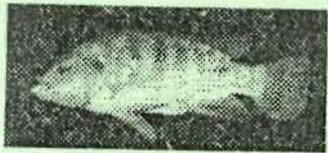




BURKINA FASO
Unité - Progrès - Justice



MINISTRE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE, SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
(MESSRS)

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-
DIOULASSO (UPB)

INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL (IDR)

CENTRE INTERNATIONAL DE
RECHERCHE DEVELOPPEMENT SUR
L'ELEVAGE EN ZONE SUB-HUMIDE
(CIRDES)

MENTION TRÈS BIEN



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

Pour l'obtention du

DIPLÔME D'INGENIEUR DU DEVELOPPEMENT RURAL

Option : EAUX ET FORETS

CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE DES
POPULATIONS D'*OREOCHROMIS*
NILOTICUS DU BURKINA FASO

Présenté et soutenu par

Mlle Aïcha Edith SOARA

Directeur de mémoire :

Dr Aboubacar TOGUYENI

Maître de stage :

Dr Sophie THEVENON

Juin 2005

SOMMAIRE

Mem-B

II

DEDICACE	930	IV
REMERCIEMENTS	304	V
SIGLES ET ABREVIATIONS		VI
LISTE DES FIGURES		VII
LISTE DES PHOTOS		VIII
LISTE DES SCHEMAS		IX
LISTE DES TABLEAUX		X
RESUME		XI
INTRODUCTION		1
Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE		4
I-1 PRESENTATION D' <i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1758)		5
I-1-1 POSITION SYSTEMATIQUE		5
I-1-2 MORPHOLOGIE		6
I-1-3 AIRE DE REPARTITION EN AFRIQUE		6
I-1-4 REGIME ALIMENTAIRE		7
I-1-5 CROISSANCE		7
I-1-6 REPRODUCTION		7
I-2 ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR LA DIVERSITE GENETIQUE D' <i>Oreochromis niloticus</i>		11
I-3 ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE MITOCHONDRIAL		12
I-4 PCR: POLYMERASE CHAIN REACTION OU REACTION DE POLYMERISATION EN CHAÎNE		13
I-4-1 PRINCIPE		13
I-4-2 PARTICULARITÉS		16
I-5 RFLP: RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM OU POLYMORPHISME DE LONGUEUR DES FRAGMENTS DE RESTRICTION		16
Chapitre II : MATERIELS ET METHODES		19
II-1 MATERIELS		20
II-1-1 MATERIEL BIOLOGIQUE		20
II-1-1-1 Bassin de la Comoé		21
II-1-1-2 Bassin de la Volta		22
II-1-1-3 Bassin du Niger		25
II-1-2 APPAREILLAGES		26

II-2 METHODES.....	28
II-2-1 EXTRACTION DE L'ADN.....	28
II-2-2 CONTRÔLE DE L'ADN.....	29
II-2-3 PCR : POLYMERASE CHAIN REACTION.....	30
II-2-3-1 Amplification du gène ND-5/6.....	30
II-2-3-2 Electrophorèse des produits d'amplification.....	31
II-2-4 RFLP: RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM.....	31
II-2-4-1 Digestion du gène ND-5/6.....	31
II-2-4-2 Electrophorèse des fragments de restriction.....	32
Chapitre III RESULTATS ET DISCUSSION.....	33
III-1 RESULTATS.....	34
III-1-1 AMPLIFICATION DU GENE ND-5/6 PAR ND-5/6-S ET ND-5/6-R.....	34
III-1-2 AMPLIFICATION DU GENE ND-5/6 PAR C-Glu ET C-Leu3.....	35
III-1-3 CARACTERISATION DES POPULATIONS PAR RFLP.....	35
III-2 DISCUSSION.....	43
III-2-1 MISE AU POINT DU PROTOCOLE D'AMPLIFICATION.....	43
III-2-2 ANALYSE DES DONNEES DE LA RFLP.....	45
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	47
BIBLIOGRAPHIE.....	48
ANNEXES.....	52

DEDICACE

Je dédie ce mémoire à :

- ✦ *mon père SOARA Missa, qui m'a montré les chemins de l'école ;*
- ✦ *ma mère TAMINI Clarisse pour sa constante présence à mes côtés ;*
- ✦ *feu mon grand père maternel TAMINI Henri et à sa femme TAMINI/BONZI Lucie pour le sacrifice consenti à mon éducation et auxquels je dois une grande partie de ma personnalité ;*
- ✦ *mon petit frère SOARA Ibrahîm Césaire pour plus d'ambitions;*
- ✦ *mes oncles, tantes, frères et sœurs pour leurs compréhensions et conseils.*

Que ce travail soit, avec la bénédiction de Dieu, le symbole de la paix des cœurs.

REMERCIEMENTS

Ce travail est le résultat d'une convention de collaboration entre l'UPB et le CIRDES. Il a été réalisé au laboratoire d'extraction d'ADN du CIRDES à Bobo-Dioulasso.

Je voudrais remercier très sincèrement :

- ❖ les responsables du **FIS** pour le financement des matériels et consommables ;
- ❖ les responsables de l'**ANAFE** pour le financement des travaux de terrain ;
- ❖ le **Professeur Abdoulaye S. Gouro**, directeur général du CIRDES, qui a bien voulu nous accueillir dans son institution pour la réalisation de ce stage ;
- ❖ mon maître de stage, le **Docteur Sophie THEVENON**, pour avoir accepté volontiers de diriger ce travail et avoir su répondre à nos multiples sollicitations chaque fois que nous avons eu des soucis dans nos manipulations ;
- ❖ le **Docteur Issa SIDIBE**, pour avoir accepté co-diriger ce travail et pour ses conseils ;
- ❖ mon directeur de mémoire, le **Docteur Aboubacar TOGUYENI**, pour avoir proposé le sujet et trouvé des financements à ce travail, mais aussi et surtout pour avoir été toujours disponible pour les différentes sorties sur le terrain et l'orientation de notre raisonnement ;
- ❖ **Monsieur Souleymane SYLLA**, mention spéciale pour tous ces moments passés ensemble, moments souvent de déception lorsque pendant des jours, voire des semaines, la PCR nous faisait montre de tous ses caprices, mais également des moments de satisfaction, lorsqu'on en arrivait à bout ;
- ❖ tout le **personnel du CIRDES**, qui nous a «adopté» en faisant de nous un «membre» à part entière de la «famille CIRDES».

Mes remerciements vont également à tous ceux qui, de très près ou de loin, ont contribué, de quelques manières que ce soit, à la réalisation de ce travail. Qu'ils trouvent ici toute l'expression de ma reconnaissance.

SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN ou DNA : Acide DésoxyriboNucléique

ADNmt : Acide DésoxyriboNucleique mitochondrial

ANAFE: African Network for Agro-Forestry Education

BET : Bromure d'ETHidium

CIRDES : Centre International de Recherche Développement sur l'Élevage en zone
Sub-humide

D-Loop : Boucle D

dNTP : diNucléotide TriPhosphate

EDTA : Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation

FIS : Fondation Internationale pour la Science

IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER

Kb : Mille paires de bases

ND-5/6 : Nicotinamine Adénine Dehydrogenase sous unités 5 et 6

pb : paires de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

Taq : *Thermus aquaticus*

TBE : Tris-Borate-EDTA

UPB : Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : carte de la répartition naturelle d' <i>Oreochromis niloticus</i> en Afrique.....	6
Figure 2 : exemple d'ADN mitochondrial, la carte du génome mitochondrial Humain.	13
Figure 3 : les trois bassins hydrographiques du Burkina Faso.....	20
Figure 4 : localisation de la retenue d'eau de Danguoindougou sur le bassin de la Comoé.....	22
Figure 5 : localisation de la retenue d'eau de Bama et de la Mare aux Hippopotames sur le sous bassin du Mouhoun.	23
Figure 6 : localisation du barrage de Bagré et de celui de la Kompienga sur les sous bassins du Nakambé et de la Pendjari.....	24
Figure 7 : localisation du barrage de la Tapoa sur le bassin du Niger.....	25

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : <i>Oreochromis niloticus</i>	5
Photo 2 : vues externe et interne d'une centrifugeuse.....	26
Photo 3 : vues externe et interne d'un thermocycleur.....	27
Photo 4 : cuve à électrophorèse accompagnée d'un générateur.....	27
Photo 5 : vues externe et interne d'un bain-marie.....	28
Photo 6 : électrophorèse sur gel d'agarose de routine (1,5%) des produits d'amplification n'ayant pas donné de bandes avec les amorces ND-5/6-S et ND-5/6-R à [MgCl ₂] 3 mM et température d'hybridation 60°C.....	34
Photo 7 : électrophorèse sur gel d'agarose de routine (1,5%) des produits d'amplification ayant donné des bandes non spécifiques avec les amorces ND-5/6-S et ND-5/6-R à [MgCl ₂] 3 mM et température d'hybridation 46°C.....	34
Photo 8 : électrophorèse sur gel d'agarose de routine (1,5%) des produits d'amplification ayant donnés des bandes spécifiques avec les amorces C-Glu et C-Leu3 à [MgCl ₂] 3 mM et température d'hybridation 56°C.....	35
Photo 9 : électrophorèse sur gel d'agarose Nusieve (2%) des produits de digestion de l'enzyme de restriction Alu I.....	36
Photo 10 : électrophorèse sur gel d'agarose Nusieve (2%) des produits de digestion de l'enzyme de restriction Hae III.....	37
Photo 11 : électrophorèse sur gel d'agarose Nusieve (2%) des produits de digestion de l'enzyme de restriction Hinf I.....	38
Photo 12 : électrophorèse sur gel d'agarose Nusieve (2%) des produits de digestion de l'enzyme de restriction Hpa II.....	40
Photo 13 : électrophorèse sur gel d'agarose Nusieve (2%) des produits de digestion de l'enzyme de restriction Taq I.....	41

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1 : deux mâles rivaux défendent leurs nids. Un mâle construit son nid	8
Schéma 2 : le mâle attire la femelle dans son nid.	8
Schéma 3 : la femelle pond des ovules et le mâle s'apprête à les féconder.....	9
Schéma 4 : la femelle reprend ses oeufs dans sa bouche pour les incuber.	9
Schéma 5 : la femelle avec ses œufs (egg) en incubation dans sa bouche.	9
Schéma 6 : la femelle reprend ses alevins dans sa bouche au moindre danger.	10
Schéma 7 : amplification d'un fragment d'ADN par PCR.....	15
Schéma 8 : mise en place du gel.....	29

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : localisation des sites d'échantillonnage des populations étudiées.....	21
Tableau II : liste des enzymes utilisées.....	31
Tableau III : les différents haplotypes obtenus avec Alu I en fonction de la taille et du nombre de fragments.....	36
Tableau IV: répartition des haplotypes de Alu I dans les différentes populations.....	36
Tableau V : les différents haplotypes obtenus avec Hae III en fonction de la taille et du nombre de fragments.....	37
Tableau VI : répartition des haplotypes de Hae III dans les différentes populations.....	38
Tableau VII : haplotype obtenu avec Hinf I en fonction de la taille et du nombre de fragments.	39
Tableau VIII : répartition de l'haplotype de Hinf I dans les différentes populations.....	39
Tableau IX : haplotype obtenu avec Hpa II en fonction de la taille et du nombre de fragments..	40
Tableau X : répartition de l'haplotype de Hpa II dans les différentes populations.....	40
Tableau XI : les différents haplotypes obtenus avec Taq I en fonction de la taille et du nombre de fragments.....	41
Tableau XII : répartition des haplotypes de Taq I dans les différentes populations.	42
Tableau XIII : répartition des haplotypes de Taq I dans les différents bassins hydrographiques.	42

RESUME

La présente étude vise à caractériser les populations d'*Oreochromis niloticus* du Burkina Faso par l'étude du polymorphisme de l'ADNmt. L'objectif à long terme de cette étude est, grâce à la connaissance de la structuration des populations, d'appuyer la mise en place du programme de sélection d'une souche d'élevage. La technique utilisée est la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) qui a consisté à digérer les produits d'amplification du gène ND-5/6 (environ 2 500 pb) par cinq enzymes de restriction. Les résultats des digestions ont révélé un monomorphisme des individus échantillonnés pour quatre enzymes (Alu I, Hae III, Hinf I et Hpa II) et un fort polymorphisme pour l'enzyme Taq I. Cette enzyme a permis, grâce aux quatre haplotypes qu'elle a donnés, d'identifier trois grandes populations qui appartiennent aux trois bassins hydrographiques du pays à savoir la Comoé, la Volta et le Niger.

Mots clés : *Oreochromis niloticus*, ADNmt, RFLP, ND-5/6.

INTRODUCTION

La forte croissance démographique, l'urbanisation galopante, l'évolution des goûts des consommateurs et leurs habitudes alimentaires, sont autant de facteurs qui ont entraîné une augmentation considérable de la demande en protéines animales.

Ainsi, le poisson, très riche en protéines à valeur biologique élevée, se trouve soumis à une forte consommation. En effet, la consommation mondiale de poissons est passée de 93,6 millions de tonnes en 1998 à 100,7 millions de tonnes en 2002, assurant ainsi à plus de 2,6 milliards de personnes au moins 20 % de leurs apports en protéines animales (FAO, 2004 b). Mais cette importante demande en poisson est de moins en moins satisfaite par les pêches de capture, qui connaissent une stabilité depuis quelques années. Pour satisfaire à leurs besoins, les populations ont donc de plus en plus recours à l'aquaculture.

L'aquaculture, qui se définit comme une activité de pratiques culturales de végétaux et d'animaux dans l'eau, croît plus rapidement que tous les autres secteurs de production de chair animale. En effet, elle s'est développée à un taux moyen annuel de 8,9 % par an depuis 1970, contre seulement 1,2 % pour les pêches de capture et 2,8 % pour les systèmes de production de viande sur la terre ferme (FAO, 2004 b). Ainsi, le développement de la pisciculture a permis à la production mondiale de poissons d'atteindre en 2002 un record de 133 millions de tonnes (FAO, 2004 b).

Dans cette aquaculture mondiale, les tilapias (genres *Oreochromis*, *Sarotherodon* et *Tilapia*) occupent le troisième rang des espèces les plus utilisées après les cyprinidés et les salmonidés (IFREMER, 2003), avec une production mondiale annuelle d'environ 1,7 millions de tonnes (Spore N° 101). Originaires d'Afrique, ils sont aujourd'hui répandus à travers le monde (Asie, Amérique, Europe). L'importance de cette production est liée à certaines caractéristiques de leur biologie :

- grande diversité : existence d'un grand nombre d'espèces ;
- grande facilité de reproduction, même en milieu fermé, sans équipement complexe ni induction hormonale de ponte ;
- facilité d'adaptation à divers milieux et à l'alimentation artificielle ;
- grande résistance aux manipulations fréquentes et possibilité d'élevage dans différents systèmes sans infrastructures très onéreuses (étangs en terre, cages flottantes, enclos) ;
- grande résistance aux maladies : très peu de problèmes pathologiques ;

- bonne qualité alimentaire et organoleptique, et aptitude à la conservation par séchage, salage ou fumage.

Parmi toutes les espèces de tilapias, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) est la principale espèce utilisée en aquaculture dans les eaux continentales en Afrique.

Le Burkina Faso, à l'instar des autres pays, rencontre des difficultés pour satisfaire sa demande en poisson par les pêches de capture. En effet, cette demande sans cesse croissante était estimée en 2001 à 22 000 tonnes contre une production halieutique de 8 505 tonnes (FAO, 2004 a).

Pour combler ce déficit de la production par rapport à la consommation, il fut créé, dans la région des Cascades, une station de pisciculture dénommée « Projet Aquaculture de Banfora » dans les années 1980. Mais, comme cela fut le cas dans la plupart des pays africains dans les années 1960 (Lazard, 1987), cette tentative a connu des problèmes qui étaient, entre autres, des problèmes d'alimentation et de mortalité.

