



HAL
open science

Etude de la structure génétique d'*Amblyomma variegatum*, tique vectrice d'*Ehrlichia ruminantium* dans l'océan Indien

Marlène Dupraz

► **To cite this version:**

Marlène Dupraz. Etude de la structure génétique d'*Amblyomma variegatum*, tique vectrice d'*Ehrlichia ruminantium* dans l'océan Indien. Parasitologie. 2012. hal-02805989

HAL Id: hal-02805989

<https://hal.inrae.fr/hal-02805989>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Master 1 Biologie des plantes, Microbiologie, Biotechnologies, Bioprocédés

Mention Interactions Micro-organismes - Hôtes - Pathogènes

2011-2012

**Etude de la structure génétique d'*Amblyomma variegatum*,
tique vectrice d'*Ehrlichia ruminantium* dans l'océan Indien**



Encadrée par Karine HUBER (karine.huber@cirad.fr)

UMR CIRAD/INRA « Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes »

Campus de Baillarguet

Introduction

En partenariat avec les pays du Sud, le Cirad produit et transmet de nouvelles connaissances, pour accompagner leur développement agricole et contribuer au débat sur les grands enjeux mondiaux de l'agronomie. Depuis 2007, la collaboration du Cirad et de l'INRA vise à promouvoir à l'international une offre française en recherche agronomique.

L'unité mixte Cirad- INRA dans laquelle j'ai effectué ce stage « Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes », par ses activités, a pour ambition de contribuer à l'amélioration du développement socio-économique des pays du Sud, en les aidants à maîtriser la santé animale.

Parmi les maladies affectant la santé animale les maladies à transmission vectorielle, qui sont en forte prévalence dans les pays du Sud où elles causent de nombreux cas de mortalité (Snelson, 1975) rendant très difficile le développement économique de ces régions (Bos & Mills, 1987).

Les arthropodes vecteurs, tels que les moustiques, les puces ou les tiques, assurent la transmission biologique et active de l'agent pathogène d'un vertébré à un autre vertébré. Ils assurent à la fois la transmission du pathogène mais lui permettent aussi d'effectuer une partie de son cycle de développement. Ceci assure à l'agent pathogène une expansion rapide du fait de la dynamique invasive des vecteurs (Rodhain, 1999).

Caractériser les déterminants de l'émergence des agents pathogènes, de leur transmission et de leur diffusion ainsi que les processus infectieux mis en œuvre et la dynamique des populations de vecteurs sont devenus des objectifs primordiaux (Young, 1988). Afin de mieux comprendre l'épidémiologie de ces maladies à transmission vectorielle et développer des méthodes de lutte anti-vectorielles efficaces, il est important de connaître les processus évolutifs qui gouvernent la distribution géographique actuelle des espèces vectrices ainsi que la structuration de leurs populations et d'avoir des informations précises sur leur dispersion, ce que permet la génétique des populations. Elle consiste en l'étude de la répartition de la variabilité génétique, dans l'espace et le temps, entre et au sein des populations naturelles d'une même espèce ainsi qu'en l'étude des forces génétiques (déduites pas

l'étude des fréquences alléliques sur des marqueurs moléculaires polymorphiques), écologiques et environnementales qui la gouvernent (mutation, recombinaison, sélection, migration, distance géographique entre individus, système de reproduction).

De nombreuses études de génétiques des populations d'arthropodes vecteurs ont ainsi permis de mieux comprendre le fonctionnement de populations de vecteurs et de préconiser des méthodes de lutte plus adaptées. Par exemple, une étude sur le moustique *Aedes aegypti*, vecteur de la dengue au Vietnam a permis de montrer, que la lutte insecticide serait plus efficace si elle était appliquée en fin de saison sèche (Huber et al., 2002). Une autre étude, portant sur la mouche tsetse (*Glossina palpalis gambiensis*) au Sénégal, a permis d'identifier les zones géographiques où un projet d'éradication serait le plus susceptible de réussir (Solano et al., 2010).

Parmi les vecteurs de maladie, les tiques, acariens hématophages stricts parasitant toutes les classes de vertébrés transmettent une grande variété d'agents pathogènes tant virus, bactéries, protozoaires que nématodes. En santé animale, par leur effet en tant que vecteur de maladies mais également par les pertes directes qu'elles génèrent (baisse des productions de lait ou de viande, coût des programmes de lutte) elles constituent un enjeu économique dominant en élevage, particulièrement dans les régions subtropicales (Jongejan & Uilenberg, 2004).

La tique *Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1794) est une tique dure de la famille des Ixodidae, vectrice d'*Ehrlichia ruminantium*, une rickettsie intracellulaire, responsable de la cowdriose (heartwater en anglais), une maladie des animaux domestiques et sauvages sévissant en Afrique sub-saharienne, à Madagascar et dans la Caraïbe et entraînant de graves symptômes souvent responsables de la mort rapide de l'animal (Peter, 2002).

Cette tique, originaire d'Afrique, a étendu son aire de répartition à l'Océan Indien et dans la Caraïbe grâce notamment à l'activité humaine (commerce de bovins) mais aussi aux flux migratoires de certains animaux tels que les oiseaux (Corn et al, 1993).

Dans l'Océan Indien, *A. variegatum* a été signalée pour la première fois à Madagascar en 1899, mais son introduction sur cette île et dans les Comores est probablement bien plus ancienne et remonte certainement à l'époque de l'importation des premiers zébus depuis l'Afrique de l'Est (5-7^{ème} siècle). Au cours du 19^{ème} siècle, *A. variegatum* a colonisé la Réunion et l'île Maurice, probablement par des échanges de bovins depuis Madagascar, ainsi que l'archipel des Antilles par le commerce de bovins depuis l'Afrique de l'Ouest (Walker, 1987). Aux Comores, la majeure partie des bovins provenaient de Madagascar, mais de nouvelles introductions depuis la Tanzanie ont été opérées depuis 2000.

Ce stage s'inscrit dans un projet global, qui a pour but (1) de déterminer l'historique de l'introduction de la tique et du pathogène dans les îles de l'Océan Indien et les phénomènes ayant conduit à l'endémisation de la maladie dans cette région ; (2) de déterminer la structuration actuelle des populations de tiques et de rickettsies et les facteurs influant sur celles-ci. A terme, ce projet pourrait permettre de définir des stratégies de lutte anti-vectorielle efficace dans chaque région affectée mais aussi d'identifier des souches d'*Ehrlichia* candidates à l'élaboration d'un vaccin.

Une première étude, dont le but était de caractériser la diversité génétique de cette tique sur l'île de Madagascar, afin de déterminer la structuration des populations d'*A. variegatum* à l'aide de marqueurs mitochondriaux et microsatellites a mis en évidence une forte diversité génétique chez les tiques *A. variegatum* et des populations bien structurées mais de manière hétérogène. Cette structure est probablement influencée par l'interaction complexe de différents facteurs géographiques, climatiques et anthropiques. (Jacquet, 2011).

Le but de mon travail pour ce stage est de caractériser la diversité génétique d'*A. variegatum*, à l'aide de marqueurs mitochondriaux et microsatellites, sur et entre les autres îles de l'océan Indien (Comores, Mayotte et La Réunion) afin de déterminer la structuration des populations de tiques et leur circulation au sein de cette zone.

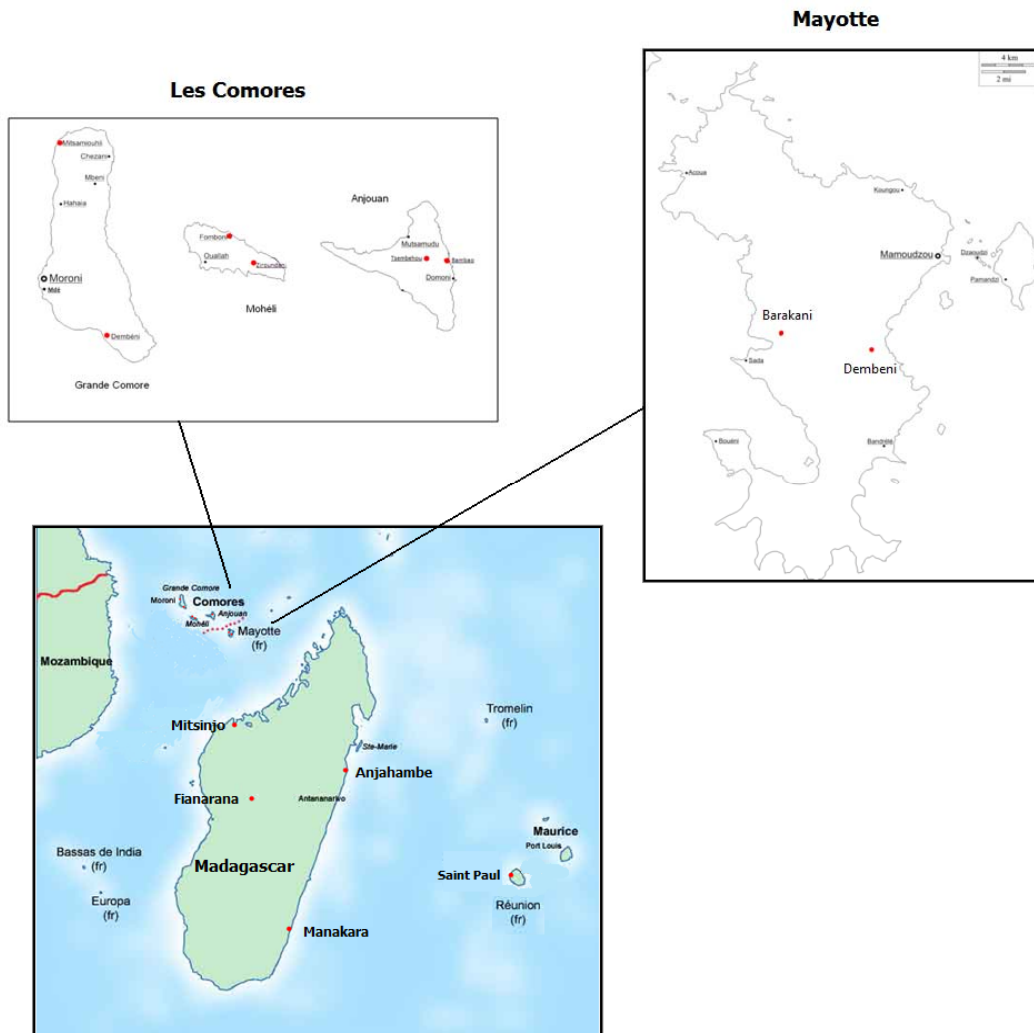
Les microsatellites qui sont des séquences d'ADN constituées par la répétition en tandem d'un motif d'une à cinq paires de bases, sont largement utilisés en génétique de populations (Jarne & Lagoda, 1996). En plus d'être fortement polymorphes (taux de mutation de 5.10^{-4} - 10^{-5}) et faciles à utiliser, ces

