

## Troisième partie : Données génétiques

Les données morphométriques, bien que rapprochant les LMI des *E. m. macaco*, pourraient inciter, malgré tout, à faire des LMI une nouvelle sous-espèce d'*E. macaco*, en se fondant sur les variations des pelages. Comme le préconisent Heckman *et al.* (2006), des analyses génétiques pourraient permettre de valider ou infirmer cette hypothèse et ainsi de ne pas tomber dans le piège des variations phénotypiques individuelles, comme facteur de spéciation.

Plusieurs hypothèses quant au statut phylogénique des LMI peuvent être avancées. Ces hypothèses sont listées ci-dessous de manière hiérarchisée :

- Si la distance génétique entre les LMI, *E. m. macaco* et *E. m. flavifrons* est grande et si nous observons une constance dans la morphologie des individus LMI, nous pourrions évoquer la découverte d'une **nouvelle sous-espèce de *Eulemur macaco***.
- Si la population intermédiaire est génétiquement équidistante des deux espèces connues et si la morphologie des individus est variable, montrant des caractéristiques des deux sous-espèces d'*Eulemur macaco*, elle sera qualifiée d'**hybride**. Après plusieurs générations, si l'évolution leur est favorable, nous pourrions assister à l'émergence d'une nouvelle sous-espèce à part entière.
- Si les LMI sont particulièrement proches génétiquement d'une des deux espèces, ils seront considérés comme des **variants morphologiques** de celle-ci.

D'après les travaux antérieurs, la découverte d'une population hybride semblait plausible. Des hybrides (fertiles et viables) des deux sous-espèces d'*E. macaco* ont déjà été décrits (Rabarivola *et al.*, 1991). De plus, plusieurs publications ont présenté des hybrides entre espèces appartenant au genre *Eulemur*. Wyner *et al.* (2002) ont décrit des cas d'hybrides entre *Eulemur fulvus rufus* et *E. albocollaris*, et Pastorini *et al.* (2009) entre *E. mongoz* et *E. fulvus*. Les *E. m. macaco* et les *E. m. flavifrons* appartenant au même genre que les animaux précités et étant des sous-espèces, une hybridation était plausible. Enfin, la rivière Andranomalaza séparant les aires de répartition de ces deux sous-espèces ne peut être considérée comme une barrière d'espèce que si elle mesure au moins 50 m de large sur 20 km de long, à l'intérieur des terres, et que sa source est à une altitude ou une distance inaccessible aux animaux des deux sous-espèces (Craul *et al.*, 2008).

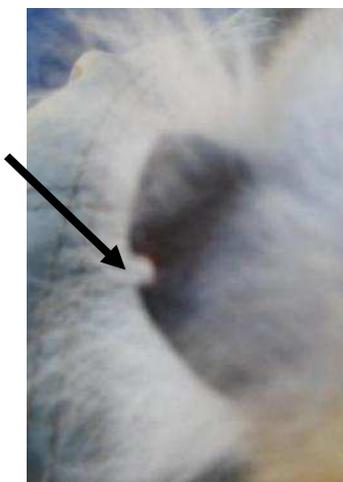
L'hypothèse de variants morphologiques peut être supportée par les travaux de Meyers *et al.* (1989). Ces auteurs ont notamment décrit de tels individus, en se fondant sur des critères morphologiques (en particulier la couleur des yeux), à l'est de Kapany, dans la montagne de Manongarivo.

### I. Matériel et méthodes des analyses génétiques

#### A. Protocole de prélèvement

Des biopsies cutanées ont été effectuées au niveau du pavillon auriculaire des animaux anesthésiés. La zone a été rasée et désinfectée à l'alcool. Le prélèvement, d'environ 0,2\*0,3cm, a été réalisé à l'aide d'un scalpel à lames stériles à usage unique et d'une pince à dents de souris (Figure 24). L'hémostase a été assurée par compression digitée et son efficacité a été vérifiée lors des prises des mesures morphométriques. Les échantillons ainsi récoltés ont été placés dans des tubes remplis d'alcool à 90° et conservés à température ambiante.

**Figure 24 : Aspect de l'oreille d'une femelle LMI, après la réalisation de la biopsie cutanée (photographie personnelle).**



La flèche indique l'emplacement de la biopsie d'une surface de  $0,06\text{cm}^2$ , sur le bord de l'oreille.

## **B. Echantillons analysés**

Les 40 biopsies cutanées effectuées durant le projet « Les lémuriens de Kapany » ont été analysées et comparées avec une base de données interne à l'UNISTRA, composée de 98 échantillons (17 *E. m. macaco* et 81 *E. m. flavifrons*). Les provenances des échantillons de la base de données conservent une valeur de confidentialité puisque les études les concernant n'ont pas encore fait l'objet de publications. Les notations des prélèvements de la base de données de l'UNISTRA ont été réalisées au fur et à mesure de leurs études de provenance respectives. Ces données sont le résultat de nombreux travaux menés par des chercheurs différents durant de nombreuses années. Cela explique l'absence d'homogénéité sur la notation des échantillons étudiés.

## **C. Protocole des analyses génétiques**

Les analyses génétiques ont été réalisées par le Dr Jean-Luc Fausser et le Dr Daniel Montagnon de l'UNISTRA. Tous les tampons utilisés (ATL, AL, AW1, AW2, AE, NT, NT3, NE) sont des produits dont la composition est tenue confidentielle par les fabricants des différents kits utilisés.

### **1. Extraction de l'ADN**

L'ADN a été extrait avec le kit QIA amp DNA minikit® (QIAGEN, Canada) suivant les instructions du fabricant. Du fait de la taille modeste des fragments, les quantités préconisées ont été divisées par deux.

Les fragments de tissu (un à deux  $\text{mm}^2$ ) ont été rincés dans du sérum physiologique. Ils ont ensuite été digérés à  $56^\circ\text{C}$  dans  $90\mu\text{l}$  de tampon ATL additionnés de  $10\mu\text{l}$  de protéinase K, l'ensemble étant agité au vortex. Après environ quatre heures de digestion, la réaction a été stoppée par adjonction de  $100\mu\text{l}$  de tampon AL puis l'ensemble a été chauffé à  $70^\circ$  pendant 10 minutes.

Cent microlitres d'éthanol pur ont été ajoutés. Puis l'ensemble a été agité pendant 10 fois une seconde à l'aide d'un agitateur, déposé sur une colonne de silice puis centrifugé à 6000G pendant 2 minutes. L'éluât a été éliminé puis la colonne a été rincée par adjonction de 250µl de tampon AW1. Après centrifugation à 6000G pendant deux minutes, l'éluât a été jeté puis la colonne a été nouvelle rincée par adjonction de 250µl de tampon AW2. L'ensemble recueilli a été centrifugé à 20000G pendant cinq minutes et l'éluât éliminé. Après adjonction de 40µl de tampon AE et cinq minutes d'incubation à température ambiante, les acides nucléiques ont été élués par centrifugation à 6000G pendant deux minutes (cette opération a été répétée une seconde fois afin de rincer correctement la colonne). L'éluât contenant les acides nucléiques a été stocké au congélateur, à moins 30°C.

## **2. Dosage des ADN**

Les ADN ont été dosés par mesure de la densité optique (DO) à 260nm et 280nm. Une unité de densité optique à 260nm correspond à 50ng/µl d'ADN double brin. La pureté du matériel peut également être évaluée par le calcul du rapport DO260/DO280 qui doit être voisin de 1.8. Un rapport supérieur traduit une contamination par des acides ribonucléiques (ARN), à l'inverse un rapport inférieur indique une contamination par des protéines.

## **3. Réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR)**

Une réaction de polymérisation en chaîne (PCR : *Polymerase Chain Reaction*) a été employée pour produire un double brin d'ADN correspondant à une partie de l'ADN mitochondrial (la D-loop : *Displacement Loop*) à l'aide des amorces dégénérées suivantes :

DL51 (5'-GCACCCAAAGCTGARRTTCTA-3') (Wyner *et al.*, 2000)

DLPL5 (5'-CCATCGWGATGTCTTATTTAAGRGGAA-3') (Baker *et al.*, 1993).

R= nucléotide G ou A et W= nucléotide A ou T

Chaque amplification a été réalisée en présence de 20 mM tris-Hcl pH 8.4, 50 mM Kcl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub> (Gibco BRL, Etats-Unis d'Amérique), 50µg BSA, 0.5µM de chaque amorce, 1,8U de Taq DNA polymérase (Perkin Elmer Cetus, Etats-Unis d'Amérique), 200µM de chaque désoxyribonucléotide (dNTP) (Boehringer Mannheim, Allemagne) et 90ng d'ADN, dans un volume final de 50µl. Les réactions ont été réalisées dans un thermocycler Perkin Elmer Cetus DNA thermocycler 480 (Lab Extreme, Etats-Unis d'Amérique), de la manière suivante :

- Pré dénaturation (7 mn à 94°C)
- 10 cycles de 3 étapes - Dénaturation (30 sec à 94°C)
  - Hybridation (45 sec à 54°C)
  - Extension (1 mn 30 sec à 72°C)
- 30 cycles de 3 étapes - Dénaturation (30 sec à 94°C)
  - Hybridation (45sec à 52°C)
  - Extension (1 mn 30 sec à 72°C)
- Extension finale (10 mn à 72°C).

## **4. Contrôle des produits de PCR**

La pureté des produits de PCR a été contrôlée par analyse d'une fraction (8µl) sur gel d'agarose à 1.3% (1.3g d'agarose pour 100ml de TBE : Tris base 87mM, acide borique 89mM, EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) 2mM pH 8.0, additionné de 0.5 µg/ml de bromure d'éthidium). L'électrophorèse a été réalisée à 200mA pendant environ deux heures

dans du TBE. Les gels ont ensuite été examinés sous lumière UV. Lorsque le produit d'amplification est apparu sous forme d'une bande unique de poids moléculaire compatible avec le fragment recherché (dans le cas présent environ 550bp, paire de base) la fraction restante a été réservée au séquençage. Le contrôle sur gel a également permis d'estimer la concentration en acides nucléiques, par comparaison avec des marqueurs de poids moléculaires, de concentrations connues. Le témoin MW (*Molecular Weight*) était un mélange de poids moléculaire et de concentration connues, servant de témoin et d'échelle au contrôle de nos produits PCR (Fermentas, Lituanie).

