

# TABLE DES MATIERES

<u>TABLE DES MATIERES</u>	iii
<u>Listes des figures</u>	vii
<u>Listes des tableaux</u>	viii
<u>Liste des abréviations</u>	x
<u>Glossaire</u>	xii
<u>I- INTRODUCTION</u>	1
<u>I-1.- GENERALITES</u>	1
<u>I-2.- ETUDE GENETIQUE ET CONSERVATION</u>	2
<u>I-3.- OBJECTIFS, BUTS, PRINCIPES ET RESULTATS ATTENDUS</u>	3
<u>II.-MATERIELS ET METHODES</u>	4
<u>II-1.- MATERIEL BIOLOGIQUE</u>	4
<u>II-1-1.- SYSTEMATIQUE D'Avahi</u>	4
<u>II-1-2.- PRINCIPAUX SYNONYMES D'Avahi</u>	5
<u>II-1-3.- PRINCIPAUX SYNONYMES D'Avahi laniger</u>	5
<u>II-1-4.- REMARQUE SUR LA TAXONOMIE D'Avahi</u>	5
<u>II-1-5.- DESCRIPTION GENERALE ET MODE DE VIE</u>	6
<u>II-1-6.- REPARTITION GEOGRAPHIQUE DU GENRE Avahi (Figure 1, page 8)</u>	6
<u>II-1-6-1.- Avahi laniger</u>	6
<u>II-1-6-2.- Avahi peyrierasi</u>	7
<u>II-1-6-3.- Avahi meridionalis meridionalis</u>	7
<u>II-1-6-4.- Avahi meridionalis ramanantsoavani</u>	7
<u>II-1-6-5.- Avahi occidentalis</u>	7
<u>II-1-6-6.- Avahi unicolor</u>	7
<u>II-1-6-7.- Avahi cleesei</u>	7
<u>II-2 SITES D'ETUDE (Figure 2: page 13)</u>	9
<u>II-2-1.- DANS L'EST</u>	9
<u>II-2-1-1.- Au Nord de la rivière Mangoro</u>	9
<u>II-2-1-2.- Entre la rivière Mangoro et la rivière Menagnara</u>	10
<u>II-2-1-3.- Entre la rivière Menagnara et Fort-Dauphin</u>	11
<u>II-2-2 DANS L'QUEST</u>	12
<u>II-3.- TRAVAIL SUR TERRAIN</u>	14
<u>II-3-1.- MATERIELS UTILISES SUR TERRAIN</u>	14
<u>II-3-2.- IMMOBILISATION DE L'ANIMAL</u>	14
<u>II-3-3.- PESAGE</u>	14
<u>II-3-4.- PRELEVEMENT D'ECHANTILLON</u>	14
<u>II-3-5.- MENSURATIONS</u>	15
<u>II-3-6.- INJECTION DE SERUM LACTATE DE RINGER</u>	15
<u>II-3-7.- MARQUAGE DE L'ANIMAL</u>	16
<u>II-4.- TRAVAIL AU LABORATOIRE</u>	16

<u>II-4-1-1.- Extraction par du mélange de phénol-chloroforme-isoamylalcool et par du chloroforme .....</u>	17
<u>II-4-1-1-1.- Préparation du tissu.....</u>	17
<u>II-4-1-1-2.- Préparation du sang.....</u>	17
<u>II-4-1-2.- Purification de l'ADN.....</u>	17
<u>II-4-1-3.- Précipitation de l'ADN.....</u>	18
<u>II-4-1-4.- Quantification de l'ADN.....</u>	19
<u>II-4-2.- ETUDE DE L'ADN MITOCHONDRIAL.....</u>	19
<u>II-4-2-1.- L'ADN mitochondrial de Mammifères (figure 3, page 20).....</u>	19
<u>II-4-2-2.- Technique d'étude de l'ADN mitochondrial.....</u>	21
<u>II-4-3.- ETUDE DE L'ADN NUCLEAIRE.....</u>	22
<u>II-4-3-1.- Le microsatellite (figure 31, annexe page 156).....</u>	22
<u>II-4-3-2.- L'amorce.....</u>	22
<u>II-4-3-3.- Génotypage.....</u>	23
<u>II-4-3-4.- Lecture sur la machine ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER.....</u>	23
<u>III.-METHODES STATISTIQUES ET ANALYTIQUES.....</u>	24
<u>III-1.- COMPARAISON DES MOYENNES DES DIFFERENTES MESURES (test t).....</u>	24
<u>III-2.- ANALYSE DES SEQUENCES DE L'ADN MITOCHONDRIAL.....</u>	25
<u>III-2-1.- DISTANCE ENTRE DEUX SEQUENCES .....</u>	25
<u>III-2-2.- CONSTRUCTION D'ARBRE A PARTIR DES SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES.....</u>	26
<u>III-2-2-1.- Méthode phénétique basée sur les distances: la méthode de l'arbre le plus proche (neighbor-joining) (Saitou et Nei, 1987).....</u>	26
<u>III-2-2-2.- Méthodes basées sur les caractères.....</u>	27
<u>III-2-2-2-1.- La méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony).....</u>	27
<u>III-2-2-2-2.- La méthode de vraisemblance (maximum likelihood).....</u>	28
<u>III-2-2-3.- La méthode de "bootstrap" .....</u>	29
<u>III-2-2-4.- Enracinement des arbres phylogénétiques.....</u>	29
<u>III-2-2-5.- Méthode NETWORK.....</u>	29
<u>III-2-3.- ANALYSE DE L'AGREGATION DE POPULATIONS.....</u>	29
<u>III-3.- ANALYSE DES GENOTYPES DE L'ADN MICROSATELLITAIRE.....</u>	30
<u>III-3-1.- ETUDE AU NIVEAU DE CHAQUE POPULATION.....</u>	31
<u>III-3-1-1.- Test de l'équilibre de Hardy-Weinberg.....</u>	31
<u>III-3-1-2.- La diversité génétique, la richesse allélique et l'hétérozygotie .....</u>	32
<u>III-3-1-3.- Le coefficient de consanguinité (FIS).....</u>	32
<u>III-3-1-4.- Le test du goulot démographique (bottleneck) avec le test de Wilcoxon.</u>	34
<u>III-3-2.- ETUDE INTERPOPULATION.....</u>	34
<u>III-3-2-1.- La différenciation génétique (indice de fixation FST).....</u>	34
<u>III-3-2-2.- Test de la structure de la population .....</u>	35

<u>IV.-RESULTATS</u> .....	37
<u>IV-1.-PELAGE</u> .....	37
<u>IV-2.- MORPHOLOGIE</u> .....	39
<u>IV-2-1.- MORPHOMETRIE ET TEST DE COMPARAISON DES MOYENNES: TEST “t”</u> .....	39
<u>IV-2-1-1.- Mensurations morphométriques</u> .....	39
<u>IV-2-2-2.- Test de comparaison des moyennes: test “t”</u> .....	41
<u>IV-3.- ETUDE DE L’ADN MITOCHONDRIAL</u> .....	48
<u>IV-3.-1 ETUDE DU FRAGMENT D-LOOP</u> .....	49
<u>IV-3-1-1.- Méthode de la vraisemblance maximum (maximum likelihood)</u> .....	52
<u>IV-3-1-2.- Méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining)</u> .....	56
<u>IV-3-1-3.- Méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony)</u> .....	61
<u>IV-3-2.- ETUDE DES FRAGMENTS COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-tGLY, ARN-tARG, ARN-tSER et une partie d’ARN-tLEU</u> .....	67
<u>IV-3-2-1.- Méthode de la vraisemblance maximum (maximum likelihood)</u> .....	71
<u>IV-3-2-2.- Méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining)</u> .....	76
<u>IV-3-2-3.- Méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony)</u> .....	79
<u>IV-3-3.- ETUDE DE LA COMBINAISON DE LA SEQUENCE DU FRAGMENT D-loop ET DES FRAGMENTS COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t GLY, ARN-t ARG, ARN-t SER et ARN-t LEU</u> .....	84
<u>IV-3-3-1.- Méthode du plus proche voisin (neighbor-joining)</u> .....	86
<u>IV-3-3-2 Méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony)</u> .....	88
<u>IV-3-3-3.- Méthode de NETWORK</u> .....	90
<u>IV-4.- ETUDE DE L’ADN NUCLEAIRE</u> .....	92
<u>IV-4-1.- ETUDE AU NIVEAU DE CHAQUE POPULATION</u> .....	92
<u>IV-4-1-1 Test de l’équilibre de Hardy-Weinberg</u> .....	92
<u>IV-4-1-2.- La diversité génétique</u> .....	94
<u>IV-4-1-3.- Le nombre moyen d’allèles par loci et la richesse allélique</u> .....	95
<u>IV-4-1-4.- Le coefficient de consanguinité (FIS)</u> .....	96
<u>IV-4-1-5.- Test du goulot démographique (bottleneck)</u> .....	98
<u>IV-4-2-1.- La différenciation génétique entre populations</u> .....	99
<u>IV-4-2-2.- Test de la structure</u> .....	101
<u>V.-DISCUSSION</u> .....	103
<u>V-1.- ETUDE DE LA SEQUENCE DE L’ADN MITOCHONDRIAL</u> .....	103
<u>V-2.- ETUDE DE L’ADN NUCLEAIRE</u> .....	108
<u>V-2-1.- HETEROZYGOTIE</u> .....	109
<u>V-2-2 LA DIVERSITE GENETIQUE</u> .....	110
<u>V-2-3 LE NOMBRE MOYEN D’ALLELES PAR LOCI ET LA RICHESSE ALLELIQUE</u> .....	111

<u>V-2-4.- LA CONSANGUINITE.....</u>	112
<u>V-2-5.- LA DIVERSIFICATION.....</u>	114
<u>V-2-6.- LE GOULOT DEMOGRAPHIQUE.....</u>	115
<u>V-2-7 TEST DE LA STRUCTURE.....</u>	116
<u>CONCLUSION.....</u>	118
<u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	123
<u>ANNEXES.....</u>	134
<u>I.- AMPLIFICATION DE l'ADN: amplification de la chaîne par polymérisation ou (ACP).....</u>	134
<u>I.1.- Dénaturation.....</u>	135
<u>I.2.- Appariement.....</u>	135
<u>I.3.-Extension (élongation).....</u>	135
<u>II.- ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE .....</u>	138
<u>II-1.- Principe de la migration électrophorétique des fragments d'ADN .....</u>	138
<u>II-2.- Préparation du minigel d'agarose.....</u>	138
<u>II-3.- Chargement des échantillons et électrophorèse.....</u>	138
<u>II-4.- Photographie de l'ADN.....</u>	139
<u>III.- SEQUENCAGE DE L'ADN MITOCHONDRIAL.....</u>	141
<u>III-1.- Amplification de la chaîne par polymérisation.....</u>	141
<u>III-1-1.- pour le fragment D-loop.....</u>	141
<u>III-1-2.- Pour les fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t GLY, ARN-t ARG, ARN-t SER et une partie d'ARN-t LEU.....</u>	142
<u>III-2.- Electrophorèse sur gel d'agarose (annexeII, page 139).....</u>	146
<u>III-3.- Purification des produits par QIAGEN®.....</u>	146
<u>III-4.- Réaction de cycle de séquençage .....</u>	148
<u>III-5.- Purification des produits par du Sephadex G-50.....</u>	149
<u>III-5-1.- Préparation du sephadex G-50:.....</u>	149
<u>III-5-2.- Purification manuelle.....</u>	149
<u>III-5-3.- Purification avec machine.....</u>	150
<u>III-6.- Lecture sur la machine AUTOMATED 3100 SEQUENCER.....</u>	151
<u>III-6-1.- Chargement à l'AUTOMATED 3100 SEQUENCER.....</u>	151
<u>III-6-2.- Préparation du gel pour électrophorèse.....</u>	151
<u>III-6-3.- Préparation du produit à analyser et déroulement de l'électrophorèse.....</u>	152
<u>III-6-4.- Alignement des séquences.....</u>	152
<u>IV.- METHODE UTILISEE POUR AVOIR UNE AMORCE.....</u>	154
<u>IV-1.- Clonage.....</u>	154
<u>IV-2.- Séquençage.....</u>	159
<u>IV-3.- Test de la température.....</u>	160
<u>IV-4.- Test de polymorphisme.....</u>	161