Dans le souci d'une recherche de solutions, les différents problèmes rencontrés ont été soumis à une expertise internationale. Après analyses, Lazard (1987) a recommandé dans son rapport un travail de sélection génétique afin d'améliorer la souche du point de vue des performances de reproduction et de croissance. En effet, aucune étude de performances zootechniques, ni de caractérisation génétique des populations d'*Oreochromis niloticus* du Burkina, et particulièrement de celle utilisée, n'avait été préalablement réalisée. Or, le Burkina Faso est drainé par trois cours d'eau internationaux (Comoé, Niger et Volta), ce qui suggère plusieurs origines possibles des populations d'*Oreochromis niloticus*, qui pourraient avoir des performances zootechniques différentes comme le laisse entrevoir les données de la Direction Générale des Ressources Halieutiques.

Des différences de croissance de l'espèce sont aussi rencontrées au niveau africain. En effet, Palada-de-Vera et Eknath (1993) ont montré dans leur étude de comparaison de différentes souches d'*Oreochromis niloticus*, des différences de croissance entre les souches provenant du Ghana (lac Volta), du Sénégal et de l'Égypte. De même, Morissens et al. (1995), ont observé des différences de performances zootechniques entre la souche "Bouaké" (Côte d'Ivoire) et la souche de la rivière Kou du Burkina. Des différences de croissance ont également été observées, par Assemien et Gourène (1998), entre la souche "Ghana" (lac Volta), la souche "Niger", la souche "Sénégal" et la souche "Bouaké".

La présente étude s'inscrit dans le cadre du plan stratégique de développement de l'aquaculture au Burkina. Son objectif est de caractériser les populations d'*Oreochromis niloticus* du Burkina en prélude à une sélection génétique d'une souche d'élevage. Ce travail préliminaire porte sur l'analyse du polymorphisme de l'ADNmt.

La première partie de ce document consiste en une revue bibliographique des connaissances actuelles sur l'espèce, sur l'ADNmt et sur quelques techniques de biologie moléculaire, notamment celles utilisées dans notre étude. La seconde partie, relative à l'étude expérimentale, décrit les matériels utilisés et la méthodologie suivie. La troisième partie présente les résultats obtenus suivis de leur discussion.

Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I-1 PRESENTATION D'*Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

I-1-1 POSITION SYSTEMATIQUE

<u>Embranchement</u> :	Vertébrés
<u>Sous-embranchement</u> :	Gnathostomes
<u>Super classe</u> :	Poissons
<u>Classe</u> :	Osteichtyens
<u>Sous-classe</u> :	Téléostéens
<u>Ordre</u> :	Perciformes
<u>Sous-ordre</u> :	Percoïdés
<u>Famille</u> :	Cichlidés
<u>Sous-famille</u> :	Tilapinés
<u>Genre</u> :	<i>Oreochromis</i>
<u>Espèce</u> :	<i>niloticus</i>
<u>Nom commun courant</u> :	Tilapia ou Carpe

Les synonymes d'*Oreochromis niloticus* (L.) (Photo 1) sont : *Tilapia nilotica* (L.) et *Sarotherodon niloticus* (L.).

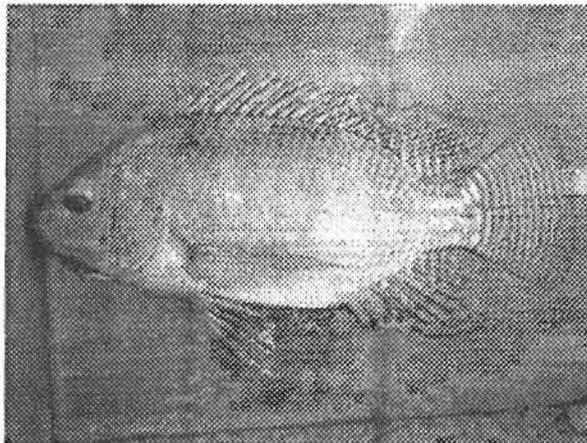


Photo 1 : *Oreochromis niloticus*.

I-1-2 MORPHOLOGIE

Le corps d'*Oreochromis niloticus* est peu allongé et comprimé latéralement. Ce corps, généralement de coloration grisâtre, avec des bandes verticales sombres assez bien marquées sur les flancs, est recouvert d'écaillles cycloïdes. Sa ligne latérale, un organe sensoriel, est discontinue, donnant ainsi une ligne latérale supérieure et une ligne latérale inférieure. La ligne latérale supérieure perce 21 à 24 écailles et l'inférieure 14 à 18 écailles (Mélard, 1986). Son principal caractère distinctif des autres espèces d'*Oreochromis* est la présence de rayures verticales blanches et noires sur sa nageoire caudale. Sa nageoire dorsale, grisâtre et formée d'une seule pièce, comprend une partie épineuse présentant 17 ou 18 épines et une partie molle comptant 12 à 14 rayons souples (Mélard, 1986). La papille génitale (sexe) est bien développée chez les deux sexes et on observe à ce niveau un dimorphisme sexuel des organes génitaux. Chez les mâles, la papille génitale est allongée alors que chez les femelles, elle est fort courte et présente en son milieu une fente transversale (oviducte) située entre l'anus et l'orifice urétal. Cette caractéristique permet de séparer assez aisément les mâles et les femelles lorsqu'ils atteignent un poids de 25-30 g et une taille de 10 à 12 cm (Mélard, 1986).

I-1-3 AIRE DE REPARTITION EN AFRIQUE

Originnaire du Haut Nil, *Oreochromis niloticus* est largement répartie en Afrique. On le rencontre principalement dans les bassins du Nil, du Niger, du Tchad et dans les lacs du Centre Est africain : Rodolphe, Albert, Edouard, Tanganyika (Bard et *al.*, 1974) (Figure 1). C'est une espèce d'eau douce qui s'adapte au milieu saumâtre.

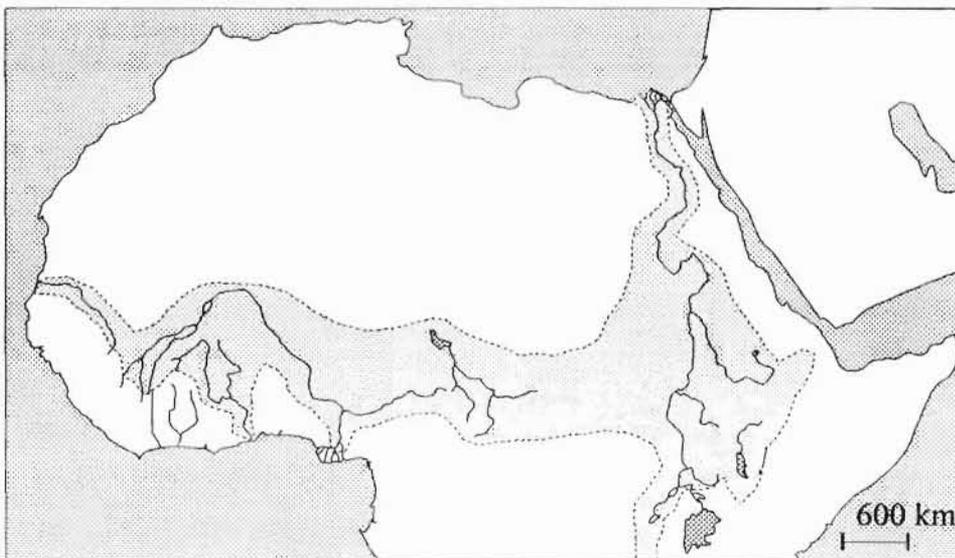


Figure 1 : carte de la répartition naturelle d'*Oreochromis niloticus* en Afrique.

I-1-4 REGIME ALIMENTAIRE

L'alimentation des alevins (0-5 g) consiste principalement en zooplancton, ensuite la part du phytoplancton devient de plus en plus grande. *Oreochromis niloticus* se nourrit aussi de larves et d'insectes (Bard et *al.*, 1974). Sa chaîne alimentaire est courte et il consomme des aliments variés.

I-1-5 CROISSANCE

Oreochromis niloticus présente une extrême plasticité de la croissance en fonction des conditions environnementales dont la qualité de l'eau, mais en général, on rencontre des individus de poids moyen compris entre 300 g et 350 g. En pisciculture intensive, le facteur prépondérant est la bonne composition des aliments et la bonne définition de la quantité à distribuer. La croissance dépend aussi du sexe : le mâle croît plus rapidement que la femelle. Cette caractéristique amène de nombreux pisciculteurs à opter pour la méthode monosexue mâle.

I-1-6 REPRODUCTION

Oreochromis niloticus est un incubateur buccal avec garde uniparentale maternelle. La reproduction intervient vers l'âge de 6 mois et a lieu quand la température dépasse $\pm 22^{\circ}\text{C}$ (Mélard, 1986). Les mâles se réunissent sur une zone de nidification à faible profondeur et sur un substrat meuble (gravier, sable, argile, ...). Chaque mâle porteur d'une coloration caractéristique défend un territoire bien déterminé et aménage un nid (Schéma 1) où il tentera d'attirer et de retenir une femelle mûre (Schéma 2) ; il s'agit d'une organisation sociale en arène de reproduction. Les femelles qui vivent en bandes à proximité de l'aire de reproduction n'effectuent que de brefs séjours sur les arènes. Allant d'un territoire à un autre, elles sont courtisées par des mâles successifs jusqu'au moment où, s'arrêtant au-dessus de la cuvette d'un nid, elles forment chacune un couple éphémère. Après une parade de synchronisation sexuelle, la femelle dépose de petits lots d'ovules que le mâle féconde immédiatement (Schéma 3). A la fin de la fécondation, la femelle quitte le nid, emportant les œufs dans sa bouche pour les incuber dans des zones abritées (Schéma 4 et 5).

L'éclosion a lieu dans la bouche de la femelle 4-6 jours après la fécondation et la vésicule vitelline est complètement résorbée à l'âge de 11-12 jours ; la durée de cette phase dépend principalement de la température de l'eau (Mélard, 1986). Dès que la vésicule vitelline est résorbée et que les alevins sont capables de prendre de la nourriture exogène, la femelle laisse

échapper de sa bouche un nuage d'alevins qui s'oriente par rapport à la mère et se réfugie dans sa bouche au moindre danger et à l'appel de ses mouvements (Schéma 6).

Lorsque les alevins atteignent une taille de 9-10 mm, ils s'affranchissent définitivement de leur mère ; celle-ci les libère en eau peu profonde (sur les bords) où ils s'organisent en banc et continuent leur croissance (Mélard, 1986).

Une femelle, maintenue dans des conditions favorables, peut se reproduire tous les 30-40 jours (Ruwet et *al.*, 1976 in Mélard, 1986) quand la température est de 25-28°C ; une même femelle peut effectuer 7-8 pontes par an mais toutes les femelles d'un lot sont loin de se reproduire aussi fréquemment (Mires, 1982 in Mélard, 1986).

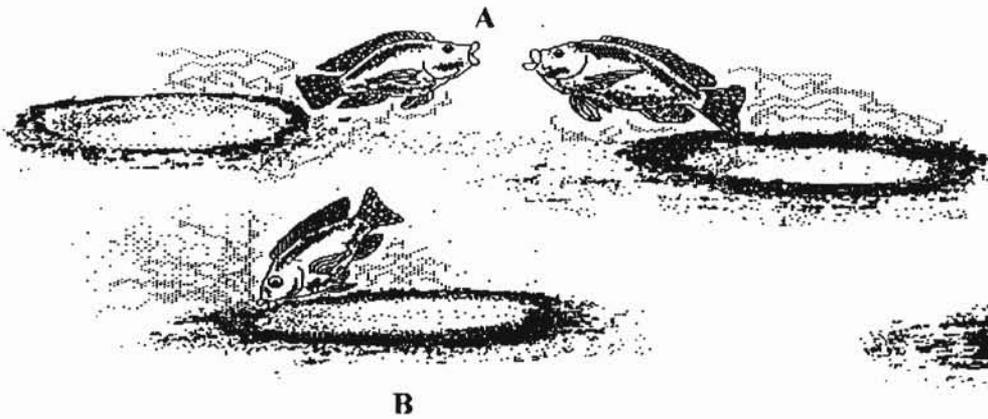


Schéma 1 : deux mâles rivaux défendent leurs nids (A). Un mâle construit son nid (B).

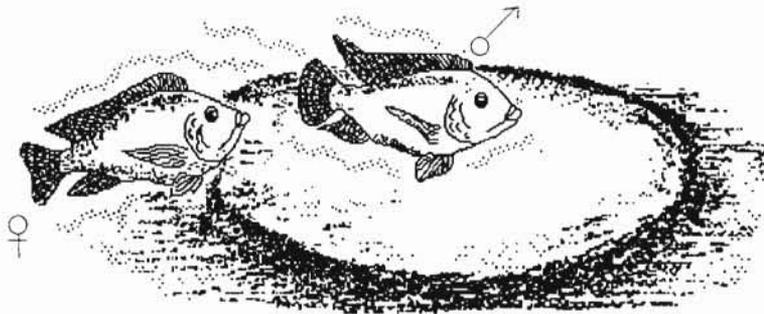


Schéma 2 : le mâle (♂) attire la femelle (♀) dans son nid.

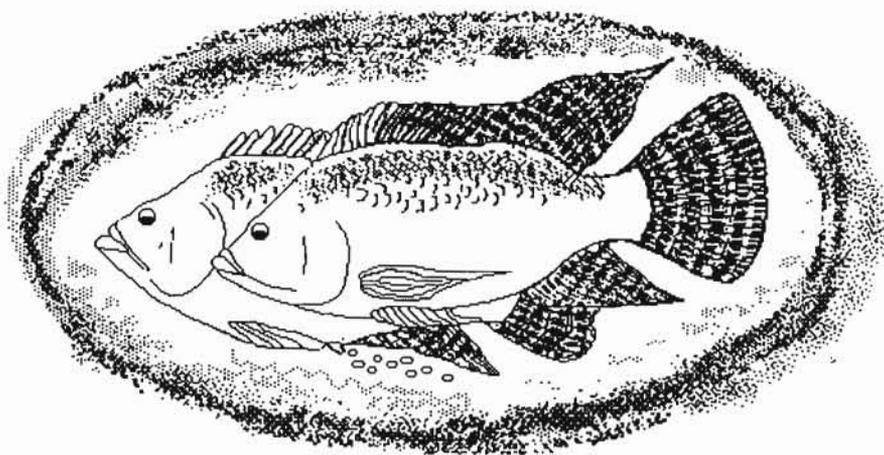


Schéma 3 : la femelle pond des ovules et le mâle s'apprête à les féconder.

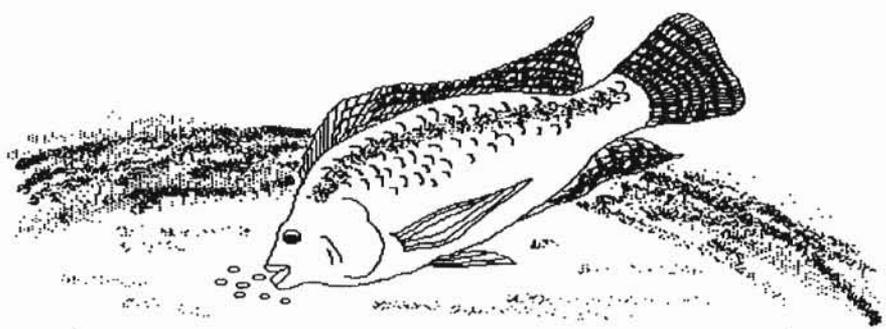


Schéma 4 : la femelle reprend ses oeufs dans sa bouche pour les incuber.

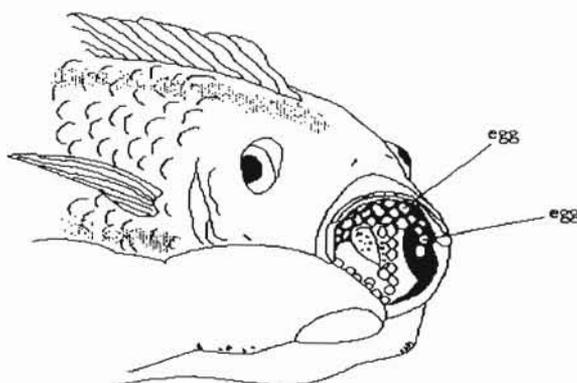


Schéma 5 : la femelle avec ses œufs (egg) en incubation dans sa bouche.

