

Divergence génétique

DIVERGENCE GÉNÉTIQUE CHEZ LES MOULES D'EAU DOUCE *UNIO DURIEUI* ET *UNIO RAVOISIERI* (MOLLUSQUES : BIVALVES : UNIONIDES) DE L'OUED DOUIMISS (TUNISIE)

par

Chiheb FASSATOUI¹, Leila HMIDA^{1,2}, Eya BELAIBA³,
Amel BEN REJEB JENHANI¹ et Mohamed Salah ROMDHANE¹

La divergence génétique entre les espèces de moule d'eau douce a été examinée à l'aide de marqueurs allozymiques. Les échantillons ont été collectés au mois d'avril 2012 au niveau de l'Oued Douimiss, situé dans le bassin versant de l'Ichkeul (nord de la Tunisie). Après identification morphologique, l'étude a été portée sur deux espèces de moule d'eau douce : *Unio ravoisieri* et *Unio durieui*. Neuf systèmes enzymatiques codés par 11 loci ont été exploités pour caractériser la diversité et la divergence génétique entre les deux espèces. L'analyse de la diversité génétique a défini un monomorphisme allozymique extensif, mais comparable à de nombreuses espèces en danger de la famille des Unionidés. Le taux d'hétérozygotie moyenne attendue non biaisée (H_{nb}) a été très faible, H_{nb} moyenne sur les loci est de 0,009 chez *Unio ravoisieri* et de 0,010 chez *Unio durieui*. La vérification de l'équilibre de Hardy-Weinberg par le test exact n'a montré aucun écart à la situation de la panmixie. Des différences dans les profils enzymatiques

1. Unité de Recherche Écosystèmes et Ressources Aquatiques (UR13AGRO1), Institut National Agronomique de Tunisie, Université de Carthage, 43, avenue Charles Nicolle, Cité Mahrajène 1082, Tunis, Tunisie.

2. Département de Biotechnologie, Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, Université de Monastir, Avenue Taher Haddad, 5000 Monastir, Tunisie.

3. Faculté des Sciences Mathématiques, Physiques et Naturelles de Tunis, Université de Tunis El Manar, Campus Universitaire Tunis El Manar, 2092 Tunis, Tunisie.

Auteur correspondant : fassatouichiheb@yahoo.fr.

Bulletin de la Société zoologique de France 140 (2)

ont été détectées entre *Unio ravoisieri* et *Unio durieui* avec la mise en évidence de plusieurs loci diagnostiques. La distance génétique non biaisée de Nei entre les deux espèces a été de 0,588 soutenant ainsi le niveau de la divergence à l'échelle spécifique.

Mots-clés : Unionidés, isozymes, loci diagnostiques, divergence génétique, bassin de l'Ichkeul.

Genetic divergence between the freshwater mussels *Unio durieui* and *Unio ravoisieri* (Mollusca: Bivalvia: Unionidae) in the Douimiss River (Tunisia)

Genetic divergence between two freshwater mussel species, *Unio ravoisieri* and *Unio durieui*, was examined using allozyme markers. Samples were collected during April 2012 from the Douimiss River of the Ichkeul watershed, located in northern Tunisia. Nine enzyme systems encoded by 11 loci were used to characterize genetic diversity and genetic divergence between the two species. Analysis of genetic diversity defined an extensive allozyme monomorphism, comparable to that of several threatened species of the family Unionidae. The mean unbiased expected heterozygosity (H_{nb}) was very low, the mean H_{nb} over loci being 0.009 for *Unio ravoisieri* and 0.010 for *Unio durieui*, and the verification of Hardy-Weinberg equilibrium by the exact test showed no significant deviation from panmixia. Differences in enzyme profiles were detected between *Unio ravoisieri* and *Unio durieui*, with the detection of several diagnostic loci. The unbiased Nei genetic distance between the two species was 0.588, thus supporting their divergence at the specific level.

Keywords: Unionidae, allozymes, diagnosis loci, genetic divergence, Ichkeul watershed.

Introduction

De nos jours, le déclin rapide de la biodiversité des eaux douces est devenu l'une des plus grandes préoccupations dans le monde (RICCIARDI & RASMUSSEN, 1999 ; LYDEARD *et al.*, 2004). Les Mollusques d'eau douce sont le groupe d'organismes le plus menacé avec des taux de déclin bien plus élevés que celui des autres groupes (RÉGNIER *et al.*, 2009). La dégradation des habitats et la détérioration de la qualité des eaux seraient les causes majeures de leur déclin (BOGAN, 1993 ; DUDGEON *et al.*, 2006 ; DOWNING *et al.*, 2010).