## **5. Purification et séquençage**

Après avoir effectué des contrôles de poids moléculaires sur gel d'agarose, les produits de PCR ont été purifiés (kit NucleoSpin<sup>®</sup> extract II, Macherey-Nagel ; Clontech, Takara Bio Incorporation, Japon). En effet, il est nécessaire d'éliminer les amorces de PCR des échantillons, car lors du séquençage, ces amorces sont de nouveau utilisées, mais séparément. Le volume des échantillons de PCR a été ajusté à 100µl avec de l'eau bidistillée puis 200µl de tampon NT dilués au 1/5 ont été ajoutés. L'ensemble a été déposé sur colonne puis centrifugé à 11000G pendant 1 mn. Après élimination de l'éluât, la colonne a été rincée par 600µl de tampon NT3 puis centrifugée à 11000G pendant 1 mn. Une seconde centrifugation (à 11000G durant 2mn), après élimination de l'éluât, a été réalisée afin de sécher la colonne. L'éluotion a été réalisée par adjonction de tampon NE. Le volume d'éluotion de tampon NE a été calculé de manière à obtenir une concentration en produit de PCR de 2 ng/µl.

Afin de séquencer les produits purifiés, chaque échantillon a subi une seconde PCR incorporant des nucléotides couplés à un fluorochrome (Taq dye deoxy terminator cycle sequencing kit, Applied Biosystem Industry, Etats-Unis d'Amérique), à l'aide d'un kit permettant d'incorporer des nucléotides marqués dans la PCR, avant le séquençage. Une fraction de 1,2µl de chaque échantillon a été additionnée de 4µl de Big Dye Terminator (BDT, Applied Biosystem Industry, Etats-Unis d'Amérique) de 2,8µl d'eau bi distillée et de 2µl d'une amorce diluée à 0,8µmol/µl. Les amorces utilisées ont été celles de Wyner *et al.* (2000) et Baker *et al.* (1993), présentées précédemment dans le paragraphe (3. Réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR)).

Protocole de la seconde PCR :

- Pré dénaturation (1 mn à 96°C)
- 25 cycles de :
  - Dénaturation (10 sec à 96°C)
  - Hybridation (5 sec à 50°C)
  - Extension (4 mn à 60°C)

En fin de réaction les produits ont été précipités à l'éthanol (10µl de produit de PCR + 40µl d'éthanol à 80% 15 mn à -30°C) puis centrifugés à 12000G pendant 30 mn. Le surnageant a été éliminé puis le précipité rincé à l'éthanol à 70% et centrifugé à 12000G pendant 5 mn. Après élimination du surnageant, le culot a été séché environ 12 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après séchage complet, le culot a été repris dans 10µl d'eau bi distillée. Enfin, 4µl du produit ont été additionnés de 16µl d'eau bi distillée puis chargés sur séquenceur automatique ABI PRISM 3100 (Applied Biosystem Industry, Etats-Unis d'Amérique). Chaque échantillon a été séquençé dans le sens 5'-3' et 3'-5'.

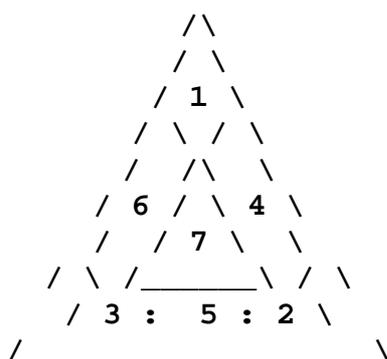
## D. Distance génétique nette et de Tamura-Nei

Suite au séquençage nous avons calculé les distances génétiques nettes et de Tamura-Nei séparant chaque échantillon. Une distance génétique nette représente le nombre de nucléotides (ou paires de bases = bp) différant entre deux séquences. Elle sert de base au calcul de distance génétique de Tamura-Nei, qui lui est donc proportionnelle. Les distances génétiques de Tamura-Nei ont été calculées avec le logiciel MEGA (Tamura *et al.*, 2007) d'après les travaux de Tamura et Nei (1993). Les distances génétiques ont été comparées entre les différentes catégories d'animaux grâce au test de Mann Whitney/Wilcoxon sur données non appariées, à procédure exacte (logiciel Epi Info®, CDC, Etats-Unis d'Amérique). Le seuil de signification statistique retenu a été le risque d'erreur  $\alpha = 5\%$  dans ce test bilatéral. Les résultats ont été présentés avec les effectifs des catégories (Nx), la valeur de p et sa position par rapport au seuil de significativité.

## E. Construction de cladogrammes

Les séquences générées sont traitées à l'aide du logiciel Bio Edit (Hall, 1999) et alignées à l'aide de CLUSTAL (Thompson *et al.*, 1997). Afin de vérifier la validité des séquences (pour la réalisation de cladogrammes), celles-ci ont été testées avec Tree puzzle (Schmidt *et al.*, 2002). Tree puzzle (Schmidt *et al.*, 2002) est un logiciel comparant les séquences quatre par quatre. Il étudie tous les quartets possibles du jeu de séquences et évalue la distance génétique (ou branche interne) de chaque quartet. Les résultats sont placés sur un diagramme triangulaire en les représentant par un point (Figure 25). Si la branche interne d'un quartet est nulle (donnant la représentation *star tree* ou arbre étoile), les séquences ne peuvent pas être analysées. Le point correspondant sur le diagramme est alors placé au centre du triangle (région 7, cf. Figure 24). A l'inverse, plus les points sont proches des angles, plus les séquences seront utilisables pour une phylogénèse (région 1, 2 ou 3, cf. Figure 25). On considère que si plus de 15 à 20% des quartets sont placés au centre du diagramme, les reconstructions phylogéniques en découlant ne seront pas fiables.

**Figure 25 : Diagramme théorique triangulaire du Tree puzzle (Schmidt et al., 2002).**



Les distances génétiques entre les séquences prises 4 à 4 (quartets) sont représentées par des points. Si la branche interne d'un quartet est nulle les séquences ne peuvent pas être analysées. Le point correspondant sur le diagramme est alors placé au centre du triangle (région 7). A l'inverse, plus les points sont proches des angles (région 1, 2 ou 3), plus les séquences seront utilisables pour une phylogénèse.

Puis, nous avons déterminé le meilleur modèle de substitution nucléotidique avec MODELTEST (Posada et Crandall, 1998). Nous avons utilisé la représentation ML (*Maximum Likelihood*) construite à partir du modèle Kimura K81 (Kimura, 1981) et la présentation NJ (*Neighbour-Joining*) construite à partir du modèle Tamura-Nei (Tamura et Nei, 1993 et Tamura *et al.*, 2007).

Les branches de l'arbre ML ne sont pas proportionnelles à la distance génétique entre les individus, alors que le cladogramme NJ représente des branches proportionnelles à la distance génétique séparant les individus. Les chiffres au niveau de chaque branche du cladogramme NJ représentent les valeurs de bootstrap. Le bootstrap est une méthode de ré-échantillonnage. Le programme effectue un tirage statistique des séquences et construit un arbre pour chaque tirage (dans notre étude 5000 tirages ont été effectués). Les chiffres sur les branches représentent le nombre de fois en pourcentage où l'arrangement a été retrouvé.

Donc « 100 » sur une branche menant à deux clades distincts signifie que les deux clades sont toujours séparés. Pour des branches plus courtes la valeur diminue, pour 50, par exemple, les clades ne sont séparés (résolus) que dans 50% des tirages. Donc plus la valeur de bootstrap est grande plus l'arbre est fiable. La valeur limite, statistiquement, est 95%. Mais en pratique, on admet que la branche est résolue pour des valeurs supérieures à 75%.

Enfin les séquences ont été analysées par la méthode de NJ et ML à l'aide du logiciel MEGA, *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Tamura *et al.*, 2007). Ceci a permis de construire les tableaux de distances génétiques et les cladogrammes.

## **F. Analyses des populations : estimation du nombre de clusters**

A l'aide du logiciel STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000), nous avons recherché la meilleure estimation de la structure de notre population d'animaux. Le logiciel détecte le nombre le plus probable de clusters dans la population (appelé K) en faisant varier K entre deux valeurs extrêmes, ici entre 1 et 20. Chaque individu est assigné à un cluster. Pour chaque valeur de K, de nombreuses itérations sont produites par le logiciel et la valeur de K la plus probable est indiquée.

# **II. Résultats des analyses génétiques**

## **A. Carte de localisation des échantillons analysés**

Les échantillons prélevés durant l'expédition « Les lémuriers de Kapany » furent regroupés sous le nom de « Kapany P1 » pour les 27 LMI et « Analafaly-Ambodimanga P4 » pour les 13 *Eulemur macaco flavifrons*. Ils furent comparés et placés dans un cladogramme avec les échantillons de la base de donnée, provenant de 6 lieux différents : Ambato (P2) Nosy-Be (P3), Maromanjo-Marozavavy (P5), Amboloboza-Andohahomby-Madiorano (P6), Ankarafa (P7), South Marovato (P8), (Figure 26).

Figure 26 : Localisation des lieux de prélèvements des échantillons analysés au nord-ouest de Madagascar (carte du Dr JL Fausser).

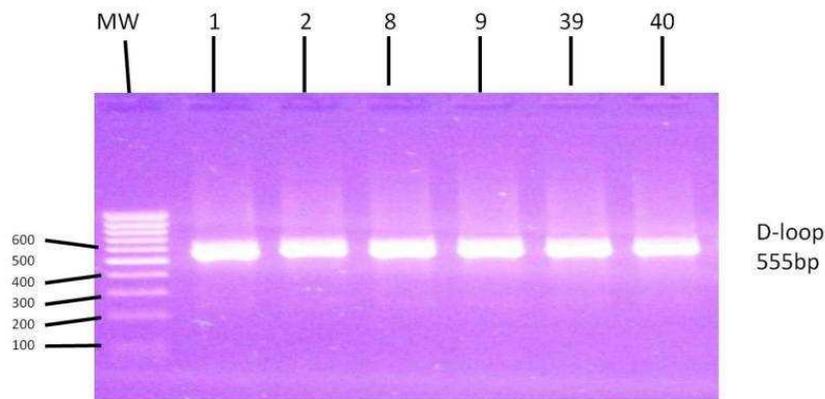


Les échantillons prélevés durant l'expédition « Les lémuriens de Kapany » ont été regroupés sous le nom de « Kapany P1 » pour les 27 LMI et « Analafaly-Ambodimanga P4 » pour les 13 *Eulemur macaco flavifrons*. Ils sont indiqués en rouge sur la carte.

