

**UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR**  
(U.C.A.D)

**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES**

**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ANIMALE**



**THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES**

Présentée par

**Mbacké SEMBENE**

**Docteur en Biologie Animale**

**Variabilité de l'Espaceur Interne Transcrit (ITS1) de l'ADN ribosomique et polymorphisme des locus microsatellites chez la bruche *Caryedon serratus* (Olivier) : différenciation en races d'hôtes et infestation de l'arachide au Sénégal.**

Soutenue le 17 novembre 2000 devant la commission d'examen:

MM	<b>Bhen Sikina</b>	<b>TOGUEBAYE</b>	Professeur, U.C.A.D. Dakar,	Président
	<b>Alex</b>	<b>DELOBEL</b>	Directeur de Recherche, I.R.D.	Rapporteur
	<b>Ngor</b>	<b>FAYE</b>	Maître de Conférences, U.C.A.D. Dakar	Rapporteur
	<b>Danamou</b>	<b>MOUNPORT</b>	Professeur, U.C.A.D. Dakar	Examineur
	<b>Jean Yves</b>	<b>RASPLUS</b>	Directeur de Recherche, I.N.R.A.	Examineur
Mme	<b>Corine</b>	<b>ROULAND</b>	Professeur, Université de Dijon	Examineur



# **AVANT-PROPOS**

A ma mère Seynabou DIOP ...

A mon père Daouda...

bien qu'ils ne sachent pas lire...

savoir qu'il y promèneront leurs mains suffit à mon bonheur.

Je dédie également ce travail:

A ma femme, **Doufi Diouf**: merci pour ton amour et ta patience. Tu récolteras, j'en suis sûr, le fruit de tes efforts. Que Dieu te préserve du mal.

A mes enfants, **Ibou, Mbacké, Pape Madiop et Ndèye Seynabou**. J'espère que vous trouverez en ce travail un exemple à dépasser.

A mon cousin et ami **Pape Karim Gueye**. Je m'honore de ton estime. Merci pour ton amitié sincère. Que DIEU Le Tout puissant te bénisse.

A mes frères: **Doudou, Maguet et Karime**. A ma soeur **Diass**. C'est dans l'unité que l'on réussit toute entreprise.

Au Docteur **Mbargou Sow**. Tu es pour moi plus qu'un frère. Merci pour ton soutien indéfectible, merci d'avoir guidé mes premiers pas à l'université.

A ma soeur **Mariama Ndiaye**. Je te souhaite beaucoup de bonheur dans ta vie.

A mon cousin **Mame Babacar Gueye**. Cela fait deux mois de novembre que je ne t'ai pas vu. Merci de ton estime et de ton amitié.

A mes beaux-parents **Adramé Diouf et Safiétou Seck**. Merci de la confiance que vous me témoignez.

A monsieur **Aziz Samb** et à son épouse **Lala**, merci pour tout et succès aux enfants.

A tous mes oncles. A ma tante **Aïda Samb**. A tous mes cousins et cousines.

A tous mes amis et camarades: **Madiop, Makhfouss, Ibou Diédhiou, Macoumba Diouf, Ibou Goudiaby, Lamine Kane, Zal, Abou**. A tous les membres du D.E.T.

A mes soeurs: , **Gnagna Ndiaye, Nimsate Kane, Mme Awa Ndiaye Diawara, Aïda Bâ**.

A la mémoire de **Mame Astou Samb**. A la mémoire de tante **Fatou Gueye**. A la mémoire de **Alassane Ndoye**. A la mémoire de **Daba DIOP**. A la mémoire de **Issakha GUEYE**. Que la terre vous soit légère.

A tous les paysans du Saloum. A tous les agriculteurs du monde.

A mes maîtres et juges. Aux précurseurs de la génétique des populations.

A tous ceux qui sont intéressés par ce travail.

Cette thèse est le fruit d'un travail mené au Laboratoire I.R.D./I.T.A. de Protection des Stocks de Dakar. Elle s'intègre au programme de recherche sur l'écologie et l'incidence des ravageurs des denrées stockées en zone tropicale. Elle a été menée sous la direction du Docteur Alex DELOBEL. Au terme de cette étude, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à :

Dr **Alex DELOBEL**, Directeur de Recherche à l'I.R.D., pour nous avoir accueilli au sein de son équipe. Sa constante disponibilité, sa rigueur, son honnêteté et son efficacité dans le travail et sa modestie font de lui un exemple. Plus qu'un directeur de thèse, il a été pour moi un guide et un conseiller. Je voudrais lui exprimer tout mon estime et ma sincère reconnaissance et à travers sa personne remercier toutes les autorités de l'I.R.D.

Dr **Bhen Sikina TOGUEBAYE**, Professeur, Chef du département de Biologie Animale de l'U.C.A.D pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse, malgré ses multiples charges. Il a accepté spontanément d'être mon Co-encadreur à la Faculté des Sciences et Techniques. Je voudrais lui manifester toute ma gratitude et profonde ma reconnaissance.

Dr **Ngor FAYE**, Maître de Conférence, pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse malgré son emploi du temps chargé. Je voudrais le remercier de sa participation active à ce travail, de toutes les suggestions qui m'ont été d'un apport considérable. Toute ma gratitude et ma sincère reconnaissance.

Dr **Danamou MOUNPORT**, Professeur pour sa disponibilité et ses encouragements. Je voudrais aujourd'hui lui transmettre tous mes remerciements et lui témoigner de toute ma sympathie. Merci d'avoir accepté de siéger à mon jury.

Il faut noter que presque toute la partie génétique de cette thèse a été réalisée au **Laboratoire de Modélisation et de Biologie Evolutive de Montpellier** dirigé par Yves GILLON (Directeur de recherche à l'IRD) sous la direction de Jean Yves RASPLUS d'une part et d'autre part au laboratoire Population, Génétique et Evolution de Gif-sur-Yvette dirigé par le Professeur Michel SOLIGNAC sous la direction de Jean-François SILVAIN.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude et ma reconnaissance à **Jean Yves RASPLUS** Directeur de recherche à l'I.N.R.A. pour sa gentillesse, sa spontanéité, sa vivacité scientifique et aussi pour avoir accepté de financer une partie de ce travail. J'ai beaucoup appris dans son laboratoire et tiens encore une fois à lui témoigner ma profonde reconnaissance. Merci aussi pour avoir accepté de juger ce travail.

Toute ma gratitude et ma reconnaissance vont aussi à **Jean-François SILVAIN** chercheur à l'IRD actuellement au Laboratoire de Population, Génétique et Evolution de Gif-Sur-Yvette sans qui, je n'aurais jamais eu le privilège de fouler le sol de ce beau pays qu'est la France, de me confronter aux nouvelles techniques de Biologie Moléculaire et de me familiariser à certains logiciels de traitements de données génétiques ; ce qui m'a permis aujourd'hui d'aboutir à ses résultats. Dommage qu'il n'est pas pu faire partie de mon jury. Je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance pour son apport scientifique et sa détermination quant à l'aboutissement de ce travail. Une partie ce travail a été financée par ce chercheur. Merci à **Michel SOLIGNAC** ; merci **Dominique VAUTRIN**.

Mes remerciements vont particulièrement à des amis et collègues du Laboratoire de Modélisation et de Biologie Evolutive de Montpellier. Je citerais **Sylvain PIRY** à qui je dois la reconstruction des arbres phylogénétiques de mes données microsatellites. Merci pour ton amitié et ton aide. J'exprime aussi ma sympathie et mon amitié **Armelle CŒUR-d'ACIER** et à mon grand-frère **Serge MEUNIER**. Armelle, par sa gentillesse à m'indiquer tout ce qui peut résoudre certains des nombreux problèmes de manipulations génétiques et Serge pour ses conseils, ont largement contribué à la réussite de ce travail. Mes profonds remerciements.

Ma gratitude va aussi à l'ensemble des chercheurs et du personnel du Laboratoire de Modélisation et de Biologie Evolutive. Merci à **Yves GILLON**, pour avoir accepté et facilité mon séjour dans ce laboratoire ; merci à **Brigitte GOT** pour sa gentillesse et son attention (un souvenir affectueux à ses enfants) ; merci à MM **MONDOR, Anne LOISEAU** pour tout ce que j'ai appris auprès de vous. Ma sympathie et mes remerciements vont aussi à **Carole, Phillipe, Christine SILVY, Sylvie HART, Pierre, Jean-Marie CORNUET, Arnaud** et **Cécile Firzames**. De merveilleux souvenirs quand je pense à tous les stagiaires que j'ai connus au Laboratoire de Modélisation.

Ma sympathie et ma reconnaissance au **Dr Corine ROULAND**, Professeur de génétique à l'université de Dijon pour avoir accepté de juger ce travail et de faire partie du jury. Je voudrais aujourd'hui lui transmettre tous mes remerciements et lui témoigner de toute ma gratitude.

Toute ma reconnaissance et ma sympathie au **Dr. Maurice TRAN**, Entomologiste à l'I.R.D. pour son accueil chaleureux et réconfortant. Je voudrai aujourd'hui le remercier de tous les conseils dont j'ai bénéficié de sa part et lui témoigner de toute ma gratitude. Merci de m'avoir toujours soutenu.

Ma profonde reconnaissance et mes remerciements vont au **Dr. Absa GUEYE NDIAYE**, Maître Assistante à l'U.C.A.D., pour m'avoir permis d'intégrer le Laboratoire de Protection des Stocks. Je voudrais aussi lui manifester toute ma reconnaissance pour avoir guidé mes premiers pas dans la recherche scientifique et lui témoigner de toute ma considération. Elle est pour moi plus qu'un maître mais une sœur. Bonne santé à elle et à ses enfants.

Merci à Monsieur Mouhamadou DIOP, Directeur de l'I.T.A., pour avoir facilité notre séjour dans l'Institut.

Merci au Dr. Babacar NDOYE, Directeur Technique et Scientifique de l'I.T.A., pour sa constante disponibilité et sa modestie. Je voudrai lui manifester toute ma reconnaissance.

Dr. Amadou KANE, Chef du Laboratoire d'Analyse Phytosanitaire de l'Institut de Technologie alimentaire, pour sa modestie et les nombreux conseils utiles à un chercheur débutant. Je voudrais lui manifester de toute ma considération.

Tous mes camarades de Laboratoire: Momar T. GUEYE, NDOUR. Tous les agents de l'I.T.A. Tous mes collègues et les techniciens du Département de Biologie animale et singulièrement mon ami Malick FALL, notre frère Cheikhna DIABAKHATE et Michel SARR.

# SOMMAIRE

AVANT PROPOS

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....1

<p style="text-align: center;"><b>CHAPITRE I:</b> <b>PRESENTATION DU CADRE GEOGRAPHIQUE ET DU MODELE BIOLOGIQUE</b> <b><i>CARYEDON SERRATUS</i> / PLANTES HÔTES</b></p>
---

**I. CADRE GEOGRAPHIQUE.....8**

**II. MODELE BIOLOGIQUE *CARYEDON SERRATUS* / PLANTES HÔTES.....10**

II.1. LE RAVAGEUR: *CARYEDON SERRATUS* (OLIVIER).....10

II.1.1. Biologie .....11

II.1.2. Origine et répartition géographique.....16

II.1.3. Plantes hôtes naturelles.....16

II.1.3.1. *Bauhinia rufescens*.....17

II.1.3.2. *Cassia sieberiana*.....18

II.1.3.3. *Piliostigma reticulatum*.....19

II.1.3.4. *Tamarindus indica*.....21

II.1.4 Parasitoïdes.....22

II.2 L'ARACHIDE.....23

II.2.1. Origine et distribution.....24

II.2.2. Pratiques culturelles et commercialisation.....25

II.2.3. Variétés et sélection.....28

II.2.4. Ennemis des cultures et des stocks.....29

II.2.5. Historique de l'infestation de l'arachide au Sénégal.....33

II.2.6. Protection des stocks contre *C. serratus*.....35

**CHAPITRE II:**  
**SEQUENCAGE DE L'ESPACEUR INTERNE TRANSCRIT (ITS 1) DE L'ADN**  
**RIBOSOMIQUE DE *CARYEDON SERRATUS***

INTRODUCTION.....	38
<b>I. MATERIEL ET METHODES D'ETUDE.....</b>	<b>40</b>
I.1. MATERIEL BIOLOGIQUE.....	40
I.2. ETUDE GENETIQUE.....	43
I.2.1. Extraction de l'ADN de <i>Caryedon serratus</i> .....	4
I.2.2. La P.C.R. (Polymerase Chain reaction) de l'ITS1 de <i>Caryedon serratus</i>	
I.2.3. Séquençage de l'ITS1.....	46
I.2.3.1. La réaction de séquence.....	46
I.2.3.2. Précipitation du produit de séquence.....	46
I.3. ANALYSE DES DONNEES.....	47
I.3.1. Analyse des séquences ITS 1.....	47
I.3.2. Reconstruction phylogénétique.....	47
<b>II. RESULTATS .....</b>	<b>49</b>
II.1. SEQUENCES OBTENUES.....	49
II.2. ARBRES PHYLOGENETIQUES.....	54
<b>III. DISCUSSION.....</b>	<b>56</b>
III.1. LES SEQUENCES ITS1.....	56
III.2. RELATION ENTRE POPULATIONS DE <i>CARYEDON SERRATUS</i> .....	57

**CHAPITRE III:**  
**LES MICROSATELLITES CHEZ *CARYEDON SERRATUS*: CARACTERISTIQUES  
ET MODALITES DE VARIATION.**

INTRODUCTION.....	62
<b>I. MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>65</b>
I.1. LE SCREENING DE LOCUS MICROSATELLITES CHEZ <i>C. SERRATUS</i> .....	65
I.2. DETERMINATION DES AMORCES ET PCR RADIOACTIVE .....	70
I.2.1. Les amorces.....	70
I.2.2. La kination.....	70
I.2.3. PCR chaude.....	71
I.2.4. Migration des produits de PCR.....	71
I.3. PARAMETRES GENETIQUES ET STATISTIQUES.....	72
I.3.1. Variabilité génétique .....	72
I.3.1.1. Nombre moyen d'allèles.....	72
I.3.1.2. Fréquences alléliques.....	72
I.3.1.3. Taux de polymorphisme .....	73
I.3.1.4. Hétérozygotie.....	73
I.3.2 Equilibre génétique .....	74
I.3.2.1 Equilibre de Hardy-Weinberg .....	74
I.3.2.2 Equilibre de liaison.....	75
I.3.3 Structure génétique hiérarchique.....	75
I.3.3.1. Indices de fixation.....	75
I.3.3.2 Identité et Distance génétiques de Nei.....	77
I.3.3.3 Flux génique.....	78
I.4. ARBRES PHYLOGENETIQUES.....	78
<b>II. RESULTATS.....</b>	<b>79</b>
II.1. LES MICROSATELLITES SEQUENCES.....	79
II.2. ANALYSE POPULATIONNELLE .....	82
II.3 ANALYSE INDIVIDUELLE.....	90
<b>III. DISCUSSION.....</b>	<b>92</b>
III.1. CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES MICROSATELLITES.....	92
III.2. STRUCTURE POPULATIONNELLE.....	93
III.3. STRUCTURE INDIVIDUELLE.....	97

**CHAPITRE IV :**  
**MECANISMES DE FORMATION ET DE MAINTIEN DES RACES HÔTES CHEZ**  
***CARYEDON SERRATUS*.**

INTRODUCTION.....104

**I. CHOIX DU SITE DE PONTE ET FECONDITE DES FEMELLES.....105**

I.1. MATERIELS ET METHODES.....105

I.2. RESULTATS.....;.....107

I.2.1. Souche Arachide.....107

I.2.2. Souche *Bauhinia rufescens*.....108

I.2.3. Souche *Cassia sieberiana*.....109

I.2.4. Souche *Piliostigma reticulatum*.....110

I.2.5. Souche *Tamarindus indica*.....111

I.2. DISCUSSION.....112

**II. INTERFECONDITE DES SOUCHES ET SURVIE DES LARVES.....114**

II.1. MATERIELS ET METHODES.....114

II.2. RESULTATS.....116

II. 3. DISCUSSION.....118

**III. RECONNAISSANCE ET FIDELITE A L'HÔTE.....120**

III.1. MATERIELS ET METHODES .....120

III.1.1. Les bruches utilisées.....120

III.1.2. Zone d'étude.....120

III.1.3. Expérimentations.....122

III.2. RESULTATS.....122

III.2.1. Souche "Arachide".....122

III.2.2. Souche "Bauhinia".....123

III.2.3. Souche "Cassia".....124

III.2.4. Souche "Piliostigma".....124

III.2.5. Souche "Tamarindus".....125

III.3. DISCUSSION.....126

**CHAPITRE V:**  
**SOURCES DE CONTAMINATION DE L'ARACHIDE PAR *CARYEDON***  
***SERRATUS* ET MISE EN ŒUVRE DES RESULTATS GENETIQUES**

INTRODUCTION.....130

**I. SOURCES DE CONTAMINATION DE L'ARACHIDE PAR *C. SERRATUS*.....130**

I.1.- MATERIEL ET METHODES.....131

I.1.1. Les parcelles.....131

I.1.2. Les variétés d'arachide.....131

I.1.3. Echantillonnage.....131

I.1.4. Paramètres analysés.....133

I.2. RESULTATS.....134

I.3. DISCUSSION.....141

**II. MISE EN ŒUVRE DES RESULTATS GENETIQUES.....142**

II.1. MATERIEL ET METHODES.....142

II.1.1. Zone d'étude.....142

II.1.3. Expérimentations.....143

II.1.4. Paramètres analysés.....145

II.2. RESULTATS.....145

II.3. DISCUSSION.....149

**CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATIONS.....151**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....157**

**ANNEXES.....181**

# **INTRODUCTION GENERALE**

L'arachide occupe une place prépondérante dans le système économique du Sénégal. Plus de la moitié des surfaces cultivables est occupée par la culture de l'arachide. Cette légumineuse rapporte chaque année environ 80 milliards de FCFA, ce qui représente 40% de l'ensemble des exportations du pays. Très riche en protéines et en calories (50% de lipides, 25% de protéines), cet oléagineux constitue également un apport nutritif très important pour les populations locales.

Peu d'insectes sont capables d'attaquer l'arachide en coque ; parmi ceux-ci, celui qui cause le plus de dégâts dans les productions est un Insecte Coléoptère appartenant à la famille des Bruchidae : *Caryedon serratus* (Olivier), communément appelé bruche de l'arachide. Dans la nature, cette bruche est capable de se développer sur plusieurs plantes hôtes de la famille des Caesalpiniacées appartenant essentiellement aux genres *Bauhinia*, *Cassia*, *Piliostigma* et *Tamarindus*. Généraliste (d'après la définition de Johnson et Slobodchikof, 1979) *Caryedon serratus* s'est secondairement attaquée à l'arachide (*Arachis hypogaea* L.), hôte sur lequel on la signale, vers 1910, à Java et au Sénégal (Davey, 1958). Les dommages qu'elle occasionne sur l'arachide peuvent aller jusqu'à 83% de perte quantitative pour une durée de stockage de 4 mois. De plus, les trous faits dans la coque par les larves favorisent l'attaque d'autres insectes tels que *Trogoderma* spp., *Tribolium* spp., *Oryzaephilus mercator*, *Ephestia cautella* et facilitent le développement d'une moisissure (*Aspergillus flavus*) productrice d'une substance cancérigène : l'aflatoxine. Les pertes interviennent à tous les stades, de la récolte à la consommation : d'abord chez le producteur, qu'il s'agisse de stocks destinés à sa propre consommation ou représentant ses prochaines semences ou en attente d'être commercialisés ; puis pendant le transport vers les lieux communs de stockage et au cours de celui-ci ; enfin dans les stov des commerçants. Toutes ces pertes sont d'autant plus dommageables qu'elles affectent le produit une fois récolté ; elles ne nuisent pas seulement au paysan mais coûtent aussi très chères à l'économie nationale.

L'élimination des insectes responsables de ces pertes pose, pour un pays en voie de développement, des problèmes quelque peu différents de ceux qu'on rencontre habituellement dans les pays développés. La question qui se pose est de savoir comment éliminer des stocks d'arachide les populations de bruches ou prévenir leurs attaques sans forcément disposer de moyens sophistiqués de traitement de prévention et de stockage dont

bénéficient les pays du nord ; il s'agit aussi de circonscrire l'infestation et de protéger des villages ou des régions non encore touchées par le ravageur. Ceci n'est possible que dans la mesure où nous disposons d'un certain nombre d'éléments, en particulier une bonne connaissance de la biologie et de l'écologie de l'insecte, de la dynamique de ses populations au cours de l'année, de l'origine des femelles responsables de l'infestation de l'arachide nouvellement récoltée.

Des mécanismes multiples et probablement complexes déterminent les relations existant entre les différentes espèces hôtes et les populations de la bruche de l'arachide. Cette bruche n'infeste pas l'arachide dans toutes les zones où cette plante est cultivée. C'est le cas par exemple de l'Amérique du Sud, continent d'origine de l'arachide. Par ailleurs, des études de comportements de ponte ont mis en relief le rôle du substrat de développement larvaire (plante hôte d'origine), et ont incité les auteurs à définir, au sein de l'espèce *Caryedon serratus*, des souches dont chacune est inféodée à une plante hôte donnée (Robert, 1984 ; Ali-Diallo, 1991). D'autre part, il existe chez *C. serratus* une plasticité dans la ponte induisant une oligophagie qui permet à l'espèce d'utiliser aussi bien les stocks d'arachide lorsque ceux-ci deviennent accessibles que les Caesalpiniaceae.

Un mode de lutte raisonnée, reposant sur d'autres principes que la destruction systématique des insectes par voie chimique, ne peut se développer sans la connaissance du statut des populations auxquelles on a affaire. Ceci nous a amené à nous poser un certain nombre de questions dans une précédente étude (Sembène, 1997) : quelle est l'influence du morcellement des sites de ponte sur la structuration génétique de la bruche de l'arachide? Comment se définissent les souches de *C. serratus* par rapport à différentes localités sénégalaises? Dans quelle mesure peut-on relier les différentes sous-populations de la bruche de l'arachide à l'existence de plusieurs plantes hôtes ? Quelles relations existent entre les bruches des différents hôtes naturels et celles infestant l'arachide? Quelles sont les affinités phylogénétiques entre populations sympatriques de plantes hôtes différentes ou allopatriques de même plante hôte? Ce questionnement est d'autant plus fondé que des études de phylogénie faites au niveau du genre *Caryedon* en combinant des caractères morphologiques et génétiques ont révélé que *Caryedon serratus*, actuellement consommatrice de Caesalpiniaceae est phylogénétiquement plus proche des *Caryedon* consommatrices de mimosaceae (Silvain & Delobel, 1998).

Les résultats obtenus dans une précédente étude, après caractérisation morphométrique (Sembène & Delobel, 1996) et études allozymiques (Sembène *et al.*, 1998 ; Sembène & Delobel, 1998) sur des populations sympatriques et allopatriques de la bruche de l'arachide révèlent qu'il existe plusieurs biotypes de *Caryedon serratus*, chacun d'eux étant inféodé à une plante ou un groupe de plantes hôtes et l'isolement entre eux n'est que partiel. Il existe alors une forte différenciation génétique entre les *C. serratus* issus de *C. sieberiana* et ceux inféodés aux quatre autres plantes hôtes. Les flux géniques sont très importants entre l'arachide et *Piliostigma reticulatum* (250 individus par génération). La conclusion qui s'était dégagée est que l'infestation primaire de l'arachide nouvellement récoltée, serait due à un nombre faible de femelles de *C. serratus* dont le développement s'est maintenu sur les gousses résiduelles de *P. reticulatum* pendant la saison pluvieuse.

Si ces conclusions ont permis, d'une part de mieux comprendre les relations existant entre *C. serratus* et ses plantes hôtes et, d'autre part, d'émettre des hypothèses quant à la dynamique d'infestation de l'arachide nouvellement récoltée, elles soulèvent des questions de plus en plus importantes aussi bien sur la biologie évolutive de *C. serratus* que sur le rôle des plantes hôtes naturelles dans l'infestation de l'arachide ; l'utilisation de marqueurs plus fins (séquences d'ADN, locus microsatellites) semble incontournable pour répondre plus nettement aux nombreuses questions qui restent à élucider.

Au niveau de la biologie évolutive, il est évident que la différenciation en races hôtes est un phénomène largement discuté chez les insectes phytophages. En effet dans beaucoup de cas, elle est observée après l'introduction d'une nouvelle plante. Chez le doryphore *Leptinotarsa decemlineata* qui se développe aux dépens d'une douzaine de Solanacées, des races hôtes sont apparues après l'introduction de *Solanum tuberosum* (Hsiao, 1978 ; 1982). Cette différenciation est aussi décrite chez la mouche *Rhagoletis pomonella* (Feder & Bush, 1989) et d'autres espèces de *Rhagoletis* (Bush & Diehl, 1984). Comme le souligne Tabashnik (1983) ce type de modèle semble très intéressant pour étudier les relations évolutives existantes entre un insecte phytophage et ses différentes plantes hôtes. Le cas *C. serratus* / plantes hôtes semble être l'un des exemples les plus pertinents du phénomène de différenciation sympatrique chez les insectes phytophages (Sembène & Delobel, 1998). Or ce phénomène est largement combattu par des auteurs

comme Mitter et Futuyma (1979) pour qui il y a de rares exemples, au sein de populations sympatriques, d'isolement lié à la nature de la plante hôte. Les conditions d'une telle différenciation sont peu probables : les accouplements devraient se faire de préférence avec des partenaires provenant de la même plante hôte. Ces hypothèses sont combattues par de nombreux auteurs (Bush & Diehl, 1982 ; Feder, 1994) car il y a au moins autant de variabilité génétique liée au choix de l'hôte chez des populations sympatriques qu'entre populations allopatriques nettement isolées.

Il est donc essentiel pour confirmer ou infirmer les résultats obtenus après électrophorèse, d'utiliser des marqueurs génétiques plus variables et surtout moins sujets à des critiques car la question de la validité des estimations du polymorphisme à partir des résultats obtenus par électrophorèse se pose. Le degré du polymorphisme peut être sous-estimé parce que l'électrophorèse ne permet pas de révéler de nombreuses substitutions d'acides aminés. De même, l'électrophorèse peut aussi conduire à surestimer le degré de polymorphisme car les enzymes généralement étudiées sont celles qu'on trouve à des concentrations élevées dans les tissus ou les liquides circulants.

Si une telle différenciation génétique est confirmée chez *C. serratus*, il est indispensable sur le plan agronomique de définir la part de chaque plante hôte naturelle et des greniers dans la population de bruches infestant l'arachide nouvellement récoltée. Il importe de connaître le statut de ces femelles responsables de l'infestation primaire, car la prévention sera menée différemment selon qu'il s'agit d'insectes provenant de stocks anciens ou d'hôtes sauvages ou alors de femelles quiescentes. Inversement les rares gousses restant dans les greniers sont-elles à l'origine de la réinfestation de certains hôtes sauvages à certaines périodes de l'année? Sur quelles distances une telle réinfestation est-elle possible? Il est donc essentiel pour nous d'utiliser d'autres marqueurs plus directs et hypervariables pour tenter de répondre à toutes ces questions qui restent encore non élucidées.

Notre travail comporte 5 chapitres:

- Dans le premier chapitre, nous présenterons le cadre géographique de notre travail et le modèle biologique *Caryedon serratus* / plantes hôtes.

- Le deuxième chapitre consistera à explorer directement le génome de *Caryedon serratus* afin de chercher s'il existe des différences dans les séquences nucléotidiques de différentes souches inféodées à des plantes hôtes différentes. Nous tenterons donc de séquencer le gène de l'Espaceur Interne Transcrit (ITS1) de l'ADN de différentes souches de *Caryedon serratus*

- Dans le troisième chapitre, la structuration génétique de différentes souches de *Caryedon serratus* sera étudiée grâce à des locus microsatellites qui sont des marqueurs hypervariables. Les microsatellites qui sont des zones hautement mutationnelles (Miklos, 1985), permettent de détecter des différenciations plus fines.

- Dans le chapitre IV, nous essaierons donc de mettre en exergue chez la bruche de l'arachide les mécanismes qui induisent et maintiennent la formation des races hôtes si l'existence de celles-ci est confirmée par les marqueurs utilisés.

- Le chapitre V sera consacré à l'étude des sources d'infestation de l'arachide au champ et à la mise en œuvre au terrain des résultats obtenus après caractérisation génétique des différentes souches de *Caryedon serratus*.

Nous terminerons ce travail par des recommandations et une conclusion générale.

**CHAPITRE I**

**PRESENTATION DU CADRE GEOGRAPHIQUE ET DU  
MODELE BIOLOGIQUE *CARYEDON SERRATUS* /  
PLANTES HÔTES**

## I. CADRE GEOGRAPHIQUE

Situé à l'ouest du continent africain, le Sénégal est compris entre 12°18' - 16°41' de latitude Nord et 10°21' - 17°32' de longitude Ouest. Il s'étend sur une superficie de 196.192 km<sup>2</sup>. Les régions phytogéographiques naturelles sont essentiellement déterminées par la pluviométrie. La zonation nord-sud des isohyètes permet de distinguer les régions sahélienne, soudanienne et guinéenne. A cheval entre deux grandes régions, se situent des domaines intermédiaires: sahélo-soudanien, soudano-sahélien, soudano-guinéen et guinéo-soudanien. On distingue une façade maritime appelée zone côtière, soumise aux influences océaniques.

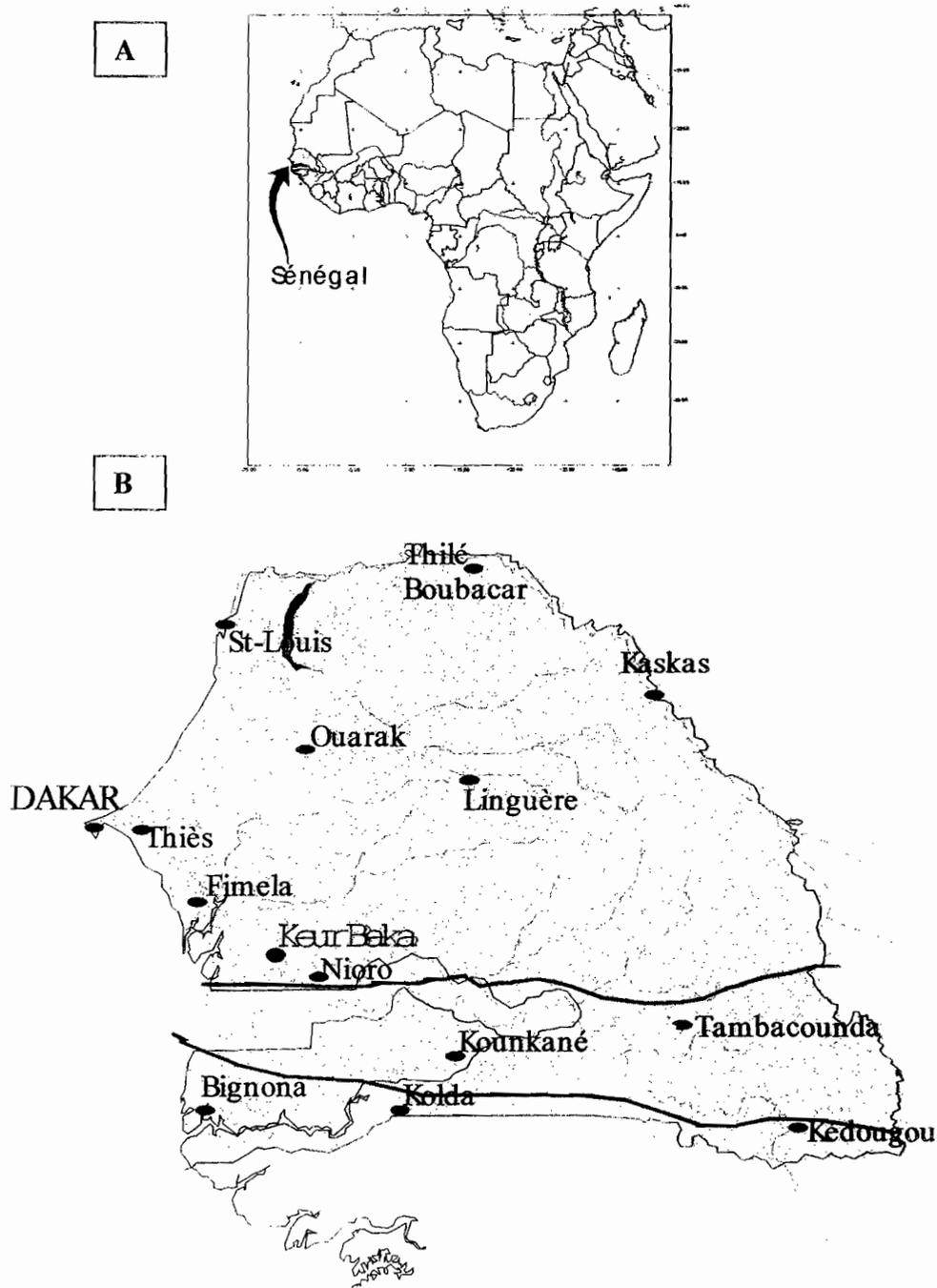
Au Nord , dans la région sahélienne (s.s.), où la saison des pluies dure à peine trois mois (pluviométrie annuelle < 300 mm), le paysage est constitué de prairies estivales composées essentiellement d'herbes annuelles. Une végétation arbustive existe également, mais elle ne dépasse guère 5 à 6 m avec quelques arbres atteignant 8 à 10 m de haut. Les espèces dominantes sont *Acacia raddiana*, *A. senegal*, *Balanites aegyptiaca*, *Boscia senegalensis*, *Ziziphus mauritiana*, *Capparis decidua*, *Leptadenia spartium*, *Chloris prieuri...* etc.

Dans le domaine sahélo-soudanien (500 à 700 mm de pluie) commencent à apparaître des espèces soudaniennes (*Sterculia* spp., *Adansonia digitata*, *Bombax costatum...*etc.). Les herbes annuelles sont dominantes mais beaucoup de graminées vivaces occupent le sol.

Les herbes et arbres soudaniens dominant dans le domaine soudano-sahélien (pluviométrie comprise entre 700 et 900 mm). Quand la pluviométrie atteint 1000 mm, la physionomie générale du paysage est celle d'une forêt sèche composée d'arbres à feuilles caduques tombant de novembre à mai.

Des climats locaux et des sols différents rompent l'homogénéité de ces trois grandes divisions et font apparaître des formations variées. Par exemple, le long de la côte nord, entre Saint-Louis et Dakar où soufflent pendant six mois les alizés du nord, frais et humides, on trouve des steppes à graminées piquetées d'*Acacia raddiana* et *A. albida* dans les sols sableux (Les Niayes). Au sud de Dakar et jusqu'à la Guinée Bissau, les estuaires envasés sont bordés de mangroves à palétuviers. Ailleurs, dans les sols humides à faible profondeur, se développent des ronciers, palmeraies à *Borassus aethiopicum*.

Les températures maximales notées au Sénégal peuvent être élevées. 48°C sont observés couramment en saison sèche, dans la zone sub-désertique. Les écarts thermiques, déjà notables dans la partie occidentale du pays, tendent à s'accroître encore davantage vers les régions est et sud: de 22 à 34 °C à Thiès et de 20 à 40 °C à Tambacounda, ville située au sud-est du Sénégal.



Figures A et B : le Sénégal : position en Afrique (A) et principaux sites d'étude (B)

## II. MODELE BIOLOGIQUE *CARYEDON SERRATUS* / PLANTES HÔTES

### II.1. LE RAVAGEUR : *CARYEDON SERRATUS* (OLIVIER)

La "bruche de l'arachide" a été classée successivement dans les genres *Bruchus*, *Caryoborus* et *Pachymerus*. La première mention connue de cet insecte remonte à la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle. L'entomologiste français Olivier reçoit de Geoffroy de Villeneuve, en voyage au Sénégal, plusieurs exemplaires d'une bruche qu'il décrit en 1790 sous le nom de *Bruchus serratus* ; la plante hôte de cet insecte n'est malheureusement pas spécifiée (Delobel, 1992). Le même insecte sera décrit en 1798 sous le nom de *Bruchus gonagra* par Fabricius, à partir de spécimens provenant de l'Inde, puis par Pic sous le nom de *Bruchus sicutensis* (Decelle, 1966) à partir d'exemplaires originaires du Zaïre. Auparavant il a été décrit des comptoirs français de l'Inde, vivant dans les graines du tamarinier (*Tamarindus indica*) sous le nom de *Caryoborus tamarindi* ; la description précise de cet insecte et les éléments de sa biologie fournis par l'auteur correspondent en tous points à celles de *Caryedon serratus*. Mais, à la suite des travaux de Southgate & Pope (1957), Mujerki & Ramdas Menon (1957) et Prevett (1965), Decelle (1966) fit une révision systématique de la bruche de l'arachide après observation et dissection d'exemplaires types provenant des récoltes de Geoffroy de Villeneuve au Sénégal. Il indiqua que les appellations antérieures comme *Caryedon acaciae* Gyll., *Caryedon cassiae* Gyll., *Caryedon fuscus* Goeze, étaient abusives et erronées et que ces bruches désignent en réalité d'autres espèces. Depuis ces études la synonymie de la bruche de l'arachide s'établit comme suit :

*Bruchus serratus* Ol. , 1790,  
*Caryoborus serratus* (Ol. ),1790,  
*Bruchus gonagra* F.,1798,  
*Caryoborus gonagra* (F.), 1798,  
*Pachymerus gonager* (F. ), 1798,  
*Caryedon gonagra* (F. ), 1798,  
*Caryoborus fuscus* Bedel, 1901,  
*Pachymerus fuscus* (Bedel), 1901.  
*Caryedon fuscus* (Bedel), 1901,  
*Pachymerus sicutensis* Pic, 1924.

Un seul nom, *Caryedon serratus*. est retenu après les travaux de Decelle (1966) ; la position systématique actuelle est la suivante:

Embranchement des Arthropodes

Classe des Insectes

Ordre des Coléoptères,

Famille des Bruchidae,

Sous-famille des Pachymerinae,

Tribu des Caryedini,

Genre *Caryedon*

Espèce *serratus*.

Le genre *Caryedon* qui comporte une trentaine d'espèces morphologiquement très voisines, est réparti dans une vaste zone qui s'étend de la pointe occidentale de l'Afrique aux îles Moluques, du sud de la Méditerranée à Madagascar (Borowiec, 1987). *Caryedon serratus* est la seule espèce du genre actuellement inféodée à une légumineuse alimentaire cultivée en Afrique malgré l'importance de ce genre sur ce continent (Decelle, 1981; 1987).

### II.1.1. Biologie

L'adulte de *C. serratus* (Fig. 1a) mesure 6 mm de long et 2 à 2,3 mm de large (Delobel & Tran, 1993). Il est de couleur brun-noirâtre. Les fémurs postérieurs sont fortement dilatés et présentent des dents sur le bord intérieur. Les tibias sont recourbés en arc de cercle. Appert (1954), Cancela da Fonseca (1964) et Pajni & Mann (1979) notent que les adultes de *C. serratus* ont une activité crépusculaire. Gagnepain *et al.* (1986) et Boucher & Pierre (1988) font état d'une activité nocturne ne s'arrêtant qu'aux heures chaudes de la matinée. Les adultes émergeant des cocons sont sexuellement mûrs et l'accouplement qui dure 25 à 40 mn à 30°C et 70% HR (Pajni & Mann, 1979), a lieu en général moins de 24 h après l'émergence (Cancela Da Fonseca, 1964 ; Ndiaye, 1981). Un spermatophore est déposé dans la bourse copulatrice de la femelle. Boucher & Huignard (1987) pensent que le dépôt de spermatophore dans la bourse copulatrice influe sur l'activité reproductrice des femelles par stimulation de l'ovogenèse et de la ponte comme chez *Acanthoscelides obtectus* (Huignard, 1976; Pouzat, 1977; Labeyrie 1977 ; 1978 a et b). Ces résultats n'ont pas été totalement confirmés par Delobel (1989a) qui note chez *C. serratus* que "... l'insémination ne paraissent pas avoir d'effets sur l'ovogenèse".



Figure 1a : Adultes de *C. serratus* sur graines de *P. reticulatum*. En face dorsale, le mâle (m) a le dernier tergite abdominal recouvert par les élytres, la femelle (f) a le dernier tergite abdominal nu.



Figure 1b : mâle et femelle en face ventrale ; la flèche indique le dernier tergite abdominal incurvé chez le mâle et servant d'organe de copulation.

La femelle pond ses oeufs peu de temps après l'accouplement, pendant la nuit, sur les gousses, de préférence dans les creux et crevasses. L'oeuf (Fig. 2a), de couleur blanche, est de forme ovoïde ( $L= 1$  mm) ; le chorion est finement réticulé. A jeun, la fécondité moyenne varie de 20 à 115 oeufs, suivant les conditions de température et d'humidité. En présence de nourriture (pollen) et d'eau, elle peut augmenter jusqu'à 650 oeufs (Delobel, 1989a). La fécondité moyenne et la production ovarienne de *C. serratus* dépendent de facteurs comme l'accouplement (Boucher & Huignard, 1987) et la présence de la plante hôte (Delobel, 1989a) qui stimulent l'ovogenèse et la ponte.

L'oeuf éclôt au bout d'une semaine environ (Ndiaye, 1981; Robert, 1984) et la larve néonate perfore la cosse de la gousse, traverse le péricarpe, perce le tégument et pénètre dans la graine dont elle se nourrit. Le développement larvaire qui dure deux à trois semaines à 35-40° C peut s'effectuer dans une ou plusieurs graines.

Quatre stades larvaires sont identifiés par Prevet (1967). Les larves (Fig. 2b) sont dodues et arquées, de couleur rosâtre avec une tête marron. Celles de deuxième et troisième stade, peu mobiles, ont des pattes réduites (Johnson & Kister, 1987). La larve de dernier stade, après avoir consommé la presque totalité des cotylédons, découpe dans le tégument de la graine et la coque de la gousse, un trou d'environ 3 mm de diamètre (Appert, 1954). Pierre & Huignard (1990) notent que la sortie et la chute des larves de quatrième stade ont lieu lors du passage jour/nuit.

La nymphose a lieu soit dans un cocon tissé au niveau de l'orifice réalisé dans la graine (Fig. 3a), soit dans un cocon collé sur une gousse ou dans le sol (Conway, 1975). Environ deux semaines après la nymphose, les adultes émergent des cocons (Fig. 3b). Dans certaines situations, on constate un étalement très important des émergences ; l'intervalle entre les premières et les dernières sorties pouvant atteindre jusqu'à 4 mois. Il pourrait s'agir d'un mécanisme de quiescence à l'intérieur du cocon, qui serait lié à l'humidité (Robert, 1984). Dans la journée, l'adulte se cache dans toutes sortes d'abris : interstices, crevasses d'écorce, ou même regagne son ancien cocon . Il peut se nourrir ou absorber diverses substances : pollen, moisissures, liquides sucrés, eau. C'est apparemment un bon voilier, encore qu'aucune évaluation des capacités migratoires ait pu être faite à ce jour.

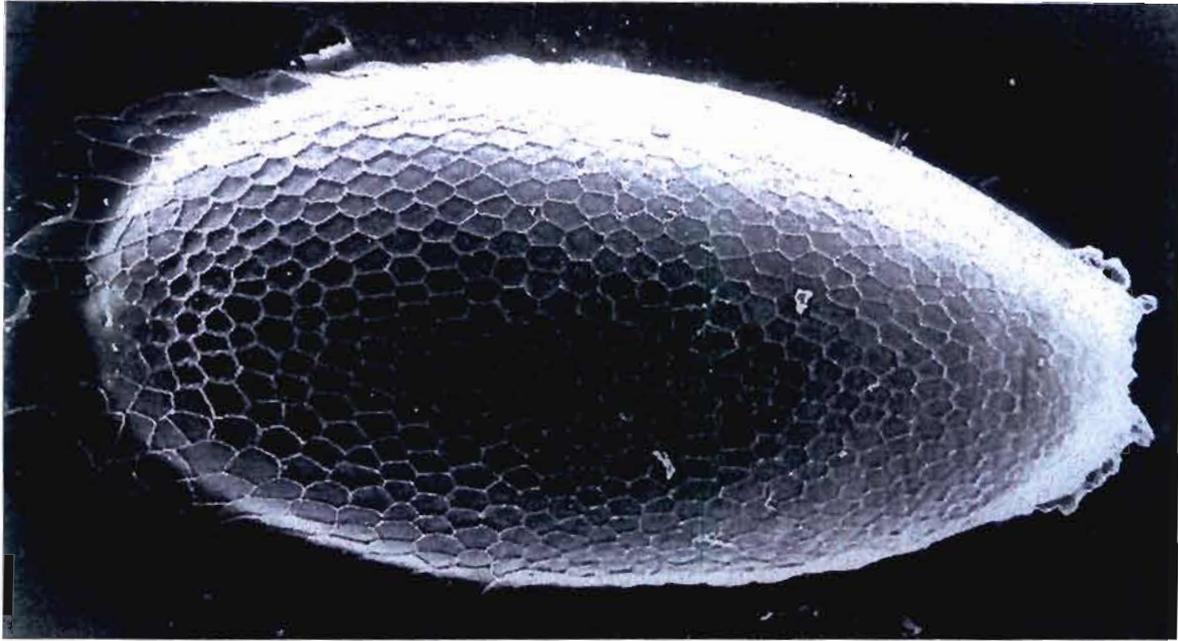


Figure 2a : oeuf de *C. serratus* vu au microscope électronique à balayage



Figure 2b : larve de dernier stade, sortie de la graine et cherchant à nymphoser.

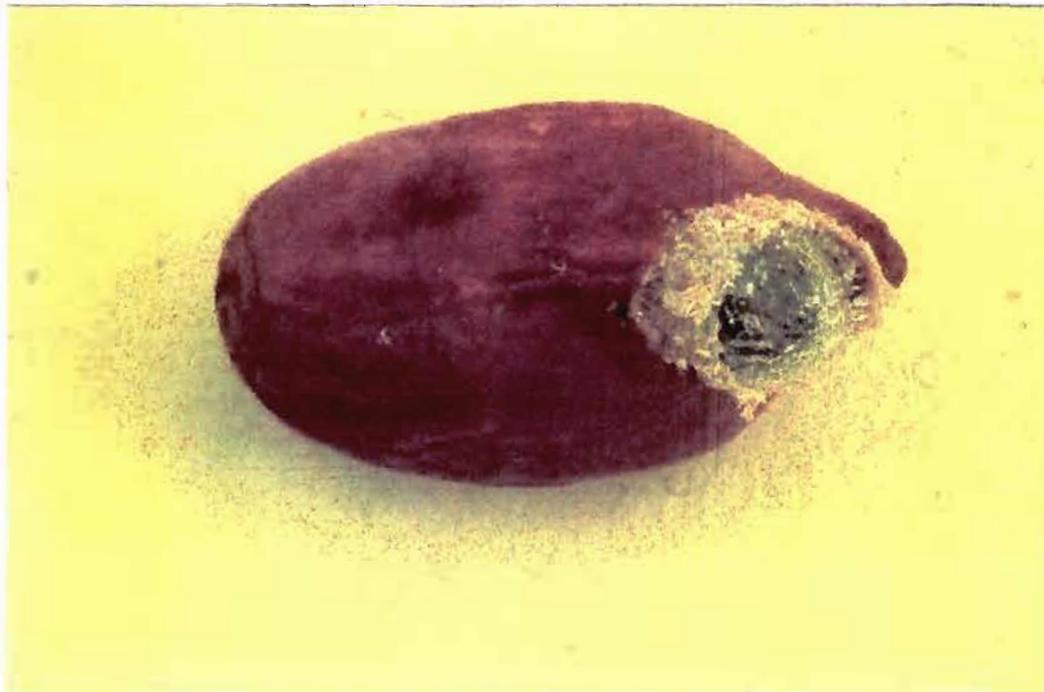


Figure3a : cocon de *C. serratus* formé à l'intérieur d'une graine d'arachide

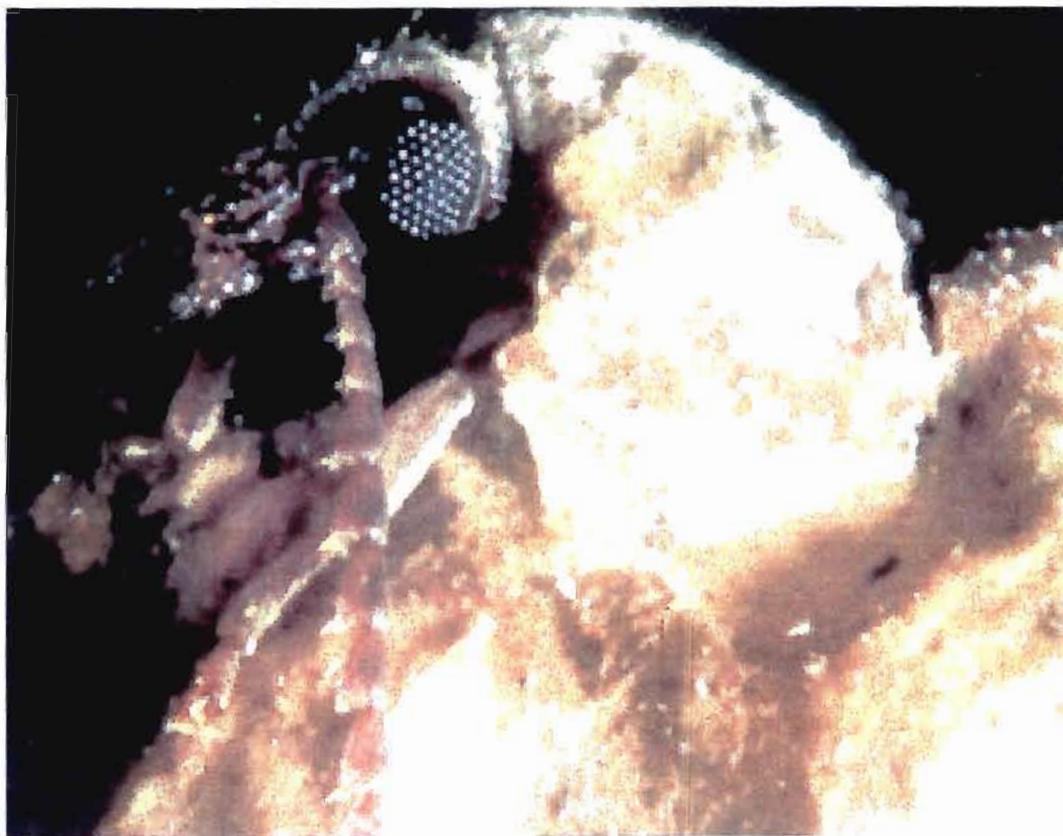


Figure3b : adulte de *C. serratus* émergeant de son cocon

### II.1.2. Origine et répartition géographique

Selon Decelle (1966), *Caryedon serratus* est un insecte d'origine africaine ; sa plante hôte initiale serait *Tamarindus indica*. A la lumière des informations apportées par les descriptions des anciens auteurs, on peut estimer qu'au début du XX<sup>ème</sup> siècle, l'aire de répartition de *C. serratus* était à peu près identique à celle du genre. La vaste dissémination de cette bruche serait due à la commercialisation du tamarin et de l'arachide. C'est une bruche qui existe en effet dans presque toute l'Afrique tropicale, surtout dans les régions de savanes arborées : Mauritanie, Sénégal, Mali, Guinée-Bissau, Côte d'Ivoire, Ghana, Burkina Faso, Niger, Tchad, Nigeria, Cameroun, Soudan, Ethiopie, Kenya, Tanzanie, Zimbabwe, Zaïre, Congo-Brazzaville (Decelle, 1987). Elle a été aussi introduite dans les îles Mascareignes (La Réunion, Maurice, Rodriguez) et dans les îles Seychelles à Mahé (Decelle, 1987). Elle a été récemment signalée (comme ravageur de l'arachide) en République Centrafricaine (Koyabay, 1988). Outre l'Afrique et Madagascar, l'aire de dispersion actuelle de *C. serratus* couvre plusieurs régions tropicales d'Asie et d'Océanie, ainsi qu'une partie des régions néotropicales : Colombie (Velez Angel, 1972), Jamaïque et Mexique (Johnson & Kingsolver, 1981).

### II.1.3. Plantes hôtes naturelles

Dans la nature, la liste des plantes hôtes sur lesquelles se développe *Caryedon serratus* est difficile à établir en raison même de l'imprécision qui a longtemps caractérisé l'identité de cette espèce. Davey (1958) cite dans un recensement bibliographique un nombre considérable de légumineuses hôtes de *Caryedon serratus*. Ses travaux seront revus par d'autres auteurs à cause des confusions taxinomiques qu'ils renferment. C'est Prevett (1965, 1966 a et b; 1967) qui établit au Nigeria et en Ouganda l'inventaire des plantes hôtes de la bruche de l'arachide : *Bauhinia rufescens* Lam., *Cassia arereh* Del., *Cassia sieberiana* DC., *Piliostigma reticulatum* (DC.) Hochst., *Piliostigma thonningii* (Schum.) Milne-Redh., *Tamarindus indica* Linné parmi les Caesalpinaceae; *Arachis hypogaea* L. parmi les Fabaceae. Decelle (1987) cite les mêmes espèces mais ajoute *Bauhinia monandra* Kurz. Ces hôtes\* de *Caryedon serratus* présentent des différences aussi bien par l'aspect des organes végétatifs, la structure des gousses (taille, couleur, présence ou non de pulpe ou de tissu fibro-ligneux, disposition des graines) que par la taille et probablement la composition chimique des graines.

\* La description des plantes hôtes sauvages de *C. serratus* est tirée en partie de Berhaut (1967) et de Maydell (1990). Il faut noter en outre que le nom *Piliostigma* a été mis en synonymie avec *Bauhinia*. Les noms valides sont donc *Bauhinia reticulata* DC et *Bauhinia thonningii* Schum. Les anciens noms sont conservés dans la suite du texte

### II.1.3.1. *Bauhinia rufescens* Lam. ("rand" en Woloff)

Les *Bauhinia rufescens* (Fig. 4a) sont des arbustes que l'on rencontre dans les zones sahélo-sahariennes et sahéliennes. Ils mesurent entre 3 et 6 mètres de haut et portent des gousses aplaties, indéhiscentes, de couleur brun-rougeâtre (Fig. 4b). Les graines, approximativement cubiques, sont disposées en file. Le péricarpe épouse la forme des graines et les isole par une ou deux.



Figure 4a : *Bauhinia rufescens* ; vue générale de l'arbre



Figure 4b : gousses de *Bauhinia rufescens*. L'arbre fructifie toute l'année.

II.1.3.2. *Cassia sieberiana* DC. ("Sendiegn" en Woloff)

Les *Cassia sieberiana* (Fig. 5) sont de petits arbres d'environ 10 m de haut que l'on rencontre surtout dans les zones sahélo-soudaniennes. Ils portent des gousses indéhiscentes, cylindriques, ligneuses, très longues (environ 40 à 60 cm), de couleur brun noir. Les graines ovoïdes sont disposées en une seule rangée, séparées les unes des autres par une mince cloison ligneuse.



Figure 5 : *Cassia sieberiana* ; les gousses peuvent atteindre jusqu'à 60 cm de long.

II.1.3.3. *Piliostigma reticulatum* (DC.) Hochst ("Nguiguiss" en Woloff).

Il est aussi appelé *Piliostigma reticulata* ou *Bauhinia reticulata* (DC.). Les *Piliostigma reticulatum* (Fig. 6a) poussent sous forme d'arbustes ou d'arbres dans les régions sahélo-soudaniennes). Les arbres portent de grandes gousses (Fig. 6b) de couleur brun rougeâtre, aplaties, indéhiscentes à péricarpe dur et fendillé. Les graines ovoïdes sont régulièrement dispersées dans un tissu fibro-ligneux.



Figure 6a : *Piliostigma reticulatum*; les gousses matures sont bruns rougeâtre



Figure 6b : gousses de *Piliostigma reticulatum* en maturation ; *Caryedon serratus* dépose ses œufs de préférence sur les parties brunes



Figure 7a : gousses de *P. reticulatum* en décomposition sur le sol



Figure 7b : paquet de cocons de *C. serratus* sur gousses de *P. reticulatum* de l'année précédente

II.1.3.4. *Tamarindus indica* Linné ("Dakhar" en Woloff).

*Tamarindus indica* serait originaire d'Afrique tropicale et non d'Inde comme son nom l'indique. Les arbres (Fig. 8a) sont souvent très grands (15 à 25m de haut) et produisent une grande quantité de fruits à usage culinaire et médicinal. Les gousses (Fig. 8b) sont indéhiscentes, mauve clair et subcylindriques. Les graines (Fig. 8b), de forme approximativement carrée sont disposées en file dans une épaisse pulpe brun foncé et sucrée à maturité



Figure 8a : *T. indica* : les gousses sont petites et difficiles à distinguer sur une vue générale



Figure 8b : détails des gousses et graines de *T. indica*

La phénologie des différentes espèces n'est pas identique mais on peut cependant en tirer une règle générale. Ces arbres fleurissent d'Août à Octobre ; leurs gousses mûrissent au début de la saison sèche (novembre-décembre) et restent longtemps présentes sur l'arbre avant de tomber sur le sol où elles se dégraderont lentement à l'image de celle de *Piliostigma reticulatum* (Fig.7a). Aucune gousse de ces plantes hôtes de *C. serratus* ne subsiste sur l'arbre pendant la saison des pluies (Août à Octobre) excepté sur *B. rufescens* qui fructifie toute l'année.

#### II.1.4. Parasitoïdes

Dans la nature, différents Hyménoptères parasitoïdes appartenant aux genres *Bracon* et *Entedon* ont été récoltés par Prevett (1966) sur *C. serratus* se développant sur des Caesalpinaceae sauvages au Nigéria. En Côte d'Ivoire, Rasplus (1988) décrit une nouvelle espèce de Pteromalidae, *Anisopteromalus caryedophagus*, ectoparasitoïde grégaire des larves et nymphes de *C. serratus*, séminivore de *P. thonningii*. Cette espèce est également signalée au Congo et au Niger.

C'est en 1989 que Gagnepain et Rasplus ont fait la revue des parasitoïdes de *C. serratus* et ont établi la liste suivante:

-*Uscana caryedoni* Viggiani Trichogramme qui se développe aux dépens des oeufs de *C. serratus* avec un taux de parasitisme variant de 3% au début des pontes à 30,0 % durant la seconde phase de la ponte en janvier ;

-*Anisopteromalus caryedophagus* Rasplus ; le taux de parasitisme est difficile à évaluer, mais près de 90 % des cocons dans les pièges sont infestés ;

-*Bracon (Ophtalmobracon)* sp. ; ce sont des ectoparasites s'attaquant fréquemment à *C. serratus* et dont la révision systématique n'est pas encore entreprise ;

-quelques espèces sporadiques : *Proconura serratocida* Rasplus et *Eurytoma caryedonicida* Rasplus.

## II.2. L'ARACHIDE

L'arachide (*Arachis hypogaea* L., Fabaceae) est une légumineuse herbacée annuelle dont les gousses se développent dans le sol (Fig. 9). Celles-ci sont indéhiscentes et renferment une à trois graines. Cet oléagineux constitue, dans certains pays comme le Sénégal, une denrée d'exportation, source d'importantes rentrées de devises. De plus, les graines, riches en calories, constituent un apport nutritif très important pour les populations locales.



Figure 9 : plante d'arachide en début de fructification

### II.2.1. Origine et distribution

Comme de nombreuses autres plantes utiles telles que le maïs, la pomme de terre, le haricot, le tabac et le cacaoyer, l'arachide est originaire du Nouveau Monde. Mais, sans doute en raison de sa moindre importance aux yeux des explorateurs de l'Amérique et des grands voyageurs, son origine et l'histoire de sa distribution dans le monde sont demeurées longtemps obscures. L'hypothèse d'une origine africaine avancée par plusieurs auteurs du XIX<sup>ème</sup> siècle était essentiellement fondée sur les descriptions trouvées chez certains auteurs grecs (Theophraste et Pline) de plantes à fructification souterraine cultivées en Egypte et dans d'autres régions du bassin méditerranéen. On sait aujourd'hui que ces descriptions ne s'appliquaient pas à l'arachide et que le terme *Arakos* en particulier désignait *Lathyrus tuberosa* (Chevalier, 1935). De même, aucun argument valable ne peut être apporté en faveur de l'hypothèse d'une origine asiatique, encore moins d'une double origine africaine et américaine de la plante. Une preuve objective de l'origine américaine de l'arachide est constituée par la découverte de graines semblables à celles des variétés actuellement cultivées au Pérou dans les tombes précolombiennes à Ancon, Pachamac et autres lieux par Squier, vers 1875. D'autre part, bien que l'espèce cultivée ne soit pas connue à l'état sauvage, l'absence d'autres espèces du genre *Arachis* dans les autres parties du monde et leur abondante distribution dans une zone allant du Brésil à l'Argentine située approximativement entre 10° et 35° de latitude Sud, confirment l'origine Sud-Américaine de la plante. On admet actuellement que celle-ci est originaire de la région du Grand Chaco incluant les vallées du Paraguay et du Parana (Gillier & Silvestre, 1969).