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## Listes des figures

Figure 1: Ancienne répartition géographique des espèces du genre Avahi (Mittermeier et al, 2006).....	8
Figure 2: Sites d'étude du genre Avahi.....	13
Figure 3: Génome mitochondrial de Mammifères (Anderson et al, 1981).....	20
Figure 4: Vue faciale de Avahi laniger.....	38
Figure 5: Vue faciale de Avahi betsileo.....	38
Figure 6: Vue faciale de Avahi nova species.....	38
Figure 7: Les différences de bases de la séquence du fragment D-loop d'Avahi avec leurs positions respectives sur la séquence.....	51
Figure 8: Phylogramme de la vraisemblance maximum (maximum likelihood) dérivé de la séquence du fragment D-loop de 29 haplotypes d'Avahi et de 26 individus extragroupes... ..	53
Figure 9: Phylogramme de la vraisemblance maximum (maximum likelihood) dérivé de la séquence du fragment D-loop de Avahi.....	54
Figure 10: Phylogramme du groupe le plus proche (neighbor-joining) dérivé de la séquence du fragment D-loop de 77 Avahi et 25 individus extragroupes.....	58
Figure 11: Phylogramme du groupe le plus proche (neighbor-joining) dérivé de la séquence du fragment D-loop de Avahi.....	59
Figure 12: Phylogramme de la parcimonie maximum (maximum parsimony) dérivé de la séquence du fragment D-loop de 77 Avahi et de 25 individus extragroupes.....	62
Figure 13: Phylogramme de la parcimonie maximum (maximum parsimony) dérivé de la séquence du fragment D-loop de Avahi.....	63
Figure 14: Topologies obtenues par la méthode de maximum de vraisemblance (maximum likelihood), la méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining) et la méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony) du fragment D-loop.....	66
Figure 15: Les différences de bases de la séquence des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t GLY, ARN-t ARG, ARN-t SER et une partie d'ARN-t LEU d'Avahi avec leurs positions respectives sur la séquence.....	69
Figure 16: Phylogramme de la vraisemblance maximum (maximum likelihood) dérivé des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t GLY, ARN-t ARG, ARN-t SER et une partie d'ARN-t LEU de 77 Avahi et de 19 individus extragroupes.....	73
Figure 17: Phylogramme de la vraisemblance maximum (maximum likelihood) dérivé des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t GLY, ARN-t ARG, ARN-t SER et une partie d'ARN-t LEU de Avahi.....	74
Figure 18: Phylogramme du groupe le plus proche (neighbor-joining) dérivé des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t GLY, ARN-t ARG, ARN-t SER et une partie d'ARN-t LEU de 77 Avahi et de 19 individus extragroupes.....	77
Figure 19: Phylogramme du groupe le plus proche (neighbor-joining) dérivé des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t GLY, ARN-t ARG, ARN-t SER et une partie d'ARN-t LEU de Avahi .....	78
Figure 20: Phylogramme de la parcimonie maximum (maximum parsimony) dérivé des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t GLY, ARN-t ARG, ARN-t SER et une partie d'ARN-t LEU de 77 Avahi et de 19 individus extragroupes.....	80
Figure 21: Phylogramme de la parcimonie maximum (maximum parsimony) dérivé des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t GLY, ARN-t ARG, ARN-t SER et une partie d'ARN-t LEU de Avahi .....	81

Figure 22: Topologie de l'arbre obtenu en utilisant la méthode de vraisemblance maximum (maximum likelihood), la méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony) et la méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining) dérivé de la séquence des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t GLY, ARN-t ARG, ARN-t SER et une partie d'ARN-t LEU.....	83
Figure 23: Phylogramme du groupe le plus proche (neighbor-joining) de la combinaison du fragment D-loop et des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t GLY, ARN-t ARG, ARN-t SER et une partie d'ARN-t LEU de 39 haplotypes d'Avahi et de 19 individus extragroupes.....	86
Figure 24: Phylogramme de la parcimonie maximum (maximum parsimony) de la séquence combinée de 39 haplotypes d'Avahi et de 19 individus extragroupes. ....	88
Figure 25: Réseau d'enjambement minimum (NETWORK) à partir de la combinaison de la séquence du fragment D-loop et des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t GLY, ARN-t ARG, ARN-t SER et une partie d'ARN-t LEU des haplotypes d'Avahi.....	91
Figure 26: Résultat du test de la structure des populations d'Avahi.....	102
Figure 27: Les différentes étapes de l'amplification de la chaîne par polymérisation.....	137
Figure 28: Produits d'amplification de la chaîne par polymérisation après électrophorèse sur gel d'agarose.....	140
Figure 29: Fragments étudiés par Pastorini: COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t GLY, ARN-t ARG, ARN-t SER et une partie d'ARN-t LEU (Pastorini, 2000).....	143
Figure 30: Séquence d'acide nucléique.....	153
Figure 31: Eléctrophérogramme du microsatellite.....	156
Figure 32: PUC 19 (plasmide de l'université de Californie).....	157
Figure 33: Insertion d'ADN dans le plasmide.....	158

## Listes des tableaux

Tableau 1: Résultats des mensurations morphométriques.....	40
Tableau 2: Résultats du test-t (comparaison des moyennes) de toutes les espèces du genre Avahi.....	42
Tableau 3: Nombre de différences parmi les huit variables mesurés entre les différentes espèces du genre Avahi.....	47
Tableau 4: Distances entre les différentes espèces d'Avahi obtenues à partir de la séquence du fragment D-loop.....	57
Tableau 5: Distances entre les différentes espèces d'Avahi obtenues à partir de la séquence des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t GLY, ARN-t ARG, ARN-t SER et une partie d'ARN-t LEU.....	71
Tableau 6: Distances entre les différentes espèces d'Avahi obtenues à partir de la combinaison de la séquence du fragment D-loop et des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t GLY, ARN-t ARG, ARN-t SER et d'ARN-t LEU.....	85
Tableau 7: Nombre de différence de bases entre les différentes espèces d'Avahi à partir de la combinaison des séquences du fragment D-loop et des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t GLY, ARN-t ARG, ARN-t SER et une partie d'ARN-t LEU.....	85
Tableau 8: Résultat du test de l'équilibre de Hardy-Weinberg des populations d'Avahi.....	93
Tableau 9: La diversité génétique des populations d'Avahi.....	94
Tableau 10: Moyenne du nombre d'allèles par loci et richesse allélique des populations d'Avahi.....	95
Tableau 11: Coefficient de consanguinité (FIS) des populations d'Avahi.....	97
Tableau 12: Probabilité d'excès d'hétérozygote (IAM, test de Wilcoxon $\alpha < 5\%$ ) de 5 populations d'Avahi.....	98
Tableau 13: Diversification (FST) entre deux populations d'Avahi.....	100

Tableau 14: Produits utilisés pour l'amplification de la chaîne par polymérisation.....	136
Tableau 15: Produits utilisés pour le contrôle négatif.....	136
Tableau 16: Les différentes étapes de l'amplification de la chaîne par polymérisation.....	136
Tableau 17: Réactifs utilisés lors de l'amplification de la chaîne par polymérisation du fragment D-loop.....	141
Tableau 18: Séquence des amorces de Pastorini (Pastorini, 2000).....	144
Tableau 19: Réactifs utilisés lors de la réaction du cycle de séquençage.....	148
Tableau 20: Les différentes étapes de la réaction du cycle de séquençage.....	149
Tableau 21: Séquences des amorces utilisées pour le génotypage d'Avahi (Andriantompohavana et al, 2004).....	162
Tableau 22: Les échantillons étudiés pour la phylogénie.....	164

## Liste des abréviations

- A:** Adénine
- ACP:** Amplification en chaîne par polymérisation
- ADN:** Acide déoxy-nucléique
- ANGAP:** Association Nationale pour la Gestion des Aires Protégées
- ARG:** Arginine
- ARN:** Acide ribo-nucléique
- ATP:** Adénosine triphosphate
- C:** Cytosine
- CITES:** Convention on International Trade in Endangered Species
- CO:** Cytochrome oxydase
- dATP:** Di-adénine triphosphate
- dCTP:** Di-cytosine triphosphate
- dGTP:** Di-guanine triphosphate
- DIF:** Deionised formamide
- D-loop:** Displacement-loop
- DMSO:** Dimethyl sulfoxyde
- dNTP:** Di-nitrotriphosphate
- dTTP:** Di-thymine triphosphate
- EB:** Elution buffer
- EDTA:** Ethylene diamine tetracetate
- ESU:** Evolutionnary significant unit
- G:** Guanine
- GLY:** Glycine
- HIS:** Histidine
- IAM:** Infinite allele model
- IPTG:** Isopropylthio- $\beta$ -galactoside
- LEU:** leucine
- MEGA:** Molecular Evolutionnary genetic Analysis
- MCS:** Multicloning site
- NADH:** Nicotineamide hydrogenase
- ND:** Nicotineamide dehydrogenase

**OSP:** Oligo selection programm

**PAA:** Population aggregate analysis

**PAUP:** Phylogenetic analysis using parsimony

**PCR:** Polymerase chain reaction

**PUC:** Plasmid of university of California

**SDS:** Sodium dodecyl sulfate

**SER:** Sérine

**STE:** Sodium tris-ethylene diamine tetraacetate

**T:** Thymine

**TAE:** Tris-acetate elution

**TBE:** Tris-borate elution

**TE:** Tris elution

**Tris-EDTA:** Tris acetate ethylene diamine tetraacetate

**UICN:** Union internationale pour la conservation de la nature

**UV:** Ultraviolet

**X-Gal:** X-galactoside

## Glossaire

**Allèle:** C'est une variation du matériel génétique ou bien c'est une forme alternative d'un gène.

**Amorce:** C'est une courte séquence d'ADN qui, hybridée avec un matrice d'acide nucléique permet à une polymérase d'initier à la synthèse du brin complémentaire.

**Bootstrap:** C'est une méthode estimant le degré de confiance des relations de parenté.

**Clade:** C'est un groupe d'organismes issus d'un ancêtre commun.

**Cluster:** C'est un groupe d'entité défini à partir d'une population, basé sur la similarité en utilisant la technique d'analyse des clusters.

**Diversité génétique:** C'est la mesure de la variation génétique dans une population.

**Extra-groupe:** C'est un groupe permettant de déterminer la racine d'un cladogramme.

**Flux génique:** C'est un mouvement de gènes chez des populations du aux migrations ou à la reproduction.

**Gène:** C'est une séquence de nucléotides codant pour une protéine.

**Génétique de population** C'est une étude des fluctuations des fréquences des différentes versions d'un gène (allèles) au cours du temps dans les populations d'êtres vivants, sous l'influence de la sélection naturelle, de la dérive génétique, des mutations et des migrations et cherche à expliquer l'adaptation et la spéciation.

**Génotype:** C'est une variation d'ADN dans un ou plusieurs loci chez un individu.

**Goulot démographique:** C'est une réduction de la taille de la population qui présente une influence sur la variation génétique.

**Groupe-frère:** Deux clades dérivant de la séparation d'une même lignée.

**Hétérozygotie:** un même allèle est en deux formes dans un locus génétique.

**Heuristique:** C'est un algorithme permettant de réduire le temps pour appliquer une méthode.

**Loi de Hardy-Weinberg:** Cette loi énonce que les fréquences alléliques et les fréquences génotypiques restent stables de génération à génération.

**Marqueur génétique:** C'est une séquence d'ADN repérable spécifiquement.

**Maximum de vraisemblance:** C'est une méthode statistique utilisée pour inférer les paramètres de la distribution de la probabilité d'un échantillon donné.

**Neighbor-joining:** C'est une méthode qui consiste à calculer les longueurs des branches, telles que les distances déduites de l'arbre soient les plus proches mesurées entre les séquences; et ensuite à calculer la longueur de l'arbre, égale à la somme des longueurs des ses branches.

**NETWORK:** C'est un cladogramme dont l'ancêtre n'est pas connu et la direction de l'évolution suit les états de caractères.

**Parcimonie:** C'est une méthode permettant de choisir un cladogramme dont l'arbre ayant le plus petit nombre de changement des états de caractères est le plus parcimonieux.

**Paraphylétique:** C'est un terme appliqué à un groupe d'organisme dont tous les descendants ne sont pas issus d'un ancêtre commun.

**Phylogénie:** C'est l'étude de l'évolution des organismes vivants en vue d'établir leur parenté.

**Richesse allélique:** C'est une mesure de la diversité génétique en tenant compte des différents types d'allèle.

**Systématique:** C'est l'étude de la diversité biologique en vue de sa classification. Elle est divisée deux: la phylogénétique et la taxinomie.



# I- INTRODUCTION

## I-1.- GENERALITES

Madagascar est une île remarquable par sa faune et sa flore avec un taux d'endémisme élevé (Myers, 1986; Goodman et Benstead, 2003, Mittermeier *et al*, 2004). Les forêts humides malgaches sont extraordinairement riches en espèces endémiques dont 100% pour les Primates; 99% pour les Amphibiens, 70 % pour les plantes. Madagascar est actuellement en pleine crise environnementale due à la déforestation qui cause des fragmentations de la forêt conduisant par la suite à la disparition de la faune et de la flore. A l'origine, les forêts humides de Madagascar couvraient 112 000 km<sup>2</sup> et le taux annuel de la déforestation à Madagascar est environ 1100 km<sup>2</sup> par an; avec cette allure la forêt humide ne couvrira que 1,5 % de la surface totale des aires protégées en 2020 (Green et Sussman, 1990). Actuellement, 90% de la couverture forestière originale est détruite alors que les aires protégées censées abritant tous les éléments représentatifs de la diversité biologique de Madagascar ne représentent que 3% de l'ensemble du territoire et que 44% de la forêt restante ont disparu entre 1940 et 2000 (Mittermeier *et al*. 2006). Le principal facteur de la dégradation de la communauté biologique de la faune et de la flore ayant évolué pendant des millions d'années est l'action humaine (Heywood, 1995; Lawton et May, 1995). En effet, des plantes invasives deviennent préoccupantes après la pratique du "tavy" défavorisant la régénération forestière, le nombre des espèces diminue et certaines sont en voie d'extinction pendant une courte période; par ailleurs, la déforestation laisse derrière elle des sols nus et fragiles. L'érosion qui s'ensuit est extrêmement importante provoquant chaque année le déversement de milliards de couches de sols arables dans les rivières dont près de 250 tonnes de terres par hectare par an se déversent dans l'Océan (Helfert et Wood, 1986). Les aires protégées à Madagascar n'occupent que 16 131 km<sup>2</sup> soit 2,7% de la surface totale de l'île (Randrianandrianina *et al*, 2003), selon la vision de Durban durant le WORLD PARK CONGRESS en 2003 et l'application du Madagascar Action Plan, des efforts sont actuellement déployés pour augmenter de trois fois la surface totale des aires protégées malgaches jusqu'à 2012 soit jusqu'à 6 millions d'hectares.