marqueurs sont considérés comme neutres, co-dominants et à ségrégation mendélienne (Lehmann et al, 1996). Ils fournissent des estimations sur la migration, la relation inter-individus et inter-populations. Parallèlement, les marqueurs mitochondriaux, présentant une hérédité maternelle, un taux de mutation plus lent et peu de recombinaison sont un outil de choix pour travailler au niveau de l'espèce. Ils permettent de retracer l'histoire des populations et de répondre à certaines questions comme celle de savoir comment l'espèce s'est distribuée dans le temps et dans l'espace sur son aire de répartition actuelle (Simon et al, 1994)

Ces deux types de marqueurs, utilisés de manière combinée permettront d'explorer des histoires à des échelles de temps différentes.

Ce travail permettra de mieux comprendre l'épidémiologie de la cowdriose, d'avoir une meilleure connaissance des phénomènes contrôlant la propagation de cette maladie, mais aussi de contribuer au développement de nouvelles stratégies de lutte anti-vectorielle.

Figure 1 : Carte d'échantillonnage



MATERIEL et METHODES

Sites d'échantillonnage

Les échantillonnages de tiques ont été effectués sur bovins ou zébus, d'octobre 2009 à avril 2010 à la Réunion, Mayotte et aux Comores (Anjouan, Mohéli, Grande Comore). En moyenne 30 tiques par site ont été prélevées, à raison de deux sites par île, un seul à la Réunion et quatre à Madagascar (Figure 1).

Les informations génétiques des quatre populations de Madagascar ont été extraites de l'étude réalisée par S. Jacquet en 2011.

Extraction d'ADN

Après lavage dans un tampon PBS et dissection des tiques, l'extraction d'ADN est réalisée à l'aide du kit « QIAGEN QIAmp DNA minikit » selon les recommandations du fournisseur (lyse à 56°C sur la nuit, élution dans 200 µL de tampon AE).

Marqueurs mitochondriaux

Huit individus de chaque population ont été sélectionnés pour représenter au mieux la diversité locale afin d'amplifier et séquencer les gènes ADNr 16S et Cytochrome b (Cytb).

Amplification

L'amplification des échantillons est réalisée en utilisant des amorces spécifiques des gènes à amplifier (annexes 1).

Une électrophorèse est ensuite réalisée sur gel d'agarose à 1% et les bandes d'ADN sont excisées puis purifiées à l'aide du kit « Illustra™ GFX™ PCR DNA and gel band purification » (GE Healthcare). Les échantillons sont envoyés pour séquençage chez Beckman Coulter Genomics.

Analyse des données

Les séquences ont été alignées en utilisant le logiciel Seaview version 4.3.0 (Gouy et al., 2010) par l'algorithme MUSCLE (Edgar, 2004). Puis nous avons utilisé le logiciel DNAsp version 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009) afin de déterminer la diversité haplotypique H_d (probabilité que deux haplotypes tirés au hasard dans la population soient identiques) calculée à partir des équations 8.4 et 8.12 de Nei (1973), la diversité nucléotidique P_i (nombre moyen de différences entre deux séquences tirées au hasard dans la population) obtenues à partir des équations 10.5 et 10.7 de Nei (1973) et sa variance, et le test de Tajima D (basé sur la différence entre le nombre de sites polymorphes et le nombre moyen de différences nucléotidiques) (Tajima, 1989) à partir de l'équation 38.

Les réseaux d'haplotypes (séquences nucléotidiques qui peuvent être communes à plusieurs individus mais qui diffèrent des autres haplotypes par une ou plusieurs substitution de nucléotides) basés sur la théorie de la coalescence, ont été créés via le logiciel Network 4.6.1.0. (www.fluxusengineering.com) en utilisant la méthode des median-joining networks (Bandelt et al. 1999).

Afin d'estimer la différenciation entre les populations étudiées et comprendre la structure de celles-ci, nous calculons K_{st}^* , l'équivalent de la statistique de séquence γ_{st} basé sur les différences entre séquences, à partir des équations 7-11 de Hudson *et al.*, (1992) pour l'ensemble des populations à l'aide du logiciel DNAsp. Un test de permutation dans lequel les haplotypes ont été affectés aux différentes localités de façon aléatoire 1000 fois, a été utilisé pour tester la significativité de K_{st}^* . Nous avons ensuite, réalisé le même test pour estimer le K_{st}^* pour chaque paire de populations. Étant donné le grand nombre de tests engendrés, les p-values obtenues ont ensuite été ajustées via la procédure de Bonferroni.

Une analyse de variance moléculaire (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) a été réalisée par ARLEQUIN (version 3.5.1.2) (Excoffier et al. 2005) afin de tester le regroupement géographique des populations. La variance génétique a été partitionnée entre plusieurs niveaux hiérarchiques (entre groupes, entre populations au sein des groupes et au sein des populations).

Marqueurs microsatellites

Huit marqueurs microsatellites développés par l'équipe de Karine Huber ont été utilisés (Annexe 2).

Amplification, migration et géotypage

Les échantillons d'ADN extraits sont amplifiés par PCR (conditions en annexe 2). L'amorce forward utilisée est marquée par une queue M13 en 5', correspondant à une séquence de 18pb. Cette queue M13 sera complétée lors de l'amplification avec une séquence marquée par un fluorochrome ou dye. Les deux types de dye utilisés fluorescent à des longueurs d'ondes différentes lorsqu'ils sont excités : 700nm et 800nm et permettront de visualiser les bandes alléliques pendant la migration. Les loci peuvent être multiplexés pour la migration en fonction de leurs tailles et du dye utilisé.

On utilise un analyseur de fragments Li-cor® grâce auquel on pourra analyser les profils géotypiques, à une paire de base près, pour chaque individu. Un gel d'acrylamide à 6.5% contenant 20ml d'acrylamide-urée, 175µl de persulfate d'ammonium (APS) et 25µl de TMED est coulé entre deux plaques de verre et est monté sur un Système Analyseur ADN 4300 (LI-COR, Lincoln, NE).

On ajoute aux échantillons 10µl d'un mélange de 2.5ml de bleu urée, 500µl d'eau et 5µl de desmil 700 et 800. Les bandes de desmiling sont des fragments d'ADN marqués, de taille connue permettant de corriger la déformation du gel pendant la migration. Les échantillons sont ensuite dénaturés 3min à 95°C et déposés sur le gel. Afin de faciliter la détermination de la taille des allèles, on dépose tous les cinq échantillons un marqueur de taille connu, spécifique à chaque loci.

La détermination des allèles se fait grâce au logiciel SAGA-GT génération 2.0 (LI-COR, Lincoln, NE), en étudiant les profils de migration obtenus lors de la révélation des amplicons. Deux lectures indépendantes ont été réalisées afin de minimiser les erreurs.

Analyse des données

Afin de déterminer s'il existe une association ne s'effectuant pas au hasard entre gènes de locus différents, nous avons réalisé un test de déséquilibre de liaison entre chaque couple de marqueurs par

randomisation de combinaisons grâce au logiciel Fstat version 2.9.3.2 (Goudet, 2001) avec pour hypothèse nulle que les génotypes des différents loci sont indépendants.

