaII-1 and Bc-HpaII-2) from *B. pfeifferi* species (profiles Bpf-HpaII-1 and Bpf-HpaII-2) as was the case for Brazilian *Biomphalaria* species [35]. The same technique had already proven useful in the identification of other species such as species of the *Anopheles gambiae* complex [50]. This technique is a promising simple tool which can help to overcome the misidentification of sibling vectors and thus help to understand epidemiological issues. Moreover, the PCR-RFLP technique revealed an intraspecific variation, characterized by the occurrence of two ribotypes in each *Biomphalaria* species. As no intermediate profile was found between ribotypes, further investigation is needed to check their taxonomical status (subspecies or simple variant). The existence of intraspecific variation is in line with the observation of a high polymorphism in the susceptibility of *B. camerunensis* populations to *S. mansoni* [14]. This level of polymorphism is expected in an outbred species such as *B. camerunensis* [51].

The phylogenetic tree constructed with ITS2 sequences clearly segregated the individuals of the two species, thus confirming their divergence; however, within each species, the two main related branches of the tree correspond to the two different profiles obtained and are indicative of an intraspecific variation. Molecular phylogenies already helped in the classification of several mollusc taxa like bivalves [52], it is then an added value for taxonomical studies.

Molecular diversity and population dynamics

Phylogenetic studies showed that almost all the haplotypes obtained within each species, regardless of their geographical origin, were closely related. Among the five populations of *B. camerunensis*, Monou II showed the highest haplotype diversity (Hd: 0.600) and a low nucleotide diversity (π : 0.008), which are indicative of a rapid population growth from a small-sized ancestral population in which the time has not been enough to find a strong diversity between haplotypes [53]. The low values of Hd (0.473) and π (0.004) obtained in *B. pfeifferi* populations are indicative of a severe and prolonged bottleneck; however, more investigations are necessary to confirm these suggestions. In addition, pairwise F_{ST} between the samples from the different administrative regions studied were high and significant, showing no signal of gene flow between these populations. Nevertheless, the lack of polymorphism in the genetic marker used could lead to a less accurate estimation of this parameter. The low genetic diversity observed in the studied populations can result from their mating system or from their ecology, since low genetic diversity is severe in subdivided populations with seasonal variation in abundance [1]. Effective population sizes and density variation appear to be important factors in the loss of variability and *Biomphalaria* are known to have subdivided habitats [54]. In addition, the positive values of the Tajima's D and Fu's F_s neutrality tests show that all the populations studied are not currently expanding. This information shows that vector control performed now will lead to a rapid population density decrease in *Biomphalaria* spp., but other studies using other nuclear or mitochondrial polymorphic markers are needed to provide more accurate demographic parameters.

Conclusions

The aim of this study was to provide a simple tool that can help to easily and accurately identify *B. pfeifferi* and *B. camerunensis* from Cameroon and provide some initial data on their genetic diversity. The digestion of ITS2 DNA fragments with *HpaII* and *TaqI*

allowed to clearly distinguish the two *Biomphalaria* species present in Cameroon, showing that the protocol used constitutes a useful alternative that can help to accurately identify the two species and thus help in future vector control campaigns. The genetic variability observed within *B. camerunensis* is in line with the ability of some of its populations to transmit schistosomes at the same level as the former known principal host, *B. pfeifferi*. Further investigations are required to formally confirm the link between the vector competence of some *B. camerunensis* populations and their genetic background.

Abbreviations

MDA: Mass drug administration; DNA: Deoxyribonucleic acid; ITS: Internal transcribed spacer; PCR: Polymerase chain reaction; RFLP: Restriction fragment length polymorphism.

Acknowledgements

The authors are thankful to Dr. Nana Djeunga Hugues Clotaire for his assistance during the preparation of the manuscript and the Liverpool school of tropical medicine for providing some laboratory reagents. The authors also thank the editor and the anonymous reviewers for their contribution that have significantly improved the quality of this paper.

Authors' contributions

MCTM conceived and designed the study, collected the field data, analyzed the data, and prepared the first draft of the manuscript. TTMT contributed in the study design, performed the data analyses and helped to draft the manuscript. ACKF participated in field data collection and helped to draft the manuscript. DNN analyzed the data. CSW contributed to the data analyses and helped to draft the manuscript. FN conceived and designed the study, provided general supervision at the various stages of the study process and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was funded by the Parasitology and Ecology Laboratory of the Faculty of Science of the University of Yaoundé 1 and the Centre for Research in Infectious Diseases (CRID) Yaoundé Cameroon. Travel for sampling collection was supported by Mr. Foga Charles Patrick.

Availability of data and materials

Data supporting the conclusions of the article are included within the article. The newly generated sequences were submitted to the GenBank database under the accession numbers MN064840–MN064845 (*Biomphalaria camerunensis*) and MN064846–MN064848 (*Biomphalaria pfeifferi*). The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Ethical approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹ Parasitology and Ecology Laboratory, Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon. ² Centre for Research in Infectious Diseases, Yaoundé, Cameroon. ³ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Bamenda, Bamenda, Cameroon. ⁴ Research Unit of Applied Biology

and Ecology, University of Dschang, Dschang, Cameroon. ⁵ Department of Vector Biology, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, UK.

Received: 17 December 2019 Accepted: 25 March 2020

Published online: 30 March 2020

References

- Brown DS. Freshwater snails of Africa and their medical importance. London: Taylor & Francis Ltd; 1980. p. 487.
- Gryseels B. The relevance of schistosomiasis for public health. *Trop Med Parasitol.* 1989;40:134–42.
- Jordan P, Webbe G, Sturrock RF. Human schistosomiasis. 3rd ed. Wallingford: CAB International; 1993.
- WHO. Global Health Observatory (GHO) data: Schistosomiasis. Geneva: World Health Organisation; 2020. http://www.who.int/neglected_diseases/LOP_WHO_meeting_investmentimpactcontrolNTD.pdf. Accessed 16 Mar 2020.
- Tchuem Tchuente LA, N'Goran EK. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis control in Cameroon and Côte d'Ivoire: implementing control on a limited budget. *Parasitology.* 2009;136:1739–45.
- Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis.* 2006;6:411–25.
- Tchuem Tchuente LA, Kamwa Ngassam RI, Sumo L, Ngassam P, Dongmo NC, Luogbou Nzu DD, et al. Mapping of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis in the regions of Centre, East and West Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1553.
- Nkengazong L, Njiokou F, Teukeng F, Eryong P, Wanji S. Reassessment of endemicity level of urinary schistosomiasis in the Kotto-Barrombi focus (South-West Cameroon) and impact of mass drug administration (MDA) on the parasitic indices. *J Cell Anim Biol.* 2009;3:159–64.
- Simões LF, Camargo EAF, Bastos LD, Neves MF, De Carvalho JF, et al. Susceptibility of Argentinean *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* to infection by *Schistosoma mansoni* and the possibility of geographic expansion of mansoni schistosomiasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46:611–6.
- WHO. Schistosomiasis: progress report 2001–2011, strategic plan 2012–2020. Geneva: World Health Organisation. 2013. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/78074>. Accessed 16 Mar 2020.
- WHO. Field use of molluscicides in schistosomiasis control programmes. An operational manual for programme managers. Geneva: World Health Organisation. 2017. <http://apps.who.int/iris>. Accessed 16 Mar 2020.
- Stensgaard AS, Utzinger J, Vounatsou P, Hürlimann E, Schur N, Saarnak CF, et al. Large-scale determinants of intestinal schistosomiasis and intermediate host snail distribution across Africa: does climate matter? *Acta Trop.* 2013;128:378–90.
- Greer GJ, Mimpfoundi R, Malek AE, Joky A, Ngonseu E, Ratard RC. Human schistosomiasis in Cameroon. II. Distribution of the snail hosts. *Am J Trop Med Hyg.* 1990;42:573–80.
- Kengne-Fokam AC, Nana-Djeunga HC, Bagayan M, Njiokou F. *Biomphalaria camerunensis* as a viable alternative intermediate host for *Schistosoma mansoni* in southern Cameroon. *Parasit Vectors.* 2018;11:181.
- Boettger CR. Diagnose einer neuen Posthornschncke aus Kamerun. *Archiv Molluskenkunde.* 1941;73:121–3.
- Mandahl-Barth G. Intermediate hosts of *Schistosoma* African *Biomphalaria* and *Bulinus*. 2. *Bull World Health Organ.* 1957;17:1–65.
- Wright CA. The freshwater gastropod molluscs of west Cameroon. *Bull Br Mus Nat Hist Zool.* 1965;13:75–98.
- Dung BT, Doanh PN, The DT, Loan HT, Losson B, Caron Y. Morphological and molecular characterization of lymnaeid snails and their potential role in transmission of *Fasciola* spp. in Vietnam. *Korean J Parasitol.* 2013;51:657–62.
- Pesic V, Gloer P. A new freshwater snail genus (Hydrobiidae, Gastropoda) from Montenegro, with a discussion on gastropod diversity and endemism in Skadar Lake. *ZooKeys.* 2013;281:69–90.
- Gasser RB, Stewart LE, Speare R. Genetic markers in ribosomal DNA from hookworm identification. *Acta Trop.* 1996;62:15–21.