## B. Séquençage de la D-loop

Nous avons obtenu 40 ADN de bonne qualité à l'issue de l'extraction et de la mesure de la DO, sur les 40 animaux biopsés. Ces ADN ont été utilisés pour effectuer les amplifications, par PCR, de la D-loop grâce aux amorces DL51 et DLPL5. La D-loop représente une séquence de l'ADN mitochondrial non codante, caractérisée par une variabilité élevée, ce qui rend cette région particulièrement utilisable pour les études phylogénétiques. Nous avons obtenu 40 produits de PCR dont la bonne qualité a été vérifiée par migration dans un gel d'agarose (Figure 27).

**Figure 27 : Exemple de résultat d'une électrophorèse des produits de PCR (crédit Dr JL Fausser).**

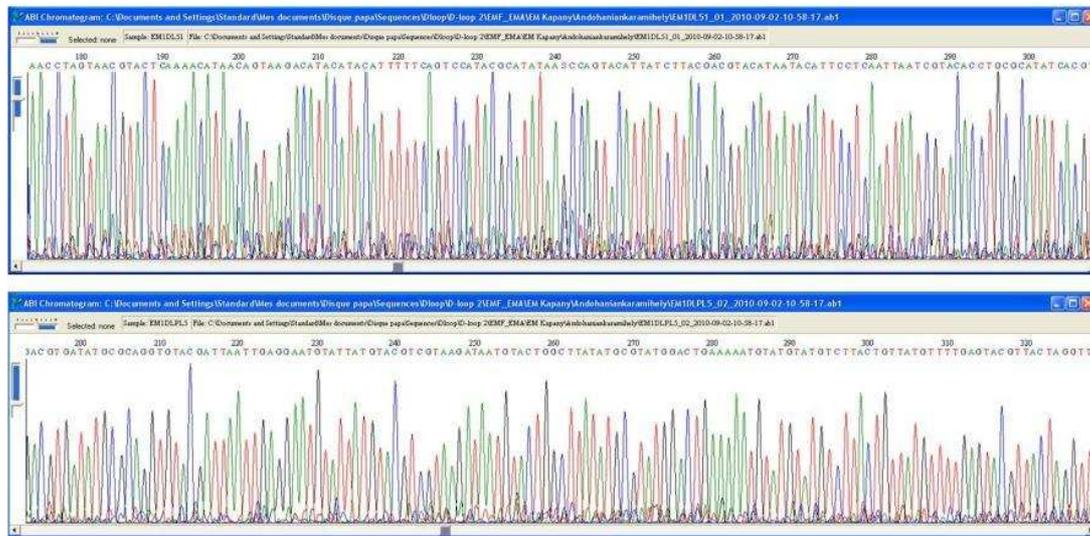


- MW: témoin contenant de l'ADN de poids moléculaire connu
- Les numéros des rangs d'électrophorèse sont ceux des échantillons correspondants aux numéros de capture.
- Les chiffres à gauche montrent l'échelle en bp (paire de base)

Ces produits de PCR ont été purifiés et séquencés dans les deux sens de lecture (*Forward* et *Reverse*) à l'aide des mêmes amorces DL51 et DLPL5. Nous avons ainsi obtenu une séquence exploitable pour 40 individus, après vérification des séquences avec le programme Bio Edit (Hall, 1999 ; Figure 28).

**Figure 28 : Résultat des séquences *Forward*, et *Reverse* de la D-loop, pour le sujet LMI n°1 (copie d'écran du logiciel Bio Edit, Hall, 1999).**

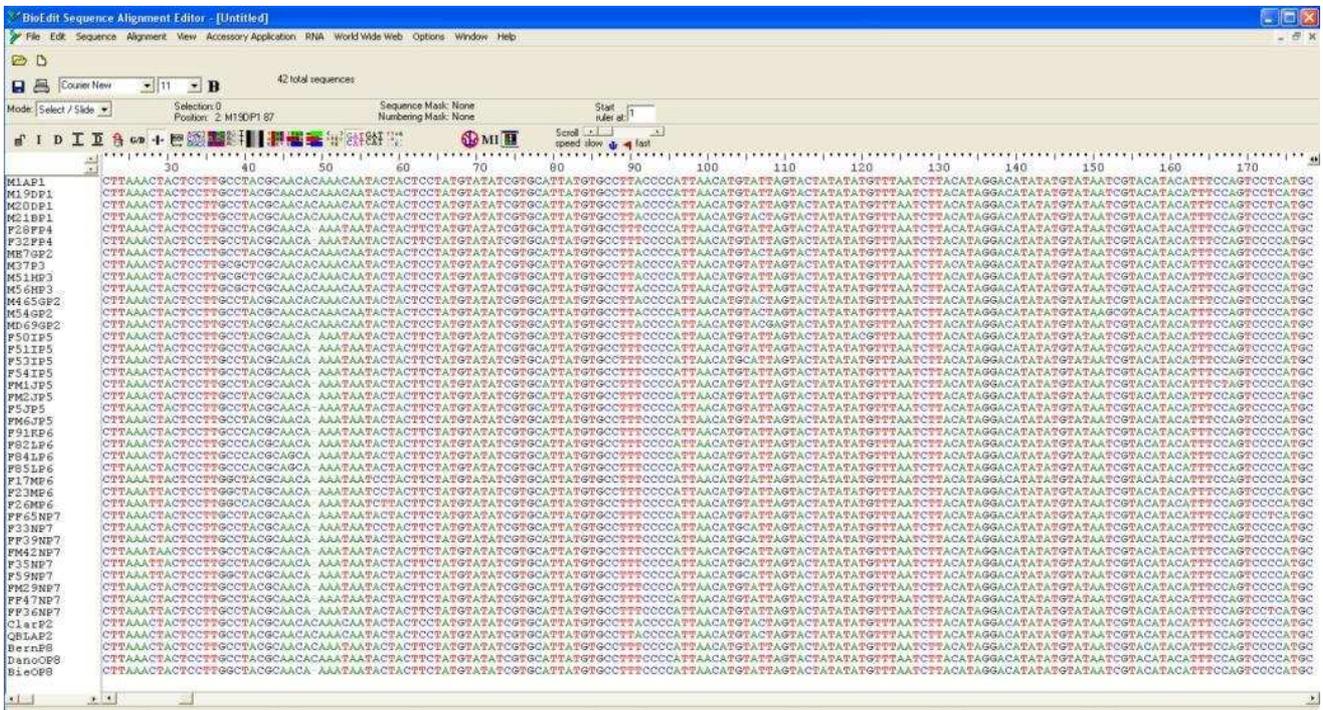
**Séquence *Forward* (DL51, en haut) et *Reverse* (DLPL5, en bas) LMI n°1**



Copie d'écrans du logiciel Bio Edit (Hall, 1999). La séquence *Forward* (DL51) en haut, se lit de gauche à droite et la séquence *Reverse* (DLPL5) en bas, se lit de droite à gauche. En lisant la séquence *Reverse* de droite à gauche, on y retrouve le complément inverse de la séquence *Forward*.

Enfin les séquences ont été alignées grâce à CLUSTAL (Thompson *et al.*, 1997) pour permettre leur utilisation lors de la construction des cladogrammes (Figure 29).

**Figure 29 : Résultat de l'alignement de 42 séquences de la base de données (copie d'écran du logiciel CLUSTAL, Thompson *et al.*, 1997).**



Copie d'écran du logiciel CLUSTAL (Thompson *et al.*, 1997). Les haplotypes, dont les séquences sont alignées, sont indiqués à gauche. Les chiffres, en haut, donnent la position des nucléotides. On remarque que la position 53 diffère entre les LMI (haplotypes finissant en P1), les *E. m. macaco* (haplotypes finissant en P2 ou P3) d'une part et les *E. m. flavifrons* (haplotypes débutant par F) d'autre part.

La séquence de la D-loop a ainsi été enregistrée pour chaque animal et chaque séquence différente (du fait de mutations) a été appelé haplotype : séquence simple brin unique caractérisée par une combinaison d'allèles ou de mutations particulière et transmise en bloc au cours des générations.

### **C. Distances génétiques nettes et de Tamura-Nei**

Toutes les distances génétiques entre tous les haplotypes sont présentées en Annexe 11. Nous avons noté dTN la distance génétique de Tamura-Nei et dNet la distance génétique nette. Pour optimiser la présentation des résultats, certains tableaux ne seront présentés qu'avec les distances génétiques nettes. Le même code a été utilisé dans les tableaux de distances génétiques et dans les cladogrammes.

La dénomination « Kapany » regroupe tous les échantillons provenant des 27 LMI prélevés et « Analafady-Ambodimanga » (AFADY) regroupe les 13 *Eulemur macaco flavifrons* capturés. La distinction entre AFADY et Mang-AFADY n'a pas été précisée puisque seul le dernier *E. m. flavifrons* y a été capturé et que cette distinction n'apporte pas d'information pertinente.

Chaque haplotype a été symbolisé par un code :

- F pour *E. m. flavifrons* ; M pour *E. m. macaco* ou LMI
- numéro de l'échantillon (parfois précédé et/ou suivi d'une lettre)
- lettre correspondant au lieu de capture (Tableau 7)
- numéro de la population (Figure 26)
- nombre de fois où l'haplotype est représenté, entre parenthèse

Par exemple: MD69GP2 = *E. m. macaco*, n°D69, capturé à Ambato, appartenant à la population P2. Les LMI appartenait à la population P1.

Bernadette, Jacques, Bie et Danos étaient des lémuriers provenant de parcs zoologiques. LCA ou LCA2 signifie *Lemur catta*, pris comme espèce témoin distincte (« outgroup »).