Le logiciel Fstat v2.9.3.2 (Goudet, 2001) nous permet de calculer les statistiques F de Wright (1931) : Fis, Fst et Fit qui sont des paramètres basés sur les calculs d'hétérozygotie observées et attendues sous l'hypothèse d'Hardy-Weinberg à trois niveaux hiérarchiques différents. Le Fis représente la part de consanguinité des individus dans les sous populations, due au système de reproduction. Le Fst mesure la part relative de consanguinité des sous populations par rapport à l'ensemble des sous populations. Enfin, le Fit reflète la consanguinité des individus par rapport au total.

Nous utiliserons les estimateurs non biaisés « f » de Fis et « θ » de Fst (Weir & Cockerham, 1984). Les indices de Fis seront testés par population, par randomisation des allèles entre individus à l'intérieur d'une sous-population et les indices de Fst seront testés par paires de populations, par randomisation des allèles d'individus entre sous-populations. 5000 permutations ont été réalisées pour la détermination de chaque indice. Un Fis égal à 0 indique qu'il y a panmixie (reproduction au hasard), un Fis négatif révèle un excès en hétérozygotes et un Fis positif est le signe d'un déficit en hétérozygotes. De même, un Fst égal à 0 indique qu'il n'y a pas de différenciation génétique entre les populations étudiées, par opposition à un indice de Fst positif.

Pour le locus lié au sexe, B2B03, les mâles ont été codés comme données manquantes (0) pour le calcul du Fis et homozygotes pour les autres analyses réalisées.

Une analyse de variance moléculaire locus par locus (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) a été réalisée par ARLEQUIN (version 3.5.1.2) (Excoffier et al. 2005) afin de tester le regroupement géographique des populations.

L'isolement par la distance décrit la tendance des individus à trouver des partenaires et à se reproduire dans les populations proches plutôt que dans celles qui sont éloignées ce qui résulterait en l'augmentation progressive de la différenciation génétique en fonction de la distance géographique. L'isolement par la distance a été testée en utilisant un test de Mantel (1967) qui permet de tester la corrélation entre la distance génétique $F_{st} / (1 - F_{st})$ pour chaque paire de population avec la distance géographique les séparant. Cette analyse a été réalisée en utilisant le sous-programme Isolde contenu dans Genepop version 4.1 (Rousset, 2008).

Figure 2 : Réseau d'haplotypes pour le marqueur 16S

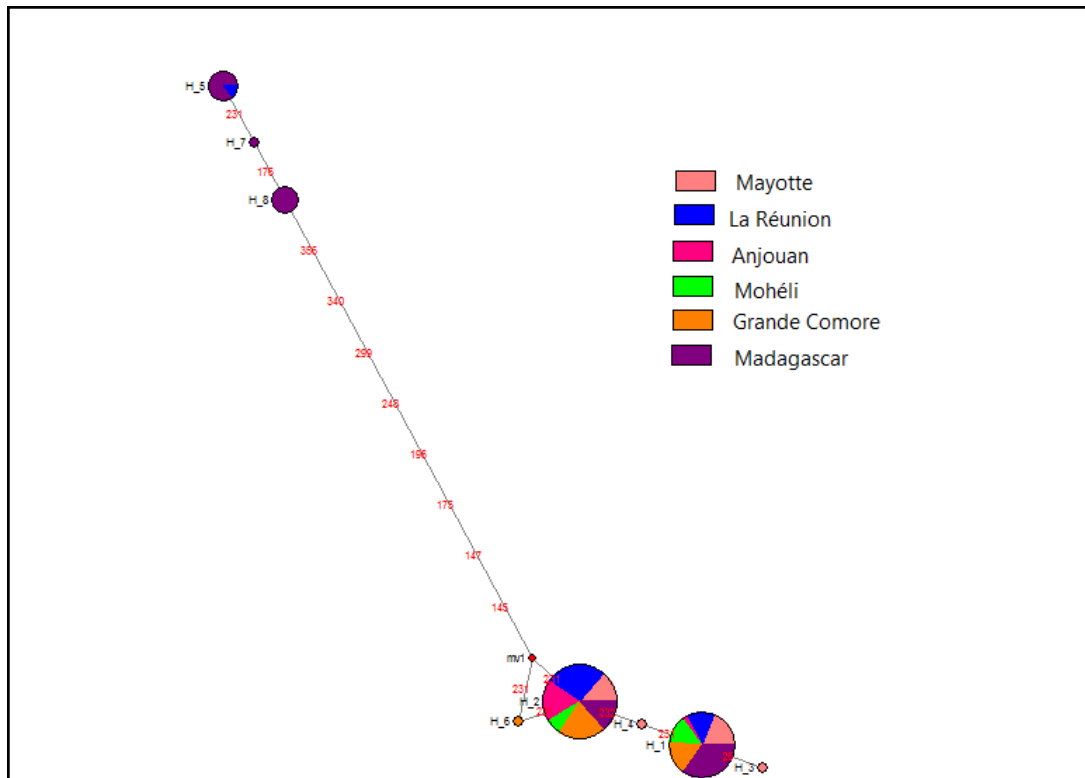
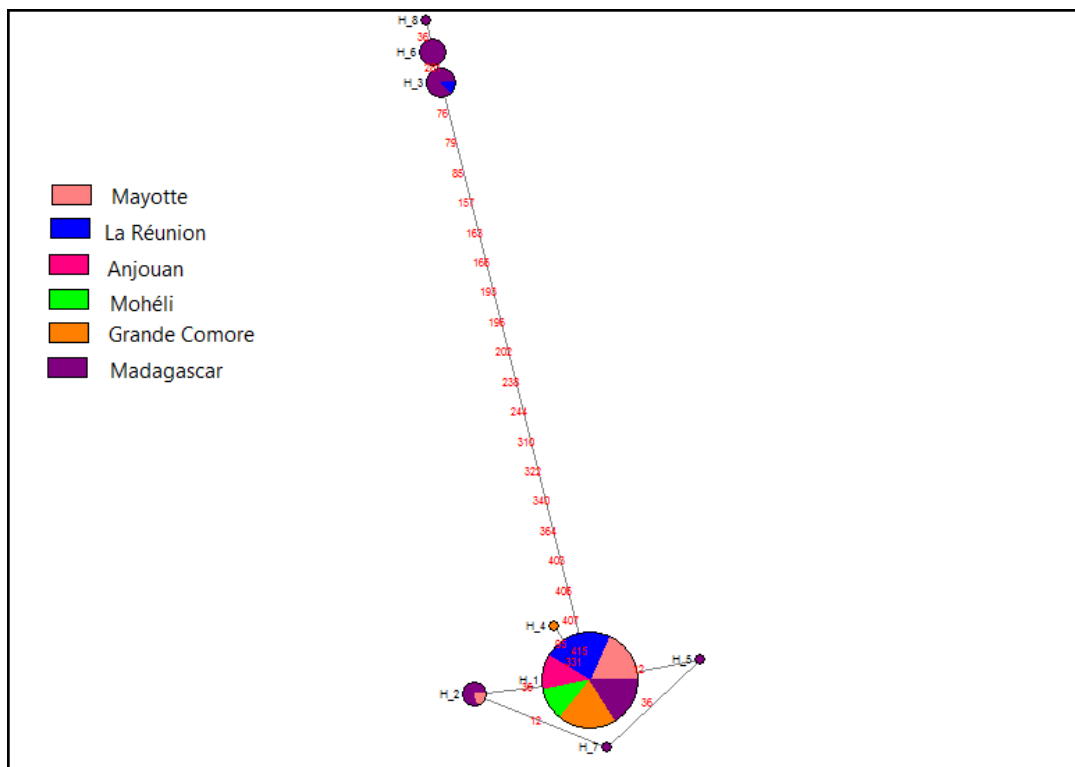


Figure 3 : Réseau d'haplotypes pour le marqueur Cytb



Résultats

Analyses mitochondriales

Diversité génétique :

L'analyse des marqueurs mitochondriaux semble indiquer une plus grande variabilité au sein des séquences de la Cytb que du 16S. En effet, il y a 24 sites polymorphes en Cytb (6%) contre seulement 12 sites polymorphes en 16S (2%) (Tableau 1). Huit haplotypes ont été mis en évidence pour les deux marqueurs. On retrouve deux haplotypes majoritaires en 16S et un seul haplotype majoritaire en Cytb. Trois haplotypes sont spécifiques à Madagascar pour le marqueur 16S: H5, H7 et H8 (avec une exception pour un individu de la Réunion pour l'haplotype 5). Pour la Cytb, six haplotypes sont spécifiques à Madagascar : H2 (avec une exception pour un individu de Mayotte), H3 (avec une exception pour un individu de la Réunion), H5, H6, H7 et H8 (Tableau 2). L'analyse de la connexion entre les différents haplotypes révèle deux groupes d'haplotypes distincts pour chacun des marqueurs (Figures 2 et 3). La seconde lignée est exclusivement constituée par les haplotypes propres à (H5, H7 et H8 en 16S et H3, H6 et H8 pour la Cytb)

La détermination de la diversité nucléotidique π et haplotypique H_d (Tableau 7), nous indique une forte diversité génétique sur l'ensemble des populations ($H_d=0.7$ en 16 S et 0.4 en Cytb). Cependant les plus fortes valeurs de H_d et de π sont observées à Madagascar. La diversité génétique est plus faible dans les îles des Comores (nombre d'haplotypes variant de 1 à 4) avec une absence de polymorphisme observée à Anjouan et Mohéli en Cytb.