Par ailleurs la forte croissance démographique, qui est doublée tous les 20 ans, constitue un facteur d'aggravation sérieux du problème environnemental à Madagascar. Madagascar compte parmi les pays à forte croissance démographique avec un taux de 2,8 à 3,8 % par an

(Population Référence Bureau, 2001) alors que la population dépend de la forêt pour ses besoins quotidiens (Goodman et Patterson, 1997). En effet le niveau de la pauvreté de la population constraint les habitants à avoir recours aux ressources naturelles de façon destructive et la richesse en espèces a diminué d'une manière inversement proportionnelle avec l'augmentation de la population humaine (Leakey et Lewin, 1996).

La diversité, l'endémicité en espèce, genre et famille, la disparition de la couverture forestière et la disparition de certaines espèces mettent Madagascar à la place de l'une des hautes priorités de conservation qui est parmi les 12 pays au sommet de la mégadiversité (Mittermeier *et al*, 2004). En effet, Madagascar fait partie du "hot spot" avec une priorité de conservation globale (Mittermeier *et al*, 2004) alors que 75-81% de sa flore et sa faune sont endémiques (Goodman et Patterson, 1997).

## **I-2.- ETUDE GENETIQUE ET CONSERVATION**

Dans le passé, la biologie de conservation a été concentrée sur l'écologie mais actuellement elle nécessite beaucoup les approches génétiques (Avise et Hamrick, 1996). La génétique de conservation est une importante discipline qui permet de déterminer la catégorie taxonomique d'une espèce (Hubby et Throckmorton, 1965, Avise, 1994) et d'estimer les paramètres génétiques de la population telles que l'hétérozygotie, le nombre d'allèle, la diversité génétique, le degré de consanguinité, la différenciation, la structure de la population (Frankham *et al*, 2003) ce qui mettent en place l'importance de la protection de l'habitat pour la conservation d'une population (Tilman *et al*, 1994) afin qu'il y aura échange de flux génique entre les différentes populations afin de maintenir la diversité génétique et d'éviter l'augmentation du taux de consanguinité. En effet les paramètres génétiques font partie des requêtes pour la conservation de la diversité biologique (Mc Neely *et al*, 1990).

La dégradation de l'habitat conduit à l'augmentation de l'isolement des populations régionales et une perte de la diversité génétique (Leberg *et al*. 1994). Ainsi l'isolement des populations limite les échanges des matériels génétiques entre populations; les espèces possédant une basse diversité génétiques sont particulièrement vulnérables à l'extinction (Pimm et Askins, 1995) et la baisse de l'hétérozygosité (réduction des allèles due à la perte de variabilité génétique) diminue la capacité d'adaptation au changement écologique, la résistance aux maladies et la capacité de se reproduire (Jiménez *et al*, 1994).

## I-3.- OBJECTIFS, BUTS, PRINCIPES ET RESULTATS

### ATTENDUS

Vue la fragmentation de la forêt actuellement ayant pour effet indirect la réduction de la diversité génétique de la population lémurienne conduisant vers la consanguinité et l'extinction, les objectifs de notre étude sont de pouvoir qualifier les nouvelles espèces dans la classification du statut de conservation UICN et la conservation de la population d'*Avahi* de l'Est et de l'Ouest de Madagascar.

a- Notre étude a pour buts de réviser la classification du genre *Avahi* (Jourdan, 1834) et d'étudier l'effet de la fragmentation de la forêt sur la santé génétique et la structure génétique de la population d'*Avahi* collectés dans plusieurs sites à Madagascar.

b- Pour la systématique, le principe est d'analyser les séquences des fragments de l'ADN mitochondrial afin d'établir la phylogénie pour déterminer la classification du genre *Avahi*. Pour la génétique de population, le principe c'est d'étudier l'ADN nucléaire afin de déterminer la santé génétique de chaque population.

c- Le résultat attendu pour l'étude de la systématique c'est la présence ou non de nouvelles espèces d'*Avahi*, tandis que pour la génétique de population les résultats attendus sont de connaître le degré de consanguinité, le taux d'hétérozygotie, le nombre d'allèle par loci, la richesse allélique, la diversité génétique, si la population a subi un goulot démographique, les diversifications entre les différentes populations et la présence de structure ou non entre les populations.

## II.-MATERIELS ET METHODES

### II-1.- MATERIEL BIOLOGIQUE

Nous avons étudié le genre *Avahi* (Jourdan, 1834) de l'Est et de l'Ouest de Madagascar avec ses différentes espèces qui sont *Avahi laniger*, *Avahi peyrierasi*, *Avahi meridionalis ramanantsoavani*, *Avahi meridionalis meridionalis*, *Avahi occidentalis*, *Avahi unicolor* et *Avahi cleesei*.

#### II-1-1.- SYSTEMATIQUE D'*Avahi*

Dans notre étude, nous avons utilisé la systématique du genre *Avahi* adoptée dans Mittermeier *et al*, 2006 et Zaramody *et al*, 2006.

Règne: ANIMAL

Phylum: CHORDES

Embranchement: VERTEBRES

Classe: MAMMIFERES

Sous-classe: THERIENS

Infra-classe: EUTHERIENS

Ordre: PRIMATES

Sous-ordre: STREPSIRHINII

Infra-Ordre: LEMURIFORMES

Super-famille: LEMUROIDEA

Famille: INDRIIDAE

Genre: *Avahi* (Jourdan, 1834)

Espèce:

*-laniger* (Gmelin, 1788)

*-meridionalis meridionalis* (Zaramody *et al*, 2006)

*-meridionalis ramanantsoavani* (Zaramody *et al*, 2006)

*-peyrierasi* (Zaramody *et al*, 2006)

*-occidentalis* (Lorenz, 1898)

*-unicolor* (Thalmann et Geissmann, 2000)

*-cleesei* (Thalmann et Geissmann, 2005)

Noms vernaculaires:

- Malagasy: Ampongy, Avahy, Fotsiefaka, Fotsife, Dadintsifaky, Tsarafangitra
- Anglais: Eastern Woolly Lemur, Eastern Avahi, Western Woolly Lemur, Western Avahi, Sambirano Avahi, Cleese's Wooly lemur
- Français: Avahi Laineux Oriental, Avahi Occidental

## **II-1-2.- PRINCIPAUX SYNONYMES D'*Avahi***

- Avahi* Jourdan, 1834  
*Lemur* Gmelin, 1788; Link, 1795  
*Indri* E. Geoffroy, 1796  
*Lichanotus* Illiger, 1811  
*Indris* A. Smith, 1833  
*Microrhynchus* Jourdan, 1834  
*Avahis* I. Geoffroy, 1835  
*Hadrocebus* Wagner, 1840  
*Semnocebus* Lesson, 1840  
*Iropocus* Glober, 1841

## **II-1-3.- PRINCIPAUX SYNONYMES D'*Avahi laniger***

- Avahi laniger laniger* Gmelin, 1788  
*Lemur brunneus* Link, 1795  
*Indri longicaudatus* E. Geoffroy, 1796  
*Indris laniger* A. Smith, 1833  
*Habrocebus lanatus* Wagner, 1840  
*Semnocebus avahi*, Lesson, 1840  
*Lichanotus avahi*, van der Hœven, 1844  
*Avahis laniger orientalis* Lorenz von Liburnau, 1898

## **II-1-4.- REMARQUE SUR LA TAXONOMIE D'*Avahi***

*Avahi* a pour synonyme de *Indri* avec une fourrure gris brun et une longue queue. *Avahi* a été observé pour la première fois par Sonnerat qu'il l'a nommé "maquis àbourré" (Sonnerat planche 189) mais sa première description a été faite par Gmelin en 1788. Ce fut Grandidier en 1875 qui a peint les deux formes d'*Avahi* (Grandidier planche 109, planche 110) dont ces deux formes ont été considérées comme sous-espèces: *Avahi laniger laniger* (Gmelin, 1788) et *Avahi laniger occidentalis* (Lorenz, 1898).

*Avahi* et *Indri* étaient classés dans le même genre *Indri* (E. Geoffroy, 1796) mais en 1811, Illiger les nommait genre *Lichanotus*. Plus tard, les systématiciens s'accordent que ceux sont des espèces différentes et A. Smith (1833) nommait *Lichanotus* pour *Indri* et *Indris* pour *Avahi* alors qu'Elliot (1913) appelait *Lichanotus* pour *Avahi* et *Indris* pour *Indri*.

Ainsi, *Lichanotus* est synonyme de *Indri* et n'est pas valable pour *Avahi*, c'est ainsi que Jourdan a nommé le genre *Avahi* en 1834.

Après des études cytogénétiques deux espèces différentes ont été découvertes qui sont *Avahi laniger* et *Avahi occidentalis* (Rumpler *et al*, 1990). Actuellement, cinq espèces ont été récemment découvertes, *Avahi unicolor* (Thalmann et Geissmann, 2000), *Avahi cleesei* (Thalmann et Geissmann, 2005), *Avahi peyrierasi* (Zaramody *et al*, 2006), *Avahi meridionalis meridionalis* (Zaramody *et al*, 2006), et *Avahi meridionalis ramanantsoavani* (Zaramody *et al*, 2006).

## **II-1-5.- DESCRIPTION GENERALE ET MODE DE VIE**

Le genre *Avahi* est le seul nocturne et la plus petite taille parmi les genres de la famille des Indriidae. *Avahi* pèse de 900 g à 1300g (Garbutt, 1999), son pelage clair roux foncé, dense et laineux. Les poils sont en forme des boucles au niveau du dos et de la cuisse. Le corps est gris brun à roux devenant pâle jusqu' à la queue. La partie ventrale est grise, la couleur de la face varie d'une espèce à une autre. La queue est recouverte de poils gris avec une tache rousse à la base. La partie ventrale a une coloration crèmeuse. La partie interne de la cuisse est blanche. La queue est plus longue que le corps. Il est monogame et vivant généralement en deux ou trois individus par groupe (Albignac, 1981); la naissance du nouveau-né se situe entre le mois d'août et le mois de septembre (Rowe, 1996).

## **II-1-6.- REPARTITION GEOGRAPHIQUE DU GENRE *Avahi* (Figure 1, page 8)**

### **II-1-6-1.- *Avahi laniger***

*Avahi laniger* vit dans la forêt humide de l'Est (Sterling et Mc Fadden, 2000; Mittermeier *et al*, 2006) dont la limite Ouest est la Réserve Spéciale d' Ambohitantely (Garbutt, 1999). Cette espèce se rencontre aussi dans la Réserve Spéciale de l'Ankarana, dans le Nord de Madagascar (Hawkins *et al*, 1990).

## **II-1-6-2.- *Avahi peyrierasi***

*Avahi peyrierasi* est trouvée au Sud de la rivière Mangoro jusqu'à Mahasoarivo (Zaramody *et al*, 2006).

## **II-1-6-3.- *Avahi meridionalis meridionalis***

*Avahi meridionalis* est trouvée dans la Réserve d'Andohahela et dans la forêt de Sainte Luce à Taolagnaro (Zaramody *et al*, 2006).

## **II-1-6-4.- *Avahi meridionalis ramanantsoavani***

*Avahi meridionalis ramanantsoavani* est trouvée dans la région de Manombo, district de Farafangana (Zaramody *et al*, 2006)

## **II-1-6-5.- *Avahi occidentalis***

*Avahi occidentalis* est trouvée au Nord de la rivière Betsiboka jusqu'à la Baie de Narinda (Thalmann et Geissmann, 2000).

## **II-1-6-6.- *Avahi unicolor***

*Avahi unicolor* est trouvée dans la région du Sambirano, y incluse la partie Ouest de la Réserve Spéciale de Manongarivo (Raxworthy et Rakotondramparany, 1988) et la presqu'île d'Ampasindava (Thalmann et Geissmann, 2000). Elle est rencontrée entre la rivière Sambirano au nord et soit la rivière Andranomalaza soit la rivière Maevarano au sud (Thalmann et Geissmann, 2000).

## **II-1-6-7.- *Avahi cleesei***

*Avahi cleesei* est trouvée dans le Parc National de Bemaraha, au nord de la rivière de Manambolo (Thalmann et Rakotoarison, 1994; Mittermeier *et al*, 2006); la limite nord de sa répartition géographique est encore mal définie.