21. Cunningham CO. Species variation within the internal transcribed spacer (ITS) region of *Gyrodactylus* (Monogenea: Gyrodactylidae) ribosomal RNA genes. *J Parasitol.* 1997;83:215–9.
22. Hope M, McManus DP. Genetic variations in geographically isolated populations and subspecies of *Oncomelania hupensis* determined by a PCR-based RFLP method. *Acta Trop.* 1994;57:75–82.
23. Stohard JR, Rollinson D. An evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for the identification and phylogeny of freshwater snail of the genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). *J Moll Stud.* 1996;62:165–76.
24. Stohard JR, Rollinson D. Molecular characterization of *Bulinus globosus* and *B. nasutus* on Zanzibar, and an investigation of their roles in the epidemiology of *Schistosoma haematobium*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;91:353–7.
25. Remigio EA, Blair D. Relationships among problematic North American stagnicoline snails (Pulmonata: Lymnaeidae) reinvestigated using nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Can J Zool.* 1997;75:1540–5.
26. Knight M, Brindley PJ, Richards CS, Lewis FA. *Schistosoma mansoni*: use of a cloned ribosomal RNA gene probe to detect restriction fragment length polymorphisms in the intermediate host *Biomphalaria glabrata*. *Exp Parasitol.* 1991;73:285–94.
27. Strahan K, Kane RA, Rollinson D. Development of cloned DNA probes for the identification of snail intermediate hosts within the genus *Bulinus*. *Acta Trop.* 1991;48:117–26.
28. Vidigal THDA, Neto ED, Simpson AJG, Carvalho OS. A low stringency polymerase chain reaction approach to identification of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996;91:739–44.
29. Pires ER, Vidigal THDA, Teles HMS, Simpson AJG, Carvalho OS. Specific identification of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria occidentalis* populations by the low stringency polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997;92:101–6.
30. Caldeira RL, Vidigal THDA, Martinela L, Simpson AJG, Carvalho OS. Identification of planorbids from Venezuela by polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95:171–7.
31. Caldeira RL, Vidigal THDA, Paulinelli ST, Simpson AJG, Carvalho OS. Molecular identification of similar species of the genus *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae) determined by PCR-RFLP. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93:219–25.
32. Spatz L, Vidigal THDA, Caldeira RL, Dias Neto E, Cappa SMG, Carvalho OS. Study of *Biomphalaria tenagophila tenagophila*, *B. t. guaibensis* and *B. occidentalis* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA intergenic spacer regions. *J Molluscan Stud.* 1999;65:143–9.
33. Vidigal THDA, Caldeira RL, Simpson AJ, Carvalho OS. Further studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil. *Mem Instituto Oswaldo Cruz.* 2000;95:57–66.
34. Vidigal THDA, Montresor LC, Simpson AJG, Carvalho OS. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of cytochrome oxidase I used for differentiation Brazilian *Biomphalaria* species intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:47–52.
35. Vidigal THDA, Spatz L, Nunes DN, Simpson AJG, Carvalho OS, Dias Neto E. *Biomphalaria* spp: identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. *Exp Parasitol.* 1998;89:180–7.
36. Vidigal THDA, Magalhães KG, Carvalho ODS. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of the ITS2 region for differentiation of Brazilian *Biomphalaria* intermediate hosts of the *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004;37:351–3.
37. Brown D. Freshwater snails of Africa and their medical importance. 2nd ed. London: Taylor & Francis Ltd.; 1994.
38. Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Publications; 1982.
39. Kane RA, Rollinson D. Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheei*. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;63:153–6.
40. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999;4:95–8.
41. Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. In: Munro HN, editor. Mammalian protein metabolism. New York: Academic Press; 1969. p. 21–132.
42. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33:1870–4.
43. Librado P, Rozas J. DNASP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009;25:1451–2.
44. Nei M. Molecular evolutionary genetics. New York: Colombia University Press; 1987. p. 512.
45. Tajima F. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 1989;123:585–95.
46. Clement M, Posada D, Crandall K. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol.* 2000;9:1657–60.
47. Okeke OC, Ubachukwu PO. Trematode infections of the freshwater snail *Biomphalaria pfeifferi* from a south-east Nigerian community with emphasis on cercariae of *Schistosoma*. *J Helminthol.* 2017;91:295–301.
48. DeJong RJ, Morgan JA, Paraense WL, Pointier JP, Amarista M, Ayeh-Kumi PF, et al. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Mol Biol Evol.* 2001;18:2225–39.
49. Rollinson D, Knopp S, Levitz S, Stohard JR, TchuemTchuenté LA, Garba A, et al. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta Trop.* 2013;128:423–40.
50. Fanello C, Santolamazza F, Della Torre A. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Med Vet Entomol.* 2002;16:461–4.
51. Kengne-Fokam AC, Nana-Djeunga HC, Njiokou F. Mating behaviour in two *Schistosoma mansoni* intermediate hosts (*Biomphalaria pfeifferi* and *Biomphalaria camerunensis*) in Cameroon. *Ann Aquac Res.* 2016;3:1017.
52. Adamkewicz SL, Harasewych G, Blake J, Saudek D, Bult CJ. A molecular phylogeny of the Bivalve mollusks. *Mol Biol Evol.* 1997;14:619–29.
53. Salducci MD, Martin J, Pech N, Chappaz R, Costedoat C, Gilles A. Deciphering the evolutionary biology of freshwater fish using multiple approaches - insights for the biological conservation of the Vairone (*Leuciscus souffia souffia*). *Conserv Genet.* 2004;5:63–77.
54. Selander RK. Genic variation in natural populations. In: Ayala FJ, editor. Molecular evolution. Massachusetts: Sinauer Associates; 1976. p. 21–45.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



RESEARCH

Open Access



PCR-based molecular identification of two intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* in Cameroon

Mureille Carole Tchami Mbagnia¹, Tito Trésor Melachio Tanekou^{2,3}, Alvine Christelle Kengne Fokam¹, Daniel Nguiffo Nguete^{2,4}, Charles Sinclair Wondji^{2,5} and Flobert Njiokou^{1,2*}

Abstract

Background: Snails of the genus *Biomphalaria* are intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*, the causative agent of the human intestinal schistosomiasis. Two *Biomphalaria* species (*Biomphalaria pfeifferi* and *Biomphalaria camerunensis*) are involved in the transmission in Cameroon, where the disease is present nationwide. However, difficulty in the identification of both vectors impedes proper assessment of the epidemiological burden caused by each species. To overcome this issue, we designed a PCR-based molecular diagnostic tool to improve the identification of these species.