Structure des populations :

Les statistiques de différenciation génétiques nous indiquent une différenciation significative sur l'ensemble des populations : $K_{st}^*(16S)=0.29941$ (p-value=0), $K_{st}^*(Cytb)=0.48360$ (p-value=0). Après correction de Bonferroni sur les tests réalisés entre paires de populations) on observe que les

Tableau 1 : Variabilité génétique au niveau des marqueurs mitochondriaux 16S et Cytb

Population	ADNr 16S				Cytb			
	NS	K	Hd \square SD	$\pi \pm \Sigma\Delta$	NS	K	Hd \square SD	$\pi \pm \Sigma\Delta$
Mayotte	3	1,181	0,657 \pm 0,080	0,00293 \pm 0,00037	1	0,133	0,133 \pm 0,112	0,00031 \pm 0,00026
La Réunion	11	1,895	0,503 \pm 0,103	0,00470 \pm 0,00222	19	2,111	0,111 \pm 0,096	0,00488 \pm 0,00423
Anjouan	2	0,444	0,222 \pm 0,166	0,00110 \pm 0,00083	0	0	0 \pm 0	0 \pm 0
Mohéli	2	1,071	0,536 \pm 0,123	0,00266 \pm 0,00061	0	0	0 \pm 0	0 \pm 0
Grde Com.	2	1,075	0,575 \pm 0,080	0,00267 \pm 0,00034	2	0,25	0,125 \pm 0,106	0,00058 \pm 0,00049
Madagascar	11	5,417	0,752 \pm 0,045	0,01344 \pm 0,00091	22	10,442	0,782 \pm 0,044	0,02411 \pm 0,00143
TOTAL	12	3,214	0,653\pm0,029	0,00798\pm0,00111	24	5,326	0,405\pm0,061	0,01230\pm0,00229

NS : nombre de sites variables ; K : nombre moyen de différences nucléotidiques

Hd : diversité haplotypiques ; Pi : diversité nucléotidique

Tableau 2 : Fréquences des haplotypes pour les marqueurs 16S et Cytb pour chaque population de l'océan Indien

16S		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	Total
Réunion	Saint Paul	5	12			1				18
Mayotte	Barakani	4	2	1						7
Mayotte	Dembeni	3	4		1					8
Anjouan		1	8							9
Mohéli		5	3							8
Grde. C.	Mitsamiouli	3	4				1			7
Grde. C.	Serehini	3	5							8
Madagascar	Mitsinjo	8	0							8
Madagascar	Manakara	0	1			6		1		8
Madagascar	Fianarana	3	3						2	8
Madagascar	Anjahambe	2	2						4	8
Total		37	44	1	1	7	1	1	6	97

CytB		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	Total
Réunion	Saint Paul	17		1						18
Mayotte	Barakani	6	1							7
Mayotte	Dembeni	8								8
Anjouan		9								9
Mohéli		8			1					9
Grde. C.	Mitsamiouli	7								7
Grde. C.	Serehini	8								8
Madagascar	Mitsinjo	5	2			1				8
Madagascar	Manakara	1		7						8
Madagascar	Fianarana	4	2				2			8
Madagascar	Anjahambe	2						1	1	4
Total		75	5	8	1	1	2	1	1	94

paires significatives sont observées entre des populations de Madagascar et les autres îles de l'Océan Indien (Tableaux 9 et 10).

L'analyse par AMOVA, testant la structuration géographique entre l'île de Madagascar et les îles de l'archipel des Comores (Tableau 6), se révèle non significative, seul le niveau intra population est significatif ($P < 0.05$).

Analyses microsatellites

Diversité génétique

Des difficultés d'amplifications au loci B2G02 ont générées trop de données manquantes. Les analyses ont donc été réalisées uniquement sur les 7 loci restant. L'analyse des profils génotypiques de chaque individu révèle un polymorphisme important pour les loci A02, B2B03 et B2C08 (11 à 14 allèles par locus) présentant une diversité génétique relativement élevée ($H_s > 0.6$). Les loci E04 et Cl6contig au contraire, semblent être monomorphes avec une faible diversité génétique ($H_s = 0.25$ et 0.10 respectivement).

Analyses intra-populations

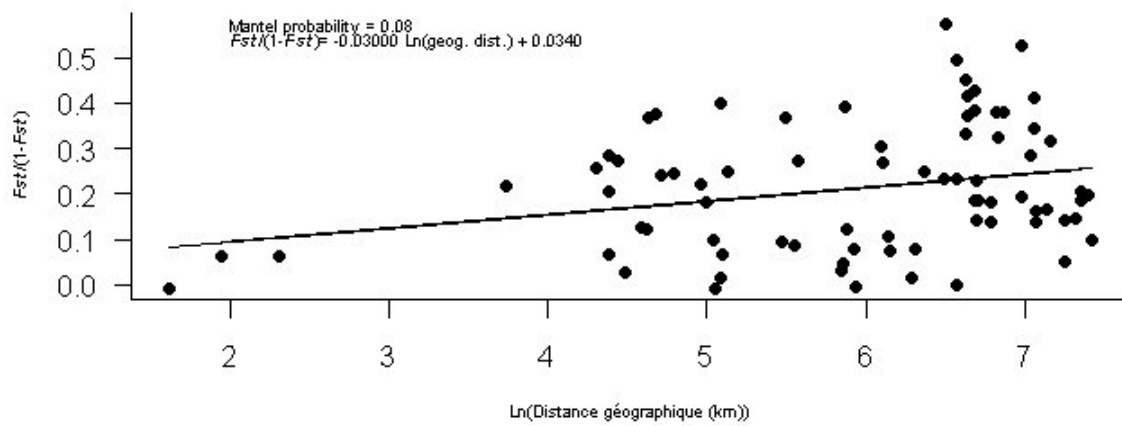
Les tests de déséquilibre de liaison révèlent une indépendance entre les différents loci, les p-values sont inférieures à la p-value ajustée 0.002381 au seuil de 5%.

L'analyse des Fis révèle un fort taux de déficit en hétérozygotes pour l'ensemble des loci ($Fis = 0.27$, p-value=0.0002) dû principalement aux loci B2B03 ($Fis = 0.778$, p-value<0.0002), B2C08 ($Fis = 0.424$, p-value<0.0002) et Cl6contig ($Fis = 0.711$, p-value<0.0002) (Tableau 5).

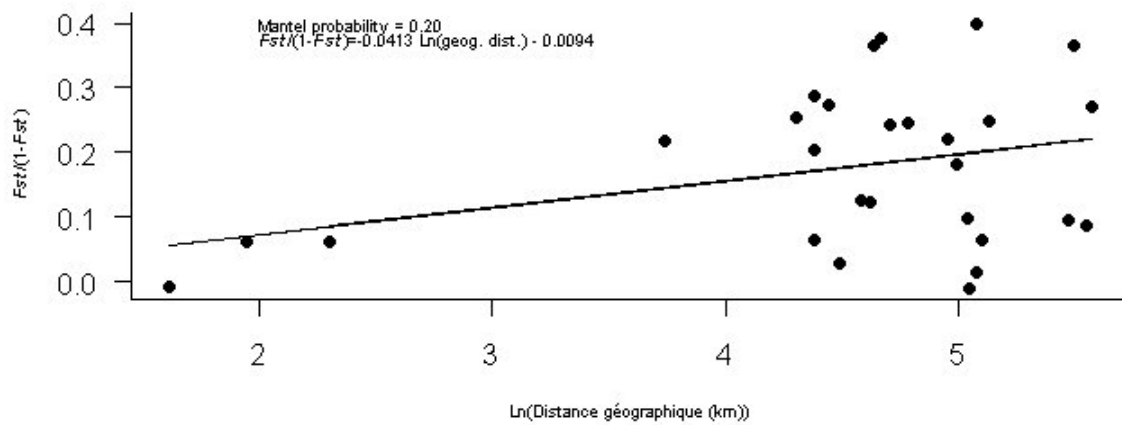
Un déficit en hétérozygotes étant provoqué par ces loci, nous avons recalculé l'indice du Fis en excluant les loci concernés (B2B03, B2C08 et Cl6contig), celui-ci s'avère être alors légèrement négatif : -0.033 (p-value=0.00096) suggérant un léger excès en hétérozygotes.

Figure 4 : Analyse de régression des $F_{st}/(1-F_{st})$ en fonction du \ln (distance géographique) entres toutes les populations de l’Océan Indien et entre Madagascar et l’archipel des Comores pour les loci microsattelites.

Tous les sites de collecte (13 sites)



Archipel des Comores (8 sites)



Structure des populations

Les tests d'isolement par la distance, réalisés entre l'ensemble des sites des îles de l'océan Indien révèle une corrélation positive entre la distance et la différenciation génétique bien que non significative ($P=0.08$), par contre l'analyse réalisée à plus petite échelle entre les îles de l'archipel des Comores se révèle non significative (Figure 4).