N



0 \_\_\_\_\_ 100km

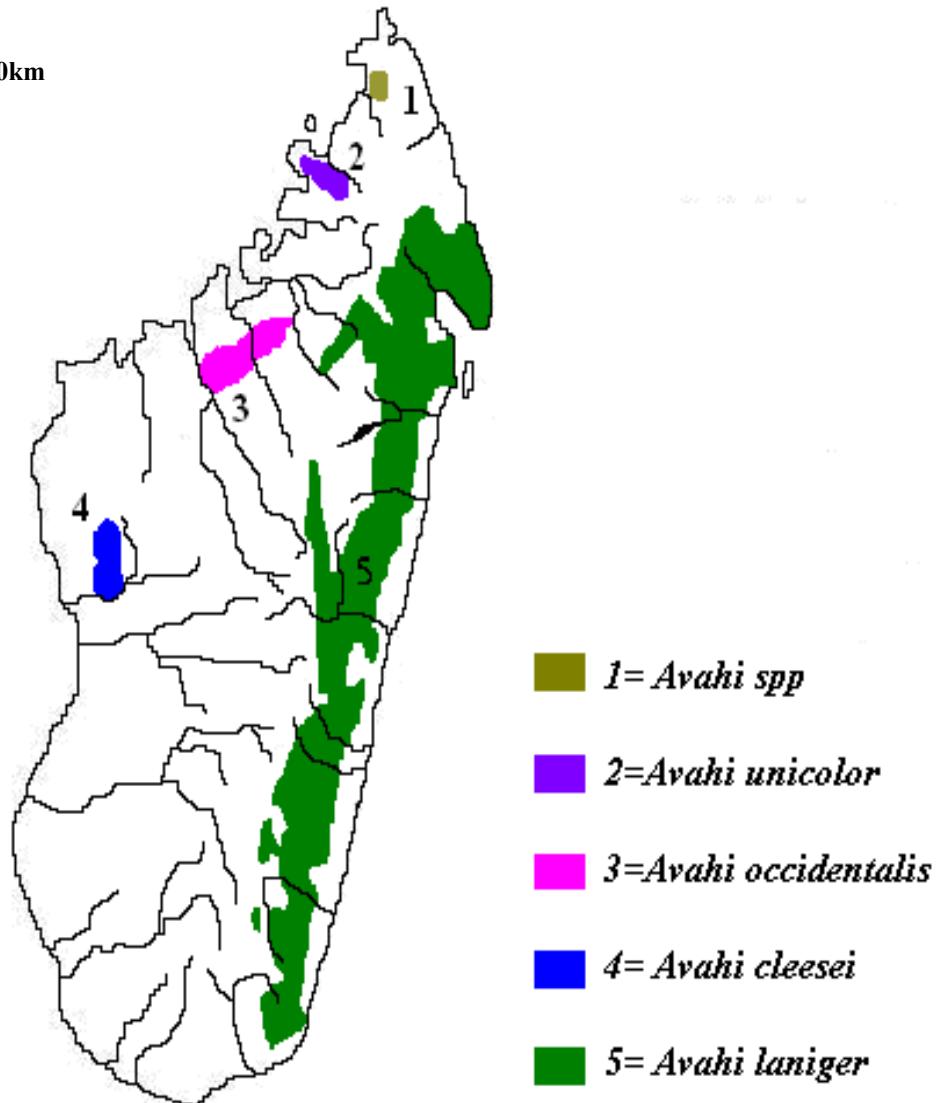


Figure 1: Ancienne répartition géographique des espèces du genre *Avahi* (Mittermeier et al, 2006)

## **II-2 SITES D'ETUDE (Figure 2: page 13)**

### **II-2-1.- DANS L'EST**

#### **II-2-1-1.- Au Nord de la rivière Mangoro**

\*Réserve Spéciale d'Anjanaharibe-Sud

La Réserve Spéciale d'Anjanaharibe-Sud se trouve à 15km au Sud de la ville d'Andapa, distant de 40 km au Sud du Parc National Marojejy et occupant une superficie de 17 194 ha. Elle fait partie des derniers sanctuaires des forêts de moyenne et de haute altitude de Madagascar. Les coordonnées géographiques de notre site sont S14°47' E049°28'.

\*Parc National Masoala

Le Parc National se trouve dans la Presqu'île de Masoala à cheval entre la Province d'Antsiranana et la Province de Tamatave. Il occupe une superficie de 210 000ha et est limité à l'Est par l'Océan Indien et à l'Ouest par la Baie d'Antongil et le plateau Makira. Les coordonnées géographiques de notre site sont S15° 40' E049° 57'.

\*Réserve Spéciale Marotandrano

La Réserve Spéciale de Marotandrano est située dans le nord de Madagascar dans la Sous-préfecture de Mandritsara. La forêt d'Ambiniviny constituant la Réserve s'étend entre S16°10-16°30' et E048°50'-049°10' et occupant une superficie de 42.000 ha. Notre site est à Anjiabolo situé à 10 km de la commune rurale de Marotandrano ayant comme coordonnées géographiques S16° 16' E048°49'

\*Parc National Mananara-Nord

Le Parc National Mananara-Nord occupe une superficie de 23 000ha. Notre site est dans la forêt d'Ivontaka-Sud, situé à 10km au Nord-Ouest du village de Sahasoa et ayant comme coordonnées géographiques S 16° 18' E 049°46'.

\*Parc National Zahamena

Le Parc National Zahamena est situé dans la Sous-préfecture d'Ambatondrazaka, à l'Est du Lac Alaotra occupant une superficie de 42 000ha. Notre site est à Antenina situé à 20km à l'Est de la Commune d'Ampasindava ayant comme coordonnées géographiques S17°29' E048°44'.

#### **\*Réserve Naturelle Intégrale de Betampona**

La Réserve Naturelle Intégrale de Betampona est située à 40km au Nord-Ouest de Tamatave. Elle est complètement isolée parce que toutes les forêts aux alentours sont toutes dégradées. Les coordonnées géographiques de notre site sont S 17° 55' E049°12'.

#### **\*Parc National Mantadia**

Le Parc National Mantadia est situé au Nord du village d'Andasibe recouvrant une superficie de 15 500 ha. Les coordonnées géographiques de notre site sont S 18°48' E 048°25'.

#### **\*Forêt classée de Maromizaha**

La forêt classée de Maromizaha est située dans la Commune rurale d'Andasibe, au Sud-Est de la Réserve Spéciale d'Analama. Les coordonées géographiques de notre site sont S18°58' E048°27'.

#### **\* Forêt classée d'Anjozorobe**

La forêt d'Anjozorobe fait partie du couloir forestier Anjozorobe-Angavo situé dans les hautes terres centrales malgache ayant une superficie totale de 52.000 ha dont 2 660 ha du coté d'Anjozorobe. Ce couloir forestier constitue l'un des derniers vestiges de forêts naturelles des hautes terres centrales malgache et il est situé à 10km à l'Est de la ville d'Anjozorobe. Les coordonnées géographiques de notre site sont S18°27' E047°56'.

### **II-2-1-2.- Entre la rivière Mangoro et la rivière Menagnara**

#### **\*Forêt classée d'Andohariana.**

C'est une forêt classée située dans la Commune d'Ankarinoro Sous-préfecture de Fandriana faisant partie du corridor forestier Fandriana-Marolambo. Les coordonnées géographiques de notre site sont S20°20' E047°33'.

#### **\*Foret classée de Tsinjoarivo**

C'est l'unique forêt tropicale de haute altitude trouvée à l'escarpement séparant le plateau central et le versant est de Madagascar. Elle est située à 70km à l'Est d'Ambatolampy, dans la Commune rurale de Tsingy de Bemaraha et fait partie du bloc forestier non protégé du plateau central de Madagascar. Les coordonnées géographiques de notre site sont S19°41' E047°46'.

#### \*Parc National Ranomafana

Le Parc National de Ranomafana est situé à 60 km au Nord-Est de Fianarantsoa, occupant une superficie de 41 000 ha. Les coordonnées géographiques de nos sites sont S21°14' E 047°25' à Talatakely et S 21°14' E 047°22' à Vohiparara.

#### \*Foret classée de Tolongoina

La forêt classée de Tolongoina est située dans la Sous-préfecture de Fort-Carnot à 46km au Sud de la ville d'Ifanadiana. Les coordonnées géographiques de notre site sont S21°30' E047°24'.

#### \*Foret classée de Lakia

La forêt classée de Lakia est située dans la commune rurale d'Andonabe, Sous-préfecture de Mananjary, à 80 km au Nord-Ouest de Manakara. Les coordonnées géographiques de notre site sont S21°30' E047°54'.

#### \*Parc National Andringitra

Le Parc National d'Andringitra est située à 47 km au Sud-Est de la ville d'Ambalavao, occupant une superficie de 31 160 ha. Notre site est situé à Ambarongy dans la forêt classée au Nord du Parc National Andringitra séparée du Parc National par la rivière Iantara. Les coordonnées géographiques de notre site sont S22°13' E047°01'.

#### \*Réserve Spéciale Manombo

La Réserve Spéciale de Manombo est située à 30km au Sud de Farafangana. Elle fait partie de la forêt humide de basse altitude de la côte Est de Madagascar. Elle a été endommagée par le cyclone Gretelle en 1997. Notre site est dans la parcelle I ayant une superficie de 2800ha dont ses coordonnées géographiques sont S23°01' E047°43'.

### **II-2-1-3.- Entre la rivière Menagnara et Fort-Dauphin**

#### \*Parc National Midongy du Sud

Le Parc National Midongy est situé sur le long de la chaîne de montagne allongée à l'Est de la ville de Midongy du Sud. Notre site est à Beharena, situé à 15km au Nord de la ville de Midongy du Sud sur la route qui la relie avec la ville de Vangaindrano; ses coordonnées géographiques sont S23°31' E047°05'.

#### **\*Parc National d'Andohahela**

Le Parc National d'Andohahela est situé à l'extrême Sud-Est de Madagascar. Notre site est à Manangotry situé à 7km au Nord du village d'Isaka-Ivondro dont les coordonnées géographiques sont S24° 46' E046° 51'. Il est localisé dans la Parcelle I qui est la partie humide du Parc National Andohahela où la végétation est typique de la forêt tropicale dense humide et occupant une superficie de 63 100ha.

### **II-2-2 DANS L'OUEST**

#### **\*Parc National de Bemaraha**

Notre site est dans la forêt de Ranotsara qui fait partie du Parc National de Bemaraha, situé à 14km au Nord de Bekopaka dont les coordonnées géographiques sont S19°01' E044°46'. Le Parc est caractérisé par du "tsingy" très tranchant.

#### **\*Forêt classée Mariarano**

La forêt classée de Mariarano est située à 60km au Nord-Est de la ville de Mahajanga et ayant une superficie de 1580 ha. Les coordonnées géographiques de notre site sont S15°29' E046°41'. La forêt est de type sec semi-caducifolié

#### **\*Forêt classée d'Anaborano (Antafondro)**

La forêt classée d'Anaborano est située à 10km à l'Est du village d'Ankaramibe et à l'Ouest de la Réserve Spéciale de Manongarivo. Les coordonnées géographiques de notre site sont S14° 02' E048°13'.