Les moules d'eau douce de la famille des Unionidés sont des Mollusques Bivalves largement répartis dans les continents du monde, à l'exception l'Antarctique (HAAS, 1969 ; BOGAN, 2008). Cette famille forme le groupe des moules d'eau douce le plus diversifié au niveau spécifique, avec plus de 670 espèces identifiées (GRAF & CUMMINGS, 2007).

Le cycle de vie chez les Unionidés est fort complexe. Il comporte 4 stades de développement : larve glochidium, stade parasitaire, juvénile et adulte. Le mode de reproduction est gonochorique, la fécondation se produit sans copulation et les femelles sont vivipares. Le sperme du mâle est capté par la femelle en filtrant l'eau. La fertilisation des œufs et le développement des embryons ont lieu dans une région spécialisée des branchies, appelée le marsupium où ils se développent en une larve

Divergence génétique entre *Unio durieui* et *Unio ravoisieri*

glochidium. Cette dernière est expulsée dans la colonne d'eau pour passer une courte période pré-parasitaire planctonique dispersive. La phase parasitaire proprement dite est entamée après la fixation et l'enkystement du glochidium sur les branchies d'un poisson téléostéen spécifique afin de terminer sa métamorphose en une moule juvénile (BARNHART *et al.*, 2008).

En Tunisie, les moules d'eau douce du genre *Unio* de la famille des Unionidés présentent une distribution très restreinte dans les milieux lotiques et lentiques nord du pays et occupent les étages bioclimatiques humide et subhumide. Trois espèces du genre *Unio* ont été identifiées en Tunisie : *Unio ravoisieri*, *Unio gibbus* et *Unio durieui* (KHALLOUFI, 2010 ; KHALLOUFI *et al.*, 2011). *Unio ravoisieri* est une espèce commune et la plus fréquente de l'Afrique du Nord (KHALLOUFI, 2010 ; GRAF & CUMMINGS, 2011). Cependant, *Unio durieui* est une espèce en danger d'extinction, inscrite sur la liste rouge de l'Union International de la Conservation de la Nature depuis 2010 (VAN DAMME *et al.*, 2010). Ces deux espèces se ressemblent beaucoup morphologiquement et sont facilement distinguable d'*Unio gibbus*. En effet, la forme de la coquille chez *Unio ravoisieri* et *Unio durieui* est ovale, d'aspect allongé et du même ordre de grandeur, tandis que *Unio gibbus* est plutôt sub-rectangulaire et moins allongé.

L'identification basée uniquement sur des critères morphologiques et anatomiques conduit parfois à la confusion entre espèces qui se ressemblent étroitement. Dans de telles circonstances, comme c'est le cas chez plusieurs espèces de moule d'eau douce, les méthodes génétiques ont été utilisées pour confirmer l'identité de l'espèce (PRIÉ *et al.*, 2012 ; PRIÉ & PUILANDRE, 2014). Les marqueurs génétiques sont devenus un outil majeur pour la systématique et pour résoudre les problèmes taxonomiques compris entre espèces et population.

Parmi les différents marqueurs génétiques, les isoenzymes qui présentent des outils très efficace pour la détermination de la structure réelle des populations et l'estimation du flux de gène inter et intra espèces dans les populations naturelles. Les grandes différences biochimiques entre les espèces, si facilement résolus par les électrophorèses, font des allozymes une technique précieuse pour identifier les membres de différentes espèces et d'évaluer la variation génétique entre les populations (AVISE, 1975).

Ce travail présente les résultats d'une étude visant à (1) comparer la variation génétique chez les moules d'eau douce de l'Oued Douimiss (nord de la Tunisie) et la comparer aux autres espèces de la famille des Unionidés (2) fournir des clés d'identification basées sur des locus enzymatiques diagnostiques facilitant la distinction entre les espèces à n'importe quel stade du cycle de vie (3) clarifier le niveau de la relation et de la divergence génétique entre les espèces collectées.

