

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I.1. PRESENTATION DES ZONES D'ETUDES.....	3
I.1.1. Zones agro-écologiques.....	3
I.1.2. Bassins de culture arachidière.....	5
I.2. PRESENTATION DES PLANTES HOTES DE <i>Caryedon serratus</i>	5
I.2.1. <i>Arachis hypogaea</i> L.....	5
I.2.1.1. Description et systématique.....	5
I.2.1.2. Culture.....	6
I.2.2.3. Stockage.....	6
I.2.2. <i>Piliostigma reticulatum</i>	6
I.3. LA BRUCHE DE L' ARACHIDE.....	7
I.3.1. Position systématique et répartition géographique.....	7
I.3.2. Morphologie.....	8
I.3.3. Cycle biologique et dégâts.....	8
I.4. LES TECHNIQUES DE PROTECTION.....	9
Chapitre II : MATERIEL ET METHODES.....	10
II.1. Echantillonnage.....	10
II.2. Etudes génétiques.....	12
II.2.1. Extraction d'ADN.....	12
II.2.2. Amplification en chaine par polymérase du cytochrome b et du 28S.....	12
II.2.3. Séquençage du Cytochrome b et du 28S.....	13
II.3. Analyses génétiques.....	13
Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	15
III.1. Résultats.....	15
III.1.1. Les haplotypes.....	15
III.1.2. La diversité génétique.....	18
III.1.2.1. Diversités haplotypique et nucléotidique.....	18
III.1.2.2. Distances génétiques.....	18
III.1.2.3. Degré de différenciation génétique entre les populations.....	20
III.1.3. Les arbres phylogénétiques.....	20
III.1.4. les réseaux d'haplotypes.....	23
III.2. Discussion.....	25
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	28
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	29
ANNEXES	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Présentation des différents pays d'étude.....	3
Figure 2 : Plante d'arachide avec ses gousses.....	6
Figure 3 : <i>Piliostigma reticulatum</i>	7
Figure 4 : Mâle et femelle de <i>C. serratus</i> en face ventrale ; la flèche indique le dernier tergite abdominal incurvé chez le mâle et servant d'organe de copulation.....	8
Figure 5 : A gauche dégâts causés par <i>C. serratus</i> sur les graines d'arachides. À droite, émergence d'un adulte de son cocon.....	9
Figure 6 : Localisation géographique des différents sites échantillonnés.....	10
Figure 7 : Les sites d'échantillonnages et les bassins de culture arachidière.....	12
Figure 8 : Arbre consensus des haplotypes selon la méthode du maximum de parcimonie avec le gène 28S.....	21
Figure 9: Arbre phylogénétique des haplotypes selon la méthode du maximum de parcimonie avec le gène cytochrome b.....	22
Figure 10 : Arbre phylogénétique des deux gènes raboutés selon la méthode consensus du maximum de Parcimonie.....	23
Figure 11 : Réseau d'haplotype obtenu avec le 28S.....	24
Figure 12 : Réseau d'haplotype obtenu avec le Cytochrome b.....	24

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des échantillons collectés.....	11
Tableau 2 : La composition haplotypique en fonction des zones agro-écologiques.....	17
Tableau 3 : La composition haplotypique des bassins de culture arachidière et des zones non cultivées.....	17
Tableau 4 : Diversités haplotypique et nucléotidique pour chaque zone agro-écologique.....	18
Tableau 5 : Distances génétiques inter-populations avec le cytochrome b et le 28S.....	19
Tableau 6 : Distances génétiques intra-populations avec le 28S et le cytochrome b.....	19
Tableau 7 : Distances génétiques entre bassins de culture arachidière et les zones où l'arachide n'est pas cultivée avec le 28S et le cytochrome b.....	20
Tableau 8 : Différenciation génétique entre les populations avec le 28S (a) et le cytochrome b (b).....	20

LISTE DES ABREVIATIONS

- ✓ **SBA** : Sud Bassin Arachidier
- ✓ **SG** : Soudano-Guinéen
- ✓ **BNA** : Nord Bassin Arachidier
- ✓ **NSB** : Nord Soudanien Burkina
- ✓ **SM** : Soudanien Mali
- ✓ **FN** : Fleuve Niger
- ✓ **SOHC** : Sénégal Oriental et Haute Casamance
- ✓ **Bar** : Bassin de culture arachidière
- ✓ **ZSB** : Zones sans bassins
- ✓ **Cytb** : Cytochrome b
- ✓ **Hd** : Diversité haplotypique
- ✓ **Pi** : Diversité nucléotidique

INTRODUCTION

L'arachide (*Arachis hypogaea*), appelée également cacahuète pour mentionner la graine contenue dans la coque, est une légumineuse annuelle cultivée dans toute la zone intertropicale. Elle appartient à la famille des papilionacées (ou fabacées), originaire d'Amérique du Sud et introduite au Sénégal à la fin du XVI^{ème} siècle. Elle est d'une grande importance nutritionnelle et économique. La multiplicité de ses usages en fait une culture très appréciée presque partout dans le monde surtout en Afrique de l'ouest. Mais au cours des années, la production de l'arachide tend à régresser, ce qui fait que les attentes pour une meilleure couverture nationale en nourriture et en exportation ne sont plus satisfaites. Cette régression est due à un certain nombre de contraintes parmi lesquelles la protection des graines après récolte demeure la plus importante (Massala, 1997). Ainsi, le ravageur majeur de l'arachide est un minuscule coléoptère de la famille des chrysomélidés. Leur développement se fait en général à l'intérieur d'une seule graine de légumineuse. Ravageurs des denrées d'une très grande importance (arachide, niébé, maïs etc...), les espèces de bruches les plus nuisibles sont celles capables de se développer dans les stocks (Delobel, 2008), parmi celles-ci la bruche *Caryedon serratus* Ol. Elle s'est adaptée sur l'arachide par allotrophie. Les pertes en poids qu'elle occasionne, peuvent aller jusqu'à 83% pour une durée de stockage de quatre Mois (Ndiaye, 1991), elles dépassent parfois 60% au Congo (Matokot *et al.*, 1987), 70% dans l'Ouest du Burkina (Ouédraogo *et al.*, 2008). Ce ravageur, décrit en 1790 par Olivier à partir des récoltes faites par Geoffroy de Villeneuve au Sénégal, est originaire des régions tropicales de l'ancien monde, d'Asie ou d'Afrique selon les auteurs. On la observée sur l'arachide pour la première fois en 1916 au Sénégal, puis en 1917 à Java (Delobel, 1988). L'aire d'extension de la bruche ne cesse de s'accroître lentement car on la rencontre actuellement dans la plupart des régions chaudes du globe (Delobel, 1988). Ainsi, elle se structure au dépend du spectre alimentaire spécifique entraînant une apparition de biotypes dont chacun est spécifique à une plante hôte donnée (Sembène *et al.*, 2010). C'est de toute évidence que la grande variété des plantes hôtes a conduit à la variété des bruches que nous observons aujourd'hui. Cette structuration sympatrique est la seule qui a été jusqu'à de nos jours mise en évidence chez *Caryedon serratus*. La plupart des auteurs ont montré que la distance n'aurait pas d'effet dans la structuration de la bruche (Sembène *et al.*, 1998) mais des haplotypes différents peuvent être rencontrés au sein d'un biotype constituant différents écotypes (Diome *et al.*, 2011 ; Ndong *et al.*, 2011). En Afrique, nous notons l'existence de zones agro-écologiques et agro-climatiques différentes. En plus, la culture de l'arachide n'est pas continue dans la sous-région ouest-africaine ; il existe des bassins où l'arachide est cultivée et d'autres où la culture est absente ou quasi absente (Diome *et al. in press*). Nous pensons également qu'il y aurait des spécificités entre les bassins de culture de l'arachide et les autres zones où le flux de gène du biotype adapté s'effectuerait entre *Piliostigma*, du fait de l'absence de la culture de cette légumineuse.

Par contre, dans les bassins de culture, ce dernier s'effectue d'une part entre *Piliostigma* et d'autre part entre *Piliostigma* et l'arachide. Selon Sembène *et al.* (2010), c'est le biotype inféodé au *Piliostigma reticulatum* qui s'est adapté à l'arachide et malgré le flux de gène entre ces deux biotypes, celui inféodé à l'arachide commence à se différencier.

Le but de ce travail est d'identifier les différents haplotypes existant dans les populations de *Caryedon serratus* inféodées à l'arachide en fonction des zones agro-écologiques et des bassins de culture de l'arachide dans quatre pays de l'Afrique de l'ouest : Sénégal, Mali, Niger et Burkina Faso. La mise en évidence de la structuration et la distribution génétique de *C. serratus* en Afrique de l'ouest est possible avec l'utilisation des marqueurs génétiques : le Cytochrome b et le 28S avec comme méthodologie la PCR-séquençage.

Après un premier chapitre réservé à la synthèse bibliographique faisant office des zones d'études, des plantes hôtes et de la bruche *Caryedon serratus*, nous essayerons dans le deuxième chapitre de faire le point des différentes expériences menées afin d'atteindre les objectifs d'étude. Enfin, dans le troisième chapitre les résultats seront présentés, suivie d'une discussion, d'une conclusion générale et des perspectives.

I.1. PRESENTATION DES ZONES D'ETUDES

Les pays de l'Afrique de l'ouest objet de cette étude sont les suivantes : Sénégal, Mali, Burkina et Niger. Le territoire sénégalais se situe entre 12°8 et 16°41 de latitude Nord et 11°21 et 17°32 de longitude Ouest. Il s'étend sur 196 722 km². Il comporte une saison des pluies, de juin à octobre, avec une importance des précipitations plus marquée du Sud au Nord et une saison sèche, de novembre à mai. Le Burkina Faso, Pays enclavé au cœur de l'Afrique de l'Ouest, il est limité au Nord et à l'Ouest par le Mali, à l'Est par le Niger. Le pays s'étend sur 274 000 km². Le Mali, vaste pays continental de l'Afrique de l'Ouest, est situé entre 10° et 25° de latitude Nord et entre 4° de longitude Est et 12° de longitude Ouest. Sa superficie est de 1 241 138 km², dont les deux tiers se trouvent en zone désertique. Alors que le Niger s'étend sur 1 267 000 km². Il est le plus vaste des pays de l'Afrique occidentale. Il est situé d'une part entre les parallèles 11°37 et 23°33 de latitude Nord, et d'autre part, entre les méridiens 16° de longitude Est et 0°10 de longitude Ouest.

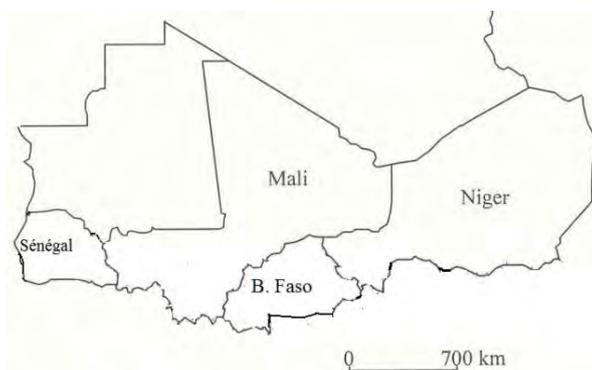


Figure 1 : Présentation des différents pays d'étude.

I.1.1. Les zones agro-écologiques

Une zone agro-écologique résulte de la combinaison entre zone écologique et zone agro-climatique. Elle se caractérise par ses ressources en sols, en végétation, en eau. Seules les zones agro-écologiques des différentes régions échantillonnées pour cette étude seront traitées. Au Sénégal avec son climat de type sahélien est subdivisé du Nord au Sud en 7 zones agro-écologiques : le fleuve, les Niayes, le Nord bassin arachidier, le Sud bassin arachidier, la zone Sylvo-pastorale, le Sénégal oriental et Haute Casamance enfin la Basse et Moyenne Casamance.

➤ Nord bassin arachidier

Il couvre le Centre-Nord du territoire (Louga, département de Kébémér, Thiès, Diourbel et Kaolack, département de Gossas) et est constitué d'un type de sol caractéristique, le sol Dior, un sol sableux adapté à la culture de l'arachide et des céréales traditionnelles. Les spéculations dominantes dans cette zone sont le mil, le niébé, le bissap, le manioc et dans une moindre mesure l'arachide à cause de la réduction progressive de la pluviométrie qui ne dépasse pas 400 mm/an.

➤ Sud bassin arachidier

Il s'étend du Centre-Sud au Centre-Ouest du territoire (Fatick, Kaolack et Kaffrine). Le type de sol dominant est le prolongement du sol sableux Dior du bassin Nord, avec un enrichissement en éléments fertilisants vers le Sud et l'Ouest pour donner des sols sablo-argileux de type Deck-Dior. Ces types de sols sont adaptés par excellence à la culture de l'arachide. Cette zone se différencie de la zone Nord par sa pluviométrie plus importante (600 à 800 mm) qui entraîne l'apparition de cultures plus exigeantes en eau telles que le maïs, le sorgho et le développement d'espèces forestières favorisant l'apiculture (Banabessey, 2011).

➤ Sénégal Oriental et Haute Casamance

Cette zone agro-écologique occupe environ 73 718 km² soit 37% de la superficie nationale. Elle demeure toutefois relativement bien arrosée. Le Sénégal Oriental correspond à la partie non fluviale du département de Bakel, de Tambacounda et de Kédougou. Elle constitue une zone de prédilection de la culture cotonnière, et du riz pluvial. Le groupe mandingue y est l'ethnie dominante. Le sorgho y est la céréale dominante et le maïs est de loin plus représentatif que le mil. La Casamance continentale est séparée du Sénégal Oriental par le Parc National de Niokolo Koba, et correspond aux départements de Kolda et de Vélingara. Cette partie de l'aire de culture sous pluie du coton est plus peuplée que le Sénégal Oriental. Les peuls qui constituent l'écrasante majorité de la population ont développé une tradition agropastorale mieux établie. Le maïs est la principale céréale et le sorgho vient en deuxième position devant le mil (Guèye *et al*, 2008).

Au Burkina Faso, ce sont les secteurs phytogéographiques reconnus et définis par Monod (1957) et Guinko (1984) d'après des critères climatiques et floristiques qui tiennent lieu de zones agro-écologiques. Elles sont au nombre de quatre : le Nord Sahélien, le Sud Sahélien, le Nord Soudanien et le Sud Soudanien.

➤ Le Nord-soudanien

Il occupe 38,9% du territoire national, avec une pluviométrie importante allant de 700 à 900 mm. Cette zone est celle des savanes dominées par les espèces : *Adansonia digitata*, *Butyrospermum paradoxum*, *Parkia biglobosa*, *Tamarindus indica*. Elle est caractérisée par la culture du coton, du sorgho, du mil, du niébé et d'arachide (Kagone, 2001).

Parmi les zones agroécologiques du Niger, nous n'allons citer que le fleuve Niger.

➤ Le fleuve Niger

La vallée du fleuve est classée comme une seule zone en dépit de la variabilité importante qui existe du Nord au Sud. Le climat est de type sahélien. La particularité de la zone réside dans le fait qu'il existe des possibilités de cultures irriguées. Les types de sols sont aptes à la culture du riz, du maraîchage et à l'arboriculture (Seybou *et al*, 2004).