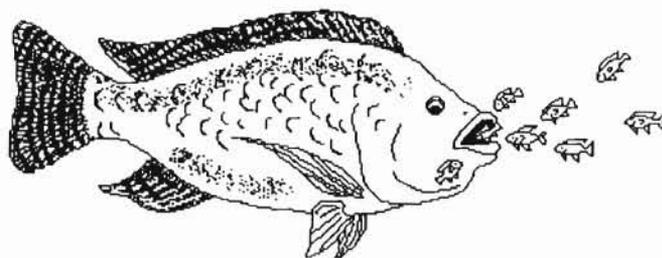


Schéma 6 : la femelle reprend ses alevins dans sa bouche au moindre danger.

Les illustrations ci-dessus sont celles de Suzanne Gray de l'Université d'Auburn, Alabama, USA.

I-2 ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR LA DIVERSITE GENETIQUE D'*Oreochromis niloticus*

La grande facilité d'adaptation d'*Oreochromis niloticus* à divers aliments et milieux, fait qu'elle est largement répandue à travers l'Afrique. Ces populations africaines ont été subdivisées en 7 sous-espèces par Trewavas (1983) sur la base de données morphologiques : *Oreochromis niloticus niloticus* de l'Afrique de l'Ouest et du Nil ; *O. n. eduardianus* des lacs George en Ouganda, Edward et Tanganyika en République Démocratique du Congo ; *O. n. cancellatus* du bassin de la rivière Awash en Ethiopie ; *O. n. filoa* des sources d'eau chaudes de la rivière Awash (Ethiopie) ; *O. n. vulcani* du lac Turkana au Kenya ; *O. n. baringoensis* du lac Baringo (Kenya) et *O. n. sugutae* de la rivière Suguta au Kenya (Agnèse et al., 1998).

Le regroupement d'une part, des populations d'Afrique de l'Ouest et celles du fleuve Nil dans la même sous-espèce morphologique, *Oreochromis niloticus niloticus* et d'autre part, des populations d'Afrique de l'Est dans les autres sous-espèces morphologiques, est aujourd'hui en conflit avec les données génétiques. En effet, les données génétiques (issues de l'étude du polymorphisme enzymatique et de l'ADN mitochondrial) révèlent une différenciation assez marquée entre les populations Soudano-sahéliennes (Niger, Sénégal, Volta et bassin du Tchad) et les populations du Nil et d'Afrique de l'Est.

La différenciation génétique la plus forte est obtenue par l'étude du polymorphisme de l'ADN mitochondrial. En effet, des travaux ont été effectués sur deux régions hypervariables de cet ADN, la D-Loop et la ND-5/6, qui ont une fréquence de mutation élevée. Après amplification par PCR, le fragment D-Loop a été d'une part, digéré par six enzymes de restriction (Agnèse et al., 1997 ; 1998), et d'autre part, soumis à un séquençage (Rognon et Guyomard, 1997 ; 2003). Quand au fragment ND-5/6, son produit amplifié a été digéré par quatre enzymes de restriction (Rognon et Guyomard, 1997). Les analyses des résultats de ces différentes études montrent une dichotomie très nette entre les populations Soudano-sahéliennes et celles du Nil et d'Afrique de l'Est. Par contre, il n'y a pas ou il existe peu de données sur la différenciation génétique entre les populations naturelles d'une aire restreinte.

Concernant les populations du Burkina Faso, seule celle de la rivière Kou a été caractérisée par analyse du polymorphisme enzymatique (Rognon et al., 1996).

I-3 ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE MITOCHONDRIAL

L'ADN mitochondrial (ADNmt) est un ADN présent dans la matrice des mitochondries, organites du milieu cellulaire qui ont l'avantage d'être présents en de multiples exemplaires dans une même cellule et de contenir chacun de nombreuses molécules d'ADN similaires.

C'est un outil pratique, pour étudier la structure géographique des sous populations à l'intérieur d'une espèce ou la différenciation génétique entre des espèces très proches, parce qu'il évolue rapidement et a tendance à être très polymorphe au sein des espèces.

L'ADNmt des vertébrés se présente sous la forme d'une molécule circulaire, double brin, sans introns, ni séquences répétées (Figure 2). Les deux brins complémentaires de l'ADNmt sont représentés par convention et en référence à une légère différence de poids moléculaire, comme "brin léger" et "brin lourd". La partie non transcrite la plus importante de la molécule, correspond à la zone contenant l'origine de réplication du brin lourd, nommée boucle D ou D-Loop.

Sa taille varie chez les vertébrés, entre 16 300 et 19 200 paires de bases, ce qui est très peu par rapport aux quelques milliards de paires de bases du génome nucléaire (Moazami-Goudarzi, 1994).

La propriété la plus anciennement connue de l'ADNmt est sa transmission maternelle, avec l'organite cellulaire qui le renferme, d'une génération à la suivante. Cette transmission matriarcale se fait sans recombinaison, ce qui permet de tracer, dans l'immense majorité des cas, des lignées maternelles. De ce fait, les différences observées entre les molécules proviennent presque exclusivement des mutations viables, essentiellement de type transition/transversion, les insertions et délétions principalement localisées dans la région de contrôle, D-Loop, étant rares (Moazami-Goudarzi, 1994).

Sa seconde propriété, qui est probablement la plus importante dans les domaines de la biologie des populations et de la phylogénie, est sa vitesse d'évolution. Cette vitesse d'évolution est considérée en moyenne, comme 5 à 10 fois plus grande que celle de l'ADN nucléaire, à l'exception des séquences microsatellites.

- ❖ l'hybridation (*annealing*) d'amorces oligonucléotidiques (ou *primers*) complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire cible. La température est alors ramenée à une valeur comprise entre 40°C et 65°C, en fonction de la longueur et de la spécificité des amorces, afin de permettre une bonne fixation de celles-ci ;
- ❖ la réaction d'élongation par une ADN polymérase thermostable (la Taq polymérase) à partir des amorces, réalisée à température optimale de 72°C.

Les produits du premier cycle d'amplification sont ensuite dénaturés par la chaleur. Les amorces sont à nouveau hybridées, avec les brins d'ADN provenant du premier cycle, qui servent de matrice à la polymérase. La synthèse de nouveaux brins se fait dans le sens de l'élongation des amorces 5' → 3'. A chaque cycle, le nombre de copies du fragment d'ADN est doublé et l'on obtient après n cycles, 2ⁿ fragments. Dans une PCR classique, n varie entre 30 et 40.

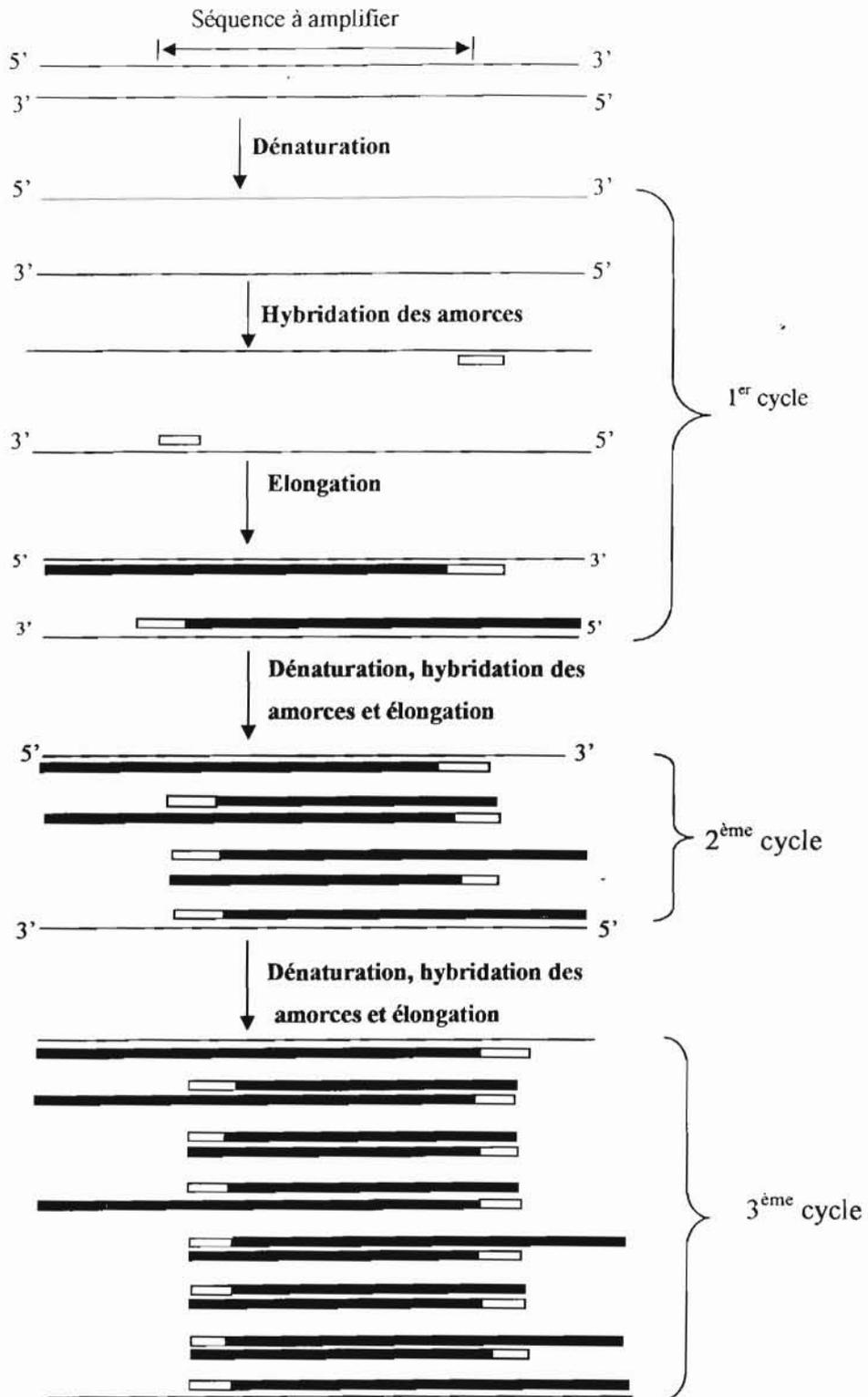


Schéma 7 : amplification d'un fragment d'ADN par PCR.

I-4-2 PARTICULARITÉS

Avant d'entamer les cycles, l'ADN doit subir une dénaturation complète. Le temps nécessaire sera donc plus long que celui utilisé dans chaque cycle, afin de bien séparer les deux chromatides. En effet, par la suite les molécules d'ADN synthétisées seront de la taille des fragments amplifiés.

Lors du dernier cycle, la durée de l'étape d'élongation sera prolongée pour permettre une synthèse complète des brins.

A la fin de la phase d'amplification, la température est abaissée à + 4°C pour inhiber l'enzyme et garder l'équilibre atteint.

I-5 RFLP: RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM OU POLYMORPHISME DE LONGUEUR DES FRAGMENTS DE RESTRICTION

Le polymorphisme de l'ADN est utilisé comme marqueur génétique d'identification des individus. Un marqueur génétique doit différencier les génotypes étudiés et être transmis selon les lois mendéliennes. Il a pour rôle d'étiqueter de façon directe ou indirecte des différences dans l'information génétique portée par deux individus ou plus.

Deux brins d'ADN donnés possèdent les mêmes molécules de phosphates et de sucres, mais diffèrent par leurs bases. Plus précisément, ils diffèrent par la séquence de leurs bases, c'est-à-dire l'ordre dans lequel celles-ci se succèdent. Des mutations apparaissant sur une séquence d'ADN peuvent être mises en évidence par l'action d'enzymes de restriction qui sont des endonucléases capables de reconnaître spécifiquement des zones de l'ADN appelées sites de restrictions. Lorsqu'une enzyme reconnaît un site spécifique de quelques bases, elle coupe la molécule d'ADN en cet endroit.

La RFLP ou polymorphisme de longueur des fragments de restriction, qui s'effectue sur les fragments d'ADN amplifiés par la méthode PCR, repose sur la comparaison de profils de coupures par les enzymes de restriction suite à l'existence d'un polymorphisme dans la séquence d'une molécule d'ADN par rapport à une autre. La méthode compare en fait la présence ou l'absence d'un site de restriction ainsi que les longueurs de fragments générés.

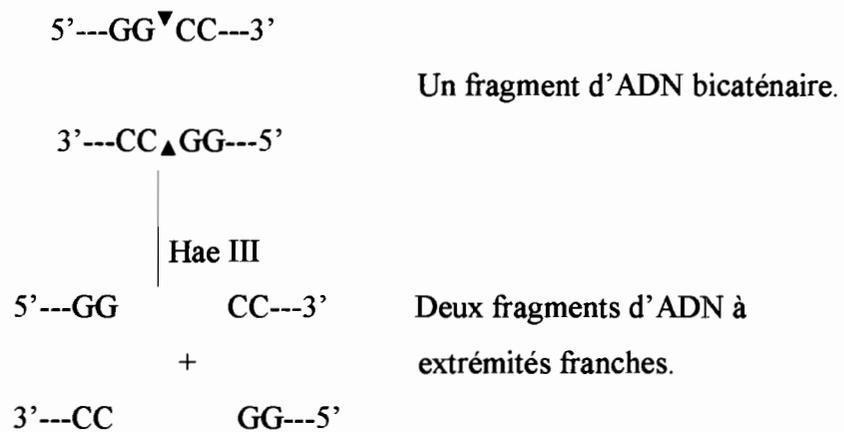
Les enzymes ou endonucléases de restriction sont le plus souvent isolées à partir de bactéries. Pour les nommer, on leur attribue des noms à 3 (ou 4) lettres qui rappellent l'origine

du micro-organisme à partir duquel elles ont été isolées. La première lettre (en majuscule) est la première lettre du nom du genre ; la seconde et la troisième lettre (en minuscules) sont les deux premières lettres du nom d'espèce ; parfois il existe une quatrième lettre qui indique la souche bactérienne d'où est extraite l'enzyme. Le chiffre romain concerne l'ordre de caractérisation des enzymes lorsque plusieurs enzymes ont été isolées à partir d'une même souche bactérienne (Adakal, 2004).

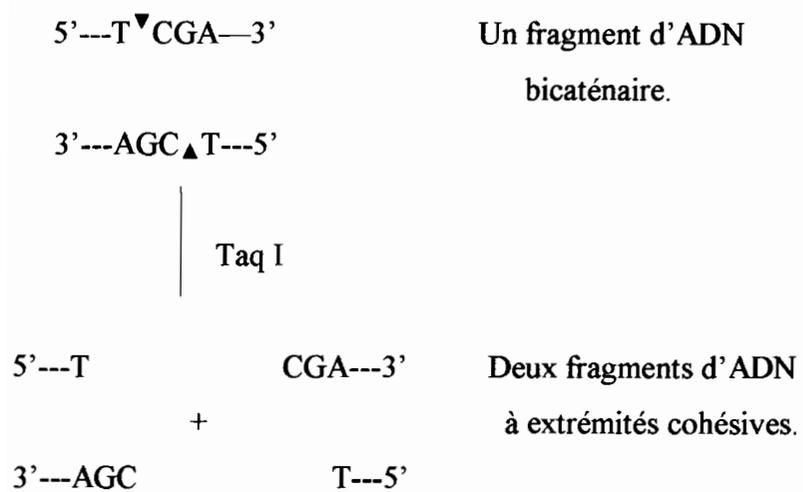
Les séquences d'ADN habituellement reconnues par les enzymes de restriction sont dites palindromiques car elles sont à symétrie inversée ; la succession des nucléotides est la même pour le brin I lu dans le sens 5' → 3' que pour le brin II complémentaire lu également dans le sens 5' → 3'. Les palindromes reconnus par les enzymes de restriction sont généralement constitués de séquences de 4 ou 6 paires de bases.

Le résultat de la coupure conduit à deux types de fragments :

- des fragments à extrémités franches : ils sont obtenus par coupure au même endroit sur les deux brins. Par exemple l'enzyme Hae III isolée de *Haemophilus aegyptius* coupe l'ADN double brin au niveau de la séquence GG/CC.



- la coupure peut aussi être décalée sur les deux brins et générer des extrémités monocaténares (simple brin) ayant des séquences complémentaires appelées extrémités cohésives ou bouts collants. Par exemple l'enzyme Taq I isolée de *Thermus aquaticus* YTI coupe l'ADN monocaténaire au niveau de la séquence T/C.