Methods: We analyzed the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of *Biomphalaria* ribosomal DNA (rDNA) using polymerase chain reaction amplification (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP).

Results: The amplification of the ITS2 region of *Biomphalaria* snails resulted in a 490 bp fragment and produced two profiles for each species after digestion with the restriction enzyme *Hpa* II. The profile 1 (Bc-Hpall-1: 212-bp and 139-bp bands) for *B. camerunensis*, was common in all the sampling points; the profile 2 (Bc-Hpall-2: 212-bp and 189-bp bands), was only observed in the Lake Monoun Njindoun sampling site. *Biomphalaria pfeifferi* profile 1 (Bpf-Hpall-1: 211-bp and 128-bp bands) was common in most of *B. pfeifferi* sampling points; the profile 2 (Bpf-Hpall-2: 289-bp and 128-bp bands) was only observed in Mokolo (Far North Cameroon). The second restriction enzyme *TaqI*, revealed three band profiles, Bc-TaqI-1 (243-bp, 136-bp and 118-bp bands) and Bc-TaqI-2 (244-bp, 136-bp and 99-bp) for *B. camerunensis* and Bpf-TaqI-1 (242-bp, 135-bp and 107-bp bands) for *B. pfeifferi*. Sequencing analysis revealed the occurrence of six haplotypes for *B. camerunensis* and three haplotypes for *B. pfeifferi*. The level of gene flow was low and the *Biomphalaria* populations were not in demographic expansion according to neutrality tests (Tajima's *D* and Fu's *F_s*).

Conclusions: The PCR-RFLP technique revealed genetic diversity in *Biomphalaria* snails, and the combination with the morphological method could improve the identification of *B. pfeifferi* and *B. camerunensis* in Cameroon. This could help focus on the infection to evaluate the transmission risk with respect of the different species and to develop efficient and cost-effective control measures.

Keywords: Molecular taxonomy, *Biomphalaria pfeifferi*, *Biomphalaria camerunensis*, *Schistosoma mansoni*, Vector control, Cameroon

*Correspondence: njiokouf@yahoo.com

¹ Parasitology and Ecology Laboratory, Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Schistosomiasis, a chronic disease caused by trematodes of the genus *Schistosoma*, is an important public health problem in many tropical and subtropical areas of the world [1–3]. Indeed, transmission of schistosomiasis is proven in 78 countries, and in 2018 the total number of people in need of preventive chemotherapy was 229.2 million, of which 124.4 million were school-aged children [4].

In Cameroon in 2009, more than 5 million people were at risk of infection with schistosomiasis, and 2 million were known to be currently infected [5]. Intestinal schistosomiasis is the most widely distributed type of schistosomiasis in the equatorial area. This type is caused by the presence in the intestinal vascular system of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. The Cameroon National Control Programme against schistosomiasis has adopted a periodic large-scale deworming campaign using praziquantel, associated with health education, as control measures. This strategy has considerably reduced morbidity and mortality levels among affected populations. However, most of the old foci remain active, and new foci are observed, likely due to the migration of the infected individuals from endemic areas to schistosomiasis free sites where intermediate hosts are present [6–9]. To overcome this situation and accelerate the progress towards elimination, the Cameroon strategic plan was revised, including the implementation of other control measures such as: (i) access to clean water; (ii) sanitation improvement; and (iii) control of intermediate host populations [10, 11]. This latter control approach requires a better understanding of the distribution, biology and population dynamics of intermediate hosts of schistosomes.

In Cameroon, *S. mansoni* transmission involves two snail species, *Biomphalaria camerunensis* (Boettger, 1941) that has also been recorded in central Africa (from Ghana at the West to the Democratic Republic of Congo at the East) [11, 12] and *Biomphalaria pfeifferi* (Krauss, 1848) that is also present throughout sub-Saharan Africa and also in one country in North Africa (Algeria) [12]. *Biomphalaria pfeifferi* is widely distributed throughout the country and is known as the main intermediate host of *S. mansoni*. Conversely, *B. camerunensis* has until now only been reported under the 6° north latitude and appears to play a minor role in the transmission of *S. mansoni* [13]. However, recent compatibility studies highlighted a relatively high susceptibility and cercarial emission rate in some *B. camerunensis* populations as high as those observed among *B. pfeifferi*, suggesting that they might play a more important role in the transmission of *S. mansoni* [14].

Biomphalaria pfeifferi and *B. camerunensis* are very similar morphologically, which makes their routine

identification difficult. The last study on the distribution of these snail species in Cameroon was performed nearly 30 years ago and the results are not reflective to the current situation, as there have been significant ecological and human changes in the respective foci. A clear distinction of these *Biomphalaria* spp. snails might help sharpen disease mapping and evaluate the transmission risk in localities where they are found. For many decades, the identification of snail intermediate hosts had been mainly based on the comparison of morphological and morphometric characters of shells [15–17]. Although the shell morphology remains an important taxonomic instrument [18, 19], studies employing alternative tools such as molecular identification seem to be more accurate for closely related species [20–25]. In the last two decades, molecular tools have been evaluated for both snail identification and phylogenetic studies [26–29]; the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region of rDNA and the analysis of cytochrome *c* oxidase subunit 1 region of mitochondrial DNA have proven to be cheaper and powerful for the identification of several *Biomphalaria* species [30–35]. More recently, the PCR-RFLP technique has been used to distinguish *Biomphalaria* species in Brazil and it appears to be an alternative molecular tool to their morphological identification [36].

The aim of this study was to test the efficiency of the PCR-RFLP protocol developed for identification of *Biomphalaria* species in South America [34, 36], for the separation of the two main *Biomphalaria* spp. currently found in Cameroon. Furthermore, sequencing of rDNA fragments enabled us to assess the genetic diversity and population structure of both species in Cameroon.

Methods

Snail sampling sites and collection method

Snail sampling was conducted from July to August 2017 in eighteen sites all located in five administrative Regions of Cameroon: nine sites in the Centre, two in the South, three in the West, two in the East and one in the Far North (Table 1, Fig. 1). Sites mentioned in previous studies were visited [13, 14], while new sites were chosen in additional streams favourable to the survival of molluscs. Snails were collected using a long-handled dip net by systematically combing the aquatic vegetation and identified using morphological criteria previously described by Brown [37]. For each sample, some individuals were taken at random and kept alive for further parasites screening, while others were individually fixed in labelled tubes containing 95% ethanol and transferred to the Parasitology and Ecology Laboratory of the University of Yaoundé I, Cameroon, where they were stored at – 20 °C until processing for molecular studies.