La dissémination de l'espèce à l'époque précolombienne aurait été d'abord, le fait des Indiens comme cela a été le cas pour le maïs, le manioc, la patate douce...etc. L'arachide aurait ainsi gagné diverses régions de l'Amérique du Sud, les îles de la mer des Antilles et probablement l'Amérique centrale et le Mexique. Les Portugais auraient ensuite introduit la plante au début du XVI<sup>ème</sup> siècle sur la côte occidentale d'Afrique. De leur côté, les Espagnols, à peu près à la même période, l'auraient introduite aux Philippines à partir de la côte Est de l'Australie. A partir de Ceylan ou de la Malaisie, elle aurait ensuite atteint Madagascar et la côte orientale. Ainsi, l'Afrique se trouverait être un lieu de rencontre de deux voies différentes de diffusion de l'espèce. Bien que l'arachide ait été présente au Mexique et dans l'Archipel des Antilles à l'époque précolombienne et que des

contacts eurent vraisemblablement lieu entre les Indiens de ces contrées et ceux des régions voisines des Etats-Unis, on ne dispose d'aucune preuve de l'existence de la plante dans ce pays à cette époque. On admet aujourd'hui qu'elle y ait été introduite à partir de la côte occidentale de l'Afrique avec le commerce des esclaves.

L'origine et l'histoire de la diffusion de l'arachide dans le monde expliquent la grande diversité des types existant d'abord en Amérique du Sud et ensuite dans deux autres contrées du monde qui peuvent être considérées comme des centres de diversification secondaire de l'espèce ; ce sont d'une part la zone Philippines-Malaisie-Indonésie où l'on trouve un grand nombre de types différents appartenant principalement au groupe des "Valencia" et "Spanish" et d'autre part l'Afrique de l'Ouest de part et d'autre du 10<sup>ème</sup> degré de latitude Sud avec de nombreux types du groupe "Virginia" (Gillier & Silvestre, 1969).

### **II.2.2. Pratiques culturelles et commercialisation**

Au Sénégal, les surfaces cultivées dépassent un million d'hectares (plus de la moitié des surfaces cultivables). Normalement, les rendements sont voisins de 1000 kg/ha, plus faibles dans le nord du pays où les précipitations sont de l'ordre de 420 mm/an (Louga) et plus fortes dans le sud avec 800 mm/an (Kaolack). Les ventes de gousses représentent au moins 50% du revenus des paysans qui constituent 70% de la population (Ndiaye, 1991). Les huiles et les tourteaux correspondent à plus de la moitié du total des exportations du pays ; enfin les fanes constituent un excellent fourrage qui fait l'objet d'un commerce local important mais difficilement chiffrable.

La culture de l'arachide se pratique sur l'ensemble du territoire, avec une prédominance au niveau du bassin arachidier qui s'étend sur plus de 600.000 ha. Il s'agit de la principale culture de rente dans la zone concernée ; de plus, une rotation faisant intervenir cette légumineuse avec des céréales (mil, sorgho ou maïs) contribue à éviter un appauvrissement excessif du sol.

Les gousses d'arachide sont généralement déterrées à maturité dès la fin de la saison des pluies (octobre ou novembre), et la teneur en eau des gousses est alors élevée, de l'ordre de 40 à 50% (Gillier & Bockelée-Morvan, 1979). Il est nécessaire d'effectuer un séchage sur le champ avant de pouvoir faire le battage.

Au Sénégal où le battage est essentiellement manuel, le séchage constitue un élément sensible du système post-récolte et doit être prolongé jusqu'à l'obtention d'une teneur en eau inférieure à 10%. L'arachide est donc rassemblée en petits tas appelés moyettes (Fig. 10) qui, 2 à 3 semaines plus tard, sont réunies en meules. Celles-ci resteront au champ pendant trois semaines au cours desquelles divers insectes peuvent les attaquer. Ce système de séchage par petits tas ou moyettes permet d'éviter le développement des moisissures sur les gousses et empêche la dispersion des gousses d'arachide lors du battage (meules).

Après le battage (novembre ou décembre), une partie de la récolte est conservée par le paysan pour constituer ses semences de l'année suivante. Le mode de stockage est variable selon les zones et la quantité de la récolte. Le plus répandu est la mise en sacs en jute ou polypropylène tressé, entreposés les uns sur les autres dans un coin de la maison ou dans des greniers faits de paille de mil. La durée de stockage de l'arachide destinée à la commercialisation est généralement courte, la campagne agricole commençant environ deux semaines après le battage.

L'essentiel des récoltes est commercialisé dans les coopératives villageoises, où le stockage se fait en vrac dans des "seccos", terme local au Sénégal qui désigne les lieux généralement en plein air où peuvent être stockés plus de 10.000 tonnes d'arachides. Ces lieux sont délimités par des sacs remplis d'arachides empilés et protégés par des palissades ou des constructions en dur.

Après 2 à 3 mois de stockage dans les seccos, interviennent la collecte et l'évacuation, d'abord dans des "centres de groupage" à proximité d'une gare ou d'une route goudronnée, ensuite directement vers les huileries où les stocks peuvent passer plus d'une année couverts de bâches. Environ 50% de la production nationale est ensuite exportée vers les marchés de l'Union Européenne.



Figure 10a : vue générale de moyettes d'arachides en cours de séchage; c'est durant cette période que l'arachide devient vulnérable à la bruche *Caryedon serratus*.



Figure 10b : Une moyette d'arachides en cours de séchage ; les gousses d'arachide sont à la portée de *Caryedon serratus*

### II.2.3. Variétés et sélection

Les caractères héréditaires indépendants des facteurs du milieu qui se sont révélés les plus utiles pour distinguer les diverses variétés d'arachide sont la dimension et la forme des gousses, leur ornementation, le nombre de graines par gousse et la couleur du tégument séminal.

La dimension des gousses varie considérablement. On désigne par très grosses gousses celles dont le diamètre est supérieur à 20 mm, par gousses moyennes celles dont le diamètre est compris entre 10 et 15 mm, et par petites celles dont le diamètre est inférieur à 10 mm. La dimension des gousses peut être appréciée par le poids de cent gousses, qui varie approximativement entre 80 et 250 g. Les gousses présentent une ou plusieurs constriction ou ceintures séparant les graines. La ceinture peut être plus ou moins marquée, ventrale ou dorsale. L'absence de ceinture s'accompagne généralement de graines présentant une partie plate au contact de la graine voisine. Les gousses à ceinture profonde donnent au contraire des graines de forme régulière.

A son extrémité distale, la gousse peut être de forme ronde ou, au contraire, s'aplatir pour former une crête sur la ligne de suture des deux valves (forme en cimier). Ce caractère s'accompagne souvent de la présence d'un bec qui peut être de forme variée. L'ornementation de la gousse qui résulte de la mise à nu du tissu mécanique du mésocarpe dessine des réticulations (réseau), plus ou moins accentuées ou de forme particulière, anastomosées ou non. Enfin la couleur du tégument séminal permet de préciser la distinction des variétés.

L'examen attentif des particularités des caractères de gousses ou de graines énumérés ci-dessus permet généralement l'identification correcte d'une variété donnée. La version actuelle de la classification agronomique des principaux types variétaux d'arachide, utilisée au Centre de Recherche Agronomique de Bambey au Sénégal, résulte des travaux de Bouffil & Sauger (1949), Catherinet (1955) et Mauboussin (travaux non publiés).

Par ailleurs, on a souvent fait état des améliorations relativement faibles apportées par les travaux de sélection au niveau de l'arachide ( Gregory *et al.*, 1951 ; Seshadri, 1962).

Ceci a été attribué, soit à la nature polyploïde de l'arachide -mais aucune preuve nette n'en a été apportée et l'on n'a pas encore mis en évidence de caractères à hérédité tétraploïde - soit à l'isolement des chercheurs et à leur faible nombre jusqu'à une époque relativement récente. Enfin, et c'est sans doute l'explication la plus vraisemblable, la culture de l'espèce, extensive dans la plupart des pays et souvent limitée à des régions pauvres en raison de sa rusticité, ne permet pas toujours l'expression des qualités des variétés nouvelles. Au Sénégal, la sélection de l'arachide a débuté en 1924 à partir de populations localement cultivées, puis s'est poursuivie, de 1959 à 1982, avec de nouvelles introductions étrangères et en faisant appel aux techniques de l'hybridation (Vieira Da Silva, 1988). Diverses variétés, à durée de cycle de développement adaptée à chacune des zones écologiques, ont été sélectionnées par la recherche agricole (I.S.R.A-I.R.A.T), et progressivement mises en place du Nord au Sud selon les caractéristiques des zones (Anonyme, 1982). Les variétés actuellement cultivées au Sénégal sont du Nord au Sud : les variétés érigées hâtives du groupe Spanish 28-206 (Mamou 2 graines) et 55-437 (Mamou 3 graines), la variété rampante semi tardive 47-16 (Baol), la variété érigée tardive 73-33 (Saloum) qui représente près de la moitié des semences distribuées et la variété GH 119-20 (arachides de bouche). Cependant, la réduction de la pluviosité moyenne générale et de la longueur du cycle des pluies depuis quelques années (Vicira Da Silva, 1988) posent de nouveaux problèmes à la culture de l'arachide, et expliquent l'intégration dans les critères de sélection, de paramètres physiologiques d'adaptation ou de tolérance à la sécheresse. C'est pourquoi les recherches ont porté et se poursuivent sur la résistance à la sécheresse et la création de variétés ou de lignées utilisant plus favorablement l'eau (Ndiaye, 1991).

#### **II.2.4. Ennemis des cultures et des stocks**

La particularité de l'arachide à former ses gousses dans le sol la protège, jusqu'à l'arrachage, des attaques des ravageurs à l'exception des iules (Myriapodes) et des insectes du sol tels que les termites (Isoptères) (Gillier & Silvestre, 1969).

Les iules apparaissent dès les premières pluies et sont susceptibles de ronger les graines qui viennent d'être semées. Après la germination, elles coupent l'axe hypocotylé. La blessure ainsi occasionnée est une ouverture aux moisissures ; les attaques cessent dès l'apparition des premières branches (Risbec, 1950 ; Biernaux, 1965).

Les termites perforent la gousse presque mûre au niveau de la dépression qui représente l'ancienne insertion du style. Seule la graine proche de l'orifice est touchée; lésion peu importante, mais suffisante pour provoquer un flétrissement et la dessiccation du fruit. En effet quand l'eau diminue dans le sol, ils recherchent dans le fruit l'humidité dont ils ont besoin, d'où la présence de dégâts plus importants en année sèche. Quand le fruit est mûr et la coque desséchée, les termites ne peuvent plus perforer la coque ; ils rongent seulement la surface sans atteindre la graine.

Le puceron *Aphis craccivora* Koch et la punaise *Aphanus sordidus* F. sont signalés comme fréquents. Les adultes et jeunes de *A. sordidus* se nourrissent en perforant les gousses d'une piqûre très fine ne laissant pas de trace, mais l'amande se dessèche par suite de la perte de son huile (Appert, 1957 et 1985), et les graines piquées se dessèchent prenant un aspect ridé, et un mauvais goût à la consommation.

Les chenilles de *Amsacta moori* Walker ou *A. albistriga* Walker, *Diacrisia obliqua* Walker et *Stomopteryse nerteria* font des dégâts sur le feuillage et attaquent l'arachide de façon sporadique.

Les Thrips, en particulier *Heliothrips indiens* provoquent des malformations sur les plantes.

Divers rongeurs occasionnent des pertes de récoltes durant le long séchage au champ. Leur importance et diversité spécifique sont variables, mais deux principaux sont signalés : l'un diurne, le rat palmiste (*Xerus erythropus*), l'autre nocturne, le rat de Gambie (*Cricetomys gambianus*) (Hubert, 1977 in Ndiaye, 1991).

La bruche de l'arachide, *Caryedon serratus* (Olivier), reste le parasite le plus redoutable de l'arachide stockée (Fig. 11 à 13). Ses dégâts varient selon les types de stocks, leur destination et la durée du stockage. Les études menées sur ce sujet ont été conduites pendant longtemps au Sénégal par l'I.R.A.T. (actuel C.I.R.A.D.) et ont porté essentiellement sur les grands stocks commerciaux ou huiliers. Pointel & Yaciuk (1979) notent qu'après trois mois de conservation, l'infestation par *C. serratus* d'un stock expérimental (de 18 tonnes), s'observe essentiellement à sa périphérie, à quelques

centimètres de la surface, ainsi qu'à la base. Gillier & Bockelée-Morvan (1979) précisent que la bruche de l'arachide occasionne dans les stocks des pertes quantitatives qui évoluent rapidement en passant de 8 à 40% en six mois et que les pertes sont plus limitées pour des stocks de plusieurs milliers de tonnes, les couches superficielles étant plus attaquées que l'intérieur des stocks ; l'origine des contaminations leur était inconnue. En Gambie, Friendship (1974) a estimé qu'environ 3% de la production d'arachides est annuellement détruite par *C. serratus*. Les attaques observées peuvent aller jusqu'à 83% après 4 mois et demi de stockage dans les centres de commercialisation (Ndiaye, 1991). Certains auteurs dont Cancela Da Fonseca (1964) ont remarqué que les arachides en coques sont plus vulnérables à la bruche, et sont attaquées à 60-90%, contre 30 à 70 % pour les arachides décortiquées. D'autres auteurs (Gillier & Bockelée-Morvan, 1979) estiment par contre que les semences d'arachide sont plus vulnérables à *C. serratus* lorsqu'elles sont conservées en graines. L'incidence des dégâts chez le paysan est en fait mal connue ; très peu de travaux ont porté sur le sujet. Conway (1975) a observé après 16 semaines de stockage, des taux d'attaques de semences paysannes passant de 0,78% à 43% ; dans certains villages, les attaques atteignent même 100%. Au Congo, Matakot *et al.* (1987) relèvent des pertes quantitatives de poids à l'issue de neuf à dix mois de stockage, variant de 9,3% dans un village à 62,8% dans un autre, et principalement dues à la bruche de l'arachide.

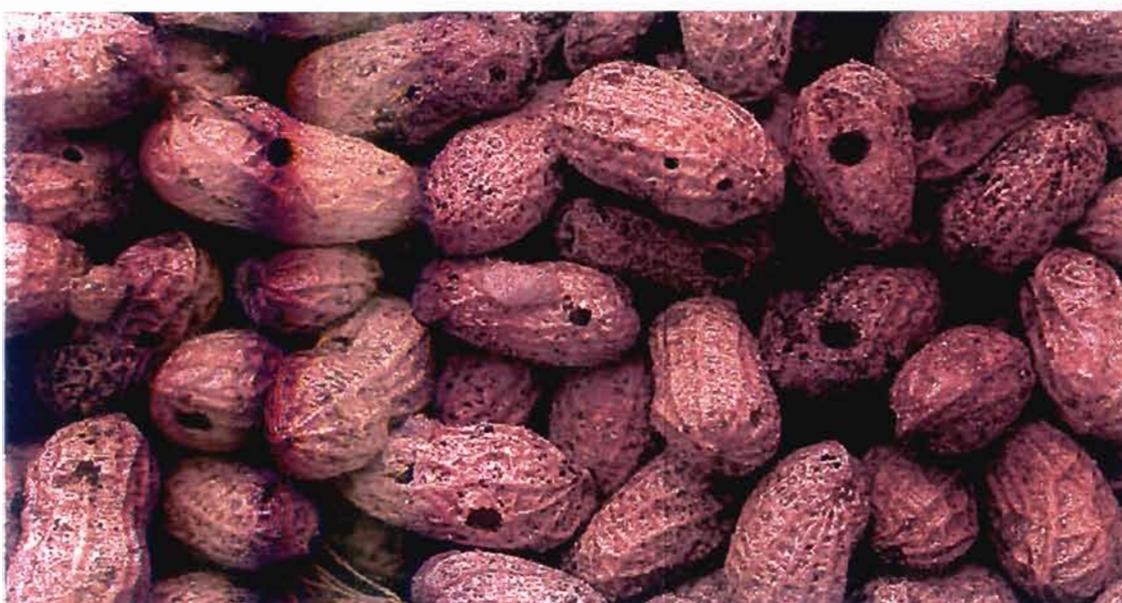


Figure 11 : dégâts causés par *Caryedon serratus* sur les gousses d'arachides ; les trous laissés par les larves favorisent le développement d'autres insectes



Figure 12 : dégâts causés par *C. serratus* ; les cocons sont faits sur et dans les gousses et graines d'arachide



Figure 13 : les graines sont réduites en poudre par les déprédateurs secondaires.

### II.2.5. Historique de l'infestation de l'arachide au Sénégal

Introduite au Sénégal au XVI<sup>e</sup> siècle durant la traite négrière, les premières attaques de l'arachide par *Caryedon serratus*, dans ce pays ont été relatées dans une monographie publiée en 1958 (Davey, 1958) et reprise par de nombreux auteurs. Cette zone fut, jusqu'au début des années 1970, la seule région du monde où *C. serratus* infestait les stocks d'arachide. Ce n'est que plus tard que Delobel (1989b) signale pour la première fois, des dégâts en Afrique centrale. Il est cependant difficile de préciser la date d'apparition de la bruche dans les stocks sénégalais car, si l'on peut rapprocher l'apparition de la bruche dans les stocks destinés à l'exportation de 1910, ceci ne signifie pas que le passage des populations de *C. serratus* sur les stocks date précisément de cette époque. En fait celui-ci n'est peut être devenu effectif qu'après de multiples tentatives avortées qui ont pu se produire pendant plusieurs siècles. En revanche, il est clair que la généralisation de l'infestation à toute l'Afrique occidentale s'est effectuée en 15 ou 20 ans. Le mode de progression de cette infestation a été décrit par Delobel & Matokot (1991). Il était cependant apparu de nouveaux centres d'infestation de l'arachide (Afrique Centrale, Inde...) éloignés du foyer originel (Sénégal), mais l'hypothèse d'importations accidentelles d'arachide bruchée du Sénégal ne peut être écartée.

La seule certitude aujourd'hui est que *C. serratus* s'attaquait déjà à l'arachide en 1913 et qu'en 1933, elle est devenue le principal ennemi des stocks d'arachide au Sénégal. C'est ainsi que Sagot, directeur de la station de Bambey et son adjoint Bouffil entament une série d'observations sur la bruche, qu'ils publieront en 1935. En deux campagnes, ils mettent en évidence trois aspects cruciaux qui concernent le mode de contamination de l'arachide :

- *C. serratus* issu d'arachides se développe très bien dans les graines de tamarinier.
- Cette hôte sauvage est infesté dans la nature par *C. serratus*.
- L'infestation de l'arachide se produit au champ, pendant le séchage en andains.

Dans une étude portant surtout sur les aspects économiques de la culture de l'arachide, Guiraud (1938) ne cite qu'un ravageur des stocks, et c'est précisément la bruche, signalant qu'elle fait "*de plus en plus de dégâts*" particulièrement graves dans les stocks de prévoyance, car les graines attaquées sont rapidement inaptées à la germination. Plus tard, certains auteurs comme Conway (1975 et 1983), Matokot *et al.* (1987) et Ali-Diallo (1991) ont émis l'idée que la connaissance de la dynamique de l'infestation des stocks d'arachide

par *Carydon serratus* devrait conditionner la mise au point d'une stratégie de lutte contre cet insecte. Or, cette question essentielle reçoit, selon les auteurs des réponses divergentes. Pour Appert (1954) au Sénégal et Green (1959) en Gambie, les hôtes sauvages jouent un rôle insignifiant, les infestations s'effectuant une fois la récolte rentrée, à partir des graines bruchées subsistant dans les greniers. Sagot & Bouffil (1935) et Corby (1941) au Nigéria, Conway (1983) en Gambie et Ndiaye (1991) au Sénégal, voient dans les mêmes plantes hôtes sauvages l'origine de l'infestation. Conway indique le rôle possible de petits effectifs de gousses résiduelles des plantes voisines des champs, après la saison des pluies, dans la contamination des arachides, et pense que la diminution des effectifs de *C. serratus* dans les hôtes primaires (*P. thonningii*, *T. indica*, *C. sieberiana*), au moment des récoltes d'arachide en octobre-novembre, pourrait constituer un moyen d'atténuation ou d'élimination des infestations au champ. A l'appui de cette hypothèse, Robert (1984), Ndiaye (1991) et Sembène (1997) notent que le degré d'infestation des meules d'arachide est liée à leur proximité des plantes hôtes naturelles et qu'il suffirait d'éloigner au maximum les meules de ces plantes pour diminuer l'infestation initiale au champ. Des données précises sur les capacités migratoires de la bruche de l'arachide devraient permettre de confirmer les conclusions de ces auteurs. Il est cependant devenu évident que les premières infestations se produisent lors du séchage, avant la rentrée des récoltes dans les greniers. Quoique faibles ces infestations se poursuivent dans les greniers et peuvent être à l'origine d'importantes pertes quantitatives à cause du caractère polyvoltin de la bruche de l'arachide.

Il a été démontré par la suite que la contamination de l'arachide pouvait avoir une double origine (greniers et plantes hôtes) et que même en l'absence de bruche dans les greniers, l'infestation de l'arachide se produit au champ, en fin de saison des pluies, dans une zone où les Caesalpiniaceae hôtes sont présents (Matokot *et al.*, 1987 au Congo ; Ndiaye, 1991 au Sénégal ; Ali-Diallo, 1991 au Niger. De plus, il ressort des travaux de Delobel & Matokot (1991) que des mécanismes multiples et probablement complexes déterminent les relations existant entre les différentes espèces hôtes et les populations de la bruche de l'arachide. En effet *Carydon serratus* n'infeste pas l'arachide dans toutes les zones où cette plante est cultivée; par exemple en Amérique du Sud, au Burkina Faso (Ouedraogo, com. pers.). De même, l'hypothèse de populations distinctes, liées à des hôtes différents (biotypes, races biologiques ou "host range", selon la terminologie employée) est

confortée par l'existence, dans certaines régions du Congo, de populations inféodées à un hôte sauvage (*Piliostigma thonningii*) au contact de cultures et de stocks d'arachides restés indemnes de toute attaque. Delobel & Matokot (1991) avancent alors deux hypothèses pour expliquer la répartition actuelle de la bruche sur caesalipiniaceae et sur arachide :

- Existence chez *C. serratus* d'une polyphagie permettant à l'espèce de se développer aussi bien dans les stocks d'arachide lorsque ceux-ci deviennent accessibles que sur Caesalpinaceae, voir Mimosaceae.
- Apparition au Sénégal au début du siècle d'une population adaptée au développement sur arachide (à la suite de modifications génétiques importantes), population qui serait à l'origine de tous les foyers actuels. Cette hypothèse suppose, au sein d'une population, l'existence d'un polymorphisme (au sens de Futuyma, 1986) lié à la nature de l'hôte, aboutissant à plus ou moins longue échéance à une spéciation.

#### **II.2.6. Protection des stocks contre *C. serratus***

Certains paysans utilisent des plantes à effet insecticide telles que *Azadirachta indica*, *Boscia senegalensis*, *Datura* sp., *Malpighia alternifolia*... etc (Ndiaye, 1991). Ces plantes semblent globalement peu efficaces car les résultats sont très peu reproductibles en stocks réels et n'empêchent pas l'évolution des attaques par *C. serratus*. C'est pourquoi, des chercheurs ont tenté de mettre au point des méthodes de protection modernes. Leurs études ont porté sur l'utilisation de méthodes physiques, chimiques et biologiques.

La conservation par le froid, parfois utilisée, ne peut être envisagée que dans des cas exceptionnels (arachide de bouche décortiquée, stocks de semence de sécurité) étant donné son coût très élevé. De même, l'ensilage hermétique est très efficace mais peu pratique et entraîne une diminution de la faculté germinative des graines. L'utilisation de poudres inertes abrasives semble prometteuse au niveau de petits stocks ; des essais réalisés avec l'attapulgite à raison de 5g/kg d'arachide décortiquée, montrent une excellente efficacité (Ndiaye, 1991). L'irradiation des grains a été utilisée contre la bruche du niébé. Elle permet de tuer les oeufs et les larves de premier stade ; les adultes survivent mais donnent naissance à des descendants anormaux (Balachowsky, 1962).

Appert (1954 et 1958) a testé l'efficacité de divers organochlorés : DDT (Dichlorodiphényl-trichlorétane), HCH (Hexachlorocyclohexane), Lindane, Aldrine, Dieldrine et a obtenu les meilleurs résultats avec la Dieldrine et le HCH. Ces produits présentent des inconvénients sanitaires que l'on ignorait à l'époque. De plus, même si les attaques étaient tant soit peu atténuées, elles étaient toujours présentes dans les stocks. La fumigation de la récolte est très efficace et peut être réalisée dans des installations fixes mais ce traitement n'est pas rémanent.

Des essais de lutte biologique contre *C. serratus* ont été initiés par Delobel (1989b). Cet auteur a étudié au laboratoire la biologie du trichogramme *Uscana caryedoni* qui parasite les oeufs de la bruche de l'arachide mais conclut que "*l'utilisation de ce parasite dans un programme de lutte biologique n'est pas envisageable...bien qu'il intervient comme agent efficace de limitation des populations de C. serratus*".

Plusieurs facteurs expliquent les échecs relatifs des traitements, particulièrement au niveau paysan : faible pouvoir pénétrant des formulations insecticides utilisées, traitements tardifs et limités aux stocks avec une méconnaissance totale de la dynamique de contamination et du cycle global du ravageur. D'autre part, les travaux sur la question présentent *C. serratus* comme "ravageur de stocks" alors que la contamination a souvent déjà eu lieu au moment du séchage et l'insecte abrité se développe dans les graines.

L'efficacité des moyens de lutte semble incontestablement liée à la connaissance de l'origine et de l'évolution de la dynamique de l'infestation primaire de l'arachide. Ceci permet, en effet, de détecter les moments où le ravageur est plus accessible et vulnérable, en particulier avant son installation dans les gousses.

**CHAPITRE II**

**SEQUENCAGE DE L'ESPACEUR INTERNE TRANSCRIT (ITS1)  
DE L'ADN RIBOSOMIQUE DE *CARYEDON SERRATUS***

## INTRODUCTION

Pour comprendre la structure des communautés biologiques observées aujourd'hui, il est nécessaire d'en retracer l'histoire (Losos, 1996), afin de séparer les composantes historiques (au sens d'une échelle de temps évolutive) des composantes écologiques récentes. Les méthodes d'analyses comparatives, de plus en plus performantes, permettent ainsi de discriminer la part relative des contraintes phylogénétiques ou environnementales dans la distribution d'un caractère (ou d'une stratégie) au sein d'un groupe d'espèces pour lequel on dispose d'une phylogénie robuste (Bauwens & Diaz-Uriate, 1997 ; Pierce & Crawford, 1997). En effet, du fait de leur apparentement, les individus d'une même clade ne constituent pas des échantillons indépendants au sens statistique du terme. Par conséquent, toute comparaison de caractères biologiques ou écologiques ne pourra se faire avec rigueur que si l'on peut apprécier le degré d'interdépendance entre les données. Une solution est de reconstruire la phylogénie de la population étudiée pour apprécier les relations d'apparentement des espèces étudiées (Hillis, 1997).

Reconstruire la phylogénie d'un ensemble d'individus peut résulter de deux approches: l'analyse de caractères morphologiques et/ou celle de caractères moléculaires.

L'approche morphologique qui a été longtemps la seule possible, pose un certain nombre de problèmes. En effet, l'information apportée est parfois entachée d'homoplasie (une similitude n'est pas la conséquence d'un héritage commun mais provient de l'acquisition d'un même état de caractère, dans les deux lignées, de façon indépendante). Il peut être difficile dans ce cas de distinguer apomorphies et convergences adaptatives: des contraintes fortes peuvent peser sur la morphologie des espèces étudiées, et les convergences liées à la biologie et à l'écologie peuvent masquer la réalité des relations phylogénétiques, et ce d'autant plus qu'on se situe à un niveau plus bas de la classification.

L'analyse moléculaire est basée sur la théorie neutraliste de l'évolution (Kimura, 1968, King & Jukes, 1969), et postule que le temps évolutif séparant différents taxa est reflété par la divergence des séquences d'ADN. On note actuellement une amélioration des techniques moléculaires: facilité d'amplification des domaines particuliers par PCR ou *Polymerase Chain Reaction* (Saiki *et al.*, 1985), techniques de séquençage directe par la méthode de Sanger *et al.* (1977) puis développement du séquençage automatique ; ceci a grandement contribué à la multiplication des phylogénies moléculaires simplifiant ainsi

l'accès aux informations contenues dans le génome. Insistons cependant sur le fait qu'une connaissance taxonomique robuste du groupe étudié est absolument nécessaire avant toute analyse moléculaire, notamment pour optimiser l'échantillonnage des espèces et des populations, et pour conserver tout son intérêt à la phylogénie obtenue. Nous retiendrons deux étapes-clés dans l'élaboration d'une phylogénie moléculaire: le choix du domaine analysé et celui de la méthode de reconstruction phylogénétique. Une excellente synthèse est proposée dans l'ouvrage de Hillis *et al.* (1996). Quelle que soit cependant la méthode de reconstruction phylogénétique utilisée, son principe repose sur une hypothèse: l'autonomie de fonctionnement d'une population, donc son isolement reproductif, peut se traduire par une différenciation génétique, fournissant ainsi des informations sur la structure de cette population ainsi que les facteurs qui la déterminent.

L'importance de la structure populationnelle en génétique a été reconnue depuis le début du siècle (Mayr, 1974). Mais, même s'il existe des structures intermédiaires entre l'individu et l'espèce (Dobzansky, 1977), la définition théorique de la population et ses subdivisions, n'est pas évidente. Les critères de définition diffèrent selon les auteurs mais le groupe le plus général au sein duquel les individus sont susceptibles d'échanger des gènes est **l'espèce**. Elle est en effet protégée de l'extérieur (c'est à dire des autres espèces) par les barrières interspécifiques qui, normalement empêchent les échanges de gènes entre individus appartenant à des espèces différentes. Les sous-groupes de l'espèce à l'intérieur desquels les individus ont l'occasion d'échanger des gènes sont définis comme étant des **populations**. Dans chacune de ces populations les individus ont en commun un pool de gènes parfaitement caractérisé par les fréquences géniques sur lesquelles agissent les mutations qui sont à la base de toute différenciation génétique.

S'il est indispensable, d'un point de vue théorique, de faire la distinction entre les structures observées et ce qui les crée, il est évident que d'un point de vue pratique, l'approche que l'on peut avoir d'une population doit passer nécessairement par une étude de ses structures. Ceci est particulièrement vrai pour les populations d'insectes phytophages inféodés à plusieurs espèces végétales. Le cas de *C. serratus* qui a ajouté, par allotrophie, une Fabaceae à ses hôtes naturels, nous semble particulièrement intéressant. Et comme la source fondamentale de la variabilité génétique se situe au niveau des séquences d'ADN, nous avons choisi dans ce chapitre de séquencer la région ITS1 de l'ADN nucléaire. L'ITS1

est une région de l'ADN nucléaire qui est transcrit en ARN ribosomique. Cette région qui est flanquée du côté 3' du 5,8S et du côté 5' du 18S de l'ADN ribosomique a montré une variabilité permettant l'étude phylogénétique chez *Cicindela dorsalis* (Vogler & DeSalle, 1994) et chez *Pimelia* spp (Juan *et al*, 1996). Bien que l'ADN mitochondrial se soit révélé être un marqueur très efficace pour retracer l'histoire évolutive des espèces, ses caractéristiques populationnelles conduisent beaucoup d'auteurs à considérer que la phylogénie de ces molécules n'est pas nécessairement le reflet de celle des populations. De plus, c'est dans le compartiment nucléaire, génétiquement indépendant du compartiment cytoplasmique, que s'accumulent les mutations évolutives intéressantes.

## **I. MATERIEL ET METHODES D'ETUDE**

### **I.1. MATERIEL BIOLOGIQUE**

Les spécimens de *Caryedon serratus* qui ont fait l'objet de cette étude proviennent de gousses récoltées sur différentes espèces de plantes hôtes entre 1995 et 1999. Les gousses des plantes hôtes sont récoltées pendant la période où les populations de bruches sont les plus abondantes. Elles sont ramenées et gardées au laboratoire dans des sacs en plastique à température ambiante pendant au moins 2 mois. Pour chaque plante hôte naturelle, les cocons formés à l'extérieur sont isolés dans des boîtes de Petri. Ceci permet d'éviter l'émergence des adultes dans les sacs; ce qui engendrerait une seconde génération. Les insectes sont récoltés dès leur émergence et gardés dans l'alcool à 100 °C. Les échantillons d'arachide ont été prélevés au champ durant le séchage ou pendant le stockage dans les greniers.

Pour chaque espèce de plante hôte, un nombre suffisant de gousses est récolté pour obtenir au moins 40 adultes de *C. serratus*.

*C. serratus* subit cependant l'attaque de divers parasites aux différents stades de son développement. Ce sont essentiellement des Hyménoptères et un acarien.

Les Hyménoptères oophages pratiquent une ouverture dans le chorion des oeufs et consomment leur contenu. Les oeufs parasités se reconnaissent à leur couleur noire lorsqu'ils contiennent le parasite, grise avec un orifice sur le chorion lorsque le parasite en est sorti. Après détermination, il se révèle qu'il s'agit de *Uscana caryedoni*. Les Hyménoptères parasites des larves appartiennent à la famille des Braconidae : il s'agit de *Bracon* sp. et *Platyspathius pictipennis* Viereck (Ali-Diallo, 1991).

L'acarien *Pyemotes tritici* parvient à son hôte à travers les orifices pratiqués dans le péricarpe des gousses par les larves ou les insectes adultes émergeant de ces dernières. Les fentes dues au craquèlement du péricarpe constituent également des voies d'accès. *P. tritici* attaque les larves des différents stades, les nymphes et les adultes de *C. serratus*. Dans les élevages, les pertes occasionnées par ce parasite sont considérables, parfois totales.

Plusieurs bruches de l'espèce *Caryedon crampeli* sont obtenues des gousses de *B. rufescens*, *C. sieberiana* et *P. reticulatum*. Cette espèce semble avoir une biologie très voisine de celle de *C. serratus*. Elle a été décrite par Pic en 1924 sous le nom de *Pachymerus crampeli*. Cet auteur écrit: "*P. crampeli* n. sp. parum elongatus, parum dense et regulariter griseo pubescens, rufus, antennis nigris, ad basin rufis ; thorace fortiter sat dense punctato ; elytris distincte striatis et minute punctatis, intervalis fere deplanatis, dense punctatis. Long. 6-7 mill." (espèce peu allongée, couverte d'une pilosité peu dense et uniformément grise, de couleur rousse, aux antennes noires sauf la base qui est rousse ; thorax fortement et assez densément ponctué ; élytres nettement striés et à points minuscules, les intervalles presque plans, densément ponctués).

La différenciation entre les deux espèces est habituellement faite par l'examen des pièces génitales et des oeufs, méthode assez complexe qui nécessite l'observation des adultes. Dans les deux espèces, les oeufs ont une forme ovoïde mais ceux de *C. serratus* présentent des bouts pointus. D'autre part, comme l'indique la description de Pic, les élytres de *C. crampeli* sont uniformément brun rougeâtre alors que ceux de *C. serratus* sont brun noirâtre avec des taches noires.

La distinction entre mâle et femelle de *C. serratus* se fait facilement par l'observation de la partie terminale de l'abdomen (fig. 1a). Chez le mâle les élytres recouvrent presque entièrement le dernier tergite abdominal ; celui-ci est visible en position dorsale chez la femelle.

On distingue les échantillons selon deux critères: l'espèce hôte et l'origine géographique. Chaque échantillon est codé en utilisant la première lettre du nom de la plante hôte et les deux premières lettres du nom de la localité où il a été récolté. Les échantillons, obtenus dans les 3 principaux sites où l'on rencontre en même temps toutes les plantes hôtes de *C. serratus*, sont récapitulés dans le tableau 1.

Tableau 1: échantillons analysés dans les 3 principaux sites.

Lieu de récolte	Plantes hôtes	Code de l'échantillon
Fimela	Arachide	Afi
	<i>Bauhinia rufescens</i>	Bfi
	<i>Cassia sieberiana</i>	Cfi
	<i>Piliostigma reticulatum</i>	Pfi
	<i>Tamarindus indica</i>	Tfi
Keur Baka	Arachide	Akb
	<i>Bauhinia rufescens</i>	Bkb
	<i>Cassia sieberiana</i>	Ckb
	<i>Piliostigma reticulatum</i>	Pkb
	<i>Tamarindus indica</i>	Tkb
Thiès	Arachide	Ath
	<i>Bauhinia rufescens</i>	Bth
	<i>Cassia sieberiana</i>	Cth
	<i>Piliostigma reticulatum</i>	Pth
	<i>Tamarindus indica</i>	Tth

Des échantillons individuels sont récoltés, en fonction des plantes hôtes présentes, à Kaskas, Kédougou, Kolda, Kounkané, Linguère, Nioro, Ouarak, Thilé Boubacar. Au moins, un individu de chaque localité est analysé ; l'objectif recherché dans ce chapitre étant de montrer comment l'espèce *C. serratus* est structurée génétiquement selon la nature de la plante hôte. Tous les spécimens utilisés dans nos expériences ont été identifiés par Delobel. Des spécimens (et leurs pièces génitales) provenant de chacune des plantes hôtes sont conservés au Laboratoire de Zoologie des Invertébrés Terrestres à l'I.F.A.N. Cheikh Anta DIOP de Dakar et au Museum d'Histoire Naturelle de Paris.

## II.2. ETUDE GENETIQUE

### II.2.1. Extraction de l'ADN de *C. serratus*

La démarche générale est résumée dans la figure 14.

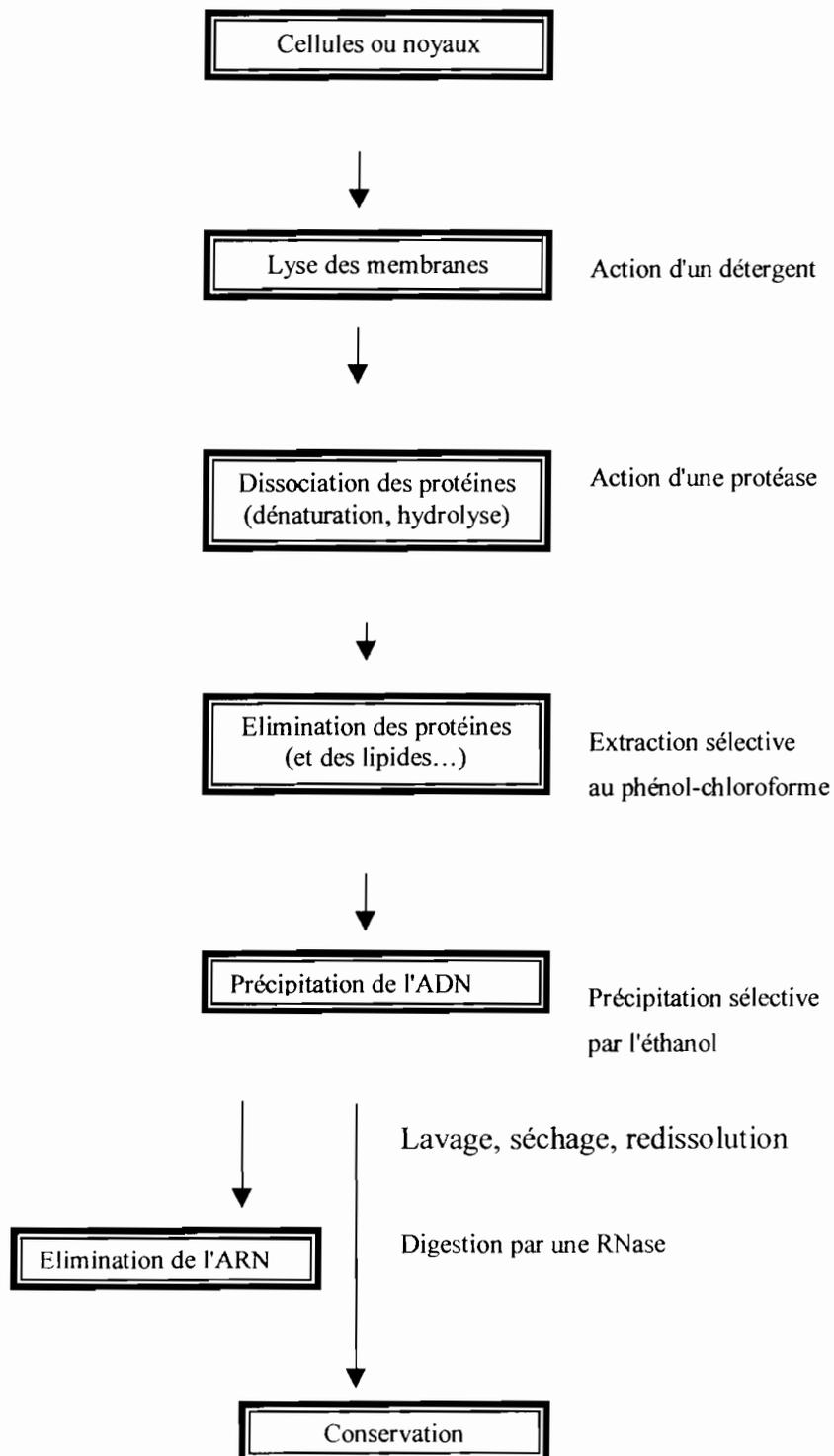


Figure 14: méthode classique d'extraction de l'ADN (Loncle *et al.*, 1993)

Les extractions d'ADN de *C. serratus* ont été faites en suivant la méthode Wilson qui consiste à:

- Placer le thorax et les pattes d'un insecte dans un tube de 1,5 ml et ajouter 200 µl de tampon d'extraction (100 mM TrisHCL, pH 8; 1mM EDTA; 100 mM NaCl; 0,1% SDS; 50 mM DDT).
- Bien écraser ces organes avec un broyeur jusqu'à désintégration complète, rajouter 5 µl de protéinase K (10 mg/ml) et vortexer.
- Mettre les tubes à 50 °C au bain-marie pendant 2 heures.
- Centrifuger 10 minutes à 12 000 rpm à 4° C et transférer environ 190 µl de surnageant dans un nouveau tube en évitant de prendre de la matière organique.
- Ajouter du phénol pur, volume à volume, mélanger avec vigueur et centrifuger 15 minutes à 12 000 rpm à 4°C.
- Transférer 175 µl de surnageant dans un nouveau tube, ajouter autant de phénol/chloroforme/isoamyle (25/24/1), bien mélanger et centrifuger 15 minutes à 12000 rpm à 4°C.
- Récupérer 160 µl de surnageant et ajouter du chloroforme/isoamyle (24/1) volume à volume. Mélanger avec vigueur et centrifuger 10 min. à 12 000 rpm à 4°C.
- Récupérer le surnageant et ajouter 1/10 de volume d'acétate de sodium (3M, pH 5,3) et 2 volumes d'éthanol absolu froid.
- Vortexer et plonger les tubes 10 minutes dans l'azote liquide ou bien les laisser à -20°C pendant toute une nuit puis centrifuger 20 min à 10 000 rpm à 4°C.
- Vider le surnageant en vérifiant la présence d'un culot d'ADN au fond du tube.
- Laver le culot en ajoutant 800 µl d'éthanol 70% et centrifuger 10 minutes à 12 000 rpm à 4°C ; éliminer le surnageant et sécher les tubes au dessiccateur.
- Ajouter 20 µl d'eau stérile, laisser l'ADN une heure à température ambiante ou toute la nuit à 4°C pour qu'il se reprend bien. Vortexer les tubes et centrifuger avant de les conserver à 4°C ou à -20°C.
- Vérifier l'extraction en faisant migrer un aliquot de 2 µl mélangé à 5 µl de bleu de bromophénol sur gel d'agarose 1,4%.

Les fragments d'ADN sont facilement détectés sur le gel grâce à un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium (BET) ; on peut ainsi visualiser en lumière UV des quantités très faibles d'ADN (de l'ordre de 5-10 ng).

### I.2.2. La P.C.R. (Polymerase Chain reaction) de l'ITS1 de *C. serratus*

La P.C.R. consiste à amplifier sélectivement une séquence particulière d'ADN par action répétée d'une ADN polymérase. Le but est de recopier un très grand nombre de fois in vitro une portion de séquence dont la longueur ne peut excéder 10 Kb et comprise entre deux amorces d'orientation inverse, s'hybridant chacune sur un des deux brins. Le procédé original de l'amplification par PCR est basé sur l'utilisation d'une enzyme ayant des propriétés particulières. Il s'agit d'une Taq ADN polymérase (®Promega) provenant d'une archaebactérie thermophile, *Thermophilus aquaticus*. Cette polymérase présente les caractéristiques particulières d'être thermostable à 95 °C et d'avoir un optimum d'activité à 72 °C. Ces propriétés permettent, par des cycles de copie successifs, la multiplication du nombre de fragments d'ADN correspondant à des copies de la séquence située entre les deux amorces choisies.

Les PCR de l'Espaceur Interne Transcrit : ITS 1 de l'ADN ribosomique de *C. serratus* ont été faites avec les amorces suivantes: CIL (5' GCGTTCGAARTGCGATGATCAA 3') et CIU (5'GTAGGTGAACCTGCAGAAGG3') qui ont été définies par Vogler et DeSalle (1994) à partir de la séquence de l'ADN de *Drosophila melanogaster* (Tautz *et al*, 1988) ; leur température d'hybridation chez la bruche de l'arachide est 50 °C.

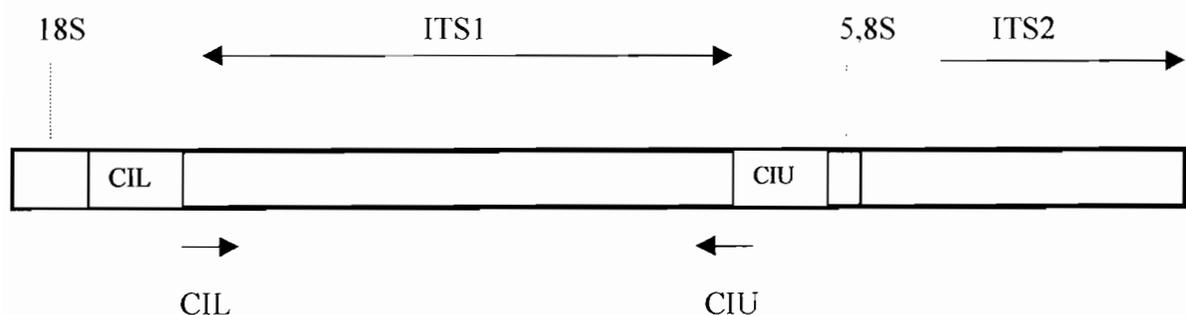


Figure 15: positionnement des ITS séquencés et des amorces utilisées sur l'ADN ribosomique.

Les conditions de PCR pour 25  $\mu$ l (1 tube) sont les suivantes:

Tampon Taq	:	2,5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	:	2,5 $\mu$ l
dNTP'S	:	0,25 $\mu$ l
CIU	:	0,125 $\mu$ l
CIL	:	0,125 $\mu$ l
Taq	:	0,125 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	:	(qsp 24) $\mu$ l
ADN	:	(1 $\mu$ l)

Les produits de PCR sont ensuite purifiés sur colonnes de Quiaquick, en reprenant l'ADN dans 30  $\mu$ l d'eau stérile. Nous avons par la suite utilisé la méthode dite du Quiagen qui consiste à récupérer l'ADN dans un gel d'agarose à 2% avant de le purifier sur colonnes de Quiaquick.

### **I.2.3. Séquençage de L'ITS1**

Les séquences sont réalisées sur séquenceur automatique Applied Biosystems 373 A, Modèle Semi-Adaptative Version 3.0. Dans l'appareil, après réplication interrompue en 4 lots avec 4dNTP différents, les produits de réaction sont déposés dans un même puits. Dans chaque lot, l'amorce utilisé a été marquée de manière non radioactive par un fluorochrome différent. L'appareil détecte en continu les 4 fluorescences sur une position du gel pendant la migration. Chaque fluorochrome étant associé à un ddNTP, la séquence peut être déduite de l'ordre de migration des différents oligonucléotides.

L'usage des séquenceurs automatiques s'est répandu ces dernières années. Ces appareils informatiques prennent totalement en compte l'électrophorèse et la lecture des résultats mais n'assurent pas la réplication interrompue.

#### **I.2.3.1. La réaction de séquence**

La réaction de séquence s'effectue de la même manière qu'une réaction de PCR avec dans chaque tube de 0,5 ml:

Terminator Mix	:	8 $\mu$ l
PCR purifiée	:	5 $\mu$ l (6 $\mu$ l si la PCR est faible)
CIL ou CIU	:	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	:	q.s.p. 20 $\mu$ l

Après avoir ajouté une goutte d'huile, le mélange est mis dans l'appareil à PCR et le programme suivant appliqué:

96 °C	:	30 secondes		24 cycles
50 °C	:	1 minute		
60 °C	:	4 minutes		
4° C	:	à l'infini		

#### I.2.3.2. Précipitation du produit de séquence

Pour chaque séquence on mélange 2 µl d'acétate de sodium, 50 µl d'éthanol absolu froid et les 20 µl de produit de séquence dans un tube de 0,5 ml. Le mélange est ensuite vortexé et centrifugé brièvement. Il est ensuite placé sur la glace pendant 10 minutes puis centrifugé 30 minutes à température ambiante (12000 rpm). L'éthanol est retiré à l'aide d'une pipette.

Le précipité est lavé avec 350 µl d'éthanol 70 à T° ambiante puis centrifugé pendant 5 minutes. Le surnageant est vidé à l'aide d'une pipette et les culots séchés dans une cloche à vide, puis mis au congélateur ; ils sont alors prêts à être séquencés.

### I.3. ANALYSE DES DONNEES

#### I.3.1. Analyse des séquences ITS 1

Les séquences obtenues ont été alignées grâce au logiciel Mc Clade 3.07. Les alignements ont été minutieusement vérifiés et corrigés manuellement. S'il le faut, la séquence est refaite pour vérification. L'alignement est en effet une étape importante de l'analyse des données, car il détermine l'homologie des sites (Swofford *et al.*, 1996).

#### I.3.2. Reconstruction phylogénétique

Nous avons utilisé trois procédures principales de reconstruction des arbres phylogénétiques dont les principes, algorithmes et avantages relatifs, sont bien détaillées dans Swofford *et al.* (1996). Nous avons systématiquement utilisé ces 3 procédures dans les analyses que nous avons faites au cours de ce travail.

La première méthode dite du *maximum de parcimonie* (Farris, 1970) considère qu'un arbre phylogénétique est optimal lorsque sa longueur totale (nombre de pas nécessaire pour expliquer le jeu de données analysées) est minimale. Très schématiquement, tous les arbres possibles (ou un échantillon raisonné des possibles) sont estimés mais seuls les arbres les plus courts (les plus parcimonieux) sont conservés ; un consensus de tous les arbres retenus peut être ensuite réalisé. Des pondérations peuvent être appliquées aux différents types de transformations observées (transitions, transversions, substitutions aux différentes positions du codon...). Les reconstructions phylogénétiques ont été réalisées grâce au logiciel PAUP 3.1.1. (Swofford, 1993). Les arbres les plus parcimonieux ont été obtenus par la recherche heuristique en considérant les insertions comme un cinquième état de caractère, avec l'option "branch-swapping" de PAUP.

Les deux autres méthodes de reconstruction sont basées de manière explicite sur des modèles expliquant les changements évolutifs. Etant donné un modèle concret évaluant notamment les probabilités des diverses transformations observées, la 2<sup>ème</sup> méthode dite du *maximum de vraisemblance* (Felsenstein, 1981 et 1993 ; Kishino *et al.*, 1990 ; Cavalli-Sforza & Edwards, 1997), permet de tester toutes les histoires ayant pu engendrer le jeu de données actuelles analysées. La vraisemblance de chaque arbre est ainsi calculée en suivant le modèle choisi, et la reconstruction phylogénétique choisie est celle pour laquelle la vraisemblance est maximale.

La troisième méthode est basée sur l'utilisation des distances génétiques non-corrigées (p-distances) grâce au logiciel MEGA (Kumar *et al.*, 1993). Ces distances sont analysées par la technique du Neighbor-Joining de Saitou & Nei (1987). Les distances entre taxons sont calculées après avoir modélisé les processus évolutifs, et l'arbre est ensuite reconstruit en fonction de la proximité génétique des taxons pris deux à deux. Un des problèmes liés à cette technique est que la transformation des données brutes en matrice de distances induit une perte d'information, mais elle a l'avantage de permettre des reconstructions rapides, ce qui peut se révéler fort utile dans les toutes premières étapes de l'analyse de données.

En Maximum de parcimonie comme en Neighbor-Joining, la robustesse des nœuds internes des phylogénies obtenues a été testée grâce à la méthode du bootstrap (Felsenstein,

1985a), avec 500 et 1000 rééchantillonnages respectivement. Le test du bootstrap a été proposé par Felsenstein pour apprécier la robustesse des branchements d'une topologie. Il est utilisable aussi bien avec les méthodes de parcimonie qu'avec les méthodes de distances. La topologie obtenue avec l'ensemble de l'information est mise à l'épreuve en utilisant seulement une partie de l'information. Dans les séquences de départ, on effectue un tirage aléatoire de sites, avec remise, jusqu'à ce qu'une séquence de même longueur soit obtenue. Il s'agit bien d'un tirage de site, c'est-à-dire d'une position dans une séquence, et l'état du caractère est noté à ce site pour l'ensemble des espèces ; quelque soit la longueur de la séquence, on peut montrer qu'un tiers environ des sites ne sont pas tirés ; les autres sont une, deux ou plusieurs fois. Un nouvel arbre est construit avec ces nouvelles données par la même méthode. L'opération est répétée un grand nombre de fois, ce qui a pour effet de varier partiellement la nature des sites retenus dans chaque tirage. On établit enfin le pourcentage de fois où, avec les séquences partielles des tirages, chaque regroupement de l'arbre obtenu avec les données complètes a été observé. Un nœud est considéré comme significatif lorsqu'il apparaît dans 95% des arbres.

Vingt six individus de *Caryedon serratus* provenant de plusieurs localités et des différentes plantes et dont les séquences complètes ne présentent aucun doute, sont utilisés pour les reconstructions phylogénétiques. *Caryedon crampeli* autre espèce inféodée aux mêmes plantes hôtes que *C. serratus*, est utilisée comme extra-group.

## **II. RESULTATS**

### **II.1. SEQUENCES OBTENUES**

Nous avons obtenu des séquences d'ITS1 de 920 pb chez la bruche de l'arachide. Ce chiffre correspond à la longueur des séquences après alignement, en tenant compte des insertions. Nous avons donc réalisé nos analyses sur des séquences de 920 nucléotides, contenant 264 sites informatifs lorsque "*Cassia sieberiana*" est inclus et 8 sites variables tous informatifs dans le cas contraire. L'ensemble des séquences est donné ci-dessous. Les nucléotides appartenant au 18SRNA (au début) et 5,8SRNA (à la fin) sont mises en italique.











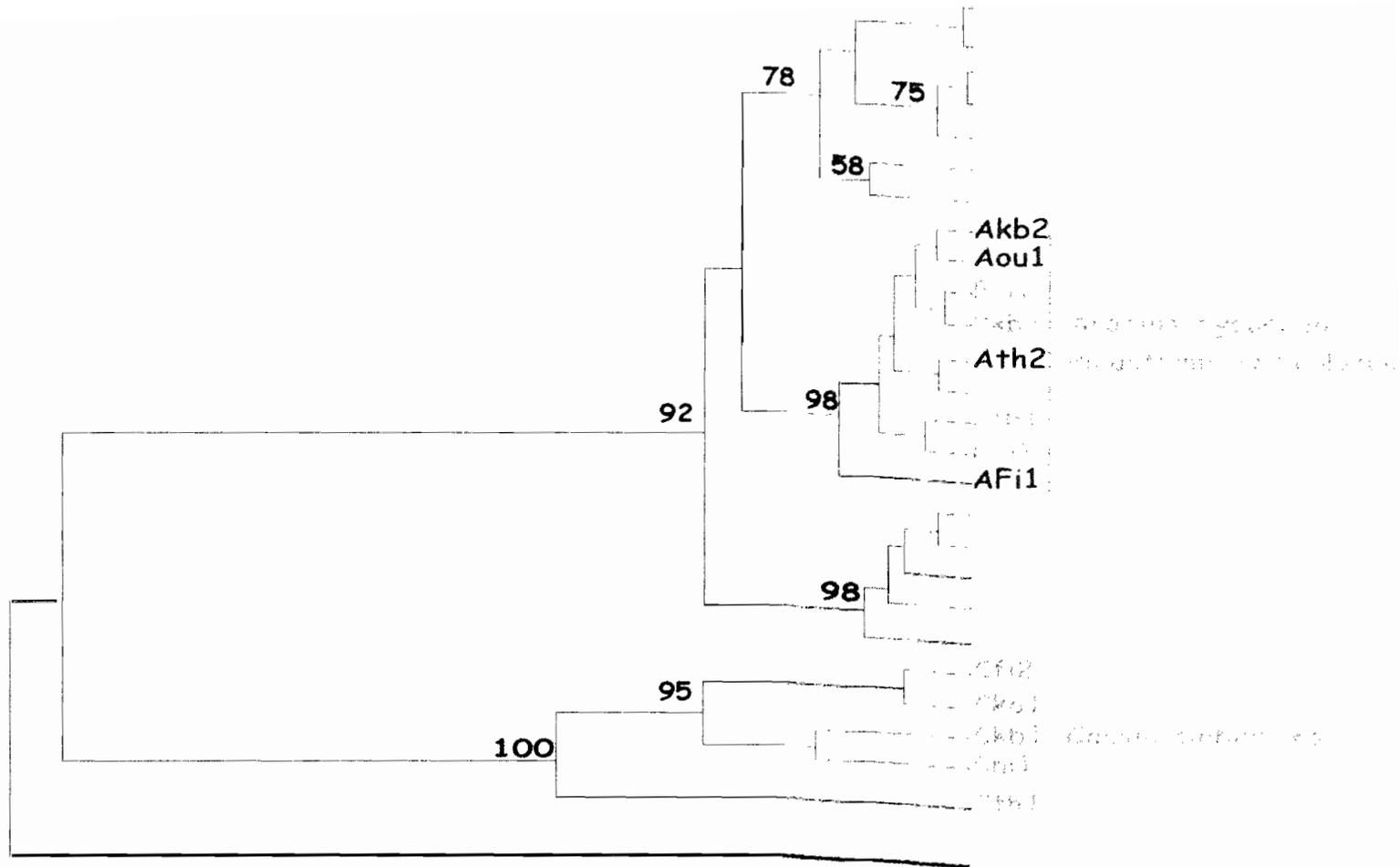


Figure 16 : arbre de consensus obtenu par analyse de parcimonie et recherche heuristique sur les séquences ITS1 de *Caryedon serratus*

### III. DISCUSSION

#### III.1. LES SEQUENCES ITS1

Le premier constat que l'on peut faire en analysant les séquences obtenues est la grande différence de longueur existant entre la séquence ITS1 chez *Caryedon serratus* issu de *Cassia sieberiana* et les autres: environ 130 pb. Ceci semble résulter de nombreuses mutations qui consistent en grande partie en un ajout (insertion) de nucléotides chez la souche "*C. sieberiana*"; quelques rares délétions sont observées cependant dans le génome de *C. serratus* issu de *C. sieberiana*. La plupart de ces mutations se localisent dans des zones hautement mutationnelles constituées d'une série de deux ou plusieurs nucléotides répétés. Souvent appelées ADN satellite, ces séquences offrent de nombreuses possibilités de conversion génique et de recombinaison inégale (Charlesworth *et al.*, 1994).

Les fonctions de ces séquences sont mal connues mais Miklos (1985) pense fortement qu'elles auraient un rôle important dans la détermination de la longueur du centromère, l'appariement des chromosomes et la recombinaison, la détermination de l'architecture tridimensionnelle du noyau et surtout la réorganisation du génome qui peut accompagner le processus de spéciation. Il existe une autre hypothèse: les différences entre les organismes pour les séquences répétées provoquent des effets phénotypiques mineurs (Hartl, 1994) ; par conséquent, les séquences ne sont pas soumises aux forces classiques de la sélection naturelle qui agissent au niveau phénotypique. Ces séquences d'ADN pourraient aussi avoir leur propre dynamisme évolutif déterminé par la conversion génique et la recombinaison inégale. Le nombre de répétitions de chaque séquence pourrait être augmenté ou diminué par des recombinaisons inégales ou d'autres phénomènes. Ce dernier constat pourrait faire penser à une possibilité de formation de boucles dans l'ITS1 de *C. serratus* issus de *C. sieberiana*; boucles qui se seraient formées au niveau de ces ADN satellites et qui s'ouvriraient lors de la dénaturation de l'ADN avant séquençage. L'ensemble des questions soulevées par la fonction des séquences répétées qui semblent être le lieu de mutation chez l'ITS1 de *C. serratus*, a été discuté par Miklos (1985); il souligne l'insuffisance de diverses hypothèses et conclut que l'ADN satellite est sans doute de l'ADN égoïste et que les principaux mécanismes de son évolution sont les mutations, la conversion génique, la recombinaison inégale et la dérive génétique. Cependant quelle que

soit l'interprétation que l'on donne à cette différence de longueur de l'ITS1 chez les souches de *C. serratus*, il est évident qu'il existe une forte différenciation génétique entre la souche "*C. sieberiana*" et les autres. Seules 67,8% des bases des deux groupes sont alignables ce qui témoigne d'une divergence mutationnelle élevée.