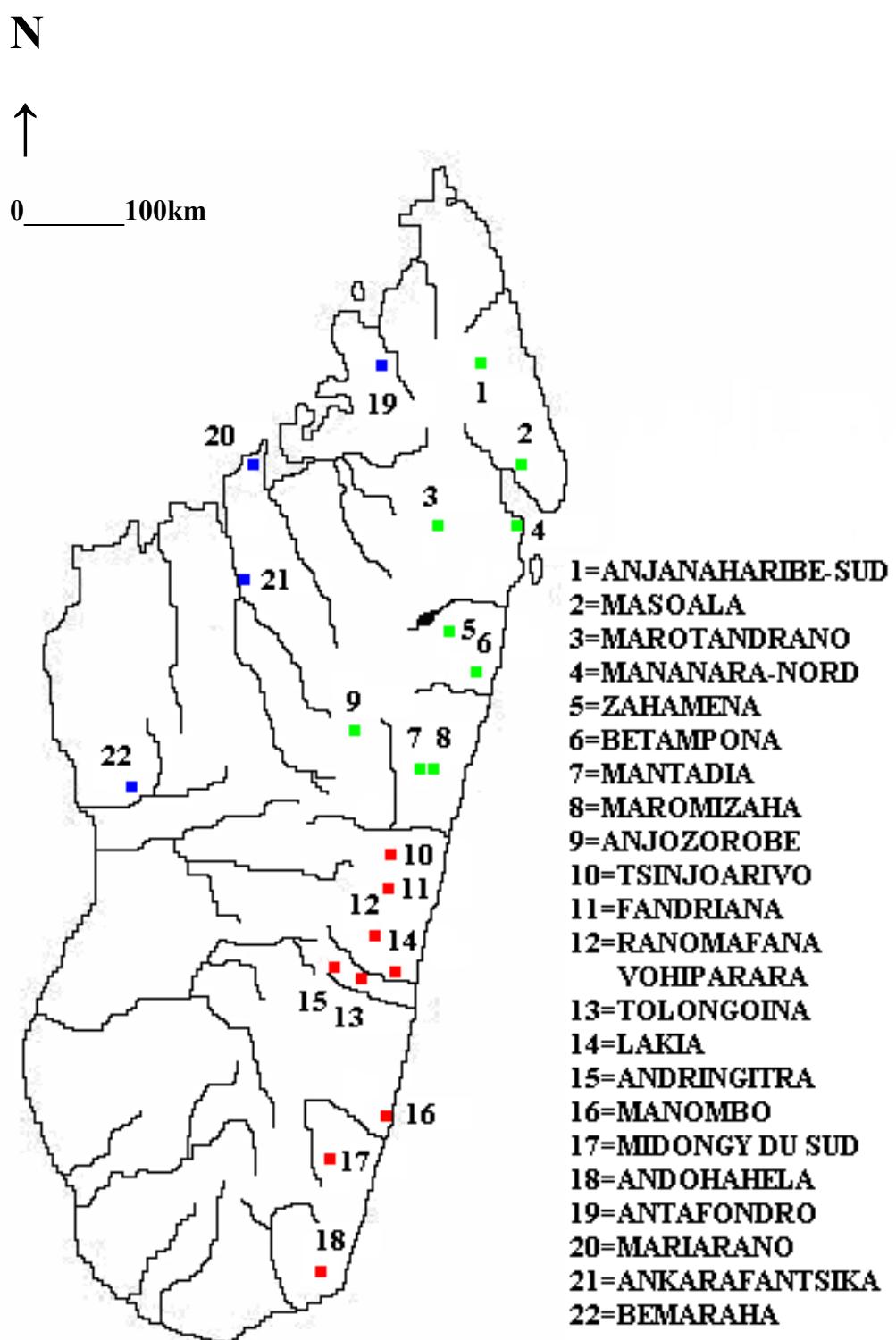


Figure 2: Sites d'étude du genre *Avahi*

## **II-3.- TRAVAIL SUR TERRAIN**

### **II-3-1.- MATERIELS UTILISES SUR TERRAIN**

Nous avons utilisé de la lance seringue du type DAN INJECT® Mod JM, de l'aiguille à propulsion (Type C; disposable dart, Pneu-Dart, Williamsport, Pennsylvania 177091, USA), de la sarbacane, du Telazol® (Tiletamine et Zolazepam, Fort Dodge Animal Health, Iowa USA), de la larme artificielle "Phoenix", du thermomètre, du stéthoscope, de la balance Pesola, du filet, du sac, de la seringue, de l'aiguille, du zéphiran, de l'eau distillée, du coton, du poinçon de biopsies, de la solution préservatrice des échantillons, du GRAFCO à base de nitrate d'argent, du transpondeur, du pied à coulisse, du mètre en ruban, du tube de Nunc®, ciseaux, de l'appareil GPS (Global Position System), du sérum de lactate de Ringer (Abbott laboratories, Chicago, Illinois, 60064, USA).

### **II-3-2.- IMMOBILISATION DE L'ANIMAL**

Nous avons immobilisé l'animal à l'aide d'une lance seringue propulsée par du gaz carbonique ou par une sarbacane munie d'une aiguille (Type C; disposable dart, Pneu-Dart, Williamsport, Pennsylvania 177091, USA) contenant du produit anesthésique Telazol® (Tiletamine et Zolazepam, Fort Dodge animal health, Iowa USA) avec une dose de 10mg par kilo de poids vif. La pression du gaz carbonique utilisée varie avec notre distance de l'animal; l'animal a été laissé tranquille après l'injection, lors de sa tombée l'animal a été capté à l'aide d'un filet et sa localisation a été enregistrée à l'appareil GPS (Global Position System).

### **II-3-3.- PESAGE**

Pour déterminer le volume sanguin à prélever qui devra être 1cc par kilo, chaque animal a été pesé à l'aide d'une balance Pesola (+/- 0,10 kg).

### **II-3-4.- PRELEVEMENT D'ECHANTILLON**

Nous avons prélevé deux tissus de 2mm de diamètre chacun au niveau de chaque oreille et 1cc de sang par kilo de poids vif au niveau de la veine fémorale. Les échantillons collectés ont été conservés dans des tubes de Nunc® de 1,8ml contenant 0,5ml de solution tampon constituée par du chlorure de sodium (NaCl) saturé, du diméthyl sulfoxyde (DMSO) à 20%, de l'éthylène diamine tétra-acétate (EDTA) à 250 mM pH 7,5 pour le tissu et une solution tampon constituée par du sodium éthylène diamine tétra-acétate à 0,1M, du tris

base à 0,1M et du sodium dodécyl sulfate (SDS) à 2% pour le sang (Longmire *et al*, 1992). Les échantillons ont été exportés vers les Etats-Unis suivant l'autorisation malagasy (CITES) et y importés suivant la loi de "l'U.S Fishes and Wildlife Service" (USFWS). Ces échantillons ont été conservés avec une température de -87°C au laboratoire de génétique moléculaire du Centre de Conservation et Recherche du Parc Zoologique Henry Doorly Zoo à Omaha, Nebraska aux Etats-Unis.

### **II-3-5.- MENSURATIONS**

Des mesures ont été faites pour chaque animal comme suit:

- poids
- couronne de la tête: longueur à partir du bout du nez jusqu'à la crête occipitale, la partie molle non incluse.
- longueur du corps: longueur à partir de la couronne occipitale jusqu'à la base de la vertèbre caudale.
- longueur de la queue: longueur à partir de la base de la queue jusqu'à son extrémité.

Nous avons mesuré le poids, la couronne de la tête, la longueur du corps et la longueur de la queue selon la méthode de Smith et Jungers (1997), Louis *et al*, (2006)

-membre antérieur:

- longueur du radius/ulna: longueur à partir du joint carpal (processus styloïde du radius) jusqu'à l'extrémité olécranienne de l'ulna.
- longueur de l'humérus: longueur à partir du grand tubercule de l'humérus jusqu'à l'extrémité du condyle latéral.

-membre postérieur :

\*longueur du tibia: longueur à partir de la tubérosité calcanéale jusqu'à la tubérosité tibiale proximale (plateau tibial)

\*longueur du fémur: longueur à partir du grand trochanter du fémur jusqu'au point distal du condyle latéral.

### **II-3-6.- INJECTION DE SERUM LACTATE DE RINGER**

Après prise de sang, une même quantité de sérum de Lactate de Ringer que le volume sanguin prélevé a été injectée d'une façon sous-cutanée pour compenser les électrolytes sanguins perdus et pour éliminer l'effet de l'anesthésie.

## **II-3-7.- MARQUAGE DE L'ANIMAL**

Pour éviter la recapture nous avons coupé les poils au niveau de la cuisse de l'animal; un transpondeur type Home Again® ayant son numéro caractéristique a été mis sous l'épiderme entre les deux scapulas pour chaque animal pour l'identifier lors d'une étude ultérieure.

## **II-3-8.- RELACHEMENT DE L'ANIMAL**

L'animal a été relâché sur le même endroit que nous l'avons capturé après avoir été totalement conscient, sain et sauf pour qu'il retrouve son groupe dans son territoire.

## **II-4.- TRAVAIL AU LABORATOIRE**

Tous nos travaux de laboratoire ont été faits dans le laboratoire de génétique du Centre de Conservation et de Recherche du Parc Zoologique Henry Doorly Zoo à Omaha, Nebraska, Etats-Unis. Au cours de toutes opérations, tous les matériels sont stériles et utilisés une seule fois pour éviter la contamination c'est-à-dire la confusion avec d'autre ADN ayant pour effet de fausser les résultats. Au laboratoire, une séquence de travail a été suivie comme suit:

- extraction de l'ADN et quantification de l'ADN
- séquençage de l'ADN mitochondrial pour la révision taxonomique du genre *Avahi*
- analyse de l'ADN nucléaire pour l'estimation des paramètres de la génétique de population
- analyse des données

### **II-4-1.- EXTRACTION**

L'ADN est une macromolécule biologique formée de deux chaînes complémentaires qui s'emboîtent tout en s'enroulant l'une autour de l'autre pour former une double hélice. Chaque chaîne est formée de phosphodiester et du sucre qui est le ribose en alternance. Chaque sucre est relié à une base azotée qui peut être soit de la thymine (T), soit de l'adénine (A), soit de la guanine (G), soit de la cytosine (C). Dans la chaîne bicaudale de l'ADN, C se trouve toujours en face de G avec une triple liaison et A en face de T avec une double liaison. La complémentarité d'A-T et G-C fait qu'on parle de "paire de base".

Le but de l'extraction d'ADN est obtenir l'ADN génomique de chaque individu étudié et qui sera utilisé ultérieurement pour toute amplification à faire. Nous avons extrait l'ADN génomique en utilisant la méthode d'extraction par du mélange de phénol-chloroforme-isoamyl alcool (Sambrook *et al*, 1989; Kocher *et al*, 1989).

## **II-4-1-1.- Extraction par du mélange de phénol-chloroforme-isoamylalcool et par du chloroforme**

Cette méthode a été inventée par (Sambrook *et al*, 1989). Ce traitement a été fait pour séparer l'ADN des débris organiques et des débris cellulaires, la purification est basée sur la solubilité des acides nucléiques dans l'eau, dans des molécules lipidiques et protidiques et dans les solvants organiques. Nous avons utilisé du mélange de phénol-chloroforme-isoamyl alcool dans la proportion 25-24-1 (25 volumes de phénol, 24 volumes de chloroforme et 1 volume d'isoamyl alcool). Le phénol est un excellent agent dénaturant les protéines et il permet la séparation des protéines avec les acides nucléiques tandis que le chloroforme et l'isoamyl alcool dénaturent les protéines et enlèvent le phénol résiduel.

### **II-4-1-1-1.- Préparation du tissu**

La moitié du tissu de 2mm de diamètre a été coupé en très petits morceaux sur une feuille de parafilm qui ont été mis dans un tube de 1,5cc contenant 108µl de chlorure de sodium-tris-éthylène diamine tétracétate (STE) à pH 7,5. Nous avons ajouté 6µl de sodium dodécyl sulfate (SDS) à 20% (qui lyse les cellules et les membranes) et 6µl de protéine kinase k à 20% (qui digère les protéines); nous avons mis le tube dans du bain-marie de 37°C pendant une nuit ou pendant 5h dans un bain-marie de 50°C. Le tout a été agité à chaque heure pour que la protéinase k soit bien mixée au tissu.

### **II-4-1-1-2.- Préparation du sang**

Nous avons mélangé dans un même tube 500 µl de chlorure de sodium tris-éthylène diamine tétracétate, 25 µl de sodium dodécyl sulfate à 20 %, 25µl de protéinase à 10% et 200 µl de sang stocké solution tampon. Nous avons agité le tube pour que la protéinase k soit bien mixée avec le sang. Nous avons mis le tout dans un bain-marie de 55°C pendant 3 heures.

## **II-4-1-2.- Purification de l'ADN**

Il est obligatoire d'utiliser des gants parce que le mélange de phénol-chloroforme-isoamyl alcool est un produit très cancérigène.

-pour le sang:

Nous avons ajouté 500 µl de mélange de phénol-chloroforme-isoamyl alcool dans le tube contenant l'échantillon et nous l'avons agité avec la machine vortexer pendant 2mn.

Nous l'avons centrifugé pendant 5mn avec une vitesse 13 000 tours par minute. Il se formait trois phases dans le tube:

- une phase supérieure contenant l'ADN
- l'interface contenant des protéines dénaturées
- une phase inférieure qui est le phénol avec des protéines dissoutes et des lipides

Nous avons pipeté la phase supérieure contenant l'ADN et l'avons mis dans un autre tube. Nous avons répété le même processus en ajoutant 500  $\mu$ l de mélange de phénol-chloroforme-isoamyl alcool une deuxième fois dans le tube contenant l'ADN.

-pour le tissu:

Nous avons ajouté 120  $\mu$ l de mélange de phénol-chloroforme-isoamyl alcool dans le tube contenant l'échantillon et nous l'avons agité avec la machine vortexer pendant 2mn.

Nous l'avons centrifugé pendant 5mn avec une vitesse 13 000 tours par minute. Il se formait trois phases dans le tube et nous avons pipeté la phase supérieure dans laquelle se trouvait l'ADN et l'avons mis dans un autre tube.

Nous avons répété le même processus en ajoutant 120  $\mu$ l de mélange de phénol-chloroforme-isoamyl alcool pour une deuxième fois. Le traitement de l'ADN au mélange de phénol-chloroforme-isoamyl alcool a été suivi d'un traitement au chloroforme pour le débarrasser des molécules liposolubles.

Nous avons accompli le traitement avec du chloroforme comme la procédure avec le traitement au mélange de phénol-chloroforme-isoamyl alcool avec 500  $\mu$ l de chloroforme pour le sang et 120  $\mu$ l de chloroforme pour le tissu.

Ce traitement au chloroforme a été faite pour une seconde fois avec le même procédé que précédemment et le surnageant final contenait l'ADN purifié.

#### **II-4-1-3.- Précipitation de l'ADN**

Nous avons ajouté 12 $\mu$ l de NaCl à 2M et 330 $\mu$ l d'éthanol 90° absolument froid dans le tube contenant l'ADN purifié et nous l'avons mis dans un réfrigérateur -20°C pendant une nuit. Le sel augmente la force ionique pour la précipitation de l'ADN par l'alcool éthylique froid.

Nous avons centrifugé le tube avec une vitesse de 13 000 tours par minute pendant 30mn.

Nous avons enlevé la phase liquide et nous avons ajouté 500  $\mu$ l d'éthanol à 70 % et nous l'avons centrifugé avec une vitesse de rotation de 13 000 tours par minute pendant 15mn.

Nous avons enlevé la phase liquide contenant l'ADN et nous l'avons laissé sécher à l'air libre ou dans la machine Speed Vac. Nous avons resuspendu l'ADN séché avec 50  $\mu$ l de Tris à 10 mM et nous l'avons mis dans du réfrigérateur de 4°C.