Matériel et méthodes

Matériel biologique

Les analyses ont été portées sur 35 spécimens de moule d'eau douce collectés de l'Oued Douimiss du bassin versant de l'Ichkeul, situé au nord de la Tunisie (coordonnées géographiques : 37°12' Nord, 09°37' Est). La collecte a été effectuée pendant le mois d'avril 2012. Les spécimens ont été obtenus manuellement en utilisant des zones peu profondes de l'Oued (moins de 0,5 m de profondeur) et des fonds sableux-vaseux. Les individus collectés ont été ramenés vivants au laboratoire. Dès leur arrivée, ils ont été placés dans des aquariums bien aérés contenant de l'eau de leur habitat d'origine. L'identification des spécimens au niveau spécifique a été basée sur des critères morphologiques externes de la coquille tels que décrits par KHALLOUFI (2010) et KHALLOUFI *et al.* (2011). Cette identification nous a permis de clarifier l'existence de deux espèces de moule d'eau douce cohabitant l'Oued Douimiss : une population d'*Unio ravoisieri* de 10 spécimens (longueur maximale moyenne des coquilles $L = 52,96 \pm 5,91$ mm) et une population d'*Unio durieui* de 25 spécimens ($L = 52,82 \pm 5,68$ mm).

Analyses électrophorétiques

La dissection a été réalisée sur des individus vivants. Au cours de la dissection, un morceau de muscle adducteur ainsi que la glande digestive ont été prélevés sur chaque individu ($\approx 0,1$ g chacun). Ces morceaux ont été broyés séparément dans des tubes Eppendorf avec 80 μ L de solution d'extraction de pH = 6,8 (Tris : 1,2 g/L ; EDTA : 0,37 g/L ; NADP : 0,04 g/L) grâce à un homogénéisateur Ultraturax T8. Le broyat obtenu est ensuite centrifugé à l'aide d'une micro-centrifugeuse réfrigérée (+4°C) pendant 15 minutes à une vitesse de 12.000xg. Le surnageant, contenant l'extrait protéique, est récupéré puis conservé au congélateur à une température de -60°C jusqu'à utilisation pour les électrophorèses.

Les électrophorèses ont été réalisées sur des gels horizontaux d'amidon à 11 % de concentration en utilisant deux systèmes tampons : Tris/Citrate/Borate pH = 8,7 (TCB 8.7) et Tris/Citrate pH = 8 (TC 8). La composition des systèmes tampons est détaillée dans le tableau 1. Un total de 9 systèmes enzymatiques correspondant à 11 locus putatifs, montrant une très bonne résolution et une reproductibilité satisfaisante, ont été analysés (tableau 2). Les systèmes enzymatiques, leurs noms et leurs codes EC (*Enzyme Commission*) ont été exprimés selon les recommandations de l'Union Internationale de Biochimie, Comité de la Nomenclature (IUBNC, 1984). Des indices ont été attribués aux allèles en utilisant toujours le même génotype d'un individu d'*Unio ravoisieri* comme référence pour tous les gels, puisqu'il représente l'espèce commune du nord de l'Afrique. L'indice 100 a été attribué à l'allèle le plus fréquent, les autres auront d'autres indices supérieurs (+5) ou inférieurs (-5) selon leur migration par rapport à l'allèle le plus fréquent. Les colorations histochimiques utilisées pour la révélation enzymatique ainsi que la préparation des gels et des systèmes tampons ont été mises au point à l'aide de l'ouvrage de PASTEUR *et al.* (1987).

Divergence génétique entre *Unio durieui* et *Unio ravoisieri*

Tableau 1

Composition des solutions tampons d'électrophorèses utilisées pour la séparation des protéines enzymatiques. TCB 8.7, Tris Citrate Borate pH = 8,7 et TC 8, Tris Citrate pH = 8 (PASTEUR *et al.*, 1987).

Composition of electrophoretic buffers used to separate enzymatic proteins. TCB 8.7, Tris Citrate Borate pH = 8.7 and TC 8, Tris Citrate pH = 8 (PASTEUR et al., 1987).

	Systèmes tampons d'électrophorèse	
	TCB 8.7	TC 8
Tampon d'électrode	Acide borique (0,3 M) NaOH (0,06 M) pH ajusté à 8,2	Tris (0,62 M) Acide citrique (0,14 M) pH ajusté à 8
Tampon de gel	Tris (0,62 M) Acide citrique (0,005 M) pH ajusté à 8,7	Dilution 1/29 du tampon d'électrode pH ajusté à 8

Tableau 2

Liste des systèmes enzymatiques étudiés chez les moules d'eau douce *Unio durieui* et *Unio ravoisieri* de l'Oued Douimiss (Tunisie) et conditions expérimentales utilisées.

Enzymatic systems studied in the freshwater mussels Unio durieui and Unio ravoisieri from Douimiss River (Tunisia) and the experimental conditions.