Au Mali, les zones agro-climatiques sont confondues aux zones agro-écologiques comme c'est le cas au Burkina Faso. Parmi celles-ci nous avons :

➤ La zone soudanienne du Mali

La zone soudanienne correspond aux écosystèmes de savane. La pluviométrie varie de 600 mm à plus de 1.100 mm. La saison pluvieuse est longue de 3 à 5 mois dans le Nord, et 5 à 7 mois dans le Sud. Le cycle de croissance des plantes se situe entre 75 et 100 jours. Suite à cette importante pluviométrie, les activités agricoles y sont plus intenses.

➤ la zone soudano-guinéenne

C'est la partie la plus humide du Mali, correspond à des écosystèmes de forêts claires avec une pluviométrie moyenne annuelle de 1100 mm. La saison pluvieuse, qui dure de 5 à 7 mois, est caractérisée par des pluies torrentielles, facteurs d'érosion, plus ou moins bien réparties en année normale. Les plantes peuvent croître entre 180 et 270 jours pour une saison pluvieuse de 5 à 7 mois. Les activités agricoles s'orientent de plus en plus sur la production de fruits et de tubercules à cause de la nature du sol qui est de type ferrallitique rouge.

I.1.2. Bassins de culture arachidière

Comme l'indique sa dénomination, le bassin arachidier correspond à la zone agricole où domine la culture arachidière. Au Sénégal, l'arachide est cultivée dans le centre et l'ouest du pays, dans le bassin arachidier et dans la frontière entre le Sénégal et la Guinée. Le bassin comprend les régions de Louga, de Thiès, de Diourbel, de Fatick, de Kaolack et de Tambacounda (département de Koumpentoum). Au Mali, cette légumineuse est cultivée dans l'ouest et le sud du pays. Il est également cultivé à l'Ouest du Burkina Faso et au sud du Niger.

I.2. PRESENTATION DES PLANTES HOTES DE *Caryedon serratus*

La bruche de l'arachide, *Caryedon serratus* Ol, reste inféodée aux gousses d'un certain nombre de plantes légumineuses appartenant à des familles différentes. Les plantes hôtes de la famille des *Caesalpiniaceae* sont : *Bauhinia rufescens* Lam, *Cassia sieberiana* DC., *Piliostigma thonningii* S, *Tamarindus indica* L, *Piliostigma reticulatum* DC. Enfin, une espèce domestiquée *Arachis hypogaea*, qui appartient à la sous-famille des *Papilionoideae*. (Sembène, 2006) Notre étude se limite seulement sur l'*Arachis hypogaea* et *Piliostigma reticulatum* hôte du biotype adapté à l'arachide.

I.2.1. *Arachis hypogaea* L.

I.2.1.1. Description et systématique

L'arachide (*Arachis hypogaea*), est une plante de la sous-famille des *Papilionoideae* originaire d'Amérique du Sud, introduit en Afrique vers la fin du XVI^{ème} siècle (Sembène *et al.*, 1998). La classification de cette plante est la suivante : Règne des *Plantae* ; Sous-règne des *Tracheobionta* ; Division des *Magnoliophyta* ; Classe des *Magnoliopsida* ; Sous-classe des *Rosidae* ; Ordre des *Fabales* ; Famille des *Fabaceae* ; Sous-famille des *Faboideae* ; Genre: *Arachis* ; Espèce : *Arachis hypogaea*. Les plantes d'arachide forment de petits buissons d'environ 50-60 centimètres de hauteur. Ses fruits, appelés couramment cacahuètes, se développent dans le sol suite à l'allongement du pédoncule floral après la fécondation des fleurs (Delobel, 1997). L'arachide est consommée par les humains comme grain, farine, patte et huile. Le Tourteau d'arachide et le feuillage sont utilisés

comme fourrage d'animal, l'huile est aussi utilisé dans la production de savon (Sembène *et al*, 2004).



Figure 2 : Plante d'arachide avec ses gousses

I.2.1.2. Culture

Le cycle de culture dure 90 à 150 jours avec la floraison qui intervient un mois après le semis. Les graines sont semées tout juste après la première pluie. Les gousses à la récolte contiennent environ 35% d'eau (Schilling, 1996), de ce fait pour mieux les stocker un séchage naturel sera donc nécessaire pour obtenir une teneur en eau inférieure à 10% (Ndiaye, 1991). L'arachide reste dispersée sur le champ 2 à 7 jours après arrachage (Sall, 1997). Elle est ensuite rassemblée en petits tas appelés moyettes durant 2 à 3 semaines avant d'être réunie en meules. Celles-ci resteront au champ pendant trois semaines au cours desquelles la bruche *Caryedon serratus* peut les attaquer. L'avantage de ce système de séchage est qu'il permette d'éviter le développement des moisissures sur les gousses (séchage par pied d'abord et moyettes ensuite) et empêche la dispersion des gousses d'arachide lors du battage (Sembène, 2000).

I.2.1.3. Stockage

En milieu traditionnel, l'arachide se conserve soit en gousses soit décortiquée. Les cultivateurs entreposent leur récolte dans des greniers traditionnels construits isolés du sol, pouvant être en chaume (aéré) ou en banco avec des parois fermes. De ce fait, ils peuvent garder l'arachide pour leur consommation pendant une année et les graines pour la semence doivent être conservées durant 8 mois (Delobel, 1997). Avec le mode de stockage moderne, l'arachide se conserve soit en vrac ou « seccos » terme local du Sénégal désignant les monticules en plein air pouvant rassembler plus de 10000 tonnes et limitées par un mur de sacs rempli d'arachides (Sembène, 2000). Pour le stockage en sac, les sacs sont empilés et recouverts d'une bâche amovible ou bien placés à l'intérieur d'un bâtiment.

I.2.2. *Piliostigma reticulatum*

C'est un petit arbre qui mesure généralement 1 à 10 m et qui se rencontre souvent sous forme de buissons. Le *Piliostigma reticulatum* encore appelé nguiguis en wolof, est une plante soudano sahélienne qui est présente le long de la vallée du fleuve Sénégal. La floraison a lieu pendant la saison sèche, après la feuillaison. Les feuilles souvent persistantes lorsque l'arbre est situé dans des lieux humides. On la rencontre du Sénégal au Soudan et elle est localement abondante et grégaire.

Dans les régions où cet arbre est abondant et produit des gousses, l'arachide est infestée dès le début du séchage. Des analyses morphométriques et génétiques ont montré que les populations de *C. serratus* et celles provenant du *Piliostigma reticulatum* sont morphologiquement et génétiquement identiques, et qu'elles se distinguent de celles inféodées aux autres plantes hôtes sauvages (Sembène et Delobel, 1996). Ainsi, au Sénégal, ce sont les femelles de *C. serratus* provenant de *P. reticulatum* qui infestent l'arachide nouvellement récoltée.



Figure 3 : *Piliostigma reticulatum* (<http://www.spong-burkina.org/wp-content/uploads/2012/05/bagen-dagha-1.jpg>)

I.3. LA BRUCHE DE L'ARACHIDE

L'arachide a pour principal ennemi un minuscule coléoptère appelé "bruche" *Caryedon serratus* Ol. Elle est un insecte originaire d'Afrique (Ouedraogo *et al.*, 2010) inféodé aux gousses de certaines légumineuses sauvages. C'est un Coléoptère qui ravage les graines d'arachide aussi bien au champ (après la récolte) que dans les entrepôts et provoque d'importantes pertes des denrées stockées (Sall, 1997). Le fait que la bruche se reproduise plusieurs fois par an (polyvoltinisme) amplifie considérablement les pertes dès lors qu'une première infestation s'est déclarée.

I.3.1. Position systématique et répartition géographique

La position systématique de la bruche a été longtemps controversée. Cependant, à la suite des travaux de Southgate et Pope en 1957, Mujerki et Ramdas Menon (1957) et Prevett (1965), Decelle (1966) a fait 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 (Ndiaye, 1991). Ainsi, la synonymie de la bruche 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, *Caryedon.fuscus* (B.), 1901, *Pachymerus sicutensis* Pic., 1924. En raison de son antériorité, c'est le nom de *C. serratus* qui a été retenu après les travaux de Decelle (1966). Sa position dans la classification actuelle des insectes est la suivante : Embranchement des Arthropodes ; Classe des Insectes ; Ordre : Coléoptères ; Famille : Chrysomelidae ; Sous famille: Bruchinae ; Tribu : Pachymerini ; Genre: *Caryedon* ; Espèce : *Caryedon serratus*.

Depuis que furent signalés les premières attaques de l'arachide par la bruche en Afrique occidentale plus particulièrement au Sénégal, son aire d'extension ne cesse de s'accroître lentement, jusqu'à s'étendre actuellement dans la plupart des régions chaudes du globe. Son expansion serait liée au commerce du tamarin et à l'exportation de l'arachide (Sembène, *et al* 2012).

I.3.2. Morphologie

L'adulte est brun à mordoré, moucheté de noir, et sous la pubescence, la cuticule est de couleur marron-noirâtre. Le corps, ovale allongé, possède des fémurs postérieurs très fortement dilatés, denticulés sur leur bord ventral. L'adulte mesure 6 à 8 mm de long (Delobel et Tran, 1993). Les tibias sont recourbés en arc de cercle. La larve est dodue et arquée, de couleur blanche ou rose avec la capsule céphalique marron. A maturité, la larve est de couleur blanc-jaunâtre virant au rose au moment de la construction du cocon (Massala, 1997).



Figure 4 : Mâle et femelle de *C. serratus* en face ventrale ; la flèche indique le dernier tergite abdominal incurvé chez le mâle et servant d'organe de copulation (Sembène, 2000).

I.3.3. Cycle biologique et dégâts

La femelle émet des phéromones qui attirent les mâles, et l'accouplement se fait en début de nuit. Vingt quatre heures (24 h) après, la femelle pond des œufs sur les gousses ou sur les graines mûres "écosées" et stockées. A jeun, la femelle peut pondre entre 20 et 115 œufs; et lorsque les conditions sont favorables, la fécondité peut aller jusqu'à 650 œufs (Delobel, 1989). L'œuf éclot au bout d'une semaine (Sembène, 1997) et le développement larvaire se déroule ensuite entièrement à l'intérieur de la graine, et le cocon de nymphe est souvent tissé dans la gousse, si bien que la première génération, et souvent la suivante, passent aisément inaperçues (Sembène *et al*, 2006). La nymphe peut s'effectuer soit à l'extérieur dans le sol, soit sur tout autre substrat. Dans ce cas la larve sort par un trou de 1,5 mm de diamètre, puis forme son cocon dans la terre à une profondeur de 2 à 8 cm. Les stades larvaires 2 et 3 sont peu mobiles tandis que les stades 1 et 4 se déplacent activement. Ainsi, les adultes émergent des cocons au bout de deux semaines après la nymphe (Sembène et Delobel, 1998). Le cycle de développement de l'œuf à l'adulte dure environ deux mois. Dans certaines conditions, on constate un étalement très important des émergences, l'intervalle entre les premières et les dernières pouvant aller jusqu'à quatre mois. Il pourrait s'agir d'un mécanisme de quiescence à l'intérieur du cocon qui serait lié à l'humidité (Robert, 1984, *in* Sall, 1997).

Les larves de la bruche causent d'énormes dégâts sur l'arachide, ils sont à la fois d'ordre quantitatifs et qualitatifs. L'attaque de *C.serratus* favorise la propagation d'*Aspergillus flavus*, champignon qui produit de l'aflatoxine substance cancérigène. Ainsi la culture devient souillée et impropre à la consommation.



Figure 5 : A gauche dégâts causés par *C. serratus* sur les graines d'arachides. À droite, émergence d'un adulte de son cocon. (<http://equipe-gengespop.com>)

I.4. LES TECHNIQUES DE PROTECTION

Pour lutter contre la bruche de l'arachide, les techniques de protection sont multiples. En milieu traditionnel, les paysans utilisent des plantes à effet insecticide comme les feuilles de *Boscia senegalensis*, les brisures d'écorces de *Faidherbia albida*, les feuilles d'*Azadirachta indica* ("neem") et les graines d'*Adansonia digitata* (Ndiaye, 1991). Ces plantes semblent généralement peu efficaces car elles n'empêchent pas l'évolution des attaques par *Caryedon serratus* (Sall, 1997). Parallèlement à cette protection traditionnelle, les paysans ont recouru à la méthode physique, utilisant des poudres minérales aussi bien sur le milieu pour perturber la circulation des ravageurs que sur l'insecte avec une absorption de son eau biologique d'où la mort par dessiccation (Sall, 1997). En milieu rural, le stockage hermétique utilisant des fûts d'huile récupérés est de plus en plus pratiqué pour emmagasiner jusqu'à 100 voire 200 kg de graines (Guèye *et al.*, 2011). En outre, la solarisation contribue à faire fuir les insectes grâce à la chaleur et à l'incidence directe des rayons solaires. Sur l'arachide, si la température externe au sol est supérieure à 33 °C, une heure d'exposition au soleil dans un dispositif de type Murdock et Shade suffit pour obtenir la mort de tous les stades de *Caryedon serratus* (Sembène *et al.*, 2006). Dans les conditions naturelles au champ, les bruches sont parasitées aux stades œufs, larves, ou nymphes par un grand nombre d'hyménoptères. Ces derniers exercent un contrôle naturel sur les populations de bruches (Sall, 1997). Le trichogramme *Uscana caryedoni* se développe aux dépens des œufs de la bruche de l'arachide, *Caryedon serratus* (Olivier), sur les fruits d'une légumineuse arbustive commune au Congo, *Piliostigma thonningii* (Delobel, 1989).

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

II.1. Echantillonnage

Il est le plus souvent impossible, ou trop coûteux, d'étudier l'ensemble des individus constituant une population ; on travaille alors sur une partie de la population que l'on appelle échantillon, il doit être représentatif. Ainsi, l'échantillonnage consiste à prélever une certaine quantité de gousses sur les arbres de *Piliostigma reticulatum*, et d'arachide chez les producteurs. C'est ainsi qu'un nombre important d'individus de *Caryedon serratus* ont été recueillies dans quatre pays de l'Afrique de l'Ouest : Sénégal, Mali, Burkina Faso et Niger. Au Sénégal, les échantillons ont été prélevés sur *Piliostigma reticulatum* dans le village de Samba Dia (14 ° 07'N, 16 ° 42'W) situé dans le nord bassin arachidier, à Kédougou (12 ° 33'N, 12 ° 10 'W) situé dans la frontière entre le Sénégal et le Mali appartenant à la zone agro-écologique du Sénégal oriental et haute Casamance et la localité de Kawil (14 ° 01'N, 16 ° 01'W) situé dans le sud bassin arachidier. Ceux de Keur Ayip (13°57'N, 15 ° 48'W) et Karang (13 ° 35'N, 16 ° 42'W) ont été recueillis dans *Arachis hypogaea* dans le sud bassin arachidier. Au Mali, deux localités sont échantillonnées, Piama (10 ° 52'N, 6 ° 06 'W), qui se trouve dans la zone soudano-guinéenne et Bawéré (14 ° 36'N, 05 ° 51'W) dans la zone soudanienne. Les échantillons provenant de ces deux localités sont issus du *Piliostigma reticulatum*. Les échantillons du Burkina sont issus de Tenkodogo (11 ° 47'N, 0 ° 22 'O.) et de Ouagadougou (12° 21 'N / 1° 32'W). Ces deux localités se situent dans la zone nord soudanienne, et les insectes sont inféodés à l'arachide. Les échantillons provenant de Youry (13 ° 17'N / 02 ° 11'E) ont été échantillonnés sur *Piliostigma reticulatum* au Niger et se situe dans le fleuve Niger.