D'autre part, à l'intérieur du groupe formé par les souches "Arachide", "Bauhinia", "Piliostigma" et "Tamarindus", il existe des insertions et/ou remplacements de nucléotides qui permettent d'identifier chaque souche. En effet, si l'on prend comme séquence de référence, celle obtenue avec les individus de la souche "arachide", "Bauhinia" est caractérisée par une insertion AT en position 406. Cette insertion se retrouve chez tous les individus de la souche "Bauhinia" analysés. La souche "Tamarindus" est caractérisée par deux remplacements: G à la place de C en position 165 et T à la place de C en position 526. En excluant *C. serratus* issu de *C. sieberiana* des analyses, on peut penser qu'il existe à l'intérieur du second groupe peu de sites informatifs mais suffisants pour les discriminer.

Avec ce niveau de variabilité intraspécifique, on peut dire que l'ITS1 de *C. serratus* constitue un bon marqueur et permet de caractériser chaque souche. Notons que les bruches inféodées à *Piliostigma reticulatum* et celles qui infestent l'arachide ont les mêmes séquences ITS1. Cette similitude entre ces deux souches a été déjà signalée lors d'études morphométriques et allozymiques (Sembène & Delobel, 1996 et 1998).

### III.2. RELATION ENTRE POPULATIONS DE *C. SERRATUS*

Le dendrogramme (Fig. 16) montre deux groupes distincts: un groupe formé des échantillons de la souche "*C. sieberiana*" et un autre composé du reste des échantillons. La valeur de la distance génétique de Kimura entre les individus "*C. sieberiana*" et ceux des autres plantes-hôtes est de 0,62. Celle de Nei séparant ces deux groupes par analyse allozymique est de 0,55 (Sembène, 1997). Ces distances excèdent les distances génétiques typiques entre sous-espèces chez les invertébrés (Klein & Seitz, 1994 ; Emelianov *et al.*, 1995). Une telle différence peut faire penser à l'existence chez *Cassia sieberiana* d'une espèce jumelle de *C. serratus*. Cependant des expériences de croisements contrôlés ont permis de vérifier que malgré cette différenciation génétique, les bruches inféodées à *C. sieberiana* et celles infestant *P. reticulatum* s'hybrident au laboratoire et donnent une

descendance fertile. La fécondité est statistiquement deux fois moindre qu'un témoin: par exemple *Cassia* x *Cassia* ou *Pilostigma* x *Pilostigma*. Mais, il est très souvent énoncé par des auteurs qu'un isolement reproductif peut apparaître entre des populations encore reliées par des flux de gènes à condition que la sélection favorisant les individus adaptés à chacun des hôtes soit forte comparativement à ces flux (Rice & Hostert, 1993). Se pose à nous la difficulté que les spécialistes ont à être d'accord sur la notion d'espèce. Une telle distance génétique peut-elle permettre d'affirmer que les populations de *C. serratus* issues de *C. sieberiana* sont une espèce jumelle? D'autre part, les individus appartenant à cette "espèce" ne révèlent aucune différence morphologique décelable à l'observation par rapport à ceux provenant de l'arachide, de *B. rufescens*, de *Pilostigma reticulatum* ou de *T. indica*. Mais bien que s'hybridant au laboratoire, rien n'indique que les deux "espèces" s'hybrident dans la nature. Une telle distance génétique et le fait que la souche *C. sieberiana* ne révèle que 3 des 7 locus microsatellites mis en évidence (voir chapitre suivant) d'une part, et qu'elle soit la seule à présenter une duplication du locus ADH1 (Sembène *et al.*, 1998) font penser que, dans la nature, les deux pools génétiques sont quasi isolés l'un par rapport à l'autre.

L'émergence de l'évolutionnisme a amené à contester la notion d'espèce telle que précédemment définie. A ce titre Lamarck (1744-1829) bien qu'ayant décrit de nombreuses espèces est arrivé à écrire que " *la nature n'a fourni ni classes, ni ordre, ni famille, ni genres, ni espèces constants mais seulement des individus qui se succèdent les uns aux autres et qui ressemblent à ceux qui les ont produits...Les espèces se fondent les unes dans les autres, de sorte qu'il n'y a aucun moyen de définir par une expression les différences qui les séparent*". Quant à Darwin (1859), il écrit: " *Je considère le terme d'espèce comme arbitrairement donné par pure commodité à un ensemble d'individus se ressemblant beaucoup entre eux...*" Il est certain que la notion de continuum évolutif paraît en opposition avec la définition d'espèce. Cependant, selon la définition classique de l'espèce biologique (Mayr, 1942 *in* Solignac *et al.*, 1995), les espèces sont des groupes de populations réellement ou potentiellement capables de se croiser et qui sont reproductivement isolées des autres groupes ayant les mêmes propriétés. Elle revient à considérer l'espèce comme un ensemble de gènes qui se transmettent d'une génération à l'autre, protégés des pools géniques des autres espèces par l'isolement reproducteur.

Notons aussi que compte tenu de la variabilité génétique, phasaire ou environnementale, le critère morphologique perd de sa valeur. Il peut même devenir source d'erreurs quand il recouvre des réalités biologiques différentes, comme dans le cas d'espèces jumelles (Solignac *et al.*, 1995 ; Hartl, 1994). L'étude de l'ensemble *Drosophila pseudoobscura* a certainement joué un rôle dans cette nouvelle conception de la notion d'espèce (Mayr & Provine, 1980). D'autres exemples d'espèces jumelles ont depuis été donnés: les mouches *Rhagoletis mendax*, contaminant des myrtilles et *Rhagoletis pomonella* contaminant des pommiers et des aubépines (Feder *et al.*, 1994). Chez *Viteus (Daktulospharia) vitifoliae* (Hemiptera: Phylloxeridae), important ravageur des vignes, il est classique de reconnaître des isolats qualifiés de biotypes sur la seule base du comportement alimentaire plus ou moins agressif des hémiptères, de leur taux de reproduction et de leur capacité à provoquer le déclin des vignes. Des marqueurs RAPD ont permis de démontrer qu'aux caractéristiques éthologiques, démographiques et agronomiques, des différents biotypes correspondait une diversité génétique identifiable.

Hormis cette différenciation importante des bruches inféodées à *C. sieberiana*, la structuration génétique de *C. serratus* paraît liée au fait que cette bruche se développe sur plusieurs plantes hôtes. Chez *C. serratus* les différences de comportement des différentes souches, peuvent être éthologiques, nutritionnelles ou reproductives. On sait que les Caesalpiniaceae hôtes de *C. serratus* présentent des graines différentes aussi bien par la forme que par la composition chimique des substances nutritionnelles (Robert, 1985), substances qui peuvent modifier la composition phéromonale ; ce qui pourrait constituer une barrière reproductrice pré-zygotique. Ce phénomène entraînerait évidemment une reproduction préférentielle ; les accouplements se feraient de préférence avec des partenaires s'étant développés dans les graines de la même plante hôte. D'autre part, se pose aussi la question de savoir si les substances nutritionnelles peuvent entraîner à long terme des mutations au niveau des gènes et/ou des changements de fréquences alléliques? Bush & Diehl (1982) pensent que le phénomène de différenciation en races hôtes nécessiterait des modifications génétiques chez les différentes populations sympatriques. Ces modifications concernent les gènes contrôlant le comportement alimentaire et/ou la physiologie digestive de la larve. D'autres facteurs pré ou post zygotiques peuvent intervenir dans les mécanismes favorisant la formation et le maintien des races hôtes ; ils seront discutés dans le chapitre suivant.

Comme l'ont déjà montré la méthode morphométrique et les marqueurs allozymiques, le séquençage l'ITS1 révèle qu'il existe plusieurs biotypes de *C. serratus*, chacun d'eux étant inféodé à une plante ou à un groupe de plantes ; l'isolement entre eux n'est que partiel. Quel est ce degré d'isolement? Morphométrie, allozymes et ADN peuvent apporter des renseignements précieux sur tel ou tel niveau de structuration mais ces marqueurs n'ont pu répondre à la totalité des questions posées et ne permettent pas la décomposition quantitative des différents niveaux de variabilité dans l'espèce. La nécessité de disposer de marqueurs nucléaires suffisamment variables et susceptibles de baliser le génome de façon serrée s'est donc faite ressentir. Dans cette optique, les microsatellites s'avèrent d'excellents outils.

**CHAPITRE III:**  
**LES MICROSATELLITES CHEZ CARYEDON**  
***SERRATUS*: CARACTERISTIQUES ET MODALITES**  
**DE VARIATION.**

## INTRODUCTION

Le génome des Eucaryotes contient des séquences d'ADN répétées en tandem, proches des centromères ou des télomères des chromosomes. Dans certains cas, cet ADN représente une fraction importante du génome (Dover & Flavell, 1982 ; Cavalier-Smith, 1985; John & Miklos, 1988). Cette catégorie inclut l'ADN satellite (séquences hautement répétées en tandem), les minisatellites et les microsatellites (séquences moyennement répétées en tandem) et les éléments transposables (séquences mobiles, dispersées et moyennement répétées).

Les microsatellites sont des séquences d'ADN constituées par la répétition en tandem d'un motif de 1 à 5 pb pour une taille totale n'excédant généralement pas 200 pb. Leur existence est connue depuis les années 70 mais ce n'est qu'au début des années 80 que les premières investigations visant à préciser la structure des microsatellites, leur variabilité, leur nombre et leur distribution dans le génome ont été faites (Hamada *et al.*, 1982). Ces études ont également montré une distribution plus ou moins régulière des microsatellites dans le génome. L'intérêt pour les microsatellites a considérablement augmenté avec la découverte, au niveau de ces séquences, d'un polymorphisme de taille reflétant un nombre variable de motifs répétés. L'avènement des techniques de réactions de polymérisation en chaîne (PCR) dans les années 80 a permis d'accéder à ce polymorphisme. En 1989, les auteurs Litt & Luty, Weber & May et Tautz, caractérisent dans des travaux indépendants la variabilité allélique à plusieurs locus microsatellites en utilisant la PCR. Ces travaux catalysèrent la réalisation d'un nombre important d'études similaires chez des espèces appartenant à différents niveaux évolutifs chez les vertébrés, les invertébrés et les plantes. L'absence de données dans les banques de séquences chez la majorité des eucaryotes a rendu nécessaire l'utilisation de méthodes moléculaires souvent lourdes pour isoler les microsatellites. Dans la majorité des cas, ces méthodes impliquent la constitution et le criblage des banques d'ADN partielles à l'aide de sondes constituées de quelques répétitions du motif recherché. L'investissement financier et temporel nécessaire à l'obtention de sondes microsatellites est quelque peu compensé par le fait que les amorces de PCR déterminées à partir des séquences d'une espèce peuvent être utilisées pour des taxons phylogénétiquement proches (Schlotterer *et al.*, 1991; Stallings *et al.*, 1991; Estoup *et al.*, 1995). On parle alors d'amorçage interspécifique ou cross-priming. Curieusement,

l'isolement et l'étude de microsatellites chez les insectes ont débuté tardivement. Les microsatellites isolés récemment chez différentes espèces d'insectes sociaux (fourmis, guêpes, abeilles et bourdons) montrent un niveau de polymorphisme comparable à celui observé chez les vertébrés (Choudhary *et al.*, 1993 ; Evans, 1993; Huhes & Queller, 1993; Estoup *et al.*, 1994 ; Estoup *et al.*, 1995). Les microsatellites ouvrent par conséquent la porte à une multitude d'études, impossibles à réaliser jusqu'à présent chez ces organismes.

L'origine des microsatellites reste inconnue mais un certain nombre d'arguments suggèrent qu'ils pourraient résulter de l'apparition aléatoire ou par transposition d'un nombre suffisant de motifs répétés pour amorcer le processus générateur de variabilité (Schlötterer & Tautz, 1992 ; Strand *et al.*, 1993 ; Jeffrey *et al.*, 1994 ; Streisinger *et al.*, 1966 ).

De par leur nombre élevé et leur répartition plus ou moins régulière dans le génome, la première application des marqueurs microsatellites a été la construction de cartes génétiques chez l'homme, la souris et les espèces domestiques d'intérêt économique (Dietrich *et al.*, 1992; Vaiman *et al.*, 1994). Ces marqueurs se sont également avérés très performants pour les cas d'identifications judiciaires. Chez l'homme, une augmentation de taille importante de certaines séquences microsatellites peut être directement à l'origine de graves pathologies (chorée de Huntington, X fragile, dystrophie myotonique, syndrome de Kennedy...) ou être associée à certains cancers (Caskey *et al.*, 1992; Imbert *et al.*, 1993 ; Thibodeau *et al.*, 1993. Miwa, 1994).

Le potentiel des microsatellites pour les études de génétique des populations et de génétique évolutive a commencé à être exploré depuis peu. Les différentes méthodes utilisées pour évaluer le taux de mutation des microsatellites montrent qu'ils varient entre  $2.5 \times 10^{-5}$  et  $10^{-2}$  (Weber & Wrong, 1993), et donc dans un domaine compris entre celui des isozymes et celui des minisatellites. Il semble que les taux de mutation les plus élevés soient associés aux microsatellites constitués d'un nombre important de répétitions (Weber, 1990). En d'autres termes, la mutabilité d'une séquence dépend du nombre de ses répétitions pour un locus donné, et un allèle muté ne présentera pas le même degré de mutabilité que l'allèle dont il provient. Ce mécanisme a été baptisé "mutation dynamique" par Richards & Suterland (1992).

Deux modèles ont été utilisés pour étudier la génétique des populations à l'aide des locus microsatellites: le modèle à nombre infini d'allèles (*Infinite allele model* ou *IAM*) et le modèle à pas (*stepwise mutation model* ou *SMM*). Avec le modèle *IAM* on émet l'hypothèse que les nouvelles mutations génèrent toujours des allèles différents de ceux qui sont déjà présents dans la population. A l'inverse, le *SMM* rend possible des convergences de taille d'allèles. Il s'ensuit que des séquences de même taille peuvent ou non être identiques par descendance. Shriver *et al.* (1993) montrent que les distributions des microsatellites observées avec un motif répété de 1-2 pb présentent régulièrement des déviations vers le *IAM*. En étudiant des microsatellites avec 2 pb, Di Rienzo *et al.* (1994) trouvent que les distributions observées s'ajustent convenablement à un modèle qui comprend une majorité de mutations à pas simple (une répétition en plus ou en moins) et une minorité de mutations de plus grande ampleur.

Comme nous l'avons signalé plus haut, une conséquence du taux de mutation élevé et du mode d'évolution probable (*SMM*) des microsatellites est qu'une classe de fragment de taille donnée à un locus, correspond potentiellement à une superposition d'allèles identiques en taille par descendance (homologie) et d'allèles dont la longueur est semblable à la suite d'événements mutationnels multiples par convergence, parallélisme ou réversion (homoplasie). D'autre part, une sélection de faible intensité conduisant à un recentrage des allèles d'un locus microsatellite sur une taille optimale (sélection centripète) a été mise en évidence en comparant des taxons distants phylogénétiquement, à savoir différentes espèces de primates (Ely *et al.*, 1992; Bowcock *et al.*, 1994; Goldstein *et al.*, 1995). Par conséquent, la puissance de résolution des marqueurs microsatellites décroît fortement avec le temps de divergence évolutive. Enfin, quelques microsatellites peuvent présenter des allèles "nuls" correspondant à l'absence de produit d'amplification (Callen *et al.*, 1993). Il en résulte une surestimation du nombre d'homozygotes et un biais dans l'estimation des fréquences alléliques à ces locus.

Les modalités évolutives des microsatellites et les limites de leur champ d'étude en génétique des populations doivent encore être précisées. Leur potentiel semble néanmoins prometteur au vu des récents travaux de génétique des populations réalisés grâce à ces marqueurs chez l'Homme (Bowcock *et al.*, 1994), d'autres mammifères (Gotteli *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1994) et chez les insectes sociaux (Estoup *et al.*, 1995).

## **I. MATERIEL ET METHODES**

Il faut d'abord mettre en évidence les marqueurs microsatellites avant de pouvoir les utiliser. Le clonage de séquences microsatellites nécessite l'utilisation de plusieurs techniques de biologie moléculaire. Cette étape délicate mais incontournable si l'on ne dispose pas de séquences répertoriées dans une banque de données, décourage souvent les expérimentateurs peu familiers des techniques de biologie moléculaire (Estoup, 1995). L'un des objectifs techniques de cette thèse a consisté à isoler et caractériser des microsatellites chez la bruche de l'arachide.

### **I.1. LE SCREENING DE LOCUS MICROSATELLITES CHEZ *C. SERRATUS***

Après un Dot Blot qui a révélé une richesse en microsatellites aussi importante chez l'abeille (Estoup, 1993b) et les *Megastigmus* (Carcreff, 1996), le protocole qui suit a été utilisé pour le screening.

5 µg d'ADN total de *C. serratus* sont digérés intégralement par l'enzyme de restriction SAU3A. Les fragments compris entre 450 et 650 pb sont récupérés sur une membrane DEAE et élués. Ces fragments sont ensuite ligués dans les vecteurs pUC 18. Le produit de ligation est intégré dans des bactéries compétentes XL1 blue. On procède à un double repiquage des colonies blanches. On peut ainsi obtenir 2 séries identiques de 12 boîtes de Petri contenant chacune 219 clones. Sur une série, on effectue un transfert sur membrane. Chaque membrane subit ensuite un traitement de préhybridation pendant 2h dans 30 ml de tampon d'hybridation avec 150 µl de poly A (condition de saturation) afin d'éviter la détection (ou screening) des polyT qui gêne alors celles des vrais microsatellites.

On procède alors à l'hybridation qui dure entre 10 et 12 heures, dans 6 ml de tampon d'hybridation avec 30 µl de chaque type de sonde soit six en tout: (TG)<sub>10</sub>, (TC)<sub>10</sub>, (CAC)<sub>5</sub>, (CCT)<sub>5</sub>, (ATCT)<sub>5</sub> et (TGTA)<sub>6</sub>, à raison de 20 pmol de chaque. Chaque sonde est marquée à la digoxigénine, ce qui permet de les repérer grâce à une réaction colorée avec un anticorps. Le signal coloré signifie que la colonie bactérienne contient un vecteur qui a intégré un fragment d'ADN contenant une séquence microsatellite.

Les différentes étapes du protocole d'isolement des locus microsatellites (du screening au séquençage) sont schématisées dans la figure 17. Le protocole détaillé est donné en annexe 1.

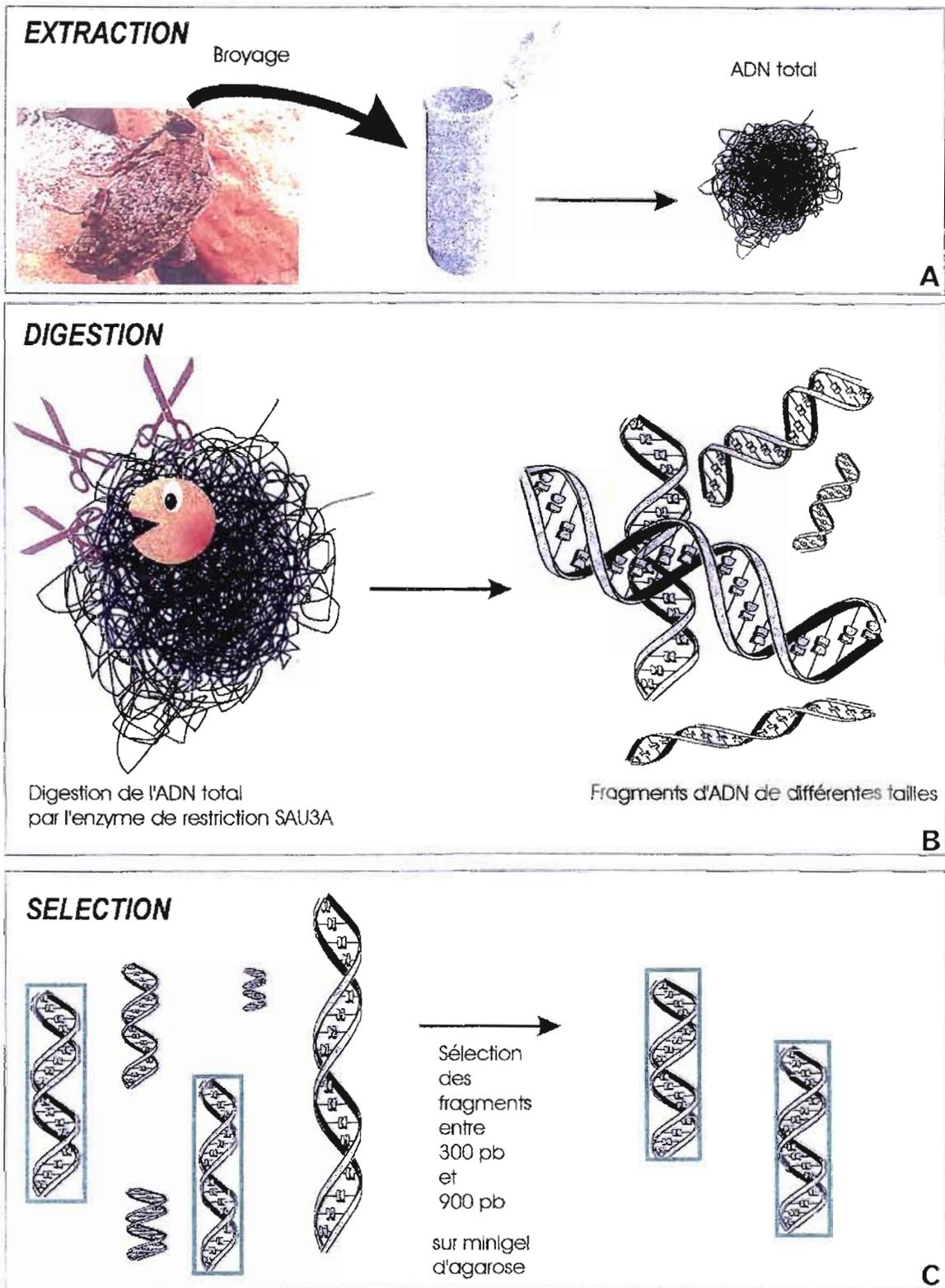


Figure 17 A à L: de l'extraction d'ADN au séquençage des locus microsatellites de *Caryedon serratus*.

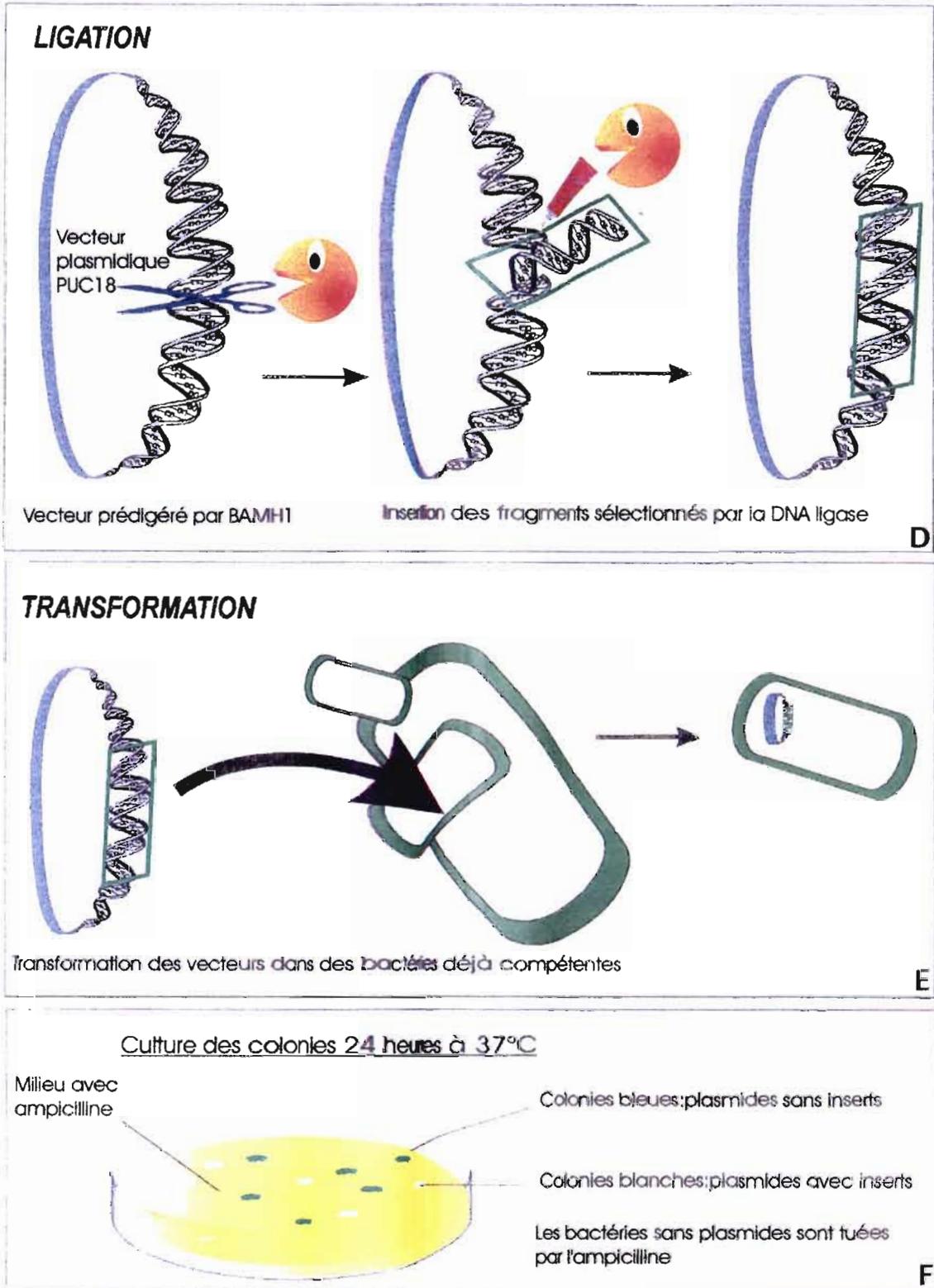


Figure 17 A à L (suite) : de l'extraction d'ADN au séquençage des locus microsatellites de *C. serratus*

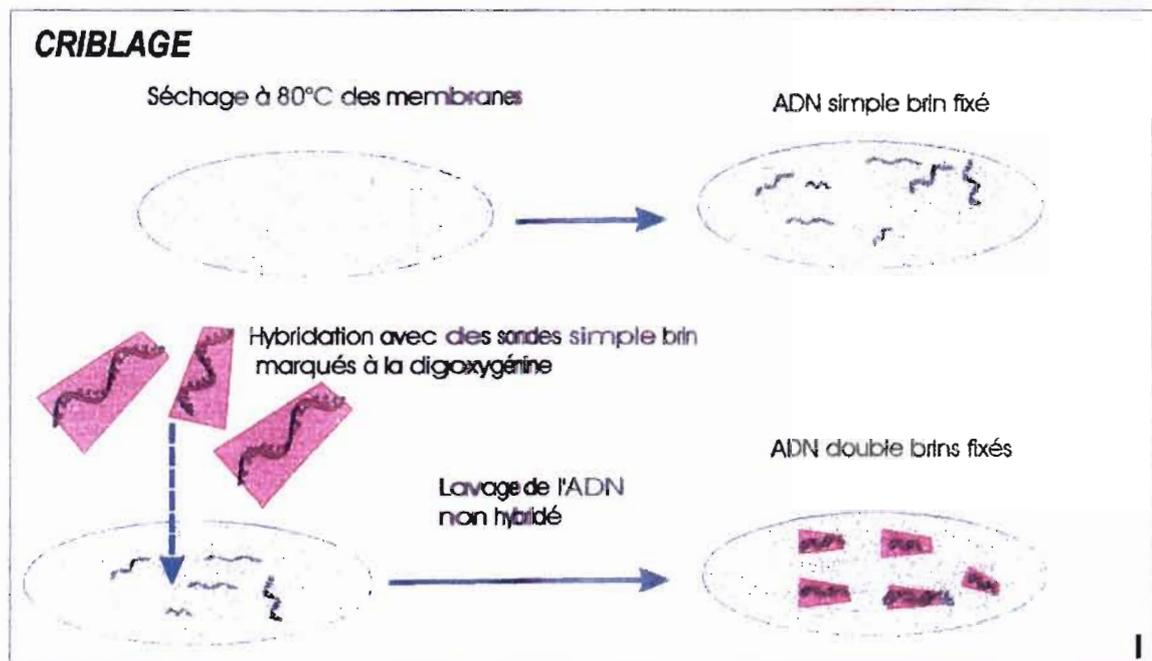
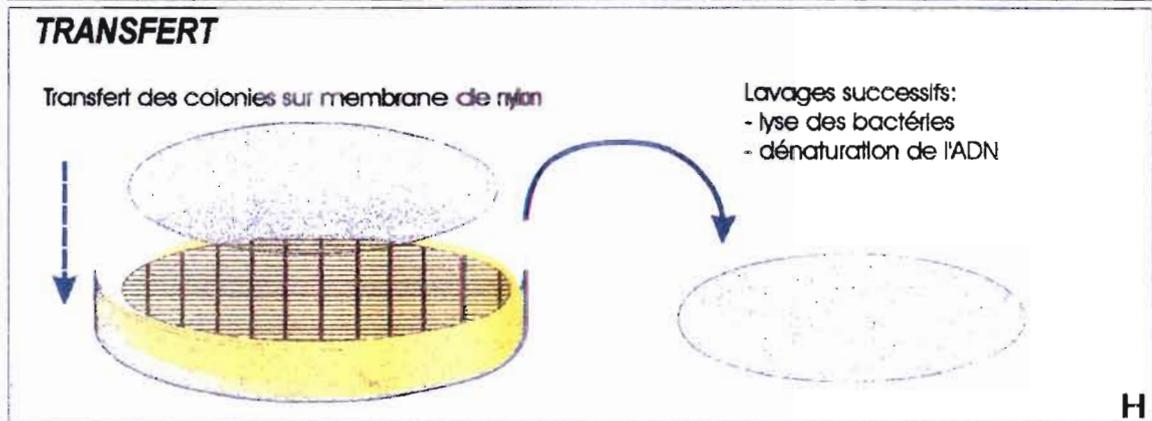
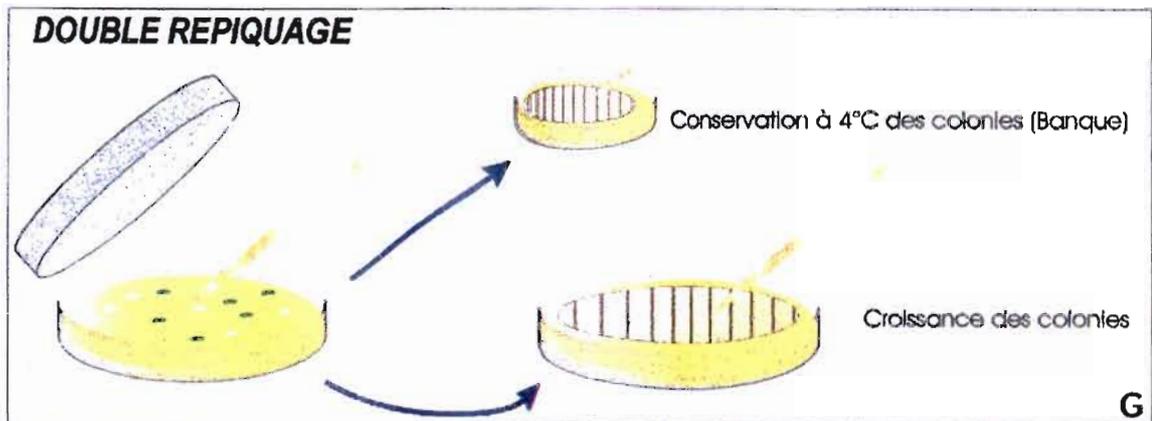


Figure 17 A à L (suite) : de l'extraction d'ADN au séquençage des locus microsatellites de *C. serratus*.

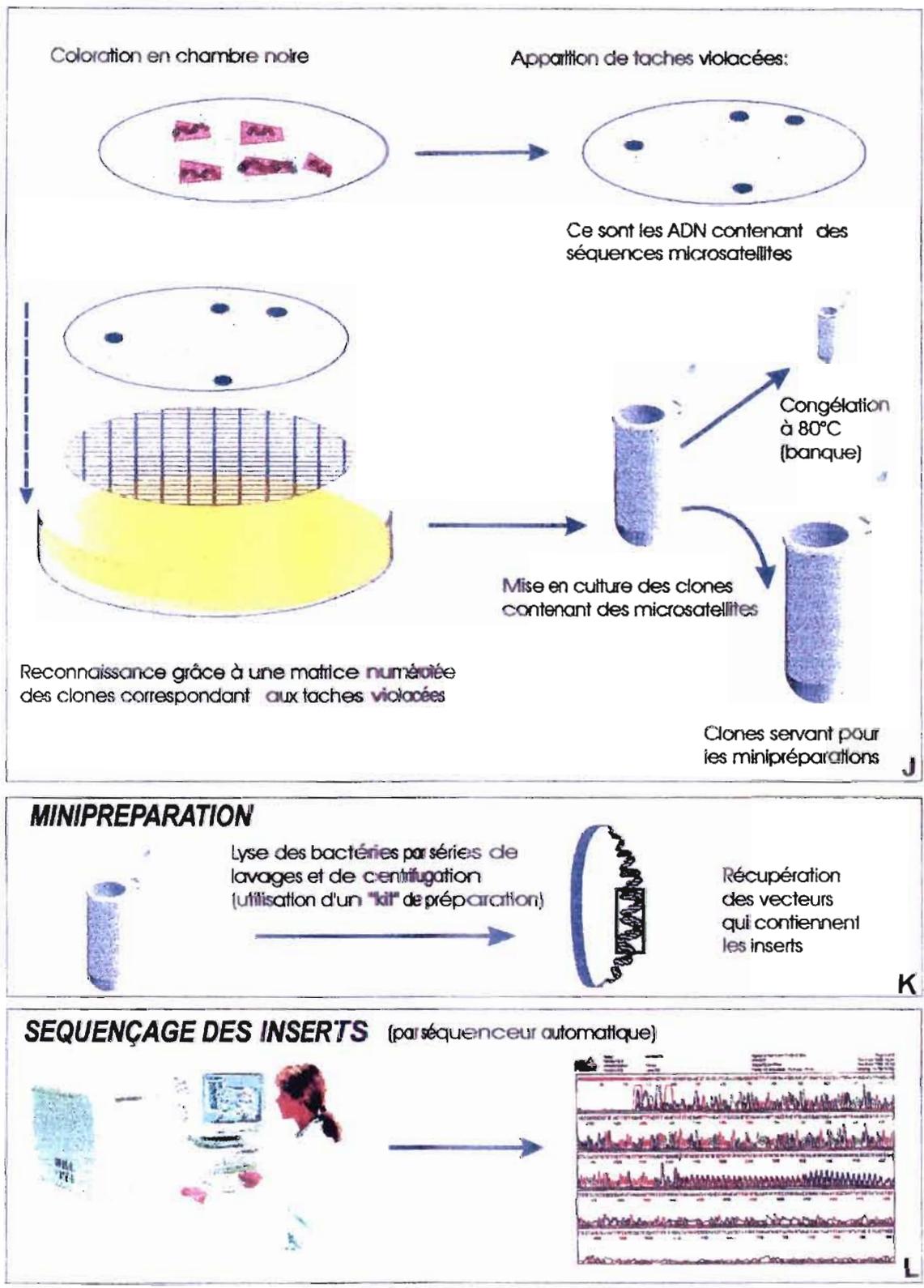


Figure 17 A à L (suite et fin) : de l'extraction d'ADN au séquençage des locus microsatellites de *C. serratus*.

## I.2. DETERMINATION DES AMORCES ET PCR RADIOACTIVE

### I.2.1. Les amorces

La détermination des deux amorces pour chaque locus comportant un microsatellite a été réalisée à l'aide du logiciel OLIGO fonctionnel sur PC et Machintosh. Ce programme calcule plusieurs paramètres des amorces oloigonucléotidiques ( $T_m$ ,  $\Delta G$ , appariements...). Le choix des amorces revêt une importance considérable puisque celles-ci sont à la base même de la spécificité de l'amplification. Pour qu'un couple d'amorces soit bon, il faut qu'il réponde à plusieurs critères lors de sa définition:

- Il faut que les températures de fusion des deux amorces soit identiques ou très proches (moins de 1° C de différence) et qu'elles soient comprises entre 55 et 60 ° C.

- Il faut que les deux amorces aient un minimum de bases qui s'hybrident entre elles si on veut qu'elles soient disponibles lors de la PCR. Ceci doit être vrai aussi pour une amorce avec elle-même. Il faut éviter donc toute formation de structure secondaire.

15 jeux d'amorces ont été définis sur les 19 locus microsatellites obtenus (voir Résultats). On fait alors synthétiser les amorces qui, une fois livrées sous forme lyophilisée, sont de nouveau suspendues dans l'eau stérile à une concentration stock d'environ 100 à 200  $\mu\text{M}$ .

Il est aussi très utile de déterminer la taille exacte de l'allèle cloné (nombre de bases qui composent le fragment de PCR potentiel en incluant les deux amorces). En effet, si une séquence quelconque utilisée comme marqueur de taille est comparée à un allèle microsatellite, la correspondance des tailles peut être biaisée de  $\pm 1$  pb en raison de compositions nucléotidiques différentes. Pour cette raison, l'amplification de l'allèle cloné (matrice = minipréparation diluée au 1/1000) constitue le référentiel de taille le plus juste.

### I.2.2. La kination

Cette étape permet d'accrocher le gamma  $^{33}\text{P}$ , un élément radioactif, à une amorce.

Tableau 2: Produits nécessaires pour la kination de gamma  $^{33}\text{P}$  à une amorce.

Produits	Volume ( $\mu\text{l}$ )
H2O	1,5
Amorce 1 (10 $\mu\text{l}$ )	2,0
Tampon	1,0
Gamma $^{33}\text{P}$	5,0
T4PNK (Pharmacia)	0,5
Total	10

Les 10 µl du mélange sont mis à incuber pendant 30 mn à 37°C puis 2 min à 90 °C et enfin la réaction est stoppée à 4 °C. Ce volume de kination sert à réaliser 2 PCR de 96 réactions chacune.

### 1.2.3. PCR chaude

Tableau 3: Mélange à réaliser pour une PCR radioactive au gamma <sup>33</sup>P .

Produits	Pour une réaction (en µl)	Pour 96 réactions (en µl)
H2O	5,46	589,68
10X buffer	1,00	108,00
MgCl2 (1,2 mM)	0,48	51,84
Amorce 2 froide (10 µM)	0,40	43,20
DNTP (10 mM)	0,30	32,40
BSA (10 mg/ml)	0,20	21,60
Amorce 1 froide (2 µM)	0,064	6,88
Amorce 1 chaude (2 µM)	0,046	5,00
Taq polymérase	0,05	5,40
Total (mix)	8,00	864,00

Le mélange est calculé pour une concentration en MgCl<sub>2</sub> de 1,2 mM (seuls les volumes d'eau et de MgCl<sub>2</sub> changent pour réaliser des PCR à concentration en MgCl<sub>2</sub> différente de 1,2 mM. Le volume final reste le même).

Les PCR chaudes sont faites dans des plaques de 96 puits (Cylepate de Robbins Scientific Corp.) Les plaques sont ensuite mises dans un thermocycleur de Biometra (UNO thermoblock). Pour cela, il faut répartir 8 µl de mélange par tube dans 2 µl d'ADN et faire le programme de PCR suivant la température d'hybridation

92 °C	:	pendant 5mn	→	Dénaturation initiale
92 °C	:	pendant 30 secondes	←	Un cycle
température d'hybridation	:	pendant 30 secondes	→	
72 °C	:	pendant 30 secondes	←	Un cycle
72 °C	:	pendant 10 min	→	
10 °C	:	à l'infini		

### 1.2.4. Migration des produits de PCR

Celle-ci se fait sur un gel dénaturant de polyacrylamide-urée à 6% d'acryl. Le gel contient 96 puits dont l'un est occupé par une séquence nucléotidique servant de marqueur pour compter le nombre de bases entre allèle. On dépose aussi deux, voir trois fois une PCR chaude effectuée avec le clone dont la séquence a permis de définir le couple d'amorce au locus étudié. Une autoradiographie du gel permet par la suite de définir le génotype des individus étudiés.

### I.3. PARAMETRES GENETIQUES ET STATISTIQUES

L'analyse des séquences, suivie de leur interprétation génétique, a permis d'identifier, pour chaque locus microsatellite, les génotypes de chaque individu. Ces données sont récapitulées sur des fiches et traitées par informatique en utilisant cinq logiciels: GeneClass, pop100gene, Genepop V1.2 (Raymond & Rousset, 1994), Biosys V 1.7 (Swofford & Selander, 1981) et Fstat V 1.2 (Goudet, 1995). Le polymorphisme (au sens large) des différents échantillons de *C. serratus* est recherché à trois niveaux: la variabilité génétique, l'équilibre génétique et la structure génétique à différents niveaux hiérarchiques.

#### I.3.1. Variabilité génétique

##### I.3.1.1. Nombre moyen d'allèles

Le nombre moyen d'allèles par locus ( $A$ ) est calculé pour l'ensemble des locus étudiés, y compris les locus n'en comportant qu'un. Il est déterminé en faisant le rapport de la somme des allèles ( $a$ ) au nombre de locus ( $r$ ) d'un échantillon donné:  $A = \sum a / r$ .

Si des gènes codant pour des locus ont plus d'allèles que ce que permet la mutation, les allèles doivent alors s'accumuler sous l'effet d'autres forces agissant dans la nature. En revanche, s'il y a moins d'allèles que ce qu'on attend, d'autres forces doivent participer à l'élimination des allèles.

##### I.3.1.2. Fréquences alléliques

La façon la plus simple de décrire la variation mendélienne consiste à donner la distribution des fréquences des génotypes dans la population. La variation peut exister aussi bien au sein d'une population qu'entre populations. Plus généralement, au lieu des fréquences génotypiques, on utilise les fréquences des allèles distincts. Si  $f_{AA}$ ,  $f_{Aa}$  et  $f_{aa}$  sont les proportions des trois génotypes pour un locus à deux allèles, les fréquences  $p(A)$  et  $q(a)$  de ces allèles s'obtiennent en comptant leur nombre. Puisque chaque homozygote  $AA$  ne comporte que des allèles  $A$  et que seule la moitié des allèles de chaque hétérozygote  $Aa$  est du type  $A$ , la fréquence totale ( $p$ ) des allèles  $A$  dans la population est  $p = f_{AA} + 1/2 f_{Aa}$  et celle ( $q$ ) des allèles  $a$  est  $q = f_{aa} + 1/2 f_{Aa}$ . Si des allèles multiples sont en cause, la fréquence de chacun des allèles est donnée par la fréquence des homozygotes plus la moitié de la somme des fréquences de tous les hétérozygotes auxquels il participe.

La fréquence d'un allèle donné, dans une population, peut être modifiée par mutation, sélection ou migration, ou encore par les effets de l'échantillonnage au hasard (échantillons trop petits).

#### 1.3.1.3. Taux de polymorphisme

Chaque espèce ou organisme révèle une variation génétique considérable qui s'exprime au sein de l'individu, au sein d'une population ou d'une population à une autre. Le polymorphisme enzymatique est l'une des descriptions quantitatives de cette variation. Certains locus ne présentent qu'un allèle dans l'échantillon étudié, d'autres plusieurs et avec des fréquences plus ou moins élevées. Les premiers sont dits monomorphes et les seconds polymorphes. Le polymorphisme est calculé, pour chaque échantillon, en faisant le rapport du nombre de locus polymorphes au nombre total de locus (polymorphes et monomorphes) révélés. Toutefois, certains locus peuvent présenter un allèle très fréquent et un ou plusieurs allèles rares. Ceux-ci ne seront alors détectés que si la taille de l'échantillon est suffisamment grande. Aussi, une application stricte de ce critère peut conduire à les classer dans l'un ou l'autre catégorie selon la taille ou les hasards de l'échantillonnage. Pour éviter cet inconvénient, on se fixe un seuil de fréquence correspondant à la probabilité de détecter les allèles rares: 5% ou 1%. Pour notre étude, nous considérons un locus comme monomorphe si son allèle le plus commun a une fréquence supérieure à 0,95.

#### 1.3.1.4. Hétérozygotie

Le taux d'hétérozygotie est l'indice le plus satisfaisant de la variabilité génétique (Lucotte, 1983). Sa valeur numérique dépend du nombre de locus polymorphes et de la structure génotypique de chacun d'eux. Le taux d'hétérozygotie est pour chaque locus, la fréquence totale des génotypes hétérozygotes observés dans un échantillon pour ce locus. L'hétérozygotie sera élevée si de nombreux allèles existent avec la même fréquence. En revanche, si un allèle est très commun et les autres rares, il y a très peu d'hétérozygotes. Si l'on considère plusieurs locus à la fois, on peut calculer l'hétérozygotie observée dans nos échantillons ( $H_o$ ) soit en faisant une moyenne de la fréquence des hétérozygotes aux différents locus, soit en prenant les fréquences gamétiques et en calculant le nombre d'individus porteurs de deux formes gamétiques différentes. Les résultats obtenus dans les deux cas sont en général légèrement différents. Nous avons utilisé la première méthode, disponible dans le logiciel Biosys V 1.7. (Swofford & Selander, 1981).

Un taux d'hétérozygotie théorique qui correspond à l'hétérozygotie de la population, en la supposant à l'équilibre de Hardy-Weinberg a pu être établi:  $H_w = 1/r \sum h$  où  $r$  est le nombre de locus et  $h$  l'hétérozygotie à chaque locus, à savoir  $h = 1 - \sum x_i^2$  où  $x_i$  est la fréquence du  $i^{\text{ème}}$  allèle à ce locus.

La comparaison de  $H_o$  et  $H_w$  a été faite par le test exact de Fisher disponible dans Genepop V.1.2 (Raymond & Rousset, 1995).

### **I.3.2 Equilibre génétique**

#### **I.3.2.1 Equilibre de Hardy-Weinberg**

L'ensemble des forces qui s'exercent sur une population détermine sa constitution génétique et tend à la maintenir ou la modifier. Les fréquences génotypiques et les allèles sont liés par des relations qu'il est possible de formaliser par un modèle mathématique plus ou moins complexe (Suzuki *et al.*, 1991). L'un des modèles les plus simples est celui de Hardy-Weinberg qui repose sur plusieurs hypothèses:

- l'organisme considéré est diploïde
- la reproduction est sexuée
- les générations sont non chevauchantes
- les croisements se font au hasard
- la taille de la population est très grande
- les migrations sont négligeables
- les mutations sont insignifiantes
- la sélection n'a pas d'effet sur les allèles considérés

De ce modèle découle la loi de Hardy-Weinberg qui dit que dans une population panmictique, en équilibre, d'effectif élevé, ne présentant ni mutation, ni sélection, ni migration, les fréquences génotypiques et alléliques restent constantes d'une génération à une autre. Par exemple, pour un locus autosomique possédant  $k$  allèles:  $A_1, A_2, \dots, A_k$ , la fréquence totale des génotypes homozygotes est  $\sum x_i^2$  avec  $x_i$  la fréquence de l'allèle  $A_i$  et la fréquence totale des hétérozygotes est  $2\sum x_i x_j$  avec  $x_j$  la fréquence de l'allèle  $A_j$ . Une population naturelle est alors dite en équilibre de Hardy-Weinberg (équilibre panmictique) quand la distribution génotypique des individus est:  $\sum x_i^2 A_i A_i + 2\sum x_i x_j A_i A_j + \sum x_j^2 A_j A_j$

Cette distribution doit se maintenir de génération en génération en l'absence de forces de spéciation. Au niveau pratique, tout écart observé par rapport à cet équilibre, peut être statistiquement analysé. Deux méthodes peuvent être utilisées:

a/ Lorsque les effectifs sont suffisamment élevés, l'adéquation des fréquences génotypiques aux proportions de Hardy-Weinberg peut être testée par le  $\chi^2$  (chi-deux) de Pearson.

b/ Le test exact de Fisher qui peut être utilisé quelle que soit la taille des échantillons.

Nous avons recherché l'équilibre panmictique dans chaque échantillon, à l'intérieur de chaque souche (plante hôte), dans toutes les sous-populations (localités) et pour l'ensemble des échantillons.

#### I.3.2.2 Equilibre de liaison

Dans une situation panmictique, les allèles de tout gène se répartissent selon des génotypes qui sont des combinaisons aléatoires dont les fréquences sont données par la loi de Hardy-Weinberg. Dans les gamètes, les allèles d'un gène A peuvent ne pas être associés de façon aléatoire avec les allèles d'un gène B. Quand les allèles de gènes différents s'associent au hasard, la fréquence d'un gamète portant une combinaison particulière d'allèles est égale au produit des fréquences de ces allèles. Les gènes qui sont associés au hasard sont dits en équilibre de liaison et les gènes non associés au hasard sont dits en déséquilibre de liaison (Solignac *et al.*, 1995).

L'absence de déséquilibre de liaison entre locus est recherchée par le test exact de Fisher. L'hypothèse nulle est l'indépendance entre les locus.

### I.3.3 Structure génétique hiérarchique

#### I.3.3.1. Indices de fixation

Ce sont des paramètres qui mesurent le déficit en hétérozygotes observé dans les échantillons par rapport aux taux d'hétérozygotes attendus dans le cas de l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Dans une population, trois niveaux hiérarchiques peuvent être observés: Celui de l'individu (I), celui de la sous-population à laquelle il appartient (S) et enfin celui de la population considérée dans son ensemble (T) (Wright, 1978).

Pour caractériser l'hétérozygotie de ces niveaux, Wright (1978) définit les paramètres suivants:

- $H_I$  = hétérozygotie moyenne observée dans une sous-population
- $H_S$  = hétérozygotie moyenne attendue dans une sous-population panmictique
- $H_T$  = hétérozygotie moyenne attendue dans une population globale panmictique

Le premier indice de fixation  $F_{is}$  (i comme individu et s comme sous-population) correspond au coefficient de consanguinité et mesure la réduction éventuelle de l'hétérozygotie individuelle à l'intérieur de la sous-population. Pour chaque allèle,

$$F_{is} = (H_s - H_i) / H_s$$

$F_{is} = 0$  dans le cas où la population est panmictique

$F_{is} = 1$  quand il n'y a que des homozygotes dans la sous-population ; il y a fixation complète de l'allèle

$F_{is} = -1$  s'il n'y a que des hétérozygotes dans la population

Le deuxième indice  $F_{it}$  (i comme individu et t comme totale) mesure la réduction d'hétérozygotie totale entre l'individu et la population totale:  $F_{it} = (H_T - H_i) / H_T$

Si  $F_{is}$  et  $F_{it}$  sont différents, c'est qu'il existe une autre source de déficit en hétérozygotes, due à une différenciation entre les différents échantillons. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet Wahlund (1928).

Entre les sous-populations et la population totale, l'effet de la subdivision est exprimé par  $F_{st}$  (s comme sous-population et t comme total). Il est appelé index de fixation :

$$F_{st} = (H_T - H_s) / H_s.$$

Cet indice peut prendre des valeurs comprises entre 0 et 1.

$F_{st} = 0$  quand il n'y a pas de différence entre les fréquences alléliques des sous-populations ;  $F_{st} = 1$  quand tous les échantillons sont panmictiques et totalement isolés.

Les trois indices sont liés par la relation:  $(1 - F_{it}) = (1 - F_{is})(1 - F_{st})$

Si toutes les sous-populations sont bien en équilibre de Hardy-Weinberg, on a :

$F_{is} = 0$ , et donc  $F_{it} = F_{st}$ . Si elles sont toutes en équilibre de Hardy-Weinberg et ont les mêmes fréquences alléliques,  $F_{is}$  et  $F_{st}$  sont nuls et  $F_{it}$  aussi. La division en sous-populations n'existe plus en fait et la population globale est à l'équilibre de Hardy-Weinberg.

L'objectif de l'utilisation des indices de fixation est d'obtenir des paramètres significatifs rendant compte de la variabilité génétique intra- et inter-groupes à l'intérieur d'un ensemble. Mais les échantillons prélevés dans chacun des groupes ont une taille réduite par rapport à l'effectif total de ces groupes. Il faut donc tenir compte du biais introduit par l'échantillonnage et construire des estimateurs non biaisés des différents paramètres.

Deux familles d'estimateurs existent dans la littérature (Nei & Chesser, 1983 ; Weir & Cocherham, 1984). Mais Goudet (1995) a montré que l'estimateur de  $F_{st}$  calculé par la méthode de Nei & Chesser (1983) était biaisé par le nombre d'échantillons utilisés, alors que celui fourni par la méthode de Weir & Cocherham (1984) ne l'était pas. Nous avons donc utilisé les estimateurs  $f$  et  $\theta$  de Weir et Cockerham (1984) des  $F$ -statistiques (Wright, 1978) pour analyser la différenciation génétique de l'ensemble des échantillons.  $f$  (coefficient de consanguinité) et  $\theta$  (degré de différenciation génétique) correspondent respectivement aux  $F_{is}$  et  $F_{st}$  de Wright.

Toutes les analyses ont été faites selon deux critères: la plante hôte et l'origine géographique. La différence des valeurs de  $\theta$  et  $f$  par rapport à 0 est testée par :  $\chi^2 = 2N (\theta)(k-1)$  pour  $k$  allèles et  $s$  échantillons avec  $(k-1)(s-1)$  degré de liberté (Raymond & Rousset, 1995).

### 1.3.3.2 Identité et Distance génétiques de Nei

Ces paramètres, comme les indices de fixation, rendent compte de la structuration génétique intra et inter-échantillons.

L'identité génétique de Nei ( $I$ ) est aussi appelée indice de ressemblance de Nei. Si  $X_i$  est la fréquence de l'allèle  $i$  d'un gène d'une population  $X$  et  $Y_i$  celle de l'allèle  $i$  au même locus dans une population  $Y$ , la probabilité d'identité de 2 allèles pris au hasard, l'un dans  $X$  et l'autre dans  $Y$ , est  $P_{XY} = \sum X_i Y_i$ .

De même la probabilité d'identité de deux allèles pris au hasard à ce locus, au sein de  $X$  est  $P_X = \sum X_i^2$ , et au sein de  $Y$ , est  $P_Y = \sum Y_i^2$ . Alors:  $I = P_{XY} / P_X P_Y$ . Si les deux populations possèdent les mêmes allèles à des fréquences identiques, on a  $P_{XY} = P_X = P_Y$  et  $I = 1$ . Si elles n'ont aucun allèle en commun,  $P_{XY}$  est égal à 0 et  $I$  est nul.

La distance génétique de Nei ( $D$ ) ou indice de dissemblance de Nei est le cologarithme népérien de  $I$ :  $D = -\log I$ .  $D$  varie de 0 (identité des échantillons comparés) à l'infini. Si par exemple,  $D = 0,15$ , c'est qu'en moyenne 15 remplacements d'allèles seront intervenus dans 100 locus depuis que les lignées des deux populations comparées se sont séparées (Pasteur *et al.*, 1987).

### I.3.3.3 Flux génique

Le flux génique entre les bruches inféodées aux différentes plantes hôtes est calculé à partir de la relation  $F_{st} = 1/(4Nm + 1)$  où  $Nm$  est le nombre effectif de migrants par génération (Wright, 1931).

## I.4. ARBRES PHYLOGENETIQUES

Les données microsatellites des populations de *C. serratus* ont été ensuite utilisées pour la construction d'arbres phylogénétiques en utilisant l'algorithme du Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987). La distance des allèles partagés (DAS) de Chakraborty & Jin (1993) a été calculée entre les individus et entre les populations. Pour chaque locus, la distance est de 1 si les deux individus n'ont aucun allèle en commun, de 0 s'ils ont leurs 2 allèles identiques et de 0,5 dans les autres cas. La DAS entre individus est calculée comme la moyenne de ces valeurs sur l'ensemble de ces locus étudiés. La DAS entre populations correspond à la moyenne des DAS entre individus de chacune des populations. Cette distance a permis la construction d'un dendrogramme des individus et des populations grâce à un programme réalisé par Jean-Marie Cornuet (Laboratoire de Modélisation et de Biologie Evolutive de Montpellier).

La robustesse de la topologie de l'arbre des populations a été établie par rééchantillonnage (bootstrapping) en effectuant 2000 tirages qui ont porté sur les individus. Pour ce dendrogramme, un indice de classification ( $I_c$ ) a été calculé afin d'établir la qualité du regroupement des individus sur les branches du dendrogramme en fonction de leur appartenance, connue a priori, à une population d'origine (Estoup, 1995). La formule de calcul de cet indice est:  $I_c = (d_T - d_G) / (d_T - d_M)$ , où  $d_T$  est la distance moyenne entre deux individus tirés au hasard dans l'échantillon total,  $d_G$  la distance moyenne entre deux individus d'une même population et  $d_M$  la distance moyenne entre deux groupes monophylétique d'un même effectif que le groupe étudié. La distance entre deux individus est le nombre total d'individus qui entre dans la composition du rameau défini par le nœud le plus externe reliant ces deux individus. Pour un groupe monophylétique de  $n$  individus, on peut montrer que:  $d_M = 2(n+1) / 3$ .  $I_c$  varie de 1 (les individus d'une population forment un groupe monophylétique) à 0 (ils sont distribués au hasard dans le dendrogramme) mais peut être négatif jusqu'à la limite de  $-0,5$  lorsque leur dispersion est supérieure à celle attendue d'une répartition au hasard.

## II. RESULTATS

### II.1. LES MICROSATELLITES SEQUENCES

Sur les 22 clones séquencés, 19 se sont révélés porteurs de locus microsatellites. Nous avons retrouvé les trois catégories de microsatellites classiquement définies (Figure 18): les microsatellites imparfaits ou interrompus (présentant une ou plusieurs des types bases substituées ou des insertions/délétions autres qu'un nombre entier du motif répété), les microsatellites parfaits (sans interruption dans la série du motif répété) et les microsatellites composés (microsatellite parfait ou imparfait adjacent à une autre séquence répétée). Les différents types de microsatellites que nous avons obtenus sont répertoriés dans le tableau 4.

Tableau 4: microsatellites obtenus et conditions de PCR pour les jeux d'amorces définies.

Locus	Catégorie	Structure	Amorces de PCR sens 5'....3'	TH en °C
M285	Parfait	(CA) <sup>9</sup>	Non définies	Non définie
M480	Parfait	(GT) <sup>74</sup>	Non définies	Non définie
M113	Parfait	(CT) <sup>36</sup>	GTACCTCGGATTTACATGGC CAGTAGATCACACCTGTCAGAAC	55
M12oméga	Parfait	(GT) <sup>19</sup>	GCTATAGCTTCCAAACAGAAC GCTCAAAGCTTCCTTACG	55
M2149	Parfait	(CT) <sup>58</sup>	GTTCAATTATATGACAGGCCG GGCAGCCCTACTACTACAAG	55
M13113	Parfait	(GT) <sup>31</sup>	GATGTTTTGAAAAGACCTGATACC CTTCTATTCGCCCATTTGTTG	58
M625	Parfait	(CT) <sup>21</sup>	GTGGAATCTGGCAGAGTGC CGTGAAGTTAAGGTCATTAGCC	56
M97	Parfait	(CT) <sup>24</sup>	GAGTGAACACCTGAAGCAG CCTAAGACTCTTACTACTGTGG	55
M984	Parfait	(GA) <sup>30</sup>	CCCATCAGTAATCAGTCCGTTG GATAAAGTCCATGGAACAGGC	58
M2delta	Imparfait	(GAAG)AT(GAAG) <sup>3</sup>	CCAGGGGGCGAAAAGACC CATGTTTCGTTGTTATCTCGG	59
M16téta	Imparfait	(GTT) <sup>2</sup> (GTTTT) <sup>2</sup> (GTT)	Non définies	Non définie
M1N	Imparfait	(CG) <sup>2</sup> CTG (CG)	Non définies	Non définie
M7153	Imparfait	(CA) <sup>6</sup> G(CA) <sup>4</sup> T(CA) <sup>5</sup>	CATGACAACGGAAGTACTTGC GTGTGTAGGAAAGCTAGGATTTG	57
M836	Imparfait	(GA) <sup>33</sup> (G) <sup>5</sup> (A) <sup>3</sup> GAGT(GA) <sup>8</sup>	CAGACTGGCAAATATGGACC CCCAGAGACAGTCAGAGCC	56
M12M	Composé	(AT) <sup>13</sup> CA(GT) <sup>24</sup>	Non définies	Non définie
M821	Composé	(CT) <sup>27</sup> (GT) <sup>x</sup>	Non définies	Non définie
M5149	Composé	(AT) <sup>4</sup> (GT)(AT) <sup>21</sup> (CT)(GT) <sup>16</sup>	GGATCATCTACAATCAATCGAC CCACGCATTAAGCCAAG	55
M66	Composé	(CA) <sup>3</sup> CGCA(CT) <sup>7</sup> (CA) <sup>4</sup> (CG)(CA) <sup>22</sup>	CAAAGTTCAGCC'TCCC' CATTATGCGTTCC'TATGGC'	55
M1425	Composé	(AT) <sup>15</sup> (CA)(GT) <sup>24</sup>	GGATCACTGATAAAGCACAAATTC CCGAGATACATACGAGTGCTG	57





47,4% des locus sont constitués de microsatellites parfaits et 74,8% de l'ensemble des locus sont constitués de séquence en (GT)<sub>n</sub> et (CT)<sub>n</sub> soit 43,2% de séquence en (GT)<sub>n</sub> et 31,6% de séquence en (CT)<sub>n</sub>.