Table 1 Description of different sampling sites

Region	Bioclimatic characteristics	Town	Water collection (n)	Geographical coordinates
Centre	Degraded forest, subequatorial climate	Minkama	Mounassi pond (32 <i>Bc</i>)	4°12'14"N, 11°35'0.2"E
			Yana Messina pool (6 <i>Bc</i>)	4°12'1"N, 11°35'3"E
			Kede River (32 <i>Bc</i>)	4°12'6"N, 11°35'6"E
		Nalassi	Nalassi River (50 <i>Bc</i>)	4°16'49"N, 11°37'58"E
			Nkoteng	Mendibi River (6 <i>Bc</i>)
		Mbandjock	Mengolo River (30 <i>Bc</i>)	4°26'37"N, 11°53'40"E
			Mekono River (34 <i>Bc</i>)	4°27'04"N, 11°54'46"E
		Yaoundé	Afeme River (30 <i>Bp</i>)	3°53'38"N, 11°28'20"E
			Ngoa-Ekellé Lake (30 <i>Bp</i>)	3°51'15"N, 11°30'07"E
South	Dense rain forest, Guinean subequatorial climate	Sangmelima	Bissono River (30 <i>Bc</i>)	2°56'28"N, 11°58'55"E
		Ebolowa	Ebengue River (4 <i>Bc</i>)	2°54'42"N, 11°10'33"E
East	Equatorial forest, subtropical climate	Bertoua	Monou II swamp (30 <i>Bc</i>)	4°34'14"N, 13°41'34"E
			Quartier Italie drain (30 <i>Bc</i>)	4°34'35"N, 13°41'43"E
			Mokolo I swamp (30 <i>Bc</i>)	4°35'18"N, 13°40'48"E
West	Shrub savannah, equatorial climate	Kouoptamo	Koupben River (30 <i>Bc</i>)	5°36'33"N, 10°35'17"E
			Mangoum	Memom River (30 <i>Bc</i>)
		Monoun Njindoun	Monoun Njindoun Lake (32 <i>Bc</i>)	5°34'53"N, 10°35'23"E
Far North	Savannah, tropical Sudan-Sahel climate	Mokolo	Lake (4 <i>Bp</i>)	10°44'00"N, 13°46'4"E

Abbreviations: n, number of snails collected; *Bc*, *Biomphalaria camerunensis*; *Bp*, *Biomphalaria pfeifferi*

DNA extraction

Total DNA was extracted from the foot of 470 *Biomphalaria* snails (around thirty individuals per sampling site) using a cethyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)-based protocol as described by Maniatis et al. [38]. Samples were thawed and air-dried; briefly, each snail foot was homogenized with a pestle in 600 µl of CTAB buffer (CTAB 2%; 0.1 M Tris-HCl, pH 8; 0.02 M EDTA, pH 8; 1.4 M NaCl). The homogenized mixture was incubated at 60 °C for 30 min. After this incubation, the DNA was extracted using 600 µl of chloroform/isoamyl alcohol (24/1; V/V) mixture, and then precipitated with isopropanol (V/V). After a centrifugation at 10,000×g for 15 min, the DNA pellet was washed with 70% ethanol, air-dried, and re-suspended in sterile water. DNA samples were stored at – 20 °C until PCR amplification.

PCR amplification of the ITS2 region of *Biomphalaria* spp

The ITS2 region of *Biomphalaria* spp. was amplified by PCR, using the primers ITS2F (5'-CGT CCG TCT GAG GGT CGG TTT GC-3') [30] and ETTS1 (5'-TGC TTA AGT TCA GCG GGT-3') [39] hybridizing in the conserved areas of the 5.8S and 28S ribosomal genes, respectively. The PCR amplification was undertaken in a final reaction volume of 20 µl containing 2 µl of extracted DNA, 2 µl of TBE PCR buffer (10×), 0.8 µl of each primer (10 µM), 0.4 µl of dNTPs mixture (10 mM), 0.06 µl of *Taq* DNA polymerase (5 U/µl) and 13.94 µl of sterile water. DNA was amplified in

a Techne TC-412 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK) thermal cycler under the following cycling conditions: initial denaturation at 95 °C for 3 min 30 s, followed by 35 cycles each at 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s, and a final extension step at 72 °C for 10 min. The amplicons were resolved on 2% agarose gels stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

Purification, sequencing and *in silico* RFLP

Purification of some amplified DNA samples was made using the enzymatic PCR clean up method with Exonuclease I (*ExoI*) and shrimp alkaline phosphatase (SAP) (New England Biolabs, Boston, MA, USA) which offer an easy way to remove the remaining primers and dNTPs left from the PCR reaction. The DNA concentration was then measured using a NanoDrop™ spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) and samples complying with the minimal concentration (ng/µl) were directly sequenced commercially (GENEWIZ, Liverpool, UK). The sequences obtained were visualized and edited using BioEdit software, then confirmed *via* alignment to similar sequences using the nucleotide BLAST tool on GenBank. Once confirmed, the putative *B. pfeifferi* and *B. camerunensis* sequences were subjected to *in silico* RFLP using the Restriction Mapper online tool (<http://www.restrictionmapper.org/>) to choose restriction enzymes which could clearly distinguish the two *Biomphalaria* species.

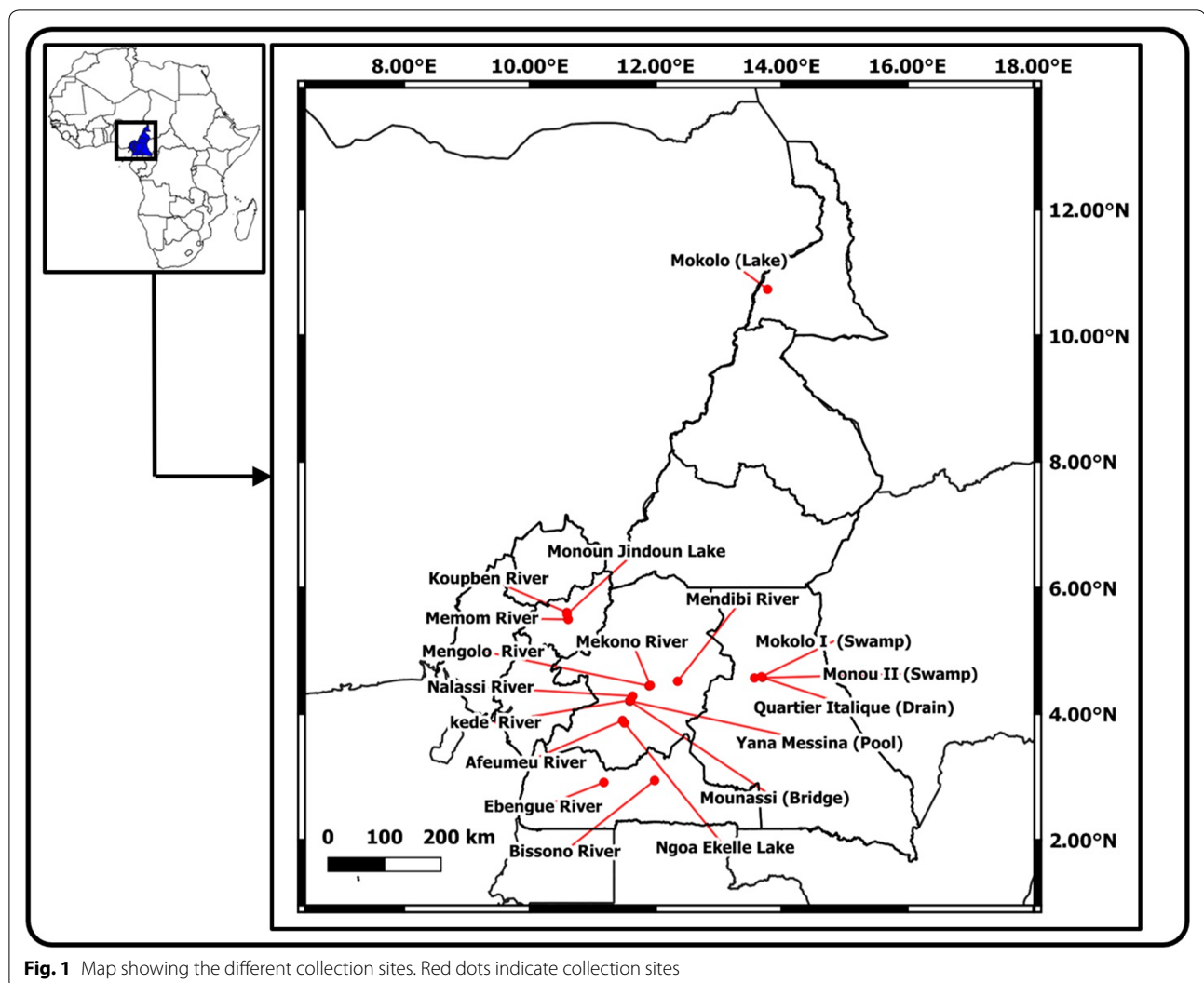


Fig. 1 Map showing the different collection sites. Red dots indicate collection sites