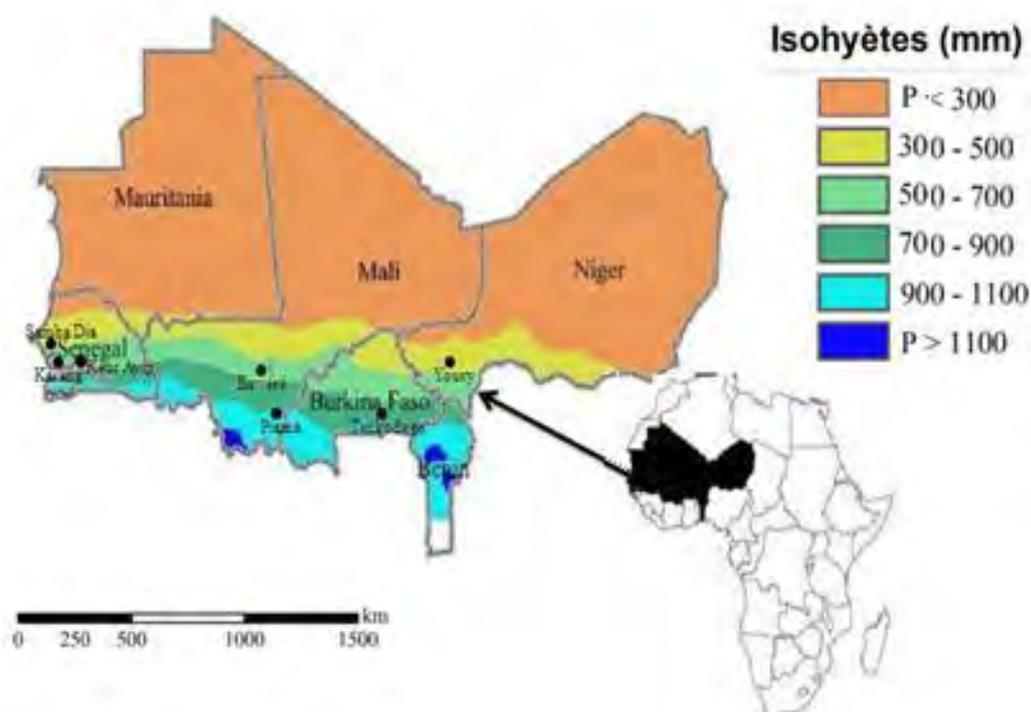


Figure 6 : Localisation géographique des différents sites échantillonnés

Au cours de l'échantillonnage chaque individu est référencé en utilisant la première lettre du nom de genre *Caryedon* (C) et du nom d'espèce *serratus* (s), suivi de la première lettre du pays d'origine en majuscule et de la première lettre du lieu de récolte. Pour les lieux de récolte constitués de deux mots, on écrit la première lettre du premier mot en majuscule suivi de la première lettre du second mot en minuscule. Avec les individus de Ouagadougou seul le pays d'origine est pris en compte car ils proviennent du marché (voir tableau 1). Les individus sont transportés au laboratoire dans des sacs en plastique et y sont déposés dans des bocaux (16 cm de hauteur et 9 cm de diamètre) dont le couvercle est muni d'une aération. Les émergences sont récoltées chaque matin et conservées dans l'alcool 96%. Les cocons sont isolés dans des plaques contenant 24 puits ou des boîtes de Pétri jusqu'à l'émergence des adultes. Certains adultes de première génération sont mis en couple sur des graines de leur plante hôte pendant 48h, le temps qu'ils déposent des œufs sur les graines. Ce qui permet d'augmenter le nombre d'individus de la population échantillonnée, par une deuxième génération.

Tableau 1 : Caractéristiques des échantillons collectés

Pays	Localités	Coordonnées géographiques	Plantes hôtes		Code des échantillons	Zones agroécologiques
			<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Piliostigma reticulatum</i>		
Sénégal	Samba Dia	14° 07'N / 16° 34' W		✓	CsSSd	Nord bassin arachidier
	Kawil	13° 35'N / 16° 25'W		✓	CsSKw	Sud bassin arachidier
	Keur Ayip	14° 10'N/16° 05'W	✓		CsSKa	
	Karang	13° 57'N / 15° 48'W	✓		CsSKg	
	Kédougou	12° 56'N/ 12° 21'W		✓	CsSK	Sénégal oriental et Haute Casamance
Burkina Faso	Tenkodogo	11°30'N / 0°3'W	✓		CsBT	Nord soudanien Burkina
	Ouagadougou	12° 21 'N / 1° 32'W	✓		CsB	
Mali	Piama	10°44'N 6°08'W		✓	CsMP	Soudano-guinéen
	Bawéré	14° 36'N / 05° 51'W		✓	CsMB	Soudanien-Mali
Niger	Youry	13° 17'N / 02°11'E		✓	CsNY	Fleuve Niger

Les populations de *Caryedon serratus* sont définies d'une part en fonction des zones agro-écologiques (tableau 1), ce qui nous donne un total de sept populations. D'autre part en fonction des bassins de culture arachidière et des zones non cultivées. Au Sénégal, l'ensemble des localités échantillonnées (Kawil, Keur Ayip, Samba Dia et Karang) se trouvent dans le bassin arachidier, de même que Ouagadougou au Burkina et Piama au Mali. Seule la région Kédougou du Sénégal se trouve dans une zone non cultivée. Les localités de Youry au Niger, Bawéré au Mali et Tenkodogo au Burkina se retrouvent en dehors des bassins de culture (Voir figure 7).

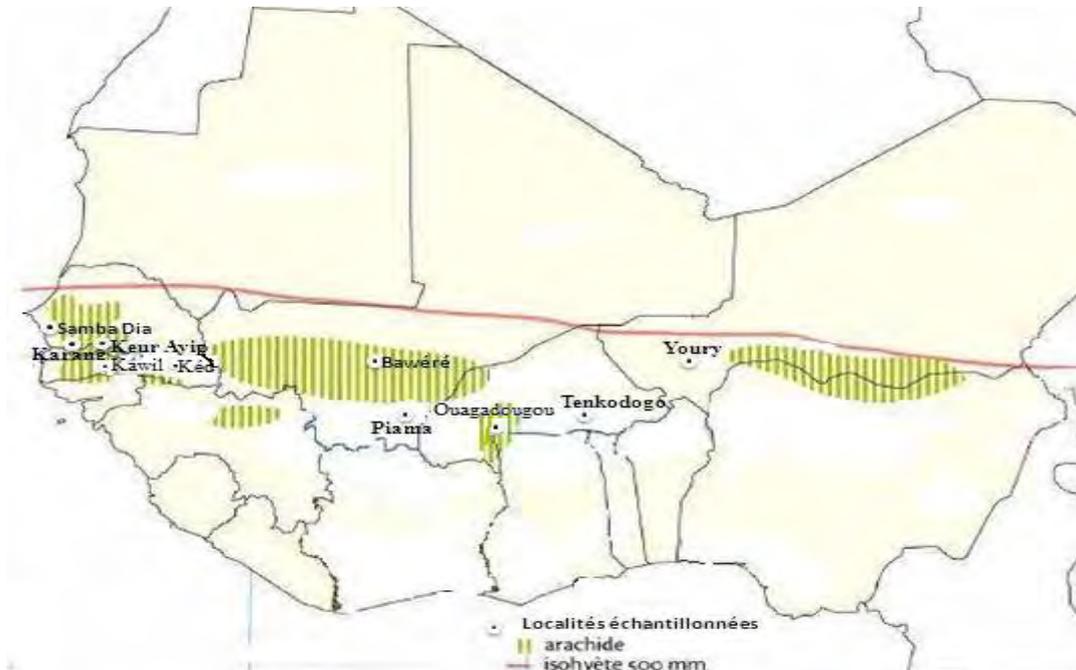


Figure 7: Les sites d'échantillonnages et les bassins de culture arachidière.

II.2. Etudes génétiques

II.2.1. Extraction de l'ADN

L'extraction commence par une dissection de l'insecte qui consiste à enlever minutieusement l'abdomen, les élytres et les ailerons. La tête, le thorax et les pattes de l'insecte sont broyés dans 180 µl d'un tampon de digestion contenant des détergents qui entraîne une dissociation des tissus et une individualisation des cellules. 20 µl de protéinase K sont ajoutés pour dégrader toutes les protéines, après une incubation à 55°C de 3h à toute une nuit. Les débris tissulaires sont éliminés après centrifugation rapide et récupération du surnageant. A cette solution, 200 µl de tampon de lyse cellulaire sont ajoutés puis un passage immédiat au vortex et incubation pendant 10 minutes à 70°C. La phase suivante consiste à ajouter 200 µl d'éthanol absolu 96-100%, à vortexer et à transvaser le mélange ainsi obtenu sur une colonne, puis à centrifuger à 13 000 rpm (rotation par minute) pendant 1 minute pour retenir l'ADN au niveau de la membrane de la colonne. En effet, l'ADN chargé négativement se fixe, par interactions ioniques, sur la membrane de silice chargée positivement. Par contre les protéines, les lipides et les polysaccharides sont éliminés.

L'ADN fixé sur la colonne est ensuite purifié pour éliminer toutes traces de contaminants. Ce lavage est réalisé par ajout successif de deux tampons de lavage AW1 et AW2 (500 µl chaque) qui passent à travers la membrane par centrifugation à 13 000 rpm pendant respectivement 1 et 3 minutes. La colonne est ensuite placée sur un tube de 1,5 ml établi selon la prédisposition d'une traçabilité de deux éluions avec le tampon AE auparavant incubé à 70°C pour augmenter le rendement de 15 à 20%. Après une première élution à 50 µl et une seconde à 30 µl, l'ADN est conservé à -20°C.

II.2.2. Amplification en chaîne par polymérase du cytochrome b et du 28S

Une partie de la région de l'extrémité du cytochrome b (Cyt b) a été amplifiée en utilisant les amorces: CB1 (5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC 3') et CB2 (5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3'). Pour l'ADN ribosomal 28S les amorces sont les

suyvants : D2CF D45F (5'-TAC CGT GAG GGA AAG AAA TTG-3 ') et D2CR D45R (5'AGA CCT CTT GGT GCC TGT TT-3'). Etant donné que les deux gènes n'ont pas le même programme pour lancer la PCR, nous allons les décrire séparément :

- Pour le 28S, l'amplification par PCR a été réalisée dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 18,525 µl d'eau ultra pure, 2,5 µl de tampon non coloré (10x), 1 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl de dNTP (2,5 mM), 0,175 µl de chaque amorce (100 µM), 0,125 µl de Taq (5U/µl) et 2 µl d'extrait d'ADN. La PCR a lieu dans un thermocycleur de type Eppendorf dans les conditions suivantes : dénaturation préliminaire à 94°C (3 minutes), suivie d'une répétition de 35 cycles de dénaturation initiale à 92°C (30 secondes), d'hybridation à 55°C (30 secondes) et d'élongation des brins d'ADN complémentaire à 72°C (1 minute), suivie d'une phase d'extension finale à 72°C (10 minutes). La PCR est bouclée par un hold à 10°C pour la conservation du produit par le thermocycleur.
- Pour le cytb, le volume réactionnel est de 25 µl contenant 18,3µl d'eau, 2,5 µl tampon de 10x, 1 µl de MgCl₂ supplémentaire, 0,5 µl de dNTP, 0,25 µl de chaque amorce, 0,2µl de Taq polymérase et 2 µl d'extrait d'ADN. Les conditions d'amplification sont les suivantes : une étape initiale de dénaturation à 94 ° C pendant 3 min, suivie de 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 min, d'hybridation à 47°C pendant 1mn et une élongation du brin d'ADN complémentaire à 72°C pendant 1 mn, une élongation finale à 72°C pendant 10 mn termine la PCR.

L'électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% dans un tampon TAE 0,5%, coloré au bromure d'éthydiuM permet de visualiser les fragments d'ADN obtenus. La détermination de la taille de ces fragments est possible à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire composé de plusieurs fragments d'ADN de taille connue qu'on dépose dans le gel et qui migre en même temps que les échantillons.

II.2.3. Séquençage du Cytochrome b et du 28S

Le séquençage repose sur la détermination de la séquence en nucléotides d'un fragment d'ADN. La purification des produits PCR et séquençage de gènes Cytb et 28S ont été réalisées par MacroGen (Corée du Sud). C'est une réaction de PCR particulière utilisant, en plus des composés habituels (ADN matrice, polymérase, amorces, dNTP, Mg²⁺), des nucléotides modifiés : les didésoxyribonucléotides (ddNTPs). Etant en compétition avec les dNTP dans le milieu réactionnel, les ddNTPs sont incorporés aléatoirement lors de la réaction de séquence, générant ainsi des fragments de différentes tailles marqués par différentes couleurs fluorescentes : ddATP-vert, ddTTP-rouge, ddCTP-bleu et ddGTP-jaune (en noir sur l'électrophorégramme. L'incorporation de ces ddNTPs par la polymérase bloque donc l'élongation de la molécule d'ADN complémentaire en cours de copie ; ce qui génère des fragments de différentes tailles. Ces fragments synthétisés sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide. La lecture du gel est réalisée par le balayage automatique d'un laser qui permet de détecter les différents fluorochromes couplés aux 4 ddNTPs.

II.3. Analyses génétiques

Pour mieux élucider notre étude nous avons utilisé deux types de marqueurs génétiques, le cytochrome b et le 28S. Le Cyt b est utilisé pour ses caractéristiques dans la grande majorité des études visant à retracer l'histoire des populations. C'est un gène à transmission maternelle, avec une

forte variabilité intra-spécifique et une absence de recombinaison génétique. Contrairement au *cytb*, le *28S* est un gène à transmission biparentale. Il restitue la population effective pour la transmission de ce gène. Ces mutations ne se conservent pas mais entraînent un effet compensatoire d'un brin à l'autre selon les liaisons hydrogènes entre les bases. Après le séquençage, les séquences obtenues sont minutieusement vérifiées, corrigées et alignées par le logiciel BioEdit version 7.0.5.3. Le fichier résultant après traitement est enregistré sous le format fasta. Pour définir les haplotypes nous avons utilisé le logiciel DNAsp version 5.10 de même que pour la diversité génétique des populations. Le logiciel TCS1extrac.21 permet de construire les réseaux d'haplotypes à partir desquels nous pouvons voir le nombre de mutations entre les haplotypes. En outre le calcul des distances génétiques et la reconstruction des arbres phylogénétiques ont été réalisés grâce au logiciel MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5.0. Trois procédures principales de reconstruction des arbres phylogénétiques sont systématiquement utilisées afin de pouvoir comparer les arbres obtenus.

1. La méthode de Neighbor-Joining : Calcul des distances entre les taxons après avoir modélisé les processus évolutifs, reconstruit l'arbre en fonction de la proximité génétique des taxons pris deux à deux.
2. La méthode du Maximum de Parcimonie : considère qu'un arbre 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 est ensuite réalisé.
3. La méthode du Maximum de Vraisemblance : 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 robustesse des branches a été évaluée pour 1000 répétitions de bootstrap.

Toutes les reconstructions phylogénétiques ont été enracinées par une séquence de *Callosobruchus maculatus* (out-group).

Chapitre III: RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats

Au total 39 séquences sont obtenues pour le 28S dont, 19 en provenance des individus issus du Sénégal, 8 du Mali, 5 du Burkina Faso et 7 du Niger. Avec le cytochrome b, nous avons 45 séquences, 18 issus des individus du Sénégal, 9 du Niger, 14 du Mali et 4 du Burkina Faso.