L'indice de F_{st} obtenu pour l'ensemble des populations est de 0.142 ($p\text{-value}<0,00064$) suggérant une différenciation génétique significative entre les populations. L'analyse des F_{st} par paires de populations révèle une différenciation significative entre la population de Fianarana à Madagascar et 3 sites dans l'archipel des Comores (2 sites sur l'île de Mohéli et 1 site sur l'île de Mayotte) (Tableau 6).

L'analyse des variances moléculaires locus par locus réalisée entre les îles de Madagascar et l'archipel des Comores, à partir des marqueurs microsatellites, n'a été effectuée qu'à partir de 6 loci, dû aux trop nombreuses données manquantes pour le locus B2C01. Les résultats se révèlent significatifs aux trois niveaux testés ($P<0.05$) (Tableau 7).

Tableau 3 : Kst* estimé à partir du marqueur 16S pour toutes les paires de populations (66 tests, après correction de Bonferroni : seuil de significativité à 5% P-value = 0.0007576)

	16S Kst*	La Saline les Hauts	La Saline Barrage	Barakani	Dembeni	Anjouan	Mohéli	Mitsamiouli	Serehini	Mitsinjo	Manakara	Fianarana	Anjahambe
Réunion	La Saline les Hauts												
Réunion	La Saline Barrage	-0,00728											
		0,515											
Mayotte	Barakani	-0,00166	0,06085										
		0,393	0,13										
Mayotte	Dembeni	0,03407	-0,0182	-0,03232									
		0,798	0,428	0,526									
Anjouan		0,043	-0,01732	0,2043	0,0864								
		0,23	0,608	0,028	0,146								
Mohéli		0,01169	0,07484	-0,06138	-0,02837	0,24394							
		0,29	0,17	1	0,625	0,051							
Grde. Com.	Mitsamiouli	-0,03951	-0,02346	-0,02479	-0,05587	0,06738	-0,01867						
		0,739	0,442	0,551	0,988	0,163	0,616						
Grde. Com.	Serehini	-0,04063	-0,04377	-0,01228	-0,06078	0,04039	-0,00446	-0,06114					
		0,673	0,669	0,611	1	0,3	0,619	1					
Madagascar	Mitsinjo	0,32048	0,49124	0,17152	0,34202	0,77398	0,17582	0,34721	0,41558				
		0,003	0,001	0,032	0,009	0	0,201	0,026	0,032				
Madagascar	Manakara	0,36655	0,58189	0,52636	0,54228	0,66607	0,56156	0,52807	0,5551	0,76353			
		0,021	0	0	0,002	0	0,001	0,001	0	0			
Madagascar	Fianarana	-0,03937	0,06387	0,00604	0,0057	0,12618	0,01513	0,00264	0,01195	0,20619	0,30819	0,33976	
		0,653	0,093	0,448	0,454	0,021	0,306	0,439	0,485	0,014	0,014	0,008	
Madagascar	Anjahambe	0,06598	0,2216	0,1554	0,16135	0,27177	0,17367	0,15345	0,16949	0,33976	0,21821	-0,01863	
		0,202	0,012	0,052	0,069	0,006	0,041	0,081	0,076	0,004	0,014	0,634	

Discussion

L'objectif de cette étude été de caractériser la diversité génétique des populations d'*Amblyomma variegatum* à travers les différentes îles de l'Océan Indien à l'aide de marqueurs mitochondriaux et microsatellites, ceci afin de déterminer la structuration des populations de tiques et leur circulation au sein de cette zone

Cette étude nous a permis de mettre en évidence une plus forte diversité génétique à Madagascar que dans les autres îles de l'Océan Indien, notamment dans l'archipel des Comores et une différenciation génétique assez marquée entre Madagascar et les autres îles mais plutôt faible entre les autres îles.

Variabilité génétique chez *A. variegatum*

Les résultats obtenus à l'aide des marqueurs mitochondriaux, révèlent une grande variabilité génétique au sein des populations de Madagascar mais relativement faible au sein des autres îles de l'océan Indien. En effet, avec une forte diversité nucléotidique π et haplotypique H_d ainsi qu'un D de Tajima positif, les populations de tique à Madagascar semblent être de grande taille et stables, la sélection naturelle favorisant la diversité génétique. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par S. Jacquet (2011) sur un plus grand nombre de populations à Madagascar. Dans les autres îles, les diversités nucléotidique π et haplotypique H_d sont relativement faibles et le D de Tajima est proche ou inférieur à 0, ce qui signe habituellement des populations en expansion après un goulot d'étranglement sévère.

Les réseaux d'haplotypes nous ont permis de différencier deux lignées. Ces deux lignées avaient été mises en évidence dans une étude à l'échelle mondiale (Huber, communication personnelle) et détectées comme étant en sympatrie à Madagascar (Jacquet, 2011). Ainsi, le groupe d'haplotypes majoritaire sur l'Océan Indien correspond à la lignée « mondiale » dont la répartition couvre toute l'aire de répartition de la tique, tandis que l'autre groupe, regroupant les haplotypes propres à Madagascar, correspond à la lignée dite de « l'Afrique de l'Est » présente en Afrique de l'Est et dans l'Océan Indien et dont la limite de répartition est limitée à l'Est par la Vallée du Rift. Ces deux lignées

Tableau 4 : Kst* estimé à partir du marqueur Cytb pour toutes les paires de populations (66 tests, après correction de Bonferroni : seuil de significativité à 5% P-value = 0.0007576)

	CytB Kst*	La Saline les Hauts	La Saline Barrage	Barakani	Dembeni	Anjouan	Mohéli	Mitsamiouli	Serehini	Mitsinjo	Manakara	Fianarana	Anjahambe
Réunion	La Saline les Hauts												
Réunion	La Saline Barrage	0,02597											
		-0,449											
Mayotte	Barakani	-0,01362	0,02597										
		-1	-0,457										
Mayotte	Dembeni	0,02597	NA	0,02597									
		0,481	NA	0,436									
Anjouan		0,04762	NA	0,04762	NA								
		0,421	NA	0,426	NA								
Mohéli		0,02597	NA	0,02597	NA	NA							
		0,461	NA	0,453	NA	NA							
Grde. Com.	Mitsamiouli	-0,00468	0	-0,02038	0	0,01923	0						
		0,747	1	1	1	0,473	1						
Grde. Com.	Serehini	0,02597	NA	0,02597	NA	NA	NA	0					
		0,451	NA	0,459	NA	NA	NA	1					
Madagascar	Mitsinjo	0,00812	0,0767	-0,04199	0,0767	0,09824	0,0767	0,02305	0,0767				
		0,347	0,182	0,797	0,195	0,081	0,193	0,328	0,212				
Madagascar	Manakara	0,50081	0,7619	0,69735	0,7619	0,77582	0,7619	0,69012	0,7619	0,64817			
		0,011	0,003	0	0	0	0,003	0,003	0,001	-0,001			
Madagascar	Fianarana	-0,0221	0,11266	0,04317	0,11266	0,13506	0,11266	0,07495	0,11266	0,03084	0,34513		
		0,381	0,069	0,342	0,072	0,031	0,066	0,081	0,092	0,481	0,001		
Madagascar	Anjahambe	0,19314	0,39814	0,33297	0,39814	0,4223	0,39814	0,34657	0,39814	0,31067	0,13748	0,06333	
		0,036	0,009	0,013	0,002	0,001	0,006	0,01	0,006	0,016	0,08	0,196	

auraient divergées en Afrique, le long de la barrière géographique créée par la vallée du Rift et auraient été mises en contact sur l'île de Madagascar grâce à plusieurs introductions successives d'animaux en provenance d'Afrique pour l'agriculture et le transport des marchandises.

Si l'on se réfère aux données archéologiques connues, les bovins auraient été présents à Madagascar dès le 5^{ème} -7^{ème} siècle, des os ayant été retrouvés sur des sites datant de cette période (Andrianaivoarivony, 1987). Le peuplement humain est intervenu au 7^{ème} siècle dans l'archipel des Comores, mais nous ne disposons pas à ce jour de données archéologiques sur l'introduction des bovins dans cette zone. Sur l'île Maurice, les bovins n'ont été introduits que bien plus tardivement au cours du 17^{ème}-18^{ème} siècle, de même pour La Réunion qui n'a été peuplée qu'à partir du 17^{ème} siècle.

Bien que la tique *A. variegatum* n'ait été décrite qu'en 1899 par Neumann à Madagascar (Barré, 1983), nos résultats génétiques laissent à penser que l'introduction de la tique pourrait être bien plus ancienne à Madagascar que dans les autres îles de l'Océan Indien et peut-être concomitante à l'introduction des bovins dans cette île. Cette introduction plus ancienne, ainsi que des réintroductions successives de tiques depuis l'Afrique de l'Est auront conduit à la plus forte diversité génétique que nous observons. Une situation similaire a été montrée pour le moustique *Ae. aegypti* à Madagascar (Delatte et al. 2011). A l'inverse la tique a certainement été introduite plus récemment dans les autres îles de l'Océan Indien. Elle n'a été décrite qu'en 1949 par Gillard à La Réunion (Barré, 1983). Une série de goulots d'étranglements, liés à différents facteurs comme un faible nombre de tiques introduites, moins de réintroductions ainsi que des traitements acaricides ont pu générer des populations de plus faible taille plus sujettes à la dérive génétique conduisant à la fixation de certains allèles comme on a pu l'observer pour certains loci microsatellites aux Comores notamment.