**Tableau 7 : Code des lieux de capture pour les haplotypes.**

<u>Lettre</u>	<u>Lieu de capture</u>	<u>Lettre</u>	<u>Lieu de capture</u>
A	Andohaniankaramihely	I	Maromanjo
B	Analabetsigny	J	Marozavavy
C	Analafaly	K	Amboloboza
D	Ambodivanio-Bevoey	L	Andohahomby
E	Ankaramihely	M	Madiorano
F	Analafady Ambodimanga	N	Ankarafa
G	Ambato	O	South Marovato
H	Nosy-be		

Les codes précédemment utilisés n'ont pu être conservés car un nombre limité de caractères, imposé par le logiciel d'édition, devait être respecté.

Ainsi on a pu dénombrer 4 haplotypes dans la population des LMI :

- M1AP1(23) : LMI, n°1, capturé à Andohaniankaramihely (ANDO), appartenant à la population P1 et cet haplotype apparaissait 23 fois.
- M20DP1 : LMI, n°20, capturé à Ambodivanio-Bevoey (AMBEVO), appartenant à la population P1
- M19DP1 : LMI, n°19, capturé à Ambodivanio-Bevoey (AMBEVO), appartenant à la population P1

- M21BP1(2) : LMI, n°21, capturé à Analabetsigny (ALABET), appartenant à la population P1 et cet haplotype apparaissait 2 fois.

Pour les *E. m. flavifrons* capturés durant le projet « Les lémuriens de Kapany », on a pu mettre en évidence deux haplotypes :

- F28FP4 (8) : *E. m. flavifrons*, n°28, capturé à Analafady-Ambodimanga (AFADY), appartenant à la population P4 et cet haplotype apparaissait 8 fois.
- F32FP4 (5) : *E. m. flavifrons*, n°32, capturé à Analafady-Ambodimanga (AFADY), appartenant à la population P4 et cet haplotype apparaissait 5 fois.

### **1. Comparaison des distances génétiques des LMI et des sous-espèces de *Eulemur***

En comparant les LMI aux *E. m. macaco*, nous avons pu relever que la plus grande dNet entre les haplotypes M19DP1(21) et M51HP3, était de 15 nucléotides (soit une valeur de 0,028 en dTN ; Tableau 8).

La plus petite dNet observée était de 1 bp (soit 0,002 en dTN), entre les haplotypes M21BP1(2) et M465GP2(7) (Tableau 8).

**Tableau 8 : Distances génétiques nettes entre les LMI et les *E. m. macaco* de la base de données de l'UNISTRA.**

	ME7GP2 (2)	M37P3 (4)	M51HP3	M56HP3	M465GP2 (7)	M54GP2	MD69GP2
M1AP1 (2)	8	10	13	11	7	10	13
M19DP1 (21)	8	12	15	13	7	10	13
M20DP1 (2)	9	11	14	12	8	11	14
M21BP1 (2)	2	10	13	11	1	4	7

Une distance génétique nette représente le nombre de nucléotides (ou paires de bases) différant entre deux séquences (pour le code couleur cf. Figure 26).

En moyenne, la dNet était de  $10 \pm 0,67$  nucléotides (soit 0,02 en dTN).

En comparant les LMI aux *E. m. flavifrons*, nous avons relevé que la plus grande dNet était de 27 bp (soit 0,056 en dTN), entre les haplotypes FM6JP5 et M19DP1(21) (Tableau 9).

**Tableau 9 : Distances génétiques nettes entre les LMI et les *E. m. flavifrons* de la base de données de l'UNISTRA.**

	M1AP1 (2)	M19DP1 (21)	M20DP1 (2)	M21BP1 (2)
F28FP4 (8)	23	24	22	23
F32FP4 (5)	24	25	23	24
F50IP5	24	25	25	24
F51IP5 (2)	23	24	24	23
F53IP5 (3)	19	20	20	21
F54IP5 (3)	20	21	21	20
FM1JP5	24	25	23	24
FM2JP5	23	24	22	23
F5JP5	24	25	25	24
FM6JP5	26	27	25	24
F91KP6 (6)	21	22	22	21
F82LP6	20	21	21	20
F84LP6 (2)	22	23	23	22
F85LP6	23	24	24	23
F17MP6 (8)	23	24	24	23
F23MP6	24	25	25	24
F26MP6	25	26	26	25
FF65NP7 (15)	21	22	22	23
F33NP7 (2)	21	22	22	23
FF39NP7 (15)	20	21	21	22
FM42NP7	22	23	23	24
F35NP7 (2)	21	22	22	23
F59NP7 (2)	22	23	23	24
FM29NP7	24	25	23	26
FF47NP7	23	24	22	25
FF36NP7 (3)	22	23	23	24
BieOP8 (3)	24	25	23	24

Une distance génétique nette représente le nombre de nucléotides (ou paires de bases) différant entre deux séquences (pour le code couleur cf. Figure 26)..

La plus petite dNet observée était de 19 nucléotides (soit 0,039 en dTN) entre les haplotypes F53IP5(3) et M1AP1(2).

En moyenne, la dNet était de  $23 \pm 0,16$  bp (soit 0,048 en dTN).

Nous avons comparé les distances génétiques nettes calculés entre LMI et *E. m. macaco* et celles entre LMI et *E. m. flavifrons*. Nous avons remarqué que ces distances génétiques nettes étaient significativement différentes :  $N_M=9$  ;  $N_F=7$ <sup>30</sup>;  $p < 0,0001$  donc  $p < 0,05$ .

Les LMI étaient donc génétiquement plus proches des *E. m. macaco* que des *E. m. flavifrons*.

## **2. Distances génétiques dans la sous-espèce *E. m. macaco***

En ce qui concerne les distances génétiques de Tamura-Nei et distances génétiques des *Eulemur macaco macaco* de la base de données, la plus grande dNet était de 18 nucléotides

<sup>30</sup> M = distances génétiques nettes entre LMI et *E. m. macaco*; F = distances génétiques nettes entre LMI et *E. m. flavifrons*

(soit 0,035 en dTN) entre l'haplotype MD69GP2 et deux autres haplotypes : M51HP3 et M56HP3 (Tableau 10).

**Tableau 10 : Distances génétiques de Tamura-Nei (sous la diagonale) et distances génétiques (au dessus de la diagonale) des *Eulemur macaco macaco* de la base de données de l'UNISTRA.**

	ME7GP2 (2)	M37P3 (4)	M51HP3	M56HP3	M465GP2 (7)	M54GP2	MD69GP2
ME7GP2 (2)		<b>12</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>7</b>
M37P3 (4)	0,024		<b>3</b>	<b>1</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	<b>17</b>
M51HP3	0,028	0,004		<b>2</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>18</b>
M56HP3	0,026	0,002	0,002		<b>12</b>	<b>14</b>	<b>18</b>
M465GP2 (7)	0,002	0,022	0,026	0,024		<b>3</b>	<b>6</b>
M54GP2	0,008	0,028	0,026	0,028	0,006		<b>7</b>
MD69GP2	0,014	0,035	0,035	0,037	0,012	0,014	

Les distances génétiques de Tamura-Nei ont été calculées avec le logiciel MEGA (Tamura *et al.*, 2007) d'après les travaux de Tamura et Nei en 1993 (pour le code couleur cf. Figure 26).

La plus petite dNet était de 1 bp (0,002 en dTN) entre les haplotypes M465GP2(7)-ME7GP2(4) et M56HP3-M37P3(4). En moyenne les individus appartenant à la sous-espèce *E. m. macaco* étaient distant de  $10 \pm 1,28$  nucléotides (soit 0,0185 dTN).

### **3. Distances génétiques dans la sous-espèce *E. m. flavifrons***

Pour les *E. m. flavifrons*, la plus grande dNet a été relevée entre les haplotypes F26MP6 et F28FP4(8). Elle était de 16 nucléotides, soit 0,033 en dTN (Tableau 11).

**Tableau 11 : Distances génétiques de Tamura-Nei (sous la diagonale) et distances génétiques nettes (au dessus de la diagonale) des *Eulemur macaco flavifrons* capturés et de la base de données de l'UNISTRA.**