III.1.1. Les haplotypes

Les individus dont les séquences sont identiques appartiennent à un même haplotype. Un haplotype privé se définit comme étant un ensemble de séquences retrouvé uniquement dans une zone donnée et un haplotype individuel est constitué d'une seule séquence. Une comparaison entre les enchainements nucléotidiques permet de mettre en jeu 7 haplotypes sur 39 séquences pour le 28S. Ce gène a une longueur de 465 bases dont 3 sites avec des délétions en position 9 pour l'ensemble des séquences sauf pour trois séquences provenant du Niger (CsNY1, CsNY6 et CsNY5) et en position 375 et 376 pour la séquence CsNY11, ce qui la réduit de 462 sites. Ce gène, renferme 405 sites invariables, 57 sites variables (4 sites parcimonies informatives et 53 sites singletons). Tandis qu'avec le gène du cytochrome b nous avons 37 haplotypes sur les 46 séquences étudiées. Ce marqueur moléculaire de type mitochondrial montre 427 sites avec absence de délétion dont 119 sites invariables et 308 sites variables (267 sites singletons variables et 41 sites parcimonies informatives). Après raboutage des gènes, nous avons un total de 892 paires de bases, 828 sites conservées, 26 sites singletons et 37 sites parcimonies informatives.

En fonction des zones agro-écologiques, le nombre d'haplotypes circulant d'une zone à une autre varie selon le marqueur génétique. Avec le gène du cytochrome b les haplotypes sont individuels dans les zones agro-écologiques suivantes : Nord bassin arachidier (H1 à H5), soudano-guinéenne (H1 à H6), soudanienne Mali (H1 à H8), fleuve Niger (H1 à H9) et le Nord soudanien Burkina (H1 à H4). Dans ces zones nous avons autant de séquences que d'haplotypes. Alors que la zone Sud bassin arachidier présente des haplotypes individuels (H2 à H8) et un haplotype privé H1 qui est majoritaire avec six individus (CsKa1-CsKg5-CsKg13-CsKw2-CsKw1-CsKa3). Avec le gène du cytochrome b les populations définies en fonction des bassins de cultures arachidières et des zones non cultivées présentent 21 haplotypes sur 27 séquences pour la première (H1 à H21) et 18 haplotypes sur 18 séquences pour la seconde. L'haplotype H1 (CsKa1-CsKg5-CsKg13-CsKw2-CsKw5-CsKa3) est majoritaire dans les bassins de cultures arachidières tandis que les haplotypes H2 à H21 sont individuels. Dans les zones non cultivées les haplotypes obtenus (H1 à H18) sont individuels.

Le gène 28S montre dans la zone du fleuve Niger 5 haplotypes pour 7 séquences dont quatre individuels (H2 à H5) ; l'haplotype H1 est majoritaire dans cette zone et compte trois individus (CsNY2-CsNY9-CsN10). Dans la zone du Sénégal Orientale et Haute Casamance, la zone soudano-guinéenne et la zone soudanienne Mali, nous avons 2 haplotypes pour chaque zone dont l'un est privé et l'autre individuel (voir tableau 2). Tandis que dans la zone Nord bassin arachidier les quatre séquences obtenues constituent un haplotype, la zone Sud bassin arachidier aussi renferme un seul haplotype pour 9 séquences et celle Nord soudanien Burkina le nombre d'haplotype est égal à 1

pour 5 séquences. Pour ce même gène, nous avons 2 haplotypes sur 17 séquences pour les localités situées dans des bassins de culture d'arachide (Samba Dia, Karang, Keur Ayip, Kawil, Bawéré et Ouagadougou). L'individu CsMB6 du Burkina constitue l'haplotype H2 tandis que H1 renferme des individus du Sénégal, du Mali et du Burkina Faso (voir tableau 2). Cependant, dans les zones où la culture de l'arachide est rare (Youry, Kédougou, Piama, Tenkodogo) le nombre d'haplotypes obtenu comparé à celui des bassins de cultures est plus important, sur 22 séquences nous comptons 7 haplotypes. L'haplotype H1 est majoritaire avec 16 individus et les 6 autres haplotypes (H2 à H7) sont individuels. Les haplotypes H3, H5, H6 et H7 proviennent de Youry, H2 de Kédougou et H4 de Piama (Tableau 2). L'analyse des résultats obtenus pour les haplotypes en fonction des zones agro-écologiques d'une part et des bassins de cultures arachidières d'autre part montre que le nombre d'haplotypes obtenu avec le cytochrome b est plus important que celui du gène 28S. En outre, suivant les différentes zones agro-écologiques, c'est la zone du fleuve Niger qui présente le plus d'haplotype. Avec le gène 28S les zones non cultivées renferment plus d'haplotypes par rapport aux bassins de cultures arachidières. Par contre, avec le cytochrome b la composition haplotypique est plus importante au sein des bassins de cultures.

Tableau 2 : Composition haplotypique des zones agro-écologiques.

Cytochrome b		
Zones agro-écologiques	Haplotypes	Individus
SBA	H1 ; H2 ; H3 ; H4 ; H5 ; H6 ; H7 ; H8	(CsKa1- CsKg5-CsKg13-CsKw2-CsKw1-CsKa3) ; (CsKg14) ; (CsKg15) ; (CsKw1) ; (CsKw3) ; (CsKa6) ; (CsKa2) ; (CsKa5)
NBA	H1 ; H2 ; H3 ; H4 ; H5	(CsSd1) ; (CsSd4) ; (CsSd3) ; (CsSd2) ; (CsSd5)
SM	H1; H2 ; H3 ; H4 ; H5 ; H6 ; H7 ; H8	(CsMB1) ; (CsMB4) ; (CsMB8) ; (CsMB12) ; (CsMB10) ; (CsMB11) ; (CsMB9) ; (CsMB7)
SG	H1 ; H2 ; H3 ; H4 ; H5 ; H6	(CsMP8) ; (CsMP1) ; (CsMP2) ; (CsMP3) ; (CsMP4) ; (CsMP6)
NSB	H1; H2 ; H3 ; H4	(CsB1) ; (CsBT2) ; (CsBT1) ; (CsBT3)
FN	H1; H2; H3; H4; H5; H6; H7; H8;H9	(CsN2) ; (CsN5) ; (CsN4) ; (CSN8) ; (CsN10) ; (CsN12) ; (CsN7) ; (CsN9) ; (CsN6)
28S		
FN	H1 ; H2 ; H3 ; H4 ; H5	(CsNY2-CsNY9-CsN10) ; (CsNY11) ; (CsNY1) ; (CsNY6) ; (CsNY5)
HCS	H1 ; H2	(CsSK2 -CsSK3- CsSK5- CsSK6) ; (CsSK4)
SG	H1 ; H2	(CsMP2- CsMP3 -CsMP5- CsMP8) ; (CsMP6)
SM	H1 ; H2	(CsMB8 -CsMB9) ; (CsMB6)
NBA	H1	(CsSSd1-CsSSd2-CsSSd4- CsSSd5)
SBA	H1	(CsSKa1-CsSKa2- CsSKa3-CsSKa5-CsSKa6-CsSKg13-CsSKg10- CsSKg5-CsSKg14)
NSB	H1	(CsBT1-CsBT2- CsBT3-CsBT4-CsBT5)

Tableau 3 : La composition haplotypique des bassins de cultures arachidières et des zones non cultivées

	28S		Cytochrome b	
	Bassins de cultures arachidières	Zones non cultivées	Bassins de cultures arachidières	Zones non cultivées
Individus	(CsSKa1-CsSKa2-CsSKa3 CsSKa5-CsSKa6-CsSKg1 CsSKg13-CsSKg10-CsSKg5-CsSKg14-CsSSd1 CsSSd2-CsSSd4-CsSSd5 CsMB8-CsMB9) ; (CsMB6)	(CsSK2- CsSK3- CsSK5- CsSK6- CsMP2 -CsMP3- CsMP5- CsMP8- CsBT1- CsBT2- CsBT3- CsBT4- CsBT5-CsNY2- CsNY9-CsNY10) ; (CsSK4) ; (CsNY11) ; (CsMP6) ; (CsNY1) ; (CsNY6) ; (CsNY5)	(CsKa1-CsKg5-CsKg13-CsKw2- CsKw5-CsKa3) ; (CsB1) ; (CsMB1) ; (CsMB8) ; (CsMB4) ; (CsMB12) ; (CsKa2) ; (CsKa5) ; (CsMB9) ; (CsMB7) ; (CsSd4) ; (CsSd1) ; (CsSd5) ; (CsSd2) ; (CsSd3) ; (CsKg14) ; (CsKg15- CsMB11) ; (CsKw3) ; (CsKw1) ; (CsKa1) ; (CsMB10)	(CsMP3) ; (CsNY8) ; (CsNY4) ; (CsNY5) ; (CsBT2) ; (CsMP2) ; (CsNY2) ; (CsNY7) ; (CsNY9) ; (CsMP1) ; (CsMP8) ; (CsMP4) ; (CsN10) ; (CsN12) ; (CsBT1) ; (CsBT3) ; (CsMP6) ; (CsNY6)
Haplotypes	H1; H2	H1 ; H2 ; H3 ; H4 ; H5 ; H6 ; H7	H1 ; H2 ; H3 ; H4 ; H5 ; H6 ; H7 ; H8 ; H9; H10 ; H11 ; H12 ; H13 ; H14 ; H15; H16 ; H17 ; H18 ; H19 ; H20 ; H21	H1; H2 ; H3 ; H4 ; H5 ; H6 ; H7; H8 ; H9 ; H10 ; H11 ; H12 ; H13; H14 ; H15 ; H16 ; H17 ;H18

III.1.2. La diversité génétique

III.1.2.1. Diversité haplotypique et nucléotidique

Les populations sont définies en fonction des zones agro-écologiques d'une part et des bassins de culture arachidière d'autre part, pour étudier la diversité génétique.

Le gène 28S montre une forte diversité haplotypique (Hd) dans le fleuve Niger (0,857) et la zone soudanienne du Mali (0,666). La zone soudano-guinéenne du Mali et la zone Sénégal Oriental et Haute Casamance ont la même diversité haplotypique (0,4) et la même diversité nucléotidique (0,0009). Ces deux zones montrent une diversité haplotypique et nucléotidique (Pi) faible. Tandis que dans le Nord bassin arachidier, le Sud bassin arachidier et le Nord soudanien Burkina, la diversité haplotypique et nucléotidique sont nulles. En effet, le gène ribosomal montre que les populations de ces trois zones agro-écologiques présentent un même pool génétique. La diversité haplotypique est très faible dans les bassins arachidières (0,117), de même que la diversité nucléotidique (0,048). Contrairement avec le gène du cytochrome b, l'ensemble des zones agro-écologiques étudiées de même que les bassins de cultures arachidières présentent une diversité haplotypique très élevée. Pour les zones agro-écologiques suivantes : le Nord bassin arachidier, Soudano-guinéen, le fleuve Niger, le soudanien Mali, le Nord soudanien Burkina et les zones où l'arachide est absente ou rare, la diversité haplotypique est égale à 1. Elle est de 0,807 pour la zone Sud bassin arachidier et de 0,954 pour les bassins de culture arachidière. Le Nord bassin arachidier et le Nord soudanien Burkina, sont caractérisés par une forte Hd et une faible Pi. Tandis que pour les autres populations Hd et Pi sont fortes. Le cytochrome b n'a pas été amplifié pour la zone du SOHC d'où cette absence de résultats. (Voir tableau 4)

Tableau 4 : Diversités haplotypique et nucléotidique pour chaque zone agro-écologique

Zones	Diversité génétique	28S		Cytochrome b	
		Hd	Pi	Hd	Pi
SBA		0	0	0,807	0,03279
NBA		0	0	1	0,00890
SG		0,400	0,00087	1	0,04262
FN		0,857	0,03628	1	0,03461
SOHC		0,400	0,0008	-	-
SM		0,666	0,00144	1	0,03279
NSB		0	0	1	0,01913
Bar		0,117	0,00025	0,954	0,03293
ZNC		0,048	0,01221	1	0,03511

III.1.2.2. Distances génétiques

➤ Distances entre zones agro-écologiques

Les valeurs des distances génétiques entre les différentes zones agro-écologiques obtenues avec le cytochrome b sont assez élevées. Elles sont comprises entre 0,026 et 0,056 (voir tableau 5). La plus grande distance génétique (0,056) est obtenue entre le Nord bassin arachidier et le Nord soudanien Burkina, contrairement pour le gène du 28S qui montre une distance nulle entre ces deux populations. La plus petite distance (0,026) s'observe entre le Nord bassin arachidier et le Sud bassin arachidier. D'après le tableau 5, les distances entre les populations varient de 0 à 0,020. Une

faible distance (0,001) s'observe entre la population soudanienne Mali et les autres populations. Alors que la distance entre la zone du fleuve Niger et les autres zones est de 0,020. La distance entre la zone Nord bassin arachidier et les autres zones est nulle. Ceci montre que ces populations sont les mêmes.

Tableau 5 : Distances génétiques inter-populations pour le cytochrome b et le 28S

Zones	Distances génétiques inter-zones													
	Cytochrome b							28S						
	SBA	NBA	SG	SM	FN	NSB	SBA	NBA	SG	SM	FN	NSB	SOHC	
SBA	-						-							
NBA	0,026	-					0,00	-						
SG	0,044	0,044	-				0,00	0,00	-					
SM	0,038	0,037	0,039	-			0,001	0,00	0,001	-				
FN	0,040	0,043	0,039	0,036	-		0,020	0,020	0,020	0,020	-			
NSB	0,045	0,056	0,034	0,034	0,030	-	0,00	0,00	0,00	0,001	0,020	-		
SOHC							0,00	0,00	0,001	0,001	0,020	0,00	-	

➤ Distances à l'intérieur d'une zone agro-écologique

Avec le gène 28S, la distance génétique intra-population est nulle dans les zones agro-écologiques suivantes : le SBA, le NBA et le NSB. Par ailleurs, la zone Sud bassin arachidier regroupe différentes localités (Kawil, Karang et Keur Ayip) dont les individus ont été échantillonnés sur l'arachide et sur *Piliostigma reticulatum*. Suite à ces divergences nous pouvons voir que les individus sont identiques. Cependant, la zone fleuve Niger (0,038) présente la plus forte distance génétique intra-population (voir tableau 6). Les distances intra-populations obtenues avec le cytochrome b varient de 0,009 à 0,044 (voir tableau 6). La population Sud bassin arachidier échantillonnée sur l'arachide et sur *Piliostigma reticulatum* présente la plus petite distance intra-population (0,009). Alors que la plus grande distance (0,044) s'observe entre la population soudano-guinéenne issus tous du *P. reticulatum*.

Tableau 6 : Distances génétiques intra-populations pour le 28S et le cytochrome b

Gènes	Zones agro-écologiques						
	SBA	NBA	SG	SM	FN	NSB	SOHC
Cytochrome b	0,009	0,035	0,044	0,039	0,036	0,020	-
28S	0	0	0,001	0,001	0,038	0	0,001

➤ Distances intra et inter bassins de culture arachidière

Avec le gène 28S la distance génétique à l'intérieure des zones non cultivées est de 0,013 et pour les bassins de culture arachidière elle est nulle (tableau 7). Le cytochrome b montre une distance intra-zones de 0,035 pour les bassins de culture arachidière et 0,037 pour les zones non cultivées. Ainsi, la différence n'est pas très significative entre ces zones. Entre les bassins de culture arachidière et les zones non cultivées la distance obtenue avec le cytochrome b (0,041) est supérieure à celle obtenue avec le 28S (0,007).