S Jacquet (2011) avait montré que la lignée « mondiale » avait une distribution plus étendue à Madagascar alors que la lignée « Afrique de l'Est » se cantonnait aux zones les plus pluvieuses de l'île et avait émis l'hypothèse que les tiques de la lignée mondiale auraient une plus grande plasticité écologique leur permettant de se maintenir dans des conditions plus variées. Ceci pourrait également expliquer la prédominance des tiques appartenant à la lignée mondiale dans les autres îles de l'Océan Indien.

Tableau 5 : Test de l'équilibre de Hardy-Weinberg aux loci microsatellites. Les valeurs de Fis pour lesquelles la p-value est inférieure à 0.05 sont représentés en gras.

	A02		B2A05		B2B03		B2C01		B2C08		C16		E04		All	
	Fis	P-value	Fis	P-value	Fis	P-value	Fis	P-value	Fis	P-value	Fis	P-value	Fis	P-value	Fis	P-value
Saint-Paul																
Réunion	-0.078	0.8797	0.000	1.0000	1.000	0.0005	-0.496	1.0000	0.332	0.0005	0.792	0.0011	0.662	0.0187	0.258	0.0005
Barakani																
Mayotte	-0.063	0.7978	0.206	0.2060	0.714	0.0005	-0.576	1.0000	0.422	0.0005	NA	NA	-0.070	1.0000	0.222	0.0005
Dembeni																
Mayotte	0.380	0.0170	0.647	0.0637	NA	NA	-0.200	1.0000	0.483	0.0368	1.000	0.0396	0.542	0.0071	0.439	0.0005
Bambao																
Anjouan	-0.121	0.8379	0.131	0.3077	0.500	0.0005	NA	NA	0.671	0.0005	-0.011	1.0000	-0.013	1.0000	0.362	0.0005
Tsembehou																
Anjouan	-0.031	0.7005	-0.500	1.0000	NA	0.0005	NA	NA	0.355	0.0253	NA	NA	NA	NA	0.181	0.0489
Fomboni																
Mohéli	0.158	0.1077	0.028	0.5005	0.475	0.0011	-0.106	0.8714	0.301	0.0044	1.000	0.0159	NA	NA	0.240	0.0005
Djandro																
Mohéli	-0.150	0.9489	0.075	0.3918	NA	0.0005	-0.145	0.8698	0.392	0.0011	NA	NA	NA	NA	0.196	0.0016
Mitsamiouli																
Grde. Com.	0.106	0.3192	0.167	0.3258	NA	0.0005	NA	NA	0.607	0.0011	NA	NA	NA	NA	0.493	0.0005
Serehini																
Grde. Com.	-0.099	0.8802	0.047	0.4665	NA	0.0005	-0.393	0.9901	0.349	0.0082	1.000	0.0319	NA	NA	0.241	0.0005
Mitsinjo																
Madagascar	0.014	0.5654	0.000	1.0000	NA	0.0005	0.090	0.4962	0.346	0.0011	0.000	1.0000	-0.065	1.0000	0.283	0.0005
Manakara																
Madagascar	-0.043	0.7654	-0.059	1.0000	1.000	0.0005	0.015	0.7341	0.439	0.0170	NA	NA	NA	NA	0.298	0.0027
Fianarana																
Madagascar	-0.274	0.9769	-0.171	1.0000	1.000	0.0005	-0.203	0.9170	0.346	0.0011	NA	NA	0.254	0.2901	0.223	0.0005
Anjahambe																
Madagascar	-0.060	0.7753	-0.021	1.0000	0.759	0.0005	0.257	0.1379	0.618	0.0005	NA	NA	NA	NA	0.379	0.0005
Total	-0,026	0.79140	0.059	0.15020	0,778	<0.00020	-0.196	0.99860	0.424	<0.00020	0.711	<0.00020	0.224	0.00520	0.274	<0.00020

Structuration au sein des populations

Un déficit en hétérozygotes est observé pour la majorité des populations mais est essentiellement causé par certains loci. Ce déficit est très certainement dû à la présence d'allèles nuls, fréquemment observés dans les études microsatellites (Callen et al. 1993). Les allèles nuls correspondent à des mutations au niveau des sites de fixation des amorces empêchant leur fixation. Il en découle que les individus homozygotes ne sont pas amplifiés et que les individus hétérozygotes sont faussement détectés comme des homozygotes. Ces allèles nuls peuvent avoir un impact non négligeable et leur incidence avoisinerait les 30% (Callen et al, 1993). Des allèles nuls ont bien été mis en évidence pour nos loci sur *A. variegatum* par S. Jacquet (2011). Ce déficit étant provoqué par un certain nombre de loci, nous avons recalculé l'indice Fis en excluant ces loci (B2B03, B2C08 et C16contig), celui-ci s'avère être alors légèrement négatif, suggérant un léger excès en hétérozygotes, ce qui est attendu dans les populations sexuées panmictiques.

Structuration entre populations

La structure des populations évolue dans le temps et dans l'espace sous l'influence des variations de l'environnement abiotique, trophique et social. Ainsi, il existe un lien fort entre la structure des populations et l'histoire de vie.

Nos résultats indiquent une différenciation génétique significative sur l'ensemble populations que nous avons étudiées. Cependant, l'analyse des Fst et Kst* par paires montre peu de différenciation significatives. Ceci semble montrer l'existence de flux géniques entre populations de tiques des différentes îles. En effet, le bétail de La Réunion et de Maurice a été essentiellement importé de Madagascar, il en va de même pour les Comores jusque dans les années 2000. Lorsque l'on regarde les paires significativement différenciées on observe que ce sont des paires concernant essentiellement Madagascar avec l'archipel des Comores. Les AMOVA testant la différenciation entre Madagascar et les îles des Comores ne se révèlent significatives que pour les marqueurs microsatellites. Ceci semble montrer moins de flux génique récent entre ces deux zones. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que si les Comores importaient leurs bovins de Madagascar, elles les importent depuis une dizaine d'année de Tanzanie. Le test d'isolement par la distance démontre que la distance géographique entre

Tableau 6 : Après correction de Bonferroni, la valeur seuil est de 0,00064. Les valeurs de Fst pour lesquelles la p-value est inférieure à la valeur seuil sont représentés en gras.

Fst	Saint Paul	Barakani	Dembeni	Bambao	Tsembehou	Fomboni	Djandro	Mitsamiouli	Serehini	Mitsinjo	Manakara	Fianarana	Anjahambe
Saint Paul (Réunion)	0.0000												
Barakani (Mayotte)	0.0476 (p=0,31410)	0.0000											
Dembeni (Mayotte)	0.1249 (p=0,17115)	0.0572 (p=0,02564)	0.0000										
Bambao (Anjouan)	0.1280	0.1110	0.2682	0.0000									
Tsembehou (Anjouan)	0.1261	0.1089	0.2738	-0.0089	0.0000								
Fomboni (Mohéli)	0.1559 (p=0,00897)	0.0609 (p=0,00256)	0.1990 (p=0,00769)	0.2151	0.2227	0.0000							
Djandro (Mohéli)	0.1703 (p=0,01859)	0.0897 (p=0,00128)	0.2857 (p=0,1731)	0.1696	0.2032	0.0573 (p=0,00897)	0.0000						
Mitsamiouli (Grde. Com.)	0.0903	0.0796	0.2135	0.0139	-0.0100	0.1953	0.1981	0.0000					
Serehini (Grde. Com.)	0.1652 (p=0,06667)	0.0859 (p=0,01474)	0.2681 (p=0,06923)	0.1540	0.1804	0.0609 (p=0,01090)	0.0269 (p=0,24551)	0.1780	0.0000				
Mitsinjo (Madagascar)	0.2212	0.1077	0.2809	0.2333	0.2110	0.0695	0.0954	0.1996	0.0710	0.0000			
Manakara (Madagascar)	0.2500 (p=0,10641)	0.1621 (p=0,01154)	0.3452 (p=0,09744)	0.2926	0.2554	0.1220 (p=0,00128)	0.1392 (p=0,00385)	0.2409	0.1410 (p=0,03077)	-0.0023	0.0000		
Fianarana (Madagascar)	0.2752 (p=0,02308)	0.1880 (p=0,00064)	0.3308 (p=0,01538)	0.3002	0.2784	0.1566 (p=0,00064)	0.1873 (p=0,00064)	0.2441	0.1533 (p=0,00192)	0.0304	0.0711 (p=0,00513)	0.0000	
Anjahambe (Madagascar)	0.2711 (p=0,00256)	0.1878 (p=0,04744)	0.3648 (p=0,04359)	0.3113	0.2935	0.1235 (p=0,00128)	0.1551 (p=0,00128)	0.2746	0.1206 (p=0,01603)	-0.0039	0.0156 (p=0,37500)	0.0433 (p=0,00192)	0.0000

populations n'est pas liée à la différenciation génétique. La dispersion des tiques ne s'effectue donc pas de proche en proche autour du point d'introduction mais elle est liée à d'autres facteurs comme la dispersion de ses hôtes. Barré et Uilenberg (2010) ont montré que les hôtes bovins étaient les principaux instruments de la dispersion d'*A. variegatum*, lui permettant ainsi de coloniser des territoires éloignés comme la Caraïbe par des importations de bovins depuis l'Afrique de l'Ouest. Outre les bovins, il a été montré que des oiseaux migrateurs pouvaient contribuer à la dispersion des stades immatures (Barré et Uilenberg, 2010). Cependant, on observe que la différenciation génétique augmente graduellement avec la distance géographique bien que non significativement, ce qui laisserait quand même penser que les échanges sont plus fréquents entre îles proches qu'entre zones géographiquement plus éloignées.