	LCA2	F28FP4	F32FP4	F50IP5	F51IP5	F53IP5	F54IP5	FM1JP5	FM2JP5	F5JP5	FM6JP5	F91KP6 (6)	F82LP6	F84LP6 (2)	F85LP6	F17MP6	F23MP6	F26MP6	FF65NP7	F33NP7	FF39NP7	FM42NP7	F35NP7	F59NP7	FM29NP7	FF47NP7	FF36NP7	BieOP8 (3)
F28FP4	0,183		9	12	10	11	9	5	11	14	10	12	10	12	13	14	15	16	8	11	10	12	11	12	12	8	9	1
F32FP4	0,175	0,018		3	5	8	6	8	8	11	9	9	9	9	10	11	12	13	7	8	7	9	8	9	3	7	8	10
F50IP5	0,175	0,025	0,006		6	7	7	11	11	12	12	8	8	8	9	10	11	12	8	7	6	8	7	8	4	10	9	13
F51IP5	0,177	0,020	0,010	0,012		7	3	9	9	8	8	8	8	8	9	10	11	12	6	7	6	8	7	8	8	10	7	11
F53IP5	0,172	0,023	0,016	0,014	0,014		6	10	8	9	11	7	7	7	8	9	10	11	7	2	1	3	2	3	7	9	8	12
F54IP5	0,174	0,018	0,012	0,014	0,006	0,012		8	8	7	7	7	7	7	8	9	10	11	5	6	5	7	6	7	9	9	6	10
FM1JP5	0,183	0,010	0,016	0,022	0,018	0,020	0,016		8	13	9	11	9	11	12	13	14	15	7	10	9	11	10	11	11	5	8	6
FM2JP5	0,180	0,022	0,016	0,022	0,018	0,016	0,016	0,016		5	5	7	9	9	10	9	10	11	9	8	7	9	8	9	9	7	10	12
F5JP5	0,180	0,029	0,022	0,024	0,016	0,018	0,014	0,026	0,010		4	8	10	10	11	10	11	12	8	9	8	10	9	10	12	10	9	15
FM6JP5	0,185	0,020	0,018	0,024	0,016	0,022	0,014	0,018	0,010	0,008		8	10	10	11	10	11	12	8	11	10	12	11	12	12	10	9	11
F91KP6 (6)	0,172	0,025	0,018	0,016	0,016	0,014	0,014	0,022	0,014	0,016	0,016		2	2	3	4	5	4	8	7	6	8	7	8	10	12	9	13
F82LP6	0,167	0,020	0,018	0,016	0,016	0,014	0,014	0,018	0,018	0,020	0,020	0,004		2	3	6	7	6	8	7	6	8	7	8	10	10	9	11
F84LP6 (2)	0,169	0,025	0,018	0,016	0,016	0,014	0,014	0,022	0,018	0,020	0,020	0,004	0,004		1	6	7	6	8	7	6	8	7	8	10	12	9	13
F85LP6	0,172	0,027	0,020	0,018	0,018	0,016	0,016	0,024	0,020	0,022	0,022	0,006	0,006	0,002		7	8	7	9	8	7	9	8	9	11	13	10	14
F17MP6	0,177	0,029	0,022	0,020	0,020	0,018	0,018	0,026	0,018	0,020	0,020	0,008	0,012	0,012	0,014		1	2	10	7	8	8	7	6	12	14	9	13
F23MP6	0,177	0,031	0,024	0,022	0,022	0,020	0,020	0,028	0,020	0,022	0,022	0,010	0,014	0,014	0,016	0,002		3	11	8	9	9	8	7	13	15	10	14
F26MP6	0,177	0,033	0,026	0,024	0,024	0,022	0,022	0,031	0,022	0,024	0,024	0,008	0,012	0,012	0,014	0,004	0,006		12	9	10	10	9	8	14	16	11	15
FF65NP7	0,172	0,016	0,014	0,016	0,012	0,014	0,010	0,014	0,018	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,018	0,020	0,022	0,024		7	6	8	7	8	10	6	1	9
F33NP7	0,177	0,023	0,016	0,014	0,014	0,004	0,012	0,020	0,016	0,018	0,022	0,014	0,014	0,014	0,016	0,014	0,016	0,018	0,014		1	3	2	3	7	9	8	12
FF39NP7	0,175	0,021	0,014	0,012	0,012	0,002	0,010	0,018	0,014	0,016	0,020	0,012	0,012	0,012	0,014	0,016	0,018	0,020	0,012	0,002		2	1	2	6	8	7	11
FM42NP7	0,180	0,025	0,018	0,016	0,016	0,006	0,014	0,022	0,018	0,020	0,024	0,016	0,016	0,016	0,018	0,016	0,018	0,020	0,016	0,006	0,004		1	2	8	10	7	13
F35NP7	0,177	0,023	0,016	0,014	0,014	0,004	0,012	0,020	0,016	0,018	0,022	0,014	0,014	0,014	0,016	0,014	0,016	0,018	0,014	0,004	0,002	0,002		1	7	9	6	12
F59NP7	0,175	0,025	0,018	0,016	0,016	0,006	0,014	0,022	0,018	0,020	0,024	0,016	0,016	0,016	0,018	0,012	0,014	0,016	0,016	0,006	0,004	0,004	0,002		8	10	7	11
FM29NP7	0,170	0,024	0,006	0,008	0,016	0,014	0,018	0,022	0,018	0,024	0,024	0,020	0,020	0,022	0,024	0,026	0,028	0,028	0,020	0,014	0,012	0,016	0,014	0,016		8	11	13
FF47NP7	0,172	0,016	0,014	0,020	0,020	0,018	0,018	0,010	0,014	0,020	0,020	0,024	0,020	0,024	0,026	0,028	0,031	0,033	0,012	0,018	0,016	0,020	0,018	0,020	0,016		7	9
FF36NP7	0,175	0,018	0,016	0,018	0,014	0,016	0,012	0,016	0,020	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,020	0,018	0,020	0,022	0,002	0,016	0,014	0,014	0,012	0,014	0,022	0,014		10
BieOP8 (3)	0,180	0,002	0,020	0,027	0,022	0,025	0,020	0,012	0,024	0,031	0,022	0,027	0,022	0,027	0,029	0,027	0,029	0,031	0,018	0,025	0,023	0,027	0,025	0,023	0,026	0,018	0,020	

Les distances génétiques de Tamura-Nei ont été calculées avec le logiciel MEGA (Tamura *et al.*, 2007) d'après les travaux de Tamura et Nei, 1993 (pour le code couleur cf. Figure 26).

Le plus petit écart a été observé entre les haplotypes F85LP6 et F84LP6(2), BieOP8(3) et F28FPA(8), F23MP6 et F17MP6(8), FF39NP7(15) et F33NP7(2), FF39NP7(15) et F53IP5(3), FF39NP7(15) et F35NP7(2), F35NP7(2) et FM42NP7, et enfin F35NP7(2) et F59NP7(2). Il était de 1 bp, soit 0,002 en dTN. La distance génétique moyenne séparant les *E. m. flavifrons*, de la base de données, était de  $9 \pm 0,16$  nucléotides (soit 0,018 en dTN).

Donc, en moyenne, la distance génétique séparant les individus dans chaque au sein de chacune des deux sous-espèce d'*E. macaco* était du même ordre de grandeur (9 à 10 bp soit 0,018 à 0,02 en dTN).

#### **4. Comparaison des distances génétiques entre les sous-espèces de *E. macaco***

La comparaison des distances génétiques nettes entre *E. m. macaco*, LMI et *E. m. flavifrons* a montré que la plus grande dNet a été relevée entre les haplotypes MD69GP2 et FM29NP7, soit 33 nucléotides, soit 0,069 dTN (Tableau 12).

**Tableau 12 : Distances génétiques nettes entre *E. m. macaco*, LMI capturés et *E. m. flavifrons* capturés et de la base de données de l'UNISTRA.**

	M1AP1 (2)	M19DP1 (21)	M20DP1 (2)	M21BP1 (2)	ME7GP2 (2)	M37P3 (4)	M51HP3	M56HP3	M465GP2 (7)	M54GP2	MD69GP2
F28FP4 (8)	23	24	22	23	25	24	27	25	24	27	30
F32FP4 (5)	24	25	23	24	26	25	28	26	25	28	31
F50IP5	24	25	25	24	26	25	28	26	25	28	31
F51IP5 (2)	23	24	24	23	25	24	27	25	24	27	30
F53IP5 (3)	19	20	20	21	23	22	25	23	22	25	28
F54IP5 (3)	20	21	21	20	22	21	24	22	21	24	27
FM1JP5	24	25	23	24	26	25	28	26	25	28	31
FM2JP5	23	24	22	23	25	24	27	25	24	27	30
F5JP5	24	25	25	24	26	25	28	26	25	28	31
FM6JP5	26	27	25	24	26	25	28	26	25	28	31
F91KP6 (6)	21	22	22	21	23	18	21	19	22	25	28
F82LP6	20	21	21	20	22	17	20	18	21	24	27
F84LP6 (2)	22	23	23	22	24	19	22	20	23	26	29
F85LP6	23	24	24	23	25	20	23	21	24	27	30
F17MP6 (8)	23	24	24	23	25	22	25	23	24	27	30
F23MP6	24	25	25	24	26	23	26	24	25	28	31
F26MP6	25	26	26	25	27	22	25	23	26	29	32
FF65NP7 (15)	21	22	22	23	25	24	27	25	24	27	30
F33NP7 (2)	21	22	22	23	25	24	27	25	24	27	30
FF39NP7 (15)	20	21	21	22	24	23	26	24	23	26	29
FM42NP7	22	23	23	24	26	25	28	26	25	28	31
F35NP7 (2)	21	22	22	23	25	24	27	25	24	27	30
F59NP7 (2)	22	23	23	24	26	25	28	26	25	28	31
FM29NP7	24	25	23	26	28	27	30	28	27	30	33
FF47NP7	23	24	22	25	27	26	29	27	26	29	32
FF36NP7 (3)	22	23	23	24	26	25	28	26	25	28	31
BieOP8 (3)	24	25	23	24	26	25	28	26	25	28	31

Une distance génétique nette représente le nombre de nucléotides (ou paires de bases) différant entre deux séquences (pour le code couleur cf. Figure 26).

Le plus petit écart a été observé entre les haplotypes M37P3(4) et F82LP6 . Il était de 17 bp, soit 0,035 en dTN. En incluant les LMI dans les calculs, la moyenne des dNet était de  $25 \pm 0,17$  nucléotides, soit 0,052 dTN. En excluant les LMI, la moyenne était quasiment inchangée :  $26 \pm 0,23$  bp ou 0,054 dTN.

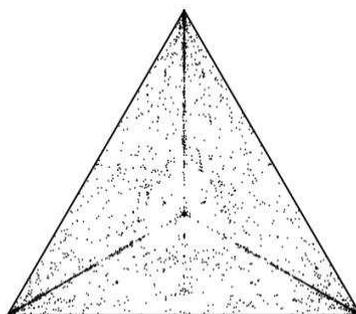
## **D. Cladogrammes obtenus**

Les cladogrammes présentent la position phylogénique des échantillons Kapany P1 et Analafaly-Ambodimanga P4, par rapport à la base de données génétiques.

### **1. Test de la validité des séquences de l'étude**

Comme expliqué précédemment, on considère que si plus de 15 à 20% des quartets sont placés au centre du diagramme, les reconstructions phylogéniques en découlant ne seront pas fiables. Avec les séquences provenant de la base de données présentée précédemment, ce pourcentage était de 10,7% (Figure 30). Les séquences étaient donc utilisables pour la reconstruction.