Tableau 7 : Distances génétiques entre bassins arachidiers et les zones où l'arachide n'est pas cultivée avec le 28S et le cytochrome b

	Distances génétiques			
	28S		Cytochrome b	
	intra-zones	inter-zones	intra-zones	inter-zones
Bassins de culture arachidière	0		0,035	
		0,007		0,041
Zones non cultivées	0,013		0,037	

III.1.2.3. Degré de différenciation génétique entre les populations

L'analyse du tableau 8 montre un faible degré de différenciation génétique entre les zones agro-écologiques d'une part et d'autre part entre les bassins de culture arachidière et les zones non cultivées, aussi bien pour le gène 28S que pour le cytochrome b. C'est seulement entre la population NBA et celle NSB que nous avons une valeur de Fst significative (0,734) (voir tableau 8b). Excepté ces dernières, les résultats obtenus montrent une absence de différenciation génétique entre les zones agro-écologiques et entre les bassins de culture arachidière et les zones non cultivées.

Tableau 8 : Différenciation génétique entre les populations du 28S (a) et du cytochrome b (b).

a			b		
28S			Cytochrome b		
Population1	Population2	Fst	Population 1	Population 2	Fst
SBA	SOHC,NBA,SG,SM,NSB	0	NBA	SBA	0,164
SOHC	SM	0,038	NBA	SM	0,347
SOHC	NBA, SG, NSB	0	NBA	SG	0,387
NBA	FN	0,037	NBA	FN	0,465
NBA	SG, SM, NSB	0	NBA	NSB	0,734
NBA	FN	0,038	SBA	FM	0,036
SG	SM, NBA	0	SBA	SG	0,105
SG	FN	0,018	SBA	FN	0,104
SM	NBA	0	SBA	NSB	0,40
SM	FN	0,036	SM	SG	-0,069
NSB	FN	0,038	SM	FN	-0,049
Bassins de culture	Zones non cultivées	0,013	SG	NSB	0,134
			SG	FN	-0,032
			SG	NSB	0,058
			FN	NSB	0,078
			Bassins de culture	Zones non cultivées	0,121

III.1.3. Les arbres phylogénétiques des haplotypes

Dans les reconstructions phylogénétiques, les zones agro-écologiques sont spécifiées par des couleurs. La zone Nord soudanienne Burkina en violet, la zone soudano-guinéenne en rouge, la zone soudanienne Mali en rose, la zone Sud bassin arachidier en noir, le Nord bassin arachidier en marron clair, le fleuve Niger en vert et la zone Sénégal oriental et haute Casamance en bleu. En outre, les points noirs sur les arbres matérialisent les individus provenant des bassins de culture arachidière.

L'arbre consensus du gène 28S obtenu selon l'approche du maximum de Parcimonie (figure 8) regroupe l'ensemble des haplotypes dans un groupe (G1) excepté l'haplotype individuel CsNY11 de la zone du fleuve Niger. Ce groupe G1 est soutenu par une forte valeur de bootstrap 100%. Les

haplotypes individuels H2 (CsSK4) de la zone Sénégal Oriental et Haute Casamance et celui H2 (CsMB6) de la zone soudanienne Mali forment un sous-groupe 1 avec 100% de bootstrap. Les haplotypes H3 (CsNY1) et H4 (CsNY6) de la zone du fleuve Niger forme un sous-groupe 2 avec 100% de bootstrap. Ce sous groupe 2 est proche de l'haplotype H5 (CsNY5) avec une valeur de bootstrap de 56%.

Les arbres phylogénétiques du 28S obtenus selon la méthode du Neighbor-Joining et celle du maximum de parcimonie présentent la même topologie que l'arbre des haplotypes du maximum de parcimonie avec des valeurs de bootstrap assez faibles. (voir annexe VII).

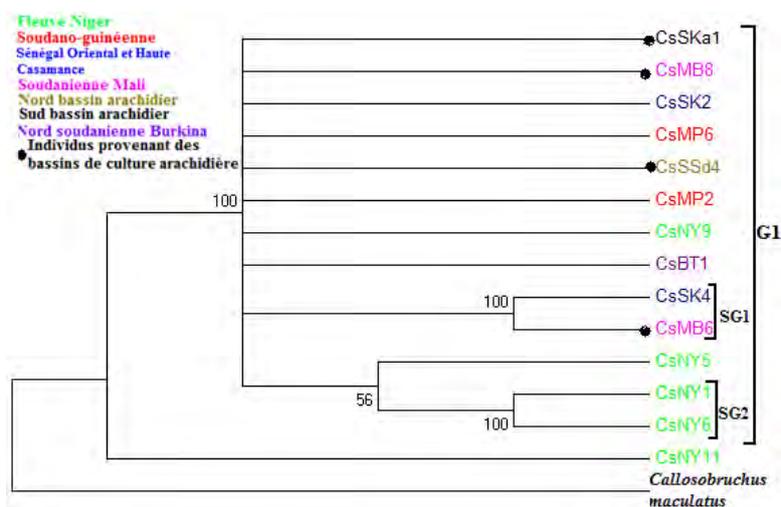


Figure 8 : Arbre consensus des haplotypes selon la méthode du maximum de parcimonie avec le gène 28S

Avec le gène du cytochrome b l'arbre du maximum de parcimonie (figure 9) montre deux groupes bien distincts avec une forte robustesse de leur branchement (100%). La valeur de bootstrap est de 100% pour le groupe 1 et de 98% pour le groupe 2. Ces deux groupes sont hétérogènes, les haplotypes rencontrés pour chaque zone se retrouvent aussi bien dans le groupe 1 comme dans le groupe 2. Seulement la zone Nord bassin arachidier du Sénégal se trouve dans le groupe 1. Dans le groupe 2 les haplotypes de la zone Sud bassin arachidier du Sénégal (CsSKa1, CsSKa5, CsSKw3 et CsSKa6) et l'haplotype individuel CsNY6 fleuve Niger forme un sous groupe avec une forte bootstrap 100%. Les haplotypes CsBT1 et CsBT3 de la zone Nord soudanienne Burkina constitue aussi un sous groupe. En ce qui concerne les haplotypes CsMB12 et CsMB10 de la zone soudanienne Mali, ils ne se retrouvent dans aucun groupe. Dans chaque groupe nous retrouvons également les haplotypes provenant les uns des bassins de culture arachidière et les autres dans les zones où la culture de l'arachide est rare voir absente. Les haplotypes rencontrés dans les bassins de culture sont majoritaire dans le groupe 1 avec de fortes valeurs de bootstrap. L'haplotype CsMP6 de la zone soudano-guinéenne du Mali constitue un troisième groupe.

Les reconstructions phylogénétiques des haplotypes par analyse du Neighbor-Joining et du maximum de vraisemblance présentent la même topologie que l'arbre consensus du maximum de

parcimonie avec des valeurs de bootstrap faibles (38% et 30%) entre les deux groupes. La différence notée entre ces arbres réside en la séparation des haplotypes CsMB10 et CsMB12 du groupe 1 de la zone Nord soudanienne Burkina par la méthode du maximum de parcimonie (voir annexe VIII).

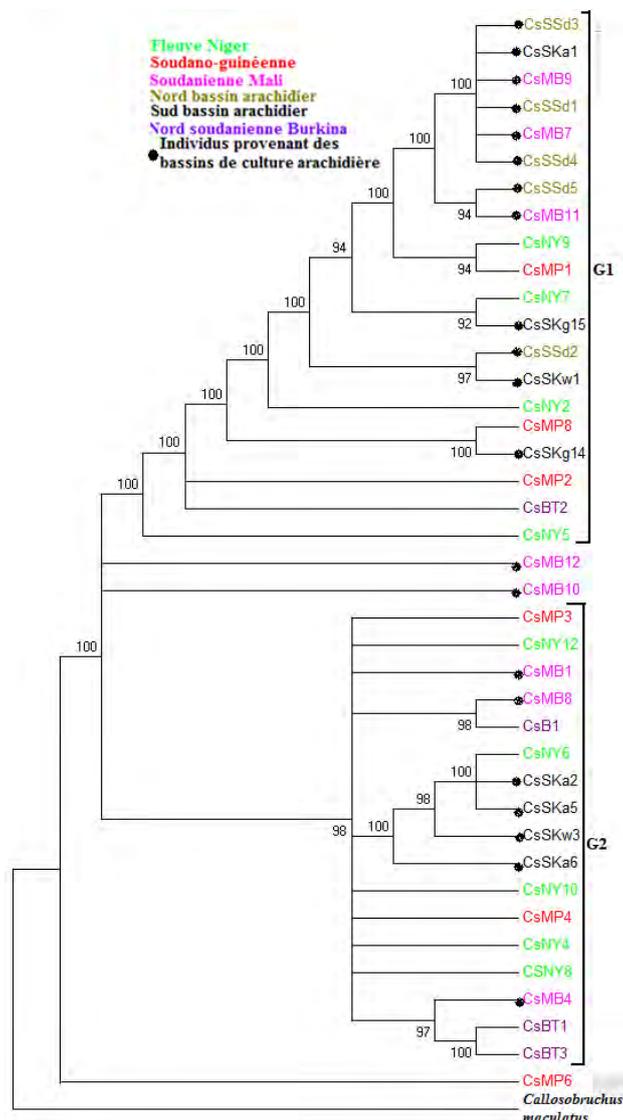


Figure 9 : Arbre phylogénétique des haplotypes selon la méthode du maximum de parcimonie avec le gène cytochrome

Avec les deux gènes raboutés, l'arbre phylogénétique obtenu selon la méthode du maximum de parcimonie révèle deux groupes ayant la même composition cladistique que ceux obtenus avec le gène cytochrome b. Chaque groupe renferme des individus issus des différentes zones agro-écologiques. Les individus de la zone Nord bassin arachidier du Sénégal et ceux de la zone Nord soudanienne Burkina sont représentés respectivement dans le G1 et le G2. Tandis que, les autres zones à savoir le Sud bassin arachidier du Sénégal, le fleuve Niger, la zone Nord soudanienne Burkina, la zone soudanienne et soudano-guinéenne du Mali nous remarquons une distribution dans les deux groupes G1 et G2. En outre, ce même cas de figure s'observe avec les individus provenant des bassins de culture arachidière et ceux des zones où la culture de l'arachide est rare voir absente. Ainsi, les individus provenant des bassins de culture sont majoritairement représentés dans le

groupe 1 et y constituent un sous groupe soutenu par une forte valeur de bootstrap 100%. Alors que dans le groupe 2 nous avons que quatre individus provenant des bassins de culture. Dans le groupe les individus CsSKa2, CsSKa5 et CsSKa6 de la zone Sud bassin arachidier du Sénégal forment avec ceux de la zone fleuve Niger CsNY6 et CsNY5 un sous groupe avec 100% de bootstrap. Nous avons aussi un autre sous groupe constitué par les individus de la zone soudano-guinéenne du Mali (CsMP3), de la zone Nord soudanienne Burkina (CsBT3 et CsBT1) et celle de la zone soudanienne du Mali.

L'arbre du maximum de parcimonie présente la même topologie que ceux du Neighbor-Joining et du maximum de vraisemblance. Les individus CsMP2, CsBT2 et CsNY5 du groupe 2 par la méthode du maximum de parcimonie sont placés dans le groupe 1 par les autres méthodes (voir annexe IX).

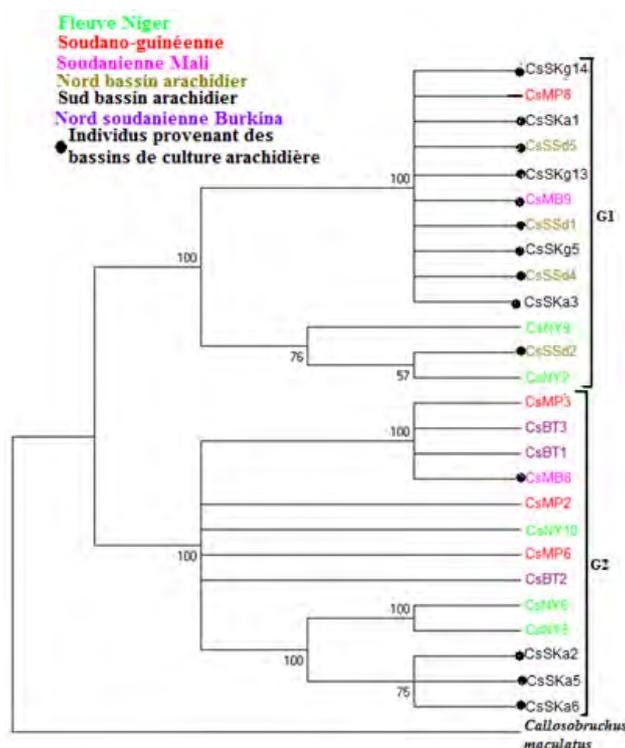


Figure 10 : Arbre phylogénétique des deux gènes raboutés selon la méthode du maximum de Parcimonie.

III.1.4. les réseaux d'haplotypes

➤ Pour le 28S

Le réseau d'haplotype du 28S montre sept disques. Chaque disque correspond à un haplotype, et leur dimension est proportionnelle au nombre d'individus correspondant à l'haplotype. Les petits cercles correspondent à des pas mutationnels entre les haplotypes. L'haplotype H1 ayant la plus grande taille est majoritaire, il renferme 32 individus provenant de différentes zones agro-écologiques, alors que le H2 ne renferme que deux individus (CsSK4, CsMB6) et les cinq autres haplotypes sont individuels H5(CsNY1), H6 (CsNY6) et H7 (CsNY5), H3 (CsNY11) et H4 (CsMP6). Les haplotypes H3 et H5 sont plus éloignés avec respectivement 40 et 12 pas mutationnels par rapport à l'haplotype ancestral.

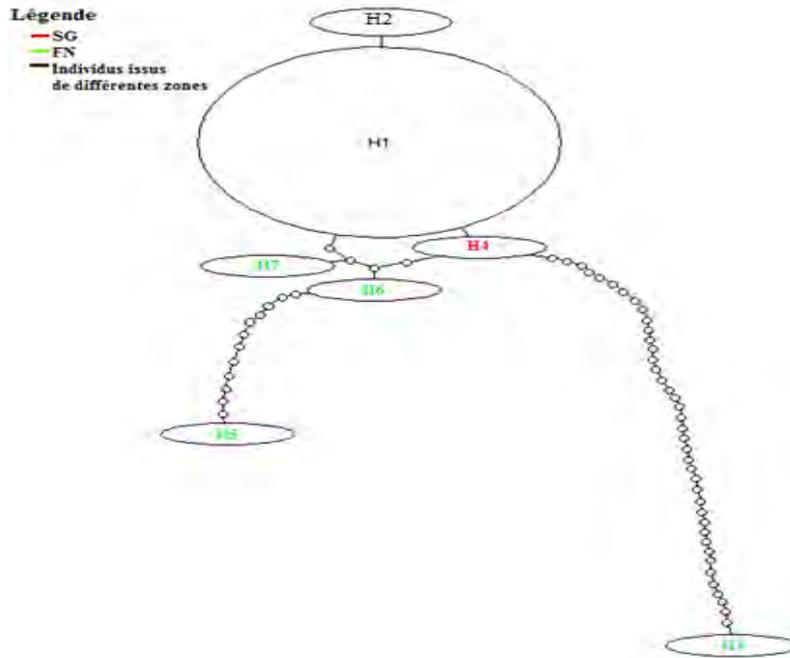


Figure 11 : Réseau d'haplotype obtenu avec le 28S

➤ **Pour le Cytochrome b**

Avec le cytochrome b, le réseau obtenu est plus complexe avec 37 disques ou haplotypes. L'haplotype H2 peut être considéré comme étant l'ancêtre commun, il est majoritaire avec six individus (CsSKa1, CsSKg5, CsSKg13, CsSKw2, CsSKw5, CsSKa3). L'haplotype H37 constitué seulement par l'individu CsMP6 tend à se détacher du lot avec 18 pas mutationnels. La structuration du réseau d'haplotypes montre une population en croissance. Avec les réseaux nous pouvons voir les mêmes regroupements phylogénétiques obtenus avec les arbres associés au nombre de pas mutationnel entre les haplotypes (figure 12).