Nom du système enzymatique	EC ^A	Locus	Tampon ^B	Tissus ^C
Estérase	3.1.1.1	<i>EST*</i>	TCB 8.7	G.d.
Glucose-6-phosphate-isomérase	5.3.1.9	<i>PGI*</i>	TC 8	M.a.
Glutamate-déshydrogénase	1.4.1.2	<i>GDH*</i>	TC 8	M.a.
Glycérol-3-phosphate-déshydrogénase	1.1.1.8	<i>G3PDH-1*</i> <i>G3PDH-2*</i>	TC 8 TC 8	G.d. G.d.
Leucine-aminopeptidase	*.*.*	<i>LAP*</i>	TC 8	M.a.
Malate-déshydrogénase	1.1.1.37	<i>MDH*</i>	TC 8	M.a.
Phosphoglucomutase	5.4.2.2	<i>PGM*</i>	TC 8	M.a.
Sorbitol-déshydrogénase	1.1.1.14	<i>SDH*</i>	TC 8	G.d.
Superoxyde-dimutase	1.15.1.1	<i>SOD-1*</i> <i>SOD-2*</i>	TCB 8.7 TCB 8.7	G.d. G.d.

^A : EC, Enzyme Commission code d'après International Union of Biochemistry, Nomenclature Committee (IUBNC, 1984).

^B : Tampon d'électrophorèse utilisés : TC 8, Tris Citrate pH 8 et TCB 8.7, Tris Citrate Borate pH 8,7 (PASTEUR *et al.*, 1987).

^C : G.d, Glande digestive ; M.a., Muscle adducteur.

Analyses des données

L'analyse et l'interprétation des données génétiques conduit à identifier, pour chaque locus enzymatique, les allèles et les génotypes présents dans les échantillons et à établir leur fréquence. La diversité génétique a été exprimée par le nombre moyen d'allèles par locus (A_m), l'hétérozygotie observée (H_o), pourcentage d'individus

Bulletin de la Société zoologique de France 140 (2)

hétérozygotes dans l'échantillon), l'hétérozygotie attendue non biaisée (H_{nb}) selon NEI (1978) et le pourcentage de loci polymorphes (P). Un locus est considéré comme polymorphe si la fréquence de l'allèle le plus commun est inférieure à 99 %. Ces paramètres ont été estimés à l'aide du logiciel GENETIX version 4.05 (BELKHIR *et al.*, 2004).

L'écart potentiel à l'équilibre de Hardy-Weinberg a été testé en estimant la statistique F_{IS} de WRIGHT (1951) selon WEIR & COCKERHAM (1984). Ce paramètre, mesurant le déséquilibre en individus hétérozygotes, a été calculé par locus et pour l'ensemble des loci confondus. Les valeurs exactes des probabilités p indiquant le niveau de significativité du paramètre F_{IS} ont été estimées par la méthode de la chaîne de Markov (test exact) *via* le logiciel GENEPOP version 4 (RAYMOND & ROUSSET, 1995).

La différenciation génétique a été également mesurée par l'indice F_{ST} de WRIGHT (1951) selon l'estimateur de WEIR & COCKERHAM (1984). Cet indice a été déterminé par locus et sur l'ensemble des loci. Les valeurs p de probabilité pour rejeter l'hypothèse nulle (absence de différenciation) ont été estimées après 1 000 permutations à l'aide du logiciel FSTAT 2.9.3 (GOUDET, 2001). Le degré de divergence génétique entre les deux espèces a été estimé par la distance génétique non biaisée (D_{nb}) de Nei (1978) en utilisant le logiciel GENETIX version 4.05 (BELKHIR *et al.*, 2004).

Résultats et discussion

Les fréquences alléliques chez les deux espèces ainsi que les valeurs des indices de la diversité génétique sont résumées dans le tableau 3. Des différences dans les profils enzymatiques non équivoques ont été détectées entre *Unio ravoisieri* et *Unio durieui*, incluant des remplacements entiers des allèles aux loci GDH^* , LAP^* et SDH^* et des différences extrêmes dans les fréquences alléliques au locus GPI^* entre les deux espèces. Les restes des loci (EST^* , $G3PDH-1^*$, $G3PDH-2^*$, MDH^* , $SOD-1^*$ et $SOD-2^*$) ont dévoilé aucune différence au niveau des zymogrammes. L'analyse de la variabilité génétique des 11 loci montre un polymorphisme très faible chez les deux espèces. Deux loci seulement se sont avérés polymorphes, PGI^* chez *Unio ravoisieri* et PGM^* chez *Unio durieui*. Généralement, les loci étudiés peuvent être classés en trois catégories : des loci monomorphes fixés par les deux espèces pour le même allèle en commun, des loci monomorphes diagnostiques permettant la distinction entre les deux et des loci polymorphes (Figure 1).