Chapitre II : MATERIELS ET METHODES

II-1 MATERIELS

II-1-1 MATERIEL BIOLOGIQUE

Des populations d'*Oreochromis niloticus*, appartenant aux trois bassins hydrographiques du pays (figure 3), ont été échantillonnées. L'espèce d'intérêt est naturellement présente dans les bassins de la Volta et du Niger, alors que sa présence dans le bassin de la Comoé est liée à des opérations de repeuplements.

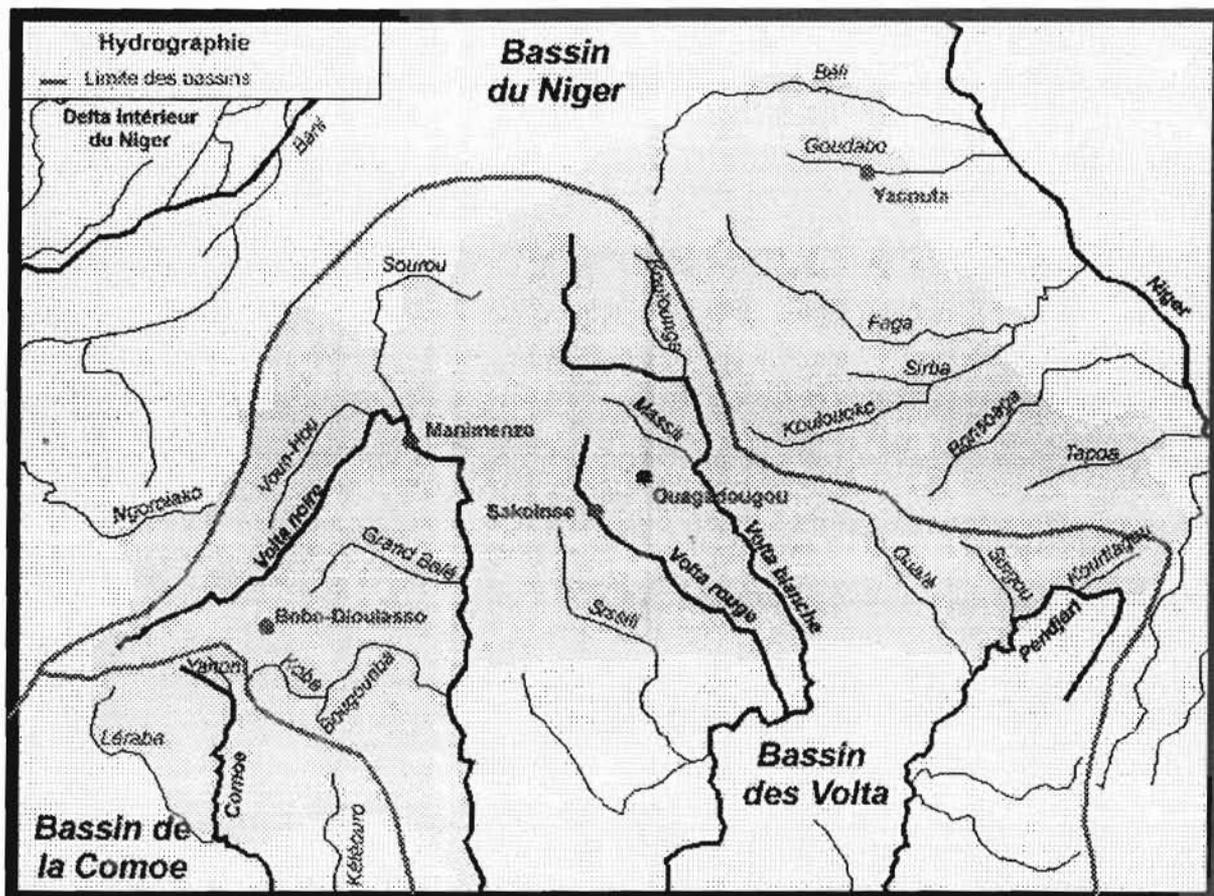


Figure 3: les trois bassins hydrographiques du Burkina Faso.

Les différentes pêches ont été effectuées au filet épervier, par des pêcheurs rencontrés sur les lieux. Les prélèvements ont porté sur des morceaux de muscles ou de nageoires et ont été conservés dans des tubes eppendorf de 1,5 ml contenant de l'éthanol à 70 %.

Le tableau I présente les populations d'*Oreochromis niloticus* concernées par cette étude. La dernière colonne décrit la symbolisation utilisée pour distinguer les différentes populations.

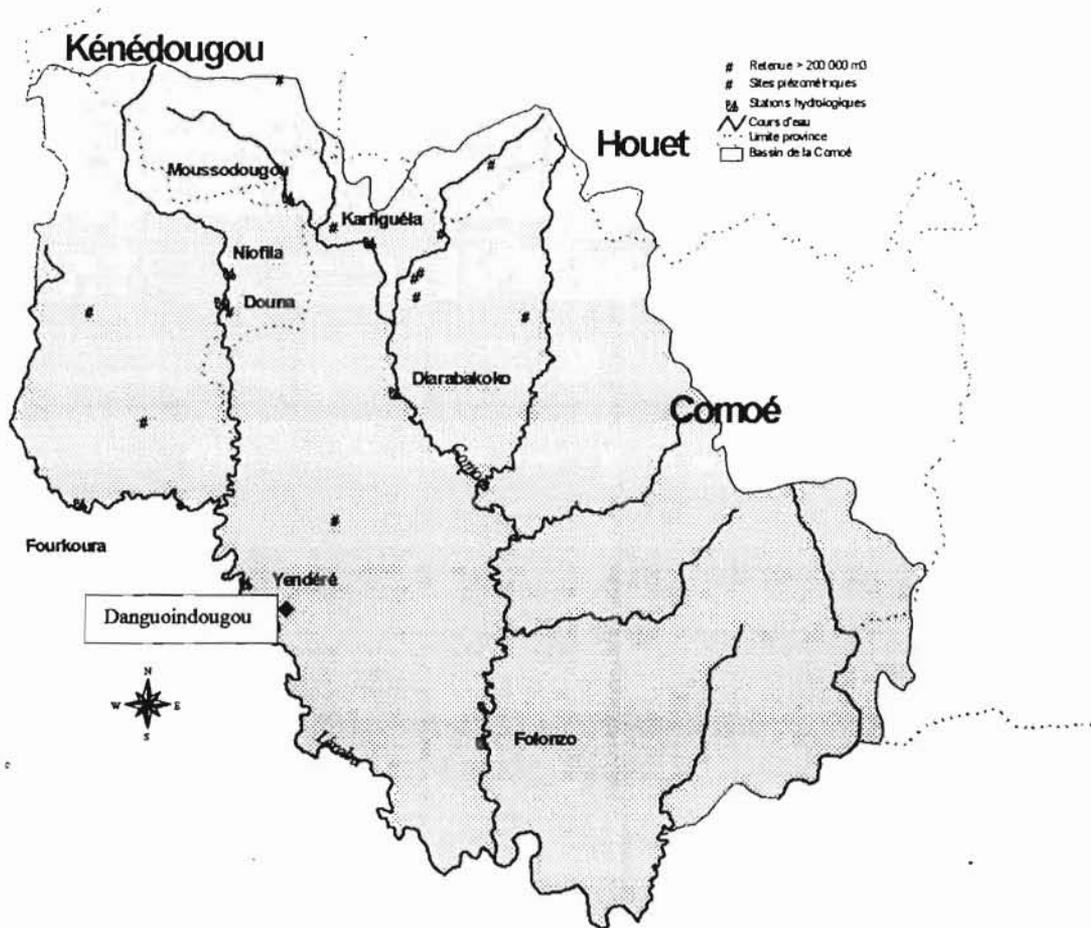
Tableau I : localisation des sites d'échantillonnage des populations étudiées.

Espèce	Bassins	Sous bassins	Origines	Lieux d'échantillonnage	Nombres	Symboles
<i>Oreochromis niloticus</i>	Comoé		Léraba	Danguoindougou	30	C
	Volta	Mouhoun	Kou	Bama	30	B
			Kou	Bazèga	15	BZ
			Mare aux Hippopotames	Mare aux Hippopotames	07	M
		Nakambé	Nakambé	Bagré	15	BG
		Pendjari	Kompienga	Kompienga	15	K
	Niger		Tapoa	Tapoa	30	T

II-1-1-1 Bassin de la Comoé

Situé au Sud-ouest du pays, le bassin de la Comoé couvre une superficie de 17 000 km², répartie sur les provinces de la Comoé, de la Léraba, du Houet, du Kéné Dougou et du Poni. Il se situe entre 9° 35' et 11° 05' de latitude Nord, 3° 30' et 5° 30' de longitude Ouest. Il prend sa source dans les falaises de Banfora et coule du Nord vers le Sud. Il est composé de deux unités hydrographiques comportant chacune un cours d'eau permanent : la Comoé à l'Est et la Léraba à l'Ouest du bassin.

Au niveau de ce bassin, les échantillons ont été récoltés dans la retenue d'eau de Danguoindougou, un des affluents de la Léraba, située à une quinzaine de kilomètres de Yendéré (Figure 4).



CÔTE D'IVOIRE

Figure 4 : localisation de la retenue d'eau de Danguoindougou (◆) sur le bassin de la Comoé.

II-1-1-2 Bassin de la Volta

Le plus important, il s'étend au Centre et à l'Ouest du pays sur une superficie de 178 000 Km². Il est constitué par trois sous bassins majeurs : ceux du Mouhoun, du Nakambé et de la Pendjari. Les eaux de ses sous-bassins se rejoignent au centre du Ghana, où elles forment le lac Volta.

a. Sous bassin du Mouhoun

Cours d'eau permanent issu du même massif gréseux que la Comoé, le Mouhoun (ex Volta Noire) et son bassin versant couvre une superficie de 92 000 Km². Il coule d'abord, dans une

MENTION TRÈS BIEN

large vallée, en direction du Nord-est, ensuite, change brusquement de direction après la boucle du Sourou et s'oriente vers le Sud-est, puis plein Sud. Ses principaux affluents sont d'amont en aval, le Kou, le Voun hou, le Sourou, le Vranso, le Grand Balé, la Bambassou et la Bougouriba.

Les échantillons de ce sous bassin ont été récoltés dans la retenue d'eau de Bama, un affluent du Kou ; à la Mare aux Hippopotames, une mare qui communique avec le fleuve Mouhoun en période de crues ; et à la station piscicole de Bazèga (village situé à environ 76 Km de Ouagadougou sur l'axe Ouaga-Pô) (Figure 5). Les échantillons de cette station sont des populations du Kou, qui ont longtemps été maintenues en étangs d'élevage.

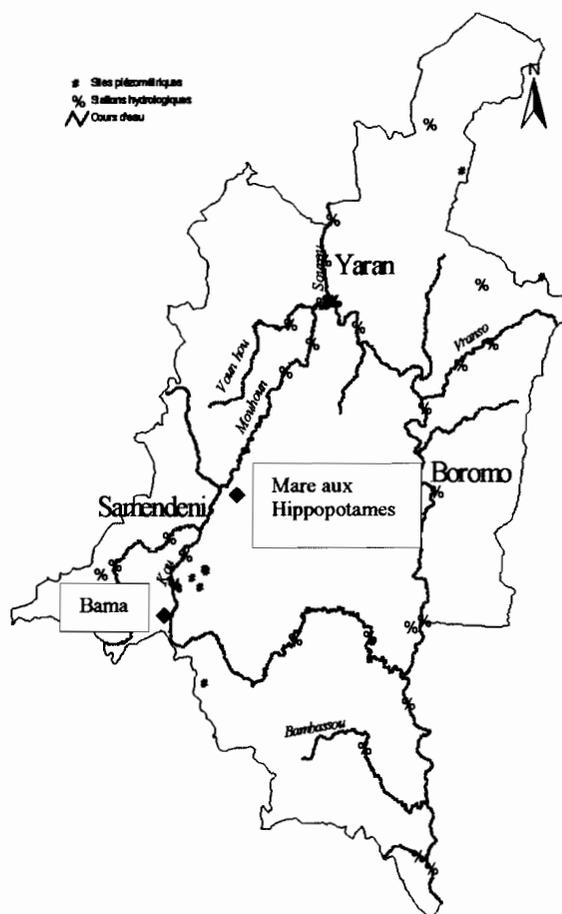


Figure 5 : localisation de la retenue d'eau de Bama (♦) et de la Mare aux Hippopotames (◆) sur le sous bassin du Mouhoun.

b. Sous bassin du Nakambé

Le Nakambé (ex Volta Blanche) prend sa source à l'Est de Ouahigouya et couvre avec son bassin versant une superficie de 50 000 Km². Le bassin du Nakambé draine toute la partie

centrale et le Nord du plateau Mossi et ne coule que pendant la saison des pluies. Ses principaux affluents sont d'amont en aval le Massili, le Dougoulamondi, le Koulipélé et la Nouhao.

Au niveau du sous bassin du Nakambé, les échantillons ont été récoltés dans le barrage de Bagré (Figure 6). Ce barrage a une superficie maximale de 25 500 ha et est bâti sur le fleuve Nakambé.

c. Sous bassin de la Pendjari

La Pendjari forme la frontière Sud-est du Burkina avec le Bénin et reçoit en rive droite trois affluents (le Doudodo, le Singou et la Kompienga) dont les bassins versants totalisent 21 600 Km². La Pendjari tarit complètement une année sur deux en Avril à Porga au Bénin.

Dans ce sous bassin, la récolte des échantillons s'est effectuée dans le barrage de la Kompienga (21 600 ha), bâti sur la rivière du même nom (Figure 6).

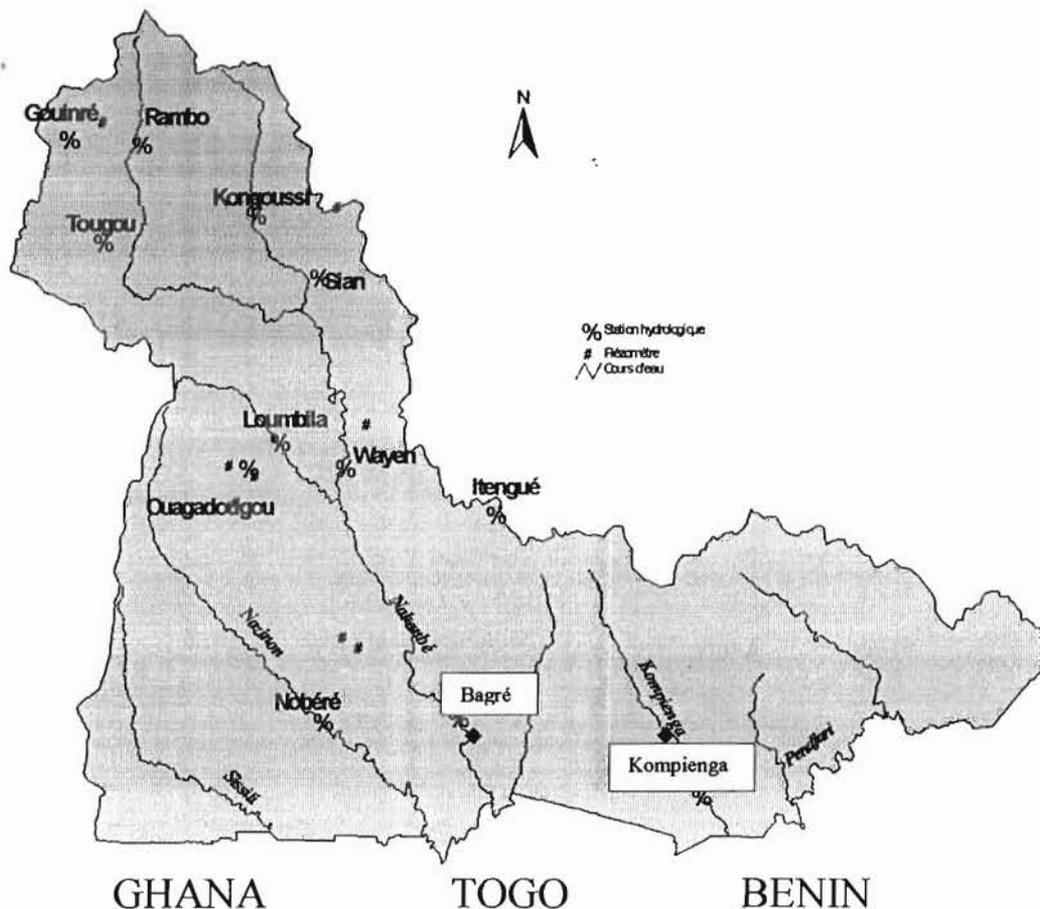


Figure 6 : localisation du barrage de Bagré (♦) et de celui de la Kompienga (♦) sur les sous bassins du Nakambé et de la Pendjari.