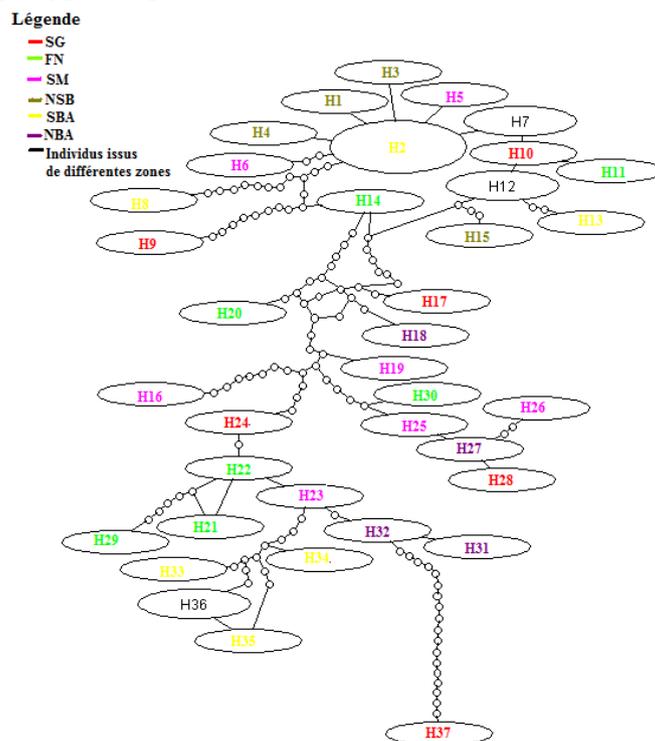


Figure 12: Réseau d'haplotype obtenu avec le Cytochrome b

III.2. DISCUSSION

L'objectif visé dans cette étude consiste à déterminer les haplotypes et de voir s'il existe une structuration génétique entre les populations de *Caryedon serratus* inféodées à l'arachide en fonction des zones agro-écologiques d'une part et d'autre part en fonction des bassins de culture arachidière dans quatre pays de l'Afrique de l'ouest (Sénégal, Mali, Burkina et Niger).

Le nombre d'haplotypes obtenu pour l'ensemble des séquences avec le cytochrome b (37 haplotypes) est supérieur à celui du 28S (7 haplotypes). Cette différence s'explique par les caractéristiques de ces deux marqueurs. Le cytochrome b est mutationnel et conserve ses mutations contrairement au 28S qui ne les conserve pas. Ces résultats ont été déjà trouvés dans les études antérieures (Ndong *et al.*, 2011 ; Diome *et al.*, 2011 ; Ndiaye et Sembène 2011). Avec le cytochrome b, l'ensemble des zones agro-écologiques renferme des haplotypes individuels. Seule la zone Sud bassin arachidier présente un haplotype majoritaire avec six individus (CsKa1-CsKg5-CsKg13-CsKw2-CsKw1-CsKa3) et sept haplotypes individuels. Ce nombre important d'haplotypes (8) dans cette zone peut s'expliquer par l'introduction d'haplotypes provenant d'autres pays voisins, comme nous pouvons le supposer dans le SBA où les localités de Karang et de Keur Ayip du Sénégal se situent dans la frontière Sénégal-gambienne, lieu d'échange par le biais du commerce. Avec les deux gènes, nous avons remarqué que la zone agro-écologique majoritaire en nombre d'haplotypes est celle du fleuve Niger. En fonction des bassins de culture arachidière le nombre d'haplotypes obtenu avec le cytochrome b (21 haplotypes) est supérieur à celui obtenu avec le gène 28S (7 haplotypes). Ceci peut s'expliquer par la variabilité du cytochrome b.

Le gène 28S montre une diversité haplotypique et nucléotidique nulle pour les zones agro-écologiques Nord bassin arachidier, Sud bassin arachidier et Nord soudanienne Burkina. Alors que la zone soudano-guinéenne, le Sénégal Oriental et Haute Casamance et les bassins de culture arachidière ont une diversité haplotypique et nucléotidique faible. Pour ces zones la faible diversité observée pourrait être due à un sévère et prolongé bottleneck démographique. Par contre, le cytochrome b étant plus variable montre une forte diversité haplotypique associée à une faible diversité nucléotidique pour l'ensemble des zones agro-écologiques de même que les bassins de culture arachidière et les zones où l'arachide est rare voir absente. Il y aurait alors dans ces zones une croissance démographique rapide à partir d'une population ancestrale à faible taille efficace, depuis un temps suffisant pour un rétablissement de la diversité haplotypique par mutation, mais trop court pour l'accumulation de fortes différences de séquences.

Les distances génétiques intra-populations obtenues avec le gène 28S varient de 0 à 0,038 et celle entre les populations de 0 à 0,020. Ces distances trouvées entre les populations sont inférieures à celles obtenues entre les haplotypes déterminés dans les études de Ndong *et al.* (2011) qui varient de 0,002 à 0,127. La zone agro-écologique du fleuve Niger présente la plus grande distance génétique intra-zone (0,038). Cette valeur montre une certaine divergence génétique dans cette population bien qu'ils proviennent d'une même plante hôte le *P. reticulatum*. Ceci serait dû au fait que les populations de *Caryedon serratus* inféodées à *Piliostigma reticulatum* coexisteraient avec

des bruches venant d'autres pays Comme l'Inde, étant donné qu'il existe un carrefour d'échange entre ces pays. Avec le cytochrome b les distances intra-populations varient de 0,009 à 0,044 et celles entre les populations de 0,026 à 0,056. C'est entre la zones Nord bassin arachidier du Sénégal dont les individus sont issus du *P. reticulatum* et celle Nord soudanienne Burkina dont les individus sont issus de l'arachide que nous avons la plus grande distance génétique 0,056. C'est presque la même valeur obtenue par Diome *et al.* (2011) entre des groupes (0,057) qu'il a déterminés dans la sous-région. La distance génétique obtenue entre les bassins de culture arachidière et les zones où la culture de l'arachide est absente voir rare est de 0,007 pour le gène 28S et 0,041 pour le cytochrome b. Tandis qu'à l'intérieur des bassins, la distance est nulle pour le 28S et pour le cytochrome b elle est de 0,035. Les distances obtenues avec le cytochrome b sont supérieures à celles obtenues avec le gène 28S. Ces résultats montrent que le cytochrome b est un marqueur génétique plus discriminant que le 28S.

Entre la population Nord bassin arachidier du Sénégal et celle Nord soudanienne Burkina, le degré de différenciation génétique observé est élevé (0,734). Ces deux populations présentent une certaine différenciation génétique. Etant donné que l'infestation de l'arachide a eu lieu pour la première fois au Sénégal, cela laisse supposer qu'en plus de la souche inféodée à *Piliostigma reticulatum*, l'arachide du Burkina est infestée par d'autres souches provenant d'autres plantes hôtes. Par ailleurs, dans la zone Nord soudanienne Burkina d'après Kagone (2001) certaines espèces de plantes y sont conservées pour des raisons utilitaires, nous pouvons citer le cas du *Tamarindus indica*. D'après Sembène (2000) *T. indica* pourrait éventuellement, être un hôte refuge de *C. serratus* qui infestent l'arachide, en cas d'inexistence de gousses de *P. reticulatum*. Par contre, Ouedraogo *et al.* (2010) pensent que les gousses de *Faidherbia albida* sont à l'origine de l'infestation de l'arachide au Burkina. Les différenciations entre les zones agro-écologiques et les bassins de cultures du Sénégal et celles des autres zones et bassins des autres pays comme le Mali et le Niger sont faibles. Cela montre qu'il n'y a pas de différenciation entre ces zones et que l'arachide serait infestée soit par les souches inféodées dans les *Piliostigmas* comme il a été démontré par Sembène (2000) soit par un transport de gousses infestées du Sénégal vers ces autres pays (Diome *et al.*, 2011). La répartition actuelle de *C. serratus* ravageur de l'arachide peut être expliquée par une succession d'introduction de matériel infesté, comme cela a été la cause probable de l'infestation de l'arachide au Congo (Delobel et Matokot, 1991).

L'ensemble des reconstructions phylogénétiques montrent deux groupes. Avec le 28S, le groupe 1 regroupe les haplotypes des différentes zones agro-écologiques à savoir le Sénégal Oriental et Haute Casamance, le Nord bassin arachidier, le Sud bassin arachidier au Sénégal ; la zone soudano-guinéenne et celle soudanienne au Mali ; la zone Nord soudanienne Burkina et enfin la zone fleuve Niger. Alors que le groupe 2 n'est constitué que par l'individu CsNY11 de la zone du fleuve Niger. Nous avons quelque soit la méthode utilisée le sous groupe 1 formé par les haplotypes CsMB6 de la zone soudanienne Mali et CsSK4 de la zone agro-écologique Sénégal Oriental et Haute Casamance.

Ils sont issus tous les deux du *Piliostigma reticulatum*. Nous pouvons voir que les pays d'origine de ces individus sont frontaliers. Ainsi, ce fait entre en cohérence avec Sembène *et al.* (1998) selon qui les distances géographiques ne sont pas déterminantes dans la structuration génétique des populations de *C. serratus* d'une même plante donnée. Le sous groupe 2 ne regroupe que les individus de la zone du fleuve Niger (CsNY1 et CsNY6). Par ailleurs, l'individu CsNY5 se rapproche de ce sous groupe 2. Ceci montre que les populations du Niger subissent une certaine force mutationnelle. Comme nous l'avons observé avec le 28S, le cytochrome b montre aussi des regroupements phylogénétiques très hétérogènes. Le cytb montre deux groupes bien distincts. Les haplotypes rencontrés pour chaque zone se retrouvent aussi bien dans le groupe 1 comme dans le groupe 2. Dans chaque groupe, nous avons également une distribution des haplotypes provenant des bassins de culture arachidière et des zones où l'arachide est rare voir absente. Par ailleurs, la population de la zone Nord bassin arachidier du Sénégal n'est représentée que dans le groupe 1. Donc, pour cette population le pool génétique est le même. L'haplotype CsMP6 de la zone soudano-guinéenne du Mali constitue un troisième groupe. Les réseaux d'haplotypes montrent pour les individus CsMP6 de la zone soudano-guinéenne du Mali et celui CsNY11 de la zone fleuve Niger issus tous les deux du *P. reticulatum* un important nombre de pas mutationnel. C'est ce qui fait qu'avec les arbres phylogénétiques le CsNY11 forme le groupe 2 avec le 28S alors que pour le cytochrome b l'individu CsMP6 forme un troisième groupe. En dehors des conditions écologiques qui règnent dans ces zones, cette diversité génétique mérite d'être élucidée. Ainsi, les arbres phylogénétiques de même que les réseaux d'haplotypes ne montrent aucune structuration génétique des populations étudiées ni en fonction des zones agro-écologiques ni en fonction des bassins de culture arachidière. Mais révèlent des informations intéressantes à savoir la présence d'une même population dans deux groupes différents. Cette structuration au sein d'une même zone et d'une même plante pourrait s'expliquer suite à l'introduction d'haplotypes nouveaux en provenance d'autres pays via les échanges commerciaux ou du fait que le cytochrome b évolue rapidement avec le temps.

CONCLUSION

L'étude effectuée tend à montrer que les populations de la bruche de l'arachide *Caryedon serratus* issus de quatre pays de l'Afrique de l'ouest (Sénégal, Burkina, Mali et Niger) ne présentent aucune structuration génétique entre les différentes zones agro-écologiques et les bassins de culture arachidière. Les résultats obtenus avec le gène mitochondrial (cytochrome b) et celui ribosomal (28S) montrent que le premier est plus discriminant pour des études génétiques. Le cytochrome b donne 37 haplotypes alors qu'avec le 28S nous ne comptons que 7 haplotypes. En effet, la plus grande diversité haplotypique est notée dans la zone fleuve Niger. Toutefois, des études plus approfondies méritent d'être réalisées pour comprendre cette tendance évolutive observée dans cette zone. En outre les zones agro-écologiques et les bassins de culture arachidière du Sénégal, du Mali et du Niger ne montrent pas de différenciation. Dans l'ensemble des zones agro-écologiques de la sous région ouest africaine c'est le même biotype qui infeste l'arachide.

Des études plus approfondies sur l'évolution de ce biotype seraient nécessaire pour comprendre la structuration observée à l'intérieur d'une même population. Ainsi, il convient de :

- diversifier les pays d'études ;
- d'augmenter la taille des échantillons, étudier la divergence génétique des populations issus d'autres plantes hôtes sauvages.