Digestion and revelation of profiles

The two enzymes which exhibited good digestion profiles after *in silico* RFLP (*Hpa*II and *Taq*I) were used for the digestion of the PCR products. The reaction was carried out in a final volume of 25 μ l, containing 2 μ l of amplified DNA, 1 μ l of restriction enzyme, 5 μ l of the manufacturer's buffer and 17 μ l of sterile water, at 37 °C for 2 h. After digestion, the products were resolved on 8% polyacrylamide gel stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

Phylogenetic and population structure analyses

All the sequences were aligned in BioEdit with the ClustalW [40] algorithm for phylogenetic analyses. The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method based on the Jukes-Cantor model [41]. Initial trees for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ

algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood approach, and then selecting the topology with highest log likelihood value. Bootstrap values supporting the nodes were computed as the percentage of trees in which associated taxa clustered together. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 [42].

Estimation of genetic diversity, including polymorphic sites (S), haplotype diversity (Hd), nucleotide diversity (π), were performed using DnaSP5.10.01 [43]. Haplotype diversity was considered as the probability that two randomly sampled alleles are different, and nucleotide diversity was considered as the average number of nucleotide differences per site in pairwise comparisons among DNA sequences [44]. Genetic differentiation among populations (F_{ST}), Fu's F_s statistics and Tajima's D [45] values were also estimated using the software DnaSP 5.10.01 [43]. To better visualize the phylogenetic relationships

among haplotypes, a haplotype network was constructed among the defined haplotypes using TCS v1. 21 software [46] and mutations steps were generated using DnaSP 5.10.01 [43] and MEGA7 [41].

Results

ITS2 amplification and sequencing

The PCR amplification of *Biomphalaria* ITS2 region resulted in a product of 490 bp. After sequencing, editing and aligning to a reference sequence, four amplicon sizes were obtained: 478 bp and 485 bp for *B. camerunensis*; 486 bp and 497 bp for *B. pfeifferi*.

Digestion and revelation of profiles

The digestion of PCR products using restriction enzymes (*HpaII* and *TaqI*) revealed different profiles for the two *Biomphalaria* species.

Biomphalaria camerunensis individuals exhibited two profiles, each with two bands: profile 1 (Bc-*HpaII*-1: 212-bp and 139-bp bands) was common in all the sampling points; profile 2 (Bc-*HpaII*-2: 212-bp and 189-bp bands) was only observed in the Lake Monoun Njindoun sampling site in the West Region and was displayed by ~ 90% of the individuals sampled there. Individuals of *B. pfeifferi*, also presented two profiles, each with two bands: profile 1 (Bpf-*HpaII*-1: 211-bp and 128-bp bands), was common in all *B. pfeifferi* sampling points; whereas profile 2 (Bpf-*HpaII*-2: 289-bp and 128-bp bands) was only observed in Mokolo (Far North Cameroon) and was present in 95% of the sampled individuals (Fig. 2).

Figure 3 shows the different profiles obtained for the two *Biomphalaria* species after the digestion of ITS2

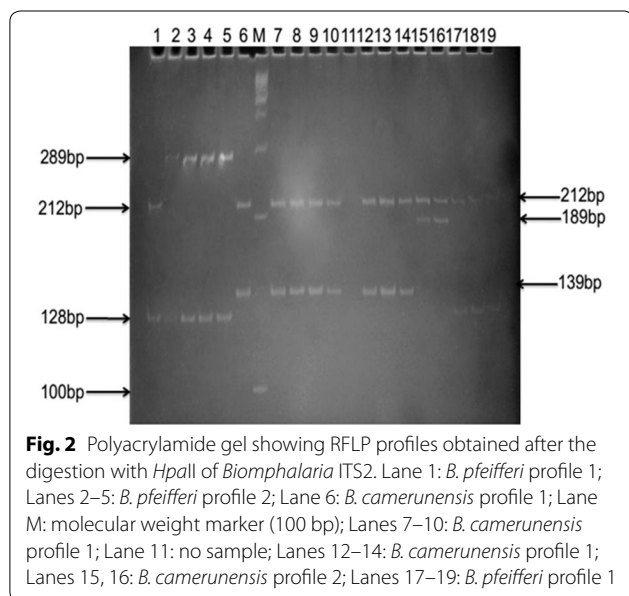


Fig. 2 Polyacrylamide gel showing RFLP profiles obtained after the digestion with *HpaII* of *Biomphalaria* ITS2. Lane 1: *B. pfeifferi* profile 1; Lanes 2–5: *B. pfeifferi* profile 2; Lane 6: *B. camerunensis* profile 1; Lane M: molecular weight marker (100 bp); Lanes 7–10: *B. camerunensis* profile 1; Lane 11: no sample; Lanes 12–14: *B. camerunensis* profile 1; Lanes 15, 16: *B. camerunensis* profile 2; Lanes 17–19: *B. pfeifferi* profile 1

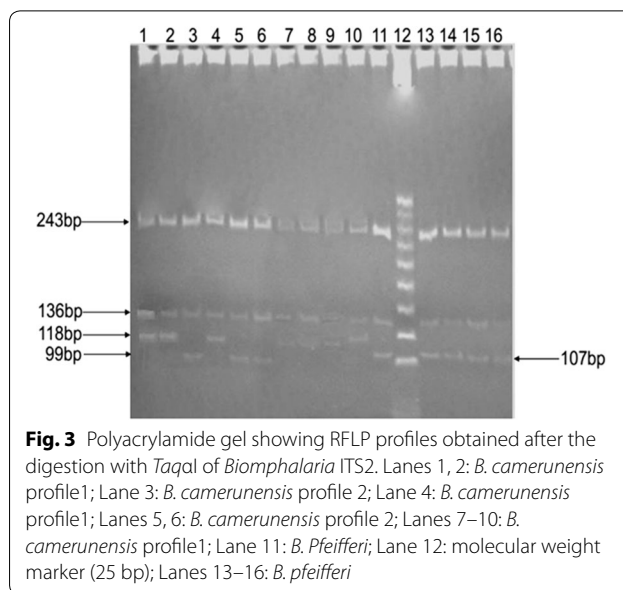
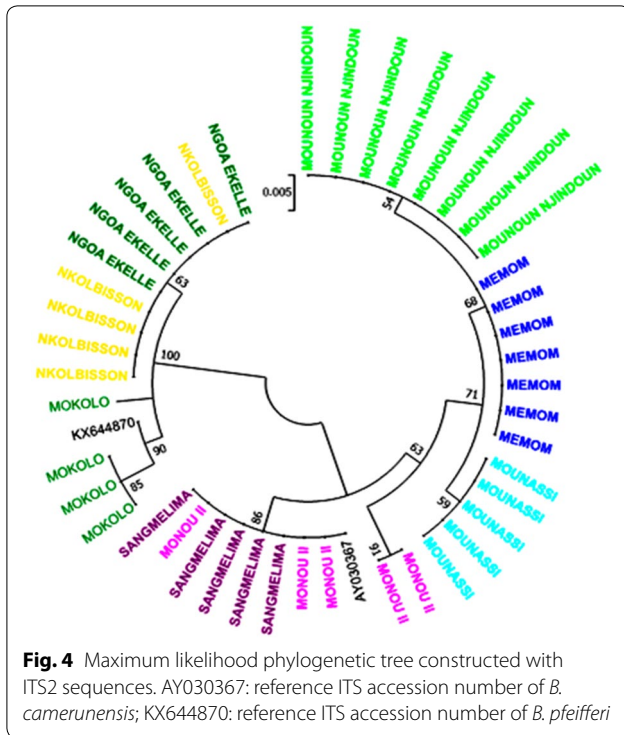