Les propriétés d'amorçage interspécifiques et intraspécifiques des microsatellites ont été aussi étudiées au sein du genre *Caryedon*. Ainsi, seulement 3 des 7 locus amplifiés chez *C. serratus* donnent des fragments d'amplifications chez *C. serratus* inféodée à *C. sieberiana*, à savoir M66, M1425 et M836. Quatre de ces locus amplifient chez *C. longispinosus* inféodée à une Mimosaceae: *Acacia raddiana* ; il s'agit des trois précités et M984. Seul un de ces locus fonctionne chez *C. crampeli*, *C. acaciae* et *C. immaculatum* : il s'agit de M1425. Le niveau de variabilité par locus microsatellite s'est avéré en outre très différent selon les espèces car un microsatellite hypervariable dans une espèce donnée peut être monomorphe dans une autre espèce, même proche phylogénétiquement.

## II.2 . ANALYSE POPULATIONNELLE

Le fichier des données microsatellites (annexe 2) donne le génotype des 560 bruches appartenant à 16 populations pour 5 locus polymorphes. 2 locus (M66 et M13113) sur les 7 locus testés pour cette étude sont monomorphes.

Les bruches inféodées à *C. sieberiana* ont été éliminées des analyses car, comme indiqué plus haut, elles n'amplifient que 3 locus sur les 7 étudiés.

Les 5 locus microsatellites analysés que sont M1425, M625, M836, M97 et M984 sont variables en taille, ce qui génère plusieurs allèles pour chacun d'eux. Le nombre d'allèles par locus varie de 7 pour M97 à 15 pour M836.

Les fréquences alléliques des différentes populations sont données au tableau 5. Le taux d'hétérozygotie sous Hardy-Weinberg ainsi que la diversité génétique des différentes populations aux différents locus sont donnés au tableau 6.

Le nombre moyen d'allèles pour l'ensemble des locus est de 5.3. Il varie de 4,0 chez "*Bauhinia*" et "arachide" à 6.4 chez "*Pilostigma*" et "*Tamarindus*" ; il est pratiquement identique à l'intérieur d'une même souche, suggérant l'existence de forces qui tendent à conserver la même variabilité génétique chez les échantillons d'une même souche. On note une plus grande variabilité intra-locus dans les populations issues de *P. reticulatum* et celles obtenues de *T. indica*. La plus faible variabilité est obtenue dans les populations issues de *B. rufescens* et celles obtenues de l'arachide. L'hétérozygotie moyenne est de  $0.541 \pm 0.08$

Tableau 5: fréquences alléliques des 16 populations étudiées pour 5 locus polymorphes.

Locus: M1425

Pop	Alleles												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
AF35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.471</b>	0.000	<b>0.386</b>	0.000	<b>0.100</b>	<b>0.043</b>	0.000
BF35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.559</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.368</b>	0.000	0.000	<b>0.074</b>
PF35	0.000	<b>0.029</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.371</b>	<b>0.014</b>	<b>0.186</b>	0.000	<b>0.014</b>	<b>0.386</b>	0.000
TF35	<b>0.014</b>	<b>0.029</b>	0.000	<b>0.014</b>	<b>0.043</b>	0.000	<b>0.029</b>	<b>0.486</b>	0.000	0.000	<b>0.229</b>	<b>0.157</b>	0.000
AK35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.014</b>	<b>0.486</b>	0.000	<b>0.400</b>	0.000	<b>0.014</b>	<b>0.086</b>	0.000
BK35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.529</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.457</b>	0.000	0.000	<b>0.014</b>
PK35	0.000	<b>0.029</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.343</b>	<b>0.029</b>	<b>0.014</b>	0.000	0.000	<b>0.586</b>	0.000
TK35	0.000	0.000	<b>0.014</b>	<b>0.043</b>	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.029</b>	<b>0.529</b>	<b>0.029</b>	<b>0.029</b>	<b>0.271</b>	<b>0.043</b>	0.000
AL35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.386</b>	0.000	<b>0.443</b>	0.000	<b>0.129</b>	<b>0.043</b>	0.000
BL35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.629</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.314</b>	0.000	0.000	<b>0.057</b>
PL35	0.000	<b>0.014</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.371</b>	<b>0.014</b>	<b>0.014</b>	0.000	0.000	<b>0.586</b>	0.000
TL35	0.000	0.000	0.000	<b>0.043</b>	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.043</b>	<b>0.571</b>	<b>0.029</b>	0.000	<b>0.271</b>	<b>0.029</b>	0.000
AO35	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.457</b>	<b>0.014</b>	<b>0.400</b>	0.000	<b>0.100</b>	<b>0.014</b>	0.000
BO35	<b>0.014</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.014</b>	<b>0.571</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.371</b>	0.000	0.000	<b>0.029</b>
FO35	0.000	<b>0.029</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.353</b>	0.000	<b>0.206</b>	0.000	<b>0.029</b>	<b>0.382</b>	0.000
TO35	0.000	0.000	0.000	<b>0.043</b>	<b>0.043</b>	0.000	<b>0.014</b>	<b>0.529</b>	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.300</b>	<b>0.057</b>	0.000

Locus: M625

Pop	Alleles												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
AF35	<b>0.014</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.400</b>	0.000	<b>0.171</b>	0.000	0.000	<b>0.400</b>	0.000	<b>0.014</b>	0.000
BF35	0.000	0.000	<b>0.015</b>	<b>0.574</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.324</b>	0.000	<b>0.088</b>	0.000	0.000
PF35	<b>0.014</b>	<b>0.043</b>	0.000	0.000	<b>0.043</b>	0.000	<b>0.214</b>	0.000	0.000	<b>0.571</b>	0.000	<b>0.114</b>	0.000
TF35	<b>0.014</b>	<b>0.029</b>	<b>0.029</b>	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.314</b>	<b>0.014</b>	<b>0.529</b>	0.000	<b>0.043</b>	0.000	<b>0.014</b>	0.000
AK35	0.000	0.000	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.429</b>	<b>0.014</b>	<b>0.143</b>	0.000	0.000	<b>0.343</b>	0.000	<b>0.057</b>	0.000
BK35	0.000	0.000	0.000	<b>0.471</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.457</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.071</b>
PK35	<b>0.057</b>	<b>0.014</b>	<b>0.029</b>	0.000	<b>0.129</b>	<b>0.014</b>	<b>0.186</b>	0.000	0.000	<b>0.500</b>	0.000	<b>0.071</b>	0.000
TK35	<b>0.029</b>	<b>0.014</b>	<b>0.029</b>	0.000	<b>0.029</b>	<b>0.414</b>	0.000	<b>0.457</b>	0.000	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.014</b>	0.000
AL35	0.000	0.000	0.000	<b>0.014</b>	<b>0.586</b>	0.000	<b>0.186</b>	0.000	0.000	<b>0.129</b>	0.000	<b>0.086</b>	0.000
BL35	0.000	0.000	0.000	<b>0.586</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.371</b>	0.000	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.029</b>
PL35	<b>0.029</b>	<b>0.029</b>	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.029</b>	0.000	<b>0.314</b>	0.000	0.000	<b>0.529</b>	0.000	<b>0.057</b>	0.000
TL35	0.000	0.000	<b>0.029</b>	<b>0.014</b>	<b>0.014</b>	<b>0.371</b>	0.000	<b>0.500</b>	0.000	<b>0.057</b>	0.000	<b>0.014</b>	0.000
AO35	<b>0.014</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.457</b>	0.000	<b>0.157</b>	0.000	0.000	<b>0.314</b>	0.000	<b>0.057</b>	0.000
BO35	0.000	<b>0.029</b>	<b>0.043</b>	<b>0.386</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.486</b>	0.000	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.043</b>
FO35	<b>0.057</b>	<b>0.057</b>	0.000	0.000	<b>0.043</b>	0.000	<b>0.200</b>	0.000	<b>0.014</b>	<b>0.529</b>	0.000	<b>0.100</b>	0.000
TO35	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.029</b>	0.000	<b>0.029</b>	<b>0.386</b>	<b>0.014</b>	<b>0.471</b>	0.000	<b>0.029</b>	0.000	<b>0.029</b>	0.000

Tableau 5 (suite et fin): fréquences alléliques des 16 populations étudiées pour 5 locus polymorphes.

Locus: M836

Pop	Alleles														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
AF35	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.591</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.076</b>	<b>0.333</b>	0.000	0.000	0.000
BF35	<b>0.014</b>	<b>0.300</b>	0.000	<b>0.357</b>	0.000	<b>0.171</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.114</b>	0.000	<b>0.029</b>	<b>0.014</b>	0.000	0.000
PF35	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.486</b>	0.000	<b>0.043</b>	<b>0.043</b>	0.000	0.000	<b>0.029</b>	<b>0.357</b>	0.000	<b>0.043</b>	0.000
TF35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.414</b>	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.014</b>	<b>0.514</b>	<b>0.043</b>	0.000
AK35	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.621</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.091</b>	<b>0.258</b>	0.000	0.000	<b>0.030</b>
BK35	0.000	<b>0.386</b>	0.000	<b>0.329</b>	0.000	<b>0.171</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.100</b>	0.000	<b>0.014</b>	0.000	0.000	0.000
PK35	0.000	0.000	<b>0.029</b>	0.000	<b>0.400</b>	0.000	<b>0.071</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.043</b>	<b>0.429</b>	<b>0.029</b>	0.000	0.000
TK35	0.000	0.000	0.000	<b>0.014</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.471</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.471</b>	<b>0.043</b>	0.000
AL35	0.000	0.000	<b>0.031</b>	0.000	<b>0.500</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.375</b>	0.000	0.000	<b>0.094</b>
BL35	<b>0.014</b>	<b>0.300</b>	0.000	<b>0.429</b>	<b>0.029</b>	<b>0.157</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.057</b>	0.000	0.000	<b>0.014</b>	0.000	0.000
PL35	0.000	0.000	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.386</b>	0.000	<b>0.057</b>	<b>0.014</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.457</b>	<b>0.043</b>	0.000	<b>0.029</b>
TL35	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.014</b>	0.000	0.000	<b>0.014</b>	<b>0.414</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.500</b>	<b>0.014</b>	<b>0.043</b>
AO35	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.500</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.086</b>	<b>0.414</b>	0.000	0.000	0.000
BO35	0.000	<b>0.157</b>	0.000	<b>0.300</b>	0.000	<b>0.400</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.143</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
PO35	0.000	0.000	0.000	<b>0.014</b>	<b>0.471</b>	0.000	<b>0.029</b>	0.000	0.000	<b>0.014</b>	<b>0.114</b>	<b>0.271</b>	<b>0.057</b>	0.000	<b>0.029</b>
TO35	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.014</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.414</b>	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.043</b>	<b>0.400</b>	<b>0.071</b>	<b>0.043</b>

Locus: M97

Pop	Alleles						
	1	2	3	4	5	6	7
AF35	<b>0.429</b>	<b>0.057</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.514</b>
BF35	0.000	0.000	<b>0.014</b>	<b>0.543</b>	<b>0.429</b>	<b>0.014</b>	0.000
PF35	<b>0.200</b>	<b>0.186</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.614</b>
TF35	0.000	<b>0.186</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.800</b>	<b>0.014</b>
AK35	<b>0.386</b>	<b>0.014</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.600</b>
BK35	0.000	<b>0.029</b>	<b>0.014</b>	<b>0.414</b>	<b>0.486</b>	<b>0.057</b>	0.000
PK35	<b>0.371</b>	<b>0.071</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.557</b>
TK35	0.000	<b>0.129</b>	<b>0.029</b>	<b>0.014</b>	<b>0.029</b>	<b>0.743</b>	<b>0.057</b>
AL35	<b>0.339</b>	<b>0.065</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.597</b>
BL35	0.000	0.000	<b>0.057</b>	<b>0.486</b>	<b>0.443</b>	<b>0.014</b>	0.000
PL35	<b>0.071</b>	<b>0.186</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.743</b>
TL35	0.000	<b>0.200</b>	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.029</b>	<b>0.757</b>	0.000
AO35	<b>0.429</b>	<b>0.057</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.514</b>
BO35	0.000	0.000	<b>0.029</b>	<b>0.471</b>	<b>0.486</b>	<b>0.014</b>	0.000
PO35	<b>0.414</b>	<b>0.014</b>	0.000	0.000	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.557</b>
TO35	0.000	<b>0.186</b>	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.043</b>	<b>0.729</b>	<b>0.029</b>

Locus: M984

Pop	Alleles													
	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14	
AF35	0.000	0.000	<b>0.147</b>	0.000	0.000	<b>0.015</b>	0.000	<b>0.191</b>	0.000	0.000	<b>0.029</b>	<b>0.618</b>	0.000	
BF35	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.529</b>	0.000	<b>0.029</b>	0.000	<b>0.200</b>	0.000	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.229</b>	
FF35	<b>0.014</b>	<b>0.614</b>	<b>0.200</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.114</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.057</b>	0.000	
TF35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.486</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.514</b>	0.000	0.000	0.000	
AK35	0.000	<b>0.030</b>	<b>0.061</b>	<b>0.015</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.242</b>	0.000	0.000	<b>0.015</b>	<b>0.636</b>	0.000	
BK35	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.371</b>	0.000	<b>0.057</b>	0.000	<b>0.386</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.186</b>	
PK35	<b>0.014</b>	<b>0.586</b>	<b>0.243</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.114</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.043</b>	0.000	
TK35	0.000	0.000	0.000	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.486</b>	0.000	<b>0.029</b>	0.000	<b>0.471</b>	0.000	0.000	0.000	
AL35	0.000	<b>0.029</b>	<b>0.029</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.114</b>	0.000	<b>0.029</b>	<b>0.029</b>	<b>0.771</b>	0.000	
BL35	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.514</b>	0.000	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.371</b>	0.000	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.086</b>	
PL35	<b>0.029</b>	<b>0.529</b>	<b>0.243</b>	<b>0.014</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.129</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.057</b>	0.000	
TL35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.543</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.443</b>	0.000	<b>0.014</b>	0.000	
AO35	0.000	<b>0.015</b>	0.000	<b>0.029</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.471</b>	0.000	0.000	<b>0.015</b>	<b>0.471</b>	0.000	
BO35	0.000	0.000	<b>0.029</b>	0.000	<b>0.471</b>	0.000	<b>0.057</b>	0.000	<b>0.286</b>	0.000	<b>0.043</b>	0.000	<b>0.114</b>	
PO35	0.000	<b>0.557</b>	<b>0.257</b>	<b>0.029</b>	0.000	<b>0.014</b>	0.000	<b>0.071</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.071</b>	0.000	
TO35	0.000	0.000	<b>0.014</b>	<b>0.029</b>	0.000	<b>0.471</b>	0.000	0.000	0.000	<b>0.471</b>	<b>0.014</b>	0.000	0.000	

Tableau 6: Nombre moyen d'allèles, hétérozygotie moyenne sous HW et diversité génétique moyenne des 16 populations étudiées pour 5 locus polymorphes.

	AF	BF	PF	TF	AK	BK	PK	TK	AL	BL	PL	TL	AO	BO	PO	TO
<b>Nombre moyen d'allèles</b>	4.0 ±1.0	4.6 ±1.5	5.2 ±1.3	5.4 ±3.0	4.8 ±1.3	4.0 ±1.0	5.4 ±1.8	6.2 ±2.2	4.4 ±1.1	4.6 ±1.5	5.6 ±1.6	5.4 ±1.8	4.4 ±1.3	5.0 ±1.0	6.0 ±1.6	6.4 ±1.3
<b>Hétérozygotie moyenne (Hw)</b>	.528 ±.07	.577 ±.10	.566 ±.04	.526 ±.13	.473 ±.08	.594 ±.08	.554 ±.07	.520 ±.10	.475 ±.09	.560 ±.04	.554 ±.13	.509 ±.09	.517 ±.05	.543 ±.08	.592 ±.10	.566 ±.08
<b>Diversité génétique</b>	.590 ±.05	.607 ±.09	.615 ±.05	.545 ±.14	.575 ±.07	.617 ±.08	.610 ±.07	.564 ±.08	.558 ±.10	.583 ±.08	.572 ±.10	.542 ±.09	.601 ±.05	.622 ±.08	.642 ±.7	.587 ±.09

En considérant l'ensemble des locus, 14 des 16 populations étudiées sont en équilibre de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ ). Seules AL et BK dévient légèrement de l'équilibre panmictique avec respectivement des probabilités de  $p = 0,045$  et  $p = 0,042$  (annexe 2). Lorsqu'on regroupe l'ensemble des échantillons, le test de  $\chi^2$  révèle, pour l'ensemble des locus, une importante déviation par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 251.4$  ; ddl = 152)

Les résultats du test d'homogénéité des fréquences alléliques (G-test) sont donnés dans le tableau 7. Ils révèlent que pour l'ensemble des locus, les fréquences alléliques sont homogènes à l'intérieur d'une souche et hétérogènes à l'intérieur d'une localité. Les fréquences alléliques des souches "arachide" et "Piliostigma" se révèlent semblables pour tous les locus sauf M984.

Tableau 7: valeurs du test d'homogénéité des fréquences alléliques (G-test) entre populations d'une même localité et entre populations de même plante hôte et de localité différentes. \* $p < 0.001$

<b>Locus</b>	<b>Localités</b>				<b>Plantes hôtes</b>			
	Fimela	Keur Baka	Linguère	Ouarak	<i>A. hypogaea</i>	<i>B. rufescens</i>	<i>P. reticulatum</i>	<i>T. indica</i>
M1425	96.87*	115.32*	201.21*	123.87*	3.43	0.74	3.53	2.12
M625	149.05*	143.65*	135.64*	136.86*	9.32	0.37	8.23	2.11
M836	118.96*	132.78*	144.68*	153.12*	0.76	2.09	1.83	1.09
M97	110.56*	121.18*	200.43*	167.93*	1.98	0.73	1.43	1.04
M984	135.64*	157.06*	171.36*	217.53*	4.12	1.63	0.56	2.03
<b>Ensemble</b>	564.67*	632.47*	589.73*	478.54*	2.13	0.13	1.87	1.32

Les valeurs de la différenciation génétique entre paires de populations sont données dans le tableau 8.

Tableau 8: Valeur de  $\theta$  (différenciation génétique) entre paires de populations pour l'ensemble des cinq locus étudiés. Les valeurs en gras correspondent aux différenciations intra-hôtes

	AF	BF	PF	TF	AK	BK	PK	TK	AL	BL	PL	TL	AO	BO	PO
BF	0.3988														
PF	0.1482	0.3867													
TF	0.4208	0.4198	0.3996												
AK	<b>-0.0085</b>	0.4056	0.1533	0.4314											
BK	0.3945	<b>0.0090</b>	0.3819	0.4114	0.4013										
PK	0.1669	0.3893	<b>0.0099</b>	0.3992	0.1738	0.3850									
TK	0.4079	0.4075	0.3954	<b>-0.0048</b>	0.4180	0.3990	0.3972								
AL	<b>0.0197</b>	0.4139	0.2068	0.4373	<b>0.0151</b>	0.4096	0.2226	0.4226							
BL	0.4105	<b>-0.0011</b>	0.3988	0.4325	0.4169	<b>0.0051</b>	0.4019	0.4201	0.4259						
PL	0.1956	0.4083	<b>0.0109</b>	0.4161	0.1998	0.4036	<b>0.0144</b>	0.4148	0.2457	0.4209					
TL	0.4184	0.4202	0.4057	<b>-0.0057</b>	0.4299	0.4116	0.4092	<b>-0.0096</b>	0.4348	0.4325	0.4265				
AO	<b>0.0092</b>	0.3936	0.1575	0.4163	<b>0.0088</b>	0.3893	0.1732	0.4015	<b>0.0363</b>	0.4058	0.2028	0.4140			
BO	0.3916	<b>0.0143</b>	0.3793	0.4129	0.3983	<b>0.0106</b>	0.3820	0.4002	0.4074	<b>0.0148</b>	0.4010	0.4131	0.3871		
PO	0.1264	0.3715	<b>0.0032</b>	0.3866	0.1331	0.3670	<b>0.0071</b>	0.3814	0.1909	0.3833	<b>0.0394</b>	0.3928	0.1419	0.3633	
TO	0.3949	0.3977	0.3801	<b>-0.0047</b>	0.4065	0.3889	0.3824	<b>-0.0108</b>	0.4092	0.4103	0.3994	<b>-0.0092</b>	0.3896	0.3900	0.3680

La valeur de  $\theta$  (0.325) des 16 populations indique que 32,5% de la variabilité totale est due à une différenciation génétique entre échantillons. La différenciation génétique intra-hôte n'est pas significative ( $\theta = 0.07$ ), ce qui signifie que les *C. serratus* inféodés à une même plante hôte sont génétiquement très proches entre eux. La divergence génétique intra-localités est par contre très significative ( $\theta = 0.378$ ) et significativement non différente de celle obtenue entre plantes hôtes ( $\theta = 0.374$ ). Les valeurs de la différenciation génétique à différents niveaux pour tous les locus sont données dans le tableau 9.

Tableau 9: valeurs de  $\theta$  à différents niveaux hiérarchiques de différenciation génétique au niveau des localités (a) et des plantes hôtes (b). La différence des valeurs de  $\theta$  par rapport à 0 est testée par  $\chi^2 = 2N(\theta)(k-1)$  pour k allèles et s échantillons avec  $(k-1)(s-1)$  degré de liberté. \*:  $p < 0,001$ .

**a**

Locus	Localités				Entre localités	Entre échantillons
	Fimela	Keur Baka	Linguère	Ouarak		
M1425	.312*	.387*	.401*	.336*	.009	.310*
M625	.343*	.319*	.384*	.317*	.008	.293*
M836	.324*	.337*	.313*	.282*	.007	.269*
M97	.437*	.419*	.477*	.430*	.001	.394*
M984	.419*	.396*	.450*	.380*	.007	.360*
<b>Ensemble</b>	<b>.373*</b>	<b>.371*</b>	<b>.405*</b>	<b>.349*</b>	<b>.007</b>	<b>.325*</b>

**b**

Locus	Plantes hôtes				Entre hôtes	Entre échantillons
	<i>A. hypogaea</i>	<i>B. rufescens</i>	<i>P. reticulatum</i>	<i>T. indica</i>		
M1425	.007	.004	.024	.004	.359*	.310*
M625	.017	.016	.003	.009	.336*	.293*
M836	.005	.022	.007	.007	.314*	.269*
M97	.009	.007	.059	.007	.447*	.394*
M984	.063	.012	.010	.012	.412*	.360*
<b>Ensemble</b>	<b>.013</b>	<b>.009</b>	<b>.014</b>	<b>.008</b>	<b>.374*</b>	<b>.325*</b>

Les distances géographiques entre échantillons ne sont pas déterminantes en ce qui concerne les ressemblances ou différences génétiques. Aucun isolement par la distance n'est observé sur les échantillons ( $p < 0,01$ ). Par contre le rôle de la plante hôte est essentiel dans le déterminisme génétique des populations.

Le dendrogramme construit à partir des distances génétiques de Cavalli-Sforza et Edwards (Fig. 19) montre que la structuration génétique est liée au fait que la bruche de l'arachide se développe sur plusieurs plantes hôtes différant aussi bien par les caractéristiques physiques de leur gousses et graines que par leur nature chimique.

Les populations de *C. serratus* inféodées à *B. rufescens* se distinguent comme un groupe frère des autres populations. Il existe une distance génétique de Kimura de l'ordre de 0,46 entre ces deux entités. Cette distance avoisine celle obtenue entre sous-espèces d'*Apis mellifera* (Estoup, 1995). D'autre part les populations inféodées à *T. indica* sont distinctes des celles inféodées à l'arachide et à *Piliostigma reticulatum*. Elles sont portées par une valeur de bootstrap maximale (100). De même, les populations de *C. serratus* inféodées à *Piliostigma reticulatum* et celles infestant l'arachide, bien que génétiquement très proches, ont pu être génétiquement séparées grâce à l'utilisation de marqueurs hypervariables comme les microsatellites.

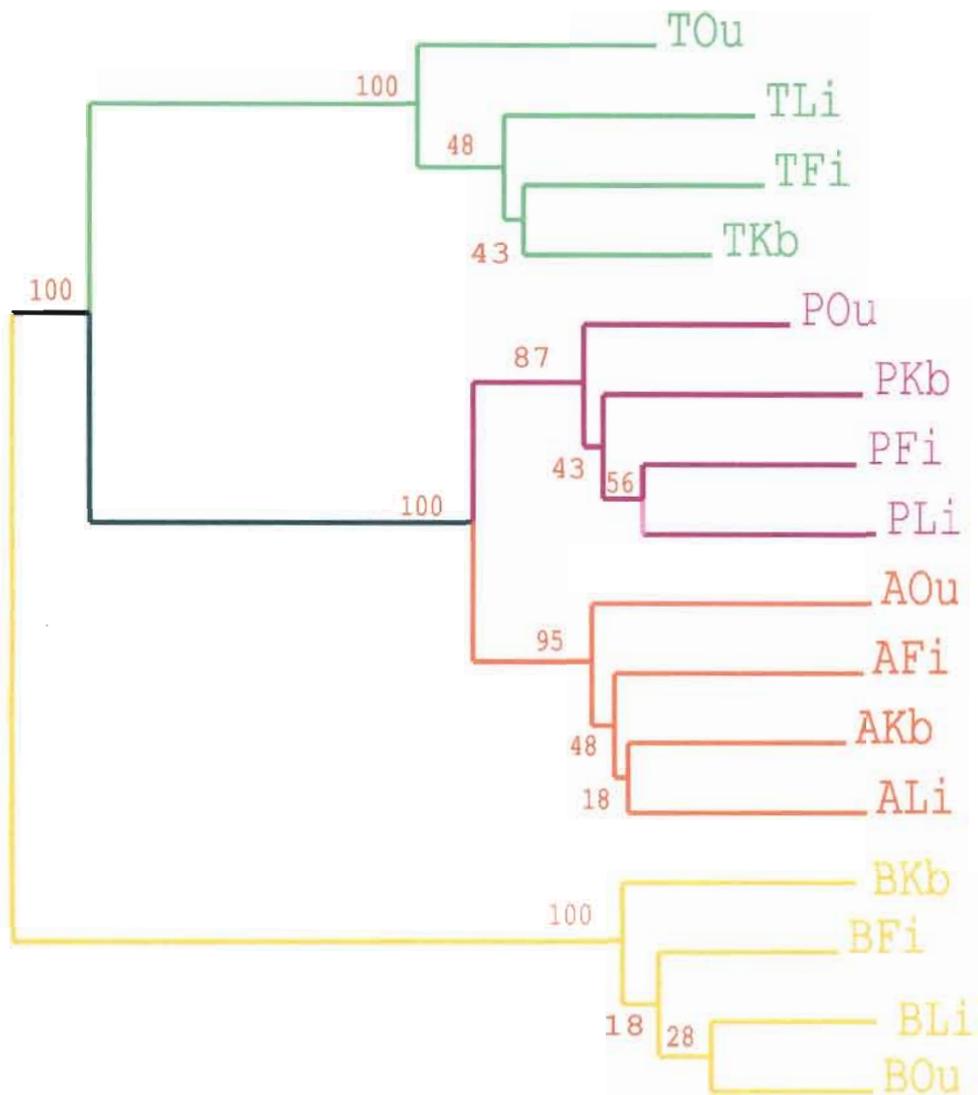


Figure 19 : arbre phylogénétique des différentes populations construit à partir des distances de Cavalli-Sforza & Edwards après 2000 rééchantillonnages des individus.

### II.3 ANALYSE INDIVIDUELLE

L'arbre des individus (Fig. 20) montre que les bruches inféodées à *Bauhinia rufescens* se distinguent nettement des autres. Aucun individu échantillonné dans ces gousses n'est retrouvé, après analyse, dans les individus des autres populations (le pourcentage de "bien classés" est de 100%). Les fréquences alléliques sont très homogènes à l'intérieur du groupe *Bauhinia rufescens*.

Les bruches inféodées à *Tamarindus indica* forment aussi un biotype lié à cette plante. Le taux de "bien classés" chez ces bruches est de 97%. Bien que génétiquement distinctes des bruches inféodées aux autres plantes hôtes, celles-ci présentent un génome caractérisé par la présence de tous les allèles observés chez les bruches inféodées *Piliostigma reticulatum* et à l'arachide.

Les bruches inféodées à *Piliostigma reticulatum* et celles infestant l'arachide, bien que génétiquement très proches commencent à diverger. Le nombre d'individus ne pouvant pas être rapportés à l'un ou l'autre groupe est cependant de 10%. Le taux de "bien classés" est de 90% pour chacune de ses deux souches. La profondeur des nœuds entre ces deux souches au niveau de l'arbre des individus et la grande similitude des fréquences alléliques des individus appartenant à ces deux souches montrent que les deux souches n'ont commencé à diverger que récemment à l'échelle des temps géologiques.

D'autre part, des échantillons d'adultes ou de cocons de *Caryedon serratus* ont été prélevés durant la saison des pluies sous la canopée ou les écorces des plantes hôtes. Ces individus typés (5 provenant de *Piliostigma reticulatum* de Kaskas, 6 provenant de *Tamarindus indica* de Tamabacounda, 8 obtenus de *Bauhinia rufescens* de Kaskas et 9 provenant de l'arachide de Kolda) sont bien assignés dans leurs souches respectives.

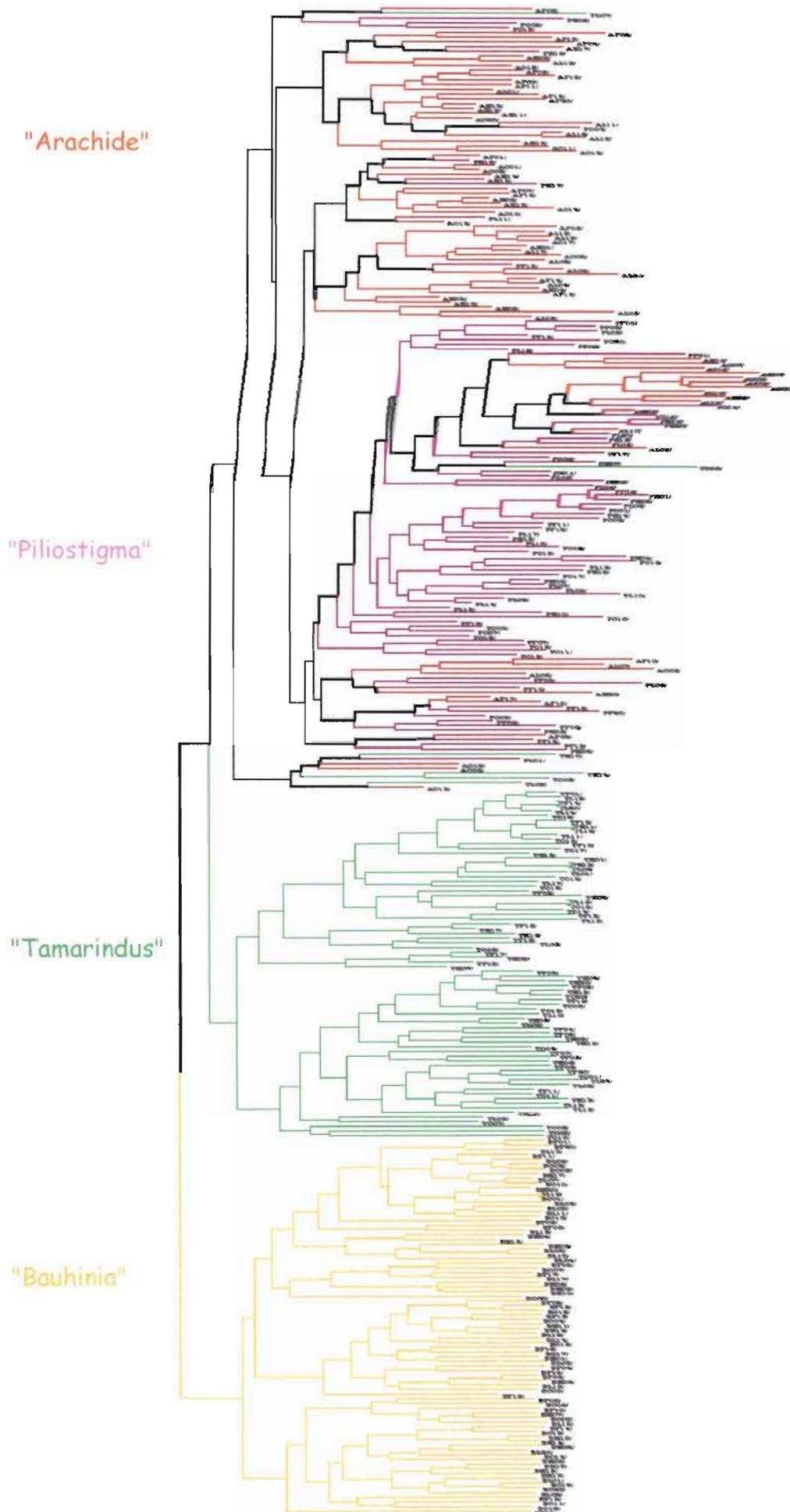


Figure 20: arbre des individus de *C. serratus*.  
 Cet arbre est construit à partir de la distance des allèles partagés (DAS).

### III. DISCUSSION

#### III.1. CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES MICROSATELLITES

Comme aucune donnée préliminaire n'existait sur l'occurrence et la densité de microsatellites chez les bruches, il convient de souligner que, par chance, le génome de *Caryedon serratus* s'est avéré riche en de tels locus. Les séquences isolées présentent également des caractéristiques structurales proches de celles des mammifères et des hyménoptères étudiés jusqu'à présent (distribution de longueurs et proportion des trois types de microsatellites classiquement admis). Seuls 47,4% des locus sont constitués de microsatellites parfaits et 74,8% de l'ensemble des locus sont constitués de séquences en (GT)<sub>n</sub> et (CT)<sub>n</sub>. Contrairement à ce qui est observé chez *Apis mellifera* et *Bombus terrestris* (Estoup & Cornuet, 1994), *C. serratus* montre une densité supérieure de séquences (GT)<sub>n</sub> (43,2%) en comparaison des séquences (CT)<sub>n</sub> (31,6%). La même tendance est observée chez des vertébrés (Estoup, 1993b). D'autre part, chez l'abeille par exemple, à l'exception des régions télométriennes où ils semblent très peu présents, les microsatellites semblent se distribuer à peu près régulièrement sur l'ensemble du génome, tout en présentant une certaine tendance au regroupement. Chez *C. serratus*, en l'absence de clonage, de cartographie et d'hybridation *in situ*, notre connaissance sur la localisation et la distribution des microsatellites reste limitée.

Il est aussi intéressant de noter que 52,6% des locus sont des microsatellites imparfaits (imparfait simples et imparfaits composés). Comme chez *C. serratus*, ces microsatellites constituent chez d'autres espèces (Abeille, Bourdon, Porc et Homme) une part importante de l'ensemble des microsatellites et présentent un polymorphisme intéressant au niveau nucléotidique. En effet, pour un locus donné, ces microsatellites sont souvent caractérisés par une grande variabilité dans la position et le nombre des interruptions qui s'intercalent entre les séries de motifs répétés. L'étude des séquences des allèles des microsatellites interrompus est donc très informative en ce qui concerne l'homoplasie de taille et la genèse des allèles. Cette approche moléculaire constitue un complément idéal aux études réalisées jusqu'à présent à partir des distributions d'allèles des microsatellites dans les populations (Estoup, 1995). L'ensemble des analyses moléculaires et statistiques suggère que les microsatellites interrompus varient fréquemment par pas

mutationnels multiples (> 1 motif). Ils ne varient donc pas selon un modèle *SMM* à pas simple et montrent des déviations vers le modèle *IAM*. Des auteurs comme Estoup & Cornuet (1994) ont émis l'hypothèse selon laquelle les microsatellites interrompus pourraient être caractérisés par une variance du nombre de répétitions supérieure à celle des microsatellites parfaits. Moins sujets à l'homoplasie de taille que les microsatellites parfaits, la saturation de l'information génétique due à cette homoplasie serait plus lente. Les microsatellites interrompus présenteraient, par conséquent, certains avantages pour l'étude des différenciations et des relations phylogénétiques. Il semble donc que la structure des microsatellites joue un rôle important sur les modalités évolutives. Cette idée était déjà implicitement exprimée par Shriver *et al.* (1993) qui ont montré que les modèles exprimant le mieux les distributions alléliques étaient différents selon la taille du motif répété. Ainsi, outre la taille des motifs répétés, d'autres caractéristiques structurelles telles que la présence d'interruptions dans les séquences répétées semblent être associées à des modalités évolutives originales. Il paraît donc utopique de vouloir trouver un modèle mutationnel unique pour expliquer les variations de l'ensemble des microsatellites.

### III.2. STRUCTURE POPULATIONNELLE

Chez *C. serratus*, la différence entre nombre moyen d'allèles est significativement moins marquée entre populations géographiquement éloignées inféodées à une même espèce hôte qu'entre échantillons sympatriques de plantes hôtes différentes ( $p < 0,01$ ).

La moyenne d'hétérozygotie de  $0.541 \pm .08$  est du même ordre de grandeur que celles obtenues chez la truite *Salmo trutta* L. (Estoup *et al.*, 1993a) et l'abeille (Estoup *et al.*, 1993b).

Pour l'ensemble des locus, 14 des 16 populations étudiées sont en équilibre de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ ). Seules AL et BK dévient légèrement de l'équilibre panmixtique avec des probabilités respectives de  $p = 0,045$  et  $p = 0,042$  (annexe 2). Autrement dit, dans une population provenant d'une plante hôte dans une localité donnée, les croisements entre individus se font au hasard. Ceci confirme l'hypothèse de Sembène (1997) concernant l'importance du moment et du comment de l'échantillonnage lors d'études de génétique des populations. En effet, un déficit important en hétérozygotes chez les échantillons analysés lors des études allozymiques (Sembène & Delobel, 1998), provoquait une déviation

significative de l'équilibre panmictique de chacun des échantillons analysés sauf ceux obtenus de *Bauhinia rufescens*. Or, sur *Piliostigma*, la dynamique des populations de *C. serratus* paraît dominée par l'alternance d'une période assez courte (de novembre à février) où les gousses mûres des plantes hôtes sont abondantes dans la nature et d'une longue période (mars à octobre) où celles-ci deviennent de plus en plus rares, puis apparemment absentes. Lorsque les premières gousses atteignent la maturité, en novembre, les populations de *C. serratus* sont généralement très faibles et les infestations sont le fait d'un nombre réduit de femelles. Les taux d'infestation relevés sur *P. reticulatum* en novembre sont d'environ 2 à 4 oeufs pour 1000 gousses. En échantillonnant les premières sorties de bruches, on obtient des populations qui consisteraient donc en un mélange des F1 d'un nombre limité de fondatrices. Ce biais d'échantillonnage a été évité lors des études microsatellites. Le même constat peut être fait sur arachide nouvellement récoltée, les taux d'infestation initiaux sont de l'ordre de 1 oeuf pour 10.000 graines (Matokot *et al.*, 1987 ; Sembène, 1997). Ceci explique en partie pourquoi les échantillons d'arachide déviaient de l'équilibre panmictique. *Bauhinia rufescens*, au contraire, fructifie toute l'année. Les taux d'infestation ne présentent pas de fluctuations de même ampleur que celles observées sur *Piliostigma*. Cette persistance des gousses de *Bauhinia rufescens* durant toute l'année est une situation favorable à la panmixie. *Tamarindus indica* est dans une situation intermédiaire. Le tamarinier présente en effet une période de fructification maximale en mars-avril. Cependant, compte tenu d'une forte variabilité inter-arbres, il est possible de trouver dans une région donnée quelques gousses mûres tout au long de l'année (Ndiaye, 1991). De plus, les graines du tamarinier sont un résidu habituel de la préparation de certains aliments au Sénégal. Elles peuvent constituer un habitat de développement favorable au maintien de la bruche de l'arachide jusqu'à la maturation des nouvelles gousses. D'autre part, en considérant l'ensemble des échantillons, le test de  $\chi^2$  révèle, pour l'ensemble des locus, une importante déviation par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 251.4$  ; ddl = 152). Ces populations ne semblent donc pas constituer un "ensemble génétique uniforme" ; les croisements entre elles ne se passeraient pas au hasard (effet Wahlund). Ainsi tout laisse à penser qu'elles sont génétiquement bien différenciées.

Les valeurs de la différenciation génétique à différents niveaux obtenus entre les différentes souches, de même l'homogénéité des fréquences alléliques dans chaque souche montrent que la structuration génétique de *C. serratus* est liée au fait que la bruche se

développe sur plusieurs plantes hôtes différant aussi bien par la forme de leurs gousses et graines que par la nature chimique de leurs substances secondaires. En effet, la différenciation intra-hôte est inexistante alors que plus de 97% de la divergence génétique totale sont dus à une différenciation entre espèces hôtes. La part de la différenciation génétique entre localités est quasi nulle. Les flux géniques entre plantes hôtes identiques semblent se faire de manière homogène à l'intérieur du Sénégal en l'absence de barrière géographique ou climatique.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, il est évident que la polyphagie supposée de *Caryedon serratus* est mise en doute. La bruche de l'arachide est en fait constituée de plusieurs populations spécialistes. Il existe plusieurs biotypes de *C. serratus* au Sénégal, chacun d'eux étant inféodé à une plante ou un groupe de plantes hôtes et l'isolement entre eux n'est que partiel. Or, il n'y a que de rares exemples d'apparition, au sein de populations sympatriques, d'un isolement lié à la nature de la plante hôte (Mitter & Futuyma, 1979). Les conditions d'une telle spéciation seraient peu probables selon Futuyma & Mayer (1980). Bush & Diehl (1982) pensent que les accouplements devraient se faire de préférence avec des partenaires provenant de la même plante hôte. Ces hypothèses de Futuyma et Mayer sont combattues par de nombreux auteurs: il y a au moins autant de variabilité génétique liée au choix de l'hôte chez des populations sympatriques qu'entre populations allopatriques nettement isolées. Dans le cas de la bruche de l'arachide, l'accouplement entre partenaires consanguins chez les hôtes sauvages est favorisé par "effet de proximité": en effet, l'indéhiscence de la plupart des gousses des plantes hôtes de *C. serratus*, empêche la dispersion des graines de chacune d'elle ; une souche peut alors maintenir ses cycles de développement sur les gousses accrochées ou sur celles tombées sous la canopée d'un arbre donné. Les larves de quatrième stade tombent généralement au sol pour la nymphose. Les adultes qui émergent des cocons, sur cette même surface réduite, n'ont certainement pas besoin de se déplacer loin pour trouver un partenaire sexuel. Ceci favorise les accouplements entre partenaires consanguins et le dépôt des oeufs par la femelle sur l'espèce dont elle est issue. Les mêmes conditions peuvent se trouver réalisées dans la situation très particulière du stock d'arachide puisque, contrairement à ce que Huignard *et al.* (1989) observent chez *Bruchidius atrolineatus*, l'adaptation aux stocks permet de maintenir chez *Caryedon serratus* le polyvoltinisme et fréquemment, les adultes n'ont pas la faculté de s'échapper des sacs ou des entrepôts où est conservée l'arachide.

D'autre part, comme le soulignent Bernays & Chapman (1994), de nombreuses observations montrent que la tendance à la spécialisation dans l'exploitation des plantes hôtes a été l'un des principaux facteurs à l'origine de la diversification des insectes phytophages. La question de l'intensité des flux géniques entre populations sauvages et l'arachide devenait primordiale car l'introduction de plantes exotiques, correspondant fréquemment à des espèces cultivées, peut favoriser l'ajout d'un nouvel hôte. Comme exemple d'un tel phénomène, on citera le cas de *Spodoptera frugiperda* (Pashley, 1988), du nymphalide *Euphydryas editha* qui s'est adapté à *Plantago lanceola* introduit par les éleveurs en Amérique du Nord (Singer *et al.*, 1988), de la punaise *Jadera haematomola* qui a ajouté à son spectre d'hôtes des graines de Sapindaceae ornementales introduites (Carroll & Boyd, 1992), de *Rhagoletis pomonella* qui, en Amérique du Nord, est passé de l'Aubépine au pommier (Bush, 1994 ; Feder *et al.*, 1994 ; Bush & Smith, 1998). Le cas le plus récent et certainement le plus spectaculaire est celui de la bruche *C. serratus* qui a ajouté une Fabaceae introduite à son spectre d'hôtes sauvages certainement après de multiples tentatives avortées. Bush et Diehl (1982) pensent que ce phénomène d'allotrophie (l'attaque d'un nouvel hôte par un insecte parasite) peut ou non nécessiter au préalable des modifications génétiques majeures chez les individus assurant l'infestation. Ces modifications concernent les gènes contrôlant le comportement alimentaire, la reproduction et/ou la physiologie digestive de la larve. Dans le cas de *C. serratus*, l'existence du biotype "arachide" fait penser que son passage sur l'arachide a nécessité de telles modifications. Les reconstructions phylogénétiques permettent aujourd'hui de proposer des scénarii quant à l'évolution des préférences alimentaires chez certains groupes d'insectes et des hypothèses quant à la nature de la plante hôte ancêtre d'un groupe étudié. Chez la bruche de l'arachide, la ressemblance morphologique, allozymique et génique des bruches inféodées à *Piliostigma reticulatum* et celles infestant l'arachide de même que l'importance des flux géniques calculés entre ces deux souches permettent d'affirmer aujourd'hui que les *C. serratus* inféodées à *P. reticulatum* ont été à l'origine de l'infestation de l'arachide au début du siècle, par allotrophie. Cette population s'est, sans doute, étendue comme tache d'huile pour infester les récoltes d'arachide dans une grande partie de l'Afrique occidentale. Ces deux souches bien que génétiquement très proches commencent à diverger. L'absence de gousses sauvages durant la période pluvieuse (sauf chez *B. rufescens*) et l'introduction de l'arachide dans l'environnement de plantes sauvages ont favorisé le passage des populations inféodées à *P. reticulatum* sur l'arachide et le

"cyclage" de la souche arachide dans les gousses résiduelles des greniers. Il conviendra cependant de noter que l'événement de divergence des différentes souches de *C. serratus* a lieu, pour d'autres raisons évolutives et historiques, avant l'adaptation des populations "*Piliostigma*" à l'arachide. Les positions basales de la souche "*C. sieberiana*" dans certaines reconstructions phylogénétiques et de "*B. rufescens*" dans d'autres en témoignent. Il est connu que les taux de mutations les plus élevés sont associés aux microsatellites constitués d'un nombre important de répétitions (Weber, 1990). En d'autres termes, la mutabilité d'une séquence dépend du nombre de ses répétitions pour un locus donné. Chez *C. serratus*, l'importance de la longueur des locus microsatellites, en plus du nombre important de générations par an (environ sept) à cause de son polyvoltinisme, ont favorisé, en environ cent ans, l'homogénéité génétique chez les bruches présentes sur l'arachide. Cette importante découverte pose à nouveau la question de l'importance des greniers dans la réinfestation de l'arachide nouvellement récoltée. L'existence d'une structuration génétique propre à la souche "arachide" fait penser que les bruches infestant l'arachide proviennent en majorité des greniers, c'est-à-dire des individus maintenant leur cycle de développement dans les résidus des graines d'arachide existant dans les greniers durant la saison des pluies. A celles-ci s'ajoutent les bruches provenant de *P. reticulatum* qui infestent les arachides, premières gousses disponibles dans la nature et pouvant permettre à *C. serratus* de se développer. L'importance des *Piliostigmas* dans l'infestation de l'arachide a été supposée dans des études antérieures comme celles de Gagnepain *et al.* (1986) en savane de Lamto en Côte-d'Ivoire et de Matokot *et al.* (1987) au Congo et, contrairement aux hypothèses avancées par Ndiaye (1991) et Pierre & Huignard (1990), *Tamarindus indica* et *B. rufescens* ne jouent qu'un rôle secondaire dans l'infestation de l'arachide séchée. Cependant, en l'absence de *P. reticulatum* dans une zone, les *C. serratus* infestant l'arachide pourraient éventuellement se réfugier et maintenir leur cycle de développement dans les gousses de *T. indica* qui se trouve être la plante génétiquement la plus ouverte aux autres populations.

### II.3. STRUCTURE INDIVIDUELLE

En dehors des hypothèses solides que l'on peut émettre quant aux mécanismes d'infestation de l'arachide nouvellement récoltée (voir plus loin), il est évident que les marqueurs utilisés ont mis en évidence une structuration génétique forte, induite par la

plante hôte chez *C. serratus*. La structuration génétique individuelle montre que les bruches inféodées à *B. rufescens* se distinguent nettement des autres. Aucun individu échantillonné dans ces gousses n'est retrouvé, après analyse, parmi les individus des autres souches. Cette forte différenciation du groupe "*Bauhinia*" pourrait s'expliquer par le fait que *B. rufescens* est un arbuste qui fructifie toute l'année, situation qui favorise la persistance de l'habitat et du support de développement, facteurs essentiels à la formation et au maintien de races hôtes chez les insectes phytophages. Dans le même ordre d'idée, les accouplements préférentiels sont favorisés et l'effectif efficace conservé même si on observe des goulots d'étranglement durant la saison des pluies où la mortalité des œufs est très élevée et où le nombre d'adultes diminue de façon drastique (Pierre et Huignard, 1990). "*B. rufescens*" qui possède des antennes plus courtes, des élytres plus petits, un nombre de dents fémorales plus élevé (Sembène & Delobel, 1996), et génétiquement des allèles privés qui l'isolent des autres souches, est une race hôte. Cet isolement, même s'il n'est pas total sur le plan éthologique pourrait évoluer et conduire à l'émergence d'un nouveau taxon.

Les bruches inféodées à *T. indica* forment aussi un biotype lié à cette plante. Le taux de "bien classés" chez ces bruches est de 97%. Ces bruches sont cependant beaucoup plus sujettes à des migrations vers l'arachide ou *P. reticulatum* que celles infestant *B. rufescens*. Comme cela a été évoqué plus haut, *T. indica* ne fructifie pas toute l'année; cet arbre est dans une situation intermédiaire et présente en effet une période de fructification maximale en mars-avril. Cependant, compte tenu d'une forte variabilité inter-arbres, il est possible de trouver dans une région donnée quelques gousses mûres tout au long de l'année. De plus, les graines du tamarinier sont un résidu habituel de la préparation de certains aliments au Sénégal. Elles peuvent constituer un habitat de développement favorable au maintien de la bruche de l'arachide jusqu'à la maturation des nouvelles gousses. Quelques uns de ces individus "épars" peuvent aller infester de l'arachide stockée ou les premières gousses de *P. reticulatum* qui mûrissent. Parmi toutes les souches, "*Tamarindus*" possède les antennes les plus longues, les yeux les plus rapprochés aussi bien ventralement que dorsalement, les élytres les plus grands, un nombre de dents fémorales plus faible (Sembène & Delobel, 1996). Cette souche, inféodée à la plante hôte qui semble être la plus "réceptive" vis à vis des autres, présente néanmoins une homogénéité des fréquences alléliques et est isolée par tous les locus microsatellites étudiés.

Les bruches inféodées à *P. reticulatum* et celles infestant l'arachide, bien que génétiquement très proches, commencent à diverger. Cette divergence est surtout portée, parmi les gènes séquencés, par M984. Le nombre d'individus ne pouvant pas être affectés de manière définitive à l'un ou l'autre groupe est cependant de 10%. Ceci montre que même s'il existe un flux génique assez élevé (245 individus par génération) entre ces deux souches, la raréfaction des gousses sauvages durant la période pluvieuse a favorisé la multiplication continue (cyclage) des bruches sur arachide dans les greniers. Les populations, que ni la morphométrie (Sembène & Delobel, 1996) ni les allozymes (Sembène & Delobel, 1998), ni le séquençage d'ADN n'ont pu génétiquement séparer, ont divergé récemment. Notons cependant, aussi bien chez "*P. reticulatum*" que chez "arachide" que tout porte à croire que l'effectif efficace est quand même préservé pour la restitution des gènes au moment de la disponibilité des gousses: pour "arachide" sur les gousses résiduelles dans les greniers ; pour "*P. reticulatum*" sur les gousses en décomposition qui subsistent dans la nature durant la période pluvieuse et de rares adultes qui émergent des derniers cocons durant la saison des pluies. Les adultes de *C. serratus* qui proviennent des greniers, ceux qui émergent à la fin de la saison sèche (période où il y a encore quelques gousses sur les arbres) dans la nature et ceux qui parviennent à sortir, entre fin juillet et début août, des rares gousses en décomposition sur le sol, sont responsables de la réinfestation des nouvelles gousses de *P. reticulatum*. Ces bruches trouvent pendant la saison des pluies de quoi s'alimenter (pollen, nectar). En présence de nourriture adéquate (pollen, eau), des possibilités de survie d'une durée moyenne de 80 à 90 jours ont été observées au laboratoire (Delobel, 1989a ; Sembène, 1997). Ceci permet d'envisager des longévités dans la nature dépassant très largement 3 mois. En période de chaleur intense ou de fortes pluies (facteurs favorisant la mortalité de *C. serratus*), les bruches s'abritent, par phototactisme négatif, sous les feuilles sèches tombées au sol. Ces analyses semblent donc confirmer celles de Janzen (1974, 1980) et de Ali-Diallo (1991) selon lesquelles les insectes se maintiendraient au niveau de leur plante hôte même lorsque les ressources trophiques et le substrat de développement se réduisent fortement comme c'est le cas en période pluvieuse. Pevett (1966a) au Nigéria, Mapangou-Divassa (1985) au Congo et Ndiaye & Jarry (1990) au Sénégal notent aussi le maintien d'une faible population et une persistance de l'activité reproductrice de *C. serratus*, dans des conditions similaires.

D'autre part, les échantillons d'adultes ou de cocons de *C. serratus* prélevés durant l'hivernage sous la canopée ou les écorces des plantes hôtes sont bien assignés au sein de leurs souches respectives après typage. Ceci confirme l'hypothèse émise quant à la présence d'adultes de *C. serratus* sexuellement actifs sous la canopée de leur hôte et la limitation des migrations d'une plante hôte donnée à une autre. Cette activité de la bruche pendant la saison des pluies a été aussi relevée par Ndiaye (1991) sur les *T. indica*, malgré la quasi ou totale absence de gousses sur cet arbre. Il est intéressant de noter, comme l'ont révélé Pierre & Huignard (1990), que malgré la saison des pluies, les *Bauhinias* reçoivent des pontes même si celles-ci sont moins fréquentes que durant la saison sèche. *P. reticulatum* semble bien "retenir" les rares adultes de *C. serratus*, probablement grâce à la morphologie de ses feuilles qui, tombées à terre, peuvent constituer un abri pour les bruches.

Le mécanisme d'isolement génétique observé aujourd'hui chez *C. serratus* pourrait aussi résulter de l'existence chez la bruche d'une forte variabilité individuelle dans la sélection du site de ponte (Robert, 1985 ; Ali-Diallo, 1990, Delobel, 1995). En plus de ses plantes hôtes habituelles, on sait que *C. serratus* pond sur toutes les gousses qui lui sont proposées mais quatre *Caesalpiniaceae* (*Bauhinia variegata*, *B. purpurea*, *Delonyx regia* et *Dialium pachyphyllum*) et deux *Fabaceae* (*Milletia laurentii* et *M. eetveldeana*) se révélèrent totalement toxiques pour les larves. En revanche, *C. serratus* effectue son cycle complet sur *Cassia javanica* (*Caesalpiniaceae*) alors que cette espèce introduite au Congo, n'y semble pas actuellement attaquée par ce *Bruchidae* (Ndioulou, 1983). D'autre part, Cancela da Fonceca (1963) a réalisé des élevages de *C. serratus* sur *Cassia fistula* ; Delobel *et al.* (1995) ont observé des oeufs et des larves mortes au premier stade de *C. serratus* sur *Prosopis africana* et *Detarium senegalensis*. Notons simplement que le fait qu'un insecte se développe au laboratoire sur une espèce végétale donnée ne signifie pas forcément qu'il pourrait boucler son cycle sur cette même espèce dans la nature. Très souvent les souches utilisées dans les expériences sont élevées après de nombreuses générations au laboratoire. Il est cependant clair que *C. serratus* possède une grande plasticité de ponte qui lui a permis de s'adapter à différents hôtes appartenant à des *Caesalpiniaceae*, des *Fabaceae* et peut-être même des *Mimosaceae* (Delobel *et al.* 1995). Il est aussi intéressant de noter que les graines dans lesquelles les larves de *C. serratus* parviennent à se développer, appartiennent toutes à la superfamille des *Leguminosae*.

Robert (1984) pense que ces graines contiennent un même type de substances toxiques, que les larves de la bruche de l'arachide sont capables de détoxifier facilement. Classiquement, on considère que les changements et les ajouts d'hôtes sont plus faciles entre des plantes chimiquement proches et que cette similitude résulte de la proximité phylogénétique de celles-ci ou bien du partage de caractères chimiques ou composés secondaires (Becerra, 1997) ou physico-chimiques bien particuliers, tels que les canaux à résine ou à latex (Farrell *et al.*, 1991). Les insectes peuvent aussi chercher à exploiter les plantes disponibles dans l'environnement immédiat de leur plante hôte d'origine (Dobler *et al.*, 1996). Enfin, la colonisation d'une nouvelle ressource alimentaire pourra être rendue possible par l'acquisition d'une "nouveauité évolutive" physiologique ou comportementale, suite par exemple à une mutation chez un taxon donné (Berenbaum, 1990). Notons cependant que les critères taxonomiques des légumineuses ne sont pas basés sur les caractéristiques biochimiques des substances nutritionnelles des espèces qui composent cette super-famille.

Une hypothèse plus plausible pour le phénomène observé chez *C. serratus* serait que la bruche possède des gènes ou allèles contrôlant la détoxification des substances nocives pour s'adapter à chacune de ses plantes hôtes. La population de *C. serratus* posséderait un système enzymatique détoxificateur large car pour qu'une espèce puisse élargir son spectre d'hôtes, il n'est pas suffisant que les femelles viennent pondre dessus ; il faut aussi que le substrat soit appétant et que les larves puissent détoxifier les substances nocives. Dans le cas de l'arachide, il est aussi possible que cette légumineuse ne contienne pas de substances toxiques naturelles. Les moyens habituels de défense chimique chez les légumineuses à gousses aériennes ne semblent pas nécessaires pour l'arachide qui présente un moyen de défense mécanique (fructification hypogée). Il est donc peu probable qu'il ait existé des pressions de sélection l'amenant à produire aussi des substances secondaires toxiques. A l'appui de ces hypothèses, Robert (1984) constate que, contrairement à la plupart des légumineuses alimentaires, l'arachide crue n'est pas toxique pour l'homme. Il note cependant que la physiologie digestive de la bruche de l'arachide est certainement très différente de celle de l'Homme. Au vu de ces arguments, il serait intéressant de tester les possibilités de développement sur graines d'arachide des larves d'autres bruchidae, en particulier d'espèces du même genre. D'autres facteurs que ceux purement métaboliques, en

particulier les caractéristiques physico-chimiques de la graine, seraient à prendre en considération.

Quoiqu'il en soit, toute différenciation génétique observée chez un insecte phytophage s'accompagne nécessairement de la mise en place d'un isolement reproductif pré ou post-zygotique en l'absence de barrières extrinsèques aux flux de gènes. En dehors des mécanismes théoriques d'isolement génétique dont nous venons de discuter, nous essaierons de mettre en évidence, dans le chapitre suivant, d'autres facteurs favorisant la formation et le maintien de races hôtes chez la bruche *C. serratus*.

**CHAPITRE IV**

**MECANISMES DE FORMATION ET DE MAINTIEN  
DES RACES HÔTES CHEZ *CARYEDON SERRATUS*.**

## INTRODUCTION

La mise en évidence de l'ensemble des mécanismes pré et post-zygotiques ayant favorisé la formation et le maintien de races hôtes chez un insecte phytophage comme la bruche de l'arachide, nécessite un travail de terrain d'une vingtaine d'années ou plus (voir les travaux de Feder, 1998, sur *Rhagoletis pomonella*) d'autant plus que l'histoire évolutive des insectes phytophages est liée à celle des groupes végétaux qui leur servent d'alimentation. Il importe de savoir comment les phytophages ont réagi à la diversification des plantes et s'ils ont pu agir en retour sur celles-ci. Ehrlich & Raven (1964) pensent que les associations entre les plantes et les insectes que l'on observe aujourd'hui ont été modelées par un processus de coévolution pas à pas dans lequel les plantes ont développé des défenses à l'encontre de leurs ennemis naturels qui, à leur tour, ont développé des mécanismes de contournement de ces défenses.

Cette hypothèse célèbre est combattue par des auteurs qui considèrent que la radiation adaptative d'une lignée d'insectes phytophages n'a pu se faire que longtemps après la diversification morphologique et chimique de ses plantes hôtes; c'est l'idée de "*sequential evolution*" défendue par Jermy (1976, 1984) et que l'on retrouve chez Futuyma & McCafferty (1990).