C'est dans cette lancée que des moyens de lutte efficace peuvent être élaboré permettant de mieux conserver les stocks d'arachide contre les attaques de la bruche *Caryedon serratus*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

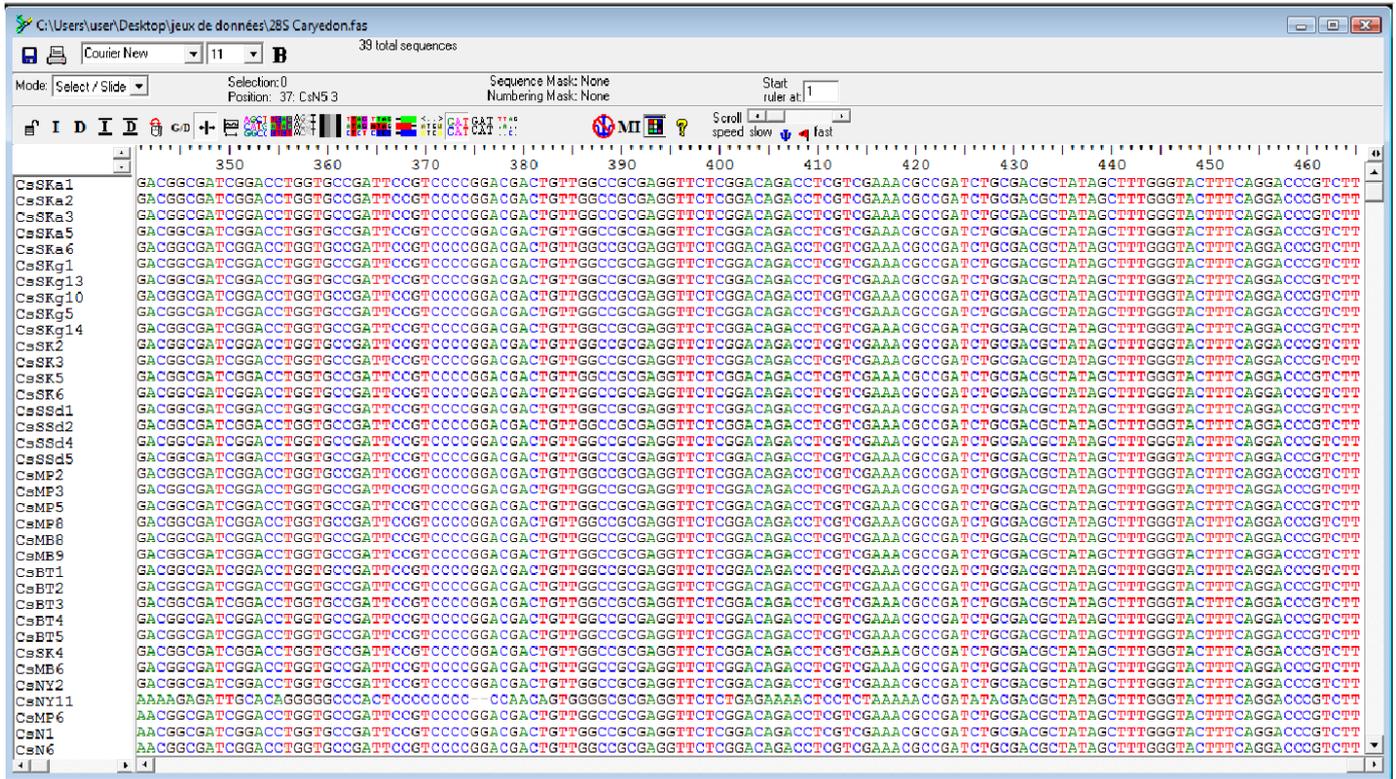
1. **BANABESSEY K., 2011.** Diagnostic environnemental de la filière arachide dans la zone du bassin arachidier. Conseil National de Concertation et de Coopération des Ruraux (CNCR). 15p
2. **DELOBEL A., 1988.** *Comment résoudre le problème des pertes en cours de stockage : l'exemple de la bruche de l'arachide (Caryedon serratus) au Congo.* ORSTOM / Brazzaville. 3
3. **DELOBEL A. & MATOKOT L., 1991.** Control of groundnut insect pests in African subsistence farming. Centre Orstom, B.P. 181, Brazzaville, Congo. 1599–1607.
4. **DELOBEL A. & TRAN M., 1993.** Les coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes. CTA et ORSTROM, 424p.
5. **DELOBEL P., 1997.** *Bases d'une lutte physique contre la bruche de l'arachide : Etude de la résistance thermique.* Rapport de stage de seconde année. Laboratoire de Protection des Stocks centre ORSTOM-ITA Dakar/SENEGAL, 42 p.
6. **DELOBEL A., 1989.** *Uscana caryedoni [hym. : trichogrammatidae] : Possibilités d'utilisation en lutte biologique Contre la bruche de l'arachide, caryedon serratus [col. : bruchidae].* ORSTOM / Brazzaville *ENTOMOPHAGA* 34 (3): 351-363.
7. **DIOME T., NDIAYE A., NDONG A., DOUMMA A., SANON A., KETOH G., & SEMBENE M., 2011.** Genetic identification of West African ecotypes of the groundnut seedbeetle *caryedon serratus* ol. (coleoptera, chrysomelidae). *South Asian Journal of Experimental Biology.* 1 (2): 88-93.
8. **GUÈYE G., SALL M., DIÈYE P N., LOUHOUNGHOU C. E.R. & SY I., 2008.** Caractérisation et typologie des exploitations agricoles familiales du Sénégal. Tome2 : Sénégal Oriental et Haute Casamance. ISRA. 8(4): 37p.
9. **GUEYE M.T., SECK D., WATHELET J.P. & LOGNAY G., 2011.** Lutte contre les ravageurs des stocks de céréales et de légumineuses au Sénégal et en Afrique occidentale : synthèse bibliographique. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(1) : 183-194.
10. **KAGONE H., 2001.** Profil fourrager Burkina Faso. IN.E.R.A. Burkina. 23p.
11. **MASSALA E., 1997.** *Impact de la pression d'infestation des bruches (callosobruchus maculatus F. et caryedon serratus OL.) sur le potentiel germinatif des graines de niébe et d'arachide : efficacité de substances d'origine Végétale pour la protection des semences. Mémoire de fin d'étude.* Pour l'obtention du diplôme d'ingénieur des travaux agricoles. 53p.
12. **MOTOKOT L., MAPANGOU-DIVASSA S. & DELOBEL A., 1987.** Évolution des populations de *Caryedon serratus* (Ol.) (Coleoptera : Bruchidae) dans les stocks d'arachide au Congo. ORSTOM / Brazzaville. 69-74.
13. **NDIAYE A. & SEMBÈNE M., 2011.** Haplotypic diversity of West African populations of groundnut seed-beetle, *Caryedon serratus* ol. (Coloeptera, Chrysomelidae, Bruchinae): Results from geographical and DNA sequences data. *Journal of Cell and Animal Biology*, Vol. 5(9) : 187-195.
14. **NDIAYE S., 1991.** *La bruche de l'arachide dans un écosystème du centre Ouest du Sénégal : Contribution à l'étude de la contamination en plein champ et dans les stocks de l'arachide par Caryedon serratus (Ol) (Col., Bruchidae) ; rôle des légumineuses hôtes sauvages dans le cycle de cette bruche.* Thèse Université de Pau et des Pays de l'Adour, France, 96p.
15. **NDIAYE S.A.S., 2004.** *Réhabilitation des sols salés expérience de la recherche forestière dans le bassin arachidier.* Séminaire du projet PRASS-AFRICARE-CRDI, Saly (Sénégal). 19-21.
16. **NDONG A., DIOME T., THIAW C., NDIAYE A., KÉBÉ K., DOUMA A., KETOH G. & SANON A. & SEMBÈNE M., 2011.** Several haplotypes of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) seed-beetle, *Caryedon serratus* Ol. (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae), in West Africa: Genetic identification using 28S sequences. *African Journal of Biotechnology* 10(55): 11409-11420.
17. **OUEDRAOGO I., TRAORÉ N. S., DAKOUO D., GUENDA W., DICKO O.I. & DABIRE L.C.B., 2008.** Impact de la bruche *Caryedon serratus* (Ol.) sur les stocks d'arachide et stratégie de protection en milieu paysan. *Science et Technique, Sciences Naturelles Et Agronomie.* 30 (1) : 7-18.
18. **OUEDRAOGO I., TRAORE N.S., GUENDA W. & DABIRE L.C.B., 2010.** Influence des plantes hôtes sur la fécondité et le développement larvaire de la bruche de l'arachide *Caryedon serratus* Olivier (Coleoptera : Bruchidae) au Burkina Faso. *Journal of Applied Biosciences.* 31 : 1906-1915.

19. SALL A., 1997. *Methodes physiques de protection des stocks d'arachide contre la bruche Caryedon serratus (olivier): Etude de faisabilité d'une technique de solarisation. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'Ingenieur agronome.* 78p.
20. SCHINLLING R., 1996. L'arachide en Afrique tropicale. *Maisonneuve et Larose.* (37). 171p.
21. SEMBENE M., & DELOBEL A., 1996. Identification morphométrique de populations soudano-sahéliennes de bruche de l'arachide, *Caryedon serratus* (Olivier) (Coleoptera Bruchidae). *Journal of african zoology.* 1(10): 357-366.
22. SEMBENE M., BRIZARD J.P. & DELOBEL A., 1998. Allozyme variation among populations of the groundnut seed-beetle, *Caryedon serratus* (Ol.) in Senegal. *Insect Sci. Applic.* 18 (3): 77-86.
23. SEMBENE M., KEBE K., DELOBEL A. & RASPLUS J.Y., 2010. Phylogenetic information reveals the peculiarity of *Caryedon serratus* (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae) feeding on *Cassia sieberiana* DC (Caesalpinoideae). *African Journal of Biotechnology*, 9 (10): 1470-140.
24. SEMBÈNE M. & DELOBEL A., 1998. Genetic differentiation of groundnut seed-beetle populations in Senegal. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* ©1998 Kluwer Academic Publishers. Printed in Belgium. 87: 171–180.
25. SEMBENE M., GUEYE N., BUTTS C.L. & ARTHUR F.H., 2004. Peanuts. Blackwell Publishing, UK. *Science and Technology.* (2): 181-196.
26. SEMBENE M., GUEYE M.T., DELOBEL P., SALL A. & DELOBEL A., 2006. Désinsectisation des stocks d'arachide infestés par *caryedon serratus* (ol.) : utilisation de la solarisation en zone sahélienne. Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques. *Journal des sciences.* 6 (1) : 11p.
27. SEMBENE P.M., 2000. *Variabilité de l'Espaceur Interne Transcrit (ITS1) de l'ADN ribosomique et polymorphisme des locus microsattellites chez la bruche Caryedon serratus (Olivier) : différenciation en races d'hôtes et infestation de l'arachide au Sénégal.* Thèse de Doctorat d'Etat es Faculté des Sciences et Techniques de Dakar (Sénégal). 180p.
28. SEMBENE P M., 2006. The origin of groundnut infestation by the seed beetle *Caryedon serratus* (Olivier) (Coleoptera: Bruchidae): Results from cytochrome B and ITS1 gene sequences. *Journal of Stored Products Research.* 42: 97-111.
29. SEMBENE M., KEBE K., DELOBEL A., 2012. Effet structurant de la plante hôte chez la bruche de l'arachide, *Caryedon serratus* (Olivier, 1790) (Coleoptera : Bruchidae). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16(1), 3-11.
30. SEMBENE 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.* Doctorat de 3ème cycle, Université de Dakar. 128p.
31. SEYBOU Y. & KODAKO Y., 2004. *Etude sur l'approfondissement du diagnostic et l'analyse des systèmes de production agro-sylvo-pastoraux dans le cadre de la mise en œuvre de la stratégie de développement rural : région de Tillabéri.* République du Niger comite interministériel de pilotage de la stratégie de développement rural secrétariat exécutif. 83p.

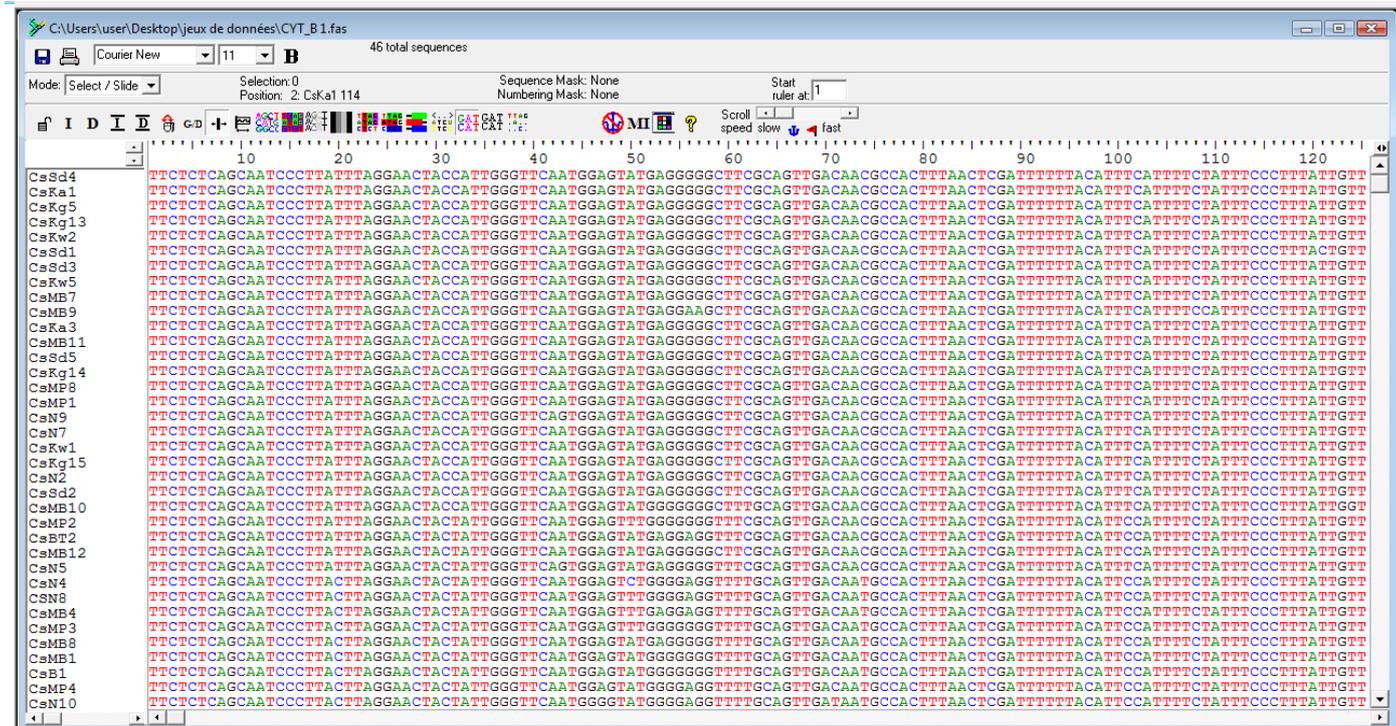
WEBOGRAPHIE

1. <http://equipe-gengespop.com> 22 Novembre 201
2. <http://www.spong-burkina.org/wp-content/uploads/2012/05/bagen-dagha-1.jpg> 3 Mai 2012.

Annexe I : Séquences du gène 28S alignées avec le logiciel BioEdit version 7.0.5.3.



Annexe II : Séquences du gène cytochrome b alignées avec le logiciel BioEdit version 7.0.5.3.