Le nombre moyen d'allèles par locus A_m est relativement faible, sa valeur moyenne sur l'ensemble des échantillons est de 1,1. Le taux de polymorphisme au seuil de 99 % ne dépasse pas 10 % pour les deux espèces. Les valeurs d'hétérozygotie observées H_o multiloci sont de 0,009 chez *Unio ravoisieri* et de 0,011 chez *Unio durieui*. L'hétérozygotie attendue non biaisée H_{nb} est de même ordre que celle observée chez les deux espèces, signalant l'absence de déviation à la situation de panmixie

Divergence génétique entre *Unio durieui* et *Unio ravoisieri*

Tableau 3

Fréquences alléliques et diversité génétique déterminées chez les moules d'eau douce *Unio durieui* et *Unio ravoisieri* de l'Oued Douimiss (Tunisie). A_m , nombre moyen d'allèles par locus; $P_{0,99}$, pourcentage des loci polymorphes au seuil de 99 %; H_o , hétérozygoties observées; H_{nb} , hétérozygotie attendue non biaisée et F_{IS} , indice de déséquilibre en hétérozygotes de WRIGHT (1951) calculés selon les estimateurs de WEIR & COCKERHAM (1984).

Allelic frequencies and genetic diversity determined for the freshwater mussels Unio durieui and Unio ravoisieri from Douimiss River (Tunisia). A_m , mean number of alleles per locus; $P_{0,99}$, percentage of polymorphic loci at a level of 99 %; H_o , observed heterozygosity; H_{nb} , unbiased expected heterozygosity and F_{IS} , WRIGHT's (1951) inbreeding index, computed following WEIR & COCKERHAM's (1984) estimators.

Locus		<i>U. durieui</i>	<i>U. ravoisieri</i>
<i>EST</i> *	100	1	1
<i>G3PDH-1</i> *	100	1	1
<i>G3PDH-2</i> *	100	1	1
<i>GDH</i> *	100	0	1
	105	1	0
<i>LAP</i> *	100	0	1
	105	1	0
<i>MDH</i> *	100	1	1
<i>PGI</i> *	95	1	0,050
	100	0	0,950
	H_o	0	0,100
	H_{nb}	0	0,100
	F_{IS}	–	0
<i>PGM</i> *	100	0	1
	105	0,940	0
	110	0,060	0
	H_o	0,120	0
	H_{nb}	0,115	0
	F_{IS}	-0,043	–
<i>SDH</i> *	100	0	1
	105	1	0
<i>SOD-1</i> *	100	1	1
<i>SOD-2</i> *	100	1	1
A_m		1,091	1,091
$P_{0,99}$		0,091	0,091
H_o		0,011	0,009
H_{nb}		0,010	0,009
F_{IS}		-0,043	0