**Figure 30 : Diagramme triangulaire de Tree puzzle (Schmidt *et al.*, 2002) obtenu pour la base de données de l'étude.**



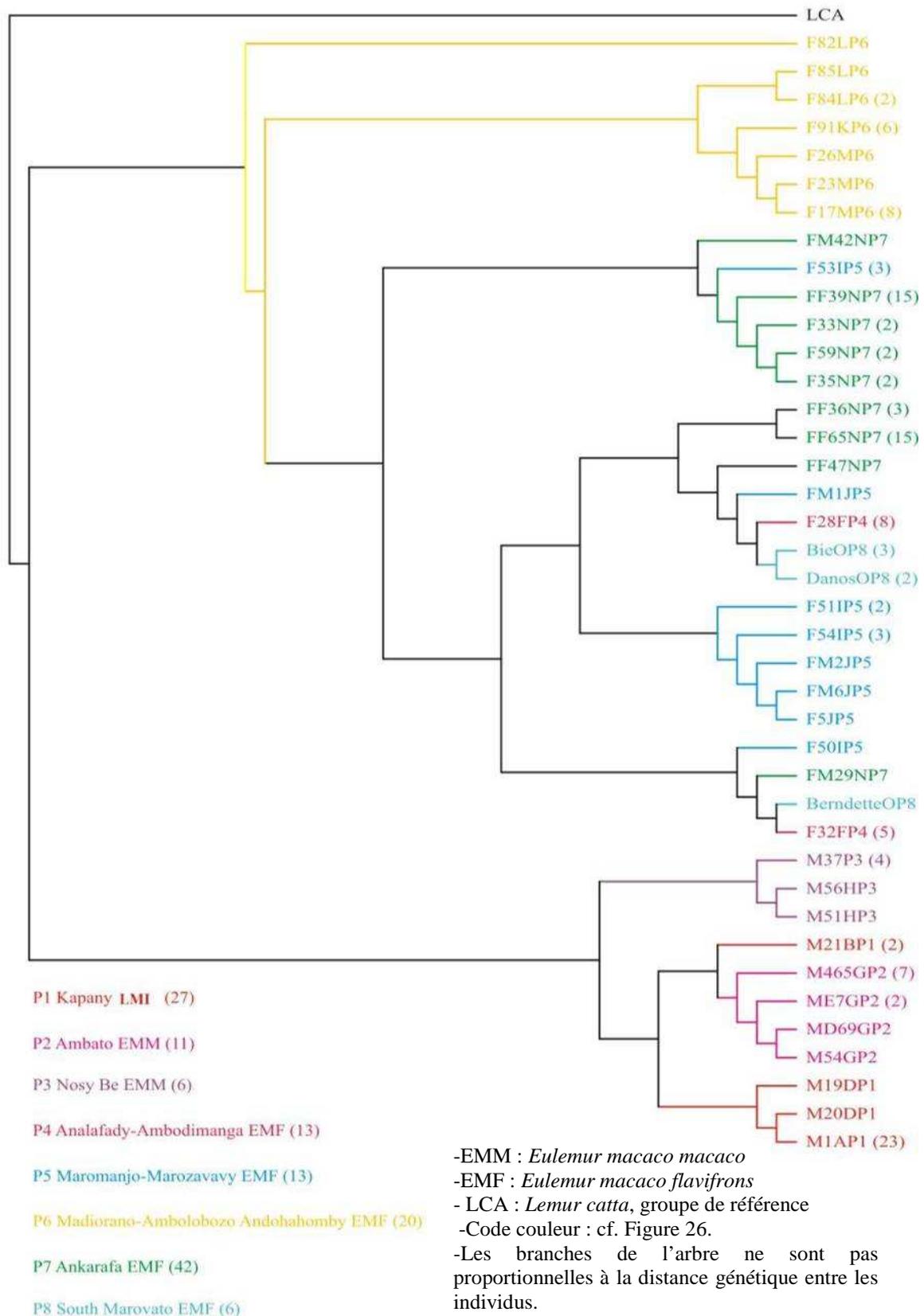
Les distances génétiques entre les séquences prises 4 à 4 (quartets) sont représentées par des points.

### **2. Lecture des cladogrammes**

Nous reprenons ici les explications fournies dans le paragraphe I-Matériel et Méthodes, pour faciliter la lecture des résultats. Les branches de l'arbre ML ne sont pas proportionnelles à la distance génétique entre les individus, alors que le cladogramme NJ représente des branches proportionnelles à la distance génétique séparant les individus (Figures 31 et 32). Les chiffres au niveau de chaque branche du cladogramme NJ représentent les valeurs de bootstrap. Le bootstrap est une méthode de ré-échantillonnage (Figure 32). Le programme effectue un tirage statistique des nucléotides et construit un arbre pour chaque tirage (dans notre étude 5000 tirages ont été effectués). Les chiffres sur les branches représentent le nombre de fois en pourcentage ou l'arrangement a été retrouvé.

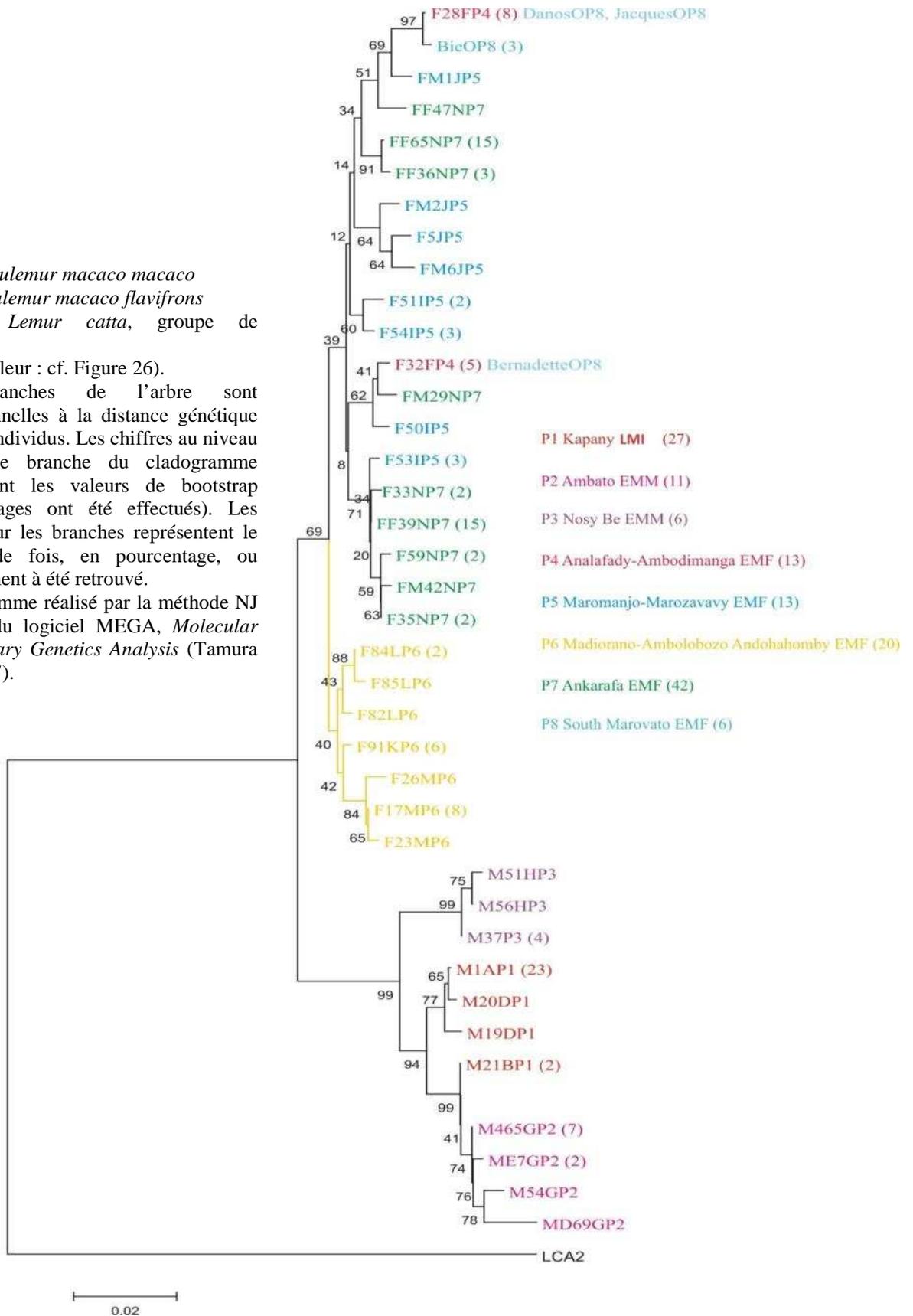
Donc « 100 » sur une branche menant à deux clades distincts signifie que les deux clades sont toujours séparés. Pour des branches plus courtes la valeur diminue, pour 50, par exemple, les clades ne sont séparés (résolus) que dans 50% des tirages. Donc plus la valeur de bootstrap est grande plus l'arbre est fiable. La valeur limite, statistiquement, est 95%. Mais en pratique, on admet que la branche est résolue pour des valeurs supérieures à 75%.

**Figure 31 : Cladogramme ML présentant la phylogénie des lémuriens de l'étude**



**Figure 32 : Cladogramme NJ présentant la phylogénie des lémuriens de l'étude**

-EMM : *Eulemur macaco macaco*  
 -EMF : *Eulemur macaco flavifrons*  
 -LCA2 : *Lemur catta*, groupe de référence  
 -Code couleur : cf. Figure 26).  
 -Les branches de l'arbre sont proportionnelles à la distance génétique entre les individus. Les chiffres au niveau de chaque branche du cladogramme représentent les valeurs de bootstrap (5000 tirages ont été effectués). Les chiffres sur les branches représentent le nombre de fois, en pourcentage, ou l'arrangement à été retrouvé.  
 -Cladogramme réalisé par la méthode NJ à l'aide du logiciel MEGA, *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Tamura et al. 2007).



### 3. Interprétation des cladogrammes

Concernant les LMI, on a remarqué que 25 des LMI sur 27 étaient regroupés dans le même clade. Les LMI 21 et 23 sortaient de ce clade compact pour se rapprocher des haplotypes présents à Ambato P2. Ces deux LMI différaient du clade compact des 25 LMI par six mêmes positions nucléotidiques mutées (Tableau 13).

**Tableau 13 : Détail des six positions nucléotidiques mutées chez les LMI 21 et 23.**

N° position	107	173	291	333	416	447
LMI 1	T	T	A	A	T	A
LMI 21 et 23	C	C	G	G	C	G

N°position : numéro de la position du nucléotide  
A : Arginine    T : Tyrosine    C :cystéine    G :guanine

Ainsi, nous avons pu faire ressortir de ces cladogrammes deux observations importantes concernant les LMI : 93% des LMI capturés étaient regroupés dans un même clade et les lémurs noirs de Nosy Be (P3) étaient plus distants des autres lémurs noirs.