Annexe III : Préparation du Mix PCR du 28S pour un échantillon

Amorce F :	D2CF D45F	Gène amplifié :	28S	Nombre de tubes :	1
Amorce R :	D2CR.D45R			Volume réactionnel :	25 µl
				Volume d'ADN matrice :	2 µl

Concentrations des réactifs			Mix PCR	
	Initiale	Finale		
Tampon :	10 x	1 x	Eau UHQ	18,525 µl
MgCl ₂ dans le tampon :	15 mM	1,5 mM	Tampon (10x) :	2,5 µl
MgCl ₂ supplémentaire :	25 mM	1 mM	MgCl ₂ :	1 µl
dNTP (chaque) :	2,5 mM	0,05 mM	dNTP :	0,5 µl
D2CF D45F	100 µM	0,7 µM	D2CF D45F	0,175 µl
D2CR D45R	100 µM	0,7 µM	D2CR D45R	0,175 µl
Solution Q :	5 x	0 x	Solution Q :	0 µl
BSA :	10 mg/ml	0 mg/ml	BSA :	0 µl
DMSO :		0 µl/tube	DMSO :	0 µl
Taq : qiagen	5 U/µl	0,625 U/tube	Taq :	0,125 µl
			Total volume :	23 µl
			Volume / tube :	23 µl

Conditions de PCR			Commentaires PCR	
Dénaturation initiale :	94°C	3min		
Nombre de cycle :		30		
Dénaturation initiale :	92°C	30sec		
Hybridation :	55°C	30sec		
Elongation	72°C	1min		
Extension finale	72°C	10min		
Hold	10°C	∞		

Annexe IV : Préparation du Mix PCR du Cytochrome b pour un échantillon

Fiche PCR n° :		Date :	
----------------	--	--------	--

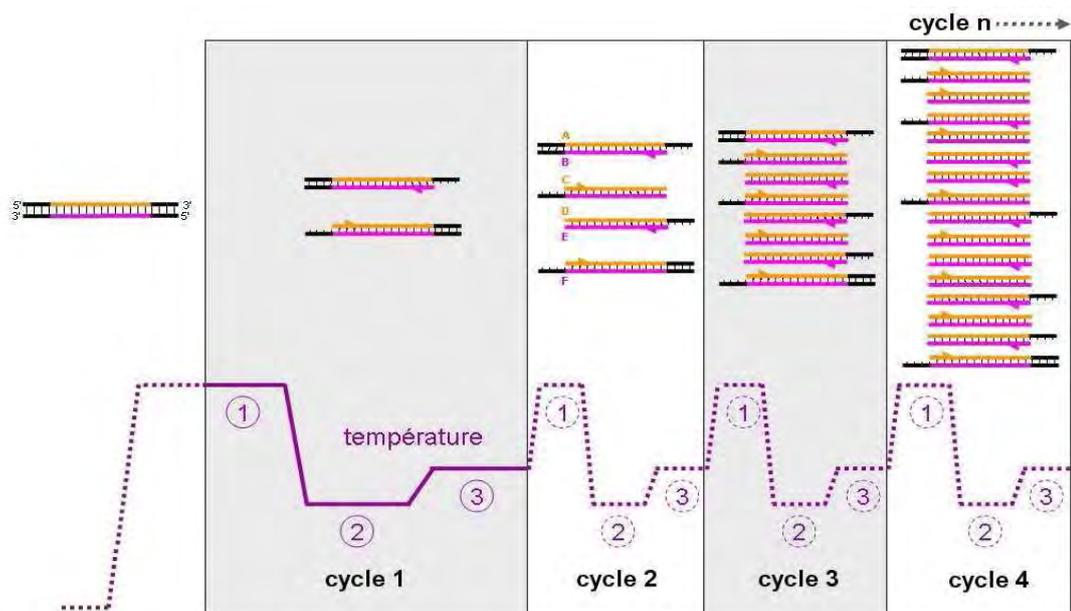
Echantillons	Master Mix PCR			
	Nombre de tubes :			1
	Volume réactionnel :			25 µl
	Volume d'ADN matrice :			2 µl
	Réactifs	Concentrations initiales	Concentrations finales	Volumes
	Eau MilliQ :			18,3 µl
	Tampon :	10 x	1 x	2,5 µl
	MgCl ₂ dans le tampon :	15 mM	1,5 mM	
	MgCl ₂ supplémentaire :	25 mM	1 mM	1 µl
	dNTP (chaque) :	2,5 mM	0,1 mM	0,5 µl
	CB1	100 µM	1 µM	0,25 µl
	CB2	100 µM	1 µM	0,25 µl
		10 µM	µM	0 µl
		10 µM	µM	0 µl
		10 µM	µM	0 µl
		10 µM	µM	0 µl
	Adjuvant	5 x	x	0 µl
	Adjuvant	100 %	%	0 µl
	Adjuvant	10 mg/ml	mg/ml	0 µl
	Taq : Qiagen	5 U/µl	1 U/tube	0,2 µl
	Volume total :			23 µl
	Volume à distribuer par tube :			23 µl

Gène amplifié		Conditions de PCR			
Cytob		Dénaturation initiale :	94°C	3min	
		Nombre de cycle :	35 cycles		puis
		Dénaturation :	94°C	1min	
		Hybridation :	47°C	1min	
		Elongation :	72°C	1min	72°C
		Elongation finale :			72°C 10min
		Hold :			10°C ∞

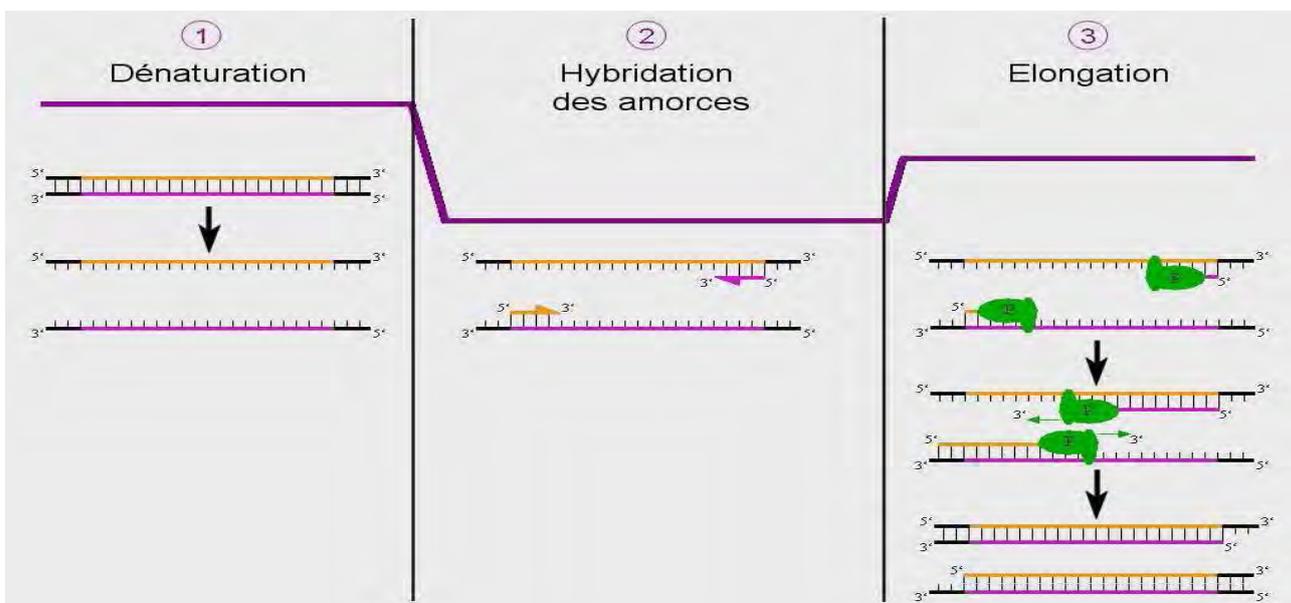
Amorces		Type de PCR	
Amorce 1 :	CB1	Hot Start :	NON
Amorce 2 :	CB2	Autre :	Classique
Amorce 3 :			
Amorce 4 :			
Amorce 5 :			
Amorce 6 :			

Thermocycleur	
Marque :	Eppendorf
Modèle :	Ep Gradient S
Numéro :	6

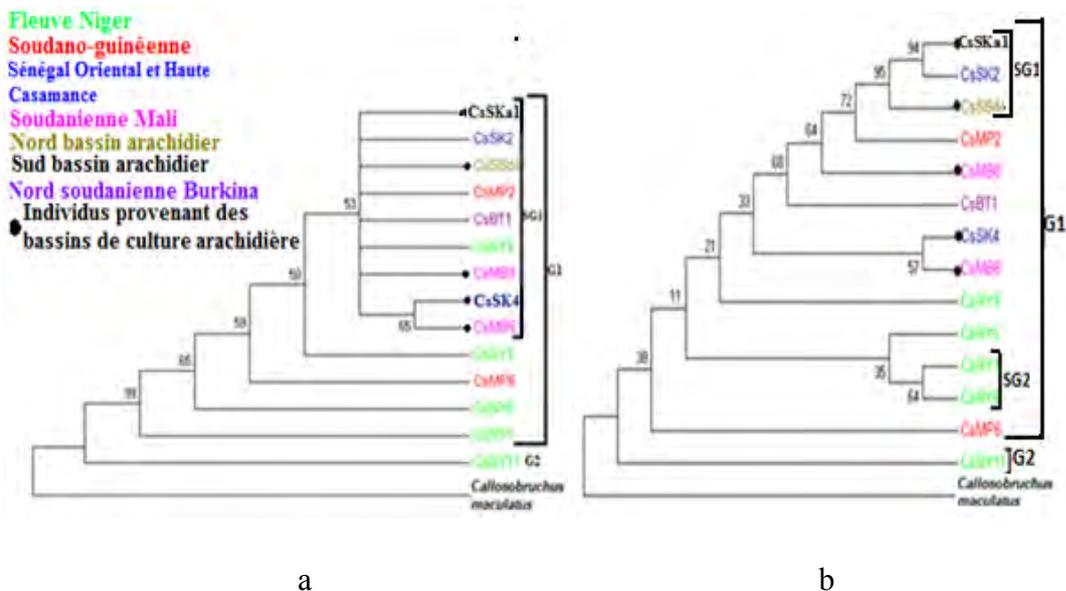
Annexe V : Augmentation exponentielle de la quantité d'ADN cible à chaque cycle de PCR



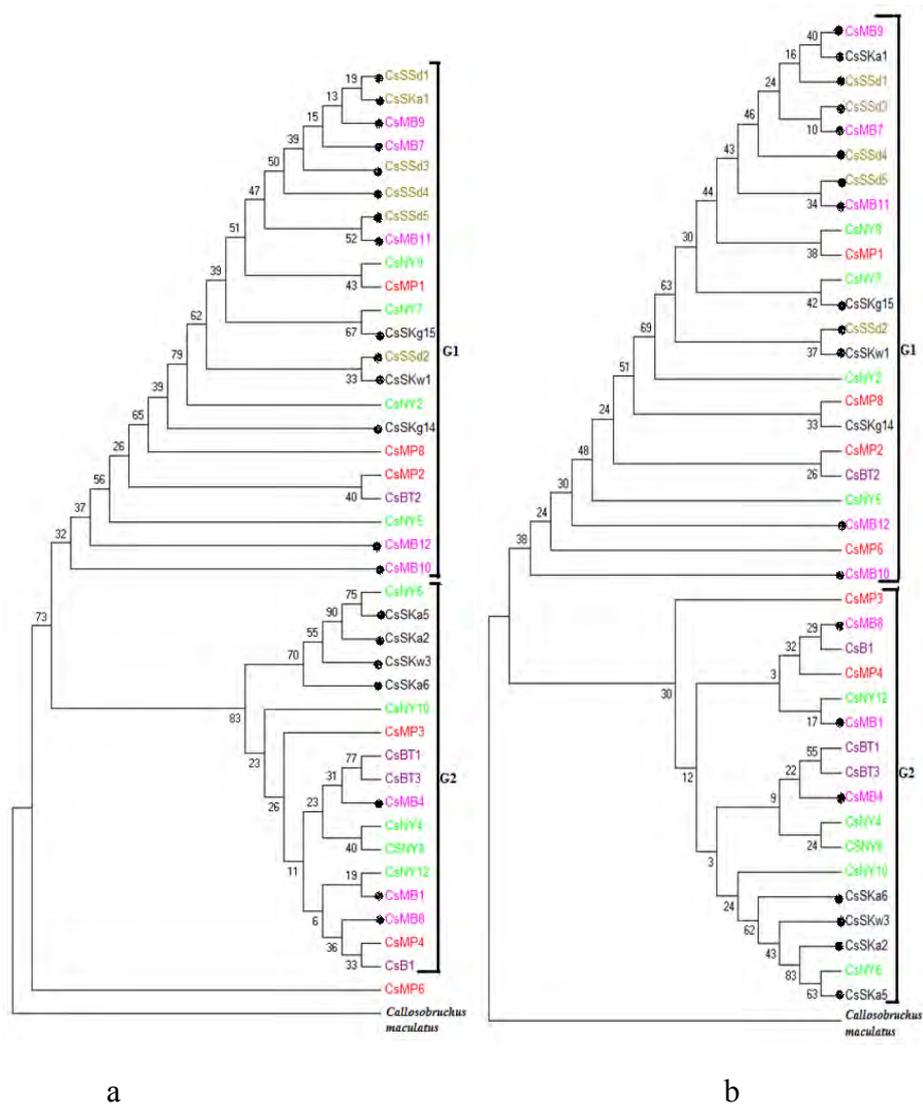
Annexe VI : Les 3 phases d'un cycle d'amplification par PCR (Gauthier, 2010)



Annexe VII : Arbres phylogénétiques des haplotypes avec le gène 28S selon la méthode du Neighbor-joining (a) et du maximum de vraisemblance (b).

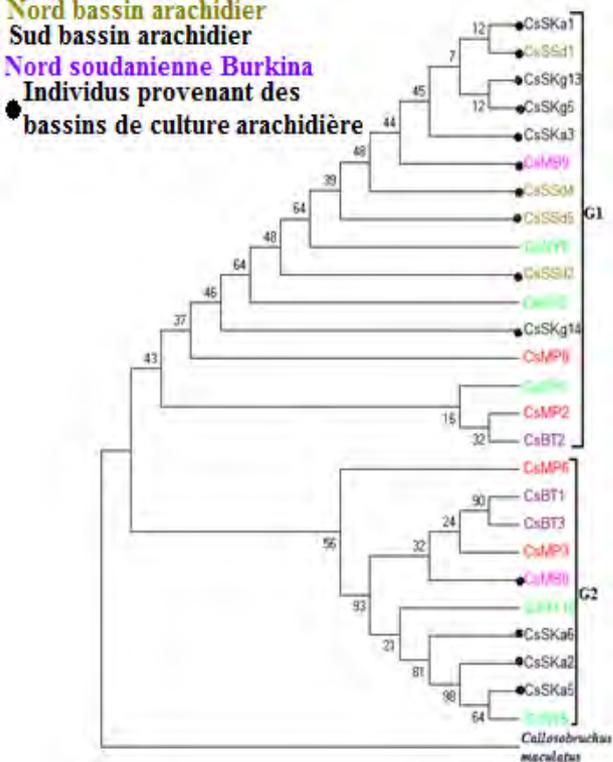


Annexe VIII : Arbres phylogénétiques des haplotypes avec le gène Cytb selon la méthode du Neighbor-joining (a) et du maximum de vraisemblance (b).

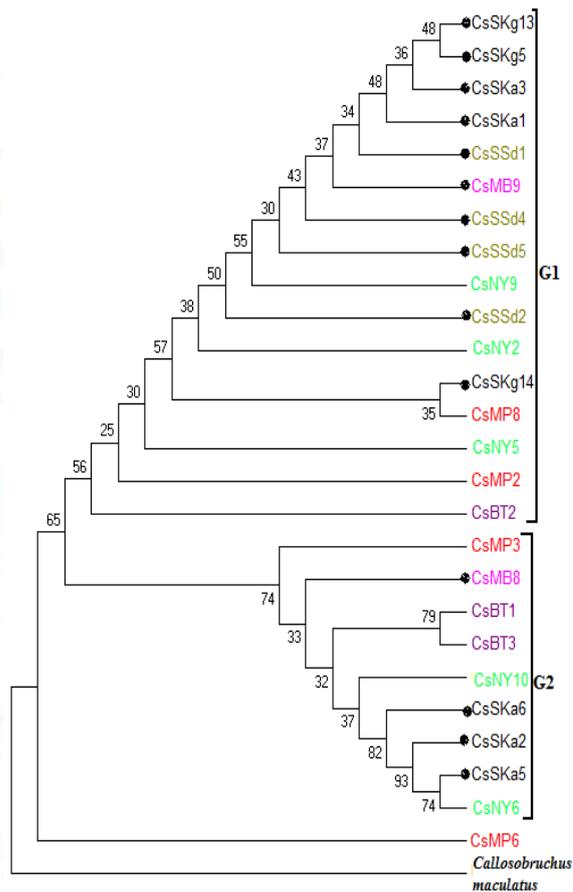


Annexe IX : Arbres phylogénétiques avec les deux gènes raboutés selon la méthode du neighbor-joining (a) et du maximum de vraisemblance (b).

Fleuve Niger
Soudano-guinéenne
Soudanaïenne Mali
Nord bassin arachidier
Sud bassin arachidier
Nord soudanaïenne Burkina
Individus provenant des bassins de culture arachidière



a



b