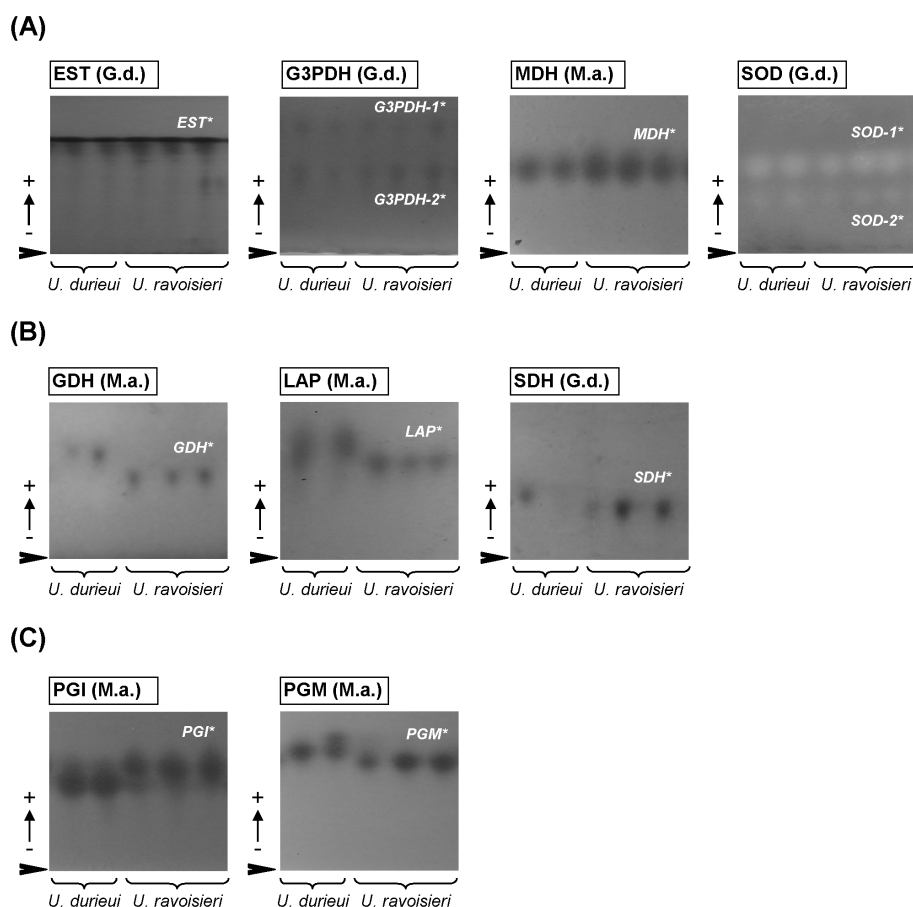


Figure 1

Quelques exemples des profils des 9 systèmes enzymatiques révélés chez les moules d'eau douce *Unio durieui* et *Unio ravoisieri* de l'Oued Douimiss (Tunisie). A, loci monomorphes fixés par l'ensemble des deux espèces pour le même allèle en commun ; B, loci monomorphes diagnostiques permettant la distinction entre les deux espèces et C, loci polymorphes. Les flèches indiquent l'origine et le sens de la migration des électrophorèses. Les abréviations indiquent les noms des systèmes enzymatiques (encadrés), les noms des loci (en italique) et les tissus sources de chaque enzyme (G.d., Glande digestive ; M.a., Muscle adducteur).

Examples of profiles for the 9 enzyme systems obtained for the freshwater mussels Unio durieui and Unio ravoisieri from Douimiss River (Tunisia). A, monomorphic loci fixed in both species for the same common allele; B, diagnostic monomorphic loci allowing the differentiation of the two species; C, polymorphic loci. The arrows indicate the origin and direction of electrophoretic migration. Abbreviations indicate the names of the enzyme systems (boxes), the names of the loci (in italics) and the source tissue of each enzyme (G.d., digestive gland; M.a., adductor muscle).

Divergence génétique entre *Unio durieui* et *Unio ravoisieri*

(valeurs F_{IS} non significatives). L'ensemble de ces résultats indiquent que les deux espèces maintiennent un faible niveau de diversité génétique caractérisant les espèces menacées (SPIELMAN *et al.*, 2004). Des résultats similaires de faible niveau de diversité génétique ont été rapportés chez diverses espèces menacées ou en voie de disparition de la famille des Unionidés (revu dans CUROLE *et al.*, 2004).

La diversité génétique d'une espèce ou d'une population constitue son potentiel évolutif, ou potentiel, à s'adapter à des changements environnementaux (TEMPLETON *et al.*, 2001 ; FRANKHAM *et al.*, 2002). Ce potentiel évolutif participe à la capacité de spéciation d'une population et donc à la création de diversité en termes d'espèces, de communautés et d'écosystèmes (TEMPLETON *et al.*, 2001). La capacité d'une population à s'adapter à une pression de sélection ou résister à une extinction déterminée dépend de la quantité de variabilité génétique. Les facteurs qui réduisent la variabilité génétique augmentent ainsi la probabilité d'extinction. La disparition de certaines espèces n'est pas uniquement un problème de taille de population, mais elle est aussi en partie la conséquence de leur faible diversité génétique. La perte de la diversité a comme conséquence un appauvrissement du patrimoine génétique et spécifique.

Pour étudier la différenciation génétique, nous avons utilisé l'indice F_{ST} de WRIGHT (1951) estimé selon WEIR & COCKERHAM (1984) à différents niveaux par locus et entre espèces (Tableau 4). La valeur F_{ST} moyenne est hautement élevée et statistiquement significative ($F_{ST} = 0,9776 \pm 0,0163$; $p < 0,001$) indiquant une forte différenciation génétique entre les deux espèces. La différenciation observée est importante malgré le faible polymorphisme des marqueurs allozymiques employés. Celle-ci est bien illustrée par la présence d'allèles privés (ou spécifiques) au niveau des loci GDH^* , LAP^* , PGI^* , PGM^* et SDH^* .