II-1-1-3 Bassin du Niger

Le bassin du Niger se subdivise en deux zones :

- le bassin du Banafing ou Ngorolako qui couvre 4 000 km², se situe dans l'extrême Ouest du pays. Ces affluents sont : le Dougo, le Seledogo et le Longo. Le Ngorolako prend sa source sur la partie occidentale du plateau de Bobo-Dioulasso et s'écoule en direction de l'Ouest dans de larges plaines inondables avant d'atteindre le Bani, un affluent du Niger ;
- le bassin du Niger à proprement parler draine le Nord-est et l'Est du pays et couvre 72 000 Km². Ce bassin est composé de plusieurs affluents de la rive droite du Moyen Niger : Béli, Dargol, Dyamongou, Gorouol, Goudébo, Sirba, Faga, Bonsoaga, Tapoa, qui coulent d'Ouest en Est. Souvent ce ne sont que des chapelets de mares entre lesquelles se trouve un oued aux bras multiples et aux berges indécises.

En dehors du réseau hydrographique, cette zone se caractérise par un nombre important de petites mares, permanentes ou temporaires, qui occupent les bas-fonds et les espaces interdunaires où elles jouent un rôle capital pour la vie pastorale.

Les échantillons étudiés pour ce bassin ont été récoltés à une dizaine de kilomètres de Diapaga dans le barrage de la Tapoa (Figure 7).

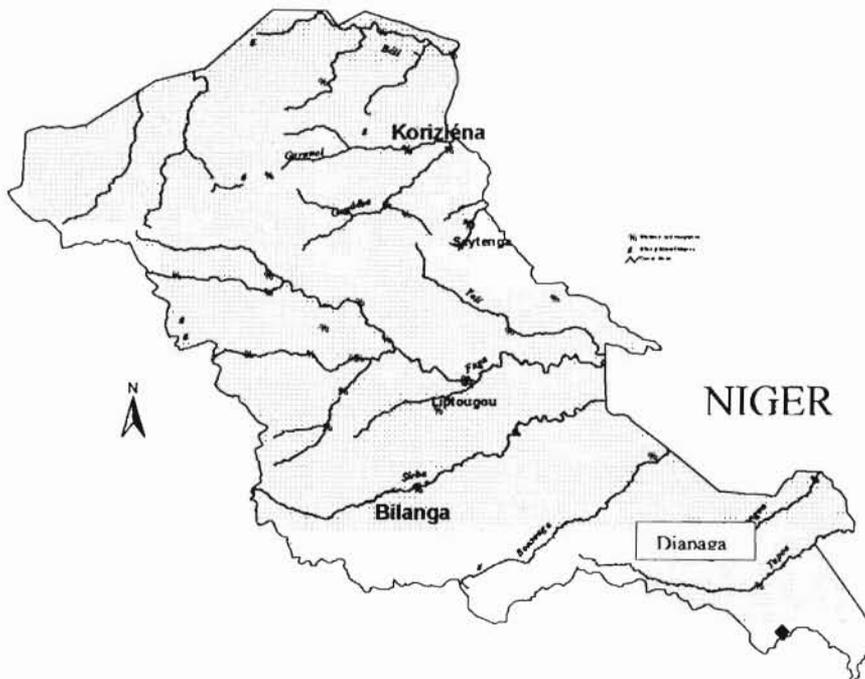


Figure 7 : localisation du barrage de la Tapoa (◆) sur le bassin du Niger.

II-1-2 APPAREILLAGES

La réalisation de cette étude a nécessité l'utilisation de plusieurs appareils (annexe 1). De tous ces appareils, les plus sollicités ont été :

a. La centrifugeuse

La centrifugeuse (Photo 2) permet, par rotation, de précipiter la phase solide en suspension (débris de cellules, protéines ou ADN précipités,...) et de la séparer de la phase liquide. La centrifugation s'effectue dans le but d'accélérer le phénomène de décantation. Elle agit par augmentation de la séparation statique grâce à l'accélération centrifuge. On retrouve alors la phase solide au fond du tube (culot), la phase liquide étant le surnageant.

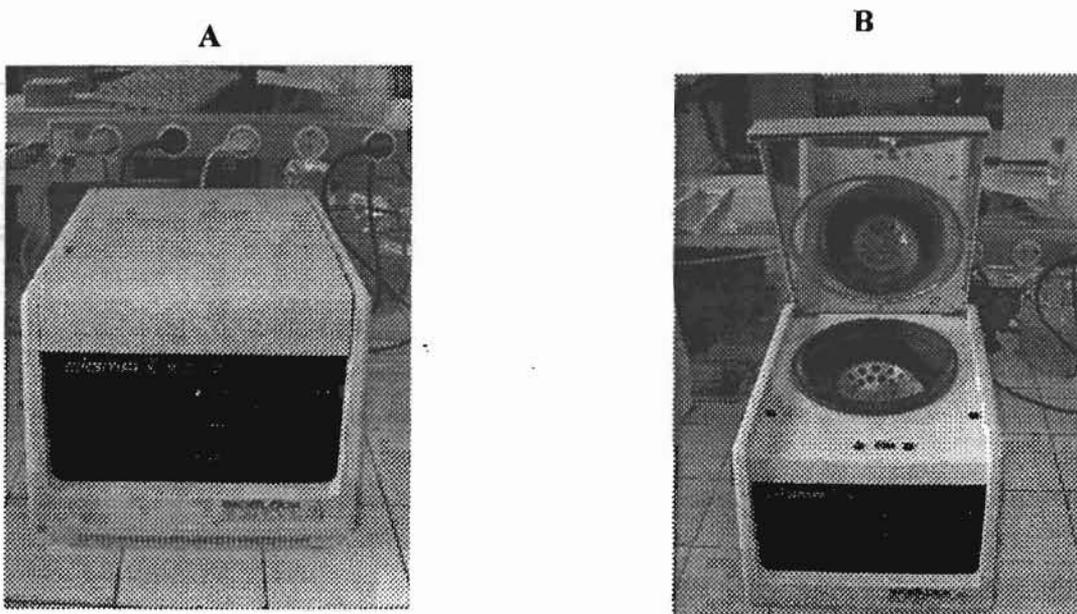


Photo 2 : vues externe (A) et interne (B) d'une centrifugeuse.

b. L'appareil à PCR :

L'appareil à PCR ou thermocycleur (Photo 3) permet la réaction de polymérisation (Polymerase Chain Reaction ou PCR) en produisant un grand nombre de fois le même cycle. Les cycles sont constitués de couples temps/températures qui permettent la polymérisation. Le thermocycleur est constitué d'un compartiment en aluminium permettant de chauffer ou de refroidir les échantillons en fonction du cycle demandé, ainsi que d'un programmeur permettant l'enregistrement de plusieurs cycles utilisés fréquemment, ce qui évite de perdre du temps à chaque manipulation.

MENTION 2013 DU

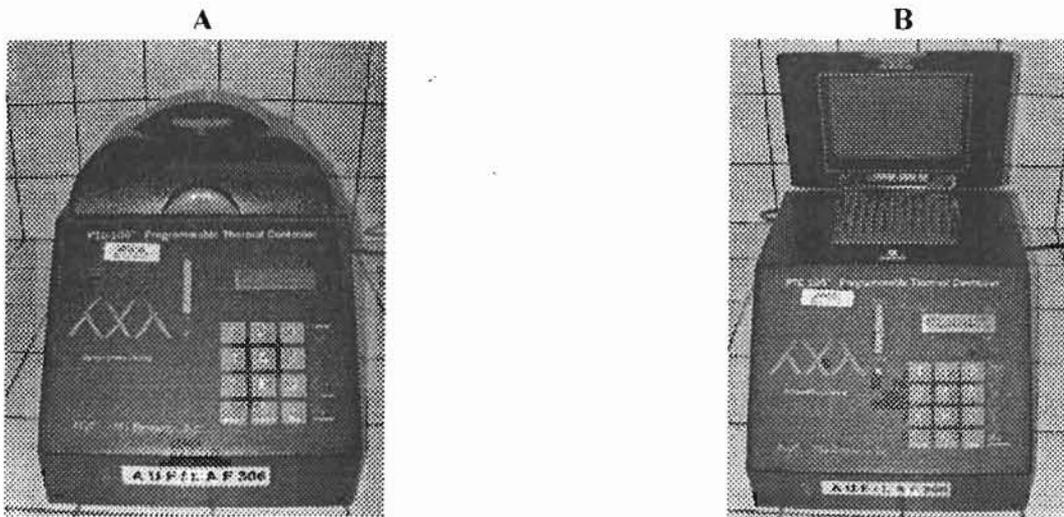


Photo 3 : vues externe (A) et interne (B) d'un thermocycleur.

c. Les cuves à électrophorèse :

Les cuves à électrophorèse (Photo 4) sont des cuves qui ont deux fils de platine (ou autre métal conducteur) à chaque extrémité. La cuve est remplie d'un liquide, le tampon de migration, dans lequel sera placé le gel d'électrophorèse. Le liquide permet le passage du courant, provenant d'un générateur électrique, entre les deux électrodes. Ce courant permet la migration de molécules, préalablement déposées dans des cavités formées dans le gel, en fonction de leur charge électrique.

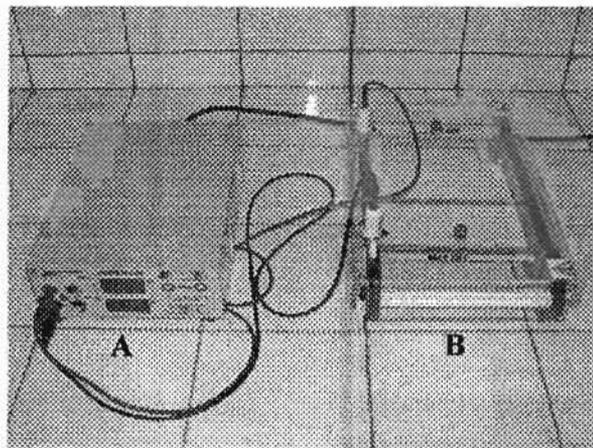


Photo 4 : cuve à électrophorèse (B) accompagnée d'un générateur (A).

d. Le bain-marie :

Un bain-marie (Photo 5) est un appareil, programmable en température, qui permet de chauffer de l'eau. Dans cette eau, on plonge un récipient contenant une préparation à chauffer.

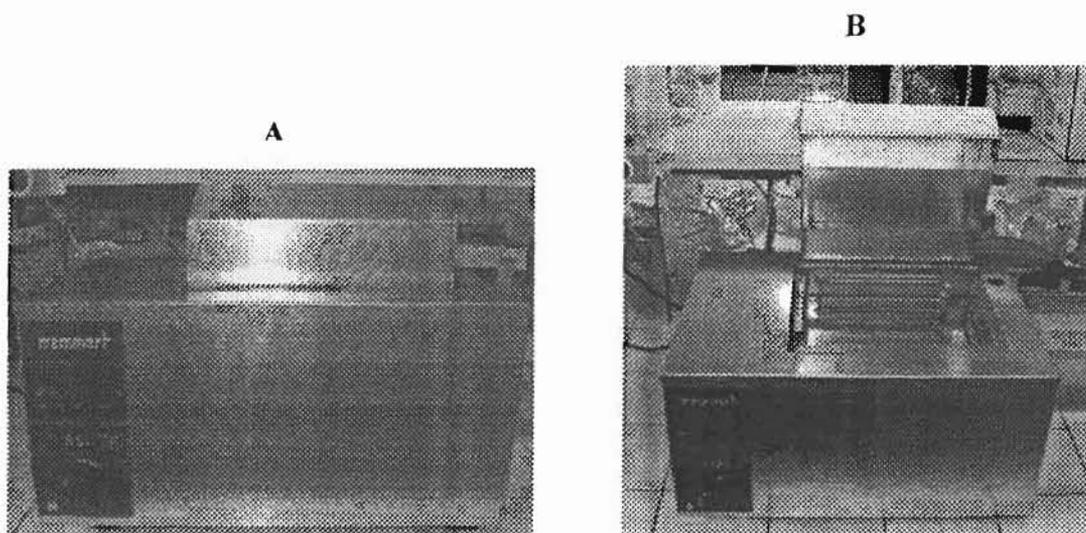


Photo 5 : vues externe (A) et interne (B) d'un bain-marie.

II-2 METHODES

II-2-1 EXTRACTION DE L'ADN

L'extraction de l'ADN d'une cellule requiert une lyse préalable de celle-ci. Ensuite, les membranes et protéines spécifiques de la cellule doivent être dégradées pour permettre la séparation des acides nucléiques des autres composantes cellulaires, l'étape finale consistant en la purification de cet ADN.

L'extraction de l'ADN des morceaux de tissus prélevés a été réalisée d'après le protocole décrit par le kit Promega « WIZARD® Genomic DNA Purification Kit ».

Pour recueillir de l'ADN, il faut prélever un petit morceau de tissus, qui sera digéré à 55°C pendant 3 heures dans 600 µl de solutions EDTA (0,5 M, pH 8,0)/«Nuclei Lysis solution» par 350 µg de protéinase K. Après la digestion, 200 µl de «Protein precipitation solution» sont ajoutés à ce produit et les protéines sont précipitées par centrifugation à 14 000 tours/min. Le surnageant contenant de l'ADN est transféré dans un tube contenant 600 µl d'isopropanol. Le tube est remué doucement jusqu'à l'obtention d'une masse visible qui est l'ADN avant d'être centrifugé à 14 000 tours/min. A la fin de cette centrifugation, l'ADN est rincé à l'éthanol, desséché puis réhydraté dans 100 µl de « DNA Rehydration solution».

L'ADN ainsi obtenu peut être conservé 2 mois à 4°C ou presque indéfiniment à -20°C.

II-2-2 CONTRÔLE DE L'ADN

Après extraction, la qualité de l'ADN est estimée en faisant migrer les échantillons sur un gel d'agarose de routine de concentration 1%. Pour préparer le gel :

- introduire dans un erlenmeyer, 1,25 g d'agarose de routine pour 125 ml de TBE 1X. Bien mélanger le contenu avant de le chauffer dans un four à micro-ondes pendant 2 minutes, afin de dissoudre les particules d'agarose en suspension et d'obtenir une solution parfaitement homogène, transparente et dépourvue de particules ;
- ajouter 10 μ l de BET (0,625 mg/ml) et bien homogénéiser la solution. Le BET détecte la présence de molécules d'ADN et se lie à elles en s'intercalant entre les bases. Ce réactif est fluorescent lors d'une exposition aux rayons Ultraviolets, et permet ainsi de visualiser l'ADN sous forme de bande rouge-orange. Le BET est mutagène, par conséquent, des précautions d'utilisation s'imposent (gants, blouse) ;
- afin de pouvoir déposer les échantillons, placer dans un moule un ou plusieurs peignes dont le nombre de dents est fonction du nombre de dépôts ;
- lorsque le mélange atteint une température d'environ 70°C, il est renversé dans le moule précédemment préparé et est solidifié au bout d'une trentaine de minutes à l'air ambiant.

Après la polymérisation, le gel est placé dans la partie centrale de la cuve à électrophorèse et est recouvert avec du tampon TBE 1X, selon le schéma 8. Il est conseillé d'immerger le gel dans le tampon avant de retirer délicatement les peignes, afin de ne pas abîmer les puits de dépôts.