Concernant les lémuriens capturés à AFADY, tous les lémuriens aux yeux turquoise capturés étaient donc effectivement placés dans le clade des *Eulemur macaco flavifrons*. Les 13 individus étaient répartis selon deux haplotypes distincts : F28FP4(8) et F32FP4(5). On ne peut pas conclure à leur plus grande proximité d' un autre groupe de lémuriens car les populations P5 (Maromanjo-Marozavavy), P7 (Ankarafa) et P8 (South Marovato) avaient des haplotypes se plaçant dans différents clades où ces populations étaient mélangées. Une seule population d'*E. m. flavifrons* se distinguait clairement des autres : P6 (Amboloboza-Andohahomby-Madiorano). Elle formait le clade de lémuriens aux yeux turquoise le plus proche des lémurs noirs.

### E. Estimation du nombre de groupements (clusters)

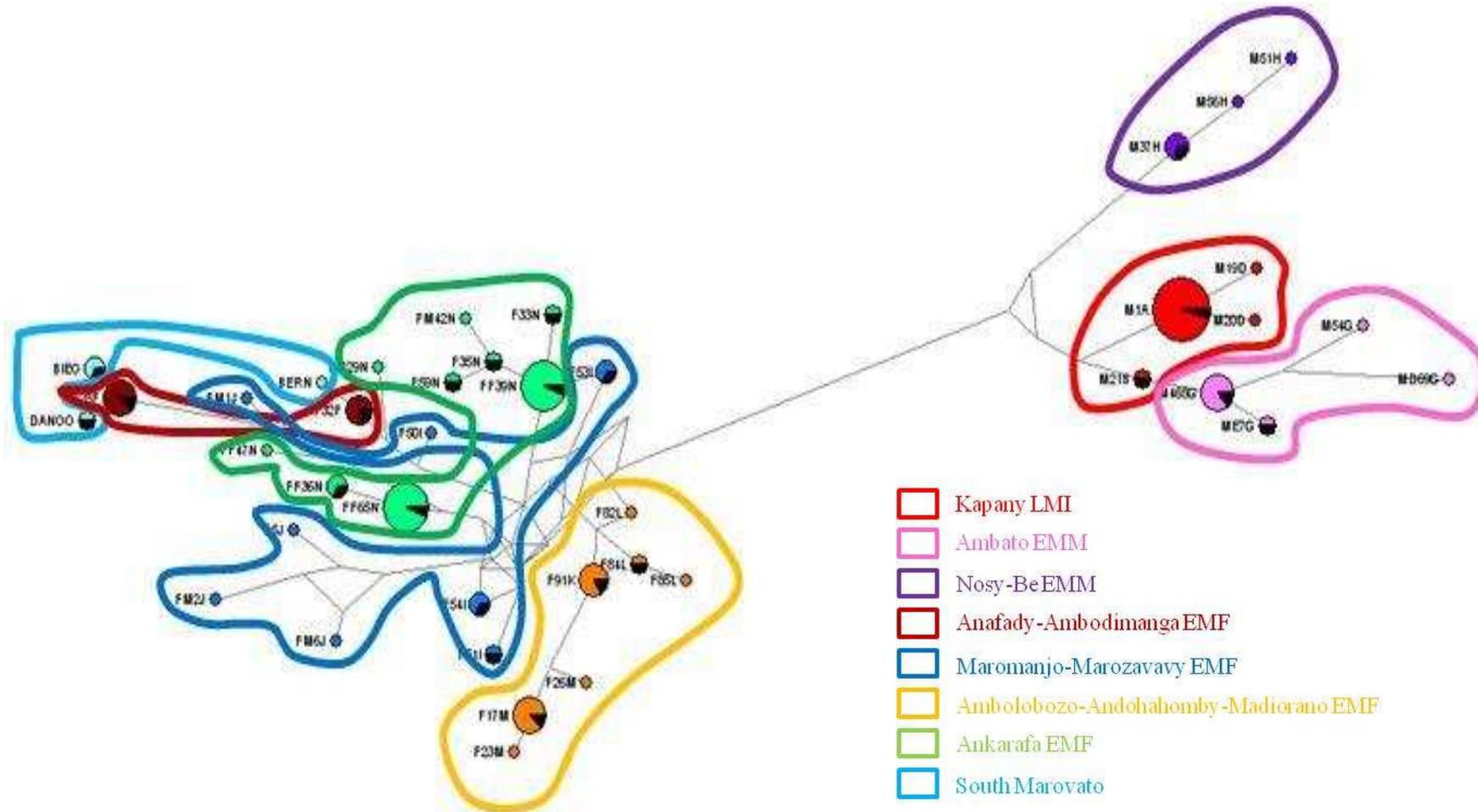
Nous avons estimé le nombre de groupement (clusters), le plus probable, qui permettrait d'expliquer la structure de notre population de lémuriens, à l'aide du logiciel STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000, Figure 33). Nous avons pu remarquer, concernant les lémuriens aux yeux turquoise, que seule la population P6(Amboloboza-Andohahomby-Madiorano) formait un groupe compact et défini.

Pour les *E. m. flavifrons* de la base de données , trois hypothèses sont possibles (Figure 33).

- Ils formeraient un seul cluster, car les distances génétiques étaient faibles entre tous les groupes.
- Ils formeraient deux clusters : P6 formant un cluster car cette population était bien distinctes des autres et le second cluster était formé par les populations P4, P5, P7 et P8.
- Ils formeraient cinq clusters : chaque population en formant un, mais cette solution est la moins probable puisque les populations 4, 5, 7 et 8 avaient des haplotypes qui s'entrecroisaient.

Concernant les lémurs noirs, nous avons remarqué que les animaux isolés sur l'île de Nosy-Be (P3) étaient plus éloignés génétiquement des populations P1 (Kapany) et P2 (Ambato) qu'elles ne l'étaient entre elles (Figure 33).

Figure 33 : Représentation graphique du nombre estimé de groupements.



Les haplotypes sont placés selon les distances génétiques qui les séparent. Le même code couleur qu'auparavant a été utilisé (Figure 26), mais la population (P1, P2, P3, etc.) n'est pas inscrite mais représentée par un trait de couleur entourant les haplotypes lui appartenant. Les ronds symbolisent les différents haplotypes. Leur taille est proportionnelle au nombre de fois où celui-ci est présent dans la base de donnée. Les camemberts symbolisent le regroupement d'haplotypes hétérogènes. Figure réalisée, par Dr D. Montagnon, à l'aide du logiciel STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) et édité par le logiciel NETWORK (Forster *et al.*, 1996).

Ainsi, nous avons pu considérer les *E. m. macaco* de la base de données comme formant soit :

- un seul cluster, car les distances génétiques entre les trois populations étaient relativement faibles,
- soit deux clusters, le premier formé par les animaux de P3 et P1 ; et P2 formant le second cluster.

Finalement, nous étions en présence de 2 ou 4 clusters (C1 et C2 ou C1, C2, C3 et C4). Dans le cas de deux clusters : C1=*E. m. macaco* (P1, P2, P3) ; C2=*E. m. flavifrons* (P4, P5, P6, P7 et P8). Dans le second cas, C1=P1+P2, C2= P3, C3= P4+P5+P7+P8 et C4=P6.

### III. Discussion sur les analyses génétiques et conclusion générale

Notre étude a porté sur l'analyse de 27 LMI comparés à une base de données de 17 échantillons d'*E. m. macaco* et 81 d'*E. m. flavifrons*. L'échantillonnage nous a paru suffisant pour conclure quant au statut taxonomique des LMI puisque Wyner *et al.* (2002) ont conclu au statut d'hybrides en se fondant sur les analyses de 21 animaux supposés hybrides, 9 d'*E. collaris*, 14 d'*E. fulvus rufus* et 16 d'*E. albocollaris*.

Pour analyser les échantillons de notre étude, nous avons choisi de travailler sur la D-loop (une séquence d'ADN mitochondriale caractérisée par une variabilité élevée). En effet, les distances génétiques intra et inter-sous-espèces ont été décrites comme très faibles dans le genre *Eulemur* (Ventura *et al.*, 2001). Ainsi, une analyse du cytochrome B (gène codant et donc fortement conservée, même entre espèces éloignées de mammifères) comme dans les travaux de Wyner *et al.* (2002), Pastorini *et al.* (2009), Clark *et al.* (2007) et Evans *et al.* (2001) par exemple, n'était pas appropriée à la distinction des LMI par rapport aux deux sous-espèces d'*Eulemur*.

Nos résultats ont montré que les LMI étaient distants de 10 nucléotides (soit 0,02 dTN) des *E. m. macaco*, en moyenne, et de 23 nucléotides (soit 0,048 en dTN) des *E. m. flavifrons*. Or, d'après nos analyses, les distances génétiques intra sous-espèces sont de 9 à 10 bp (0,018 à 0,02 en dTN) alors que les celles entre les sous-espèces sont de l'ordre de 26 bp (soit 0,054 en dTN). Donc, dans notre étude, les LMI étaient donc deux fois plus proches génétiquement des *E. m. macaco* que des *E. m. flavifrons*. Ceci un est un premier argument pour vouloir classer les LMI dans la sous-espèce des *E. m. macaco*. Il n'existe pas, dans la littérature, d'études analysant la D-loop des sous-espèces d'*E. macaco* pouvant être comparée à la notre. Pastorini *et al.* (2002) ont bien analysé 3 échantillons de chaque groupes mais en s'intéressant à des gènes codant (COIII, ND3, ND4L, 5tRNAs) qui ont une vitesse d'évolution plus lente que la D-loop. Grâce à la recherche du Dr D. Montagnon (communication personnelle) sur les analyses du cytochrome B précédemment réalisées sur les échantillons de la base de données, nous avons pu obtenir la distance génétique entre les sous espèces *E. macaco macaco* et *E. m. flavifrons*, exprimée en pourcentage de nucléotides variants par rapport à la longueur totale de la séquence. Elle était comprise entre 2,63% et 5,78% (Dr D. Montagnon, communication personnelle). Ces résultats sont du même ordre de grandeur que ceux de Pastorini *et al.* (2002) (distance génétique comprise entre 2,83% et

3,25%<sup>31</sup>). Cette similarité n'est pas surprenante sachant que les 6 échantillons de l'étude de Pastorini *et al.* (2002) provenaient d'Ambato pour les *E. m. macaco* (P2 dans notre étude) et de Maromandia pour les *E. m. flavifrons* (très proche de P4 de notre étude). Nous ne pouvons donc pas analyser la diversité génétique de nos localisations de prélèvements.