Fig. 3 Polyacrylamide gel showing RFLP profiles obtained after the digestion with *TaqI* of *Biomphalaria* ITS2. Lanes 1, 2: *B. camerunensis* profile1; Lane 3: *B. camerunensis* profile 2; Lane 4: *B. camerunensis* profile1; Lanes 5, 6: *B. camerunensis* profile 2; Lanes 7–10: *B. camerunensis* profile1; Lane 11: *B. Pfeifferi*; Lane 12: molecular weight marker (25 bp); Lanes 13–16: *B. Pfeifferi*

amplicons with *TaqI* enzyme. Individuals of the species *B. camerunensis* showed two profiles, each represented on the gel by three bands: profile 1 (Bc-*TaqI*-1: 243-bp, 136-bp and 118-bp bands) was common in all the sampling sites; while profile 2 (Bc-*TaqI*-2: 244-bp, 136-bp and 99-bp bands) was only observed in samples from Lake Monoun Njindoun (these were the same individuals that displayed profile 2 with the *HpaII* enzyme). All the individuals of *B. pfeifferi* presented a three-band profile (242 bp, 135 bp and 107 bp).

Phylogenetic analyses

The analysis involved 44 nucleotide sequences of 424 bp plus two reference nucleotide sequences, one for *B. pfeifferi* from the South-East of Nigeria [47] and one for *B. camerunensis* from Sangmelima in Cameroon [48]. A clear segregation of the two *Biomphalaria* species (bootstrap 100) was observed. One cluster included *B. pfeifferi* from Mokolo in the Far North Region, Nkolbisson and Ngoa Ekelle in the Centre Region, and another cluster included *B. camerunensis* from Mounassi in the Centre Region, Sangmelima in the South Region, Monou II in the East Region, Monoun Njindoun and Memom in the West Region (Fig. 4). A total of nine haplotypes were detected in the different studied populations including six for *B. camerunensis* and three for *B. pfeifferi*. In general, haplotypes of each species were strongly related with a maximum of 5 and 8 mutational steps in *B. pfeifferi* and *B. camerunensis* populations, respectively (Fig. 5). The haplotype H4 found only in Monoun Njindoun in the West Region was the only haplotype isolated from the other haplotypes of *B. camerunensis* and was different from the



reference sequence from Cameroon with 22 mutational steps (Fig. 6). When comparing the haplotypes of the two species, 30 mutational steps were recorded, confirming the segregation of these species (Fig. 6).

Genetic diversity of Biomphalaria populations

Of the eight populations analysed, six did not display any polymorphism (all the individual having the same haplotype). Haplotype and nucleotide diversities of *B. camerunensis* samples were 0.798 and 0.008, respectively, while in *B. pfeifferi* samples, they were 0.473 and 0.004, respectively. Assessment of demographic expansion of populations, based on neutrality tests gave a negative value for Tajima’s *D* in Mokolo (− 0.796) and a positive value (1.718) in Monou II and these values were not significant; Fu’s *F_s* test values were positive in samples of the two species (Table 2), showing that populations under study were not in expansion.

Population structure

Genetic structure of *Biomphalaria* spp. populations was analyzed by pairwise *F_{ST}* among five populations of *B. camerunensis* and three populations of *B. pfeifferi*. *F_{ST}* values were high and significant (*P* < 0.01) between all *B. camerunensis* pairs from Sangmelima, Monou II, Mounoun Njindoun, and Memom but low and non-significant between the two populations from Sangmelima in the South Region and Monou II in the East Region (*P* = 0.25) (Table 3). In *B. pfeifferi* populations, *F_{ST}* values were only significant between the samples from the Center Region (Nkolbisson, Ngoa-Ekelle) and the one from the Far North Region (Mokolo) (*P* < 10^{−3}) (Table 4).

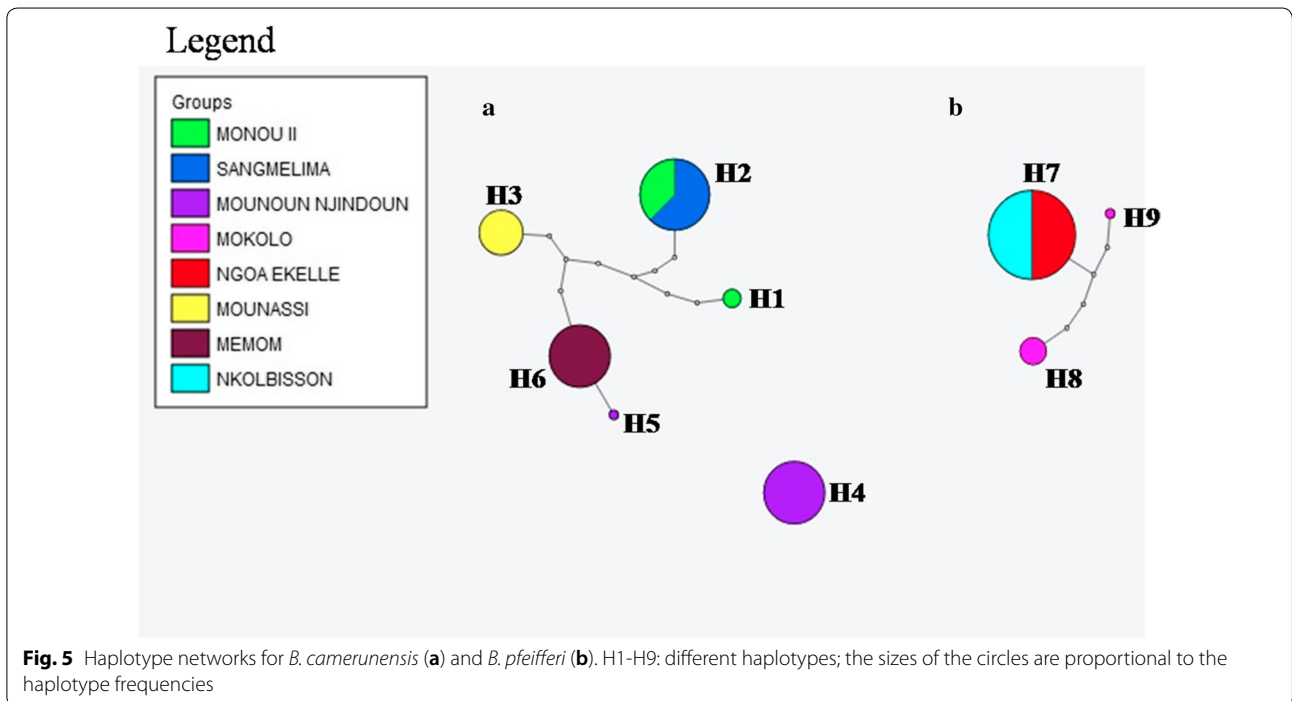


Table 4 Fixation index (F_{ST}) between localities *Biomphalaria pfeifferi* populations

Localities	Ngoa-Ekellé	Nkolbisson	Mokolo
Ngoa-Ekellé (n = 5)			
Nkolbisson (n = 5)	0		
Mokolo (n = 4)	0,6**	0,6**	-

Note: Numbers in parentheses indicate the number of individuals analyzed

** $P < 0.01$

Discussion

Morphological identification of *S. mansoni* vector species of the genus *Biomphalaria* is difficult because shells are very similar in shape and color. Moreover, morphological and anatomical characters were found to vary among populations as shown in Sangmelima and Nkoteng by Peka Sangou (2010, personal communication) and Mvogo Ndongo (2012, personal communication). To scale up the fight against schistosomiasis and achieve elimination, an anti-vector campaign has recently been advocated in addition to MDA which for a very long time had been the only prevention approach [49]. The identification of the two sibling *Biomphalaria* spp. is tricky, but useful for the establishment of baseline data, prior to a vector control campaign. To provide more tools to achieve this goal, we designed a diagnostic assay that will facilitate the morphological identification of *B. pfeifferi* and *B. camerunensis* in Cameroon and help improve the control of these species.