La valeur de distance génétique de NEI (1978) entre *Unio durieui* et *Unio ravoisieri* est de l'ordre de 0.588. Cette valeur dépasse celles trouvées typiquement

Tableau 4

Valeurs de l'indice de différenciation génétique F_{ST} selon WEIR & COCKERHAM (1984) calculées par locus polymorphe et diagnostique et pour l'ensemble des loci entre les échantillons de moules d'eau douce *Unio durieui* et *Unio ravoisieri* de l'Oued Douimiss (Tunisie).

Values of the fixation index (F_{ST}) according to WEIR & COCKERHAM (1984), calculated per polymorphic and diagnostic locus and for overall loci between samples of the freshwater mussels *Unio durieui* and *Unio ravoisieri* from Douimiss River (Tunisia).

Locus	F_{ST}	Valeur p
GDH^*	1	< 0,001
LAP^*	1	< 0,001
PGI^*	0,970	< 0,001
PGM^*	0,919	< 0,001
SDH^*	1	< 0,001
La moyenne	0,978	< 0,001

Bulletin de la Société zoologique de France 140 (2)

entre les espèces congénères (THORPE, 1982) et étant également significatif au niveau spécifique (NEI, 1987).

En conclusion, cette investigation présente une perspective utile, mais préliminaire de la structure des populations des moules d'eau douce de l'Oued Douimiss. Le nombre important de loci diagnostiques mis en évidence entre *Unio ravoisieri* et *Unio durieui* ainsi que les valeurs élevées des distances génétiques trouvées attestent du niveau de divergence entre ces deux espèces et facilitent par conséquent l'identification, même à des stades plus précoces de l'histoire de vie. Il est important de signaler l'importance des résultats obtenus ici à l'aide des marqueurs allozymiques, qui apportent sur le plan fondamental des résultats intéressants confortant la systématique des deux espèces établie sur la base de critères morphologiques et/ou anatomique. De plus, la pertinence de ces marqueurs touche également le domaine de la conservation et de la gestion des stocks de ces ressources.

Remerciements

Nous souhaitons remercier les évaluateurs anonymes de cet article et l'éditeur du journal pour leurs intéressantes remarques, propositions et suggestions. Ce travail s'inscrit dans le cadre des activités de l'Unité de Recherche Écosystèmes et ressources aquatiques (UR13AGRO1 / INAT / Université de Carthage), financé par le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique et l'Institution de la Recherche et de l'Enseignement supérieur agricole.

RÉFÉRENCES

- AVISE, J.C. (1975).- Systematic value of electrophoresis data. *Syst. Zool.*, **23**, 465-481.
- BARNHART, M.C., HAAG, W.R. & ROSTON, W.N. (2008).- Adaptations to host infection and larval parasitism in Unionoida. *J. North Am. Benthol. Soc.*, **27**, 370-394.
- BELKHIR, K., BORSA, P., CHIKHI, L., GOUDET, J. & BONHOMME, F. (2004).- GENETIX, Version 4.05.2. Logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France. Disponible sur le site internet : <http://kimura.univ-montp2.fr/genetix/>.
- BOGAN, A.E. (1993).- Freshwater bivalve extinctions (Mollusca: Unionoida): a search for causes. *Am. Zool.*, **33**, 599-609.
- BOGAN, A.E. (2008).- Global diversity of freshwater mussels (Mollusca, Bivalvia) in freshwater. *Hydrobiologia*, **595**, 139-147.
- CURROLE, J.P., FOLTZ, D.W. & BROWN, K.M. (2004).- Extensive allozyme monomorphism in a threatened species of freshwater mussel, *Margaritifera hembeli* Conrad (Bivalvia: Margaritiferidae). *Conserv. Genet.*, **5**, 271-278.
- DOWNING, J.A., VAN METER, P. & WOOLNOUGH, D.A. (2010).- Suspects and evidence: a review of the causes of extirpation and decline in freshwater mussels. *Anim. Biodiv. Conserv.*, **33**, 151-185.
- DUDGEON, D., ARTHINGTON, A.H., GESSNER, M.O., KAWABATA, Z.-I., KNOWLER, D.J., LÉVÊQUE, C., NAIMAN, R.J., PRIEUR-RICHARD, A.-H., SOTO, D., STIASSNY, M.L.J. & SULLIVAN, C.A. (2006).- Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol. Rev.*, **81**, 163-182.