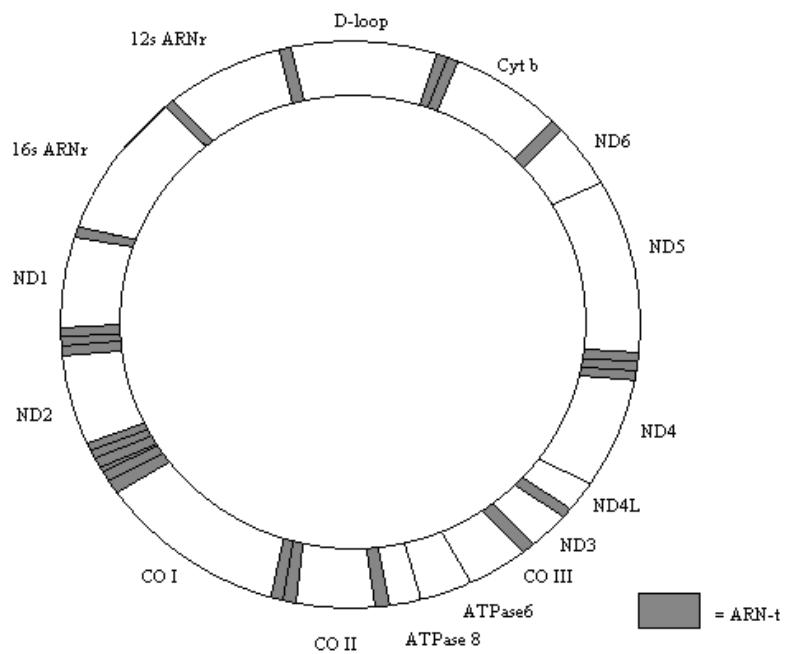
#### **II-4-1-4.- Quantification de l'ADN**

L'ADN génomique a été quantifiée par mesure spectrophotométrique de l'absorption à 260nm ( $A_{260}$ ) avec un spectrophotomètre. Il a été indispensable de mesurer également l'absorption à 280nm parce que celle-ci a permis d'estimer la contamination éventuelle de l'extraction des protéines. L'absorption se définit comme l'unité de densité optique mesurée à 260nm, sa valeur est comprise entre 0,1 et 1. L'absorption de 1 unité à 260nm correspond à 50ng d'ADN par  $\mu$ l et cette valeur est valable uniquement à un pH neutre (pH=7). Nous avons travaillé avec une concentration d'ADN de 50ng/ $\mu$ l et si la concentration est supérieure à cette valeur, nous avons dilué l'ADN avec de l'eau stérile et c'était le produit final de l'extraction

### **II-4-2.- ETUDE DE L'ADN MITOCHONDRIAL**

#### **II-4-2-1.- L'ADN mitochondrial de Mammifères (figure 3, page 20)**

Le génome mitochondrial de mammifères est un duplexe d'ADN circulaire formé de 16569 paires de bases (Anderson *et al*, 1981). La fonction de ce génome se repartit comme suit 11354 paires de base pour les protéines, 2511 paires de base pour l'ARN ribosomal, 1490 paires de base pour l'ARN de transfert et 1241 paires de base non codantes. Il est constitué d'une région de contrôle (D-Loop) pour l'initiation de la réPLICATION de l'ADN, des gènes pour deux molécules d'ARN-r, 22 molécules d'ARN de transfert, et 13 protéines (région codante) dont 12 interviennent dans le transport des électrons et la synthèse d'ATP.



**Figure 3:** Génome mitochondrial de Mammifères (Anderson *et al*, 1981)

Les gènes Complexe I (NADH déhydrogenase): ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6

Les gènes Complexe III (ubiquinol: cytochrome c oxydoréductase): Cytb

Les gènes Complexe IV (cytochrome c oxidase): COI, COII, COIII

Les gènes Complexe V (ATP synthase): ATPase 6, ATPase 8

Les gènes ARN ribosomal: 12s ARN-r et 16s ARN-r

## **II-4-2-2.- Technique d'étude de l'ADN mitochondrial**

La technique utilisée pour l'étude de l'ADN mitochondrial est celle du séquençage des nucléotides entre deux espèces ou des individus. Le fragment étudié a été préalablement amplifié par la technique d'amplification de la chaîne par polymérisation (**annexe I, page 135**). Les fragments d'ADN contenant les nucléotides fluorescents ont été détectés par un rayon laser et analysés avec de l'ordinateur qui restitue l'enchaînement des nucléotides; la séquence des nucléotides s'est présentée sous-forme d'élécrophérogramme dont chaque nucléotide possède une coloration spécifique: verte pour **A**, rouge pour **T**, bleue pour **C** et noire pour **G** (**figure 30, annexe page 153**).

Pour obtenir une bonne séquence, quatre amores ont été utilisées:

- \*une amorce agissant à partir d'une extrémité d'un simple brin d'ADN
- \*une autre agissant sur l'autre extrémité de l'autre brin et dans le sens contraire que la première amorce
- \*une amorce agissant à partir d'une base quelconque à l'intérieur du simple brin d'ADN
- \*une autre agissant à l'intérieur de la chaîne mais dans le sens contraire à cette dernière amorce

Toutes les séquences obtenues ont été alignées en utilisant le logiciel Clustal X (Thompson *et al.* 1997) pour générer une séquence de consensus. Pour tous les individus étudiés les séquences obtenues ont été déposées dans la banque de gènes qui est maintenue par "US National Center for Biotechnology Information at the National Library of Medicine" avec des numéros d'accession caractéristiques. Avant d'obtenir le séquençage de l'ADN mitochondrial, nous avons fait une série de manipulation:

- Amplification de la chaîne par polymérisation (**annexe I, page 135**)
- Electrophorèse sur gel d'agarose (**annexe II, page 139**)
- Purification des produits d'amplification de la chaîne par polymérisation par filtre du kit QIAGEN®
- Electrophorèse sur gel d'agarose (**annexe II, page 139**)
- Cycle de séquençage
- Purification des produits avec du sephadex
- Séchage avec la machine "Speed Vac"
- Lecture sur la machine AUTOMATED 3100 SEQUENCER
- Alignement des séquences

## II-4-3.- ETUDE DE L'ADN NUCLEAIRE

### II-4-3-1.- Le microsatellite (figure 31, annexe page 156)

Le microsatellite est un marqueur génétique d'ADN (séquence d'ADN repérable spécifiquement) hautement polymorphe avec des allèles codominants; il est constitué par une répétition plusieurs fois de 2 à 5 paires de base largement répandu dans le génome nucléaire des organismes (Litt et Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber et May, 1989; Estoup *et al*, 1995). Le microsatellite a été utilisé pour désigner des amorces utilisées pour le génotypage.

### II-4-3-2.- L'amorce

L'amorce est un court oligonucléotide synthétique utilisé pour initier la synthèse d'ADN à partir d'une séquence spécifique. Elle a été obtenue à partir des séquences flanquantes d'un microsatellite pour avoir une séquence complémentaire d'une extrémité du simple modèle brin d'ADN (ADN cible). La séquence de chaque amorce obtenue a été publiée et déposée à la banque de gènes.



#### Synthèse de double brin d'ADN à partir d'un seul brin en utilisant une amorce.

L'extension de la synthèse est assurée par une enzyme polymérase.

La séquence et la température d'action de l'amorce sont très importantes sur le succès de l'amplification. Les critères pour désigner une amorce varient suivant le programme utilisé mais les caractères cruciaux sont:

- la similarité devrait être 100% avec l'ADN cible.
- il ne devrait pas avoir une complémentarité (absence de boucle à cheveu) comme suit



Pour avoir des amorces, nous avons fait une série de manipulation:

- Extraction
- Digestion de l'ADN par l'enzyme de restriction *Sau3AI*
- Isoler des produits de 300-500 bp par électrophorèse sur gel d'agarose

- Cloner l'ADN dans du vecteur (plasmide) (**figure 33, annexe page 158**)
- Lyser des colonies et transférer l'ADN à une membrane d'hybridation
- Hybrider à des oligonucléotides étiquetés et sélectionner les clones positifs
- Séquencer les clones positifs
- Désigner l'amorce
- Tester si l'amorce est polymorphique

#### **II-4-3-3.- Génotypage**

Le génotypage est la détermination des allèles chez les différents individus. Il a pour but de déterminer la longueur de chaque fragment d'ADN amplifié (allèle). Lors du génotypage, nous avons utilisé le même processus que l'amplification de la chaîne par polymérisation dont 22 amorces polymorphiques ont été utilisées (**tableau 21, annexe page 162**, Andriantompohavana *et al*, 2004).

#### **II-4-3-4.- Lecture sur la machine ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER**

Nous avons prélevé 1 $\mu$ l du produit d'amplification de la chaîne par polymérisation et nous l'avons séché l'échantillon à sec dans la machine Refrigerated Vapor Trap RTV 400 ou Speed Vac et nous avons ajouté 2 $\mu$ l de DIF (deionised formamide), 0,5 $\mu$ l de solution tampon et 0,5  $\mu$ l de Rox<sup>TM</sup>. Nous avons dénaturé le tout pendant 5 mn dans la machine Thermocycler.

Nous avons prélevé 0,5  $\mu$ l de cet ADN dénaturé et nous l'avons transféré à un peigne absorbant; nous avons immergé la pointe de ce peigne dans une solution tampon dans la machine ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER connecté avec un ordinateur. La valeur lue à l'ordinateur lié à l'ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER correspond à l'allèle d'un locus.

### III.-METHODES STATISTIQUES ET ANALYTIQUES

#### III-1.- COMPARAISON DES MOYENNES DES DIFFERENTES MESURES (test t)

Pour que le test-t de Student ait eu lieu, les données devront suivre une distribution normale, les variances sont égales. La probabilité pour que l'hypothèse soit acceptée a été calculée en utilisant le logiciel VASSARTSTAT: STATISTICAL COMPUTATION WEB SITE. Si la valeur p-value calculée est supérieure à la valeur de signification statistique ( $p=0,05$ ), l'hypothèse que les deux populations ne diffèrent pas est rejetée et si la valeur de p-value calculée est inférieure à la valeur de signification ( $p=0,05$ ), l'hypothèse est retenue.

Pour caractériser les différences sur les mensurations entre les différentes espèces d'*Avahi*, nous avons testé les variables deux à deux. Puisque toutes les espèces d'*Avahi* sont indépendantes et nous avons utilisé la formule suivante:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}}$$

avec  $S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2} = \sqrt{\frac{(N_1 - 1)S_1^2 + (N_2 - 1)S_2^2}{(N_1 + N_2 - 2)}}$

$s^2$  est l'estimateur non biaisé de la variance

$N_1$  = le nombre des individus de la population 1

$N_2$  = le nombre des individus de la population 2

$(N - 1)$  est le degré de liberté pour chaque groupe étudié

$(N_1 + N_2) - 2$  est le degré de liberté des deux populations à tester

## III-2.- ANALYSE DES SEQUENCES DE L'ADN MITOCHONDRIAL

### III-2-1.- DISTANCE ENTRE DEUX SEQUENCES

La distance entre deux séquences est l'estimation du nombre de substitutions nucléotidiques par site de nucléotide entre ces deux séquences. En effet les mesures de la distance résument la quantité des divergences génétiques entre les couples d'individus ou de populations ou d'espèces. Usuellement, la distance est corrigée à cause des facteurs comme la différence du taux de transition, de transversion et du taux de substitutions multiple à un site.

Pour calculer la distance nous avons utilisé le modèle de Kimura à 2 paramètres qui est basé sur la probabilité de substitution et la probabilité de transversion. Le taux de mutation de site nucléotidique peut être un problème pour certaines séquences et ce problème est explicitement adressé au modèle de distribution de Tamura-Nei utilisant le modèle Kimura à 2 paramètres. Pour la méthode d'analyse du groupe le plus proche (neighbor-joining) les mesures de distances (Kimura, 1980) ont été utilisées pour corriger les données de séquence des nucléotides et nous avons implanté l'arbre par le modèle de Tamura-Nei (Tamura et Nei, 1993). La distance de Kimura à 2 paramètres est fondée sur l'hypothèse suivante:

a-toutes les substitutions de chaque nucléotide sont équiprobables

b-les transitions et les transversions se produisent avec des taux différents

Le nombre de substitutions de nucléotide par site est donné par la relation:

$$d = \frac{1}{2} \ln \left[ \frac{1}{1-2P-Q} \right] + \frac{1}{4} \ln \left[ \frac{1}{1-2Q} \right]$$

avec P et Q sont les différences proportionnelles entre les deux séquences dues respectivement aux transitions et aux transversions

Kimura (1980) a fourni une méthode pour impliquer la distance dans laquelle des transitions et les transversions sont traitées séparément:

$$d_{AB} = -\frac{1}{2} \ln \left[ (1-2P-Q) \sqrt{1-2Q} \right]$$

avec P est la fraction de la séquence différente par une transition et Q est la fraction de la séquence différente par une transversion.

## **III-2-2.- CONSTRUCTION D'ARBRE A PARTIR DES SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES**

La reconstruction phylogénétique a été utilisée pour la représentation de relations existantes entre des séquences ou des espèces, ce qui permet de trouver les liens généalogiques entre des individus. Des individus possédant des séquences similaires sont étroitement liés et des individus distants présentent des différences sur les séquences. Pour les branches avec échelle, la longueur des branches est proportionnelle avec le nombre de changements et la distance entre les espèces est la somme de la longueur de toutes branches reliées entre elles (Swofford, 2001). Nous avons utilisé le logiciel PAUP 4.0 ou Phylogenetic Analysis Using Parsimony (Swofford, 2001) pour l'analyse cladistique des données de séquences, ce logiciel compare automatiquement les séquences en utilisant la méthode de recherche heuristique qui permet de trouver un arbre optimal à partir de la matrice des caractères issus des séquences alignées.