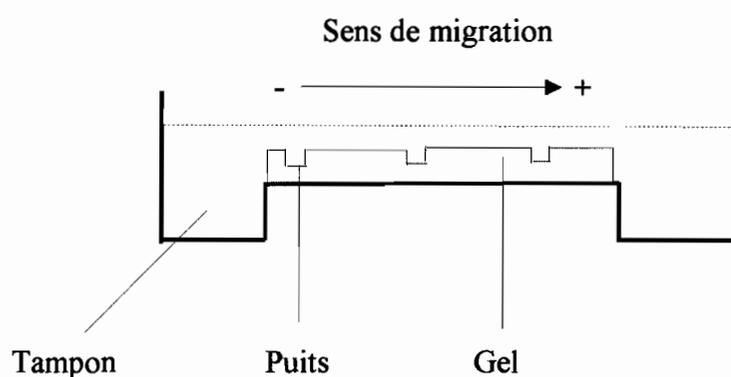


Schéma 8 : mise en place du gel.

Pour le dépôt, 3 μ l d'ADN réhydraté est mélangé avec une goutte de colorant «Gel Loading solution» et le mélange est introduit dans un puits à l'aide d'une micropipette. Le colorant ne réagit pas avec le BET, il joue seulement le rôle de témoin de migration. La migration est lancée à la fin des dépôts avec un voltage de 80 volts et une durée d'une heure. L'ADN étant une molécule chargée négativement, placée dans un champ électrique, elle migre de la cathode (-) vers l'anode (+).

A la fin de la migration, le gel est enlevé de la cuve et placé sur une table à Ultraviolet, sous laquelle, l'ADN complexé au BET émet une fluorescence orangée. L'image ainsi obtenue, est visualisée sur un moniteur qui permet de la photographier ou de l'enregistrer sur une disquette.

II-2-3 PCR : POLYMERASE CHAIN REACTION

II-2-3-1 Amplification du gène ND-5/6

Le choix des amorces spécifiques se faisant en fonction de la région à amplifier, les amorces ND-5/6-R et ND-5/6-S ont été choisies pour l'amplification du gène ND-5/6, longue d'environ 2 500 pb.

ND-5/6-S: 5'-AATAGTTTATCCATTGGTCTTAGG-3'

ND-5/6-R: 5'-TTACAACGATGGTTTTTCATATCA-3'

Ces amorces qui ont été utilisées par Cronin *et al.* (1993), sur le saumon chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) et sur le saumon kéta (*Oncorhynchus keta*), n'ont donné que des bandes non spécifiques avec *Oreochromis niloticus*. De ce fait, d'autres amorces ont été utilisées. Il s'agit de la C-Glu et de la C-Leu3 (Park *et al.*, 1993).

C-Glu : 5'-CAACGGTGGTTCTTCAAGTC-3'

C-Leu3 : 5'-GGAACCAAAAACCTTTGGTGCAACTCC-3'

Chaque réaction de PCR est composée de 3 μ l d'ADN réhydraté ; 6 μ l de Tampon 10 x contenant du $MgCl_2$ (15 mM) ; 3,6 μ l de $MgCl_2$ (25 mM) ; 0,6 μ l de dNTPs (20 000 μ M) ; 0,6 μ l de chacune des deux amorces (20 μ M chacune) ; 0,4 μ l de Taq polymérase (5 ui/ μ l) et 45,2 μ l d'eau distillée pour compléter le volume final à 60 μ l. Les cycles d'amplification, au nombre de 34, sont constitués comme suit : 94°C pendant 45 s, 60°C pendant 45 s, 72°C pendant 3 mn.

II-2-3-2 Electrophorèse des produits d'amplification

Après la PCR, on obtient une certaine quantité de produits amplifiés qui peut être analysée par électrophorèse sur gel d'agarose de routine de concentration 1,5%. La préparation de ce gel s'effectue comme décrite plus haut avec pour seules différences les quantités d'agarose et de BET qui sont maintenant respectivement de 1,875 g et 15 µl.

Le dépôt des échantillons se fait dans les puits en mélangeant 3 µl de produit PCR et une goutte de «Gel Loading solution». Sur chaque rangée de peignes, introduire dans un puits 2 µl de marqueur de poids moléculaire (1 µl de 100 pb DNA Step Ladder + 1 µl de son tampon).

La migration s'effectue pendant 2 heures 30 minutes à 120 volts. Après la migration, le gel est observé sous une lampe Ultraviolet et les molécules d'ADN complexées au BET deviennent visibles sous forme de bandes dont la taille est définie à l'aide du marqueur de taille.

II-2-4 RFLP: RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM

II-2-4-1 Digestion du gène ND-5/6

L'ADN des individus à comparer est digéré par cinq enzymes qui ont été choisies en fonction de leur site de restriction (Tableau II).

Tableau II : liste des enzymes utilisées.

Nucléases	Sources	Sites reconnus
Alu I	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'---AG [▼] CT---3' 3'---TC [▲] GA---5'
Hae III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5'---GG [▼] CC---3' 3'---CC [▲] GG---5'
Hinf I	<i>Haemophilus influenzae</i> Rf	5'---G [▼] ANT C---3' 3'---C TNA [▲] G---5'
Hpa II	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	5'---C [▼] CG G---3' 3'---G GC [▲] C---5'
Taq I	<i>Thermus aquaticus</i> YTI	5'---T [▼] CG A---3' 3'---A GC [▲] T--5'

Les enzymes sont utilisées séparément, en digestion simple. Les mêmes conditions opératoires ont été utilisées pour quatre des cinq enzymes de restriction à savoir Alu I, Hae III, Hinf I et Hpa II (incubation à 37°C au bain-marie pendant 3 heures). Pour la Taq I, une incubation est réalisée pendant 3 heures à 65°C.

II-2-4-2 Electrophorèse des fragments de restriction

Pour toutes les cinq enzymes, la migration des produits de digestion est effectuée sur un gel d'agarose Nusieve 2% (soit 2,5 g pour 125 ml de TBE 1 x). L'agarose Nusieve permet une meilleure séparation des fragments de taille inférieure à 1 Kb que l'agarose de routine. Afin de pouvoir recevoir la totalité du produit de digestion et donner une meilleure résolution, les puits préparés doivent être fins, étroits et profonds. Les produits de digestion sont migrés aux côtés d'un marqueur de poids moléculaire (100 bp DNA Step Ladder) pour identifier la taille des fragments obtenus. La migration s'effectue en 2 heures à 100 volts.

o
p
e
s

r
d
o

Chapitre III RESULTATS ET DISCUSSION

11/11/2011 14:14:11

III-1 RESULTATS

III-1-1 AMPLIFICATION DU GENE ND-5/6 PAR ND-5/6-S ET ND-5/6-R

L'amplification du fragment ND-5/6, réalisée avec les amorces ND-5/6-S et ND-5/6-R (Cronin et *al.*, 1993), n'a pas donné de résultats satisfaisants malgré l'application de différents protocoles. En effet, des essais avec différentes concentrations de réactifs et différentes températures d'hybridation ont tous connu des échecs. Ces échecs se sont traduits, soit par la non apparition de bandes (Photo 6), soit par l'apparition de bandes de tailles non souhaitées appelées bandes non spécifiques (Photo 7).

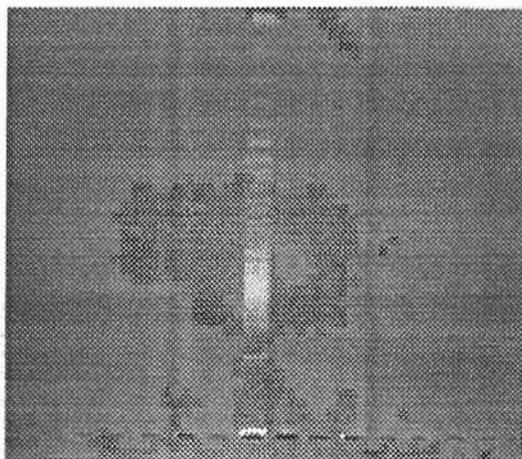


Photo 6 : électrophorèse sur gel d'agarose de routine (1,5%) des produits d'amplification n'ayant pas donné de bandes avec les amorces ND-5/6-S et ND-5/6-R à [MgCl₂] 3 mM et température d'hybridation 60°C.

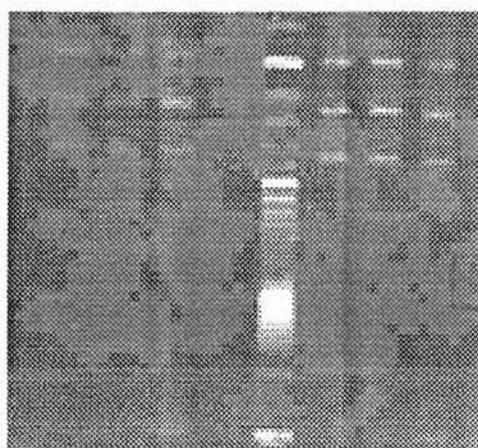


Photo 7 : électrophorèse sur gel d'agarose de routine (1,5%) des produits d'amplification ayant donné des bandes non spécifiques avec les amorces ND-5/6-S et ND-5/6-R à [MgCl₂] 3 mM et température d'hybridation 46°C.

III-1-2 AMPLIFICATION DU GENE ND-5/6 PAR C-Glu ET C-Leu3

Au vu de l'échec de la PCR avec les amorces ND-5/6-S et ND-5/6-R, de nouvelles amorces ont été testées, il s'agit de la C-Glu et de la C-Leu3 (Park et *al.*, 1993). Ces dernières amorces ont permis d'obtenir, après amplification du fragment ND-5/6 à la concentration $MgCl_2$ de 3 mM et aux températures d'hybridation de 60°C, 56°C, et 53°C, des bandes uniques à environ 2 500 pb appelées bandes spécifiques (Photo 8) correspondant à la taille attendue selon les publications (Cronin et *al.*, 1993 ; Park et *al.*, 1993; Rognon et Guyomard, 1997).

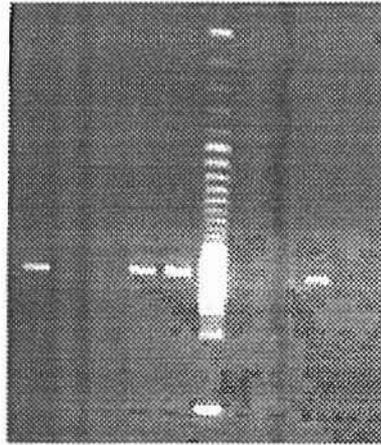


Photo 8 : électrophorèse sur gel d'agarose de routine (1,5%) des produits d'amplification ayant donné des bandes spécifiques avec les amorces C-Glu et C-Leu3 à $[MgCl_2]$ 3 mM et température d'hybridation 56°C.

III-1-3 CARACTERISATION DES POPULATIONS PAR RFLP

Les produits de coupure des cinq enzymes (Alu I, Hae III, Hinf I, Hpa II et Taq I) apparaissent, après migration sur gel d'agarose Nusieve (2%), en plusieurs bandes lorsque l'enzyme reconnaît son site de restriction ou dans le cas contraire en une seule bande à la même taille que le produit d'amplification.

a. Alu I

En fonction de la taille et du nombre des fragments de restriction obtenus, les différents profils (Figure 9) ont pu être regroupés en quatre haplotypes (Tableau III). Ces haplotypes ont été désignés par les lettres A, B, C et D en fonction de la taille totale des fragments générés.

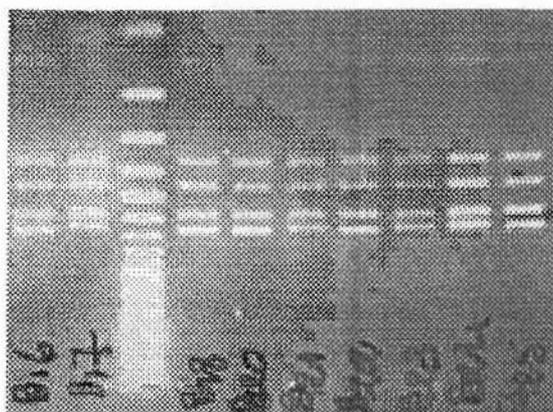


Photo 9 : électrophorèse sur gel d'agarose Nusieve (2%) des produits de digestion de l'enzyme de restriction Alu I.

Tableau III : les différents haplotypes obtenus avec Alu I en fonction de la taille et du nombre de fragments.

Haplotypes	Taille estimée des bandes observées								Total
A	660	590	470	380	200	140	110		2 550
B	660	590	470	380		140	110	90	2 440
C	660	590	470	380		140	110		2 350
D	660	590	470	380			110	90	2 300

L'analyse du pourcentage de chaque haplotype dans les différentes populations montre une prédominance de l'haplotype C (87% à 100%). Les autres haplotypes ne dépassant guère les 7% (Tableau IV).

Tableau IV: répartition des haplotypes de Alu I dans les différentes populations.

Populations Haplotypes (%)	B (30)	BG (15)	BZ (15)	C (30)	K (15)	M (07)	T (30)
A	-	-	-	-	-	-	7
B	7	-	-	-	-	-	-
C	90	87	93	100	100	100	93
D	3	-	-	-	-	-	-
Pb	-	13	7	-	-	-	-

NB : Pb = échantillons non lisibles ou dont la somme des tailles des différents fragments dépassent 2 550 pb.

L'analyse des pourcentages par bassin hydrographique montre une prédominance de l'haplotype C dans les trois bassins : 93% dans les bassins de la Volta et du Niger, 100% dans le bassin de la Comoé.

b. Hae III

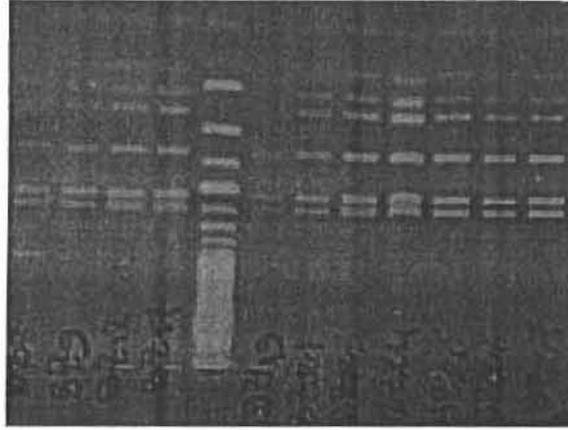


Photo 10 : électrophorèse sur gel d'agarose Nusieve (2%) des produits de digestion de l'enzyme de restriction Hae III.

Appliquant le même principe (taille et nombre des fragments de restriction obtenus), les profils (Photo 10) ont pu être regroupés en cinq haplotypes désignés par les lettres A, B, C, D et E en fonction de la taille totale des fragment générés (Tableau V).

Tableau V : les différents haplotypes obtenus avec Hae III en fonction de la taille et du nombre de fragments.

Haplotypes	Taille estimée des bandes observées										Total
A		600	550	380	260	250	220	180		100	2 540
B		600	550	380		250	220	180	150	100	2 430
C		600	550	380		250	220	180		100	2 280
D			550	380	260	250	220	180		100	1 940
E	900		550	380		250		180		100	2 360

L'analyse du pourcentage de chaque haplotype dans les différentes populations montre une prédominance de l'haplotype C (80% à 100%). Les autres haplotypes étant compris entre 3% et 20% (Tableau VI).

Tableau VI : répartition des haplotypes de Hae III dans les différentes populations.

Haplotypes (%) \ Populations	B (30)	BG (15)	BZ (15)	C (30)	K (15)	M (07)	T (30)
A	3	13	-	-	20	-	-
B	-	-	-	-	-	-	20
C	80	87	80	93	80	100	80
D	3	-	-	-	-	-	-
E	3	-	-	-	-	-	-
Pb	10	-	20	7	-	-	-

NB : Pb = échantillons non lisibles ou dont la somme des tailles des différents fragments dépassent 2 550 pb.