Selon Bush & Diehl (1982), la formation de races hôtes chez un insecte phytophage implique des changements dans les préférences alimentaires et/ou les sites d'oviposition, des adaptations physiologiques au nouvel hôte, des croisements préférentiels entre partenaires associés à chacun des hôtes. Les gènes doivent être théoriquement étroitement liés à moins que le choix du partenaire ne soit lié à la préférence alimentaire (Craig *et al.*, 1993).

Les expériences menées dans ce chapitre entrent dans le cadre de la recherche de mécanismes pré et post-reproducteurs permettant d'expliquer la formation et le maintien de races hôtes chez *C. serratus*. Nous essaierons d'étudier successivement le choix du site de la ponte et la fécondité des femelles ; l'interfécondité des différentes souches et la survie des larves ; la reconnaissance et fidélité à l'hôte, la capacité migratoire.

## I. CHOIX DU SITE DE PONTE ET FECONDITE DES FEMELLES

Le maintien d'"espèces biologiques" pourrait être facilité par le fait que les bruches se développent plus facilement, dans une certaine mesure, sur l'hôte dont elles sont issues. En analysant le comportement de ponte de la bruche de l'arachide, certains auteurs (Robert, 1984 ; Ndiaye, 1991 ; Ali-Diallo, 1991) ont pensé qu'elle se développe en suivant le principe de sélection d'hôtes émis par Hopkins (1917) à l'issue de ses travaux sur *Dendroctonus monticolae*. Selon ce principe, certains insectes polyphages, se développant aux dépens de plusieurs hôtes, auraient tendance à pondre sur la même espèce que celle où elles ont effectué leur développement. Il se produirait chez les femelles pondeuses, au stade larvaire, une mémorisation du substrat de ponte qui serait conservée chez l'adulte après la métamorphose. Robert (1984) conclut d'ailleurs que le mécanisme du choix de l'hôte serait plus complexe et ne dépendrait pas seulement d'une mémorisation larvaire mais aussi d'une induction au stade nymphal. Cet auteur a montré que les femelles ayant nymphosé à l'intérieur des gousses d'une plante hôte donnée manifestent une plus grande préférence pour cette plante que les femelles ayant nymphosé à l'extérieur des gousses. Mais le nombre insuffisant de plantes hôtes (*B. rufescens* et l'arachide) utilisés par Robert (1984) et le manque de traitement statistique des données de Ali-Diallo (1991) rendent leurs résultats peu crédibles.

Nous avons vérifié l'existence du choix préférentiel du substrat de ponte par les femelles de *Caryedon serratus* issues de cinq plantes hôtes différentes.

### I.1. MATERIELS ET METHODES

Les *C. serratus* utilisés proviennent de gousses récoltées à Keur Baka pendant la période où les populations de *C. serratus* sont les plus abondantes dans la nature (de novembre à mai). Les insectes appartiennent à cinq souches que l'on distingue suivant la nature de la plante hôte où a lieu le développement des larves: Arachide, *Piliostigma reticulatum*, *Bauhinia rufescens*, *Cassia sieberiana*, *Tamarindus indica*.

Pour chaque espèce de plante hôte, un nombre suffisant de gousses est récolté pour obtenir au moins 20 femelles et 20 mâles de *C. serratus*. Les mâles et les femelles âgés de

24 h au plus, au début de l'expérience (génération F0 ou F1) sont placés par couples pendant 2 nuits dans une plaque pour culture de tissus à 24 puits. Les femelles sont ensuite transférées chacune dans une cage de 50 x 25 x 25 cm<sup>3</sup> recouverte de grillage. Une ouverture pouvant être fermée par un tissu en forme de manchon de 50 cm de long, est laissée dans une des plus petites bases. Les gousses des plantes hôtes sauvages sont suspendues dans chaque cage ; leur position varie d'une répétition à une autre. Celles d'arachide sont posées en tas (Fig. 21).



Figure 21: cage d'expérimentation avec les gousses des hôtes sauvages accrochées et le tas d'arachide.

La surface de ponte offerte aux insectes est la même pour chaque type de gousse. 20 femelles sont utilisées pour chaque plante hôte. Les expériences ont lieu dans les conditions suivantes : 27-29°C, HR = 80-100 % en saison humide et 27-30°C, HR = 30-90% en saison sèche. Chaque expérience dure 20 jours. Les femelles utilisées sont nourries d'eau distillée et de pollen granulé, renouvelés régulièrement. Les oeufs pondus par chaque souche sur les gousses des différentes plantes hôtes sont dénombrés à la fin de chaque expérience. Les pourcentages de ponte sont représentés sous forme graphique. Les comparaisons de moyennes sont effectuées au moyen d'un test t (Student-Fisher).

## I.2. RESULTATS

Le tableau 10 récapitule le nombre total d'œufs déposés par l'ensemble des 20 femelles de chaque souche sur les gousses des différentes plantes hôtes utilisées dans l'expérience.

Tableau 10: nombre total d'œufs déposés par chaque souche.

Plantes hôtes utilisées	Souches				
	Arachide	<i>B. rufescens</i>	<i>C. sieberiana</i>	<i>P. reticulatum</i>	<i>T. indica</i>
Arachide	253	24	5	216	43
<i>B. rufescens</i>	3	529	21	5	19
<i>C. sieberiana</i>	1	17	569	0	5
<i>P. reticulatum</i>	36	23	7	258	60
<i>T. indica</i>	11	26	34	43	494
<b>Total</b>	<b>304</b>	<b>619</b>	<b>636</b>	<b>522</b>	<b>621</b>

Le nombre total d'œufs déposés par les femelles sur l'ensemble des gousses est de 2702. La souche arachide est statistiquement la moins féconde. Les nombres d'œufs émis par les femelles des autres souches ne sont pas significativement différents ( $p < 0,01$ ). La répartition des œufs des différentes souches de *Caryedon serratus* sur les cinq plantes hôtes s'établissent comme suit.

### I.2.1. Souche Arachide

Les femelles placées en situation de choix répartissent leurs œufs sur les différentes gousses disponibles mais avec une préférence significative pour la plante sur laquelle a eu lieu le développement larvaire. En effet, à la fin de l'expérience, les 304 œufs émis par les femelles de la souche "Arachide" sont répartis comme suit (Fig. 22a):

- 83,5% des œufs sont déposés sur les gousses d'arachide. Le nombre moyen d'œufs par femelle pondreuse est de 17. Deux des 20 femelles n'ont pas émis d'œufs. Il y a donc une ponte préférentielle sur les gousses d'arachide.
- *Piliostigma reticulatum* reçoit quand même 11,9% des œufs. D'ailleurs 2 des 18 femelles pondreuses ont déposé de manière préférentielle leurs œufs sur les gousses de cette plante hôte.

- Les gousses de *T. indica* ne reçoivent que 3,63%. Aucune femelle de la souche "Arachide" n'a déposé de manière préférentielle ses œufs sur cette plante.
- Le pourcentage d'œufs déposés sur les gousses de *Bauhinia rufescens* et celles de *Cassia sieberiana* ne diffère pas de 0.

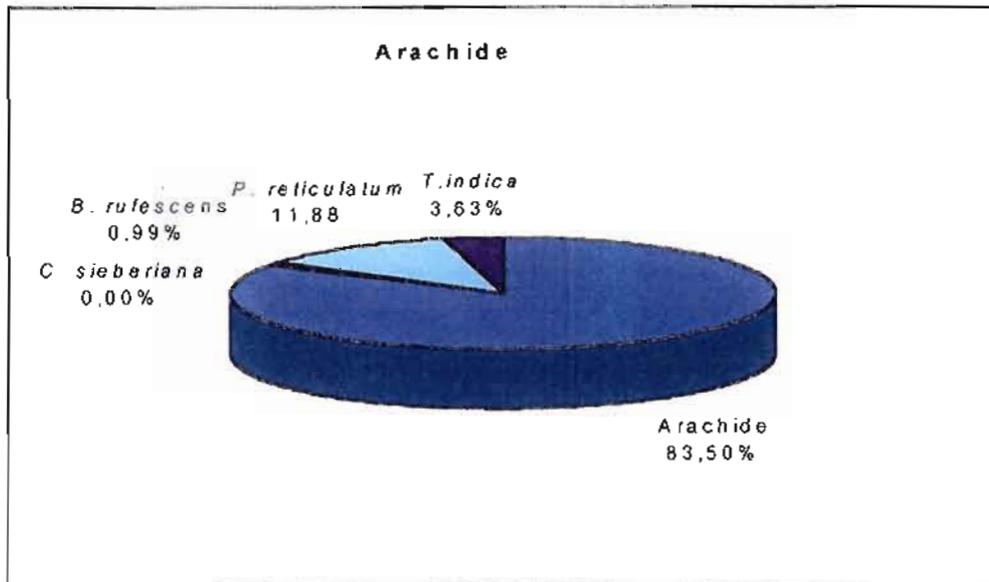


Figure 22a. répartition des œufs de la souche "Arachide" sur cinq plantes hôtes.

### 1.2.2. Souche *Bauhinia rufescens*

- 619 œufs sont pondus par les femelles de la souche "*B. rufescens*". Les gousses de *B. rufescens* (plante où s'est effectué le développement) reçoivent le plus fort pourcentage d'œufs, 85,46 % (Fig. 22b). Deux femelles n'ont pas émis d'œufs. Les 18 autres femelles ont toutes pondus sur cette plante. Le nombre moyen d'œufs par femelle ponduse est de 34.
- Le reste des œufs est également réparti entre les autres plantes hôtes ( $p > 0, 05$ ): 3,88% sur arachide, 3,72 % sur *P. reticulatum*, 2,75% sur *C. sieberiana* et 4,20% sur *T. indica*. Notons cependant que 9 femelles sur les 18 ponduses n'ont pas déposé d'œufs sur les gousses de *C. sieberiana*.

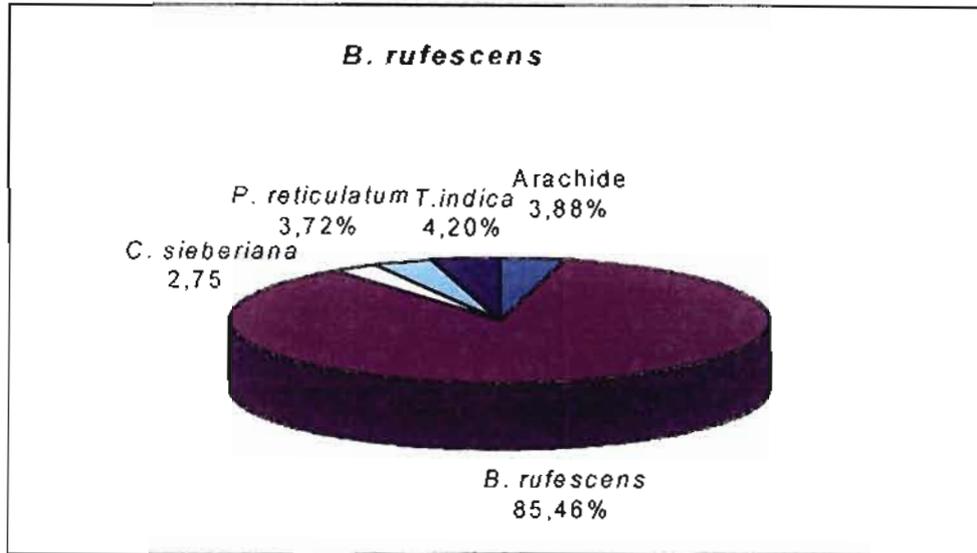


Figure 22b. répartition des oeufs de la souche "*B. rufescens*" sur cinq plantes hôtes.

### 1.2.3. Souche *Cassia sieberiana*

- 636 œufs sont pondus par les femelles de la souche "*C. sieberiana*". Les gousses de *C. sieberiana* (plante hôte d'origine des femelles) reçoivent 90,47 % des œufs pondus par 19 femelles (Fig. 22c). Une des femelles utilisée n'a pas pondu sur les gousses. Les femelles ont déposé chacune plus de 90% de leurs œufs sur cette plante. Le nombre moyen d'œufs par femelle pondreuse est de 33.
- 75% des femelles de cette souche n'ont déposé aucun œuf sur les gousses d'arachide. D'ailleurs les 5 femelles ayant pondu sur ces gousses n'ont déposé chacune qu'un seul œuf sur une gousse. Le pourcentage d'œufs déposés sur les gousses d'arachide ne diffère pas de 0.
- Sur les gousses de *Piliostigma reticulatum* le pourcentage d'œufs déposés est aussi égal à 0 ( $p < 0$ ). Seules 4 femelles ont déposé des œufs sur ces gousses.
- Les gousses de *B. rufescens* et celles de *T. indica* ont reçu respectivement 3,30% et 5,35% des œufs déposés. Ces pourcentages, bien qu'étant très faibles, sont cependant différents de 0.

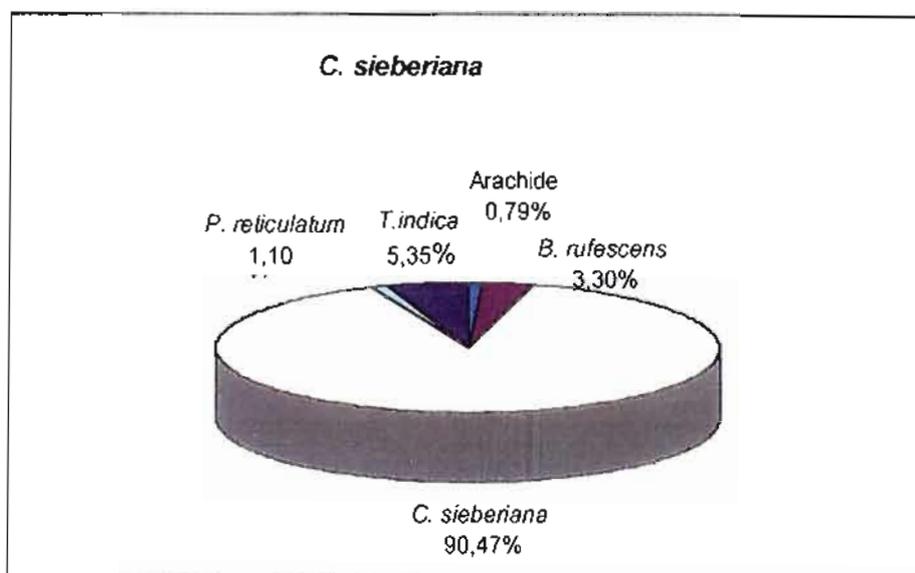


Figure 22c. répartition des oeufs de la souche "*C. sieberiana*" sur cinq plantes hôtes.

#### 1.2.4. Souche *Piliostigma reticulatum*

- Les femelles de la souche "*P. reticulatum*" ont pondu au total 522 œufs. Toutes les femelles utilisées ont pondu. Le nombre moyen d'œufs pondu par femelle est de 26. Les gousses de *P. reticulatum* ont reçu 49,43% des pontes (Fig. 22d). Toutes les femelles de cette souche ont pondu sur *P. reticulatum*.
- 41,38% des œufs de la souche "*P. reticulatum*" sont déposés sur les gousses d'arachide. D'ailleurs toutes les femelles de cette souche ont pondu sur ces gousses. Ce pourcentage de ponte n'est pas statistiquement différent de celui obtenu sur les gousses de la plante hôte dont les femelles pondeuses sont issues (*P. reticulatum*).
- 8,24 % des œufs sont pondus sur *T. indica*. Ce pourcentage est dû à 2 femelles qui ont pondu plus de 96% de l'ensemble des œufs déposés sur cette plante hôte.
- Les pourcentages d'œufs déposés sur *B. rufescens* et *C. sieberiana* sont statistiquement nuls. Aucune femelle n'a pondu sur *C. sieberiana* et seulement 5 femelles ont déposé chacune 1 œuf sur les gousses de *B. rufescens*.

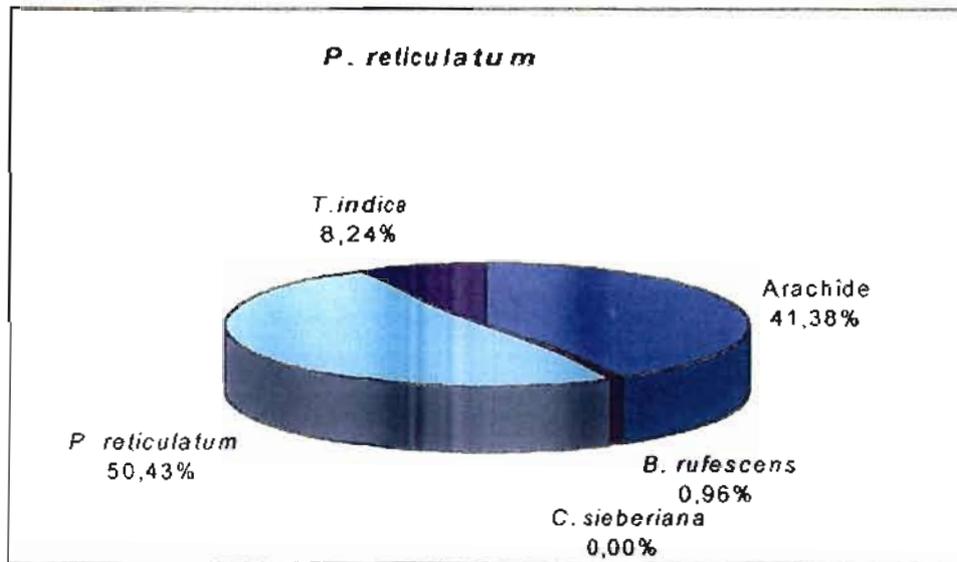


Figure 22d. répartition des oeufs de la souche "*P. reticulatum*" sur cinq plantes hôtes.

#### 1.2.5. Souche *Tamarindus indica*

- 621 œufs ont été pondus par les femelles de la souche "*T. indica*" sur l'ensemble des gousses. 79,38% des œufs sont déposés sur les gousses de la plante hôte d'origine des femelles, *T. indica* (Fig. 22e). Toutes les femelles ont émis des œufs sur ces gousses. Le nombre moyen d'œufs par femelle pondreuse est de 31.
- Le pourcentage de ponte sur Arachide, *B. rufescens* et *P. reticulatum* est respectivement de 6,92%, 3,06% et 9,66%. Sur *C. sieberiana*, la ponte est quasi nulle (0,80%).

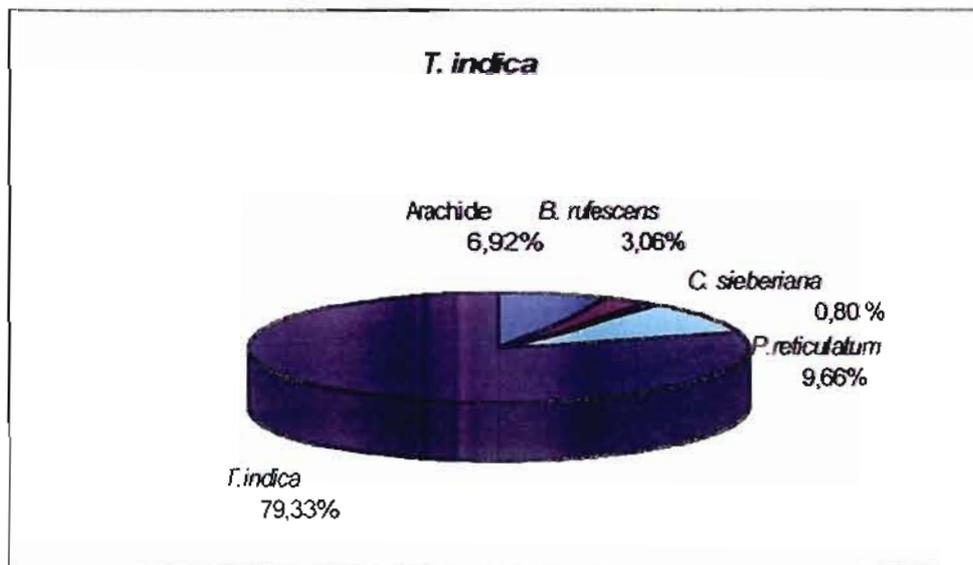


Figure 22e. répartition des oeufs de la souche "*T. indica*" sur cinq plantes hôtes.

## 1.2. DISCUSSION

Comme chez tous les insectes dont les larves ne cherchent pas activement leur nourriture, l'expression actuelle du résultat de l'évolution concomitante plantes hôtes/populations chez *Caryedon serratus* repose probablement dans une large mesure sur le choix du site de ponte par la femelle. La comparaison des fécondités entre souche sur chaque espèce de plante doit cependant être faite avec prudence car les chiffres obtenus pour chaque souche peuvent dépendre de l'état physiologique des femelles.

Mais, même si l'adéquation entre choix du site de ponte et performance larvaire n'est pas mise en exergue dans ce test, les résultats obtenus nous ont néanmoins permis de mettre en évidence certaines caractéristiques des différentes populations étudiées et révèlent que chacune des souches utilisées se développe en suivant le principe de sélection d'hôte de Hopkins. En effet, la ponte des femelle se fait de manière privilégiée sur la plante où a lieu le développement originel. D'autres travaux, notamment ceux de Thorpe (1938), appuyés par ceux de Cushing (1941) sur *Drosophila guittifera*, ont montré aussi l'existence du principe de Hopkins. Pour eux, les larves seraient conditionnées par l'odeur spécifique de leurs hôtes ou du milieu d'élevage et seraient attirées par cette odeur à l'état adulte. Ce principe se vérifie chez *Nasonia vitripennis*, Hyménoptère parasite de Diptères (Smith & Cornell, 1979). Pour d'autres auteurs, le principe de Hopkins n'existe pas (Zaazon, 1951 ; Wiklund, 1975). D'après Mayr (1974) et Huttel & Bush (1972), il n'y a en fait aucune évidence que cette mémorisation soit forte et soit spécifiquement valable. Hershberger et Smith (1967) chez *Drosophila melanogaster* et Van Emden *et al* (1996) chez *Aphidius rhopalosiphi* montrent que cette réponse conditionnée est susceptible d'extinction. En fait, pour ces auteurs, la préférence pour l'hôte dont les bruches sont issues paraît liée, plutôt qu'à une mémorisation du substrat de ponte par la larve, à un conditionnement de l'adulte au moment de l'émergence, à la suite du contact avec les parois externes du cocon ou encore avec la plante hôte. Pour Wiklund (1975), le choix du lieu de ponte n'est pas influencé par le substrat où s'est effectué le développement larvaire. Selon lui, le choix des plantes par les larves et par les femelles serait sous la dépendance de complexes géniques différents. Contrairement à d'autres insectes phytophages où le choix de la plante peut être assuré partiellement ou totalement par la larve (Wiklund, 1975), chez *C. serratus*, comme chez de nombreux Bruchidae, il est entièrement le fait de la femelle. C'est elle qui, en

collant ses oeufs sur les gousses assure la coïncidence spatiale entre le stade adulte reproducteur et le stade larvaire consommateur. La larve néonate de ce Coléoptère disposant de réserves limitées et le développement de tous les stades larvaires s'effectuant dans la même gousse, ce choix ne peut donc pas être modifié par la suite. Cependant, la liaison entre gènes de préférence (choix de la plante hôte lors de la phase d'oviposition) et gènes de performance (survie et vitesse de développement de la larve, poids et fécondité de la descendance), même si elle est une hypothèse souvent admise (Bush & Diehl, 1982 ; Björkman, 1997), l'adéquation entre le choix par la femelle du site de ponte et le succès du développement larvaire n'est pas toujours démontrée. Des travaux comme ceux de Wasserman & Futuyma (1981) et Fox (1993) sur *Callosobruchus maculatus* ou Jaenike (1989) sur *Drosophila tripunctata* montrent une corrélation faible ou nulle entre préférence de la femelle et survie ou développement larvaire. Il existe cependant de multiples exemples de plantes non exploitées (parce qu'elles contiennent des substances répulsives envers la femelle) alors qu'elles conviennent au développement larvaire des insectes (Bernays & Chapman, 1987), ou inversement de plantes toxiques dépourvues de substances répulsives (voir par exemple, Johnson *et al.*, 1996).

De nombreux facteurs liés à l'écologie de la plante hôte, aux ennemis naturels de cet insecte phytophage ou à l'environnement, jouent un rôle dans la dynamique des populations de *Caryedon serratus*, en particulier dans le choix des plantes hôtes (Fox & Morrow, 1981). Il est vrai qu'au laboratoire, les situations de choix proposées à la bruche de l'arachide sont fort différentes de celles qu'elle peut rencontrer dans la nature d'autant plus que l'effet de migration est limité. Or, il est vraisemblable que le spectre des molécules allélochimiques perçue par les femelles joue un rôle majeur dans la reconnaissance des gousses surtout dans un espace aussi réduit que ces cages. Il faut cependant noter que l'hypothèse de phénologies distinctes qui permettraient aux différentes Caesalpinaceae hôtes de retenir, dans la nature, des populations génétiquement isolées (par un voltinisme différent selon les hôtes, par exemple) est contredite par le fait que *Bauhinia rufescens* garde ses gousses toute l'année et que même les gousses tombées à terre reçoivent des pontes. D'autre part, les mêmes expériences que celles que nous avons menées dans ce test, reprises par Delobel, donnent des résultats moins nets, qui mettent aussi en exergue l'aspect physique des gousses (Delobel, com.pers). La singularité de la bruche de l'arachide, *C. serratus*, réside dans l'identité presque parfaite qui existe chez

cette espèce entre spectre fondamental (l'ensemble des plantes sur lesquelles le développement est supposé possible) et spectre réalisé. Ceci traduit une capacité particulièrement élevée des femelles de cette espèce à exploiter au mieux les ressources disponibles, mais peut également s'interpréter comme une capacité de discrimination entre hôtes possibles particulièrement faible. C'est sans doute la raison pour laquelle *C. serratus* est la seule espèce de *Caryedon* rencontrée jusqu'à présent dans les stocks d'arachide (Delobel *et al.* 2000).

## II. INTERFECONDITE DES SOUCHES ET SURVIE DES LARVES

### II.1. MATERIEL ET METHODES

Nous avons choisi ici de faire des tests de croisements sexuels afin de savoir si les souches sont interfécondes et de comparer la fécondité des différentes combinaisons. Les souches *Cassia sieberiana*, *Bauhinia rufescens* et *Pilostigma reticulatum* sont utilisées. Les critères de choix de ces souches sont basés sur la distance génétique existant entre ces souches au vu des résultats de séquençage de l'ITS1 et des locus microsatellites.

Les *C. serratus* utilisées proviennent de gousses récoltées dans plusieurs localités du Sénégal pendant la période où *C. serratus* est abondante dans la nature (de novembre à mai). Pour chaque espèce de plante hôte, un nombre suffisant de gousses est récolté pour obtenir au moins 20 femelles et 20 mâles de *C. serratus*. Ces insectes sont maintenus en élevages pendant 6 générations sur leur plante hôte d'origine. A la 7<sup>ème</sup> génération, chaque bruche est isolée dès le stade nymphal (cocon) dans une plaque pour culture de tissus à 24 puits en attendant son émergence.

Pour chaque croisement, 50 graines de chacune des plantes hôtes d'où proviennent les bruches utilisées sont placées dans une boîte de Pétri contenant une couche de sable tamisé d'environ 1 cm d'épaisseur.

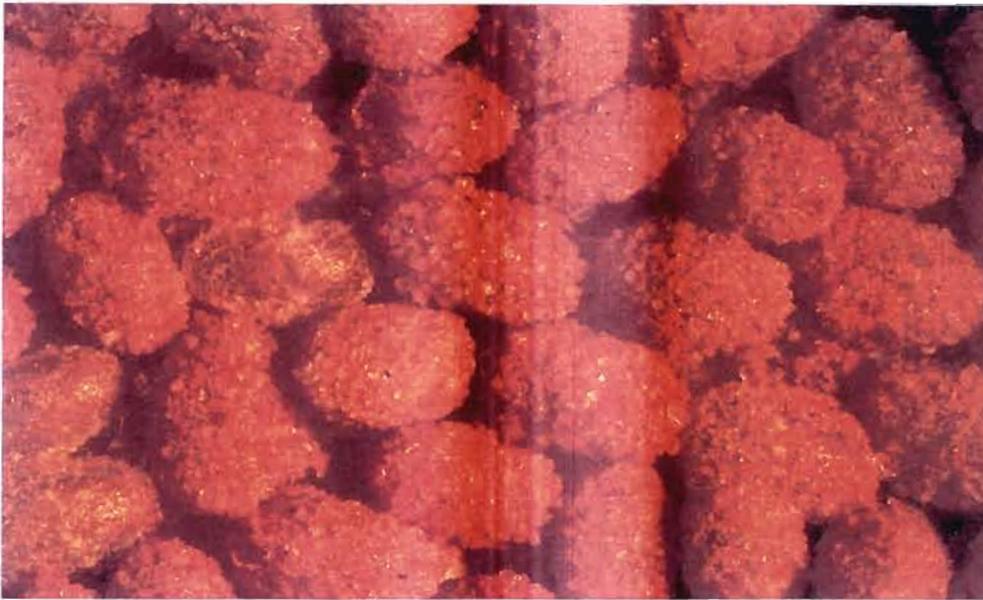


Figure 23: cocons de *C. serratus* formés dans le sable.

100 graines de chacune des plantes hôtes utilisées sont mises dans chacune des boîtes de Petri témoins (boîtes où des croisements entre mâle et femelle provenant d'une même plante hôte sont effectués). Les croisements suivants ont été effectués dès l'émergence des adultes. Chacun d'eux est affecté d'un numéro d'identification.

Mâle Cassia X Femelle Bauhinia = 1

Femelle Cassia X Mâle Bauhinia = 2

Mâle Cassia X Femelle Piliostigma = 3

Femelle Cassia X Mâle Piliostigma = 4

Mâle Bauhinia X Femelle Piliostigma = 5

Femelle Bauhinia X Mâle Piliostigma = 6

Mâle Bauhinia X Femelle Bauhinia = 7

Mâle Cassia X Femelle Cassia = 8

Mâle Piliostigma X Femelle Piliostigma = 9

Les expériences ont lieu dans les conditions suivantes: 27-29°C, HR = 80-100 % en saison humide et 27-30°C, HR = 30-90% en saison sèche. Chaque expérience dure le temps de vie des bruches utilisées. Les insectes utilisés ne sont pas nourris.

Dans chaque expérience, les oeufs pondus par chaque souche sur les graines des différentes espèces de plantes, les cocons formés et les adultes émergés, sont dénombrés. Chaque type de croisement est répété 20 fois. Les comparaisons de pourcentages d'oeufs pondus sont effectuées au moyen d'un test t (Student-Fisher).

Dans chaque type de croisement, la fertilité des descendants est testée par la même méthode que les croisements parentaux. Les mêmes paramètres sont aussi calculés.

## II.2. RESULTATS

Le tableau 11 résume les nombres moyens d'oeufs pondus, de cocons formés et d'adultes émergés pour chaque type de croisement sexuel. Pour chaque paramètre du tableau, les valeurs suivies des mêmes lettres alphabétiques sont statistiquement égales.

Tableau 11: nombres moyens d'oeufs pondus, de cocons formés et d'adultes émergés.

Croisements	Oeufs pondus	Cocons formés	Adultes émergés
Mâle Cassia X Femelle Bauhinia	16,95 <sup>a</sup>	12,05 <sup>a</sup>	12,05 <sup>a</sup>
Femelle Cassia X Mâle Bauhinia	12,35 <sup>a</sup>	10,27 <sup>a</sup>	9,45 <sup>a</sup>
Mâle Cassia X Femelle Piliostigma	23,20 <sup>b</sup>	20,55 <sup>b</sup>	19,90 <sup>b</sup>
Femelle Cassia X Mâle Piliostigma	18,05 <sup>ab</sup>	16,35 <sup>b</sup>	15,65 <sup>b</sup>
Mâle Bauhinia X Femelle Piliostigma	21,65 <sup>b</sup>	21,05 <sup>b</sup>	20,35 <sup>b</sup>
Femelle Bauhinia X Mâle Piliostigma	16,85 <sup>a</sup>	15,75 <sup>ab</sup>	15,05 <sup>ab</sup>
Mâle Bauhinia X Femelle Bauhinia	34,25 <sup>c</sup>	30,15 <sup>c</sup>	27,45 <sup>c</sup>
Mâle Cassia X Femelle Cassia	31,75 <sup>c</sup>	28,65 <sup>c</sup>	28,30 <sup>c</sup>
Mâle Piliostigma X Femelle Piliostigma	39,05 <sup>c</sup>	27,47 <sup>c</sup>	26,84 <sup>c</sup>

Il ressort de ce tableau que malgré la distance génétique observée entre les souches utilisées, celles-ci sont interfécondes et donnent une descendance viable. Cependant la descendance des témoins (croisements au sein d'une même plante hôte) est statistiquement le double de celle obtenue entre plantes hôtes différentes.

D'autre part, il n'existe aucune mortalité larvaire "anormale" au niveau des croisements entre plantes hôtes différentes. Le taux de mortalité est statistiquement le même dans tous les croisements. Les résultats des tests de fertilité de la F1 sont résumés dans le tableau 12.

Tableau 12: nombres moyens d'œufs pondus, de cocons formés et d'adultes émergés des croisements de la F1.

	Œufs pondus	Cocons formés	Adultes émergés
Mâle (1) X Femelle (1)	7,55 <sup>a</sup>	7,05 <sup>a</sup>	7,05 <sup>a</sup>
Mâle (2) X Femelle (2)	6,25 <sup>a</sup>	5,27 <sup>a</sup>	4,45 <sup>a</sup>
Mâle (3) X Femelle (3)	13,30 <sup>b</sup>	12,55 <sup>b</sup>	11,90 <sup>b</sup>
Mâle (4) X Femelle (4)	10,05 <sup>b</sup>	9,35 <sup>b</sup>	8,65 <sup>b</sup>
Mâle (5) X Femelle (5)	10,65 <sup>b</sup>	9,85 <sup>b</sup>	9,35 <sup>b</sup>
Mâle (6) X Femelle (6)	10,85 <sup>ab</sup>	10,75 <sup>ab</sup>	10,05 <sup>ab</sup>
Mâle (7) X Femelle (7)	18,25 <sup>c</sup>	15,45 <sup>c</sup>	15,45 <sup>c</sup>
Mâle (8) X Femelle (8)	17,95 <sup>c</sup>	16,65 <sup>c</sup>	15,30 <sup>c</sup>
Mâle (9) X Femelle (9)	16,05 <sup>c</sup>	14,54 <sup>c</sup>	11,75 <sup>c</sup>

Ces résultats révèlent que les hybrides obtenus des parents sont bien fertiles. Comme dans le cas des parents, la descendance est significativement plus petite chez les hybrides obtenus de croisement entre souches différentes que chez les bruches obtenues d'une même plante hôte.

Lorsque l'on compare la fertilité des "parents" à celle de la F1 (Fig. 24), on remarque que le nombre d'œufs déposés diminue presque de moitié dans tous les croisements entre mâle et femelle de la F1.

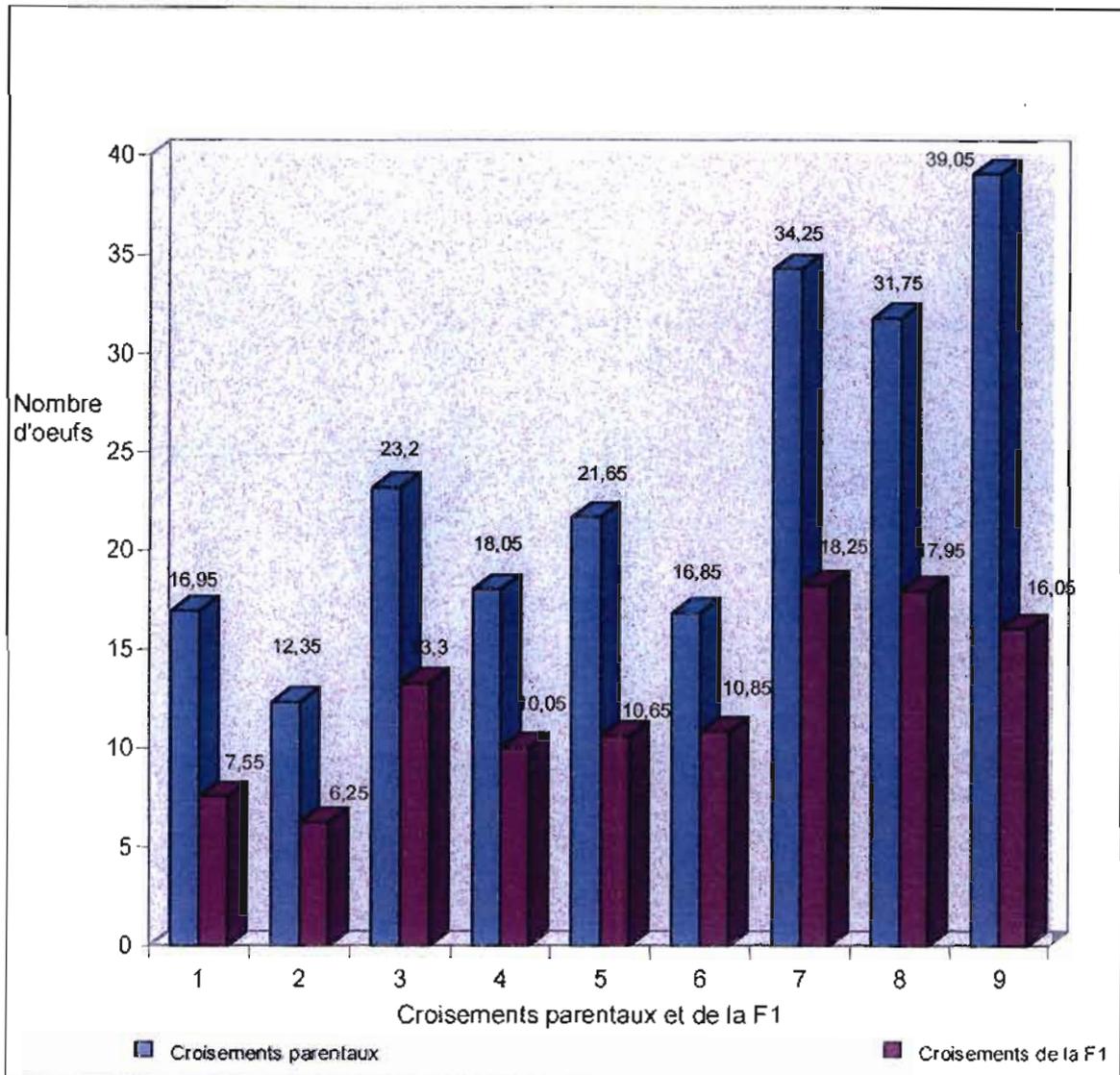


Figure 24: comparaison des nombres d'oeufs dans les deux types de croisements

### II. 3. DISCUSSION

Ces expériences de croisements contrôlés ont permis de vérifier que malgré la différenciation génétique existant entre elles, les bruches inféodées à *B. rufescens*, à *Cassia sieberiana* et à *P. reticulatum*, s'hybrident au laboratoire et donnent une descendance fertile. La fécondité obtenue entre mâle et femelle provenant de plantes hôtes différentes est cependant deux fois moindre que celle d'un croisement témoin ("Cassia x Cassia", "Bauhinia" x "Bauhinia" ou "Piliostigma" x "Piliostigma"). D'autre part, lorsque l'on compare la fécondité des "parents" à celle de la F1, on constate que le nombre d'oeufs déposés diminue presque de moitié dans tous les croisements comme s'il existait une

barrière reproductrice de plus en plus importante au fur et à mesure que les générations se succèdent. Ceci pourrait s'expliquer par l'existence de barrières reproductrices pré ou post-zygotiques qui empêcheraient, en situation de liberté comme dans la nature, aux bruches inféodées à des plantes hôtes différentes de s'accoupler ; dans le cas des expériences de laboratoire, c'est comme si on "obligeait" un mâle et une femelle ne provenant pas de la même plante hôte à s'accoupler. De plus, la production d'ovocytes étant continue chez la femelle de *C. serratus*, celle-ci s'accouple avec n'importe quel mâle (provenant de n'importe laquelle des plantes hôtes de *C. serratus*) pour se "débarrasser" de ses œufs. Notons cependant que la descendance obtenue par les "parents" nous permet de rejeter toute hypothèse quant à des structures différentes des génitalia des bruches des différentes souches.

Quelle interprétation faut-il donc donner à de tels chiffres? Seules des expériences de génétiques mendéliennes suivies d'observations des différents types d'appariements des chromosomes pourront certainement expliquer ces constats. Toujours est-il que sur les plans théoriques et expérimentaux, les travaux de laboratoire menés au cours des 40 dernières années ont montré qu'un isolement reproductif peut apparaître entre des populations encore reliées par des flux de gènes à condition que la sélection favorisant les individus adaptés à chacun des hôtes soit forte comparativement à ces flux (Rice & Hostert, 1993). L'idée générale actuelle est que l'isolement reproductif prézygotique va, dans ce cas, se développer du fait de corrélations fortuites (pléiotropie/entraînement génétique ou "auto-stop génique") entre les caractères qui seront sélectionnés dans l'environnement de chacun des hôtes, mais qui n'entraînent pas d'isolement reproductif, et d'autres caractères responsables de l'isolement reproductif (Miyatake & Shimizu, 1999).

Les travaux de Rice & Hostert (1993) indiquent aussi qu'un phénomène de spéciation peut se produire sans qu'il y ait allopatrie, ce qui apporte une base théorique aux partisans de la spéciation sympatrique par ségrégation écologique (Bush, 1994). Cette dernière peut être perçue comme un cas particulier de différenciation génétique liée à la sélection en présence de flux géniques.

### III. RECONNAISSANCE ET FIDELITE A L'HÔTE

La reconnaissance et la fidélité à l'hôte constituent des barrières pré-reproductrices entre souches ou races sympatriques chez plusieurs insectes phytophages dont le site de ponte est morcelé. L'objectif de ce chapitre est donc de déterminer s'il y a reconnaissance et fidélité à l'hôte en mesurant les flux d'individus de *C. serratus* différentes souches vers les différentes espèces hôtes. Nous testerons dans le même chapitre la capacité migratoire de la bruche de l'arachide pour avoir une idée sur sa faculté de dispersion et sa vitesse de déplacement.

#### III.1. MATERIEL ET METHODES

##### III.1.1. Les bruches utilisées

Les adultes de *C. serratus* utilisés proviennent de gousses récoltées dans plusieurs zones du Sénégal pendant la période où les populations de *C. serratus* sont les plus abondantes dans la nature. Les souches "Arachide", "Bauhinia", "Cassia", "Piliostigma" et "Tamarindus" sont utilisées. La souche arachide est composée de *C. serratus* provenant de l'arachide nouvellement récoltée. La souche "Bauhinia" est formée de *C. serratus* issus de *B. rufescens* ; la souche "Cassia" de *C. serratus* issus de *Cassia sieberiana*, la souche "Piliostigma", de *C. serratus* issus de *Piliostigma reticulatum* et la souche "Tamarindus", de *C. serratus* issus de *Tamarindus indica*. Les insectes de chacune des souches sont élevés sur leur plante hôte d'origine pendant plusieurs générations. Pour chaque plante hôte, un nombre suffisant de gousses est récolté pour obtenir au moins 50 adultes de *C. serratus*. Les adultes utilisés sont marqués sur les élytres à l'aide de vernis à ongle d'une couleur différente pour chaque souche.

##### III.1.2. Zone d'étude

L'expérience a lieu Thiawandou, village situé à 10 km de Kaolack en allant vers Niore. Les différentes plantes hôtes de *C. serratus* coexistent dans cette localité. Ce village est marqué par une longue période de saison sèche (de novembre à juin) et une saison des pluies (de juillet à octobre). Les hauteurs de pluies sont de 800 mm en moyenne mais leur

répartition et la quantité d'eau tombée peuvent être très différentes d'une année à l'autre ( $\pm$  100 mm). La saison sèche est chaude (moyenne des maxima: 32 °C), l'humidité relative est faible dans la journée (10 à 30%) mais augmente dans la nuit pour atteindre son maximum le matin (80 à 100%). Les vents dominants sont les alizés continentaux chauds et secs (harmattan). La saison des pluies est caractérisée par une amplitude thermique journalière bien plus faible et une humidité relative plus élevée et relativement constante (80 à 100%). Les moussons, vents d'ouest et du sud-ouest, dominent alors largement et sont responsables des précipitations.

On distingue essentiellement deux types de sols dans cette localité: des sols rouges et des sols beiges. Les sols rouges sont des formations ferrugineuses tropicales lessivées plus ou moins remaniées, formées sur matériaux dunaires. En raison des faibles proportions d'argile et de matière organique, ils sont caractérisés par des capacités de stockage de l'eau et des cations faibles. Ils sont peu profonds et parsemés de taches de concrétions de fer et d'aluminium, à taux d'acidité très élevé du fait de leur très faible teneur en calcaire assimilable. Les sols beiges sont des sols ferrugineux tropicaux, lessivés, parfois hydromorphes sur matériaux des basses plaines. Ils se rapprochent des sols "dior" par leur texture sableuse en surface et sont également peu riches en éléments minéraux.

La végétation est de type soudano-sahélien, caractérisée par la présence d'espèces très diversifiées. Les herbes annuelles coexistent avec quelques arbres et arbustes. Dans les zones défrichées et cultivées (arachide, mil et maïs essentiellement), il ne subsiste de la savane arborée qu'une strate arbustive assez développée par endroit et des arbres dispersés. Les espèces végétales préservées, le sont pour leur utilité directe ou indirecte (alimentation des hommes et du bétail, fibre, ombrage, fertilisation des sols, médecine traditionnelle,...) pour les populations locales. Les arbres les plus fréquents sont: *Adansonia digitata*, *Tamarindus indica*, *Detarium senegalensis*, *Detarium microcarpum*, *Cassia sieberiana*, *Cordyla pinnata*, *Piliostigma reticulatum*, *Piliostigma thonningii*, *Bauhinia rufescens*, *Prosopis africana*, *Parkia biglobosa*...etc. Dans la strate arbustive, les espèces dominantes sont *Cassia occidentalis*, *Cassia obtusifolia*, *Guiera senegalensis*, *Combretum micranthum*. Le tapis herbacé au sol est composé essentiellement d'espèces annuelles dominées par les graminées, se desséchant à partir du mois de Novembre ; les genres les plus courants sont *Aristida*, *Chloris*, *Chenchrus*, *Eragrostis*, *Schoenfeldia*,....

### III.1.3. Expérimentations

Nous avons repéré dans cette zone un lieu où coexistent les différentes plantes hôtes (*Bauhinia rufescens*, *Cassia sieberiana*, *Piliostigma reticulatum*, *Tamarindus indica*). Les plantes hôtes choisies sont marquées à l'aide de la peinture. Deux arbres sont choisis pour chaque plante hôte et sur chacune d'elles sont accrochés des pièges à carton ondulé pouvant servir de refuges à *C. serratus* durant la journée. Deux tas d'arachides d'environ 15 kilogrammes chacun sont constitués.

Toutes les bruches (marquées) des différentes souches sont lâchées en même temps en un point situé à environ égale distance des arbres hôtes choisis. Le lendemain, les bruches marquées sont recherchées, du petit matin au crépuscule dans les pièges posés sur les arbres hôtes, sous les craquelures de l'écorce des arbres, sous les feuilles tombées sous la canopée des arbres. Nous avons aussi recherché ces bruches dans une touffe de *Guiera senegalensis* et sur *Balanites aegyptiaca*. Ces deux plantes qui ne sont pas hôtes de *C. serratus* se trouvaient dans le lieu d'étude.

Les bruches de chaque souche, capturées sur chaque hôte, sur *Guiera senegalensis* et sur *Balanites aegyptiaca* sont dénombrées et ensuite relâchées. La même recherche se fera durant 5 jours. La comparaison des moyennes de capture des 5 jours est faite au moyen du test de Student-Fischer. Dans les graphiques, les valeurs suivies des mêmes lettres alphabétiques sont statistiquement égales.

## III.2. RESULTATS

Les figures 25a à 25e illustrent les pourcentages de bruches retrouvées sur les arbustes choisis pour chacune des souches.

### III.2.1.1. Souche "Arachide"

Parmi les 50 bruches de la souche arachide lâchées, 44 ont été retrouvées. 24,2% des bruches de la souche arachide sont retrouvés dans les deux tas d'arachide. 25,6% sont retrouvés sur *Piliostigma reticulatum*. Un pourcentage significatif de ces bruches est retrouvé sur *Tamarindus indica* (19,8%). Notons que plus de 20% des bruches de la souche arachide sont retrouvées sur des arbustes qui ne sont pas plantes hôtes de *C. serratus*

(*Guiera senegalensis* et *Balanites aegyptiaca*). *C. sieberiana* et *B. rufescens* reçoivent des pourcentages faibles de bruches de cette souche avec respectivement 2,2% et 6,9%.

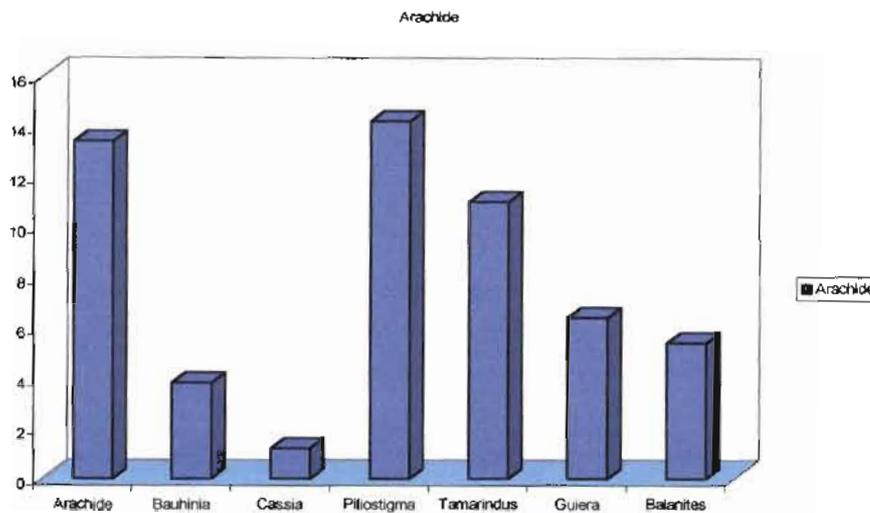


Figure 25a: répartition des bruches de la souche arachide

#### II.2.1.2. Souche "Bauhinia"

34 des 50 bruches de la souche "Bauhinia" ont été retrouvées après 5 jours de recherche. 31,58% de ces bruches ont été retrouvés sur la plante hôte dont ils sont originaires (*Bauhinia rufescens*). Les pourcentages de bruches observées sur Arachide (13,5%), sur *Piliostigma reticulatum* (15,2%) et sur *Tamarindus indica* (17,0%) sont statistiquement égaux ( $p > 0,05$ ). *Cassia sieberiana* ne reçoit que 6,4% des bruches. 16,4% des bruches sont retrouvés sur *G. senegalensis* (11,5%) et *B. aegyptiaca* (4,8%).

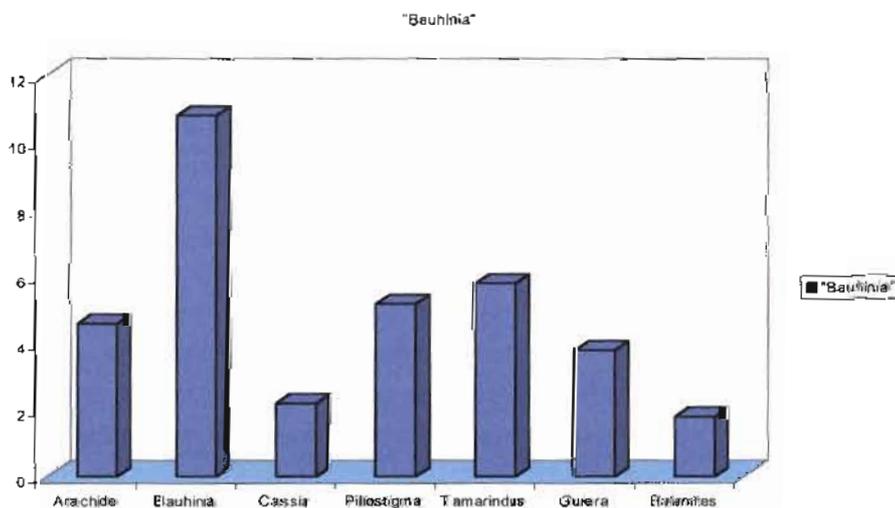


Figure 25b: répartition des bruches de la souche "Bauhinia"

### III.2.1.3. Souche "Cassia"

Sur les 50 bruches de la souche "Cassia", 36 ont été retrouvées. 31,8% de ces bruches l'ont été sur *Cassia sieberiana*, plante hôte d'origine de la souche. *Bauhinia rufescens* (15,1%) et *Tamarindus indica* (12,9%) reçoivent des pourcentages de bruches statistiquement égaux. Seules 7,8% des bruches sont retrouvés sur *Piliostigma reticulatum*. Au total 20,7% des bruches sont retrouvés sur *Guiera senegalensis* et *Balanites aegyptiaca*.

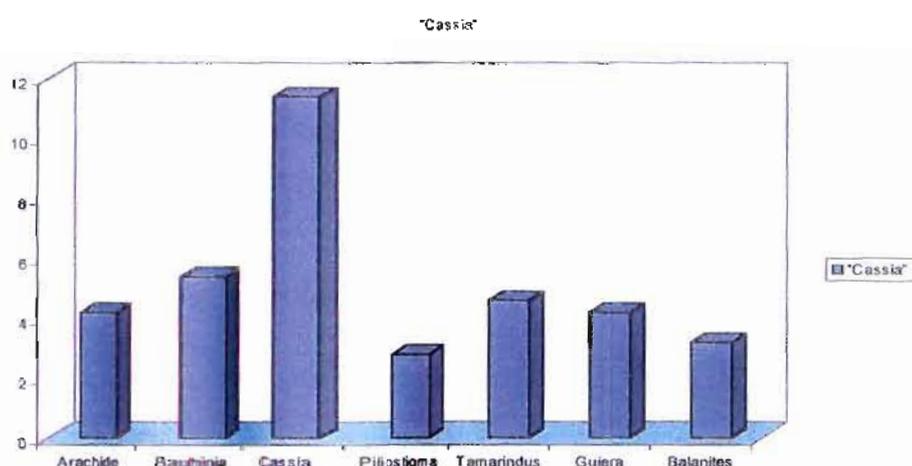


Figure 25c: répartition des bruches de la souche "Cassia".

### III.2.1.4. Souche "Piliostigma"

42 des 50 bruches de la souche "Piliostigma" lâchées sont retrouvés à la fin de l'expérience. 55,71% de ces bruches sont retrouvées sur Arachide (29,04%) et *Piliostigma reticulatum* (26,67%), 17, 14% sur *Tamarindus indica*. *Bauhinia rufescens* et *Cassia sieberiana* reçoivent un nombre faible de bruches avec respectivement 8,09% et 4,76%. Les plantes qui ne sont pas hôtes de *Caryedon serratus* (*Guiera senegalensis* et *Balanites aegyptiaca*) abritent au total 16, 67% de ces bruches.

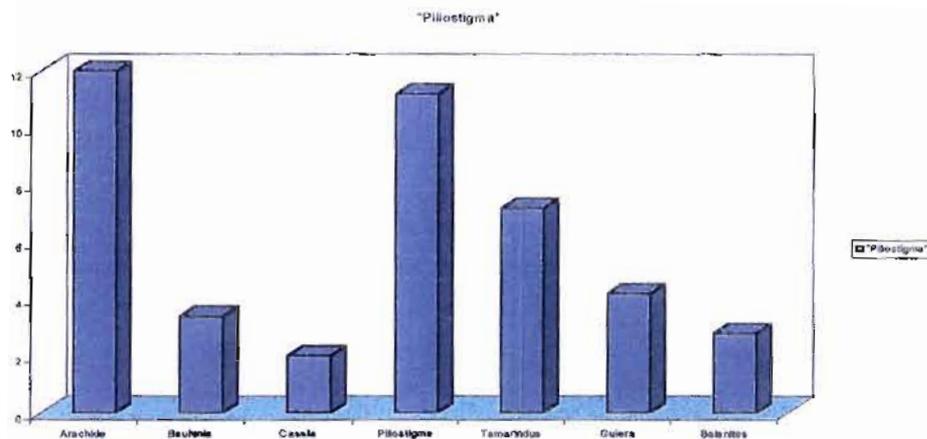


Figure 25d: répartition des bruches de la souche "Piliostigma".

### III.2.1.5. Souche "Tamarindus"

Seules 30 des 50 bruches de la souche "Tamarindus" ont été retrouvées. Les bruches de cette souche sont retrouvées en majorité sur *Piliostigma reticulatum* (35,10%). Presque 30% de ces bruches sont cependant retrouvées sur *Tamarindus indica*, leur plante hôte d'origine. 19,86% sont retrouvés sur les tas d'arachide. *Bauhinia rufescens* et *Cassia sieberiana* reçoivent un nombre faible de bruches avec respectivement 7,28% et 4,63%. *Guiera senegalensis* et *Balanites aegyptiaca* n'abritent au total que 9,93% des bruches.

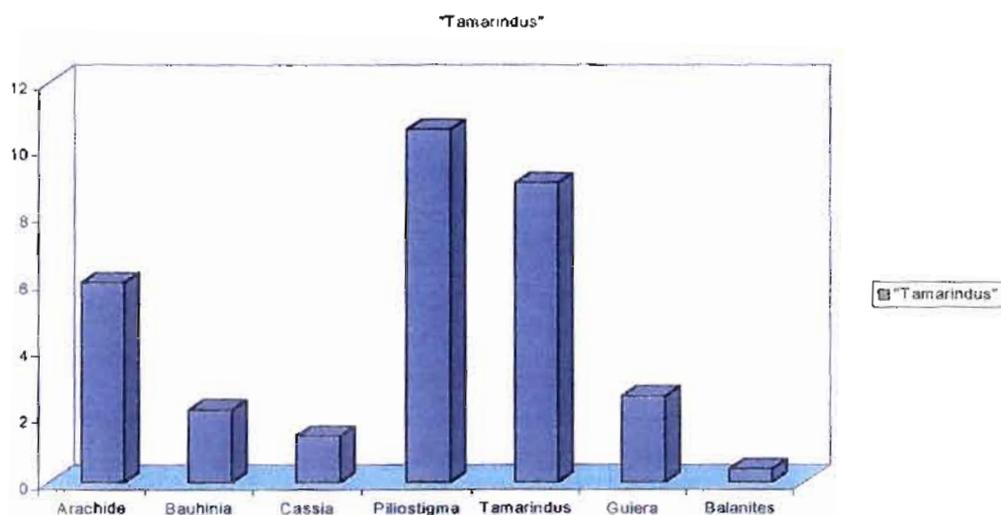


Figure 25e: répartition des bruches de la souche "Tamarindus"

### III.3. DISCUSSION

Le premier constat que l'on peut faire est que les bruches issues de *Cassia sieberiana* et celles inféodées à *Bauhinia rufescens* présentent une bonne reconnaissance et une fidélité à leur hôte bien que le temps que dure cette expérience soit particulièrement court pour nous permettre de conclure avec certitude. Mais le fait que 31,6% des bruches de la souche "Bauhinia" et 31,8% de celles de la souche "Cassia" soient capables de retrouver et de se maintenir sur leur plante hôte respective met en relief l'attractivité chimique qu'exercerait de manière spécifique chaque plante hôte sur "sa souche". On connaît le rôle central joué par la constitution chimique des végétaux (nutriments et substances allélochimiques) aussi bien dans l'évolution de la spécificité alimentaire des insectes que dans le maintien ou la variation des spectres alimentaires. Des désaccords subsistent cependant sur la place qu'il faut accorder à d'autres facteurs (ennemis naturels, écologie de la plante, contraintes génétiques entre choix du site de ponte et performance larvaire, etc.) et la manière dont la chimie des plantes et l'évolution des insectes ont pu s'influencer mutuellement. Certains auteurs considèrent la spécialisation alimentaire comme résultant de l'exploitation d'avantages sélectifs dans l'utilisation de nourriture (découverte de l'hôte et reconnaissance des partenaires sexuels facilitées, réduction du coût de l'adaptation à des composés secondaires multiples, protection contre des ennemis naturels polyphages); une autre hypothèse présente au contraire la spécialisation comme un "cul-de-sac évolutif", où aboutiraient des espèces prédisposées génétiquement à la spéciation, donc à l'isolement reproductif (Bernays & Graham, 1988).