L'interprétation des cladogrammes a permis de définir le statut taxonomique des LMI. Ces représentations graphiques nous ont permis de remarquer que 93% des LMI étaient regroupés dans le même clade, inclus dans le groupe des *E. m. macaco*, clairement séparés de celui des *E. m. flavifrons*. **Les LMI que nous avons étudiés seraient donc des *Eulemur macaco macaco***. Nous les nommerons pour la suite les « lémuriens de Kapany », LDK pour les différencier des autres *E. m. macaco* de la base de données. Vingt cinq LDK sur 27 étaient regroupés dans le même clade. Nous pouvons donc conclure à une très faible diversité génétique présente chez les LDK. Les cladogrammes étant construits à partir des analyses génétiques, ils représentent graphiquement les distances génétiques entre les différents haplotypes. Ces graphiques ont permis d'observer que la population de l'île de Nosy-Be (P3, *E. m. macaco*) et celle de la région Madiorano, Amboloboza, Andohahomby (P6, *E. m. flavifrons*) formaient des groupes distincts des autres populations de leur sous-espèce respective. Ces deux groupes se sont éloignés génétiquement du reste des animaux de la sous-espèce, formant un isolat génétique qui n'a pas été brassé avec les autres populations. La vie insulaire des *E. m. macaco* de Nosy-Be peut expliquer cet état.

Ces séparations de populations ont été retrouvées dans l'analyse du nombre estimé de clusters. Cette observation a permis de développer deux hypothèses quant à la manière de regrouper les populations de lémuriens analysées : nous avons pu déterminer deux clusters (C1=*E. m. macaco* (P1=LDK, P2, P3) ; C2=*E. m. flavifrons* (P4, P5, P6, P7 et P8)) ou quatre (C1=P1+P2, C2=P3, C3= P4+P5+P7+P8 et C4=P6).

En se fondant sur ces observations, deux hypothèses peuvent être développées, la seconde impliquant une révision taxonomique.

- Si nous considérons qu'il existe deux clusters, la taxonomie reste inchangée : *E. m. macaco* et *E. m. flavifrons* sont bien deux sous-espèces d'*E. macaco*. Et nous avons mis en évidence trois populations génétiques (P1, P2 et P3) pour la première et cinq pour la seconde (P4, P5, P6, P7 et P8). La conservation du statut de sous-espèces pour ces deux groupes a été soutenue par de nombreux auteurs (Pastorini *et al.*, 2000, 2002, 2009 ; Groves, 2001 ; Rumpler, 2004). Ils se fondent sur une grande proximité génétique (Pastorini *et al.*, 2002), une morphologie semblable (Groves, 2001), sur un caryotype similaire et la possibilité de produire des hybrides viables et fertiles (Rumpler, 2004).
- Si nous considérons que les analyses génétiques révèlent la présence de quatre clusters, nous pouvons penser à une révision de la taxonomie. Cette division des sous-espèces, la plus basse catégorie hiérarchique de la classification, nous a fait nous questionner sur une éventuelle élévation de ces dernières au rang d'espèces.

Ce genre d'élévation taxonomique s'est produit dans le genre *Eulemur*. *Eulemur fulvus* comptait 6 sous-espèces mais en 2002, le « IUCN/Conservation Breeding Specialist Group » (CBSG, groupe de travail réunissant les plus grands spécialistes des lémuriens, considéré comme une référence) a proposé d'accepter le statut d'espèce pour *E. albocollaris*, *E. collaris* et *E. sanfordi*<sup>32</sup> mais de conserver le statut de sous-espèces pour *E. fulvus fulvus*, *E. f. rufus*,

---

<sup>31</sup> L'étude de Pastorini *et al.* (2002) portait sur la séquence de 2400bp. L'écart entre les sous-espèces d'*E. macaco* a été estimée à 68-72bp. Soit le calcul suivant pour les distances génétiques :  $(68 \times 100) / 2400 = 2,83$  et  $(72 \times 100) / 2400 = 3,25$ .

<sup>32</sup> Ces espèces possèdent des caryotypes différents : *E. albocollaris* (2N=48), *E. collaris* (2N=50-52) et *E. sanfordi* (2N=60) (Buettner-Janush et Hamilton, 1979 et Hamilton *et al.*, 1980 dans Wyner *et al.*, 2002).

*E. f. mayottensis* et *E. f. albifrons* (Mittermeier *et al.*, 2006). Groves (2001) est allé plus loin en proposant l'élévation de toutes les sous-espèces d'*E. fulvus* au rang hiérarchique supérieur (proposition non reconnue par le CBSG). Cet auteur se fondait sur des critères phénotypiques et cranio-dentaires. Tattersall (2007) a remarqué que l'élévation phylogénique de ces groupes poserait problème puisque l'espèce *E. macaco* serait alors la seule polytypique dans le genre *Eulemur*.

Ainsi, Mittermeier *et al.* (2008) ont proposé d'élever *E. m. macaco* et *E. m. flavifrons* au rang d'espèce (proposition non reconnue par le CBSG). Ces auteurs se sont fondés sur l'observation d'une zone d'hybridation restreinte (Meyers *et al.*, 1989 ; Rabarivola *et al.*, 1991 ; Schwitzer *et al.*, 2005 et 2006) et sur le calcul de distances génétiques. Les travaux de Pastorini *et al.* (2000 et 2002) ont démontré que les distances génétiques séparant les *E. fulvus* (29-90bp,) étaient du même ordre de grandeur que celles entre *E. m. macaco* et *E. m. flavifrons* (68-72bp). Mais sur ce point Mittermeier *et al.* (2008) n'ont pas pris en considération une potentielle introgression (barrière de reproduction permissive chez le genre *Eulemur*) réduisant la distance génétique sans pour autant justifier une révision taxonomique (Pastorini *et al.*, 2009). Les analyses génétiques, comme nous l'avons vu, ne peuvent pas permettre de conclure quant au statut taxonomique de populations en comparant leurs distances génétiques à une valeur seuil. Pour illustrer ce propos, le Dr Montagnon a réalisé une étude en calculant les distances de Tamura-Nei, sur des analyses de cytochrome b chez différentes espèces de lémurien (de la base de données de l'UNISTRA, communication personnelle) : *Avahi laniger* (0.00088 à 0.12634, 37 séquences), *Propithecus diadema edwardsi* et *P. verreauxi coronatus* (4 et 6 séquences respectivement, distances de 0.09550 à 0.10117). On a ainsi remarqué de plus grandes distances à l'intérieur d'une même espèce (*Avahi laniger* : 0.00088 à 0.12634) qu'entre deux espèces (*P. d. edwardsi* et *P. v. coronatus*: 0.09550 à 0.10117).

Les distances génétiques, comme déterminant du statut phylogénique, sont donc à manier avec les plus grandes précautions.

Pour trancher ce débat taxonomique, nous avons pu faire appel à notre étude de la morphométrie comparée entre *E. m. macaco* et *E. m. flavifrons*. D'après nos résultats, ces deux groupes partagent des mesures morphométriques tout à fait similaires. **Ainsi, nous proposons de conserver le statut de sous-espèces pour les *E. m. macaco* et *E. m. flavifrons*.**

Les LDK appartiennent bien à la sous-espèce *E. m. macaco*. L'étude morphologique des LDK ont montré que ces animaux correspondaient à la description générale des *E. m. macaco* mais nous avons pu noter quelques particularités (nuance d'intensité du pelage, couleur de la queue, ligne frontale, ligne suborbitale). Donc à la lumière de notre étude, nous proposons de considérer les LDK comme des **variants phénotypiques/morphologiques d'*Eulemur macaco macaco***. Les différents clusters précités sont donc considérés comme des populations génétiques (Clark, 2001).

Grâce à cette découverte, nous pouvons affirmer que la frontière sud de l'aire de répartition des *E. m. macaco* est matérialisée par la rivière Andranomalaza (Koenders *et al.*, 1985 ; Meyers *et al.*, 1989 ; Schwitzer *et al.*, 2005, 2006 ; Mittermeier *et al.*, 2006) et non la rivière Sambirano (Groves, 2001 et Mittermeier *et al.*, 1994 et 2008).

Les LDK étudiés ont présenté une très faible diversité génétique : 27 animaux caractérisés par 4 haplotypes. Ces animaux évoluaient à la frontière sud de l'aire de répartition des *E. m. macaco*, mitoyenne de la frontière nord de celle de l'autre sous-espèce d'*E. macaco*. Or cette aire était qualifiée de zone d'hybridation entre *E. m. macaco* et *E. m. flavifrons*

---

Tandis que les *E. m. macaco* et les *E. m. flavifrons* partagent le même caryotype (2N=44) (Rumpler et Dutrillaux, 1980 dans Rumpler 2004).

(Meyers *et al.*, 1989 ; Rabarivola *et al.*, 1991 ; Schwitzer *et al.*, 2006 ; Mittermeier *et al.*, 2008). Grâce à ces constats nous pouvons noter une diminution importante du brassage génétique entre les deux sous-espèces.

Plus généralement, nos résultats révèlent une faible diversité génétique dans le groupe des LDK et la population P2 (Ambato). Ceci laisse présumer que le brassage génétique<sup>33</sup> des *E. m. macaco* avec des lémuriens extérieurs a diminué (comme *E. fulvus* ou *E. sanfordi* ; Meyers *et al.*, 1989). Une diminution du brassage génétique d'une population est une menace pour sa survie. Elle peut être principalement imputable à la fragmentation de l'habitat de ces lémuriens (Rabarivola *et al.*, 1996 et 1998). Ce constat génétique ne peut pas être pour autant utilisé comme un indicateur de la viabilité des *E. m. macaco* (Fausser *et al.*, 2000).

Des mesures de protection concrètes, visant à protéger les forêts, seront les principaux acteurs de la sauvegarde des lémuriens à Madagascar.

MCours.com

---

<sup>33</sup> Un brassage génétique entre *E. m. macaco* et d'autres espèces d'*Eulemur* est plausible puisque dans ce genre, la barrière de reproduction est permissive (Pastorini *et al.*, 2009).