La prédominance de l'haplotype C est également constatée au niveau des trois bassins hydrographiques : Niger 80%, Volta 83% et Comoé 93%.

c. Hinf I

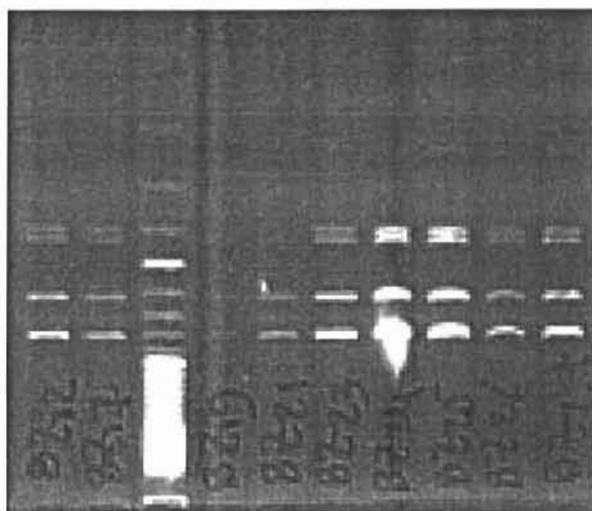


Photo 11 : électrophorèse sur gel d'agarose Nusieve (2%) des produits de digestion de l'enzyme de restriction Hinf I.

Les produits de digestion de Hinf I ont révélé pour tous les individus, après électrophorèse (Photo 11), un seul profil de coupure qui a été désigné par la lettre A (Tableau VII).

Tableau VII : haplotype obtenu avec Hinf I en fonction de la taille et du nombre de fragments.

Haplotype	Taille estimée des bandes observées					Total
A	830	630	430	400	220	2 510

L'analyse du pourcentage du seul haplotype obtenu avec Hinf I dans les différentes populations montre sa prédominance dans presque toutes les populations (67% à 93%), excepté celles de la Mare aux Hippopotames (29%) (Tableau VIII). Dans cette dernière, la majorité des profils de restriction pose des problèmes de lecture.

Tableau VIII : répartition de l'haplotype de Hinf I dans les différentes populations.

Haplotypes (%) \ Populations	B (30)	BG (15)	BZ (15)	C (30)	K (15)	M (07)	T (30)
A	90	80	67	70	87	29	93
Pb	10	20	33	30	13	71	7

NB : Pb = échantillons non lisibles ou dont la somme des tailles des différents fragments dépassent 2 550 pb.

L'unique haplotype A prédominant dans presque toutes les populations, l'est aussi dans les différents bassins hydrographiques : Comoé 70%, Volta 78% et Niger 93%.

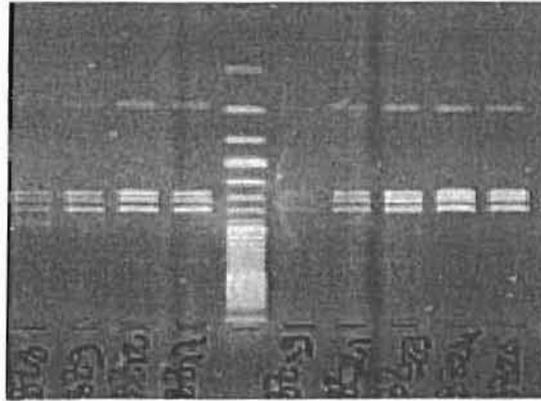
d. Hpa II

Photo 12 : électrophorèse sur gel d'agarose Nusieve (2%) des produits de digestion de l'enzyme de restriction Hpa II.

Comme Hinf I, l'enzyme de restriction Hpa II n'a donné qu'un seul profil (Photo 12) qui a été désigné par la lettre A (Tableau IX).

Tableau IX : haplotype obtenu avec Hpa II en fonction de la taille et du nombre de fragments.

Haplotype	Taille estimée des bandes observées				Total
A	810	720	680	290	2 500

L'analyse du pourcentage de l'haplotype A montre sa dominance plus ou moins prononcée dans les différentes populations (40% à 83%) (Tableau X). Dans les populations de Bama, de Bagré et de Bazèga, beaucoup d'échantillons posent des problèmes de lecture.

Tableau X : répartition de l'haplotype de Hpa II dans les différentes populations.

Populations Haplotypes (%)	B (30)	BG (15)	BZ (15)	C (30)	K (15)	M (07)	T (30)
A	40	53	40	73	73	71	83
Pb	60	47	60	27	27	29	17

NB : Pb = échantillons non lisibles ou dont la somme des tailles des différents fragments dépassent 2 550 pb.

L'analyse du pourcentage du seul haplotype A dans les différents bassins hydrographiques montre sa prédominance dans les bassins de la Comoé (73%) et du Niger (83%) et une dominance moindre dans celui de la Volta (51%).

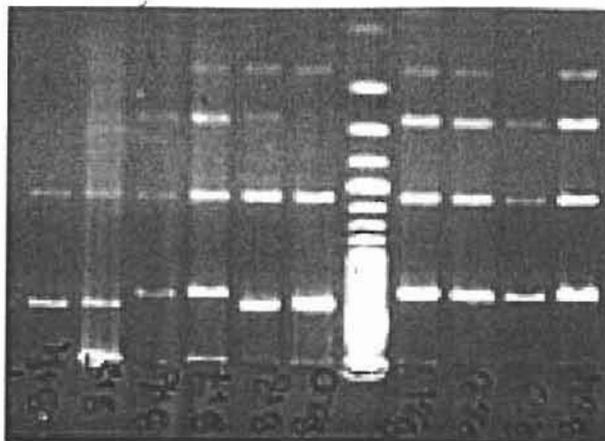
e. Taq I

Photo 13 : électrophorèse sur gel d'agarose Nusieve (2%) des produits de digestion de l'enzyme de restriction Taq I.

L'analyse des gels après digestion par la Taq I a révélé quatre profils différents (Photo 13) désignés par les lettres A, B, C et D, en fonction de la taille totale de la bande (Tableau XI).

Tableau XI : les différents haplotypes obtenus avec Taq I en fonction de la taille et du nombre de fragments.

Haplotypes	Taille estimée des bandes observées				Total
A	1 600	520	250	150	2 520
B	1 500	520	250	150	2 420
C	1 600	520		150	2 270
D	1 500	520		150	2 170

L'analyse du pourcentage de chaque haplotype dans les différentes populations montre une prédominance de trois haplotypes : A (86%), B (100%) et C (67%). L'haplotype D n'est présente que dans une seule population et à un très faible pourcentage (Tableau XII).

Tableau XII : répartition des haplotypes de Taq I dans les différentes populations.

Haplotypes (%) \ Populations	B (30)	BG (15)	BZ (15)	C (30)	K (15)	M (07)	T (30)
A	30	27	20	-	13	86	-
B	50	13	7	7	7	14	100
C	10	53	60	67	67	-	-
D	-	-	-	3	-	-	-
Pb	10	7	13	23	13	-	-

NB : Pb = échantillons non lisibles ou dont la somme des tailles des différents fragments dépassent 2 550 pb.

L'analyse des pourcentages des différents haplotypes par bassin hydrographique (Tableau XIII) montre une prédominance de l'haplotype A dans le bassin de la Volta (29%), de l'haplotype B qui semble fixé dans le bassin du Niger (100%) et de l'haplotype C dans le bassin de la Comoé (67%). L'haplotype D ne représentant que 3% dans le bassin de la Comoé.

Tableau XIII : répartition des haplotypes de Taq I dans les différents bassins hydrographiques.

Haplotypes (%) \ Bassins	Comoé (30)	Volta (82)	Niger (30)
A	-	29	-
B	7	24	100
C	67	37	-
D	3	-	-
Pb	23	10	-

NB : Pb = échantillons non lisibles ou dont la somme des tailles des différents fragments dépassent 2 550 pb.

III-2 DISCUSSION

III-2-1 MISE AU POINT DU PROTOCOLE D'AMPLIFICATION

La difficulté majeure rencontrée au cours de cette étude fut le choix du couple d'amorces pour l'amplification du gène ND-5/6. Ce fragment de l'ADNmt dont les premiers nucléotides sont bien connus, doit être amplifié avec des amorces qui lui sont spécifiques. Le fragment correspondant chez *Oreochromis niloticus* a déjà été amplifié par Rognon et Guyomard (1997). Mais, ces derniers ont seulement mentionné dans leur écrit, sur la différenciation de l'ADNmt entre les populations de *Oreochromis niloticus* de l'Afrique de l'Ouest et celles de l'Est, qu'ils ont utilisé les amorces de Cronin et *al.* (1993) pour amplifier le fragment ND-5/6, sans en préciser la séquence exacte. En effet, dans leur étude sur les variations intra et inter spécifiques de l'ADNmt chez deux espèces de saumons : le saumon chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) et le saumon keta (*Oncorhynchus keta*), Cronin et *al.* (1993) ont utilisé le couple d'amorces ND-5/6-S et ND-5/6-R pour l'amplification du fragment ND-5/6 des saumons. La séquence du couple d'amorces qui leur a permis d'obtenir des résultats satisfaisants, après électrophorèse des produits de la PCR, n'a donné aucune satisfaction avec *Oreochromis niloticus*. En effet, à la révélation, aucune bande ou des bandes non spécifiques ont été observées. A plusieurs reprises, nous avons tenté de résoudre ce problème d'invisibilité ou de non spécificité des bandes obtenues, soit en modifiant la concentration des réactifs, soit en jouant sur la température d'hybridation ou sur le temps d'élongation, soit en modifiant les trois paramètres en même temps. Aucun résultat satisfaisant n'a été obtenu.

Face à l'échec de plus d'une quinzaine de PCR, de nouvelles amorces (Park et *al.*, 1993) ont été testées. Ces auteurs ont utilisé dans leur étude sur les faibles niveaux de variations intra spécifiques de l'ADNmt chez le saumon keta (*Oncorhynchus keta*), le couple d'amorces C-Glu et C-Leu3 pour l'amplification du fragment ND-5/6. Ce dernier couple d'amorces a permis dans notre étude d'obtenir après révélation, des bandes spécifiques chez *Oreochromis niloticus*.

Il ressort donc de nos résultats que le couple d'amorces ND-5/6-S et ND-5/6-R n'est pas spécifique de la séquence du gène ND-5/6 d'*Oreochromis niloticus*. Ces amorces pourraient s'hybrider ailleurs dans le génome (mitochondrial et/ou nucléaire). Par contre, on peut conclure que les amorces C-Glu et C-Leu3 sont spécifiques du gène ND-5/6 de *Oreochromis niloticus*.

Lorsque nous comparons les deux couples d'amorces, nous constatons, en plus de la différence dans leur constitution, une différence du nombre de bases dans le couple C-Glu et C-

Leu3 alors que le couple ND-5/6-S et ND-5/6-R a le même nombre de bases. En effet, C-Glu a vingt bases alors que C-Leu3 en a vingt sept.

Cependant, il faut également signaler que, même avec ce couple d'amorces, tous les échantillons n'ont pu être amplifiés à la même température d'hybridation. En effet, certains ont été amplifiés à 60°C, d'autres à 56°C et d'autres enfin à 53°C. Quelques échantillons n'ont pu être amplifiés à aucune de ces températures.

Si nous regroupons les échantillons par température d'hybridation, nous constatons que, les populations du bassin de la Volta se sont hybridées en grande partie à deux températures : 56°C (51%) et 53°C (35%), contrairement à celles du bassin du Niger qui ne se sont hybridées grandement qu'à la seule température de 56°C (77%). Quand aux populations du bassin de la Comoé, elles se sont hybridées aux trois températures qui sont : 60°C (37%), 56°C (33%) et 53°C (30%). Ces variations de la température d'hybridation en fonction des bassins hydrographiques ont laissé présager de l'existence d'une possible différence dans la séquence du fragment ND-5/6 entre les populations des différents bassins.

La variation de la température d'hybridation observée au sein d'une même population peut être liée, soit à un mélange de populations dû aux opérations de repeuplement, soit à une possible apparition de mutations plus ou moins importantes au niveau du site de fixation des amorces. Lorsque la mutation est peu importante, un abaissement de la température peut conduire à une amplification du fragment. Dans certains cas, il n'y a pas de fixation possible des amorces, donc pas d'amplification. Pour conforter cette hypothèse de forte variabilité aux sites de fixation des amorces, nous avons pu noter que Roca et *al.* (2005), ont dû utiliser trois couples d'amorces différents pour amplifier le même gène ND-5/6 chez deux espèces africaines d'éléphants, l'éléphant de forêt et l'éléphant de savane.

Il faut noter également que certains échantillons qui ne réagissaient pas aux différentes températures d'hybridation ci-dessus citées (cas des populations de la Mare aux Hippopotames) ont pu être amplifiés grâce à une purification supplémentaire au Chelex, ce qui laisse penser que la purification au kit Promega n'était pas adéquate. D'autres investigations devront être réalisées pour comprendre ce phénomène.

L'extraction de l'ADN étant une étape importante, il faudra donc tester les deux méthodes d'extraction (kit Promega et Chelex) sur l'ensemble des échantillons, afin de pouvoir choisir la méthode d'extraction la meilleure.

III-2-2 ANALYSE DES DONNEES DE LA RFLP

La méthode de lecture des profils de coupure repose sur une comparaison de la présence ou de l'absence d'un site de restriction ainsi que les tailles des fragments générés par les différentes digestions.

A la lecture des profils de coupure, les enzymes Alu I, Hae III et Taq I ont donné chacune plusieurs haplotypes différents par la taille totale des fragments générés ; des tailles totales souvent très inférieures à la taille du produit amplifié (environ 2 500 pb). Un test de répétitivité, c'est-à-dire la reprise des manipulations dans les mêmes conditions et la comparaison des résultats, a été quelques fois nécessaire pour confirmer certains résultats douteux (cas de l'haplotype D de l'enzyme Hae III). Cette variation de taille totale d'un haplotype à un autre peut s'expliquer de deux manières, vu la faible résolution du gel d'agarose Nusieve. Elle peut s'expliquer soit par des superpositions de bandes de même taille ou différentes de seulement quelques bases, soit par l'obtention de bandes de très faible taille.

Différents haplotypes ont été obtenus avec les cinq enzymes de restriction utilisées. Hormis les échantillons qui posent des problèmes de lecture (peut être dus à des contaminations lors des manipulations) et qu'il faudrait reprendre, les enzymes Hinf I et Hpa II présentent un seul haplotype et l'enzyme Alu I en présente quatre dont le dominant est l'haplotype C (94%). Ces résultats correspondent aux haplotypes obtenus au niveau des populations de *Oreochromis niloticus* de la zone Ouest africaine (Rognon et Guyomard, 1997).

La quatrième enzyme qui est l'enzyme Hae III, donne également un haplotype dominant qui correspond à l'haplotype C (84%) mais cette enzyme ne figure pas sur la liste des enzymes utilisées par Rognon et Guyomard (1997) sur l'espèce *Oreochromis niloticus*. Elle a plutôt été utilisée par Agnès et *al.* (1997) sur la même espèce mais sur un autre fragment de l'ADNmt, la D-Loop (1 000 pb) où ils ont obtenu deux haplotypes.

Ces quatre premières enzymes semblent peu intéressantes pour l'étude de la diversité génétique à l'échelle du pays. La cinquième enzyme, à savoir la Taq I, présente elle un polymorphisme plus important avec les haplotypes suivants : A (17%), B (37%) et C (35%). D'après les données de la littérature, cette enzyme n'a jamais été utilisée chez cette espèce. Elle a été utilisée par Cronin et *al.* (1993) sur le même fragment mais sur une autre espèce de poissons, le saumon chez laquelle ils ont trouvé deux haplotypes. Il serait donc intéressant d'utiliser cette enzyme sur un plus grand nombre d'individus et surtout sur d'autres populations

au niveau macro géographique (populations de l'Afrique de l'Est, de l'Ouest et du bassin du Nil) pour observer le regroupement de ces populations par rapport à cette enzyme.

Pour cette enzyme, lorsque nous considérons les populations par bassin hydrographique, nous notons que l'haplotype A est fréquent dans le bassin de la Volta (29%), l'haplotype B semble fixé dans le bassin du Niger (100%) et l'haplotype C est fréquent dans le bassin de la Comoé (67%). Par ailleurs, les haplotypes A, B et C sont retrouvés dans les populations de la Volta; les haplotypes B, C et D dans les populations de la Comoé alors que les populations du bassin du Niger ne présentent qu'un seul haplotype qui est le B. Cette répartition des haplotypes de la Taq I témoigne de l'hétérogénéité des populations de *Oreochromis niloticus* du Burkina Faso. Ce résultat pourrait expliquer en partie les variations observées dans la température d'hybridation entre les populations des différents bassins hydrographiques. Cette hétérogénéité de la population traduit une diversité biologique liée sans doute à la colonisation des cours d'eau par différentes populations de *Oreochromis niloticus*. Le fait de retrouver plusieurs haplotypes dans un même cours d'eau pourrait être lié, aux actions anthropologiques à travers les multiples campagnes de repeuplement.