Les souches inféodées à l'arachide, à *Piliostigma reticulatum* et *Tamarindus indica* ne sont capables d'aucune reconnaissance entre ces trois plantes hôtes mais ne migrent pratiquement vers *Cassia sieberiana* ou *Bauhinia rufescens*. Ceci fait penser que les substances attractives ou répulsives émanant de l'arachide, *P. reticulatum* et *T. indica* seraient chimiquement apparentées. Ces substances différeraient beaucoup de celles qu'on pourrait rencontrer chez *B. rufescens* et *C. sieberiana*. Des analyses biochimiques portant sur les diverses parties de chacune des plantes hôtes permettront sans doute de répondre avec certitude à cette hypothèse. Toujours est-il que toutes les méthodes de caractérisation génétique que nous avons utilisées ont montré que les *C. serratus* inféodées à *Cassia sieberiana* et celles infestant *Bauhinia rufescens* sont génétiquement très éloignées de celles inféodées aux autres plantes hôtes que sont l'arachide, *Piliostigma reticulatum* et

*Tamarindus indica*. Notons aussi que la fidélité à l'hôte peut être un phénomène continu car, bien qu'il existe des goulots d'étranglement, la persistance des hôtes de *C. serratus* est un phénomène effectif. L'arachide existe toute l'année même si c'est sous forme de graines résiduelles dans les greniers ; *B. rufescens* fructifie toute l'année et demeure un substrat de développement favorable, même durant la saison pluvieuse ; des gousses de *P. reticulatum* en pourrissement persistent dans la nature et permettent de maintenir, même si c'est à un faible niveau, la persistance de la souche ; le tamarinier présente des cultivars qui fructifient à différentes périodes de l'année ; ses graines sont aussi le résidu de plusieurs préparations culinaires et se retrouvent presque dans toutes les concessions.

D'autre part, la bruche de l'arachide paraît être un bon voilier. Ceci peut être la source d'une possible homogénéisation des flux géniques mais peut aussi favoriser, grâce à sa grande plasticité de ponte, l'attaque de nouveaux hôtes et la fondation de nouvelles colonies géographiquement distinctes. L'influence du flux génique dans l'homogénéisation des caractéristiques génétiques ou comme facteur de diversification des populations reste cependant sujette à controverses. Selon Mayr (1974) et Dobzansky (1977), un flux génique important empêche toute différenciation génétique des populations. Cependant Erlich & Raven (1969) et Endler (1973, 1979) ainsi que les partisans de la spéciation sympatrique pensent que le flux génique n'a pas un rôle important: la sélection naturelle peut maintenir une forte différenciation malgré un flux génique élevé.

D'autres barrières écologiques telles que la disponibilité de l'hôte, la différence spatio-temporelle dans l'émergence des adultes des différentes souches et les contraintes parasitaires sont en étude au laboratoire. Des hypothèses de plus en plus fortes sont aussi émises quant à la spécificité de la composition phéromonale chez des populations d'insectes se développant sur des graines appartenant à des genres différents (Rasplus et Solignac, communication personnelle). Les substances biochimiques propres à chaque type de graine rendraient spécifique l'odeur phéromonale de telle sorte qu'un mâle issu d'une plante hôte donnée ne pourrait être attiré que par une femelle issue de la même plante hôte. Ceci favoriserait évidemment les accouplements préférentiels ou "dirigés".

Quelle que soit la validité ou l'invalidité de ces hypothèses, le constat que l'on peut faire est que, comme ceux de Bush & Diehl (1982), de Hsiao (1982), de Feder *et al.* (1994)

chez *Rhagoletis pomonella* , de Emelianov *et al.* (1995), nos travaux apportent un nouvel argument en faveur de l'isolement de populations sympatriques. Cette divergence sympatrique s'est révélée dans la plupart des cas par des différences de fréquences alléliques pour des marqueurs neutres ou par l'estimation de l'héritabilité des caractères morphologiques ou comportementaux jouant un rôle dans les différences de *fitness* observées entre populations (Feder *et al.*, 1994 ; Carroll *et al.*, 1997; Sembène & Delobel, 1998).

**CHAPITRE V:**  
**SOURCES DE CONTAMINATION DE L'ARACHIDE PAR**  
***CARYEDON SERRATUS* ET MISE EN ŒUVRE DES**  
**RESULTATS GENETIQUES**

## INTRODUCTION

La connaissance précise de la dynamique de contamination permet de situer le début de l'infestation primaire et d'intervenir pour l'empêcher ou l'atténuer car le polyvoltinisme de *C. serratus* amplifie considérablement les dégâts dès lors qu'une primo-infestation s'est déjà installée.

L'objectif de cette étude est donc de déterminer d'une part, le moment précis où se produit l'infestation de l'arachide et d'autre part, d'évaluer les populations de *C. serratus* et les dégâts qu'elles occasionnent sur l'arachide en séchage au champ à partir de l'analyse au laboratoire d'échantillons de gousses prélevés en milieu paysan. Il existe une bibliographie abondante sur les méthodes de choix des différentes unités d'échantillonnage pour une étude de ce type (Drew *et al.*, 1978 ; De Lima, 1979 ). Le choix du village, des parcelles comme de la variété d'arachide ne s'est fait ni de façon aléatoire, ni de façon représentative; il a, dans une certaine mesure, été fait en fonction des objectifs que nous avons définis ("field test"). En effet, notre objectif n'était pas de faire une étude précise des pertes à l'échelle régionale. De tels chiffres seraient coûteux, longs et difficiles à obtenir, et on a de toute façon plus besoin d'informations sur des situations précises pouvant permettre une globalisation, que des moyennes régionales ou nationales. Ceci nous a conduit à fonder notre démarche sur des études de cas localisés, faisant l'objet d'un suivi périodique et régulier à partir du séchage au champ et jusqu'après 2 semaines de stockage. Ce type d'opération peut donner des renseignements suffisamment fiables sur les niveaux d'infestation et leurs causes pour servir de bases solides à des activités ultérieures visant leur réduction (Adams, 1977).

### I. SOURCES DE CONTAMINATION DE L'ARACHIDE PAR *C. SERRATUS*

Pour l'étude de la dynamique de l'infestation de l'arachide en séchage au champ, un seul village situé au coeur du bassin arachidier a été choisi. Les critères de choix des parcelles cultivées, pour la comparaison des paramètres étudiés, ont porté notamment sur la variété d'arachide cultivée, l'emplacement de la parcelle par rapport aux plantes hôtes de *Caryedon serratus*, l'existence de pratiques ou dispositifs spéciaux de stockage.

## **I.1. MATERIEL ET METHODES**

### **I.1.1. Les parcelles**

Huit (8) parcelles d'arachide (P<sub>1</sub> à P<sub>8</sub>), cultivées par des paysans du village de Keur Baka, ont été suivies depuis les semis jusqu'à la récolte. Leur superficie varie de 1 à 1,5 ha. Des Caesalpiniaceae hôtes sauvages de *C. serratus* (*Bauhinia rufescens*, *Cassia sieberiana*, *Piliostigma reticulatum* et *Tamarindus indica*), bordent ou poussent à l'intérieur des parcelles choisies. Les champs P<sub>2</sub>, P<sub>7</sub> et P<sub>8</sub> sont les plus éloignés des plantes hôtes (Fig. 26).

### **I.1.2. Les variétés d'arachide**

Dans les parcelles P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>, la variété d'arachide cultivée est la 73-33. Elle est tardive et présente une ramification alterne et un port érigé. Les gousses sont moyennes (110-160g), présentent un réseau effacé et contiennent très souvent 2 graines par gousse. Son cycle végétatif, des semis à la récolte, est d'environ 100 jours. C'est la variété la plus cultivée au Sénégal. Elle est bien adaptée aux régions de la zone sahélo-soudanienne et soudano-guinéenne. La plus grande partie de la récolte de cette variété est destinée à l'exportation.

L'arachide de bouche (GH 119-20) localement appelée "Guerté Niaye" est cultivée dans chacune des parcelles P<sub>5</sub>, P<sub>6</sub>, P<sub>7</sub> et P<sub>8</sub>. C'est une variété à ramification alterne. Les gousses (150-200g) contiennent chacune 2 graines. Elles présentent un réseau net. La ceinture et le bec sont très effacés. Son cycle végétatif est voisin de celui du type 73-33. La majeure partie des récoltes de cette variété est destinée à la consommation locale.

### **I.1.3. Echantillonnage**

Les arachides, semées en fin juin 1998, ont été récoltées entre le 17 et le 27 octobre de la même année. Les pieds déterrés ont été mis en andains deux jours après, puis laissés exposés au soleil environ 3 semaines pour ensuite être rassemblés en meules, après la période des brumes matinales. 3 semaines plus tard, ce sera successivement le battage, l'égoussage et le stockage en sacs (fin novembre). Les arachides mises dans des sacs en polypropylène tressé sont entassées dans des greniers. Seules les arachides des parcelles 4 et 5 ont été stockées en vrac dans des greniers faits de paille de mil.

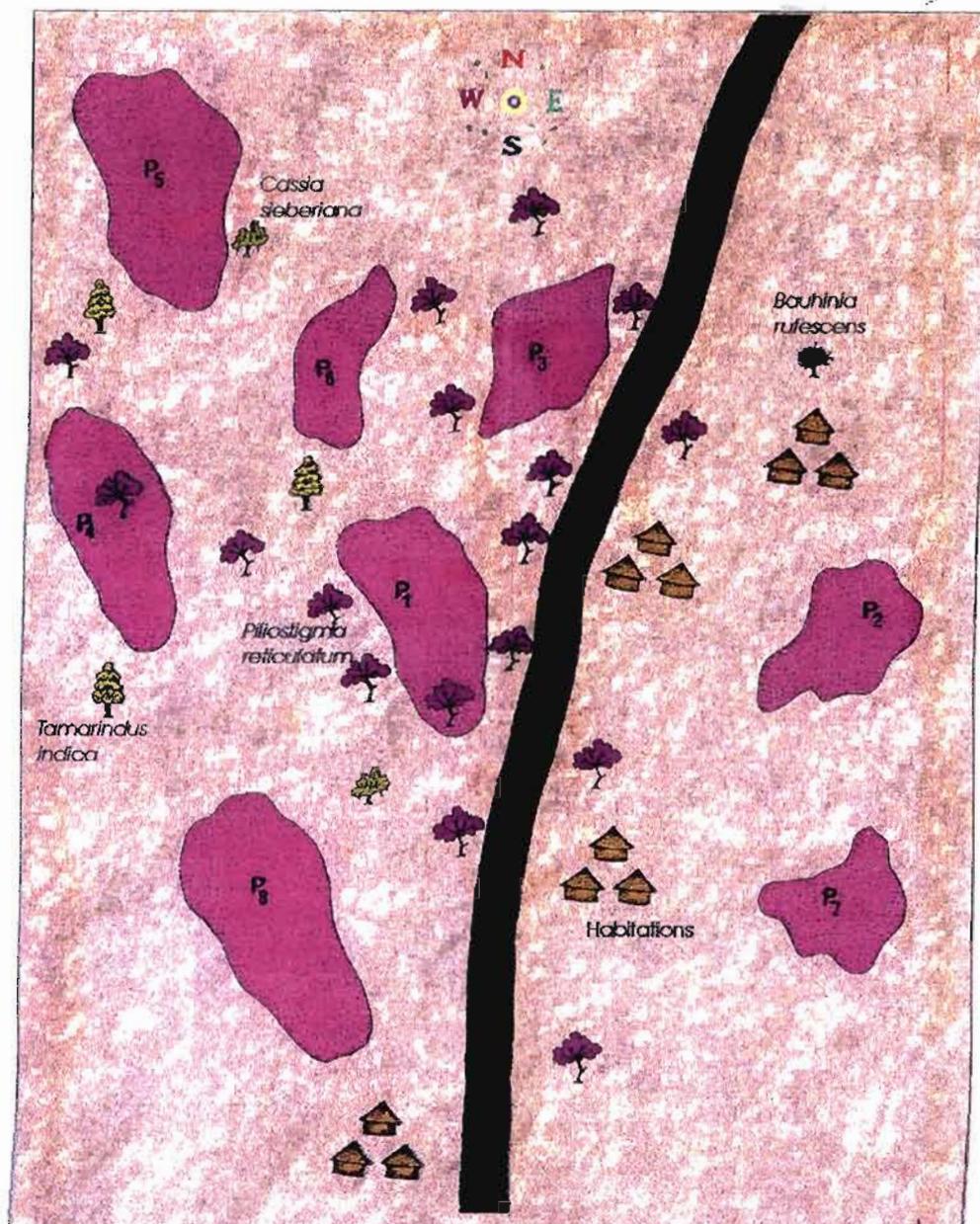


Figure 26: Position des parcelles (P) et des plantes hôtes naturelles de *C. serratus*.  
L'échelle entre les différents éléments n'est pas respectée.

Des prélèvements de gousses ont été faits à chaque étape des itinéraires techniques précités. Quatre jours après le déterrage, un échantillon de quatre kilogrammes d'arachides (environ 1000 gousses) a été prélevé sur chaque parcelle. Ces prélèvements sont répétés une fois par semaine au champ jusqu'à 35 jours après la récolte et ensuite dans les sacs en polypropylène tressé et dans les greniers.

Les gousses sont ramenées au laboratoire dans des sacs en polypropylène tressé neufs et étanches et sont conservées dans une pièce aérée du laboratoire dont la température ambiante suit les fluctuations de la température extérieure. Chaque échantillon est gardé pendant au moins 2 mois pour contrôler le niveau d'infestation par *C. serratus*. La teneur en eau des gousses de chaque échantillon est déterminée au début et à la fin de l'expérience.

Nous avons évité un prélèvement d'un nombre trop important de gousses, de façon à ne pas modifier la dynamique des populations de *C. serratus*.

#### **II.1.4. Paramètres analysés**

Nous avons d'abord examiné à partir de quel niveau minimum d'infestation au champ la contamination va s'installer et se poursuivre en stocks. Ensuite nous avons précisé l'influence de l'infestation primaire sur l'évolution de la contamination au champ, sans possibilité de réinfestation d'origine extérieure ou de sortie des adultes et des larves de quatrième stade ( $L_4$ ) de ces échantillons. Dans ces conditions, la contamination de chaque échantillon ne dépendra que de l'infestation initiale au champ et des générations ultérieures qui réinfesteront leur propre stock.

L'évolution de divers indicateurs des dégâts a été mesurée par analyse graphique:

- Le pourcentage d'oeufs présents sur chaque échantillon (fraîchement déposés, éclos, stériles ou morts).

- Le nombre de gousses infestées, c'est-à-dire présentant des oeufs et/ou des trous d'émergence d'adultes ou de larves de *C. serratus*.

- Le nombre d'adultes émergés des gousses (les nymphes sont dénombrées comme étant des adultes).

- Le taux de mortalité (embryonnaire et larvaire) est défini comme étant le rapport entre la différence du nombre total d'oeufs moins le nombre d'adultes émergés et le nombre d'oeufs total pour chaque échantillon.

- Le pourcentage de perte pondérale (PP). Les pertes en poids sont quantifiées uniquement sur les échantillons prélevés au dernier jour de séchage (35<sup>ème</sup> jour) et conservés pendant deux mois au laboratoire. Ceci pour déterminer la perte quantitative de l'arachide ayant seulement subi l'infestation initiale qui se produit au champ. Les pertes sont estimées de la manière suivante:  $PP = (P_i - P_f / P_i) \times 100$ , où  $P_i$  est le poids sec initial de l'échantillon ;  $P_f$ , le poids sec final du même échantillon.

Le test de Newman-Keuls est utilisé pour comparer l'évolution de l'infestation entre variétés. Dans les graphiques, les valeurs suivies d'une même lettre alphabétique sont statistiquement égales. Le test exact de Fisher nous a permis de comparer l'évolution de certains paramètres entre les parcelles.

## **I.2. RESULTATS**

Les premières attaques de larves de *C. serratus* sont observées dès le 4<sup>ème</sup> jour après la récolte. L'évolution du nombre d'oeufs déposés sur les gousses (Fig. 27 et 29) révèle que la ponte se poursuit tant qu'il y a des gousses disponibles et augmente en fonction de la durée de séchage. Les niveaux d'infestation initiaux sont faibles dans les deux variétés: 8,5 oeufs déposés chez la variété 73-33 et 5 chez la variété GH 119-20 pour 1000 gousses environ. Aucun oeuf n'est observé après 7 jours de séchage dans les parcelles 2 et 5, mais les niveaux d'infestation relevés à l'échantillonnage suivant, qui sont du même ordre de grandeur que ceux observés dans les autres parcelles, indiquent que les gousses des parcelles 2 et 5 étaient probablement déjà atteintes.

Les courbes d'évolution du nombre de gousses infestées (Fig. 27 et 29) et du nombre d'adultes émergés (Fig. 28 et 30) présentent la même tendance que celles du nombre

d'oeufs déposés au niveau de chacune des deux variétés. La teneur en eau des gousses s'étant stabilisée dès le 7<sup>ème</sup> jour à environ 4% H.R., l'accroissement du nombre de gousses infestées et du nombre d'adultes émergés est sûrement lié au temps de séchage.

Le taux de gousses infestées dans l'arachide stockée en vrac est de 74,5% (parcelles P<sub>4</sub> et P<sub>5</sub>). Il se révèle plus élevé que celui observé dans l'arachide stockée dans des sacs en polypropylène tressé (33,5%) à  $p < 0,01$ .

Le taux de mortalité embryonnaire et larvaire est en moyenne de 70% 7 jours après la récolte mais diminue rapidement en fonction du temps de séchage (Fig. 26 et 28).

Les tests comparatifs de l'infestation des deux variétés (Fig. 29) montrent que les niveaux d'infestation sont pratiquement identiques chez la variété 73-33 et la variété GH 119-20 ; aucune différence statistiquement significative n'est observée ( $P > 0,05$ ) sauf au niveau du taux de mortalité 7 jours après la récolte ( $p < 0,01$ ) période pendant lequel le taux de mortalité larvaire est plus élevé au niveau de la variété GH 119-20.

Il faut aussi noter que les parcelles les plus éloignées des plantes hôtes sauvages (P<sub>2</sub>, P<sub>7</sub> et P<sub>8</sub>) présentent les plus faibles taux d'infestation.

Les pourcentages de perte en poids des échantillons prélevés au dernier jour de séchage et conservés 2 mois au laboratoire sont de 0,19% chez la variété 73-33 et de 0,21% chez la variété GH 119-20 en deux mois de stockage. Dans chacune des variétés, il existe une forte corrélation entre la perte en poids et le nombre de *C. serratus* émergés pendant la même période.

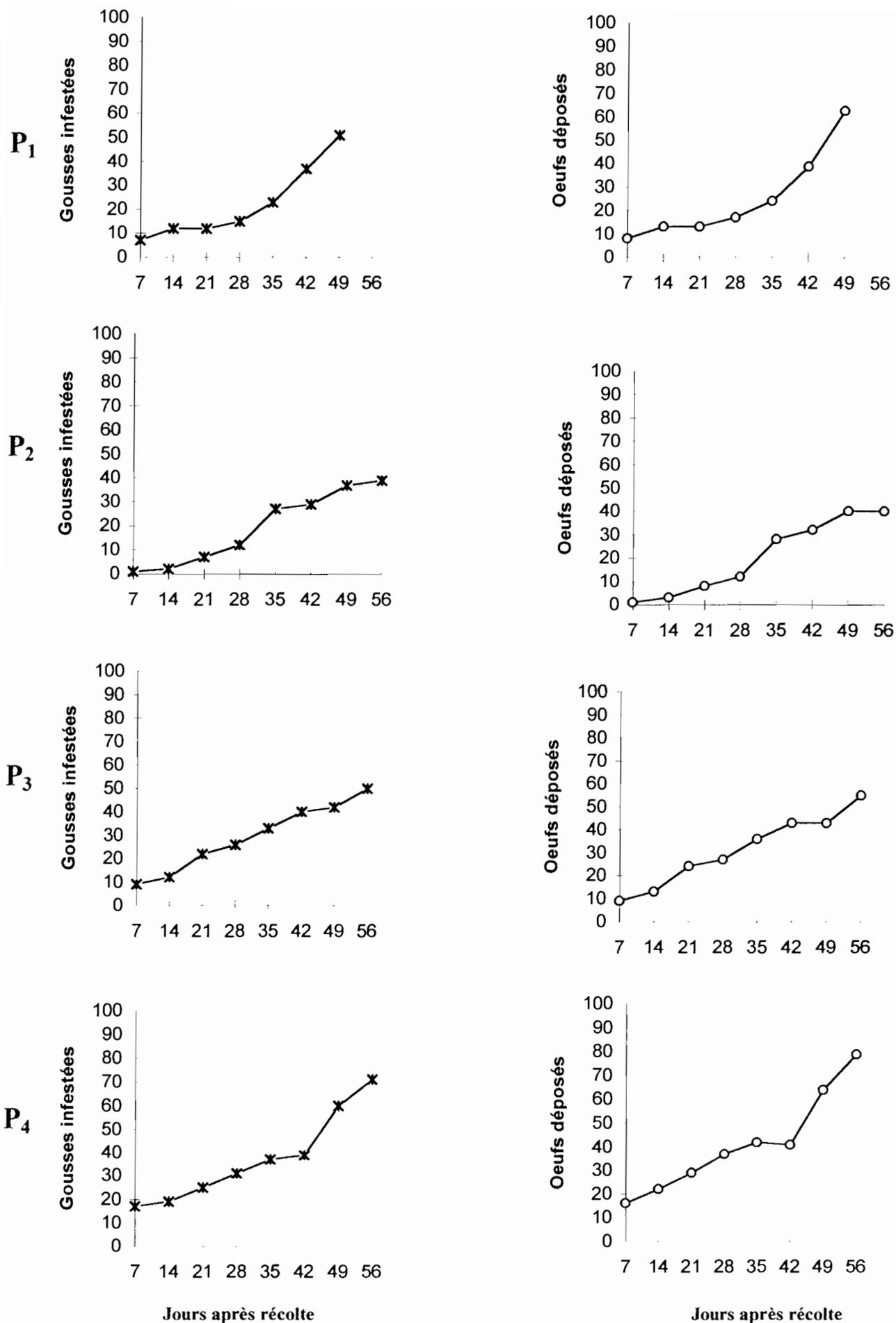


Figure 27 : évolution du nombre de gousses infestées (colonne de gauche) et du nombre d'œufs déposés sur les gousses (colonne de droite) par *C. serratus* au cours de l'infestation de la variété d'arachide 73-33 dans les parcelles P<sub>1</sub> à P<sub>4</sub>.

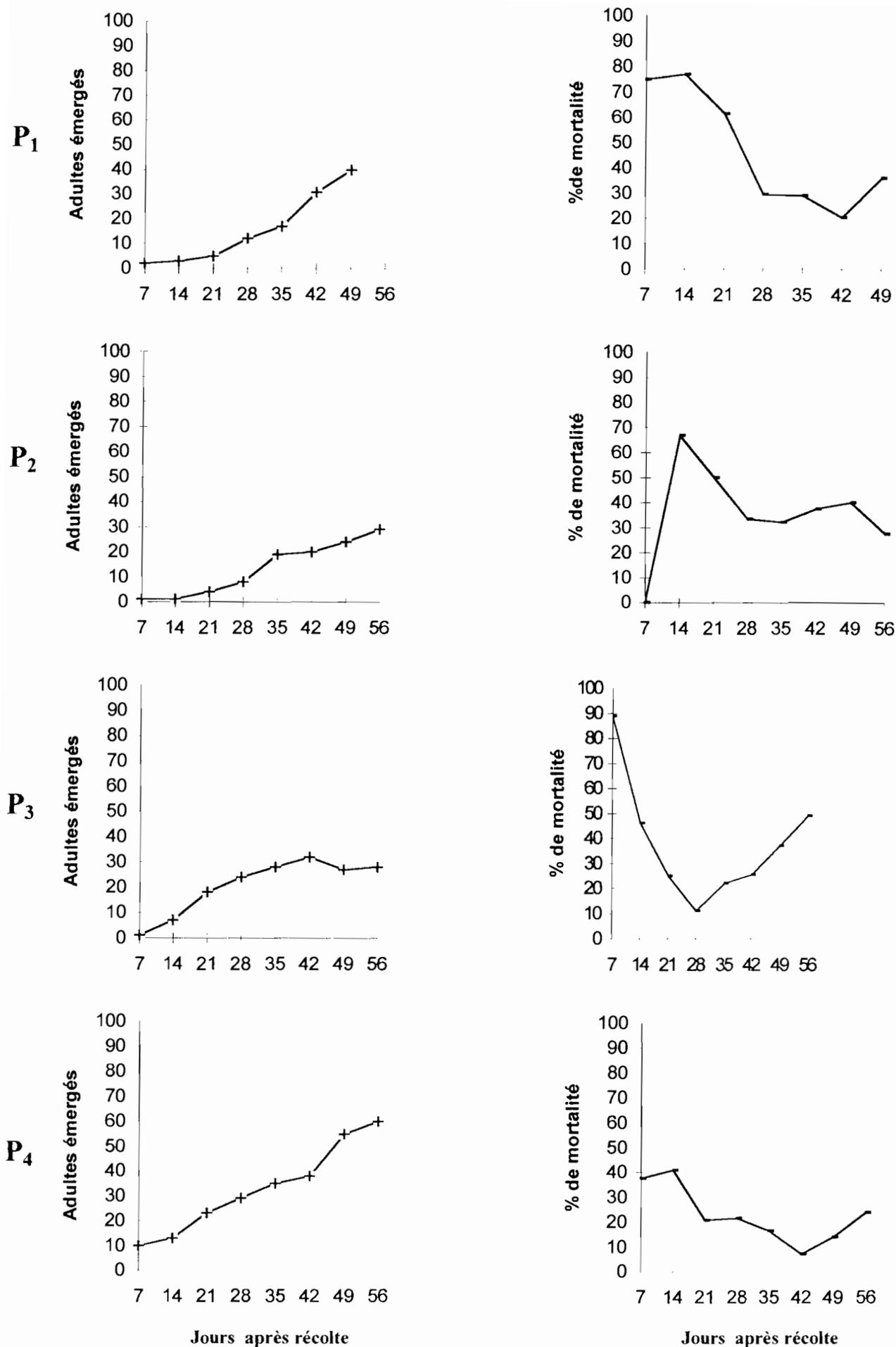


Figure 28 : évolution du nombre d'adultes émergés (colonne de gauche) et du taux de mortalité (colonne de droite) de *C. serratus* au cours de l'infestation de la variété d'arachide 73-33 dans les parcelles P<sub>1</sub> à P<sub>4</sub>.

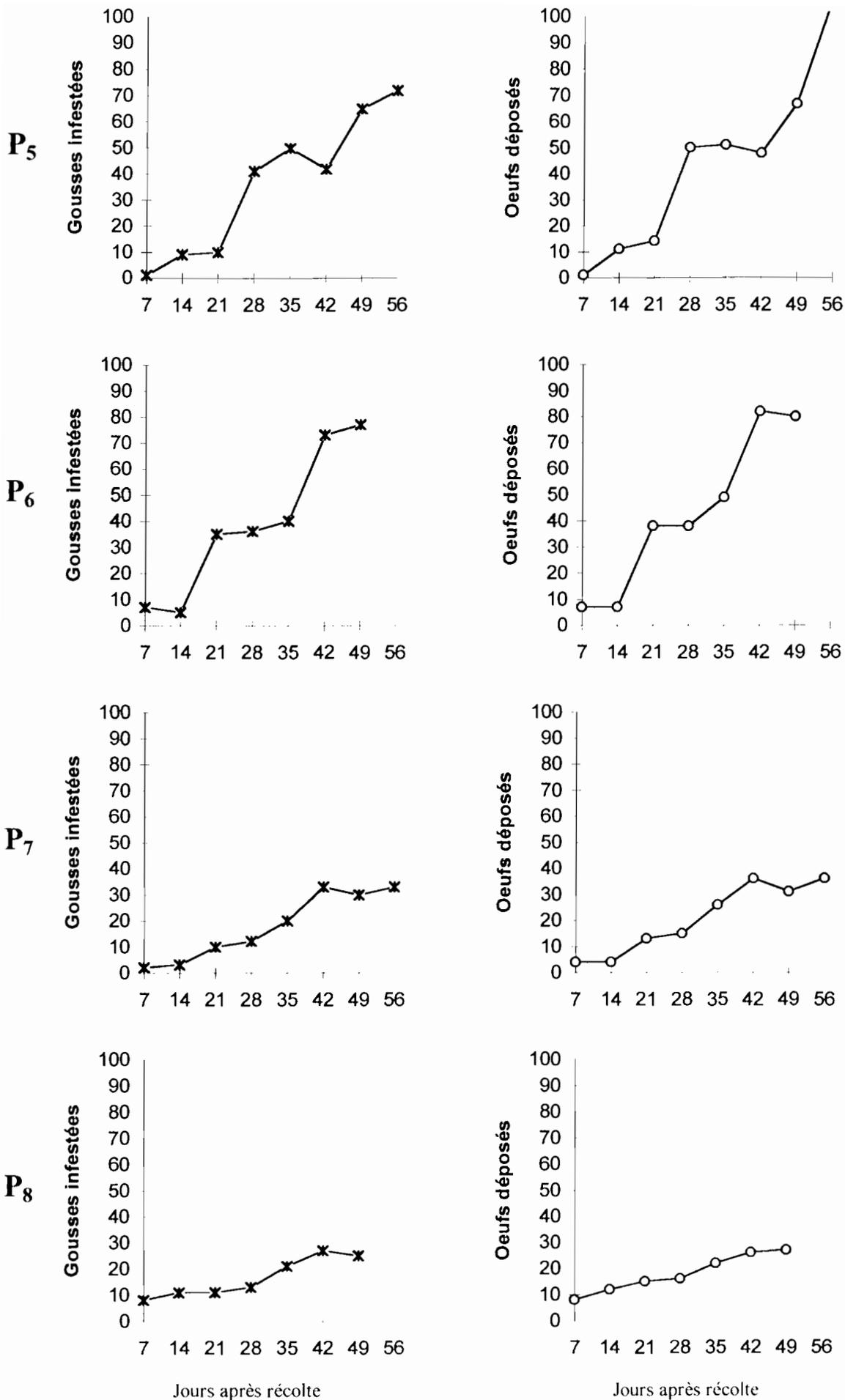


Figure 29 : évolution du nombre de gousses infestées (colonne de gauche) et du nombre d'oeufs déposés sur les gousses (colonne de droite) par *C. serratus* au cours de l'infestation de la variété d'arachide GH 119-20 dans les parcelles P<sub>5</sub> à P<sub>8</sub>.

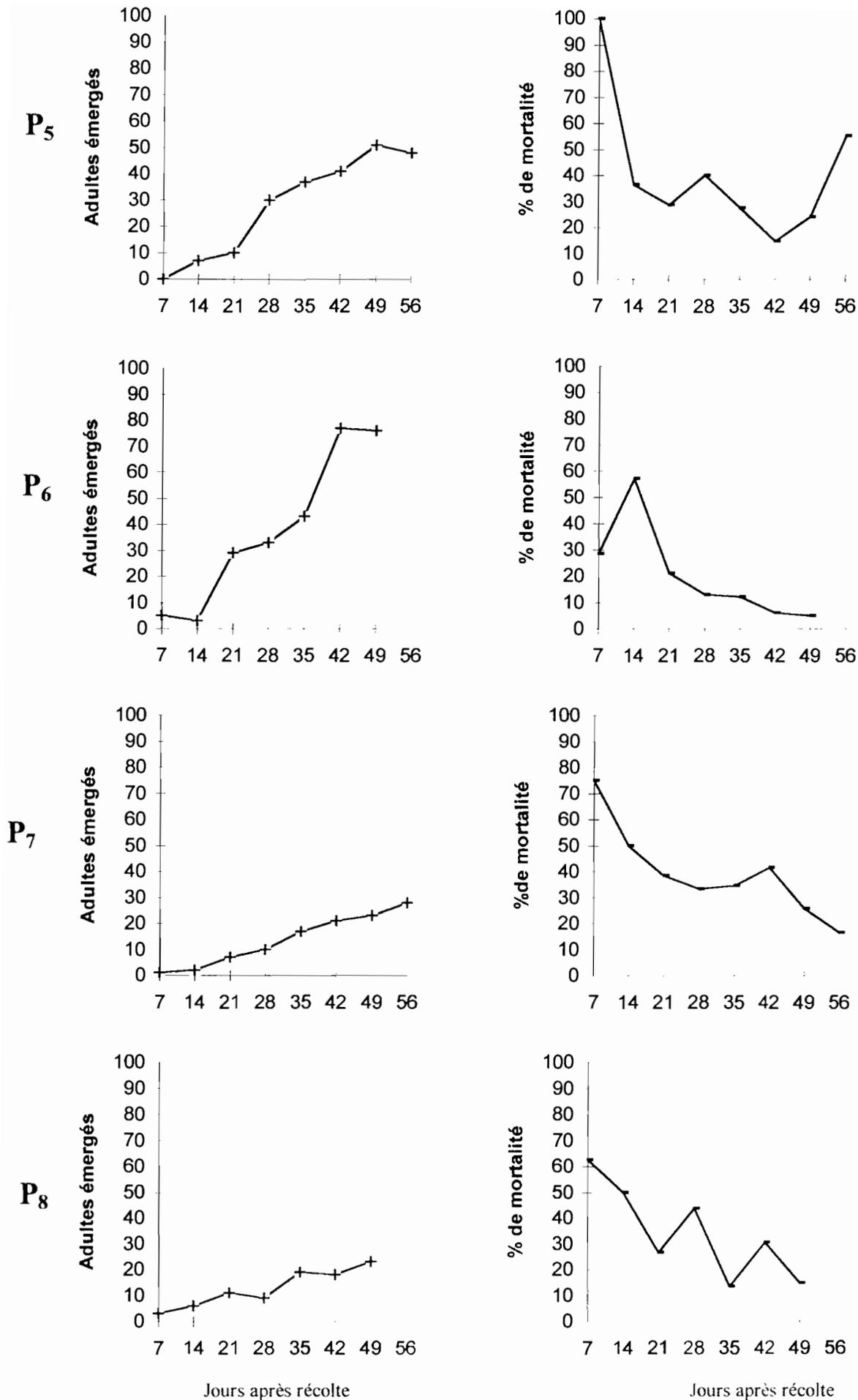


Figure 30 : évolution du nombre d'adultes émergés (colonne de gauche) et du taux de mortalité (colonne de droite) de *C. serratus* au cours de l'infestation de la variété d'arachide GH 119-20 dans les parcelles P<sub>5</sub> à P<sub>8</sub>.

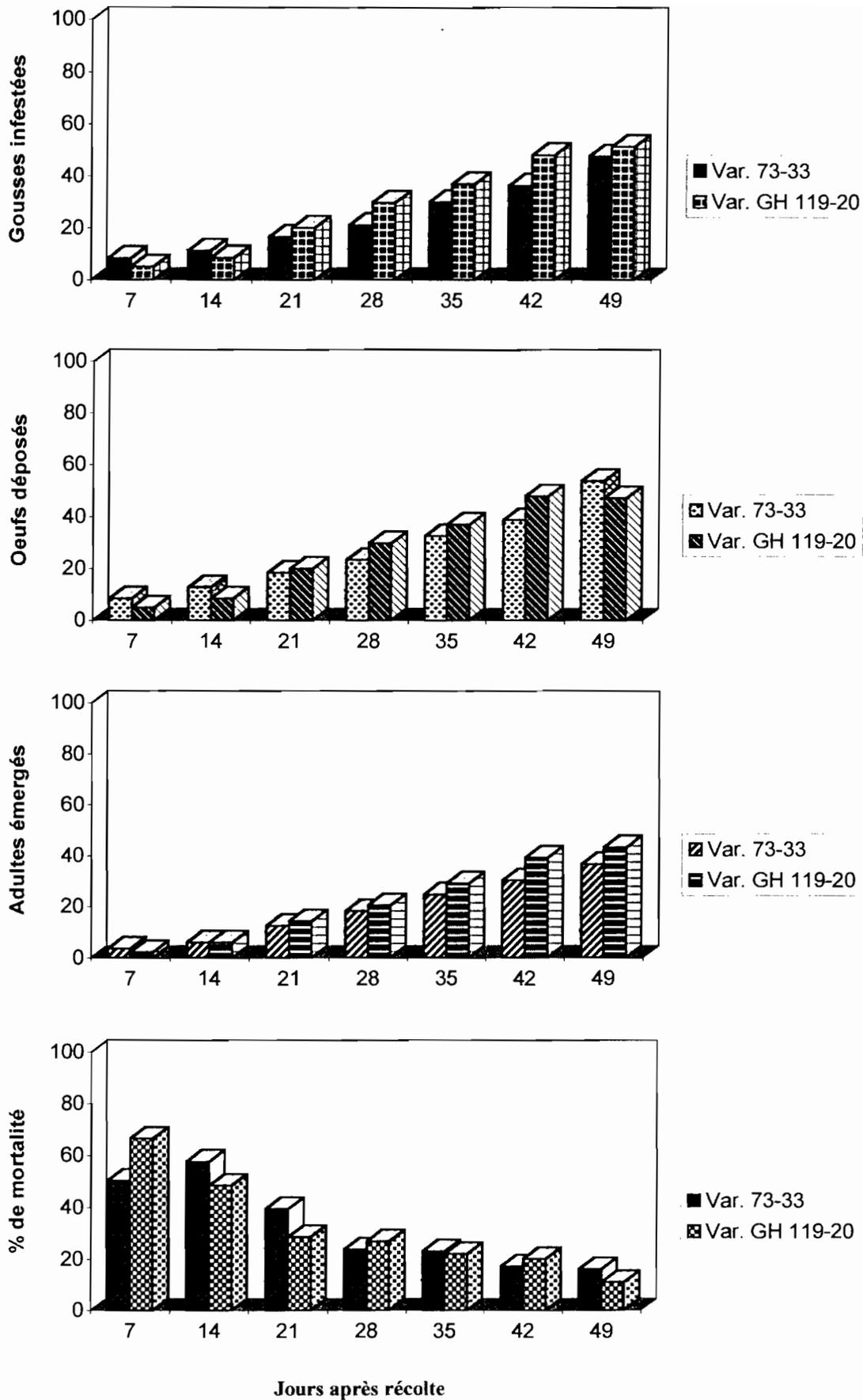


Figure 31 : évolution de l'infestation des deux variétés d'arachide (73-33 et GH 119-20) par *C. serratus* au bout de 7 semaines de séchage : nombre de gousses infestées sur 1500 gousses ; nombre d'oeufs déposés sur les gousses ; nombre d'adultes émergés de gousses infestées ; pourcentage de mortalité totale de *C. serratus*.

### I.3. DISCUSSION

Certains auteurs comme Conway (1975 et 1983), Matokot *et al.* (1987) et Ali-Diallo (1991) estiment que la connaissance de la dynamique de l'infestation des stocks d'arachide par *C. serratus* devrait conditionner la mise au point d'une stratégie de lutte contre cet insecte. Or, cette question essentielle reçoit, selon les auteurs des réponses divergentes.

Pour Appert (1954) au Sénégal et Green (1959) en Gambie, les hôtes sauvages jouent un rôle insignifiant, les infestations s'effectuant une fois la récolte rentrée, à partir des graines bruchées subsistant dans les greniers.

Sagot & Bouffil (1935) et Corby (1941) au Nigéria, Conway (1983) en Gambie et Ndiaye (1991) au Sénégal, voient dans les mêmes plantes hôtes sauvages l'origine de l'infestation. Conway indique le rôle possible de petits effectifs de gousses résiduelles des plantes voisines des champs, après la saison des pluies, dans la contamination des arachides, et pense que la diminution des effectifs de *C. serratus* dans les hôtes primaires (*Piliostigma thonningii*, *Tamarindus indica*, *Cassia sieberiana*), au moment des récoltes d'arachide en octobre-novembre, pourrait constituer un moyen d'atténuation ou d'élimination des infestations au champ. A l'appui de cette hypothèse, Robert (1984) note que le degré d'infestation des meules d'arachide est liée à leur proximité des plantes hôtes naturelles et qu'il suffirait d'éloigner au maximum les meules de ces plantes pour diminuer l'infestation initiale au champ. Nos résultats révèlent, certes, que la proximité des plantes hôtes de l'arachide en séchage semble augmenter les niveaux d'infestation puisque les parcelles 2, 7 et 8 (les plus éloignées des plantes hôtes) présentent les plus faibles taux d'infestation, mais il nous semble hâtif, en l'absence de données précises sur les capacités migratoires de la bruche de l'arachide, de tirer la même conclusion que Robert. De plus, pour cet auteur, les premières infestations pourraient se produire dans les cultures en place, sur les quelques gousses qui affleurent au niveau sol. Ce phénomène a été déjà constaté chez un autre bruchidae: *Callosobruchus subinnotus*, qui s'attaque à une Fabaceae à graines hypogées: *Voandzeia* sp. (Decelle, 1981). Ceci reste à préciser chez *Caryedon serratus* qui ne peut pas se développer dans des gousses ayant une teneur en eau supérieure à 40% comme c'est le cas des gousses d'arachide en fin de maturation (Ndiaye, 1991 ; Sembène, 1997).

Nos résultats révèlent plutôt que les premières infestations se produisent lors du séchage, avant la rentrée des récoltes dans les greniers. Celles-ci, quoique faibles, se poursuivent dans les greniers et peuvent être à l'origine d'importantes pertes quantitatives à cause du caractère polyvoltin de la bruche.

Il est intéressant de noter que le stockage des gousses d'arachide dans des sacs de polypropylène tressé semble offrir une meilleure protection des récoltes que celui fait en vrac dans les greniers. En effet le pourcentage de gousses infestées, pendant une semaine de stockage de l'arachide conservée en vrac (74,5%), est plus de deux fois supérieur à celui de l'arachide mise en sacs (33,5%). Dans un stockage de type semi-étanche (sacs en polypropylène tressé), la composition de l'atmosphère interstitielle est modifiée par la respiration des graines elles-même mais aussi et surtout par celle des insectes et des moisissures qui peuvent se développer sur elles en fonction de la teneur en eau et de la température. On aboutit à un autoconfinement dû à une raréfaction de l'oxygène et à une augmentation de la teneur en dioxyde de carbone, telles que les insectes présents ne peuvent survivre et les moisissures se développer. L'évaluation d'un tel "système amélioré de conservation" dans des conditions tropicales simulées au laboratoire a donné des résultats encourageants pour le riz paddy (Haryadi, 1987) en montrant notamment que les prélèvements de grains ne nuisent pas à l'anaérobiose partielle. De telles pratiques seraient certainement très concluantes surtout si les sacs étaient pleinement remplis d'arachide et hermétiquement fermés, accélérant ainsi le confinement et rendant en même temps difficile les déplacements et la rencontre des bruches; l'infestation peut ainsi disparaître à la première génération d'insectes (Matokot *et al.*, 1987).

## **II. MISE EN ŒUVRE DES RESULTATS GENETIQUES**

### **II.1. MATERIEL ET METHODES**

#### **II.1.1. Zone d'étude**

Six villages distants d'au moins 10 km les uns les autres ont été choisis pour cette étude: Keur Baka, Koné Peulh, Koné Sérère, Mboss, Thiawandou et Mbane. Ils sont tous situés dans la commune de Ndoffane (Département de Kaolack), au coeur du bassin arachidier.

Ce milieu se trouve dans le domaine soudano-sahélien. Les caractéristiques des sols et du climat de même que la pluviométrie sont les mêmes que celles décrites à Thiawandou (chapitre précédent).

### II.1.2. Expérimentations

Dans les villages choisis, les semis ont eu lieu au début du mois de juillet 1999. La variété d'arachide cultivée dans toutes les parcelles choisies est la 73-33. Les gousses d'arachide sont déterrées à maturité dès la fin des pluies (octobre ou novembre), et la teneur en eau des gousses est alors élevée, de l'ordre de 40 à 50%. Le mode de stockage est le même dans tous les villages choisis. Les gousses d'arachide sont mises dans des sacs en jute ou polypropylène tressé, entreposés les uns sur les autres dans un coin de la maison ou dans des greniers faits de paille de mil.

Quatre parcelles (champs) cultivées par des paysans ont été choisies dans chaque village. Tous ces villages sont touchés par la bruche de l'arachide. Des études menées de 1995 à 1998 ont montré que les pertes quantitatives pouvaient aller jusqu'à 78% pour une durée de stockage de 3 mois (Sembène, 1997). Les parcelles d'arachide ont été suivies des semis à la récolte. Leur superficie varie de 1 à 1,5 ha. Des Caesalpiniaceae hôtes sauvages de *Caryedon serratus* (*Bauhinia rufescens*, *Cassia sieberiana*, *Piliostigma reticulatum* et *Tamarindus indica*), bordent ou poussent à l'intérieur des parcelles choisies.

Les expériences ont eu lieu entre le 07 et le 18 octobre 1999. Sauf *Bauhinia rufescens*, aucune des plantes hôtes de *C. serratus* ne portait des gousses mûres à cette période. Dans certains villages (voir plus loin), les greniers sont traités à l'aide de deux insecticides 5 jours avant les récoltes : il s'agit du Pirimiphos-méthyl (Actellic) et du Malathion.

Le Pirimiphos-méthyl est un organophosphoré de faible toxicité pour les mammifères. Il est utilisé pour la lutte contre une très grande diversité d'insectes nuisibles qu'il supprime par son action de contact, d'ingestion et de vapeur. Il peut être appliqué directement aux murs, planchers et plafonds des magasins, aux sacs de toiles contenant des produits stockés ou mélangé aux récoltes stockées en vrac (Durand, 1983).

Le Malathion est aussi un organophosphoré. Il s'hydrolyse rapidement à pH neutre. Il est rangé dans le groupe des pesticides non toxiques pour l'homme. Son indice de sélectivité (50) est bas (Durand, 1983).

Les deux pesticides sont utilisés à raison de 150 ml de solution émulsifiable dans 20 litres d'eau. Le traitement des greniers est effectué à l'aide d'un pulvérisateur à dos à pression entrenue à raison de 10 litres de produit par grenier. Les toitures de chaume, les murs, les poutres, les claies, les étagères et les sacs contenant habituellement l'arachide en stocks, sont traités.

Les gousses en décomposition des plantes hôtes sauvages ont été ramassées et brûlées dans certaines localités. Les traitements effectués dans les villages sont résumés dans le tableau 13.

Tableau 13: traitements au niveau des villages ; les cellules grisées indiquent les types de traitement effectués.

	Mboss	Koné Peulh	Keur Baka	Thiawandou	Koné Sérère	Mbane
Greniers traités à l'insecticide						
Ramassage des gousses de <i>P. reticulatum</i> seulement						
Ramassage des gousses des autres plantes hôtes de <i>C. serratus</i>						

Dans chaque village, nous avons prélevé durant le séchage en moyettes, un échantillon d'environ 1000 gousses dans chacune des quatres parcelles choisies. Nous avons évité un prélèvement d'un nombre trop important de gousses, de façon à ne pas modifier la dynamique des populations de *C. serratus*. Les gousses sont ramenées au laboratoire dans des sacs en polypropylène tressé neufs et étanches. Une fois au laboratoire, elles sont mises dans des bocaux en verre fermés par un couvercle grillagé et sont conservées dans une pièce aérée dont la température ambiante suit les fluctuations de la température extérieure. Chaque échantillon est gardé pendant au moins 2 mois pour contrôler le niveau d'infestation par *C. serratus*. La teneur en eau des gousses de chaque échantillon est déterminée au début et à la fin de l'expérience.

### II.1.3. Paramètres analysés

Comme précédemment dit, les divers indicateurs des dégâts suivants ont été mesurés deux mois après l'échantillonnage.

- Le nombre moyen d'oeufs (éclos, stériles ou morts) présents sur chaque échantillon de 1000 gousses.
- Le pourcentage de gousses infestées, c'est-à-dire présentant des oeufs et/ou des trous d'émergence d'adultes ou de larves de *C. serratus*.
- Le nombre d'adultes émergés de 1000 gousses. Les nymphes sont dénombrées comme étant des adultes.
- Le pourcentage de perte pondérale (PP). Les pertes sont estimées de la manière suivante:  $PP = ((P_i - P_f) / P_i) \times 100$ , où  $P_i$  est le poids sec initial de l'échantillon;  $P_f$ , le poids sec final du même échantillon.

Le test de Newman-Keuls et le test exact de Fisher sont utilisés pour comparer les différents paramètres entre villages. La différence des valeurs par rapport à 0 est aussi calculée par le test exact de Fischer. Dans les graphiques, les valeurs suivies d'une même lettre alphabétique ne diffèrent pas significativement entre elles.

## II.2. RESULTATS

Les premières attaques par des larves de *C. serratus* sont observées dès le 5<sup>ème</sup> jour après la récolte sauf à Koné sérère où elles ont été observées au 7<sup>ème</sup> jour après la récolte. Les niveaux d'infestation initiaux sont faibles dans tous les villages (Tableau 14).

Tableau 14: différents niveaux d'infestation dans les six villages deux mois après récolte

	Mboss	Koné Peulh	Keur Baka	Thiawandou	Koné sérère	Mbane
<b>Nbre moyen d'œufs</b>	3,25	5	1	6	0,5	6,5
Pour 1000 gousses						
<b>% de gousses infestées</b>	2,25	4,5	0,5	5,5	0,5	4,5
<b>Nbre d'adultes émergés</b>	2	3	0	4,5	0	5
Pour 1000 gousses						
<b>% de perte en poids</b>	0,12	0,19	0,04	0,25	0,02	0,24

Les tests comparatifs de l'infestation entre villages révèlent des différences significatives de niveaux d'infestation (Fig. 32).

Lorsque les gousses de toutes les plantes hôtes sont ramassées sans que les greniers ne soient traités à l'insecticide (à Koné Peulh), l'infestation de l'arachide nouvellement récoltée s'installe. Le même résultat est obtenu lorsque les gousses de *P. reticulatum* sont les seules à être ramassées comme à Mboss. Les taux d'infestation obtenus sont cependant significativement plus faibles que ceux obtenus en condition naturelle c'est-à-dire lorsqu'aucun traitement n'est appliqué comme à Mbane ( $p < 0,01$ ).

De même lorsqu'on traite à l'insecticide les greniers et qu'on laisse sur place les gousses en pourrissement de *P. reticulatum* comme à Thiawandou, la contamination de l'arachide persiste et n'est pas significativement différente de qu'on observe à Mbane.

Dans les villages de Keur Baka et de Koné Sérère où les gousses de *P. reticulatum* sont ramassées et les greniers traités, l'infestation de l'arachide nouvellement récoltée n'est pas statistiquement différente de 0 ( $p > 0,05$ ).

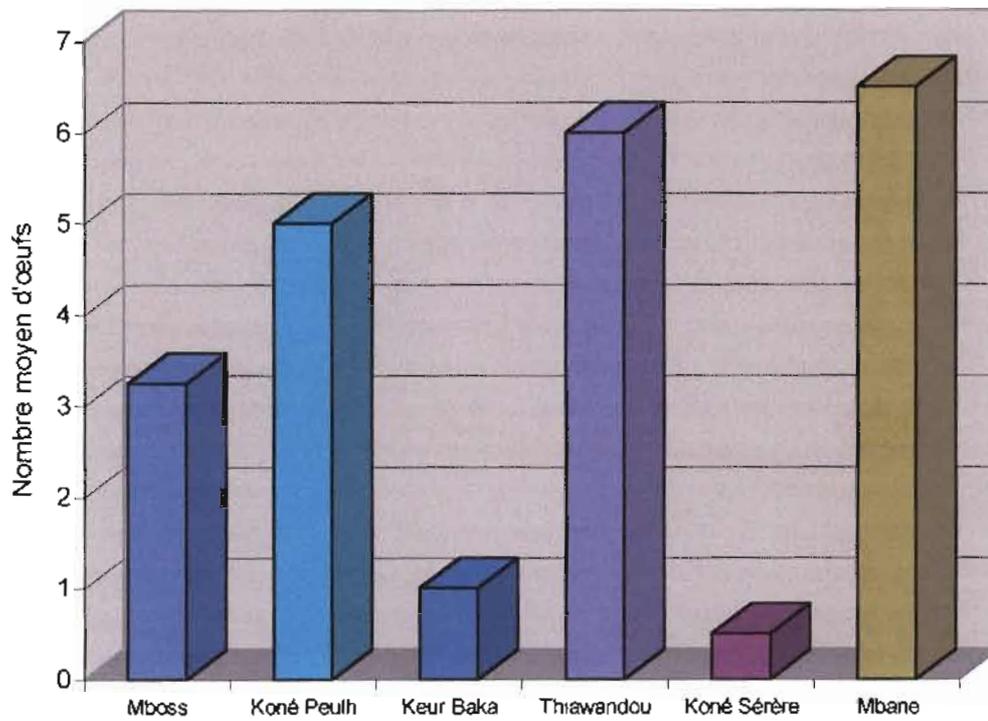


Figure 32 a : nombre moyen d'œufs pour 1000 gousses

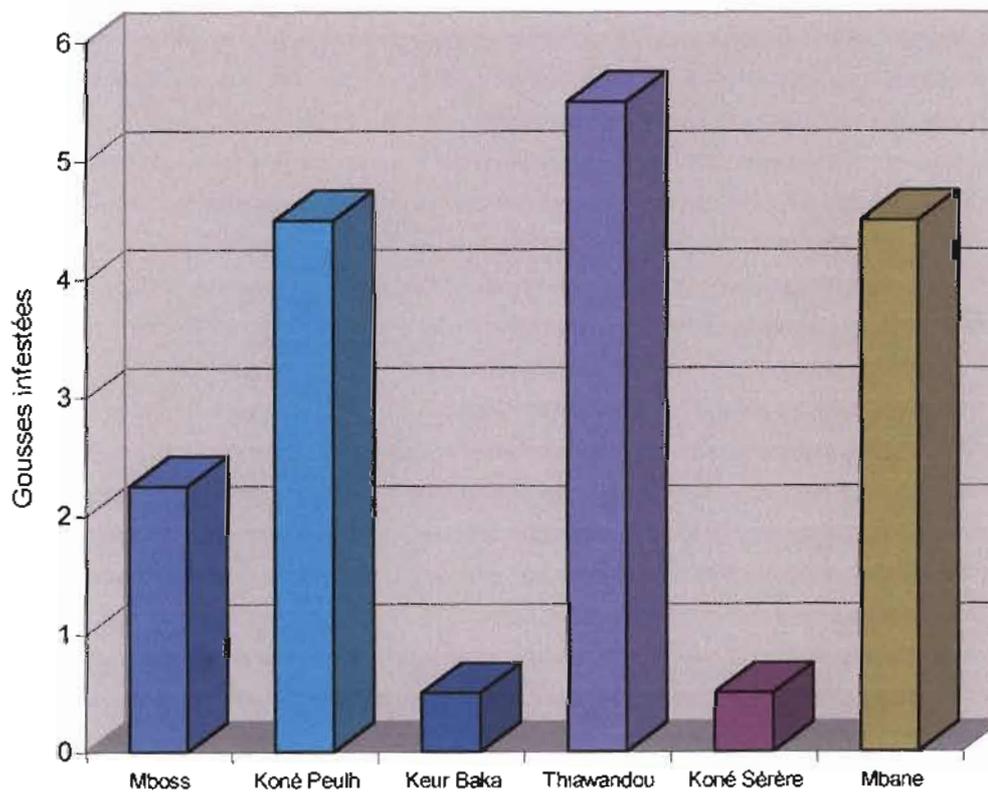


Figure 32b : pourcentage moyen de gousses infestées

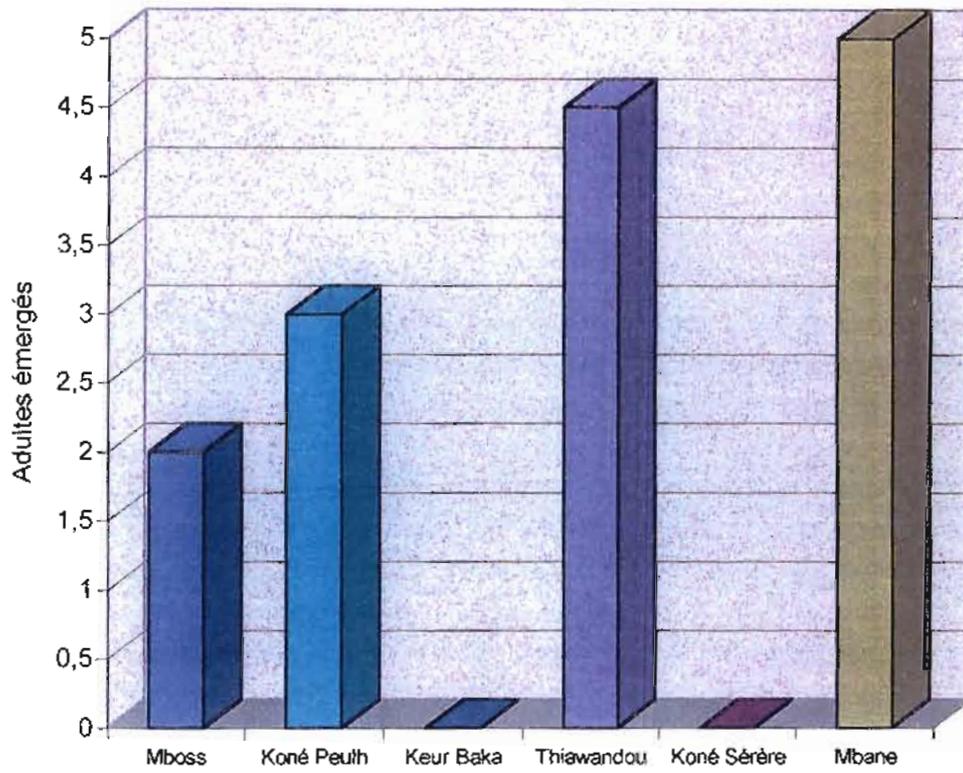


Figure 32 c : nombre moyen d'adultes émergés de 1000 gousses

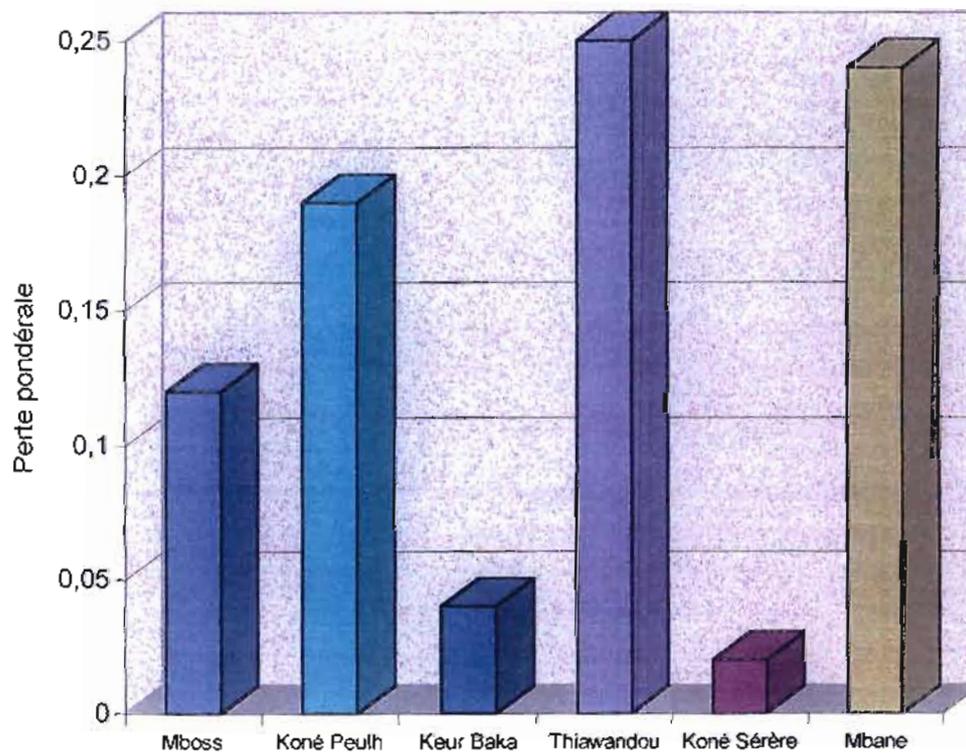


Figure 32d : pourcentage de perte en poids

### II.3. DISCUSSION

Les résultats obtenus confirment en plusieurs points les résultats de laboratoire et apportent, après cinq ans d'expérimentations de terrain et de laboratoire, une réponse claire à la question quant à l'origine de l'infestation de l'arachide. Les premières infestations se produisent lors du séchage, avant la rentrée des récoltes dans les greniers. Les bruches qui proviennent des greniers, et celles qui proviennent des rares gousses en décomposition de *P. reticulatum* infestent les arachides, premières gousses disponibles dans la nature et pouvant permettre à *C. serratus* de se développer. Ce constat confirme les résultats obtenus au laboratoire après caractérisation génétique des différentes souches de la bruche de l'arachide. Les infestations constatées, quoique faibles, se poursuivent dans les greniers et peuvent être à l'origine d'importantes pertes quantitatives à cause du caractère polyvoltin de la bruche. Notons aussi que ces résultats viennent confirmer en grande partie ceux obtenus lors d'une prospection géographique allant du nord au sud du Sénégal (Sembène, 1997). Les résultats de cette prospection sont rappelés dans le tableau 15.

Tableau 15: perte en poids de l'arachide après cinq mois de stockage.