Pour examiner la phylogénie de *Avahi*, nous avons analysé les séquences avec la méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony), la méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining) et la méthode de la vraisemblance maximum (maximum likelihood) pour le fragment D-loop, les fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> (Swofford, 2001) et la combinaison des séquences de ces fragments en utilisant le logiciel PAUP 4.0; tous les arbres obtenus sont des arbres de consensus.

Comme décrit dans Davis et Nixon (1992), Louis *et al*, (2006), Mayor *et al* (2004) et Wyner *et al*, (1999), nous avons utilisé Mac Clade 3.01 (Maddison et Maddison 1992) et MEGA 2.0 (Kumar et al. 1993) pour désigner des unités de l'évolution (ESU) pour l'espèce *d'Avahi* en utilisant l'analyse globale de la population (PAA) des séquences étudiées. L'analyse globale de la population distingue les caractères apomorphiques en accordant la plus petite unité définissable (Davis et Nixon, 1992; Louis *et al*, 2006; Mayor *et al*, 2004; Ravaoarimanana *et al*, 2004).

### **III-2-2-1.- Méthode phénétique basée sur les distances: la méthode de l'arbre le plus proche (neighbor-joining) (Saitou et Nei, 1987).**

Cette méthode identifie les plus proches unités taxonomiques par la distance entre eux et les arbres ont été calculés par similarité des séquences. Pour cette méthode, certains paramètres doivent être respectés qui sont:

\*tout changement de base est considéré comme égal.

\*les taux de substitutions sont aussi supposés identiques pour tous les sites nucléotidiques.

\*les insertions et les délétions sont plus considérées que les substitutions. Les insertions ou les délétions de bases multiples sur un site sont moins important que les multiples insertions ou délétions indépendantes.

\*il est possible de corriger les substitutions multiples à un seul site

Les distances entre des séquences d'ADN ont été calculées comme la somme de toutes les différences de paire de base entre deux séquences et celle-ci crée une matrice de distance qui permet de construire un arbre. A partir de la matrice de distance obtenue, l'arbre phylogénétique a été établi avec des algorithmes de groupage qui construisent un arbre par liaison des pairs de taxa les moins distants, suivi par des taxa successivement plus distants.

### **III-2-2-2.- Méthodes basées sur les caractères**

#### **III-2-2-2-1.- La méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony)**

La méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony) est une méthode qui identifie l'arbre qui implique le plus petit nombre de mutation nécessaire pour expliquer les différences sur les groupes étudiés (Fitch, 1977). Elle consiste à minimiser le nombre de changement (mutations/substitutions) nécessaires pour passer d'une séquence à une autre dans une topologie de l'arbre; tous les arbres possibles ont donné des chiffres basés sur le nombre de changements et l'arbre le plus parcimonieux est celui qui a le moins de changements pour toutes séquences qui dérivent de l'ancêtre commun (Cavalli-Sforza et Edwards 1967; Fitch, 1971).

Cette méthode s'appuie sur les hypothèses suivantes:

-les sites évoluent indépendamment les uns des autres (la séquence peut être considérée comme une suite de caractères non ordonnés).

-les changements sont supposés survenir entre n'importe quelle paire de nucléotides.

L'arbre de la parcimonie maximum (maximum parsimony) est caractérisé par quelques facteurs (Kluges et Farris, 1969) qui sont:

**\*la longueur de l'arbre** qui est la somme du nombre de changements de caractère le long de chaque branche et l'entrenœud de l'arbre (Wiley, 1991).

**\*l'indice de consistance** (uniformité) est la mesure de la somme de l'homoplasie d'un caractère sur l'arbre (apparition indépendante de caractères similaires dans des taxons

proches); il est défini comme la somme totale du nombre de substitution donnée par la topologie divisée par le nombre de substitution minimum possible. S'il y a homoplasie ces deux sommes sont égales et la consistance est maximum (Hillis et al, 1996); une haute valeur de l'indice de consistance indique une consistance de l'arbre.

$$CI = \frac{\sum m_i}{\sum S_i} \text{ avec}$$

m= substitution minimum possible

S = nombre minimum de substitution donnée par la topologie

**\*Indice de rétention (RI)** qui est analogue à l'indice de consistance (Swofford, 1999)

$$RI = \frac{\sum g_i - \sum S_i}{\sum g_i - \sum m_i}$$

Avec m= substitution minimum possible

S = nombre minimum de substitution donnée par la topologie

g= nombre maximum de substitution pour un arbre concevable

**\*Indice de consistance de rééchelonnement (RC):**

L'indice de consistance de rééchelonnement est utilisé pour évaluer la conformité et pour ajuster les caractères dans l'arbre. Une haute valeur de l'indice de consistance de rééchelonnement indique que tous les caractères sont plus conformes entre eux.

$$RC = \frac{\sum g_i - \sum S_i}{(\sum g_i - \sum m_i)(\sum m_i - \sum S_i)}$$

Avec m= substitution minimum possible

S = nombre minimum de substitution donnée par la topologie

g= nombre maximum de substitution pour un arbre concevable

### **III-2-2-2-2.- La méthode de vraisemblance (maximum likelihood)**

Cette méthode utilise la position du changement sur l'alignement, elle évalue tout arbre possible et calcule les vraisemblances pour chaque arbre. Les vraisemblances de chaque arbre ont été obtenues par multiplication des vraisemblances pour chaque site. Les nucléotides ont été considérés séparément pour toutes les séquences c'est-à-dire qu'ils sont indépendants; l'arbre le plus probable est l'arbre avec le maximum de vraisemblance.

### **III-2-2-3.- La méthode de “bootstrap”**

Le “bootstrap” a été introduit en phylogénie dans le package Phylogenetic Inference Package) par Felsenstein (1985); cette méthode a été utilisée pour mettre en place les intervalles de confiance sur la phylogénie. Les analyses du bootstrap ont été performées pour examiner le support relatif de chaque parenté dans les topologies résultantes, ces analyses du bootstrap ont été accomplies avec 1 000, 3 000 ou 4 000 pseudoréplications et la valeur du nœud supérieur à 50% de support de bootstrap est fiable lors de l’analyse.

La méthode de bootstrap est divisée en 3 étapes réalisées chacune au moins trois fois:

- Réalisation d'un pseudo-alignement  $A'$  à partir des séquences d'origine en prenant arbitrairement  $n$  colonnes (avec remplacements) de l'alignement d'origine
- Estimation de l'arbre obtenu  $T'$
- Comparaison des arbres  $T$  et  $T'$ : chaque sous-arbre de  $T$  a été vérifié s'il est présent dans  $T'$ . La présence dans les arbres  $T'$  de chaque sous-arbre de  $T$  sera compté, et la fréquence avec laquelle un sous-arbre est trouvé dans les arbres  $T'$  est la valeur de bootstrap; plus la valeur de cette fréquence est élevée plus la fiabilité de la branche est importante

### **III-2-2-4.- Enracinement des arbres phylogénétiques**

Les états de caractères dérivés et ancestraux sont déterminés en utilisant la méthode de comparaison d'extragroupe (Watrous et Wheeler, 1981; Farris, 1982, Maddison *et al*, 1984).

### **III-2-2-5.- Méthode NETWORK**

La méthode de NETWORK version 4.11 (Bandelt *et al*, 1999) groupe les individus pour former un cluster suivant le nombre de différences dans le raccordement entre eux. Les individus d'un même groupe présente une différence inférieure à 10 et deux clusters présentent une différence supérieure à 10 dans leurs raccordements.

## **III-2-3.- ANALYSE DE L'AGREGATION DE POPULATIONS**

Les biologistes ont développé plus de 22 concepts de l'espèce dont une espèce est la plus petite agrégation de population par une combinaison unique d'états de caractères (Nixon et Wheeler, 1990). Dans notre étude, nous avons préféré le concept des espèces phylogénétiques (Wilson, 1981) qui est basé sur la présence de caractères décrits à partir de l'analyse d'agrégation de la population permettant de distinguer des traits de caractéristiques d'une population (Davis et Nixon, 1992).

Le principe de base de l'analyse d'agrégation de populations est que tous les individus sont considérés comme appartenant à une même espèce et si deux populations ne présentent pas de caractères qui les distinguent, elles appartiennent à une même espèce; si deux populations présentent des caractères qui les distinguent, elles appartiennent à deux espèces différentes (Davis et Nixon, 1992). Les données de base pour ce principe dans notre étude sont la présence ou l'absence d'une base bien déterminée à une position donnée dans une séquence. Selon le concept de l'espèce phylogénétique que nous avons utilisé, une espèce aura des caractères moléculaires qui lui sont propres et des traits autapomorphiques état de caractère dérivé propres au taxon permettant de le distinguer d'une autre espèce dans une hiérarchie cladistique (Rosen, 1979; Nixon *et al*, 1990).

### **III-3.- ANALYSE DES GENOTYPES DE L'ADN MICROSATELLITAIRE**

Le marqueur génétique est caractérisé par le degré du polymorphisme et l'intégrité des sites de l'amorce. Nous avons analysé les génotypes multilocus selon le modèle d'allèles infini (IAM; Kimura et Crow, 1964) selon laquelle quelque soit la taille de l'allèle, il en résulte d'une mutation au hasard. Cette mutation peut être une translocation, une transversion, une délétion ou une insertion. Il est estimé que si une population panmictique est subdivisée, le modèle d'allèle infini assume que la distribution des allèles dans les loci est le résultat des événements particuliers comme la sélection, l'effet fondateur et le goulot démographique

Des erreurs du génotypage dues à la concentration de l'ADN (qui devra être 50 ng/ $\mu$ l) peuvent survenir, provoquant des déviations de l'équilibre Hardy-Weinberg et une falsification de l'estimation de la consanguinité, la structure de la population et de la migration (Taberlet *et al*, 1999). Par conséquent, les données du génotype de microsatellite des populations sont examinées par du logiciel MICRO-CHECKER (Oosterhout *et al*, 2004) et MICROSAT ANALYSER (MSA, Dieringer et Schlötterer, 2003) qui facilitent l'identification de diverses erreurs de génotypage. Une fois exempt des erreurs de génotypage, les données ont été analysées avec le logiciel GENEPOL3.1 (Raymond et Rousset, 1995) et le test de Hardy-Weinberg pour identifier la probabilité d'excès ou de déficit d'homozygotes. Pour mettre en évidence l'existence ou non de la réduction de la taille de population, les données ont été analysées avec le test BOTTLENECK v. 1.2.02 (Piry *et al*, 1999) avec le test de Wilcoxon sous le modèle infini d'allèle ( $P<0,05$ ) (IAM,

Kimura et Crow, 1964, Luikart, 1997). Le modèle d'allèle infini décrit la distribution des allèles du marqueur comme résultant des effets fondateurs ou du goulot démographique (bottleneck). Pour calculer les fréquences alléliques et les fréquences d'hétérozygotie pour chaque locus, les données du génotype ont été analysées avec le logiciel Cervus®.

### III-3-1.- ETUDE AU NIVEAU DE CHAQUE POPULATION

#### III-3-1-1.- Test de l'équilibre de Hardy-Weinberg

La diversité génétique dans un simple locus est caractérisée par:

- l'hétérozygotie expectée
- l'hétérozygotie observée
- la diversité allélique

Pour un seul locus avec deux allèles de fréquence  $p$  et  $q$ , l'hétérozygosité attendue est

$H_e = 2pq$  qui est appelée aussi diversité génique.

Pour plusieurs allèles

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^{n_i} p_i^2$$

$p_i$  = fréquence du  $i^{\text{th}}$  allèle

$$\text{avec } p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

$$f(\mathbf{AA}) = p^2$$

$$f(\mathbf{Aa}) = 2pq$$

$$f(\mathbf{aa}) = q^2$$

L'hétérozygotie observée est exprimée par la formule:

$$H_o = \frac{N_h}{N}$$

avec

\* $N_h$  est le nombre des individus hétérozygotes pour un locus

\* $N$  est le nombre total des individus étudiés

Les données génotypiques obtenues ont été analysées avec le logiciel GENEPOP3.1 (Raymond et Rousset, 1995) pour estimer le taux d'hétérozygotie. Si l'hétérozygotie attendue ( $H_e$ ) est supérieure à l'hétérozygotie observée ( $H_o$ ), la population ne suit pas l'équilibre de Hardy-Weinberg (Triantafyllidis *et al*, 2002).