Taxonomic study

The PCR-RFLP-based protocol used has clearly distinguished *B. camerunensis* species (profiles Bc-HpaII-1 and Bc-HpaII-2) from *B. pfeifferi* species (profiles Bpf-HpaII-1 and Bpf-HpaII-2) as was the case for Brazilian *Biomphalaria* species [35]. The same technique had already proven useful in the identification of other species such as species of the *Anopheles gambiae* complex [50]. This technique is a promising simple tool which can help to overcome the misidentification of sibling vectors and thus help to understand epidemiological issues. Moreover, the PCR-RFLP technique revealed an intraspecific variation, characterized by the occurrence of two ribotypes in each *Biomphalaria* species. As no intermediate profile was found between ribotypes, further investigation is needed to check their taxonomical status (subspecies or simple variant). The existence of intraspecific variation is in line with the observation of a high polymorphism in the susceptibility of *B. camerunensis* populations to *S. mansoni* [14]. This level of polymorphism is expected in an outbred species such as *B. camerunensis* [51].

The phylogenetic tree constructed with ITS2 sequences clearly segregated the individuals of the two species, thus confirming their divergence; however, within each species, the two main related branches of the tree correspond to the two different profiles obtained and are indicative of an intraspecific variation. Molecular phylogenies already helped in the classification of several mollusc taxa like bivalves [52], it is then an added value for taxonomical studies.

Molecular diversity and population dynamics

Phylogenetic studies showed that almost all the haplotypes obtained within each species, regardless of their geographical origin, were closely related. Among the five populations of *B. camerunensis*, Monou II showed the highest haplotype diversity (Hd: 0.600) and a low nucleotide diversity (π : 0.008), which are indicative of a rapid population growth from a small-sized ancestral population in which the time has not been enough to find a strong diversity between haplotypes [53]. The low values of Hd (0.473) and π (0.004) obtained in *B. pfeifferi* populations are indicative of a severe and prolonged bottleneck; however, more investigations are necessary to confirm these suggestions. In addition, pairwise F_{ST} between the samples from the different administrative regions studied were high and significant, showing no signal of gene flow between these populations. Nevertheless, the lack of polymorphism in the genetic marker used could lead to a less accurate estimation of this parameter. The low genetic diversity observed in the studied populations can result from their mating system or from their ecology, since low genetic diversity is severe in subdivided populations with seasonal variation in abundance [1]. Effective population sizes and density variation appear to be important factors in the loss of variability and *Biomphalaria* are known to have subdivided habitats [54]. In addition, the positive values of the Tajima's D and Fu's F_s neutrality tests show that all the populations studied are not currently expanding. This information shows that vector control performed now will lead to a rapid population density decrease in *Biomphalaria* spp., but other studies using other nuclear or mitochondrial polymorphic markers are needed to provide more accurate demographic parameters.

Conclusions

The aim of this study was to provide a simple tool that can help to easily and accurately identify *B. pfeifferi* and *B. camerunensis* from Cameroon and provide some initial data on their genetic diversity. The digestion of ITS2 DNA fragments with *HpaII* and *TaqI*

allowed to clearly distinguish the two *Biomphalaria* species present in Cameroon, showing that the protocol used constitutes a useful alternative that can help to accurately identify the two species and thus help in future vector control campaigns. The genetic variability observed within *B. camerunensis* is in line with the ability of some of its populations to transmit schistosomes at the same level as the former known principal host, *B. pfeifferi*. Further investigations are required to formally confirm the link between the vector competence of some *B. camerunensis* populations and their genetic background.

Abbreviations

MDA: Mass drug administration; DNA: Deoxyribonucleic acid; ITS: Internal transcribed spacer; PCR: Polymerase chain reaction; RFLP: Restriction fragment length polymorphism.

Acknowledgements

The authors are thankful to Dr. Nana Djeunga Hugues Clotaire for his assistance during the preparation of the manuscript and the Liverpool school of tropical medicine for providing some laboratory reagents. The authors also thank the editor and the anonymous reviewers for their contribution that have significantly improved the quality of this paper.

Authors' contributions

MCTM conceived and designed the study, collected the field data, analyzed the data, and prepared the first draft of the manuscript. TTMT contributed in the study design, performed the data analyses and helped to draft the manuscript. ACKF participated in field data collection and helped to draft the manuscript. DNN analyzed the data. CSW contributed to the data analyses and helped to draft the manuscript. FN conceived and designed the study, provided general supervision at the various stages of the study process and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was funded by the Parasitology and Ecology Laboratory of the Faculty of Science of the University of Yaoundé 1 and the Centre for Research in Infectious Diseases (CRID) Yaoundé Cameroon. Travel for sampling collection was supported by Mr. Foga Charles Patrick.

Availability of data and materials

Data supporting the conclusions of the article are included within the article. The newly generated sequences were submitted to the GenBank database under the accession numbers MN064840–MN064845 (*Biomphalaria camerunensis*) and MN064846–MN064848 (*Biomphalaria pfeifferi*). The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Ethical approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹ Parasitology and Ecology Laboratory, Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon. ² Centre for Research in Infectious Diseases, Yaoundé, Cameroon. ³ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Bamenda, Bamenda, Cameroon. ⁴ Research Unit of Applied Biology

and Ecology, University of Dschang, Dschang, Cameroon. ⁵ Department of Vector Biology, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, UK.