Présence de plantes hôtes de *C. serratus* \* = valeur indéterminée

Villages	Plantes hôtes de <i>C. serratus</i>					% de perte en poids de l'arachide
	Arachide	<i>B. rufescens</i>	<i>C. sieberiana</i>	<i>P. reticulatum</i>	<i>T. indica</i>	
Gnit						0
Diohor						0
Golum						0
Yamane						0
Ndimbou						0
Médina Ngewel						*
Maka Touré						22,1
Nguer Malal						27,4
Thioumadé						32,8
Niomré						15,3
Louga						86,4
Ourack						73,7
Koki						69,8
Thiamène						19,4
Boulal						0,8
Dahra						0,4
Some						0
Warkhoh						0
Linguère						36,4
Niack						52,3

Dans les zones où *Piliostigma reticulatum* est abondant et productif de gousses (de Maka Touré à Thiamène et de Linguère à Niack), l'infestation de l'arachide par *C. serratus* se produit dès le début du séchage. Les niveaux de perte en poids sec de l'arachide sont élevés et varient de 15,3% à Niomré à 86,4% à Louga ; les premiers adultes sont déjà visibles dans les meules ou au moment du battage. L'infestation de l'arachide se révèle quasi nulle dans les localités où *Piliostigma reticulatum* est absent (de Gnit à Médina Ndimbou et de Boulal à Warkhoh). La perte en poids sec de l'arachide, après cinq mois de stockage, varie de 0 à 0,8% dans ces zones. Or, dans ces endroits, d'autres plantes hôtes sauvages de *C. serratus* (*B. rufescens* et *T. indica*) sont présentes avec un taux d'infestation de 2 à 3 *C. serratus* par gousse. Les bruches inféodées à ces hôtes semblent maintenir leur cycle biologique sur leur plante hôte naturelle, n'infestant pratiquement pas l'arachide. Ceci est particulièrement possible sur *B. rufescens*, qui a en permanence des gousses mûres. De même, comme énoncé précédemment, les graines de tamarinier, résidus culinaires, peuvent constituer des substrats de développement pouvant maintenir la souche en l'absence de gousses sur les arbres.

## **CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATIONS**

*Caryedon serratus* est un insecte ayant une grande plasticité de ponte. Au Sénégal, il se développe sur des légumineuses arborescentes relativement communes dans la région du bassin arachidier: *Bauhinia rufescens*, *B. monandra*, *B. tomentosa*, *Cassia sieberiana*, *Piliostigma reticulatum*, *P. thonningii* et *Tamarindus indica*. Il pond sur *Prosopis africana* et *Detarium senegalensis* mais les larves ne parviennent pas à se développer sur ces Légumineuses. Elles meurent généralement au premier stade.

*Caryedon serratus* une bruche qui s'est secondairement adaptée à l'arachide (*Arachis hypogaea*, Fabaceae) devenant ainsi l'unique espèce du genre *Caryedon* contaminant cette légumineuse. Il semble que les principaux facteurs influençant l'évolution des populations de cette bruche soient climatiques et biocénotiques mais n'empêchent pas sa persistance dans la nature durant la saison des pluies.

L'étude, menée au Sénégal depuis 1995, a porté sur la dynamique de contamination de l'arachide, l'écologie de *Caryedon serratus* et les relations que cette bruche noue avec ses différentes plantes hôtes. Nous avons utilisé plusieurs méthodes de travail aussi bien au terrain qu'au laboratoire. Pour caractériser les différentes souches de la bruche de l'arachide, des marqueurs aussi modernes que variés comme la morphométrie, l'électrophorèse enzymatique (Sembène, 1997), le séquençage d'ADN et les locus microsatellites, sont utilisés. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence plusieurs aspects importants de la biologie et de l'écologie de ce ravageur:

Les essais sur la dynamique d'infestation de l'arachide nous ont permis de préciser qu'il subsiste toujours, durant la période pluvieuse, une faible population de *C. serratus*, reproductivement active, qui infeste l'arachide nouvellement récoltée. La contamination peut aussi avoir pour origine le grenier lui-même ou les greniers voisins mal nettoyés. Cette infestation, quoique faible durant les deux premiers mois (environ 0,2% des gousses), se poursuit et est à l'origine d'importantes pertes quantitatives à cause du caractère polyvoltin de la bruche de l'arachide. Cependant, le stockage en sacs en polypropylène tressé limite l'infestation *in situ* par confinement des insectes. Dans un stockage de type semi-étanche (sacs en polypropylène tressé), la composition de l'atmosphère interstitielle est modifiée par la respiration des graines elles-mêmes, mais aussi et surtout par celle des insectes et des moisissures qui peuvent se développer sur elles

en fonction de la teneur en eau et de la température. On aboutit à un autoconfinement dû à une raréfaction de l'oxygène et à une augmentation de la teneur en dioxyde de carbone, telles que les insectes présents ne peuvent survivre et les moisissures se développer. L'évaluation d'un tel "système amélioré de conservation" dans des conditions tropicales simulées au laboratoire a donné des résultats encourageants pour le riz paddy (Haryadi, 1987) en montrant notamment que les prélèvements de grains ne nuisent pas à l'anaérobiose partielle. De telles pratiques seraient certainement très concluantes surtout si les sacs étaient pleinement remplis d'arachide et hermétiquement fermés, accélérant ainsi le confinement et rendant en même temps difficile les déplacements et la rencontre des bruches; l'infestation peut ainsi disparaître à la première génération d'insectes.

D'autre part, il est évident que la contamination de l'arachide peut avoir une double origine (greniers et plantes hôtes) mais, en s'appuyant sur nos propres résultats, les travaux de Matokot *et al.* (1987) au Congo, de Ndiaye (1991) au Sénégal et de Ali-Diallo (1991) au Niger, on peut affirmer que même en l'absence de bruche dans les greniers, l'infestation de l'arachide se produit au champ, en fin de saison des pluies, dans une zone où les Caesalpiniaceae hôtes sont présents. Ces légumineuses ne produisent et ne portent pourtant plus de gousses pendant cette période. Se pose donc le problème de la survie de *C. serratus* durant la saison des pluies, en l'absence de substrats de développement.

La prospection effectuée aux abords de la limite nord de l'aire de distribution des plantes hôtes naturelles de *C. serratus*, révèle qu'il existe une corrélation positive entre la présence des plantes hôtes sauvages et le niveau d'infestation de l'arachide (perte en poids). Dans les zones où les plantes hôtes sont quasiment absentes (Nord du Sénégal), l'infestation de l'arachide par *C. serratus* est pratiquement nulle. Les premières attaques ne sont observées que sur de l'arachide stockée pendant au moins 7 mois. Ces infestations ont certainement pour origine de l'arachide bruchée venant des autres régions du Sénégal.

Les analyses morphométrique et génétique (allozymes, séquençage d'ADN et locus microsattellites) des différentes souches de bruches ont permis de montrer pour la première fois que la population de *C. serratus* forme des biotypes liés à chacune des espèces de plantes hôtes (*host-races*) aussi bien sur le plan morphologique que génétique. Les différents facteurs favorisant la formation et le maintien de ces races hôtes ont été mis en

évidence. Il existe un flux génique très élevé entre les *C. serratus* issus de l'arachide et ceux provenant de *Piliostigma reticulatum*. Ils se distinguent des souches inféodées aux autres plantes hôtes. Dans la zone d'étude, l'infestation primaire de l'arachide nouvellement récoltée est due précisément aux femelles de *C. serratus* issues des gousses en décomposition de *P. reticulatum* et à celles qui se développent dans les gousses d'arachide résiduelles des greniers. *T. indica* pourrait éventuellement, être un hôte refuge des *C. serratus* qui infestent l'arachide, en cas d'inexistence de gousses de *P. reticulatum*.

La mise en œuvre sur le terrain des résultats génétiques confirme l'origine de l'infestation de l'arachide nouvellement récoltée au Sénégal.

*C. serratus* est donc un insecte "à surveiller" qui pourrait passer sur d'autres légumineuses utiles à l'homme. D'autre part, il ne doit plus être considéré comme un insecte se développant uniquement dans les stocks. Le problème de la conservation de l'arachide doit être revu en tenant compte de la pré-infestation au champ car le polyvoltinisme de la bruche de l'arachide amplifie considérablement les dégâts en stocks dès lors qu'une primo-infestation s'est déjà installée. Il convient d'éviter l'infestation initiale, celle qui a pour origine *P. reticulatum* et qui se produit au cours du séchage. Pour y parvenir, trois possibilités:

- Soit procéder au séchage au village, dans la mesure où il n'y pousse pas de piliostigmas ;

- Soit, et c'est la solution qui paraît la plus pratique, éliminer les gousses de l'hôte sauvage avant leur maturité en les cueillant pour le bétail ou en les brûlant. Ceci ne nuit nullement au monde paysan car l'intérêt de *P. reticulatum* réside dans son écorce qui est utilisée pour attacher les gerbes de mil, les fagots de bois ou les clôtures de maisons, tisser des palissades.

- Soit raccourcir, le plus possible, la période de séchage, évitant ainsi une exposition trop longue en plein champ.

Il est aussi essentiel que les bruches infestant la récolte de la saison précédente ne puissent pas passer sur la nouvelle récolte. Des règles élémentaires d'hygiène suffiraient à éviter cette infestation : se débarrasser des stocks infestés au moins deux mois avant la rentrée de la nouvelle arachide ; en effet, des femelles pourraient subsister pendant tout ce temps dans un recoin du grenier ; nettoyer avec soin les lieux de stockage ; prendre garde en particulier aux sacs ayant contenu de l'arachide, qui peuvent abriter des cocons et des adultes ; mettre les gousses d'arachide, dès après le battage, dans des sacs en polypropylène tressé, non troués, en les remplissant pleinement et en les fermant hermétiquement. Par ailleurs, il serait préférable que les achats d'arachide par les services de l'Etat soient achevés dans les deux mois qui suivent la récolte. Les sacs bruchés devront évidemment être isolés et traités à l'aide d'un insecticide dès leur arrivée sur les lieux de stockage.

D'une manière générale, pour ce qui concerne les magasins de l'Etat, quelques mesures relativement simples devraient être prises :

-Isoler dès leur arrivée les sacs contenant de l'arachide provenant des régions infestées; les détruire en cas de forte infestation. Traiter tous les autres sacs au moyen d'applications insecticides adéquates.

-Nettoyer très soigneusement les hangars après chaque saison, badigeonner murs et charpentes à l'aide d'insecticides.

-Ne pas réutiliser les sacs sans les avoir débarrassés des insectes qui peuvent s'y trouver. Conserver les sacs vides et propres loin des stocks d'arachide.

-Constituer de gros stocks, ceux-ci étant proportionnellement moins attaqués que les petits en raison de l'élévation de température à l'intérieur de la masse.

-Ne pas avoir, de préférence, de stocks intermédiaires entre le lieu de récolte et le secco final. Comme les attaques se localisent surtout en périphérie, chaque fois que l'on déplace le tas d'arachide, on bouleverse sa structure, ce qui homogénéise l'infestation. De plus, on provoque une baisse de la température interne, ce qui favorise la multiplication des insectes.

En plus de ces mesures immédiatement applicables, d'autres voies sont en cours d'expérimentation dans notre laboratoire et ne peuvent encore donner lieu à des recommandations. Nous citerons l'utilisation de substances d'origine végétale dont nous espérons obtenir un effet répulsif et/ou insecticide. Nous envisageons également le recours au stockage étanche en poches plastique hermétiquement fermées, avec ou sans appauvrissement de l'atmosphère en oxygène. Un troisième volet de recherche est celui de la lutte biologique par entomophages, c'est-à-dire au moyen d'insectes ou d'acariens auxiliaires, parasites ou prédateurs de la bruche. De même, les possibilités offertes par les caractères de résistance de certaines variétés d'arachide aux insectes ont déjà été évoquées. Notre étude n'a pu être étendue sur ce point qui devrait être vérifié par des expérimentations particulières.

Pour mettre en évidence les mécanismes de résistance biochimique des autres Fabaceae aux différentes souches de *C. serratus* et les mécanismes de résistance des souches de *C. serratus* à leurs plantes hôtes (Delobel *in litt.*), il est nécessaire de déterminer l'ensemble des substances nutritionnelles et/ou volatiles pouvant intervenir dans l'attractivité des plantes envers les femelles gravides, l'effet des fruits sur la survie de la larve néonate (rôle de la gousse et de l'enveloppe de la graine) et enfin l'adéquation ou la toxicité de la graine aux besoins nutritionnels de la larve. La mise en évidence de ces mécanismes peut sûrement fournir de nouveaux moyens pour la mise en oeuvre de méthodes de lutte contre la bruche de l'arachide. Il est difficile de prévoir a priori la nature des sites d'intervention ; on peut penser néanmoins à des molécules antagonistes pouvant être intégrées, par génie génétique ou par sélection traditionnelle, aux cultivars d'arachide existant au Sénégal.

Insistons une fois de plus sur le fait que les progrès accomplis dans la recherche de méthodes de lutte contre la bruche de l'arachide doivent s'appuyer sur une étude détaillée de la biologie du ravageur. Et ce qui est vrai pour la bruche de l'arachide l'est également pour l'ensemble des ravageurs des denrées agricoles. Cependant, beaucoup reste à faire, d'une part pour mettre à l'épreuve au niveau des paysans, les méthodes que nous préconisons ; d'autre part, pour découvrir et mettre en pratique de nouvelles méthodes de lutte. Il s'agira enfin de faire passer le message chez tous les opérateurs économiques ; c'est là un important travail de formation et de vulgarisation sans lequel les résultats de laboratoire resteraient sans grand intérêt.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- ADAMS J.M., 1977. Post-harvest losses in cereals and pulses. The results of a question survey. *Trop. Stored Prod. Inf.*, 34 : 23-48.
- ALI-DIALLO B., 1991. *Biologie de Caryedon serratus (Ol.) en présence de ses plantes hôtes sur le terrain et en conditions expérimentales*. Thèse Université de Niamey, Tome 1, 103 p.
- ALI-DIALLO B. & PIERRE D., 1990. Importance des plantes sauvages sur la contamination des stocks d'arachide (*Arachis hypogaea*) par *Caryedon serratus* (Ol.) (Coleoptera : Bruchidae). *Séminaire sur la post-récolte en Afrique*. Abidjan, Côte d'Ivoire.
- ALZOUMA I., HUIGNARD J. & LEROI B., 1985. La ponte de *Bruchidius atrolineatus* Pic. (Col., Bruchidae) au cours de la maturation de *Vigna unguiculata* Walp. et ses conséquences sur le développement. *Ann. Soc. entomol. Fr.*, 21 : 207-217.
- ANONYME, 1982. Caractéristiques des variétés d'arachide actuellement recommandées au Sénégal. *Doc. roneo C.N.R.A.* Bambey (I.S.R.A., Sénégal), 12 p.
- APPERT J., 1954. La bruche de l'arachide. *Ann. C. R.A.* Bambey, 13 : 181-190.
- APPERT J., 1957. *Les parasites animaux des plantes cultivées au Sénégal et au Soudan*. Gou. Gén. A.O.F., 272 p.
- APPERT J., 1958. Protection de l'arachide au Sénégal contre les insectes nuisibles. *Publ. Sci. Counc. Afr. S. Sahara*, 31 : 173-176.
- APPERT J., 1985. *Stockage des produits vivriers et semenciers*. Ed. Maisonneuve et Larose, Paris, Tech. d'Agron. Trop., 113 p.
- AYALA F.J., 1972. Darwinian versus non-Darwinian evolution in natural populations of *Drosophila*. *Proc. Sixth Berkeley Symp. Math. Stat. Prob.*, 5 : 211-236.

- BALACHOWSKY A.S., 1962. *Entomologie appliquée à l'agriculture*. Tome I, pp. 441-485.
- BAUWENS D. & DIAZ-URIATE R., 1997. Covariation of life-history traits in lacertid lizards : a comparative study. *The American Naturalist*, 149 (1) : 91-111.
- BECERRA J.X., 1997. Insects on plants : macroevolutionary chemical trends in host use. *Science*, 276 : 253-256.
- BERENBAUM, M.R. 1990. Evolution of specialization in insect. Umbellifer association. *Annu. Rev. Entomol.*, 35 : 319-343.
- BERHAUT R.P., 1967. *Flore illustrée du Sénégal*, 2<sup>ème</sup> édition, Clairafrique, 485 p.
- BERNAYS E.A. & CHAPMAN R.F., 1994. Host-plant selection by phytophagous insects. Edition Chapman & Hall, New York, 311 p.
- BIASIOLO A & COMPARINI A., 1990. Esterase-6 locus, a new enzyme polymorphism in *Apis mellifera*. *Apidologie*, 21, 123-126.
- BIERNAUX J., 1965. Quelques mises au point en matière de biologie des Iules de la betterave. Considérations actuelles sur certains iulicides. *Communication n°1 du centre de Recherches zoologiques appliquées*, Gembloux (Belgique).
- BOROWIECK L., 1987. The genera of seed-beetles (Coleoptera, Bruchidae). *Polskie pismo Entomol.* 57 : 3-207.
- BOUCHER L. & HUIGNARD J., 1987. Transfer of male secretions from the spermatophore to the female insect in *Caryedon serratus* (Ol.) : analysis of the possible trophic role of these secretions. *J. Insect Physiol.*, 33 : 949-957
- BOUCHER L. & PIERRE D., 1988. Etude du rythme d'accouplement chez *Caryedon serratus* en conditions d'élevage et en conditions naturelles. *Ann. Soc. entomol. Fr.*, 24 : 151-159.

- BOUFFIL F. & SAUGER, L., 1949. Première classification des variétés d'arachides de la collection de Bambey. Paris, *Agro. Trop.*, 4 : 493-502.
- BOWCOCK A.M., RUIZ LINARES J., TOMFOHRDE E., MINCH J.R. KIDD & CAVALLI-SFORZA L.L., 1993. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellite . *Nature*, 368 : 455-457.
- BUSH G.L., 1994. Sympatric speciation in animals : new wine in old bottles. *Trends in Ecology and Evolution*, 9 : 285-288.
- BUSH G.L. & DIEH S.R.L., 1982. Host shifts, genetic models of sympatric speciation and the origin of parasitic insect species. In : J.H. Visser & A.K. Minks (eds.). *Proc. 5th Int. Symp. Insect-Plant Relationships*. Pudoc, Wageningen, pp. 297-305.
- BUSH G.L. & SMITH J.S., 1998. The genetics and ecology of sympatric speciation. *Res. Popul. Ecol.*, 40(2) : 175-187.
- CALLEN D.F., THOMPSON A.D., SHEN Y., PHILLIPS H.A., RICHARDS R.I., MULLEY J.C. & SUTHERLAND G.R., 1993. Incidence and origin of "nul" alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*, 52 : 922-927.
- CANCELA DA FONSECA J.P., 1964. Oviposition and length of adult life in *Caryedon gonagra* (F.). *Bull. entomol. Res.*, 5 : 697-707.
- CARCREFF E., 1996. *Relations phylétiques et caractérisation génétique de Megastigmus wachtli* (Hym. Tormidae). Mémoire de D.E.A. de Physiologie des Invertébrés, Paris VI, 54 p.
- CARROLL S.P. & BOYD C., 1992. Host race radiation in the soapberry bug : natural history with the history. *Evolution* 46(4) : 1052-1069.

- CARROLL S.P., DINGLE H. & KLASSEN S.P., 1997. Genetic differentiation of fitness-associated traits among rapidly evolving populations of the soapberry bug. *Evolution*, 51(4), 1182-1188.
- CASKEY C.T., PIZZUTI A., FU Y.H., FENWICK R.G. & NELSON D.L., 1992. Triplet repeat mutations in human disease. *Science*, 256 : 784-788.
- CATHERINET M., 1955. Etude sur le port de l'arachide cultivée. Un nouveau type variétal d'arachide, le type Boukombe. *Ann. C.R.A. Bambey. Bull. Agro.*, 15 : 34-48.
- CAVALIER-SMITH T., 1985. *The evolution of genome size*. Eds John Wiley, Chichester, 126 p.
- CAVALLI-SFORZA L.L. & EDWARDS A.W.F., 1997. Phylogenetic analysis : models and estimation procedures. *Evolution*, 32 : 550-570.
- CHACRABORTY R. & JIN L., 1993. A unified approach to study hypervariable polymorphism : statistical consideration of determining relatedness and population distance. *In DNA fingerprinting : State of the Science* ed. by S.D.J. Pena, Chacraborty R., Epplen & A.J. Jeffrey. Birkhauser Verlag Basel / Switzerland, pp 153-175.
- CHAIBOU M., PIERRE D., J.C. BIEMONT & POUZAT J., 1993. Existence d'une phéromone sexuelle chez *Caryedon serratus* : attractivité des femelles et réactivité des mâles. *Entomologia Experimentalis & Applicata*, 67 : 253-262.
- CHEVALIER A., 1935. Monographie de l'arachide. II : l'arachide au Sénégal. *Rev. Bot. appl.*, 16 : 673-871.
- CHOUDHARY M., STRASSMANN J.E., SOLI C.R. & QUELLER D.C., 1993. Microsatellite variation in a social insect. *Biochemical Genetics*, 31 : 87-96 .
- CLARKE B., 1970. Darwinian evolution of proteins. *Science*, 168 : 1009-1011.

- CONWAY J.A., 1975. Investigations into the origin, development and control of *Caryedon serratus* attacking stored groundnuts in the Gambia. *Proc. 1st int. work. Conf. stored Prod. Entomol.*, Savannah, pp. 554-566.
- CONWAY J.A., 1983. Notes on biology and ecology of the groundnut seed beetle *Caryedon serratus* (Ol.), (Coleoptera : Bruchidae) under field conditions in Senegambia. *Trop. Stored. Prod. Inf.*, 45 : 11-13.
- CORBY H.D.R., 1941. Report of a study of a pest (*Pachymoerus longus* Pic.) causing damage to groundnuts in the Wurkum district of the Muri Division of Adamwa. *Samaru, Nigeria, Agricultural Department*, 15 p.
- CUSHING J.E., 1941. An experiment on olfactory conditioning in *Drosophila gutifera*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 27 : 496-499.
- DARWIN C., 1859. *On the origine of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. Harvard University Press, Cambridge, 235 p.
- DAVEY P.M., 1958. The groundnut bruchid, *Caryedon gonagra* (F.). *Bull. of Entomol. Res.*, 49 : 385-404.
- DE LIMA C.P.F., 1979. Appropriate techniques for use in the assessment of country loss in stored produce in the tropics. *Trop. Stored Prod. Inf.* 38 : 15-19.
- DECELLE J., 1966. *Bruchus serratus* Ol., 1790, espèce-type du genre *Caryedon* Schönherr, *Rev. Zool. Bot. Afr.*, 74 : 169-174
- DECELLE J., 1981. Bruchidae related to grain legumes in the Afro-Tropical area. *Ser. Ent.* Vol. 9. Ed. by V. Labeyrie, Junk Publisher, pp. 197-201.

- DECELLE J., 1987. Les coléoptères bruchidae nuisibles aux légumineuses alimentaires cultivées dans la région afrotropicale. In "Les légumineuses alimentaires en Afrique". Ed. AUPELF, 188-200.
- DELOBEL A., 1989a. Influence des gousses d'arachide (*Arachis hypogaea*) et de l'alimentation imaginale sur l'ovogénèse, l'accouplement et la ponte chez la bruche *Caryedon serratus*. *Entomologia Experimentalis & Applicata*, 52 : 281-289.
- DELOBEL A., 1989b. *Uscana caryedoni* (Hym. Trichogrammatidae) : possibilités d'utilisation en lutte biologique contre la bruche de l'arachide, *Caryedon serratus* (Col. Bruchidae). *Entomophaga*, 34 : 351-363.
- DELOBEL A., 1992. *La bruche de l'arachide : un exemple contemporain de déplacement du spectre alimentaire*. Rapport pour l'Antenne ORSTOM/Museum National d'Histoire Naturelle, 14p.
- DELOBEL A., 1995. The shift of *Caryedon serratus* (Ol.) from wild Caesalpiniaceae to groundnuts took place in West Africa (Coleoptera : Bruchidae). *J. stored Prod Res.*, 31 : 101-102.
- DELOBEL A., TRAN M. & SEMBENE, M., 2000. Influence du choix alimentaire sur la fécondité et le développement larvaire des *Caryedon* des légumineuses (Coleoptera : Bruchidae) au Sénégal. *Ann. Soc. Entomol.* 36(1) : 61-73.
- DELOBEL A., DELOBEL H., TRAN M., SEMBENE M. & HAN S.H., 1995. Observations sur les relations trophiques entre les bruches du genre *Caryedon* (Coléoptères, Bruchidae) et leurs plantes hôtes sauvages au Sénégal. *Bull. Ins. Fond. Af. Noire Cheikh Anta Diop, Dakar, série A*, 48 : 79-88.
- DELOBEL A. & MATOKOT L., 1991. Control of groundnut insect pests in African subsistence farming. In : F. Fleurat-Lessard & P. Ducom (eds.). *Proc. 5th int. work. Conf. stored Prod. Prot.*, Bordeaux, p. 1599-1607.
- DELOBEL A. & TRAN M., 1993. *Les Coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes*. CTA et ORSTOM, 424 p.

- DI RIENZO A., PETERSON A.C., GARZA J.C., VALDE A.M., SLATKIN M. & FREIMER N.B., 1994. Mutational processes of sample-sequence repeat loci in human populations. *Proceeding of National Academy of Sciences, USA*, 91 : 3166-3170.
- DIETRICH W., KATZ H., LINCOLN S.E., SHIN H.S., FRIEDMAN J., DRACOPOLI N.C. & LANDER E.S., 1992. A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics* , 131 : 423- 447 .
- DOBLER S., MARADULYN P., PASTEELS J.M. & ROWELL-RAHIER M., 1996. Host plant switches and the evolution of chemical defense and life history in the leaf beetle genus *Oreina*. *Evolution*, 50 : 2373-2386.
- DOBZANSKY T.H., 1977. *Génétique du processus évolutif*. Flammarion, Paris, 346 p.
- DOVER G.A. & FLAVELL R.B., 1982. *Genome evolution*. Eds. Academic, London, 248 p.
- DREW B.A., GRANOVSKY T.A. & LINDBLAD C.J., 1978. Representative sampling, interpretation of results, accuracy and reliability. *Am. Assoc. Cereal Chem.*, p. 45-55.
- DUCHATEAU M.J., HOSHIBA H. & VELTHUIS H.H.W., 1994. Diploid males in the bumble bee *Bombus terrestris*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 68 : 87-99.
- DURAND J.Y., 1983. Toxicité des pesticides et particulièrement des insecticides. Symposium sur la protection des stocks céréaliers en zone sahélienne. Edition : L.A.W. Hayward & C. Herz, pp. 115-143.
- ELY J., DEKA R., CHAKRABOTY R. & FERRELL R.E., 1992. Comparison of five tandem repeat loci between humans and chimpanzees, *Genomics*, 14 : 692-698.

- EMELIANOV I., MALLET J. & BALTENSWEILER W., 1995. Genetic differentiation in *Zeiraphera diniana* (Lepidoptera : Tortricidae, the larch budmoth) : polymorphism, host races or sibling species? *Heredity*, 75 : 416-424.
- ENDLER J.A., 1973. Gene flow and population differentiation. *Science*, 179 : 243-250.
- ENDLER J.A., 1979. Gene flow and life history patterns. *Genetics*, 93 : 263-284.
- ERLICH P.R. & RAVEN P.H., 1969. Differentiation of populations. *Science*, 165 : 1228-1232.
- ESTOUP A., 1995. *Apport des marqueurs microsatellites pour l'étude de la variabilité génétique chez deux insectes sociaux, l'abeille domestique (Apis Mellifera L) et le bourdon (Bombus terrestris Latreille), de la colonie à l'espèce*. Thèse Université Paris sud, centre d'Orsay, 69 p.
- ESTOUP A. & CORNUET J.M., 1994. Utilisation de sondes oligonucleotidiques marquées à la digoxigénine pour la recherche de microsatellites. *Brin complémentaire, le journal des biotechnologies*, 10 : 5-7.
- ESTOUP A., GARNERY L., SOLIGNAC M. & CORNUET J.M., 1995. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations. *Genetics Society of America*, 140 : 679-695.
- ESTOUP A., PRESA P., KRIEG F., VAIMAN D. & GUYOMARD R., 1993a. (CT)<sub>n</sub> and (GT)<sub>n</sub> microsatellites : a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L.(brown trout). *Heredity*, 71 : 488-496.
- ESTOUP A., SOLIGNAC M. & CORNUET J.M., 1994. Precise assesment of the number of patriline and of genetic relatedness in honey bee colonies. Proceeding of the Royal Society of London : biological. *Science*, 258 : 1-7.

- ESTOUP A, SOLIGNAC M., HARRY M. & CORNUET J.M., 1993b. (CT)<sub>n</sub> and (GT)<sub>n</sub> microsatellites in two insect species : *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research*, 21 : 1427-1431.
- EVANS J.D., 1993. Parentage analyses in ant colonies using simple sequence repeat loci. *Molecular Ecology*, 2 : 393- 397.
- FARRIS J.S., 1970. Methods for computing Wagner trees. *Systematic Zoology*, 34 : 21-34.
- FEDER J.L., 1998. The apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella* flies in the face of conventional wisdom about speciation. In D.J. Howard and S.H. Berlocher (eds.) *Endless forms : species and speciation*. Oxford University Press, Oxford, 98 p.
- FEDER J.L. & BUSH G.L., 1989. A field test of differential host plant usage between two sibling species of *Rhagoletis pomonella* fruit flies and its consequence for sympatric models of speciation. *Evolution* 43 : 1813-1819.
- FEDER J.L., OPP S.B., WLAZLO B., REYNOLDS K., GO W. & SPISAK S., 1994. Host fidelity is an effective premating barrier between sympatric races of the apple maggot fly. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 91 : 7990-7994.
- FELSENSTEIN J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences : a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17 : 368-376.
- FELSENSTEIN J., 1985. Confidence of limits on phylogenies : an approach using bootstrap. *Evolution*, 39 (4) : 783-791.
- FELSENSTEIN J., 1993. PHYLIP (Phylogenetic Inference Package), version 3.5c. *Dpt of Genetics*, University of Washington, Seattle, 145 p.
- FOX, L.R. & MORROW P.A., 1981. Specialization : species property or local phenomenon? *Science*, 211 : 887-893.

- FRIENDSHIP R., 1974. *A preliminary investigation of field and secco infestation of gambian groundnut by Caryedon serratus (Ol.)*. Trop. Prod. Inst., L. 38, 14 p.
- FUTUYMA D.J., 1986. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, Sunderland, 120 p.
- FUTUYMA D. & CAFFERTY S.J. MC., 1990. Phylogeny and evolution for host plant associations in the leaf beetle genus *Ophraella* (Coleoptera : Chrysomelidae). *Evolution*, 44 : 1885-1913.
- FUTUYMA D.J. & MAYER G.C., 1980. Non-allopatric speciation in animals. *Syst. Zool.*, 29 : 254-271.
- GAGNEPAIN C., GILLON Y. & LEROUX J.M., 1986. *Caryedon serratus* (Col. Bruchidae), principal insecte consommateur des gousses de *Piliostigma thonningii* (Caesalpinaceae) en savane de Lamto (Côte d'Ivoire). *Ann. Soc. entomol. Fr. (N.S.)*, 4 : 457-467.
- GAGNEPAIN C. & RASPLUS J.Y., 1989. *Caryedon serratus* and its parasitoids in the savanna around Lamto, Ivory Coast. *Entomophaga*, 34 : 559-567.
- GILLIER P. & BOCKELEEE-MORVAN A., 1979. La protection des stocks d'arachide contre les insectes. *Oléagineux*, 3 : 131-137.
- GILLIER P. & SILVESTRE P., 1969. *L'arachide, techniques agricoles et productions tropicales*. Ed. G.P. Maisonneuve et Larose, 292 p.
- GOLDSTEIN D.B., LINARES A.R., FELMAN M.W., & CAVALLI-SFORZA L.L., 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, 139 : 463-471.

- GOTTELLI D., SILLERO-ZUBIRI C., APPLEBAUM D., ROY M.S. GIRMAN D.J., GARCIA-MORENO J., OSTRANDERS E.A. & WAYNE R.K., 1994. Molecular genetics of the most endangered canid : the Ethiopian wolf *Canis simensis*. *Molecular Ecology*, 3 : 301-312.
- GOUDET J., 1995. Fstat (version 1.2) : a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86 : 485-486.
- GREEN A., 1959. The control of insects infesting groundnuts after harvest in the Gambia. A study of the groundnut borer *Caryedon gonagra* (F.) under field conditions. *Trop. Sci.*, 1 : 200-205.
- GREGORY W.C., SMITH B.W. & YARBROUCH J.A., 1951. Morphology, genetics and breeding in the peanut. In "The unpredictable legume. A symposium, Washington", *The Nat. Fert. Asso.* pp. 28-88.
- GUIRAUD X., 1938. *L'arachide sénégalaise*. Libre. Tech. & écon., Paris, 123 p.
- HAMADA H, PETRINO M. & KAKUNAGA T., 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* , 79 : 6465-6469.
- HARTL D.L., 1994. *Génétique des Populations*. Ed. Flammarion, Paris, 305 p.
- HERSHBERGER W.A. & SMITH M.P., 1967. Conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Anim. Behav.*, 15 : 259-262.
- HILLIS D.M., 1997. Biology recapitulates phylogeny. *Science*, 276 : 218-219.
- HILLIS D.M., MABLE B.K. & MORRITZ C., 1996. Application of molecular systematics. In : Hillis D. M., B.K. Mable & C. Morritz (Editeurs), *Molecular Systematics*, second edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, p. 515-544.

- HOPKINS A.D., 1917. A description of C.G. Hewitt's paper on " Insect behavior". *J. Econ. Ent.*, 10 : 92-93.
- HSIAO T.H., 1978. Host plant adaptations among geographic populations of the Colorado potato beetle. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 24 : 437-447.
- HSIAO T.H., 1982. Geographic variation and host plant adaptation of the Colorado potato beetle. *Proc. 5<sup>th</sup> int. Symp. Insect-Plant Relations*. Wageningen, 1982, pp. 315-324.
- HUBERT B., 1977. Ecologie des populations de rongeurs de *Bandia* (Sénégal) en zone sahélo-soudanienne. *La terre et la vie*, 31 : 33-100.
- HUGUE C.R.& QUELLER D.C, 1993. Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. *Molecular Ecology* , 2 : 131-137.
- HUIGNARD J. 1976. Interactions between the host-plant and mating upon the reproductive activity of *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera : Bruchidae) from different colombian ecosystems. *Oecologica* (Berl.), 35 : 307-318.
- HUIGNARD J., MONGE J.P.& GERMAIN J.F., 1989. Influence of thermoperiodic variations on the induction of the reproductive diapause of *Bruchidius atrolineatus*. In : Regulation of Insect Reproduction IV, pp. 197-207. M. Tonner et al. Edition, Academia Praha Publ.
- HUTTEL M.D. & BUSH G.L., 1972. The genetics of host selection and its bearing on sympatric speciation in procecidocharas (Diptera : Tephritidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 15 : 465-480.
- IMBER J., KRETZ C., JOHNSON K. & MADEL J.L., 1993. Origine of the expansion mutation in myotonic dystrophy. *Nature Genetic*, 4 : 72-76.

- JANZEN D.H., 1974. The role of the seed predator guild in a tropical deciduous forest, with some reflections on tropical biological control. In "*Biology in Pest and Disease control*". Blackwell. Oxford U.K : 3-14. D.P. Jones and M.F. Solomon editions.
- JANZEN D.H., 1980. Specificity of seed-attacking beetles in a Costa Rica deciduous forest. *J. Ecol.*, 929-952.
- JEFFREY A.J., TAMAKI K., MACLEOD A., MONCKTON D.G., NEIL D.L. & AMOUR J.A.L., 1994. Complex gene conversion events in germline at human minisatellites. *Nature Genetics*, 6 : 136-145 .
- JOHN B & MIKLOS G.L.G., 1988. *The eukaryote genome in development and evolution*. Eds. Allen and Unwin London, 432 p.
- JOHNSON C.D. & KINGSOLVER J.M., 1981. Checklist of the Bruchidae (Coleoptera) of Canada, United States, Mexico, Central America and the west Indies. *Coleopterists Bulletin*, 35 : 409-422.
- JOHNSON C.D. & KISTER R.A., 1987. Nutritional ecology of bruchid beetles. Offprints from nutritional ecology of insects, mites and spiders. Ed. D' Frand Slansky Jr and Dr. J. Rodriguez, pp. 259-282.
- JOHNSON C.D. & SLOBODCHIKOFF C.N., 1979. Coevolution of *Cassia* (Leguminosae) and its seed beetle predators (Bruchidae). *Environ. Entomol.*, 8 : 1059-1064.
- JUAN C., KAMAL M.I., PEDRO O. & HEWIT G.M., 1996. Mitochondrial DN sequence variation and phylogeography of *Pimelia* dakling beetles on the island of Tenerife (Canary Islands). *Heredity*, 77 : 589-598.

- KERDELHUE C., 1997. *Les communautés de chalcidiens sycophiles associées aux figuiers du sous-genre Sycomorus : écologie et évolution*. Thèse, Institut National Agronomique Paris-Grignon, 205 p.
- KERHARO J. & ADAM J.D., 1974. *La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques*. Ed. Vigot frères, Paris, 480 p.
- KIMURA M., 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217 : 624-626.
- KIMURA, M., 1990. *Théorie neutraliste de l'évolution moléculaire*. Ed. Flammarion, Paris, 232 p.
- KING J.L. & JUKES T.H., 1969. Non-Darwinian evolution. *Science*, 164 : 788-798.
- KISHINO H., MIYATA T. & HASEGAWA M., 1990. Maximum likelihood inference of protein phylogeny and the origin of the chloroplasts. *Journal of Molecular Evolution*, 31 : 151-160.
- KLEIN M. & SEITZ A., 1994. Geographic differentiation between populations of *Rhinocyllus conicus* Frölich (Coleoptera : Curculionidae) : concordance of allozyme and morphometric analysis. *Zool. J. Lin. Soc.*, 110 : 181-191.
- KOYABAY S., 1988. *Etude des problèmes biologiques liés au stockage villageois des arachides*. Mém. Inst. Sup. Dévelop. Rural, Mbaiki (RCA), 76 p.
- KRAFSUR E.S., OBRYCKI J.J. & FLANDERS R.V., 1992. Gene flow in populations of the Seven- Spotted Lady Beetle, *Coccinella septempunctata*. *Heredity*, 83 : 440-444.
- KUMAR S., TAMURA K. & NEI M., 1993. MEGA : molecular evolutionary genetic analysis. Pennsylvania State University, University Park.

- LABEYRIE V., 1977. Environnement sensoriel et coévolution des insectes. *In* "Comportement des insectes et milieu trophique", Ed. V. Labeyrie, *coll. int.* C.N.R.S., pp. 265-493.
- LABEYRIE V., 1978a. Reproduction of insects and coevolution of insects and plants. *Entomologia Experimentalis & Applicata*, 24 : 496-514.
- LABEYRIE V., 1978b. The significance of the environment in the control of insect fecundity. *Ann. Rev. Entomol.*, 23 : 69-89.
- LABEYRIE V., 1981. Ecological problems arising from weevil infestation of food legumes; *Séries Entomol.*, vol. 19, Ed. by V. Labeyrie, Junk Publishers.
- LITT M. & LUTY J.A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by vitro amplification of dinucleotide repeats within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44 : 397-401.
- LONCLE D., AMAUDRIC M. & JACOTY C., 1993. *Génie génétique*. Doin éditeurs, Paris, 439 p.
- LOSOS J.B., 1996. Phylogenetic perspectives on community ecology. *Ecology*, 77(5) : 1344-1354.
- LUCOTTE G., 1983. *Génétique des populations : initiation théorique et biochimique à l'étude du polymorphisme*. Ed. InterEditions, 200 p.
- MAPANGO-DIVASSA S., 1985. *Sensibilité à la bruche Caryedon serratus Ol. (Col. Bruchidae) de quelques variétés d'arachide cultivées en République Populaire du Congo*. Mem. Ing. Dev. Rur., Uni. M. Ngouabi, Brazzaville, 80 p.
- MATOKOT L., MAPANGO-DIVASSA S. & DELOBEL A., 1987. Evolution des populations de *Caryedon serratus* (Ol.) dans les stocks d'arachide au Congo. *Agron. trop.*, 42 : 69-74.

- MAYDELL H.H. VON, 1992. *Arbres et arbustes du Sahel*. Verlag J. Margraf, 531 p.
- MAYR E., 1942. *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, Cambridge, 122 p.
- MAYR E., 1974. *Populations, espèces et évolution*. Hermann, Paris, 496 p.
- MAYR E. & PROVINE W.B., 1980. *The evolutionary synthesis*. Harvard University Press, Cambridge, 120 p.
- MIKLOS G.L.G., 1985. Localized highly repetitive DNA sequences in vertebrate and invertebrate genomes. pp. 241-321. In : R.J. Mac-Intyre (ed.), *Molecular Evolutionary Genetics*. Plenum, New York.
- MITTER C. & FUTUYMA D.J., 1979. Population genetic consequences of feeding habits in some forest Lepidoptera. *Genetics*, 92 : 1005-1021.
- MIWA S., 1994. Triplet repeats strike again. *Nature Genetics*, 6 : 3-4.
- MIYATAKE T. & SHIMIZU T., 1999. Genetic correlations between life-history and behavioral traits can cause reproductive isolation. *Evolution*, 53(1) : 201-208.
- MUZERKI S. & RAMDAS MENON, M.G., 1957. The taxonomic position of *Caryedon fuscus* (Goeze), *C. gonager* (Fabricius) and *C. languidus* (Gyllenhal) (Coleoptera, Bruchidae) based on the genitalia. *Proc. R. Ent. Soc. Lon.*, 4 : 103-106.
- NDIAYE A., 1981. *Biologie de la bruche de l'arachide, Caryedon serratus Ol. ; effets des rayons X sur la femelle*. Thèse 3ème cycle, Uni. Paris Sud, Orsay, n° 2971, 135 p.
- NDIAYE S., 1991. *La bruche de l'arachide dans un agrosystème du centre-ouest du Sénégal : contribution à l'étude de la contamination en plein champ et dans les stocks de l'arachide (Arachis hypogaea L.) par Caryedon serratus (Ol.)*

(Coleoptera-Bruchidae); rôle des légumineuses hôtes sauvages dans le cycle de cette bruche. Thèse Université de Pau et des Pays de l'Adour, 96 p.

NDIAYE S. & M. JARRY, 1990. Importance de certaines légumineuses arborées et arbustives au Sénégal dans le cycle de *Caryedon serratus* (Ol.), et influence sur la contamination en plein champ de l'arachide (*Arachis hypogea* L.). In : F. Fleurat-Lessard & P. Ducom (eds.). *Proc. 5th Int. Work. Conf. Stored Prod. Prot.*, Bordeaux, 3 : 1663-1669.

NDIOULOU D., 1983. Les bruches sur les légumineuses cultivées en République Populaire du Congo : origine des attaques et plantes hôtes naturelles. *Doc. Ronéo, Off. Rech. Sc. Tech. Outre-Mer.*

NEI M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89 : 583-590.

NEI M. & CHESSER R.K., 1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Ann. Hum. Genet.*, 47 : 253-259.

PAJNI H.R. & MANN B.K., 1979. Some aspects of the biology of *Caryedon serratus* (Ol.) *Bull. Grain Technol.*, 17 : 43-47.

PIC M., 1924. *Mélanges exotico-entomologiques : Nouveautés diverses*, pp. 23-25.

PIERCE V.A. & CRAWFORD D.L., 1997. Phylogenetic analysis of glycolytic enzyme expression. *Science*, 276 : 256-259.

PIERRE D. & HUIGNARD J., 1990. The biological cycle of *Caryedon serratus* Boh. (Coleoptera, Bruchidae) on one of its host plants *Bauhinia rufescens* Lam. (Caesalpinioideae) in a Sahelian zone. *Acta Oecologica* 11 : 93-101.

- PIMBERT M., 1985. Comparaison des comportements de ponte de *Zabrotes subfaciatus* en présence de gousses et de graines de *Phaseolus vulgaris* L. *Biol. Behav.* 10 : 309-319.
- POINTEL J.G. & YACIUK G., 1979. Infestation par *Caryedon gonagra* F. de stocks expérimentaux d'arachides en coque au Sénégal et températures observées. *Z. angew. Zool.* 66 : 185-198.
- POUZAT J., 1977. Effets des stimulations provenant de la plante hôte, le haricot, *Phaseolus vulgaris* L., sur le comportement de la ponte de la bruche du haricot, *Acanthoscelides obtectus* Say. In "Comportement des insectes et milieu trophique". Ed. V. Labeyrie, pp. 115-131.
- PREVETT P.F., 1965. The genus *Caryedon* in Northern Nigeria, with descriptions of six new species. *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, 1 : 523-547.
- PREVETT P.F., 1966a. Notes on the biology, food plants and distribution of Nigerian Bruchidae, with particular reference to the northern region. *Bull. Entomol. Soc. Nigeria*, 1 : 3-6.
- PREVETT P.F., 1966b. Observations on biology in the genus *Caryedon* Schoenherr in northern Nigeria, with a list of associated parasitic Hymenoptera. *Proc. Res. entomol. Soc. London*, 41 : 9-16.
- PREVETT P.F., 1967. The field occurrence of *Caryedon serratus* (Ol.), the groundnut seed beetle, in Uganda. *J. Stored Prod. Res.* 30 : 267-268.
- RASPLUS J.Y., 1988. *La communauté parasitaire des coléoptères séminivores de Légumineuses dans une mosaïque forêt-savane en Afrique de l'Ouest (Lamto-Côte d'Ivoire)*. Thèse Doctorat (Entomologie) Université d'Orsay, Paris XI, 437 p.
- RAYMOND M. & ROUSSET F., 1995. Genepop (V. 1.2) : a population genetics software for exact tests ecumenicism. *J. Heredity*, 86 : 248-249.

- RICHARDS R.I. & SUTHERLAND G.R., 1992. Dynamic mutations : a new class of mutation causing human disease. *Cell*, 70 : 709-712.
- RISBEC J., 1950. *La faune entomologique des cultures au Sénégal et au Soudan Français*. Gou. Gén. A.O.F., 639 p.
- ROBERT P., 1984. *Contribution à l'étude de l'écologie de la bruche de l'arachide : Caryedon serratus Ol. (Coléoptère, Bruchidae), sur ses différentes plantes hôtes*. Thèse Université François Rabelais de Tours, 122 p.
- ROBERT P., 1985. A comparative study of some aspects of the reproduction of three *Caryedon serratus* strains in presence of its potential host plants. *Oecologia* (Berlin), 65 : 425-430.
- ROWELL-RAHIER M., 1992. Genetic structure of leaf-beetles populations : microgeographic and sexual differentiation in *Oreina cacaliae* and *O. speciosissima*. *Entomologia Experimentalis & Applicata*, 65 : 247-257.
- SAGOT R. & BOUFFIL F., 1935. Etudes sur la bruche de l'arachide (*Pachymoerus acaciae*) *Bull. Comm. AOF*, 18 : 79-91.
- SAITOU N. & NEI M., 1987. The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 : 406-425.
- SANGER F., NICKLEN S. & COULSON A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 74 : 5463-5467.
- SCHLÖTTERER C., AMOS B. & TAUTZ D., 1991. Conservation of polymorphic simple sequences loci in cetacean species. *Nature*, 354 : 65-65.

- SCHLÖTTERER C. & TAUZ D., 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20 : 211-215.
- SEMBÈNE M., 1997. *Modalités d'infestation de l'arachide par la bruche *Caryedon serratus* (Olivier) en zone soudano-sahélienne : identification morphométrique et génétique de populations sauvages et adaptées*. Thèse 3<sup>ème</sup> cycle, Univ. Cheikh Anta Diop, Dakar, 128 p.
- SEMBÈNE M., BRIZARD J.P. & DELOBEL A., 1998. Allozyme variation among populations of groundnut seed-beetle *Caryedon serratus* (Ol.) (Coleoptera : Bruchidae) in Senegal. *Insect Sciences and its Application*, 18 : 77-86.
- SEMBÈNE M. & DELOBEL A., 1996. Identification morphométrique de populations soudano-sahéliennes de bruche de l'arachide, *Caryedon serratus* (Olivier) (Coleoptera Bruchidae). *Journal of African Zoology*, 110 : 357-366.
- SEMBÈNE M. & DELOBEL A., 1998. Genetic differentiation of groundnut seed-beetle populations in Senegal. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 87 : 171-180.
- SESHADRI C.R., 1962. *Groundnut*. Hyderabad-1. Indian Oilseeds Committee, 274 p.
- SHRIVER M.D., JIN L., CHAKRABORTY R. & BOERWINKLE E., 1993. VNTR allele frequency distribution under the stepwise mutation model. *Genetics*, 134 : 983-993.
- SILVAIN J.F & DELOBEL A., 1998. Phylogeny of west african *Caryedon* (Coleoptera : Bruchidae) : Congruence between molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9 : 533-541.
- SINGER M.C. & THOMAS M.D., 1988. Heritability of oviposition preference and its relationship to offspring performance within a single insect population. *Evolution*, 42 : 977-985.

- SMITH M.A. & CORNELL H.V., 1979. Hopkins host selection in *Nansonia vitripennis* and its implications for sympatric speciation. *Anim. Behav.*, 27 : 365-370.
- SOLIGNAC M., PERIQUET G., ANXOLABEHÈRE D. & PETIT C., 1995. *Génétique et évolution*, Tome 1. *La variation, les gènes dans les populations*, Paris, Hermann, 295 p.
- SOUTHGATE B.J. & POPE R.D., 1957. The groundnut seed beetle, a study of its identity and taxonomic position. *Ann. Mag. Nat. Hist.*, 12 : 669-672.
- STALLING R.L., FORD A.F., NELSON D.C., TORNEY C.E., HILDEBRAND C.E. & MOYZIS R.K., 1991. Evolution and distribution of (GT)<sub>n</sub> repetitive sequences in human genomes. *Genomics* , 10 : 807-815.
- STRAND M., PROLLA T.A., LISKAY R.M. & PETES T.D., 1993. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeasts by mutation affecting DNA mismatch repair. *Nature*, 36 (5) : 274-276.
- STREISINGER G., Y. OKADA, J. EMRICH, A. NEWTON, A. TSUGITA, E. TERZHAGHI & M. INOUYE 1966. Frameshift mutations and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 31 : 77-84.
- SUZUKI D.T., A.J.F. GRIFFITHS, J.H. MILLER & R.C. LEWONTIN, 1991. *Introduction à l'analyse génétique*. Ed. Universitaires, Paris, 768 p.
- SWOFFORD D.L., 1993. Paup version 3.1.1. Program and Documentation. Illinois Natural History Museum, Champeigne.
- SWOFFORD D.L., G.J. OLSEN, P.J. WADDELL & HILLIS D.M. , 1996. Phylogenetic inference . *In* : Hillis D.M., C. Moritz & B.K. Mable (Editeurs), *Molecular Systematics*, second edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, pp. 407-514.

- SWOFFORD D.L. & R.B. SELANDER, 1981. Biosys-1 : a Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Heredity*, 72 : 281-283.
- TABASHNIK B.E., 1983. Host range evolution : the shift from native legume hosts to alfafa by butterfly *Colias philodice eriphyle*. *Evolution*, 37 (1) : 150-162.
- TAUTZ D., 1989. Hypervariability of sample sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17 : 6463-6471.
- TAYLOR A.C., SHERWIN W.B. & WAYNE R.K., 1994. Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked Species : the northern hairy-nosed wombat *Lasiorchilus krefftii*. *Molecular Ecology*, 3 : 277-290 .
- THIBODEAU S.N., BREN G. & SCHAID D., 1993. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*, 260 : 816-819.
- THORPE W.H., 1938. The evolutionary significance of habitat selection. *Am. Evol.*, 14 : 1-5.
- VAIMAN D., MERCIER D., MOAZAMIE-GOUDARZI K., EGGEN A., CIAM-POLINI R., LEPINGLE A., VELMALA R., KAUKINEN J., VARVIO S.L., MARTIN P., LEVEZIEL H. & GUERIN G., 1994. A set of 99 cattle microsatellites-characterization, Synteny mapping and polymorphism. *Mammalian Genome*, 5 : 288-297.
- VAN EMDEN H.F., SPONAGL B., BAKER T., GANGULY S. & DOULUMPAKA S., 1996. Hopkins "host selection", another nail in its coffin. *Physiological Entomology*, 21 : 325-328.
- VELEZ ANGEL R., 1972. El gorgojo del tamarindo, *Caryedon serratus* (Olivier). *Rev. Facultad Nac. Agron. Medellin*, 27 : 71-74.

- VIEIRA DA SILVA J., 1988. Amélioration et physiologie de l'arachide en milieu semi-aride. *Coll. F.I.S.*, Madagascar, pp. 113-120.
- VOGLER A.P. & DESALLE R., 1994. Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the Tiger beetle *Cicindela dorsalis*. *Mol. Biol. Evol.* 11(3) : 393-405.
- WALHUND S., 1928. Zusammensetzung von populationen und korrelationserscheinungen vom Stanpunkt der Vererbungstehre ausbetrachtet. *Hereditas*, 11 : 65-106.
- WEBER J.L. & MAY P.E., 1989. Abudan class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44 : 388-396.
- WEBER J.L., 1990. Informativeness of human (dC-dT)<sub>n</sub>(dG-dA)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, 7 : 524-530.
- WEBER J.L. & WRONG C., 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, 2 : 1123-1128.
- WEIR B.S. & COCKERHAM C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38 : 1358-1370.
- WIKLUND C., 1975. The evolutionary relationship between adult oviposition preferences and larval host-plant in *Papilio machaon* L. *Oecologia* (Berl.), 18 : 185-187.
- WRIGHT S., 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics*, 16 : 97-159.
- WRIGH, S., 1978. *Evolution and the genetics of populations. Vol. 4. Variability within and among natural populations*. University of Chicago, 45 p.
- ZAAZON H.T., 1951. The effect of age on host-selection principle. *Bull. Fond. I. Entom.*, 35 : 167-174.

## **ANNEXES**

## **ANNEXE 1. SCREENING DE LOCUS MICROSATELLITES CHEZ *C. SERRATUS***

### **I. DIGESTION ET RECUPERATION DE L'ADN DE *CARYEDON SERRATUS***

- Mettre 5 µg d'ADN dans un tube et digérer avec l'enzyme SAU 3 A pendant toute la nuit.
- Vérifier avec 2 µl de digestat que la digestion est complète (on obtient un smear).
- Déposer les 48 µl d'ADN restant avec 8 µl de bleu de Bromophénol dans un puits d'un gel d'agarose de 2%.
- Faire migrer environ 1h30 à 100 Volts avec un marqueur de taille.
- Sous la lampe UV, éliminer le gel sous la taille minimum choisie (450 pb dans mon cas). Faire des encoches au niveau de la taille maximum choisie 650 pb et y insérer un petit morceau de membrane DEAE de la taille de l'encoche.
- Inverser le sens de migration pendant 45 min et vérifier que l'ADN est bien sur la membrane.

### **II. ELUTION DE L'ADN**

- Rincer la membrane avec la solution Low Salt Buffer (Tableau 16) puis la transférer dans un tube Eppendorf de 2 ml.
- Eluer l'ADN dans 200 µl de la solution High Salt Buffer (Tableau 16) pendant 20-30 minutes à 68 °C. Bien recouvrir la membrane de cette solution.
- Transférer l'éluant dans un nouveau tube et ajouter à nouveau 200 µl de High Salt Buffer et éluer 15 min à 68 °C.
- Ajouter à l'éluant 400 µl de phénol; bien agiter. Centrifuger à 12 000 rpm pendant 15 min à 4°C afin d'éliminer les résidus de la membrane.
- Récupérer le surnageant (attention : ne pas prélever en même temps le dépôt blanc des protéines sur la paroi interne du tube) dans un nouveau tube et verser 400 µl de chloroforme/alcool isoamyl (24/1). Centrifuger à 12 000 rpm pendant 10 min à 4 °C.
- Récupérer le surnageant et ajouter du n-acrylamide carrier à 1% (acryl linéaire) afin de faciliter la précipitation de l'ADN par l'éthanol absolu. Rincer dans l'éthanol à 70 %. L'ADN est ensuite repris dans 20 µl d'eau stérile.

Tableau 16 : Solution des deux tampons Low et High Salt Buffer

Produits	Low Salt Buffer	High Salt Buffer
Tris pH 8.0	50 mM	50 mM
NaCl	150 mM	1 M
EDTA	10 mM	10 mM

### III. LIGATION

Le tableau 17 donne le mélange à effectuer avec le Kit de ligation Pharmacia selon la taille des fragments d'ADN à insérer dans le vecteur. Le rapport insert/vecteur doit être de 5/1.

Tableau 17 : Mélange à effectuer avec le Kit de Ligation Pharmacia

Produits	Fragments d'ADN de 600 pb en moyenne	Témoin de déphosphorilation
Vecteur pUC 18 (50 ng/μl)	1 μl	1 μl
ADN (25 ng/μl)	2 μl	0 μl
ATP (10 mM)	1 μl	1 μl
Tampon (10 X)	1 μl	1 μl
Ligase	1,6 μl	1,6 μl
H <sub>2</sub> O	3,4 μl	5,4 μl
Volume total	10 μl	10 μl

### IV. TRANSFORMATION

#### IV.1. Vecteur utilisé

Le vecteur pUC 18 *Bam*H I/BAP a une taille de 2586 pb. Il contient un gène de résistance à l'ampicilline, le site de restriction *Pvu*II et *Eco*R I, un multisite de clonage (MCS) comportant un site de restriction de différentes enzymes dont *Bam*H I qui est compatible avec le site de restriction de SAU 3 A, une portion du gène *lacZ* et de son promoteur permettant l'expression des gènes de la β-galactosidase d'*Echerichia coli*.

#### IV.2. Bactérie compétente utilisée

La bactérie XL1Blue est une *E. coli* K12 contenant un épisome F' avec la mutation *lacZ*DM15 (perte de la régulation permettant la sélection des colonies par un test de

coloration bleu/blanc). C'est est un gène de résistance. Son génotype est : End A1hsdR 17 sup E44 thi rec A1 gyrA 96 rel A1 (lac-) F' (pro AB+ lac9 lac ZD15 Tn10).

Le milieu de culture pour les bactéries XL1 Blue est LB. Pour 500 ml de LB soit 20 boîtes de Pétri il faut : 4 g de bactotryptone, 2,5 g d'extrait de levure, 2,5 g de NaCl, eau qsp 500 ml.

Pour le milieu LB agar ajouter 7,5 g de bactoagar (soit 1,5% en concentration finale). Autoclaver, laisser refroidir jusqu'à 55°C et ajouter :

30 mg de tétracycline

50 mg d'ampiciline

30 mg d'IPTG

50 mg X-gal (dissous dans 1 ml de diméthylformamide)

Couler le LB dans des boîtes de Pétri.

#### IV.3. Le crible blanc/bleu

L'incorporation du vecteur pUC 18 dans une bactérie compétente entraîne une  $\alpha$ -complémentation pour la  $\beta$ -galactosidase. En effet, ni le fragment codé par le gène de l'hôte (portion carboxyl-terminale), ni le fragment porté par le vecteur (segment proximal opérateur du gène LacZ) ne sont actifs isolément. Mais si les deux fragments sont mis en présence, on a synthèse d'une  $\beta$ -galactosidase active. Les colonies des bactéries Lac<sup>+</sup> qui en résultent sont reconnues par leur coloration bleue sur un substrat chromogène tel que le X-gal, et un inducteur puissant, l'IPTG. La construction d'un plasmide recombinant par insertion d'un fragment d'ADN au site MCS du vecteur pUC18 provoque la rupture de la phase de lecture du plasmide et donc l'impossibilité de réaliser une  $\alpha$ -complémentation. Les colonies possédant ce plasmide recombiné apparaissent donc de couleur blanche et non bleue en présence de substrat chromogène. En outre, la sélection entre les bactéries transformées et celles qui ne possèdent pas de plasmide se fait grâce au gène de résistance à l'ampicilline (antibiotique) présent dans le plasmide. Etalées sur un milieu sélectif (contenant un substrat chromogène et de l'ampiciline), les premières survivent alors que les secondes meurent. Ainsi les colonies blanches résultantes sont celles qui contiennent un plasmide recombinant et qui seront choisies par la suite.

Toutes les étapes de la transformation se font en conditions stériles et les pointes à filters sont utilisées pour le prélèvement des solutions à la pipette.

- Disposer les cellules compétentes XL1-Blue sur de la glace.
- Remuer doucement les cellules à la main. Verser 50 µl des cellules compétentes dans un tube Falcon 2059 de 15 ml, y ajouter 0,85 µl de β-mercaptoéthanol frais dilué au 1/10 (solution :14,2 M).
- Remuer doucement le contenu et laisser les cellules compétentes incuber pendant 10 min sur de la glace en agitant légèrement le tube toutes les 2 min.
- Ajouter aux cellules 5 ng d'ADN (1 µl) et mélanger doucement avec la pipette. On réalise deux transformations par type de fragments d'ADN (les "petites" tailles d'environ 300 pb et "les grandes" de 625 pb approximativement). Deux tubes Falcon supplémentaires sont également nécessaires pour les témoins : le témoin de déphosphorylation et le témoin de transformation. Ce dernier correspond à un plasmide pUC18 non recombiné qui induira sur milieu de culture des bactéries bleues.
- Laisser incuber les différents tubes dans la glace pendant 30 min.
- Passer les tubes dans un bain-marie à 42 ° C pendant 45 secondes. La durée de ce choc thermique est critique pour le succès de la manipulation
- Incuber les tubes dans la glace pendant 2 min.
- Ajouter 1 ml du milieu LB (milieu de culture sans agar) par tube et laisser incuber pendant une heure à 37 °C en les remuant à 225-250 rpm.
- Centrifuger ensuite les tubes à 5000 rpm, éliminer 700 µl de surnageant pour chacun des tubes.
- Etaler 3 boîtes de Pétri par tube de transformation, à raison de 100µl de milieu LB par boîte (bien stériliser l'étaioir en le passant à la flamme).
- Laisser une nuit à l'étuve à 37 °C sans empiler les boîtes de Pétri. Nous avons au total 7 transformations x 2 boîtes/transformations = 14 boîtes + 2 boîtes correspondant aux 2 témoins, soit 16 boîtes de Pétri contenant un milieu LB + X-gal avec les deux antibiotiques (l'ampiciline et la tétracycline).