Une analyse complémentaire plus spécifique utilisant les microsatellites permettra d'affiner la compréhension de la structuration de la diversité génétique du tilapia. En effet, le taux de mutation des marqueurs microsatellites est supérieur à celui de l'ADNmt; en outre les microsatellites sont présents dans le génome nucléaire et donnent accès à l'information génétique transmise par les mâles et les femelles, à la différence de l'ADNmt qui vient de la lignée maternelle. Les microsatellites sont des séquences du génome constituées par la répétition en tandem d'un motif simple d'ADN (quelques nucléotides) dont le polymorphisme ne réside pas dans des mutations ponctuelles, mais dans le nombre de répétitions de ces motifs simples et dont les fragments d'amplification ne diffèrent en taille que de quelques bases.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude sur la caractérisation génétique des populations de *Oreochromis niloticus* constitue l'une des premières phases du programme de sélection génétique en cours au Burkina Faso. Au cours de celle-ci, nous avons pu mettre au point un protocole d'amplification du gène ND-5/6 de l'ADNmt. Après amplification, les produits amplifiés du gène ont été digérés par cinq enzymes de restriction et ont révélé un fort polymorphisme pour l'enzyme Taq I. En effet, cette enzyme a donné quatre haplotypes qui ont permis de regrouper toutes les populations en trois grands groupes appartenant aux trois bassins hydrographiques que compte le pays à savoir la Comoé, la Volta et le Niger.

L'analyse du polymorphisme de l'ADNmt semble montrer une discrimination assez nette entre les populations et l'existence d'une diversité génétique importante. Elle doit alors être plus largement étudiée par une étude plus approfondie avec la Taq I sur un plus grand effectif et par l'utilisation d'autres outils, particulièrement les marqueurs microsatellites afin de confirmer les résultats obtenus. Si la forte diversité génétique s'avère une réalité, il serait intéressant par la suite d'effectuer des croisements intra et inter populations et de comparer les différentes performances zootechniques afin de pouvoir sélectionner, après estimation des valeurs de croisements en terme génétique et financier, une meilleure souche d'élevage qui sera vulgarisée auprès des pisciculteurs.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Adakal E. H., 2004** : Utilisation des techniques Nested PCR et RFLP pour la détection et la caractérisation génétique d'*Ehrlichia ruminantium* au Burkina Faso. Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) de biologie animale. Faculté des Sciences et Technique de Dakar. N° d'ordre 194 ; 60 p.
2. **Agnèse J. F., B. Adépo-Gourène, K. E. Abbans, Y. Fermon, 1997**: Genetic differentiation among natural populations of the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). *Heredity* 79, 88-96.
3. **Agnèse J. F., B. Adépo-Gourène, L. Pouyaud, 1998**: Genetic differentiation among natural populations of the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). *Genetics and Aquaculture in Africa*; 153-163.
4. **Assemien O., G. Gourène, 1998**: Zoo-technical characterization of four strains of *Oreochromis niloticus*. *Genetics and aquaculture in Africa*; 183-187.
5. **Bard J., P. de Kimpe, J. Lemasson, P. Lessent, 1974** : Manuel de pisciculture tropicale. Centre Technique Forestier Tropical ; 209 p.
6. **Bernatchez L., R. G. Danzmann, 1993**: Congruence in control-Region sequence and Restriction-site variation in Mitochondrial DNA of Brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchell). *Mol. Biol. Evol.* 10 (5): 1002-1014.
7. **Bernatchez L., A. Osinov, 1995**: Genetic diversity of trout (genus *Salmo*) from its most eastern native range based on mitochondrial DNA and nuclear gene variations. *Molecular Ecology*: 4, 285-297.
8. **Bezault E., 1998/1999** : Etude de la conservation de locus microsatellites chez les Tilapias et application à l'analyse de la ségrégation méiotique chez des hybrides inter-génériques (*O. niloticus* x *S. melanotheron*). Diplôme d'études supérieures de sciences naturelles. Université Pierre et Marie Curie – Paris VI. CIRAD-EMVT, INRA-Laboratoire de génétique des poissons ; 41 p.

9. **Cronin M. A., W. J. Spearman, R. L. Wilmot, J. C. Patton, J. W. Bickham, 1993:** Mitochondrial DNA variation in Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and Chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50 : 708-715.
10. **FAO, 2002 :** Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture (SOFIA) 2002 ; 152 p.
11. **FAO, 2004 a :** La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture (SOFA) 2003-2004 ; 228 p.
12. **FAO, 2004 b :** Profil de la pêche par pays.
[http: // www.fao.org/fi/fcp/fr/BFA/profile.htm](http://www.fao.org/fi/fcp/fr/BFA/profile.htm) consulté le 08/01/05.
13. **FAO, 2004 c :** Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture (SOFIA) 2004 ; 164 p.
14. **IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER), 2003 :** Aquaculture, semaine de l'enseignement 2003, centre de Brest.
[http : // www.ifremer.fr/aquaculture/aquaculture/pisciculture.htm](http://www.ifremer.fr/aquaculture/aquaculture/pisciculture.htm) consulté le 31/03/05.
15. **Kabré T., 1982 :** Elevage intensif de *Sarotherodon niloticus*. Détermination de la courbe de croissance, paramètres de conduite d'élevage. Mémoire de fin d'études. Institut Supérieur Polytechnique. Direction de la pêche et de la Pisciculture. Projet Aquaculture de Banfora ; 95 p.
16. **Lazard J., 1987 :** Projet Aquaculture de Banfora : Bilan diagnostic ; Propositions de relance. Caisse Centrale de Coopération Economique ; 55 p.
17. **Lazard J., X. Rognon, 1997:** Genetic diversity of tilapia and aquaculture development in Côte d'Ivoire and Niger. *The israeli journal of Aquaculture-Bamidgeh* 49 (2), 90-98.
18. **Levêque C., 1998 :** Biodiversité et gestion des systèmes aquatiques continentaux. *Revue des Sciences de l'Eau, Rev. Sci. Eau N° spécial* : 211-221.
19. **Maftah A., R. Julien, 1999 :** Biologie moléculaire. 2^e édition Dunod ; 159 p.

- 20. Mélard Ch., 1986 :** Cahiers d'éthologie appliquée à la protection et à la conservation de la vie sauvage, à la gestion et au contrôle des ressources et productions animales. Collection Enquêtes et Dossiers : 10. Les bases biologiques de l'élevage intensif du Tilapia du Nil. Volume 6, Fascicule 3. Ministère de l'éducation nationale et de la culture française ; 224 p.
- 21. Moazami-Goudarzi K., 1994 :** Caractérisation de plusieurs races bovines françaises à l'aide de marqueurs polymorphes. Thèse. Université de Paris Sud, Centre d'Orsay ; 123 p.
- 22. Morissens P., X. Rognon, I. Dembélé, 1995 :** Comparaison des performances de croissance et des caractéristiques électrophorétiques de trois souches d'*Oreochromis niloticus* présentes en Côte d'Ivoire. In RSV Pullin, J. Lazard, M. Legendre, J.B. Amon Kotias and D. Pauly (eds). The Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture. ICLARM Conf. Proc. 41: 00p.
- 23. Ouattara B., J. Janssen, 1997 :** Les poissons de quelques lacs naturels et lacs de barrage du Sud-ouest du Burkina Faso. Projet "Gestion de la pêche dans le Sud-ouest". Ministère de l'environnement et de l'eau, Burkina Faso. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH ; 48 p.
- 24. Palada-de Vera M. S., A. E. Eknath, 1993:** Predictability of individual growth rates in tilapia. International Center for Living Aquatic Resources Management (ICLARM), Makati, Metro Manila, Philippines. Aquaculture, 111:147-158. Elsevier science publishers B.V., Amsterdam.
- 25. Park L. K., M. A. Brainard, D. A. Dightman, G. A. Winans, 1993:** Low levels of intraspecific variation in the mitochondrial DNA of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Mol Mar Biol Biotechnol. 1993 Dec: 2 (6): 362-70.
- 26. Roca A. L., N. Georgiadis, S. J. O'Brien, 2005:** Cytonuclear genomic dissociation in elephant species. Nature Genetics Volume 37, Number 1, 96-100 p.
- 27. Rognon X., 1993 :** Diversité génétique et relations phylogénétiques chez les tilapias (Pisces : Cichlidae). Comparaison des données du polymorphisme enzymatique et mitochondrial. Thèse de l'Université Paris XI, Orsay ; 176 p.

28. **Rognon X., M. Andriamanga, B. McAndrew et R. Guyomard, 1996:** Allozyme variation in natural and cultured populations in two tilapia species: *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. *Heredity*, 76: 640-650.
29. **Rognon X., R. Guyomard, 1997:** Brief Communications. Mitochondrial DNA differentiation among East and West African Nile tilapia populations. *Journal of Fish Biology* (1997) 51, 204-207.
30. **Rognon X., R. Guyomard, 2003:** Large extent of mitochondrial DNA transfer from *Oreochromis aureus* to *O. niloticus* in West Africa. *Molecular Ecology*: 12, 435-445.
31. **Somé V., 1992 :** Croissance et reproduction de : *Alestes nurse* Ruppell ; *Lates niloticus* L. ; *Oreochromis niloticus* L. ; *Sarotherodon galilaeus* Art. de la Tapoa. Mémoire de fin d'études N° 0018; 65 p.
32. **Spore N°101, Octobre 2002 :** Information pour le développement agricole des pays ACP ; 16 p.
33. **Tagu D., C. Moussard éd., 2003 :** Principes des techniques de biologie moléculaire. 2^e édition revue et augmentée. INRA ; 176 p.
34. **Tartivel M. P., 1994 :** Analyse du polymorphisme de marqueurs microsatellites à l'aide d'un automate de séquençage. Application aux bovins. Rapport de stage, laboratoire de génétique biochimique et cytogénétique. INRA ; 47 p.
35. **Toguyeni A., 1996 :** La croissance différentielle liée au sexe chez le tilapia (Pisces : Cichlidae), *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Contribution des facteurs génétiques, nutritionnels, comportementaux et recherche d'un relais endocrinien. Thèse de Doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes (ENSAR), option : Biologie et Agronomie; 158 p.

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE 1

En plus du matériel ordinaire de Laboratoire, les appareils suivants ont été utilisés :

- Agitateurs :
 - Agitateur vortex
Janke&Kunkel
IKA-WERK
 - Agitateur magnétique chauffant 4 postes
Fisherbrand

- Appareil à glace pilée :
 - ICE Flakers
 - Brima Ice Markers

- Autoclave :
 - Webeco

- Bain-marie :
 - Memmert

- Balance :
 - Sartorius type L610D

- Centrifugeuse :
 - Sigma 201 m

- Congélateur -20°C :
 - Sidex

- Cuves à électrophorèse pour gels d'agarose :
 - Horizontal Midi-Gel Unit
Model # MGU-600T
C.B.S Scientific Co
 - Horizontal Mini et Midi gel
Fisherbrand

- Distillateur :
 - Verre Schott

- Four à micro-ondes :
 - 900 W
 - Micrologic MW 260

- Générateurs :
 - Générateur pour Electrophorèse 3000 V
Gen-apex 3000 X
Prolabo
 - Générateur 3000 V
Electrophoresis Power Supply PS 3003
Apelex

- Générateur 300 V
Electrophoresis Power Supply
Fisher Scientific LABOSI
- Hotte à flux laminaire:
ESI FLUFRANCE 220 V 50 Hz
Equipements Scientifiques & Industriels
- Incubateur :
Hybaid
Mini Oven MK II
- pH-mètre:
 - Microprocessor pH/mV/°C Meter
5 Watts
 - pH meter BASIC 20
CRISON Instruments S.A
- Photo-print :
Vilber Lourmat
- Réfrigérateur :
Bosch
- Stérilisateur :
Memmert
- Thermocycleur :
PTC-100™ Programmable Thermal Controller
MJ Research IMC.

ANNEXE 2

PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN

Le kit Promega a été utilisé pour l'extraction :

- a. mélanger dans un tube de centrifugation, 120 μ l de solution EDTA de concentration 0,5 M (pH 8,0) et 500 μ l de solution de lyse des noyaux. Laisser refroidir le mélange sur de la glace ;
- b. mettre 0,5-1 cm de tissu dans un tube de micro-centrifugation de 1,5 ml ;
- c. ajouter 600 μ l du mélange EDTA/solution de lyse des noyaux dans le tube ;
- d. ajouter 17,5 μ l de Protéinase K 20 mg/ml ;
- e. incuber pendant 3 heures à 55°C tout en agitant ; vortexer l'échantillon une fois par heure. S'assurer que le tissu est complètement digéré.
 - I. Ajouter 200 μ l de solution de précipitation des protéines et vortexer vigoureusement à grande vitesse pendant 20 secondes. Refroidir l'échantillon dans de la glace pendant 5 minutes ;
 - II. centrifuger pendant 4 minutes à 13,000-16,000 * g. Les protéines précipitées forment une fine boulette blanche ;
 - III. enlever soigneusement le surnageant contenant l'ADN et le transférer dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml contenant 600 μ l d'isopropanol ;
 - IV. mélanger doucement la solution en la renversant jusqu'à ce que le brin blanc de l'ADN forme une masse visible ;
 - V. centrifuger pendant 1 minute à 13,000-16,000 * g. L'ADN sera visible comme une petite boulette blanche. Décantier soigneusement le surnageant ;
 - VI. ajouter 600 μ l d'éthanol 70% et renverser doucement le tube plusieurs fois pour laver l'ADN. Centrifuger pendant 1 minute à 13,000-16,000 * g ;
 - VII. aspirer soigneusement l'éthanol afin de ne pas aspirer la boulette d'ADN qui est très mobile;
 - VIII. renverser le tube sur un papier absorbant et sécher la boulette pendant 10-15 minutes ;
 - IX. ajouter 100 μ l de solution de réhydratation de l'ADN et réhydrater l'ADN en l'incubant à 65°C pendant 1 heure ;
 - X. garder l'ADN à 2-8°C.

ANNEXE 3

PROTOCOLE D'AMPLIFICATION PAR PCR

PCR classique	Pour 1 échantillon			Pour 4 échantillons (dont le blanc)
	Concentration de la solution mère	Concentration dans la PCR (sauf la Taq où il s'agit de la quantité)	Volume en μ l dans la PCR	Volume en μ l dans le Mix
Tampon 10x (MgCl ₂ 15mM)	10	1	6.00	30
MgCl₂ mM	25	3	3.60	18
dNTP μ M	20 000	200	0.60	3
C-Glu μ M	20	0.2	0.60	3
C-Leu3 μ M	20	0.2	0.60	3
Taq ui/ μ l	5	2	0.40	2
Eau qsp			45.20	226
Somme			11.80	59
ADN - échantillon			3.00	
TOTAL			60.00	

Volume à ajouter= (Concentration PCR * Volume PCR)/C initiale

Cycle de PCR			
Nom : Pois 1		Machine PCR : PTC-100™	
	Température	Temps	Nombre de cycles
Démarrage	94	3 mn	
Dénaturation	94	45 s	
Hybridation	56	45 s	x 34
Elongation	72	3 mn	
Elongation	72	10 mn	

Migration	
Gel type : gel d'agarose	Durée : 2 heures
Concentration : 1,5%	Volt : 120 volts

N° de l'échantillon	Nom
1	blanc
2	poisson 1
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	

ANNEXE 4

PROTOCOLE DE LA DIGESTION PAR RFLP

Placer dans un tube de 0,2 ml :

- 1 μ l de tampon 10 X;
- 0,5 μ l d'enzyme (10 ui/ μ l);
- 8,5 μ l de produit PCR;
- soit un total de 10 μ l.

Adapter le protocole à l'intensité des bandes obtenues suite à l'amplification du fragment. Une intensité faible nécessite un plus grand volume de produit de PCR.

Mettre le mélange au bain marie à 37°C pendant 3 heures pour les enzymes suivantes : Alu I, Hae III, Hinf I et Hpa II. Pour la Taq I, placer le mélange à 65°C pendant 3 heures.