Divergence génétique entre *Unio durieui* et *Unio ravoisieri*

- FRANKHAM, R., BALLOU, J.D. & BRISCOE, D.A. (2002).- *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, 617 pp.
- GOUDET, J. (2001).- FSTAT (version 2.9.3.) a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Institute of Ecology, University of Lausanne, Switzerland. Disponible sur le site internet: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- GRAF, D.L. & CUMMINGS, K.S. (2007).- Review of the systematics and global diversity of freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoida). *J. Mollus. Stud.*, **73**, 291-314.
- GRAF, D.L. & CUMMINGS, K.S. (2011).- Freshwater mussel (Mollusca: Bivalvia: Unionoida) richness and endemism in the ecoregions of Africa and Madagascar based on comprehensive museum sampling. *Hydrobiologia*, **678**, 17-36.
- HAAS, F. (1969).- Superfamilia: Unionacea. *Das Tierreich* (Berlin), **88**, 1-663.
- IUBNC (1984).- *Enzyme nomenclature*. International Union of Biochemistry, Nomenclature Committee, Academic Press, Orlando, Florida, USA, 646 p.
- KHALLOUFI, N. (2010).- *Les mollusques des eaux continentales de Tunisie : systématique, écologie et biologie*. Thèse de doctorat en Sciences Biologiques, Faculté des Sciences de Tunis, Tunisie, 496 p.
- KHALLOUFI, N., TOLEDO, C., MACHORDOM, A., BOUMAÏZA, M. & ARAUJO, R. (2011).- The unionids of Tunisia: taxonomy and phylogenetic relationships, with redescription of *Unio ravoisieri* Deshayes, 1847 and *U. durieui* Deshayes, 1847. *J. Mollus. Stud.*, **77**, 103-115.
- LYDEARD, C., COWIE, R.H., PONDER, W.F., BOGAN, A.E., BOUCHET, P., CLARK, S.A., CUMMINGS, K.S., FREST, T.J., GARGOMINY, O., HERBERT, D.G., HERSHLER, R., PEREZ, K.E., ROTH, B., SEDDON, M., STRONG, E.E. & THOMPSON, F.G. (2004).- The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience*, **54**, 321-330.
- NEI, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583-590.
- NEI, M. (1987).- *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, USA.
- PASTEUR, N., PASTEUR, G., BONHOMME, F., CATALAN, J. & BRITTON-DAVIDIAN, J. (1987).- *Manuel de génétique par électrophorèses des protéines*. Collection Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris, France, 217 p.
- PRIÉ, V. & PUILLANDRE, N. (2014).- Molecular phylogeny, taxonomy, and distribution of French *Unio* species (Bivalvia, Unionidae). *Hydrobiologia*, **735**, 95-110.
- PRIÉ, V., PUILLANDRE, N. & BOUCHET, P. (2012).- Bad taxonomy can kill: molecular reevaluation of *Unio mancus* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Unionidae) and its accepted subspecies. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.*, **405**, 18.
- RAYMOND, M. & ROUSSET, F. (1995).- GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, **86**, 248-249.
- RÉGNIER, C., FONTAINE, B. & BOUCHET, P. (2009).- Not knowing, not recording, not listing: numerous unnoticed mollusk extinctions. *Conserv. Biol.*, **23**, 1214-1221.
- RICCIARDI, A. & RASMUSSEN, J.B. (1999).- Extinction rates of North American freshwater fauna. *Conserv. Biol.*, **13**, 1220-1222.
- SPIELMAN, D., BROOK, B.W. & FRANKHAM, R. (2004).- Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15261-15264.
- TEMPLETON, A.R., ROBERTSON, R.J., BRISSON, J. & STRASBURG, J. (2001).- Disrupting evolutionary processes: the effect of habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 5426-5432.
- THORPE, J.P. (1982).- The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **13**, 139-168.

Bulletin de la Société zoologique de France 140 (2)

- VAN DAMME, D., GHAMIZI, M., SOLIMAN, G., Mcivor, A. & SEDDON, M.B. (2010).- The status and distribution of freshwater molluscs. *In*: N. García, A. Cuttelod & D. Abdul Malak (eds). *The status and distribution of freshwater biodiversity in northern Africa*. Gland, Switzerland, Cambridge, UK, and Malaga, Spain: IUCN, 2010. Chapter 4, pp. 29-50.
- WEIR, B.S. & COCKERHAM, C.C. (1984).- Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- WRIGHT, S. (1951).- The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.*, **15**, 323-354.

(reçu le 18/02/2015 ; accepté le 19/05/2015)