## V. REPIQUAGE

- Préparer les 20 boîtes de Pétri avec le milieu LB sans antibiotiques.
- Pratiquer un double repiquage à partir des 14 boîtes mère.
- A l'aide d'un cure-dent stérile par colonie, transplanter les clones les uns après les autres dans la même case des deux boîtes identiques des deux séries.

- Mettre les boîtes à 37 °C pendant toute une nuit.
- Puis à 4 °C le lendemain matin pour stopper la croissance des colonies bactériennes.

## **VI. TRANSFERT DE LA BANQUE GENOMIQUE PARTIELLE SUR MEMBRANE DE NYLON**

Les membranes utilisées sont des membranes N+ 5Amersham-N Nylon, 0,45 µ, 82 mm, de la taille des boîtes de Pétri. Il est nécessaire de les manipuler avec des gants et des pinces uniquement. Avant le transfert, les membranes sont numérotées et orientées à l'aide d'un système de repérage à trois points.

3 solutions sont à préparer à cette étape (1 litre pour chaque solution) :

- solution 1 : NaOH 0,5M, NaCl 1,5M
- solution 2 : Tris HCl 0,5M à pH 7,5, NaCl 1,5M
- solution 3 : 2X SSC (pour neutraliser)
- Prendre une membrane et la déposer délicatement pendant 2 minutes sur la matrice bactérienne quadrillée et reporter les marques de la membrane sur le socle de la boîte et sur le couvercle. Une double épaisseur de papier Whatman 3M est utilisée afin de réaliser les traitements par capillarité. Attention, l'empreinte bactérienne doit se trouver sur le dessus.
- Laisser la membrane 10 min sur le papier Whatman imbibé de solution 1 (cela fait éclater les bactéries).
- Laisser 5 min sur le papier Whatman imbibé de solution 2 (dénaturation de l'ADN).
- Enfin, laisser 5 min sur le papier Whatman imbibé de la solution 3. L'ADN est ensuite fixé en mettant les membranes pendant 1h à 80 °C sur du papier Whatman sec.

## **VII. DEPROTEINISATION, PREHYBRIDATION ET HYBRIDATION**

Trois solutions sont utilisées

- Tampon d'hybridation (1 litre) : 5X SSC, solution de blocage à 10% (soit 10g pour 100ml), SDS 0,002%, N-lauroylsarkosine 0,1%, eau distillée qsp 1l
- Solution R1 : 2X SSC, SDS 0,1%, eau distillée qsp 1l.
- Solution R2 : 1X SSC, SDS 0,1%, eau distillée qsp 1l.

Toutes les étapes sont réalisées dans un four à hybridation à 50° C (Techne hybridiser HB-1D) à raison de 5 membranes par tube. Toutes les solutions doivent être préchauffées à la température voulue avant de s'en servir. La déprotéinisation est tout d'abord effectuée dans les tubes en y ajoutant 50 ml de solution R1 ainsi que 0,1 mg/ml de protéinase K. C'est une

étape fondamentale car elle permet d'éliminer la majeure partie du bruit de fond. Les membranes sont ensuite rincées par deux fois dans 50 ml de solution R1 pendant 10 min.

Une étape de préhybridation est ensuite réalisée pendant 2h dans 30 ml de tampon d'hybridation avec 150 µl de poly A (condition de saturation) afin d'éviter la détection (ou screening) des polyT qui gêne alors celle des vrais microsatellites.

Vient après l'hybridation qui dure entre 10 et 12 heures, dans 6 ml de tampon d'hybridation avec 30 µl de chaque type de sonde (six en tout : (TG)10, (TC)10, (CAC)5, (CCT)5, (ATCT)5 et (TGTA)6 à raison de 20 pmol de chaque) dont deux sont fournies par le Kit Boehringer (marquage Dig-Olimer) et 30 µl de polyA. Un double rinçage est encore effectué pendant 15 min dans la solution R1 puis dans la solution R2.

Afin de contrôler l'efficacité de la solution de détection, on utilise comme témoin de détection la sonde (TG)10 que l'on dépose sur une des cases vides de la membrane. Une couleur violette devra être obtenue à l'endroit du dépôt de cette sonde.

### VIII. DÉTECTION DES CLONES POSITIFS

La détection se fait grâce au Kit Boehringer. Plusieurs solutions sont à réaliser :

- Tampon 1 (Tp1) : 1 litre à autoclaver (stérilisation à 120°C)  
NaCl 0,15 M  
NaOH ajuster le pH à 7,5
- BSS (Blocking Stock Solution) à autoclaver, conserver à 4 °C  
Blocking reagent dilué à 10% dans Tampon 1
- Tampon 2 (Tp2) : 900 ml  
BSS 1 vol.  
Tampon 1 9 vol.
- Tampon 3 : (Tp3) : 660 ml, le laisser à température ambiante  
Tris HCl pH 8 0,1 M  
NaCl 0,1 M  
MgCl<sub>2</sub> 50 mM  
Ajuster le pH à 9,5
- Solution de détection : Par boîte de Pétri (14 cm)

- Tampon 3 30 ml

NTB 135  $\mu$ l

BCIP (X-phosphate) 105  $\mu$ l

- Les membranes sont rincées dans 50 ml de tampon Tp1 pendant 5 min à 50 °C. La détection des clones positifs (contenant normalement des microsattellites) va donc se faire à l'aide du DIG Nucleic Acid Detection Kit (Boehringer). Les sites aspécifiques sont bloqués par ajout de 100 ml de tampon Tp2 pendant 45 min à 50° C. Les tubes étanches sont ensuite refroidis sous l'eau et mis en incubation à température ambiante dans 50 ml de Tp2 et 10  $\mu$ l d'antiDIG-AP-Conjugate (anticorps) pendant 30 min.
- Deux rinçages de 15 min chacun dans le tampon Tp1 (75 ml/tube) sont réalisés, puis un troisième s'effectue dans le tampon Tp3 pendant 5 min à raison de 50 ml par tube.
- Après cette série de rinçages, chaque membrane est placée dans une boîte de Pétri et incubée à l'abri de la lumière à température ambiante, dans 10 ml de solution de détection pendant une à trois heures. La réaction terminée, les clones porteurs de microsattellites apparaissent en violet, les clones négatifs, en jaune très pâle. Il ne reste plus qu'à rincer les membranes à l'eau distillée, les faire sécher puis repérer les clones positifs. L'intensité de la couleur violette des clones positifs est fonction de leur teneur plus ou moins importante en microsattellites. On note leur intensité de 1 à 10 afin de se donner des priorités pour les étapes ultérieures.

Des minipréparations d'ADN sont réalisées à partir des clones présentant un signal positif.

## **IX. MINIPREPARATION D'ADN**

### **IX.1. Préculture**

- Prélever en condition stérile 2 ml de milieu LB; ajouter 20  $\mu$ l d'ampiciline (5 mg/ml) et 20  $\mu$ l de tétracycline (2,5 mg/ml)..
- Ensemencer avec les clones repérés sur les boîtes.
- Mettre sous agitation à 250 rpm pendant 1 nuit à 37 °C.

### **IX.2. Minipréparation**

- Vider les précultures dans un tube de 2 ml.
- Culotter les bactéries en centrifugeant à température ambiante 5 min à 12 000 rpm.

- Vider le surnageant dans de l'eau de javel.
- Ajouter un ml de TE froid (10,1). Vortexer pour bien laver.
- Centrifuger 5 min à 12 000 rpm à 4 °C.
- Vider le surnageant à la pipette.
- Ajouter 150 µl de TE. Vortexer pour bien homogénéiser.
- Laisser les tubes 5 min dans la glace.
- Faire la lyse alcaline avec le mélange suivant préparé au moment de l'emploi :
 

Pour 24 tubes	NaOH (1 N)	2 ml
	Eau stérile	7,5 ml
	SDS (20%)	500 µl
- Mettre 260 µl de ce mélange dans chaque tube et agiter légèrement à la main.
- Laisser les tubes 5 min dans la glace.
- Neutraliser avec 195 µl d'acétate de potassium (3M, pH 5.3). Agiter légèrement.
- Laisser les tubes 5 min dans la glace.
- Centrifuger 10 min à 12 000 rpm à 4°C.
- Récupérer le surnageant
- Faire un phénol/chloroforme puis un chloroforme/isoamyl.
- Ajouter 2 volumes d'éthanol absolu et précipiter 10 min dans l'azote liquide ou une nuit au congélateur à -20 °C.
- Centrifuger 15 min à 12 000 rpm à 4 °C
- Vider le surnageant et laver avec 1 ml d'éthanol 70%.
- Centrifuger 10 min à 12 000 rpm à 4 °C
- Sécher et reprendre les culots dans 35 µl d'eau stérile
- Pour vérifier s'il y a un insert, faire une digestion avec le mélange suivant :
 

2 µl de minipréparation
1 µl de tampon
1 µl PVU II (1 unité)
0,2 µl de Rnase
Eau qsp 10 µl
- laisser digérer 1 heure à 37 °C.
- Mettre 5 µl de bleu de bromphénol dans chaque tube.
- Faire migrer sur un minigel d'agarose à 1,4%.

## **X. RNASE DES MINIPREPARATIONS**

- Allumer le bain marie à 37 °C
- Prendre 33 µl de miniprep, puis ajouter 167 µl d'eau stérile (PPI) (qsp 200 µl)
- Mettre 2 µl de Rnase et digérer pendant 1 heure à 37 °C.
- Petite centrifugation pour tout reculotter
- Ajouter 200 µl de phénol-chloroforme-isoamyl.
- Centrifuger 15 mn à 4 °C à 12 000 rpm.
- Récupérer environ 180 µl du surnageant, puis ajouter 1/10 du volume d'acétate de sodium et 2 volumes d'éthanol absolu froid.
- Précipiter dans l'azote liquide pendant 10 min ou au congélateur à -20 pendant une nuit.
- Centrifuger 20 min à 4 °C à 12000 rpm.
- Jeter l'alcool et ajouter entre 500 et 700 µl d'éthanol 70% froid.
- Centrifuger 10 min à 4°C à 12000 rpm.
- Eliminer l'alcool à la pipette, mettre les tubes dans le dessiccateur pendant 15 min.
- Reprendre l'ADN dans 20 µl d'eau stérile PPI.

## **XI. SEQUENÇAGE DES MINIPREPARATIONS**

Deux méthodes de séquençage sont utilisées dans notre laboratoire : la méthode manuelle de Sanger (1977) et le séquençage automatique.

### **I.2.4.1. Séquençage manuel (Méthode de Sanger)**

La méthode mise au point par Sanger de séquençage enzymatique par incorporation de didésoxyribonucléotides terminateurs de chaîne a été universellement adoptée. L'absence d'un hydroxyle en 3' au niveau d'un didésoxyribonucléotide ne permet pas la formation d'une liaison phosphodiester : la conséquence est un arrêt de l'élongation lorsqu'un didésoxyribonucléotide est incorporé dans un brin d'ADN en synthèse. Ce phénomène est à la base de la méthode de Sanger (1977). L'ADN à séquencer doit être monocaténaire. Une amorce est hybridée en aval de la région à séquencer. Après addition d'ADN polymérase et des 4 dNTP dont l'un est marqué par un isotope radioactif, le mélange est réparti en 4 tubes ; dans chaque tube est ajouté un didésoxyribonucléotide (ddNTP) différent. Dans le tube A par exemple, on ajoute du ddATP. Par réplication va être

synthétisé un brin complémentaire du brin à séquencer, mais la réplication va être interrompue par incorporation du ddATP. Si le ddATP et le dATP ont été ajoutés dans un rapport de concentration adéquat (de l'ordre de 1%), les interruptions de réplication sont statistiquement réparties sur toutes les occurrences de la base A dans le brin néosynthétisé. Une «chasse» est ensuite réalisée par ajout en excès des 4 dNTP de manière à poursuivre l'élongation des chaînes non interrompues. Par suite de leur grande taille, elles ne gêneront pas la lecture de la séquence sur le gel de polyacrylamide. Puis la réplication est stoppée par ajout d'une solution dénaturante.

Le contenu de chaque tube est ensuite analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide (à 6 ou 8 %), en conditions dénaturantes (en présence d'urée). Les différents oligonucléotides formés sont séparés en fonction de leur taille, à la base près. Après migration, ils sont visualisés par autoradiographie. Dans le puits A, chaque bande correspond à un oligonucléotide dont la synthèse a été interrompue par le ddATP et qui compte donc la base A en position 3' terminal. Tous les oligonucléotides se terminant par un A étant présents, toutes les positions de la base A dans le brin néosynthétisé pourront être déterminées. En comparant les positions relatives des différentes bandes dans les 4 puits, on peut ainsi déterminer les positions relatives des différentes bases et lire en partant du bas du gel, la séquence 5'-----3' du brin synthétisé. La séquence du brin matrice complémentaire et antiparallèle peut être déduite. Environ 300 bases sont lisibles sur un gel de 40 cm. Le séquençage des minipreps est effectué à l'aide du kit "T7 sequencing".

### **XI.1. Préparation de l'ADN**

- Allumer le thermoline à 37 °C.
- Ajouter 1 µl de soude (2N) à 9 µl de la minipréparation (=500 ng d'ADN), vortexer, centrifuger et incuber 10 à 15 min à 37 °C.
- Ajouter 2 µl du primer universel ou reverse (à 5 µM) et mélanger à la pipette.
- Neutraliser avec 3 µl d'acétate de potassium (3M, pH 5,2).
- Précipiter avec 75 µl d'éthanol absolu, vortexer et plonger les tubes 10 minutes dans de l'azote liquide ou 4 heures à -80.
- Centrifuger 15 min à 12 000 rpm.
- Vider le surnageant à la pipette, sécher et reprendre le mélange ADN/amorce dans 12 µl d'eau stérile et 2 µl d'*annealing buffer* (Pharmacia).

## XI.2. Séquençage

- Marquer pour chaque clone 4 tubes (G, A, T, C) et y ajouter respectivement 2,5 µl des mélanges de séquençage (Nucléotides *Mixshort*, Pharmacia).
- Diluer la T7 DNA polymérase à 1,5 u/µl avec l'enzyme dilution buffer (Pharmacia), mélanger à la pipette et plonger la solution dans la glace.
- Préparer le mélange de séquençage comprenant pour chaque clone :

Tableau 18 : Mélange de séquençage (T7 sequencing kit, Pharmacia)

Produits	Volumes
Labelling mix (Pharmacia)	3µl
T7 polymérase diluée (1,5u/µl)	2 µl
DATP marqué (35S)	0,5 µl
Eau stérile	qsp 7 µl

- Mélanger à la pipette et garder le mélange de séquençage dans de la glace.
- Ajouter 6 µl du mélange de séquençage à chaque tube d'ADN/amorce, mélanger à la pipette et laisser incuber 5 minutes à température ambiante (18 à 20 °C).
- Faire chauffer, dans le thermoline, les mélanges de séquençage à 37 °C (Nucléotides *Mixshort*, Pharmacia).
- Mélanger à la pipette 4,5 µl de la solution marquée à chacun des mélanges de séquençage et laisser incuber 5 minutes à 37 °C.
- Arrêter la réaction en ajoutant 5 µl de solution stop (Pharmacia) en mélangeant à la pipette. Attention à bien respecter le décalage temporel de chaque tube.
- Conserver les séquences à -20 °C avant migration (demi vie du <sup>35</sup>S : 2 mois).

Faire migrer les séquences sur un gel dénaturant de polyacrylamide-urée à 6% d'acryl.  
Révéler ces séquences par autoradiographie

### Réaction de séquence

Terminator Mix 7 µl

Miniprep Rnasée x µl (à définir suivant le résultat de la Rnase sur gel d'agarose 0,8 %).

Amorce (PU ou PR) 1 µl

H2O PPI qsp pour 20 µl

Purification du produit de séquence

- Préparer un tube de 0,5 ml pour chaque séquence.
- Mettre 2  $\mu$ l d'acétate de sodium, 50  $\mu$ l d'éthanol absolu froid et 20  $\mu$ l de produit de séquence.
- Vortexer et centrifuger brièvement.
- Placer les tubes dans de la glace pendant 10 mn.
- Centrifuger 30 mn à température ambiante à 12000 rpm (centrifugeuse de pailasse).
- Retirer l'éthanol à la pipette, laver dans 350  $\mu$ l d'éthanol à 70 % à température ambiante
- Centrifuger 5 min à température ambiante (centrifugeuse de pailasse).
- Vider le surnageant à la pipette puis sécher les culots et les entreposer dans le congélateur.

**ANNEXE 2 : GENOTYPES DES 16 POPULATIONS DE *C. SERRATUS* POUR 5 LOCUS ETUDIES.**

Chaque population comprend 35 individus d'où un total de 560 individus. Les chiffres représentent les tailles réelles des allèles.

Locus  
M1425  
M625  
M836  
M97  
M984

POP					
AF01,	197197	209209	000000	226226	282282
AF02,	189187	233221	280280	254254	282282
AF03,	197187	221221	280269	248226	265265
AF04,	197197	221221	280269	254254	282265
AF05,	189187	209201	280280	226226	273273
AF06,	197197	209209	268268	254254	000000
AF07,	197189	209209	280268	248226	265265
AF08,	193189	221221	280280	254226	265265
AF09,	197189	221217	280280	254226	265265
AF10,	197189	221217	000000	226226	267265
AF11,	197193	221221	280280	254226	267265
AF12,	197189	221221	280280	254226	277265
AF13,	193193	217209	280280	254254	282265
AF14,	197193	221217	280280	226226	265265
AF15,	193193	221217	280280	254226	273265
AF16,	197193	209209	268268	254226	265265
AF17,	193193	209209	280280	226226	273265
AF18,	193193	217217	280268	226226	265265
AF19,	193193	209209	280280	248226	273273
AF20,	193193	221209	280280	254226	265265
AF21,	197193	217209	268268	254226	282265
AF22,	197197	217209	268268	254226	265265
AF23,	197197	221209	280268	226226	265265
AF24,	197193	217209	280268	254254	273265
AF25,	197193	221209	280268	254254	273265
AF26,	197197	221209	280268	254226	273265
AF27,	197193	221209	280268	248226	273265
AF28,	197197	221209	268268	226226	273265
AF29,	197193	217209	280268	254254	282282
AF30,	193193	221209	280268	254226	265265
AF31,	197193	221221	280268	254226	273265
AF32,	197193	221209	280268	254226	265265
AF33,	197197	221209	269269	226226	282265
AF34,	197193	221209	280268	254226	265265
AF35,	197193	221217	280269	254254	273265

## POP

BF01,	201201	225225	282282	242242	278278
BF02,	201185	225211	290282	242242	278278
BF03,	201185	225207	290270	242232	278278
BF04,	201185	225207	292270	242242	271271
BF05,	201201	000000	290278	238238	264264
BF06,	191191	225211	282278	238238	275264
BF07,	191191	229225	290282	244242	278264
BF08,	191191	225225	290270	242242	278264
BF09,	201201	225225	282282	242238	275264
BF10,	191191	225211	282282	242238	278264
BF11,	201185	211211	282268	238238	278278
BF12,	201185	211211	282282	242242	278271
BF13,	201191	211211	282282	242242	271271
BF14,	191191	211211	278270	238238	278271
BF15,	191191	225225	278270	242238	278271
BF16,	201201	225225	278262	242242	278271
BF17,	201201	225211	290278	238238	278271
BF18,	201191	225207	290270	242242	278271
BF19,	201201	225207	290278	242242	278278
BF20,	000000	225207	290290	242242	278278
BF21,	201191	225207	290282	242238	278271
BF22,	201191	225225	290282	242238	278264
BF23,	201201	225211	290270	242238	278271
BF24,	201201	211211	290290	238238	278278
BF25,	201191	225211	290282	242238	264264
BF26,	201191	225211	290282	242238	264264
BF27,	201191	225225	282278	242238	278271
BF28,	201201	225211	290278	242238	278264
BF29,	201191	225225	290282	242238	278271
BF30,	201201	225211	290282	238238	278264
BF31,	201191	225211	282282	242238	278278
BF32,	201201	225225	290282	242238	278264
BF33,	191191	225211	282268	242238	278278
BF34,	201191	225211	278270	242238	278267
BF35,	201191	225225	278278	242238	278264

## POP

PF01,	197193	221209	280268	226226	290273
PF02,	197197	209209	280269	226226	290273
PF03,	189187	209209	280269	254254	290273
PF04,	187187	233209	280280	254226	290290
PF05,	195187	217201	268268	254226	290290
PF06,	187187	217201	268268	254226	290282
PF07,	197187	231209	276268	248226	290290
PF08,	211193	217209	276268	226226	290282
PF09,	187187	231209	280274	254226	290290
PF10,	211193	209209	274260	226226	290290
PF11,	187187	209209	280280	254226	292290
PF12,	187187	209209	280280	248226	290290
PF13,	193193	209209	280280	248248	290265

PF14,	197187	209201	280280	248226	273273
PF15,	187187	231221	280280	226226	265265
PF16,	197197	209209	274260	226226	290290
PF17,	197187	201201	268268	226226	290282
PF18,	187187	209209	268268	254226	290290
PF19,	197193	221201	280280	226226	282282
PF20,	197193	209209	268260	254254	290273
PF21,	197187	217217	280268	254226	290273
PF22,	197197	209201	280268	248226	290290
PF23,	197187	209209	280268	254226	290282
PF24,	197193	217209	280268	226226	290282
PF25,	197187	209209	280268	248226	282282
PF26,	197193	217209	280268	248248	290265
PF27,	197187	217209	280268	226226	290282
PF28,	197197	217217	268268	226226	290290
PF29,	193187	217209	280268	254226	290282
PF30,	197197	209201	280276	248226	290282
PF31,	193187	209209	280268	248226	290290
PF32,	197193	217217	280268	226226	290282
PF33,	197187	217209	280280	248226	290282
PF34,	197187	209209	280268	254226	290290
PF35,	197193	217209	280280	248226	290273

POP

TF01,	195195	219215	272262	232232	277277
TF02,	211195	219219	272272	248248	277277
TF03,	195187	215215	268262	232232	269269
TF04,	203187	215215	262262	232232	269269
TF05,	205195	219215	262262	232232	269269
TF06,	203187	215209	272262	232232	269269
TF07,	197189	225219	270260	232232	277269
TF08,	197195	233219	262260	232232	277277
TF09,	203187	229215	262262	232232	277277
TF10,	195195	217215	262260	232232	277277
TF11,	189189	231209	262262	232232	277269
TF12,	189189	215215	272272	248232	277269
TF13,	195189	231215	272272	232226	269269
TF14,	195189	215215	272262	232232	277277
TF15,	195195	215215	272272	232232	277269
TF16,	187187	219201	272262	232232	269269
TF17,	213195	219219	272262	232232	269269
TF18,	195195	229215	272262	232232	269269
TF19,	195187	215209	272262	232232	277269
TF20,	195195	219215	262262	232232	277269
TF21,	195189	215215	262262	248232	277269
TF22,	211195	219215	272262	248232	277269
TF23,	195195	219215	262262	232232	277277
TF24,	195187	219219	272262	248232	269269
TF25,	195189	219215	272262	248232	277269
TF26,	195187	219215	272262	248232	277269

TF27,	195189	219215	272272	232232	269269
TF28,	195187	219219	272262	248232	277269
TF29,	195189	219215	262262	232232	277269
TF30,	195187	215215	272262	248232	277269
TF31,	195189	219215	272262	248232	277269
TF32,	195189	215215	272272	232232	277269
TF33,	189189	215215	272262	248232	277269
TF34,	195195	219215	272272	232232	277277
TF35,	195189	215215	262262	248232	277277
POP					
AK01,	197197	221221	280280	226226	265265
AK02,	197197	209209	280280	226226	265265
AK03,	197187	209201	280258	254254	290265
AK04,	197187	217217	280280	226226	267265
AK05,	197187	209209	280280	226226	265265
AK06,	197197	209209	000000	254254	273265
AK07,	197189	221221	268268	254226	000000
AK08,	197197	221201	268268	254226	282282
AK09,	197193	221209	268268	254226	290273
AK10,	197197	221201	280280	226226	000000
AK11,	193193	221209	280280	248226	265265
AK12,	193193	209209	280280	254226	265265
AK13,	197197	221209	280280	254226	265265
AK14,	197197	209209	280269	226226	280265
AK15,	197197	219209	280268	226226	273265
AK16,	197187	221209	280280	226226	273265
AK17,	187187	221221	280280	254254	273273
AK18,	193193	209201	280258	254226	273273
AK19,	193193	209209	280280	254226	273265
AK20,	201193	229209	000000	226226	265265
AK21,	197193	221209	280268	226226	265265
AK22,	197193	221217	280280	226226	282265
AK23,	197193	221217	280268	254226	265265
AK24,	193193	221221	269269	254254	282265
AK25,	197193	217217	280268	226226	265265
AK26,	197193	221209	280268	254226	273265
AK27,	197193	221217	280269	254226	273273
AK28,	193193	221217	280268	254254	265265
AK29,	197193	221221	280280	254226	273265
AK30,	197193	221221	280268	226226	265265
AK31,	197193	221209	280269	254226	265265
AK32,	197193	221221	268268	254226	273265
AK33,	197193	221209	280269	254254	273273
AK34,	193193	221217	280268	226226	265265
AK35,	197193	221217	280268	254254	265265
POP					
BK01,	201201	225193	290278	242242	278264
BK02,	201191	211211	290270	242238	278278
BK03,	191191	225193	290270	238238	278278
BK04,	201191	225193	290282	238232	271271

BK05,	201201	211211	290282	244232	271271
BK06,	201201	225211	290290	242238	264264
BK07,	191191	211211	282278	242238	275264
BK08,	191191	225225	290278	242242	278275
BK09,	201185	211211	290290	242242	275264
BK10,	191191	211211	290290	242242	264264
BK11,	201201	225225	282282	242242	271271
BK12,	191191	225211	282282	242242	271271
BK13,	191191	211211	290270	238238	271271
BK14,	201191	211211	290270	238238	271271
BK15,	201191	225211	282268	238232	271271
BK16,	191191	225193	278278	238238	278264
BK17,	201201	211211	290282	242238	278278
BK18,	201191	225193	290278	248238	278264
BK19,	191191	211211	290278	248238	278264
BK20,	201191	225211	290282	238238	278264
BK21,	201191	225225	290278	242238	278278
BK22,	201191	225211	290278	242242	278271
BK23,	201201	225225	290270	242238	278271
BK24,	201191	225211	290282	242238	278271
BK25,	201191	225211	290282	242238	278271
BK26,	201201	225211	282282	242238	278264
BK27,	201191	225211	282282	238238	278271
BK28,	201201	225225	290278	242238	278271
BK29,	201191	225211	290282	242238	278271
BK30,	201191	225225	290282	238232	278271
BK31,	201191	225211	282282	238238	271264
BK32,	201191	225211	282282	242238	278271
BK33,	201201	225225	278270	242238	278271
BK34,	201191	225211	278270	242238	278271
BK35,	201201	225211	290282	242238	275271
POP					
PK01,	187187	233209	280268	254254	290290
PK02,	195187	209201	280280	226226	290282
PK03,	197193	209209	280269	254226	290290
PK04,	187187	209201	280269	254226	290265
PK05,	187187	233209	280280	248226	290290
PK06,	211187	233209	276268	254254	292290
PK07,	187187	233209	268268	226226	290282
PK08,	187187	209209	276268	226226	290290
PK09,	187187	209201	284268	248248	290282
PK10,	211187	221209	284280	226226	290290
PK11,	187187	209209	268268	226226	282282
PK12,	187187	221217	268268	226226	290282
PK13,	187187	209209	280262	254226	290290
PK14,	197187	219217	280280	254226	290290
PK15,	187187	231209	280268	254226	290265
PK16,	197197	209209	268268	226226	290282
PK17,	197197	229229	280268	226226	290265
PK18,	197197	221201	268268	226226	290290

PK19,	187187	221221	280268	254254	290282
PK20,	197197	221221	268268	226226	290290
PK21,	197187	217217	280280	254254	290282
PK22,	195187	217217	280280	254226	290273
PK23,	197187	209209	280268	254226	273273
PK24,	197187	217201	280268	254226	290273
PK25,	197187	209209	280268	248226	290282
PK26,	197187	217209	280269	226226	290282
PK27,	187187	217209	280268	254254	290290
PK28,	197187	221209	276268	254226	290273
PK29,	197187	209209	276268	254226	290282
PK30,	197187	217209	276268	248226	282282
PK31,	197187	217209	280268	254226	290282
PK32,	197197	217209	268268	254254	282282
PK33,	187187	209209	280262	254226	290273
PK34,	197197	217209	280280	254226	290273
PK35,	197187	221209	280268	254226	290273
POP					
TK01,	205195	219219	272272	244232	277277
TK02,	205195	219219	272272	248248	277277
TK03,	195187	219219	262260	232232	277277
TK04,	207195	215215	282262	232232	269269
TK05,	205187	215215	272260	232232	269269
TK06,	197193	221215	262262	232232	277269
TK07,	195187	219215	272262	232232	280273
TK08,	195189	229219	272262	232232	269269
TK09,	203195	219215	272262	242232	269269
TK10,	197193	221201	262262	244232	277273
TK11,	195195	215215	272272	232232	277277
TK12,	195195	219219	272272	232232	277277
TK13,	195195	215215	272262	238232	277277
TK14,	195189	219219	262262	238232	277277
TK15,	189189	231219	272262	232232	277277
TK16,	195195	233215	272272	232226	269269
TK17,	195189	215209	272272	232226	269269
TK18,	195191	233215	262262	232232	269269
TK19,	189189	229215	272260	232232	269269
TK20,	195191	215215	272262	232232	269269
TK21,	195189	219215	262262	248232	277269
TK22,	195195	215215	262262	248232	277269
TK23,	195189	219215	272262	248232	277269
TK24,	195195	215215	272262	232232	269269
TK25,	189189	219215	272262	232232	277269
TK26,	195189	219215	272272	248232	277269
TK27,	195189	219215	272262	232232	277269
TK28,	195189	219219	262262	248232	277269
TK29,	195189	219215	272262	232232	277277
TK30,	195189	219215	262262	232232	277269
TK31,	195195	219219	272262	232232	277269
TK32,	195189	215215	272272	248232	277269

TK33,	195195	219219	262262	232226	277269
TK34,	195189	219215	272262	232226	277269
TK35,	195189	219215	272272	248232	277277
POP					
AL01,	193189	221209	280280	254226	269265
AL02,	197189	201201	280280	226226	265265
AL03,	197197	217201	000000	000000	290265
AL04,	197189	217217	280280	226226	265265
AL05,	197189	209201	258258	226226	265265
AL06,	193189	209209	284268	226226	273265
AL07,	193189	225217	284268	226226	265265
AL08,	193187	221221	000000	226226	265265
AL09,	193187	221221	268268	226226	267267
AL10,	197197	221209	268268	226226	265265
AL11,	193193	221221	280268	248248	282265
AL12,	193193	221209	280258	254254	265265
AL13,	197197	221221	280268	248226	265265
AL14,	197193	221221	268268	254226	273265
AL15,	197197	221217	268268	254226	282265
AL16,	193193	221221	280258	254254	265265
AL17,	197197	221201	280280	226226	265265
AL18,	197197	221209	000000	000000	278265
AL19,	197197	221221	280280	248226	265265
AL20,	193187	221221	280280	000000	265265
AL21,	193193	221217	280258	226226	269265
AL22,	197193	221221	280268	254226	265265
AL23,	197193	221201	280268	000000	290265
AL24,	197193	221217	280280	254226	265265
AL25,	197193	217217	280268	226226	265265
AL26,	197193	221217	280258	254226	273265
AL27,	193193	221209	280268	254226	265265
AL28,	197193	221221	280268	254226	265265
AL29,	197189	221217	280280	254226	273273
AL30,	197193	221217	268268	254226	265265
AL31,	193193	221217	280268	254254	265265
AL32,	193189	221221	280268	254254	273265
AL33,	193193	221221	280280	254254	265265
AL34,	197193	221209	268268	226226	265265
AL35,	193189	221221	280268	254226	273265
POP					
BL01,	191191	225225	278278	242238	278271
BL02,	201191	225225	278278	238238	278278
BL03,	201201	225193	290278	242242	278278
BL04,	201191	225193	282282	242238	271271
BL05,	201185	211211	292282	238238	278264
BL06,	201191	225225	290270	244242	271271
BL07,	201201	225211	282282	242238	278278
BL08,	201201	211211	282282	238238	278278
BL09,	201201	225207	282282	238238	278278
BL10,	201191	225225	282282	242238	278278

BL11,	201201	225225	282282	238238	278267
BL12,	201185	225211	282278	242242	271271
BL13,	201185	225211	282262	244232	278278
BL14,	201191	211211	278278	242242	278278
BL15,	191191	211211	282282	242242	275271
BL16,	201201	225225	290270	244242	271271
BL17,	201201	225225	290290	238238	271271
BL18,	191191	225211	290270	242242	271271
BL19,	201191	225211	282278	238238	278264
BL20,	191191	225211	290270	242238	278264
BL21,	201191	225225	290278	242238	278271
BL22,	201201	225211	290282	242242	278264
BL23,	201191	225211	290282	242238	278271
BL24,	201191	225225	290282	242242	278271
BL25,	201185	225211	290278	242238	278271
BL26,	201191	225225	290282	244242	278271
BL27,	201191	225211	290290	242238	278271
BL28,	201201	211211	282280	242238	278271
BL29,	201191	225211	290282	242238	278264
BL30,	201191	225211	290290	242238	278271
BL31,	201201	225225	290282	238238	278264
BL32,	201201	225211	282282	242238	278271
BL33,	201201	225211	290282	242238	278271
BL34,	201201	225211	282280	242242	278271
BL35,	201191	225211	290282	242238	278271
POP					
PL01,	195187	221217	268262	226226	273273
PL02,	187187	233217	280280	248226	290273
PL03,	187187	221217	268258	226226	290273
PL04,	187187	217217	284268	248226	290290
PL05,	187187	217217	268268	254226	292290
PL06,	187187	209209	276268	226226	290265
PL07,	187187	209209	280276	254226	290290
PL08,	187187	209209	280276	248226	290282
PL09,	211193	233229	280276	226226	280273
PL10,	187187	209209	274262	248226	290265
PL11,	197197	209209	280280	254226	290282
PL12,	197187	231209	268268	226226	290290
PL13,	187187	209201	268268	254226	290265
PL14,	197187	209209	280268	226226	290265
PL15,	187187	209201	280268	226226	290290
PL16,	187187	209209	268262	226226	290290
PL17,	197187	209209	280280	226226	290273
PL18,	197197	217209	268258	254226	290273
PL19,	187187	209209	268268	226226	290273
PL20,	197197	209201	268268	226226	292273
PL21,	197187	217209	280268	248226	290282
PL22,	197187	217209	280268	226226	290290
PL23,	197187	217209	280268	248248	290282
PL24,	197197	217209	280268	248248	282282

PL25,	197187	217209	280268	226226	290282
PL26,	197187	217217	268268	248226	290282
PL27,	197187	217201	280268	226226	290290
PL28,	197187	217209	280280	248248	290282
PL29,	197187	217209	280280	226226	290290
PL30,	197187	231209	268268	226226	290282
PL31,	197187	217209	280268	248226	290282
PL32,	197197	217209	280268	226226	290282
PL33,	197187	209209	280268	226226	282282
PL34,	197187	217209	280268	226226	290282
PL35,	197187	217209	280280	226226	282282
POP					
TL01,	195195	219219	272272	232232	269269
TL02,	195195	219219	272272	232232	277277
TL03,	205187	219215	272262	238232	269269
TL04,	205195	219215	262262	244232	277277
TL05,	205195	219215	262262	232232	277277
TL06,	197195	219209	262262	232232	277265
TL07,	197193	219215	274272	238232	269269
TL08,	195187	221219	280258	232232	277269
TL09,	197193	229219	262258	232232	269269
TL10,	203195	229209	262260	232232	269269
TL11,	195195	215215	272262	232232	277269
TL12,	195195	215215	272262	232232	277277
TL13,	189189	215215	262262	232232	277277
TL14,	195189	219215	272262	232232	277277
TL15,	189189	219215	272262	232232	277269
TL16,	195195	215215	272272	232232	277277
TL17,	195195	225209	272272	232232	277277
TL18,	195195	215201	272272	248248	277277
TL19,	189189	215215	272272	248248	277277
TL20,	195189	215215	272262	232232	277277
TL21,	195189	219215	272262	248232	277269
TL22,	195195	219215	272262	232232	277269
TL23,	195189	215215	262262	248232	277269
TL24,	195189	215215	272262	248232	269269
TL25,	195195	219215	262262	248232	277269
TL26,	195189	219215	272262	232232	277269
TL27,	195195	219215	262262	232232	277269
TL28,	195189	219219	262258	248232	277269
TL29,	195189	219215	272262	248232	277269
TL30,	195189	215209	272272	248232	277269
TL31,	195189	215215	262262	248232	269269
TL32,	195189	219219	272262	248232	277269
TL33,	195189	215215	272262	232232	277269
TL34,	195195	219219	272262	248232	269269
TL35,	195189	219215	262262	232232	277269
POP					
AO01,	203197	209209	268268	226226	273265
AO02,	197197	209209	268268	226226	273265

AO03,	197189	221217	268268	254226	273273
AO04,	189189	221217	268268	254226	273265
AO05,	197197	233201	280280	248226	265265
AO06,	193189	221201	280268	248226	000000
AO07,	197197	221209	268268	226226	267265
AO08,	197189	221209	280280	254226	280273
AO09,	189189	221221	268268	254226	273273
AO10,	197197	209209	280268	226226	265265
AO11,	193193	221221	280269	254226	273273
AO12,	193193	221221	269269	226226	280273
AO13,	197193	221209	280280	254254	273265
AO14,	197197	209209	280269	254226	265265
AO15,	197197	209209	280280	226226	290265
AO16,	197197	221221	280280	226226	273273
AO17,	197197	221221	280280	248226	273265
AO18,	197197	221209	280280	254226	265265
AO19,	195193	217209	280280	254226	273265
AO20,	193193	221209	280268	254226	265265
AO21,	197193	221209	280268	254226	273265
AO22,	197193	217217	280268	254254	265265
AO23,	197193	209201	280268	254254	273265
AO24,	193193	221217	280268	254254	273265
AO25,	197193	217209	268268	254254	265265
AO26,	193187	221221	280268	254254	273265
AO27,	197193	221209	280268	226226	273265
AO28,	197193	221217	280269	254254	273273
AO29,	193193	221221	280268	254254	265265
AO30,	197193	221221	280268	254226	273265
AO31,	193193	221221	280268	226226	273273
AO32,	197193	209201	280268	248226	273273
AO33,	197193	221217	280269	254254	273273
AO34,	193193	217209	280268	226226	273265
AO35,	197193	221217	280268	254226	273265
POP					
BO01,	201191	225225	282278	238238	278264
BO02,	201201	211211	282278	238238	278278
BO03,	201201	211211	278278	238238	278278
BO04,	201191	211193	282282	242242	278271
BO05,	201201	225211	290270	242242	271264
BO06,	201201	229229	290278	244232	282282
BO07,	201201	225207	290282	238238	264264
BO08,	203191	229211	282282	238238	278275
BO09,	191191	211211	278278	242242	275264
BO10,	201201	231211	282282	242238	278278
BO11,	191191	225211	270270	242238	278267
BO12,	201201	225211	278270	244238	278267
BO13,	191191	211211	278270	238238	278267
BO14,	191191	211211	270270	242238	278278
BO15,	201185	211211	282282	242242	278278
BO16,	201201	225225	282278	238238	278275

BO17,	201185	225225	282278	242242	278275
BO18,	213191	225225	278278	242238	271271
BO19,	201191	211193	278278	242242	271271
BO20,	201191	225211	278278	238238	271271
BO21,	201201	225211	282282	242238	278271
BO22,	191191	225211	290282	242238	278264
BO23,	201191	225211	282278	242238	278271
BO24,	201201	211211	278278	242238	271271
BO25,	201191	225225	290278	242238	278271
BO26,	201191	225211	290278	242238	278271
BO27,	191191	225225	290282	242238	278271
BO28,	201201	225211	282278	242242	278278
BO29,	201191	225211	290282	238238	278264
BO30,	201201	225211	290278	242242	278271
BO31,	201191	211211	282270	242238	278271
BO32,	201191	231211	278278	242238	278271
BO33,	201191	225225	290290	242238	278271
BO34,	201201	211193	278270	242242	278271
BO35,	201191	225211	278270	242238	278264
POP					
PO01,	187187	233209	280276	254226	290273
PO02,	187187	201201	280276	254226	290290
PO03,	187187	221209	280262	226226	290265
PO04,	193193	221209	280262	254254	273265
PO05,	193193	209209	280280	226226	290290
PO06,	211187	209209	280268	254226	290282
PO07,	211187	209209	280280	226226	290282
PO08,	197187	209209	268268	226226	290277
PO09,	193189	233209	268268	254254	290290
PO10,	189187	233211	282269	226226	290290
PO11,	197193	209201	280268	248226	282282
PO12,	197193	231209	280268	254254	290290
PO13,	197193	231209	280268	226226	282280
PO14,	197197	231217	270268	254226	290280
PO15,	197197	233209	268258	254254	290290
PO16,	193187	209209	280269	226226	290282
PO17,	187187	209201	280269	226226	282265
PO18,	187187	209201	280262	254226	265265
PO19,	187187	221209	280262	226226	290290
PO20,	000000	209209	268268	238226	290290
PO21,	197187	217209	280268	254226	290282
PO22,	197187	209201	280268	254226	290273
PO23,	197197	217209	280268	254226	290290
PO24,	197197	217209	280280	254254	273273
PO25,	197193	209201	280268	254226	290282
PO26,	197187	217209	280269	226226	282282
PO27,	197187	217217	280268	254226	282282
PO28,	197187	209209	269269	254254	290290
PO29,	193187	217217	268258	254226	290282
PO30,	197187	217209	280280	254226	290282

PO31,	197187	209209	280269	254254	290282
PO32,	197197	217209	280269	254226	290290
PO33,	197187	231209	280280	254226	290282
PO34,	193193	217217	280268	226226	290290
PO35,	197193	217209	280280	254226	290282
POP					
TO01,	195195	219219	262262	232232	277277
TO02,	197193	219219	262262	232226	269269
TO03,	195187	215201	272262	232226	269269
TO04,	195187	219215	270260	232232	269269
TO05,	195195	219215	262258	232232	269269
TO06,	203189	217215	262260	232232	269267
TO07,	195187	221219	262260	232232	280269
TO08,	195187	229209	262260	238232	280277
TO09,	203189	219215	280258	238232	277277
TO10,	203189	221219	262258	232232	282277
TO11,	195189	219215	262262	232232	277277
TO12,	195195	215215	268262	232232	277277
TO13,	195195	215215	272268	232232	277269
TO14,	195195	219215	272272	248248	277269
TO15,	195195	219219	272268	244232	277269
TO16,	189189	219215	272272	232232	277277
TO17,	195189	229215	272260	232232	277277
TO18,	195195	215201	272272	248248	277277
TO19,	195195	215209	272272	248232	269269
TO20,	195189	233215	262262	232232	269269
TO21,	205195	219215	272262	248232	277269
TO22,	195189	215215	272262	248232	269269
TO23,	195189	215215	272262	248232	277269
TO24,	195189	219215	272262	232232	277269
TO25,	205195	215215	262262	248232	277269
TO26,	195189	219219	272262	248232	277269
TO27,	195195	219215	272272	232232	277269
TO28,	195189	215215	272272	232232	277277
TO29,	195189	219215	272262	248232	277269
TO30,	205189	219219	262262	232232	277269
TO31,	195195	219215	272262	248232	269269
TO32,	189189	219219	272262	248232	277269
TO33,	189189	219215	272272	232232	277269
TO34,	195189	219215	272272	232232	277269
TO35,	195189	215215	272262	238232	277269

**ANNEXE 3 : TEST DE L'EQUILIBRE DE HARDY-WEINBERG POUR L'ENSEMBLE DES POPULATIONS ET DES LOCUS.**

=====  
 Results by locus  
 =====

Locus : M1425

-----

Fis :  
-----

POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.
AF35	.1249	/	+.088	+.016	2736
BF35	.1208	/	+.155	+.086	148
PF35	.1241	.0162	+.087	+.026	-
TF35	.2168	.0255	+.028	+.016	-
AK35	.1613	.0114	+.104	+.092	-
BK35	.8601	/	+.065	+.035	33
PK35	.2809	.0182	+.194	+.059	-
TK35	.1298	.0248	-.056	-.017	-
AL35	.4669	/	+.072	+.005	4066
BL35	.4497	/	-.008	-.008	100
PL35	.0729	.0097	+.022	+.007	-
TL35	.0623	.0141	+.005	-.008	-
AO35	.1242	.0165	+.231	+.143	-
BO35	.2988	.0221	+.159	+.043	-
PO35	.2275	.0142	+.156	+.093	-
TO35	.1068	.0152	+.006	-.015	-

All (Fisher's method) :  
 Chi2 : 54.1  
 Df : 32  
 Prob : .0086

Locus : M625

-----

Fis :  
-----

POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.
AF35	.9749	.0029	+.048	+.021	-
BF35	.2891	/	+.014	+.004	464
PF35	.2668	.0190	+.172	+.076	-
TF35	.4962	.0350	+.043	+.003	-
AK35	.1008	.0120	+.167	+.089	-
BK35	.1314	/	+.051	+.008	186
PK35	.2221	.0274	+.144	+.198	-
TK35	.2256	.0250	+.133	+.022	-
AL35	.1460	.0105	+.155	+.141	-

```

BL35      .8472   /   -.034  -.012  132
PL35      .2504 .0205 -.006  -.017  -
TL35      .1412 .0177 +.074  +.007  -
AO35      .2153 .0138 +.154  +.065  -
BO35      .1513 .0129 +.125  +.148  -
PO35      .4483 .0224 +.022  +.040  -
TO35      .3381 .0287 +.009  -.004  -
All (Fisher's method) :
Chi2      :      42.7
Df        :      32
Prob      :      .0980

```

Locus : M836

```

-----
Fis :
-----
POP      P-val  S.E.  W&C  R&H  Matr.
-----
AF35     .1053   /    +.164 +.254  130
BF35     .0762  .0105 +.009 -.013  -
PF35     .1199  .0119 +.062 +.000  -
TF35     .1519  .0112 +.048 +.010  -
AK35     .2063   /    +.171 +.164  768
BK35     .0630  .0055 -.001 -.008  -
PK35     .2637  .0184 +.044 -.007  -
TK35     .5663   /    +.137 +.045  258
AL35     .0703   /    +.182 +.150  1113
BL35     .0918  .0140 +.154 +.076  -
PL35     .2949  .0296 +.026 -.005  -
TL35     .1803  .0177 +.072 +.014  -
AO35     .0964   /    +.064 +.153  226
BO35     .3016   /    +.203 +.203  36201
PO35     .1584  .0227 -.027 +.004  -
TO35     .1498  .0187 +.104 +.011  -
All (Fisher's method) :
Chi2     :      60.7
Df       :      32
Prob     :      .0016

```

Locus : M97

```

-----
Fis :
-----
POP      P-val  S.E.  W&C  R&H  Matr.
-----
AF35     .2463   /    +.077 +.032  136
BF35     1       /    +.028 +.012  77
PF35     .1507   /    +.024 +.092  308
TF35     1       /    -.039 -.016  14

```

AK35	.3599	/	+.199	+.109	28
BK35	.0882	.0099	-.006	-.012	-
PK35	.1247	/	+.126	+.231	154
TK35	1	.0000	-.057	-.003	-
AL35	.0893	/	+.217	+.334	94
BL35	.0695	/	+.053	+.010	368
PL35	.2108	/	+.175	+.132	76
TL35	.8192	/	+.052	+.028	72
AO35	.1313	/	+.181	+.094	136
BO35	.0547	/	+.116	+.040	166
PO35	.9122	/	+.076	+.031	74
TO35	.8509	.0114	+.022	+.018	-

All (Fisher's method) :  
Chi2 : 41.7  
Df : 32  
Prob : .1169

Locus : M984

-----  
Fis :  
-----

POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.
AF35	.0864	.0084	+.173	+.149	-
BF35	.0316	.0040	+.058	+.052	-
PF35	.2229	.0130	+.056	+.165	-
TF35	.7349	/	+.099	+.101	18
AK35	.1753	.0185	+.273	+.161	-
BK35	.1268	/	+.084	+.060	10779
PK35	.4245	.0158	-.015	+.038	-
TK35	.0254	/	+.221	+.080	166
AL35	.2087	.0271	+.132	+.223	-
BL35	.2185	.0178	-.003	-.009	-
PL35	.1558	.0163	-.011	+.016	-
TL35	.6118	/	+.116	+.063	32
AO35	.5476	.0165	+.062	+.015	-
BO35	.1128	.0142	+.044	+.220	-
PO35	.1632	.0127	+.174	+.167	-
TO35	1	.0000	+.035	+.007	-

All (Fisher's method) :  
Chi2 : 52.2  
Df : 32  
Prob : .0136

=====  
 Results by population  
 =====

Pop : AF35

-----

Fis :  
-----

POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.
M1425	.1249	/	+.088	+.016	2736
M625	.9749	.0029	+.048	+.021	-
M836	.1053	/	+.164	+.254	130
M97	.2463	/	+.077	+.032	136
M984	.0864	.0084	+.173	+.149	-
All (Fisher's method) :					
Chi2	:	16.4			
Df	:	10			
Prob	:	.0884			

Pop : BF35

-----

Fis :  
-----

POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.
M1425	.1208	/	+.155	+.086	148
M625	.2891	/	+.014	+.004	464
M836	.0762	.0105	+.009	-.013	-
M97	1	/	+.028	+.012	77
M984	.0316	.0040	+.058	+.052	-
All (Fisher's method) :					
Chi2	:	18.8			
Df	:	10			
Prob	:	.0433			

Pop : PF35

-----

Fis :  
-----

POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.
M1425	.1241	.0162	+.087	+.026	-
M625	.2668	.0190	+.172	+.076	-
M836	.1199	.0119	+.062	+.000	-
M97	.1507	/	+.024	+.092	308
M984	.2229	.0130	+.056	+.165	-
All (Fisher's method) :					
Chi2	:	17.8			
Df	:	10			
Prob	:	.0576			

Pop : TF35

```
-----  
Fis :  
-----  
POP          P-val S.E.  W&C   R&H   Matr.  
-----  
M1425        .2168 .0255 +.028 +.016 -  
M625         .4962 .0350 +.043 +.003 -  
M836         .1519 .0112 +.048 +.010 -  
M97          1      /    -.039 -.016 14  
M984         .7349 /     +.099 +.101 18  
All (Fisher's method) :  
Chi2   :      8.8  
Df     :      10  
Prob   :     .5470
```

Pop : AK35

```
-----  
Fis :  
-----  
POP          P-val S.E.  W&C   R&H   Matr.  
-----  
M1425        .1613 .0114 +.104 +.092 -  
M625         .1008 .0120 +.167 +.089 -  
M836         .2063 /     +.171 +.164 768  
M97          .3599 /     +.199 +.109 28  
M984         .1753 .0185 +.273 +.161 -  
All (Fisher's method) :  
Chi2   :     16.9  
Df     :      10  
Prob   :     .0761
```

Pop : BK35

```
-----  
Fis :  
-----  
POP          P-val S.E.  W&C   R&H   Matr.  
-----  
M1425        .8601 /     +.065 +.035 33  
M625         .1314 /     +.051 +.008 186  
M836         .0630 .0055 -.001 -.008 -  
M97          .0882 .0099 -.006 -.012 -  
M984         .1268 /     +.084 +.060 10779  
All (Fisher's method) :  
Chi2   :     18.9  
Df     :      10  
Prob   :     .0419
```

Pop : PK35

---

Fis :

---

POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.
M1425	.2809	.0182	+.194	+.059	-
M625	.2221	.0274	+.144	+.198	-
M836	.2637	.0184	+.044	-.007	-
M97	.1247	/	+.126	+.231	154
M984	.4245	.0158	-.015	+.038	-

All (Fisher's method) :

Chi2 : 14.1  
Df : 10  
Prob : .1689

Pop : TK35

---

Fis :

---

POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.
M1425	.1298	.0248	-.056	-.017	-
M625	.2256	.0250	+.133	+.022	-
M836	.5663	/	+.137	+.045	258
M97	1	.0000	-.057	-.003	-
M984	.0254	/	+.221	+.080	166

All (Fisher's method) :

Chi2 : 15.5  
Df : 10  
Prob : .1134

Pop : AL35

---

Fis :

---

POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.
M1425	.4669	/	+.072	+.005	4066
M625	.1460	.0105	+.155	+.141	-
M836	.0703	/	+.182	+.150	1113
M97	.0893	/	+.217	+.334	94
M984	.2087	.0271	+.132	+.223	-

All (Fisher's method) :

Chi2 : 18.6  
Df : 10  
Prob : .0450

Pop : BL35

-----  
Fis :  
-----  
POP            P-val S.E.    W&C    R&H    Matr.  
-----  
M1425        .4497    /    -.008   -.008   100  
M625         .8472    /    -.034   -.012   132  
M836         .0918   .0140   +.154   +.076   -  
M97          .0695    /    +.053   +.010   368  
M984         .2185   .0178   -.003   -.009   -  
All (Fisher's method) :  
Chi2    :     15.1  
Df      :     10  
Prob    :     .1291

Pop : PL35

-----  
Fis :  
-----  
POP            P-val S.E.    W&C    R&H    Matr.  
-----  
M1425        .0729   .0097   +.022   +.007   -  
M625         .2504   .0205   -.006   -.017   -  
M836         .2949   .0296   +.026   -.005   -  
M97          .2108    /    +.175   +.132   76  
M984         .1558   .0163   -.011   +.016   -  
All (Fisher's method) :  
Chi2    :     17.3  
Df      :     10  
Prob    :     .0684

Pop : TL35

-----  
Fis :  
-----  
POP            P-val S.E.    W&C    R&H    Matr.  
-----  
M1425        .0623   .0141   +.005   -.008   -  
M625         .1412   .0177   +.074   +.007   -  
M836         .1803   .0177   +.072   +.014   -  
M97          .8192    /    +.052   +.028   72  
M984         .6118    /    +.116   +.063   32  
  
All (Fisher's method) :  
Chi2    :     14.3  
Df      :     10  
Prob    :     .1609

Pop : AO35

-----  
Fis :  
-----  
POP            P-val S.E.    W&C    R&H    Matr.  
-----  
M1425          .1242 .0165   +.231   +.143   -  
M625           .2153 .0138   +.154   +.065   -  
M836           .0964   /   +.064   +.153   226  
M97            .1313   /   +.181   +.094   136  
M984           .5476 .0165   +.062   +.015   -  
  
All (Fisher's method) :  
Chi2   :      17.2  
Df     :      10  
Prob   :      .0703

Pop : BO35

-----  
Fis :  
-----  
POP            P-val S.E.    W&C    R&H    Matr.  
-----  
M1425          .2988 .0221   +.159   +.043   -  
M625           .1513 .0129   +.125   +.148   -  
M836           .3016   /   +.203   +.203   36201  
M97            .0547   /   +.116   +.040   166  
M984           .1128 .0142   +.044   +.220   -  
All (Fisher's method) :  
Chi2   :      18.8  
Df     :      10  
Prob   :      .0433

Pop : PO35

-----  
Fis :  
-----  
POP            P-val S.E.    W&C    R&H    Matr.  
-----  
M1425          .2275 .0142   +.156   +.093   -  
M625           .4483 .0224   +.022   +.040   -  
M836           .1584 .0227   -.027   +.004   -  
M97            .9122   /   +.076   +.031   74  
M984           .1632 .0127   +.174   +.167   -  
All (Fisher's method) :  
Chi2   :      12.1  
Df     :      10  
Prob   :      .2810

Pop : T035

-----

Fis :

-----

POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.
M1425	.1068	.0152	+0.006	-.015	-
M625	.3381	.0287	+0.009	-.004	-
M836	.1498	.0187	+0.104	+0.011	-
M97	.8509	.0114	+0.022	+0.018	-
M984	1	.0000	+0.035	+0.007	-

All (Fisher's method) :

Chi2 : 10.8

Df : 10

Prob : .3764

=====  
All locus, all populations  
=====

All (Fisher's method) :

Chi2 : 251.4

Df : 152

Prob : .0000

Normal ending

**Titre:** Variabilité de l'Espacement Interne Transcrit (ITS1) de l'ADN ribosomique et polymorphisme des locus microsatellites chez la bruche *Caryedon serratus* (Olivier): différenciation en races d'hôtes et infestation de l'arachide au Sénégal.

Nom du candidat: **Mbacké SEMBENE**

Nature de la thèse: **Doctorat d'Etat es Sciences**

**Jury :**

MM	<b>Bhen Sikina</b>	<b>TOGUEBAYE</b>	Professeur, U.C.A.D. Dakar,	Président
	<b>Alex</b>	<b>DELOBEL</b>	Directeur de Recherche, I.R.D.	Rapporteur
	<b>Ngor</b>	<b>FAYE</b>	Maître de Conférences, U.C.A.D. Dakar	Rapporteur
	<b>Danamou</b>	<b>MOUNPORT</b>	Professeur, U.C.A.D. Dakar	Examineur
	<b>Jean Yves</b>	<b>RASPLUS</b>	Directeur de Recherche, I.N.R.A.	Examineur
Mme	<b>Corine</b>	<b>ROULAND</b>	Professeur, Université de Dijon	Examineur

**Résumé:**

L'arachide, principale culture de rente au Sénégal, subit de lourdes pertes à la suite de son infestation par la bruche *Caryedon serratus* (Olivier) qui est un insecte doté d'une grande plasticité de ponte. Au Sénégal, il se développe sur des légumineuses arborescentes relativement communes dans la région du bassin arachidier: *Bauhinia rufescens*, *B. monandra*, *B. tomentosa*, *Cassia sieberiana*, *Piliostigma reticulatum*, *P. thonningii* et *Tamarindus indica*. Il pond sur *Prosopis africana* et *Detarium senegalensis* mais ses larves ne parviennent pas à se développer sur ces Légumineuses. Cette bruche s'est secondairement adaptée à l'arachide (*Arachis hypogaea*, Fabaceae) devenant ainsi l'unique espèce du genre *Caryedon* contaminant cette légumineuse. Il semble que les principaux facteurs influençant l'évolution des populations de cette bruche soient climatiques et biocénétiques.

Des analyses génétiques par séquençage d'ADN, isolement et étude du polymorphisme des locus microsatellites des différentes souches de bruches ont permis de montrer pour la première fois que la population de *C. serratus* forme des biotypes liés à chacune des espèces de plantes hôtes (*host-races*) aussi bien sur le plan morphologique que génétique. Il existe un flux génique très élevé entre les *C. serratus* issus de l'arachide et ceux provenant de *Piliostigma reticulatum*. Ils se distinguent des souches inféodées aux autres plantes hôtes. Les différents facteurs ayant favorisé la formation et le maintien des races hôtes chez *Caryedon serratus* ont été mis en évidence.

L'étude de la dynamique d'infestation de l'arachide séchée au champ nous a permis de préciser qu'il subsiste toujours, durant la période hivernale, une faible population de *C. serratus*, reproductivement active, qui infeste l'arachide nouvellement récoltée. Cette infestation quoique faible durant les deux premiers mois se poursuit et est à l'origine d'importantes pertes quantitatives à cause du caractère polyvoltin de la bruche de l'arachide. Le stockage en sacs en polypropylène tressé limite cependant l'infestation *in situ* par confinement des insectes.

La mise en œuvre sur le terrain des résultats génétiques confirme l'origine de l'infestation de l'arachide nouvellement récoltée au Sénégal : l'infestation primaire de l'arachide nouvellement récoltée est due précisément aux femelles de *C. serratus* issues des gousses de *P. reticulatum* et à celles qui se développent dans les gousses d'arachide résiduelles des greniers. *T. indica* pourrait éventuellement, être un hôte refuge des *C. serratus* qui infestent l'arachide, en cas d'inexistence de gousses de *P. reticulatum*.

A partir de ces résultats, nous émettons quelques recommandations afin d'empêcher ou d'atténuer fortement l'infestation des récoltes d'arachide: éliminer les gousses de *Piliostigma reticulatum* avant leur maturité en les cueillant pour le bétail, raccourcir le plus possible la période de séchage de l'arachide au champ, stocker l'arachide dans des sacs en polypropylène tressé en les remplissant pleinement...etc. D'autres recommandations concernant la commercialisation de l'arachide et des précautions à prendre au niveau des magasins de l'Etat sont aussi émises.

**Mots clés:** Arachide, Bruche, *Caryedon serratus*, infestation, génétique, séquençage, ITS1, locus microsatellites, population.