L'image complexe fournie par ces résultats ne peut pas être expliquée par les seuls mouvements de bovins. La différenciation génétique des populations résulte également d'autres facteurs, comme le type de paysage, les facteurs climatiques ou encore les pratiques d'élevage (partage des pâtures, usages d'acaricides, achats de bovins...). A Madagascar, il a été mis en évidence une influence significative du type de paysage, du partage des pâtures par des animaux provenant d'autres villages, du niveau d'infestation des animaux ainsi que de l'application de traitements acaricides (Jacquet, 2011). Les questionnaires d'enquête remplis lors des collectes des tiques et rassemblant ces informations devront encore être analysés.

Perspectives pour la lutte anti-vectorielle

Cette étude montre l'importance de l'hôte bovin dans la dispersion de la tique et notamment dans sa circulation entre les îles. Il apparaît donc important de surveiller ces échanges de bétail et de recommander une surveillance vétérinaire et un détiquage des bovins avant toute importation, à l'embarquement dans le bateau ou au débarquement. Les îles les plus isolées génétiquement et présentant des populations de faible taille efficace pourront être la cible d'actions ciblées, visant au contrôle voire à l'éradication de la tique sur celles-ci. Cependant pour pouvoir affiner ces recommandations des études à plus fine échelle devront être menées.

Tableau 7: Résultats de l'AMOVA locus par locus réalisée entre Madagascar et les îles de l'Océan Indien.

	Source de variation	d. f.	Somme des carrés	Composants de Variance	Pourcentage de variation	Indice de fixation	P-value
16S	Inter-groupes	1	32.035	0.73017	34.43	$F_{CT}=0.34435$	0.15347
	Intra-groupes- Inter-populations	4	3.692	-0.03865	-1.82	$F_{SC}=-0.02780$	0.17107
	Intra-population	93	132.889	1.42891	67.39	$F_{ST}=0.32612$	0.00000
	Total	98	168.616	2.12044			
Cyt b	Inter-groupes	1	74.086	1.77241	48.95	$F_{CT}=0.48948$	0.15836
	Intra-groupes	4	0.914	-0.13613	-3.76	$F_{SC}=-0.07364$	0.89443
	Intra-population	92	182.597	1.98474	54.81	$F_{ST}=0.45188$	0.00000
	Total	97	258.316	3.62103			
Microsatellites	Inter-groupes		38.812	0.18897	10.79220	$F_{CT}=0.10792$	0.00000
	Intra-groupes		71.558	0.18527	10.58101	$F_{SC}=0.11861$	0.00000
	Intra-population		546.381	1.37676	78.62679	$F_{ST}=0.21373$	0.00000
	Total		656.751	1.75101			

Conclusion

L'étude de la diversité génétique et de la structuration génétique, à l'aide de marqueurs mitochondriaux et microsatellites, sur les populations d'*A. variegatum* de l'Océan Indien nous a permis d'explorer l'histoire de l'introduction de la tique dans cette zone et mettre en évidence l'influence de l'hôte bovin dans mouvements de tiques entre les îles. L'étude des autres facteurs pouvant influencer sur la structuration nous permettra d'avoir une meilleure image de la situation. Mis en parallèle avec les résultats des études sur la diversité génétique d'*Erlchia ruminantium*, cette étude permettra de mieux comprendre l'épidémiologie de la cowdriose et de définir des stratégies de lutte efficaces contre cette maladie.

Bibliographie

- Andrianaivoarivony R. (1987-1988). Note sur la conservation des os dans le sol. Nouveau Centre d'Art Archéo. 5: 20-21.
- Bandelt HJ., Forster P., Röhl A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16: 37-48.
- Barré N., Morel PC. (1983). Tiques (Acariens, Ixodoidea) des Mascareignes (Océan Indien) et maladies transmises. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*. 36: 371-317.
- Barré N., Uilenberg G. (2010). Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. 29:149-160.
- Bos R., Mills A. (1987). Financial and economic aspects of environmental management for vector control. *Parasitology*. 3:160-163.
- Callen DF., Thompson AD., Hilary YS., Phillips A., Richards R, Mulley J C., Sutherland GR (1993). Incidence and Origin of "Null" Alleles in the (AC)_n Microsatellite Markers. *American Journal of Human Genetics*. 52:922-927.
- Corn JL., Barré N., Thiebot B., Creekmore TE., Garris GI., Nettles VF. (1993). Rôle potentiel des garde-boeufs, *Bubulcus ibis* (Ciconiformes : Ardeidae) dans la dissémination d'*Amblyomma variegatum* (Acari : Ixodidae) dans l'est des Caraïbes. *Journal of Medical Entomology*. 30: 1029-1037.
- Delatte H., Bagny L., Brengue C., Bouetard A., Paupy C., Fontenille D. (2011). The invaders: phylogeography of dengue and chikungunya viruses_Aedes_vectors, on the South West islands of the Indian Ocean. *Infection, Genetics and Evolution*. 11: 1769-1781
- De Deken R., Martin V., Saido A., Madder M., Brandt J., Geysen D. (2006). An outbreak of East Coast Fever on the Comoros: A consequence of the import of immunised cattle from Tanzania? *Veterinary Parasitology*. 4 : 245-253.
- Edgar RC. (2004). Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32: 1792-1797.
- Excoffier L., Smouse P., and Quattro J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479-491.
- Excoffier L., Laval G., and Schneider S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1:47-50.

- Gouy M., Guindon S., Gascuel O. (2010). SeaView version 4 : a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*. 27: 221-224.
- Huber K., Loan LL., Hoang TH., Tien TK., Rodhain F., Failloux AB. (2002). Temporal genetic variation in *Aedes aegypti* populations in Ho Chi Minh City (Vietnam). 89: 7-14.
- Jarne P., Lagoda P. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* .11: 424-429.
- Jacquet S. (2011). Etude de la structure génétique d'*Amblyomma variegatum*, tique vectrice d'*Ehrlichia ruminantium* à Madagascar. Mémoire de Master 2 « Biologie Géoscience Agro ressources Environnement », Université de Montpellier II.
- Jongejans F., Uilenberg G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*. 129: S3-S14.
- Lehmann T., Hawley WA., Collins FH. (1996). An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci. *Genetics*. 144: 1155-1163.
- Librado P., Rozas J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451-1452.
- Mantel N. (1967). The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Researches*. 27: 209-220.
- Nei M. (1973). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Peter TF., BurrIDGE MJ., Mahan SM. (2002). *Ehrlichia ruminantium* infection (heartwater) in wild animals. *Trends in Parasitology*. 18: 214-218.
- Rodhain F. *Les Maladies à vecteurs*, coll. Que sais-je ?, n°3494, P.U.F., Paris, 1999
- Rousset F. (2008). Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*. 8: 103-106.
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. (1994). Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*. 87: 651-701.
- Snelson, J.T. (1975). Animal ectoparasites and disease vectors causing major reductions in world food supplies. *Food and Agriculture Organization of the United Nations Plant Protection Bulletin*. 13: 103-114.

- Solano P., Kaba D., Ravel S., Dyer NA., Sall B., Vreysen MJ., Seck MT., Darbyshir H., Gardes L., Donnelly MJ., De Meeûs T., Bouyer J. (2010). Population genetics as a tool to select tsetse control strategies: suppression or eradication of *Glossina palpalis gambiensis* in the Niayes of Senegal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 4: e692.
- Tajima F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*. 123: 585-595.
- Young AS., Grocock CM., Kariuki DP. (1988). Integrated control of ticks and tick-borne diseases of cattle in Africa. *Parasitology*. 403-432
- Yssouf_A et al (2011). Colonization of Grande Comore Island by a lineage of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Parasitology Vectors*.17: 34-38.
- Walker JB. (1987). The tick vectors of *Cowdria ruminantium* (Ixodoidea, Ixodidae, genus *Amblyomma*) and their distribution. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Researches*.54: 353-379.
- Weir BS., Cockerham CC. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38: 1358-1370.