Received: 17 December 2019 Accepted: 25 March 2020

Published online: 30 March 2020

References

- Brown DS. Freshwater snails of Africa and their medical importance. London: Taylor & Francis Ltd; 1980. p. 487.
- Gryseels B. The relevance of schistosomiasis for public health. *Trop Med Parasitol.* 1989;40:134–42.
- Jordan P, Webbe G, Sturrock RF. Human schistosomiasis. 3rd ed. Wallingford: CAB International; 1993.
- WHO. Global Health Observatory (GHO) data: Schistosomiasis. Geneva: World Health Organisation; 2020. http://www.who.int/neglected_diseases/LOP_WHO_meeting_investmentimpactcontrolNTD.pdf. Accessed 16 Mar 2020.
- Tchuem Tchuente LA, N'Goran EK. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis control in Cameroon and Côte d'Ivoire: implementing control on a limited budget. *Parasitology.* 2009;136:1739–45.
- Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis.* 2006;6:411–25.
- Tchuem Tchuente LA, Kamwa Ngassam RI, Sumo L, Ngassam P, Dongmo NC, Luogbou Nzu DD, et al. Mapping of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis in the regions of Centre, East and West Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1553.
- Nkengazong L, Njiokou F, Teukeng F, Eryong P, Wanji S. Reassessment of endemicity level of urinary schistosomiasis in the Kotto-Barrombi focus (South-West Cameroon) and impact of mass drug administration (MDA) on the parasitic indices. *J Cell Anim Biol.* 2009;3:159–64.
- Simões LF, Camargo EAF, Bastos LD, Neves MF, De Carvalho JF, et al. Susceptibility of Argentinean *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* to infection by *Schistosoma mansoni* and the possibility of geographic expansion of mansoni schistosomiasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46:611–6.
- WHO. Schistosomiasis: progress report 2001–2011, strategic plan 2012–2020. Geneva: World Health Organisation. 2013. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/78074>. Accessed 16 Mar 2020.
- WHO. Field use of molluscicides in schistosomiasis control programmes. An operational manual for programme managers. Geneva: World Health Organisation. 2017. <http://apps.who.int/iris>. Accessed 16 Mar 2020.
- Stensgaard AS, Utzinger J, Vounatsou P, Hürlimann E, Schur N, Saarnak CF, et al. Large-scale determinants of intestinal schistosomiasis and intermediate host snail distribution across Africa: does climate matter? *Acta Trop.* 2013;128:378–90.
- Greer GJ, Mimpfoundi R, Malek AE, Joky A, Ngonseu E, Ratard RC. Human schistosomiasis in Cameroon. II. Distribution of the snail hosts. *Am J Trop Med Hyg.* 1990;42:573–80.
- Kengne-Fokam AC, Nana-Djeunga HC, Bagayan M, Njiokou F. *Biomphalaria camerunensis* as a viable alternative intermediate host for *Schistosoma mansoni* in southern Cameroon. *Parasit Vectors.* 2018;11:181.
- Boettger CR. Diagnose einer neuen Posthornschncke aus Kamerun. *Archiv Molluskenkunde.* 1941;73:121–3.
- Mandahl-Barth G. Intermediate hosts of *Schistosoma* African *Biomphalaria* and *Bulinus*. 2. *Bull World Health Organ.* 1957;17:1–65.
- Wright CA. The freshwater gastropod molluscs of west Cameroon. *Bull Br Mus Nat Hist Zool.* 1965;13:75–98.
- Dung BT, Doanh PN, The DT, Loan HT, Losson B, Caron Y. Morphological and molecular characterization of lymnaeid snails and their potential role in transmission of *Fasciola* spp. in Vietnam. *Korean J Parasitol.* 2013;51:657–62.
- Pesic V, Gloer P. A new freshwater snail genus (Hydrobiidae, Gastropoda) from Montenegro, with a discussion on gastropod diversity and endemism in Skadar Lake. *ZooKeys.* 2013;281:69–90.
- Gasser RB, Stewart LE, Speare R. Genetic markers in ribosomal DNA from hookworm identification. *Acta Trop.* 1996;62:15–21.

21. Cunningham CO. Species variation within the internal transcribed spacer (ITS) region of *Gyrodactylus* (Monogenea: Gyrodactylidae) ribosomal RNA genes. *J Parasitol.* 1997;83:215–9.
22. Hope M, McManus DP. Genetic variations in geographically isolated populations and subspecies of *Oncomelania hupensis* determined by a PCR-based RFLP method. *Acta Trop.* 1994;57:75–82.
23. Stohard JR, Rollinson D. An evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for the identification and phylogeny of freshwater snail of the genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). *J Moll Stud.* 1996;62:165–76.
24. Stohard JR, Rollinson D. Molecular characterization of *Bulinus globosus* and *B. nasutus* on Zanzibar, and an investigation of their roles in the epidemiology of *Schistosoma haematobium*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;91:353–7.
25. Remigio EA, Blair D. Relationships among problematic North American stagnicoline snails (Pulmonata: Lymnaeidae) reinvestigated using nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Can J Zool.* 1997;75:1540–5.
26. Knight M, Brindley PJ, Richards CS, Lewis FA. *Schistosoma mansoni*: use of a cloned ribosomal RNA gene probe to detect restriction fragment length polymorphisms in the intermediate host *Biomphalaria glabrata*. *Exp Parasitol.* 1991;73:285–94.
27. Strahan K, Kane RA, Rollinson D. Development of cloned DNA probes for the identification of snail intermediate hosts within the genus *Bulinus*. *Acta Trop.* 1991;48:117–26.
28. Vidigal THDA, Neto ED, Simpson AJG, Carvalho OS. A low stringency polymerase chain reaction approach to identification of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996;91:739–44.
29. Pires ER, Vidigal THDA, Teles HMS, Simpson AJG, Carvalho OS. Specific identification of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria occidentalis* populations by the low stringency polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997;92:101–6.
30. Caldeira RL, Vidigal THDA, Martinela L, Simpson AJG, Carvalho OS. Identification of planorbids from Venezuela by polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95:171–7.
31. Caldeira RL, Vidigal THDA, Paulinelli ST, Simpson AJG, Carvalho OS. Molecular identification of similar species of the genus *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae) determined by PCR-RFLP. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93:219–25.
32. Spatz L, Vidigal THDA, Caldeira RL, Dias Neto E, Cappa SMG, Carvalho OS. Study of *Biomphalaria tenagophila tenagophila*, *B. t. guaibensis* and *B. occidentalis* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA intergenic spacer regions. *J Molluscan Stud.* 1999;65:143–9.
33. Vidigal THDA, Caldeira RL, Simpson AJ, Carvalho OS. Further studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil. *Mem Instituto Oswaldo Cruz.* 2000;95:57–66.
34. Vidigal THDA, Montresor LC, Simpson AJG, Carvalho OS. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of cytochrome oxidase I used for differentiation Brazilian *Biomphalaria* species intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:47–52.
35. Vidigal THDA, Spatz L, Nunes DN, Simpson AJG, Carvalho OS, Dias Neto E. *Biomphalaria* spp: identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. *Exp Parasitol.* 1998;89:180–7.
36. Vidigal THDA, Magalhães KG, Carvalho ODS. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of the ITS2 region for differentiation of Brazilian *Biomphalaria* intermediate hosts of the *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004;37:351–3.
37. Brown D. Freshwater snails of Africa and their medical importance. 2nd ed. London: Taylor & Francis Ltd.; 1994.
38. Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Publications; 1982.
39. Kane RA, Rollinson D. Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheei*. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;63:153–6.
40. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999;4:95–8.
41. Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. In: Munro HN, editor. Mammalian protein metabolism. New York: Academic Press; 1969. p. 21–132.
42. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33:1870–4.
43. Librado P, Rozas J. DNASP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009;25:1451–2.
44. Nei M. Molecular evolutionary genetics. New York: Colombia University Press; 1987. p. 512.
45. Tajima F. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 1989;123:585–95.
46. Clement M, Posada D, Crandall K. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol.* 2000;9:1657–60.
47. Okeke OC, Ubachukwu PO. Trematode infections of the freshwater snail *Biomphalaria pfeifferi* from a south-east Nigerian community with emphasis on cercariae of *Schistosoma*. *J Helminthol.* 2017;91:295–301.
48. DeJong RJ, Morgan JA, Paraense WL, Pointier JP, Amarista M, Ayeh-Kumi PF, et al. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Mol Biol Evol.* 2001;18:2225–39.
49. Rollinson D, Knopp S, Levitz S, Stohard JR, Tchuente LA, Garba A, et al. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta Trop.* 2013;128:423–40.
50. Fanello C, Santolamazza F, Della Torre A. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Med Vet Entomol.* 2002;16:461–4.
51. Kengne-Fokam AC, Nana-Djeunga HC, Njiokou F. Mating behaviour in two *Schistosoma mansoni* intermediate hosts (*Biomphalaria pfeifferi* and *Biomphalaria camerunensis*) in Cameroon. *Ann Aquac Res.* 2016;3:1017.
52. Adamkewicz SL, Harasewych G, Blake J, Saudek D, Bult CJ. A molecular phylogeny of the Bivalve mollusks. *Mol Biol Evol.* 1997;14:619–29.
53. Salducci MD, Martin J, Pech N, Chappaz R, Costedoat C, Gilles A. Deciphering the evolutionary biology of freshwater fish using multiple approaches - insights for the biological conservation of the Vairone (*Leuciscus souffia souffia*). *Conserv Genet.* 2004;5:63–77.
54. Selander RK. Genic variation in natural populations. In: Ayala FJ, editor. Molecular evolution. Massachusetts: Sinauer Associates; 1976. p. 21–45.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