Liste des figures et tableaux

- Figure 1 : Carte d'échantillonnage
- Figure 2 : Réseau d'haplotypes pour le marqueur 16S
- Figure 3 : Réseau d'haplotypes pour le marqueur Cytb
- Figure 4 : Analyse de régression des $F_{st}/(1-F_{st})$ en fonction du \ln (distance géographique) entre toutes les populations de l'Océan Indien et entre Madagascar et l'archipel des Comores pour les loci microsatellites.
- Tableau 1 : Variabilité génétique au niveau des marqueurs mitochondriaux 16S et Cytb
- Tableau 2 : Fréquences des haplotypes pour les marqueurs 16S et Cytb pour chaque population de l'océan Indien
- Tableau 3 : K_{st}^* estimé à partir du marqueur 16S pour toutes les paires de populations (66 tests, après correction de Bonferroni : seuil de significativité à 5% P -value = 0.0007576)
- Tableau 4 : K_{st}^* estimé à partir du marqueur Cytb pour toutes les paires de populations (66 tests, après correction de Bonferroni : seuil de significativité à 5% P -value = 0.0007576)
- Tableau 5 : Test de l'équilibre de Hardy-Weinberg aux loci microsatellites. Les valeurs de F_{is} pour lesquelles la p -value est inférieure à 0.05 sont représentés en gras.
- Tableau 6 : Après correction de Bonferroni, la valeur seuil est de 0,00064. Les valeurs de F_{st} pour lesquelles la p -value est inférieure à la valeur seuil sont représentés en gras.
- Tableau 7: Résultats de l'AMOVA locus par locus réalisée entre Madagascar et les îles de l'Océan Indien.
- Annexe 1 : Conditions d'amplification des marqueurs mitochondriaux
- Annexes 2 : Conditions d'amplification des marqueurs microsatellites

Annexe 1: Conditions d'amplification des marqueurs mitochondriaux

Amorces :

16S rRNA gène (ref. Black IV, WC & Piesman J. (1994). Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 10034-10038)

16S+1 5'-CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG-3'

16S-1 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT-3'

Cytb (ref Simon et al. (1994). Annals of the Entomological Society of America 87: 651-701.

Amorces modifiées par Karine Huber)

CB-N-11367mo 5'-ATTACCCCCCTAATTTATTAGGAAT-3'

CB-J-10933mo 5'-TATATTTTACCCTGAGGGCAAATATC-3'

Mix PCR :

Utilisation du FailSafe™ PCR System (Epicentre Biotechnologies) avec le Premix C.

Pour 1 réaction PCR :

Prémix C (2X)	1X	25 µL
Amo. 16S+1 ou CB-N(10 µM)	10 pmol	1 µL
Amo. 16S-1 ou CB-J(10 µM)	10 pmol	1 µL
Taq (2.5 U/µL)	1.25 U	0.5 µL
ADN		2 µL
Eau qsp		50 µL

Conditions d'amplification 16S :

95°C	5 min	} 10 cycles
92°C	1 min	
48°C	1 min	
72°C	1 min 30s	
92°C	1 min	} 32 cycles
54°C	35s	
72°C	1 min 30s	
72°C	7 min	
Hold +8°C		

Conditions d'amplification Cyt b :

95°C	5 min	} 10 cycles
92°C	1 min	
52°C	1 min	
72°C	1 min 30s	
92°C	1 min	} 30 cycles
58°C	35s	
72°C	1 min 30s	
72°C	7 min	
Hold +8°C		

Annexes 2 : Conditions d'amplification des marqueurs microsatellites

Loci	Type de répétition	Forward primer	Reverse primer	Taille fragment
E04	(CA) ₆	AGACGGGGCCATACCTAGA	GATTTCTGTTGCCACTGC	107
Cl6Contig	(TAAC) ₃	GAGGGGCAACCTGTAAAC	TGCACTCTAACGAACTGG	211
B2A05	(TG) ₇	TCCCTACTGCTCATTGGA	AAGCGAAACCAGGTAAGG	211
A02	(CA) ₆ (AATA) ₃	ATAGGGATTTGCCCTCAC	CTTGGGTAGCACAACCTG	214
B2B03	(AC) ₇	TACGTGTCCCTGTGCAT	CCCATTCTGTCCAGTTG	158
B2C01	(TG)(CGTG) ₄	TTCCAGGGTGCTACATGA	CTTCACGGCGCTAGTAAT	264
B2C08	(CA) ₇	GGTGTACGGTTTTGGTA	GCGATACATGCTCAATGC	240

MIX 1

	Concentration mère	Concentrations réaction	Volume pour 1 réaction
Tampon	10X	1X	2 µL
dNTP	2,5 mM	60 µM	0,48 µL
Amorce M13F	10 µM	0,16 µM	0,32 µL
Amorce R	10 µM	0,2 µM	0,4 µL
M13 Dye	10 µM	0,2 µM	0,4 µL
Taq	5U/ µL	0,5U	0,1 µL
ADN			adn>2ng/µl : 2 µL adn<2ng/µl : 4µl
Eau		qsp 20 µL	14,3 µL

MIX 2

	Concentration mère	Concentrations réaction	Volume pour 1 réaction
Tampon	10X	1X	2 µL
MgCl ₂	25 mM	1,2 mM	0,96 µL
dNTP	2,5 mM	60 µM	0,48 µL
Amorce M13F	10 µM	0,16 µM	0,32 µL
Amorce R	100 µM	0,2 µM	0,4 µL
M13 Dye	10 µM	0,2 µM	0,4 µL
Taq	5U/ µL	0,5U	0,1 µL
ADN			adn>2ng/µl : 2 µL adn<2ng/µl : 4µl
Eau		qsp 20 µL	13,34 µL

MIX 3

	Concentration mère	Concentrations réaction	Volume pour 1 réaction
Tampon	10X	1X	2 µL
MgCl ₂	25 mM	2 mM	1,6 µL
dNTP	2,5 mM	60 µM	0,48 µL
Amorce M13F	10 µM	0,16 µM	0,32 µL
Amorce R	10 µM	0,2 µM	0,4 µL
M13 Dye	10 µM	0,2 µM	0,4 µL
Taq	5U/ µL	0,5U	0,1 µL
ADN			adn>2ng/µl : 2 µL adn<2ng/µl : 4µl
Eau		qsp 20 µL	12,7 µL

Conditions d'amplification microsatellites

Loci	Mix	denat 95	95°C	Tdown	Tdown durée	72°C	Nb cycle tdown	95°C	Ta	Ta durée	72°C	Nb cycles	Elong 72°C
E04	3	5 min	1 min	62°C-55°C, 0,7°C/cycle	1 min	1 min	10	1 min	55°C	1 min	1 min	25	5 min
Cl6Contig	3	5 min	1 min	62°C - 55°C, 0,7°C/cycle	1 min	1 min	10	1 min	55°C	1 min	1 min	25	5 min
B2A05	2	5 min	1 min	63°C - 56°C, 0,7°C/cycle	1 min	1 min	10	1 min	56°C	1 min	1 min	25	5 min
A02	3	5 min	1 min	62°C - 55°C, 0,7°C/cycle	1 min	1 min	10	1 min	55°C	1 min	1 min	25	5 min
B2B03	1	5 min	1 min	63°C - 56°C, 0,7°C/cycle	1 min	1 min	10	1 min	56°C	1 min	1 min	25	5 min
B2C01	3	5 min	1 min	66°C - 59°C, 0,7°C/cycle	1 min	1 min	10	1 min	59°C	1 min	1 min	25	5 min
B2C08	2	5 min	1 min	66°C - 59°C, 0,7°C/cycle	1 min	1 min	10	1 min	59°C	1 min	1 min	25	5 min

Résumé

La cowdriose est une rickettsiose aiguë des ruminants provoquée par la bactérie *Ehrlichia ruminantium*, principalement transmise par la tique *Amblyomma variegatum*. L'objectif de ce travail a été de caractériser la diversité génétique des populations d'*Amblyomma variegatum* à travers les différentes îles de l'Océan Indien à l'aide de marqueurs mitochondriaux et microsatellites, ceci afin de déterminer la structuration des populations de tiques et leur circulation au sein de cette zone. Cette étude nous a permis de mettre en évidence une plus forte diversité génétique à Madagascar que dans les autres îles de l'Océan Indien, notamment dans l'archipel des Comores et une différenciation génétique assez marquée entre Madagascar et les autres îles mais plutôt faible entre les autres îles. Cette structure est probablement influencée par l'interaction complexe de différents facteurs, en particulier les mouvements de bovins. A terme, cette étude permettra de mieux comprendre l'épidémiologie de la cowdriose.

Abstract

Cowdriosis is a tick-borne disease of ruminants caused by *Ehrlichia ruminantium* and transmitted by the hard tick *A. variegatum*. The aim of this study was to investigate the genetic diversity of the tick populations in the Indian Ocean area, and to determine their population genetic structure by analyzing mitochondrial and microsatellite markers. Our results show a higher genetic diversity in Madagascar whereas a lower genetic diversity is observed in the other islands and a genetic differentiation between Madagascar and the other islands. This structure is probably shaped by the complex interaction of different factors but mainly by cattle displacements. This study will provide a better understanding of the epidemiology of the cowdriosis.

Mots clé : *Amblyomma variegatum*, *Ehrlichia ruminantium*, vecteur, génétique de populations, microsatellites, ADN mitochondrial.