Pour qu'une population soit en équilibre de Hardy-Weinberg:

- 1-Les individus doivent être diploïdes
- 2-La reproduction doit être sexuée
- 3-La fréquence des allèles ne doit pas être affectée par une mutation
- 4- La reproduction doit être au hasard
- 5-La taille de la population doit être infinie
- 6-La migration doit être absente
- 7-La sélection doit être absente

### **III-3-1-2.- La diversité génétique, la richesse allélique et l'hétérozygotie**

Pour estimer la diversité génétique et la moyenne du nombre d'allèle par loci, les données génotypiques obtenues ont été analysées avec le logiciel GENEPOP3.1 (Raymond et Rousset, 1995). La richesse allélique dépend du nombre d'allèles pour chaque locus de tous les marqueurs génétiques utilisés. La fréquence d'un allèle est une mesure de la fréquence relative d'un allèle sur un locus génétique dans une population, elle est exprimée par un pourcentage. L'ensemble des fréquences alléliques montrent la diversité génétique d'une population. La fréquence allélique pour un locus donné dans une population est exprimée par la formule de Nei et Roychoudhury (1974):

$$f = \frac{2N_{ho} + N_{he}}{2N}$$

\*N est le nombre total des individus

\* $N_{ho}$  est le nombre des individus homozygotes pour cet allèle

\* $N_{he}$  est le nombre des individus hétérozygotes pour cet allèle

Et l'hétérozygosité observée est exprimée par la formule de Nei et Roychoudhury (1974):

$$H_o = \frac{N_h}{N}$$

$H_o$  est l'hétérozygotie observée

$N_h$  est le nombre des individus hétérozygotes pour un locus

N est le nombre total des individus étudiés

### **III-3-1-3.- Le coefficient de consanguinité ( $F_{IS}$ )**

Les valeurs des F statistiques de Wright (1969) permettent de déterminer la variation génétique d'une population. Trois niveaux hiérarchiques peuvent être observés:

- la variation génétique de l'individu (I)
- la variation génétique de la sous-population à laquelle (S)
- la variation génétique de la population dans son ensemble (T)

Pour caractériser l'hétérozygotie génétique de ces trois niveaux, Wright a défini les paramètres suivants:

\* $H_I$ =hétérozygotie observée moyenne par individu sur l'ensemble des sous-populations.  $H_I$  exprime la proportion des hétérozygotes dans la sous-population

\* $H_S$ =hétérozygotie attendue par individu pour une sous-population supposée à l'équilibre de Hardy-Weinberg.

\* $H_T$ =hétérozygotie attendue par individu en supposant que la population globale est à l'équilibre de Hardy-Weinberg.

$$H_T = \sum_{i=1}^k \frac{H_i}{k}$$

où  $H_i$  est l'hétérozygotie attendue dans la  $i^{\text{ème}}$  sous-population  $i$

$$H_S = \sum_{i=1}^k x_i^2$$

où  $x_i^2$  est la fréquence du  $i^{\text{ème}}$  allèle

La moyenne  $H_S$  sur  $k$  populations est:

$$H_S = \sum_S^k \frac{H_S}{K} \text{ et } H_I = 1 - \sum \overline{X_i}^2$$

Où  $\overline{X_i}^2$  est la fréquence moyenne de l'allèle  $A_i$  sur l'ensemble des  $k$  populations.

Nous avons utilisé l'approche de Hardy-Weinberg pour connaître la différenciation des sous-populations dans les termes de F-statistiques, en effet, nous avons utilisé l'indice statistique de Wright  $F_{IS}$  qui est le coefficient de consanguinité.

$$F_{IS} = \frac{(H_S - H_I)}{H_S}$$

*ou*

$$F_{IS} = \frac{1 - H_I}{2pq}$$

$F_{IS}$  est le coefficient de consanguinité ou indice de fixation ou coefficient coancestral qui est conventionnellement défini comme la probabilité que deux allèles chez le descendant sont identiques.  $F_{IS}$  mesure la réduction éventuelle de l'hétérozygotie des individus de la sous-population (parenté génétique d'un individu par rapport à une sous-population).

$F_{IS}$  dépend du ratio des hétérozygotes observés et des hétérozygotes attendues.

La valeur de  $F_{IS}$  varie de -1 à +1. Si la population n'a pas d'hétérozygotes  $F_{IS}=1$ , une haute valeur de  $F_{IS}$  peut correspondre à un grand degré de consanguinité et si tous les individus sont hétérozygotes on a  $F_{IS} = -1$

\*Si la population est en l'équilibre de Hardy-Weinberg,  $F_{IS}=0$ .

\*Si  $F_{IS}<0$ , la sous-population présente un excès d'hétérozygote.

\*Si  $F_{IS}>0$ , la sous-population présente une déficience d'hétérozygote.

$F_{IS}$  a été estimé en utilisant le logiciel FSTAT (Goudet, 1995).

### **III-3-1-4.- Le test du goulot démographique (bottleneck) avec le test de Wilcoxon**

Lorsqu'une population ne suit pas l'équilibre de Hardy-Weinberg, le test "BOTTLENECK v1.2.02" (Cornuet et Luikart, 1996 ; Cornuet *et al*, 1999 ; Piry *et al*, 1999) permet de déterminer s'il y a eu réduction du nombre de la population par suite d'un certain phénomène comme le dégât cyclonique provoquant une diminution de la taille effective de la population, du taux d'hétérozygotie et le nombre d'allèles observés (Nei *et al*, 1975); la population devra ensuite subir le test de Wilcoxon  $\alpha<5\%$  (IAM, Kimura et Crow, 1964, Luikart, 1997) dont au minimum 10 individus par site est exigé pour obtenir un résultat informatif.

## **III-3-2.- ETUDE INTERPOPULATION**

### **III-3-2-1.- La différenciation génétique (indice de fixation $F_{ST}$ )**

La différenciation génétique est la deuxième valeur de F-statistique de Wright (1969) déterminant la variation génétique d'une population, elle a été estimée en utilisant le logiciel FSTAT (Goudet, 1995).

La différenciation génétique est exprimée par  $F_{ST}$  appelé indice de fixation, il détermine la différenciation génétique des sous-populations par rapport à la population totale. Entre les sous-populations et la population totale, l'effet de la subdivision est exprimée par:

$$F_{ST} = \frac{(\bar{H}_T - \bar{H}_S)}{\bar{H}_T} = \frac{1 - H_S}{2pq}$$

$F_{ST}$  est l'indice de fixation et il détermine la différenciation génétique des sous-populations par rapport à la population totale.

$$H_T = 2\bar{pq}$$

et

$$H_S = \sum_{i=1}^k x_i^2$$

$\bar{p}$  est la fréquence moyenne de l'allèle A

$\bar{q}$  est la fréquence moyenne de l'allèle a

$F_{ST}$  varie de 0 à 1.

Si toutes les sous-populations ont la même fréquence allélique et sont en l'équilibre de Hardy-Weinberg,  $F_{ST}=0$  c'est-à-dire sans subdivision ou sans divergence dans la population (panmixie)

Si  $F_{ST} = 1$ : il y a complète isolation (subdivision extrême) c'est-à-dire les populations sont complètement différenciées

Wright (1969) a caractérisé le degré de diversification génétique entre populations par les valeurs suivantes de l'indice  $F_{ST}$ :

$F_{ST} = 0$  à  $0,05$ , la diversification est faible

$F_{ST} = 0,05$  à  $0,15$  la diversification est modérée

$F_{ST} = 0,15$  à  $0,25$ , la diversification est importante

$F_{ST} > 0,25$ , la diversification est très importante

### III-3-2-2.- Test de la structure de la population

Lorsque la population ne suit pas l'équilibre de Hardy-Weinberg; il se peut que le taux d'hétérozygote est faible mais il n'y a pas de consanguinité c'est l'effet de Wahlund (Wahlund, 1928) ou il y a consanguinité. Pour connaître s'il y a exactement consanguinité ou il y a division de la population en sous-population (effet de Wahlund, goulot

démographique), il faut tester s'il y a un risque de structure cryptique au sein de la population par le programme STRUCTURE 2.0 (Pritchard et al, 2002). Cette méthode estime le nombre K de population le plus convenable capable d'interpréter les génotypes; lorsque ce nombre K de populations avec la plus grande vraisemblance a été identifié et la proportion du génoome de chaque individu a été utilisée pour déterminer la similarité ou la distinction des populations, nous avons utilisé le test Delta K (Evanno *et al*, 2005) pour déterminer cette structure. Le principe du test Delta K c'est de regrouper les populations qui ont une vraisemblance pour représenter un cluster.

## IV.-RESULTATS

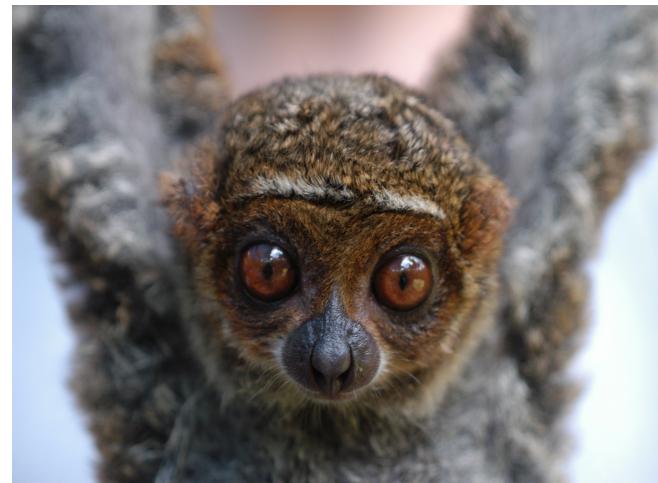
### IV-1.-PELAGE

*Avahi* de l'Ouest est divisée en trois espèces qui sont *Avahi unicolor* (Thalmann et Geissmann, 2000), *Avahi occidentalis* (Lorenz, 1898) et *Avahi cleesei* (Thalmann et Geissmann, 2005); *Avahi* de l'Est est divisée en quatre espèces: *Avahi laniger* (Gmelin, 1788), *Avahi peyrierasi* (Zaramody et al, 2006), *Avahi meridionalis meridionalis* (Zaramody et al, 2006) et *Avahi meridionalis ramanantsoavani* (Zaramody et al, 2006) alors qu'auparavant tout *Avahi* de l'Est a été nommée *Avahi laniger* depuis Anjanaharibe-Sud jusqu'à Andohahela (Mittermeier et al, 2005). D'après notre étude, deux nouvelles espèces ont été découvertes en utilisant le concept des espèces phylogénétiques: *Avahi betsileo* (à Fandriana) et *Avahi nova species* (à Ranomafana) qui est soit *Avahi peyrierasi 1* soit *Avahi peyrierasi 2*.

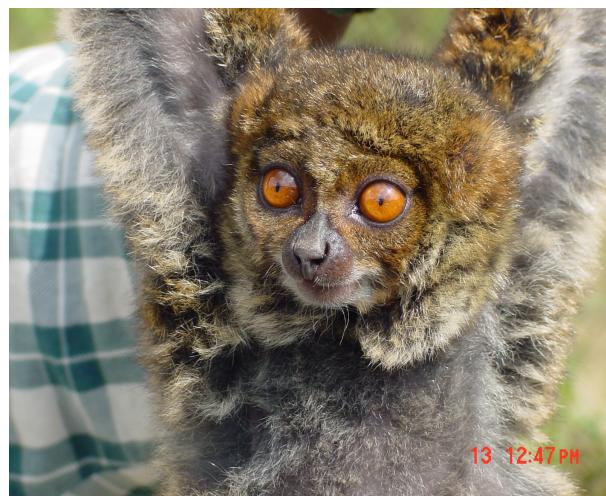
-*Avahi laniger*: La tête est grise claire avec une face gris foncée; au-dessus de l'œil il y a une tache blanche bien nette. L'oreille est petite et non pas cachée dans une touffe de poils (**figure 4, page 38**). La partie dorsale est gris rousse devenant gris claire sur le côté postérieur. La queue est rousse à l'extrémité et rousse claire à sa base. La fourrure est en forme de boucle sur le dos et la cuisse. La partie postérieure de la cuisse est blanche.

-*Avahi betsileo*: La tête est brune claire avec une face brun foncée; il n'y a pas de tache blanche au-dessus de l'œil. La fourrure sur le cou est très dense. L'oreille est petite et cachée dans une touffe de poils (**figure 5, page 38**). La partie dorsale est brune devenant brun claire sur le côté postérieur. La queue est brune foncée et brun claire à sa base. La fourrure est en forme de boucle sur le dos et la cuisse. La partie postérieure de la cuisse est blanche.

-*Avahi nova species* La tête et la face sont grise foncées avec une face gris foncée; au-dessus de l'œil la tache blanche est bien nette. L'oreille est petite et non pas cachée dans une touffe de poils. La fourrure sur le cou n'est pas dense (**figure 6, page 38**). La partie dorsale est gris rousse devenant gris claire sur le côté postérieur. La queue est rousse sombre à l'extrémité et rousse claire à sa base. La fourrure est en forme de boucle sur le dos et la cuisse. La partie postérieure de la cuisse est blanche.



**Figure 4:** Vue faciale de *Avahi laniger*



**Figure 5:** Vue faciale de *Avahi betsileo*



**Figure 6:** Vue faciale de *Avahi nova species*

## IV-2.- MORPHOLOGIE

### IV-2-1.- MORPHOMETRIE ET TEST DE COMPARAISON DES MOYENNES: TEST “t”

#### IV-2-1-1.- Mensurations morphométriques

La longueur de la tête, la longueur du corps, la longueur de la queue, la longueur du radius, la longueur de l'humérus, la longueur du tibia et la longueur du fémur de chaque individu ont été mesurées et les moyennes respectives de chaque variable avec les écart-types respectifs sont résumées dans le **tableau 1 (page 40)**.

Le poids varie de 0,84 kg (*Avahi unicolor*) à 1,13 kg (*Avahi laniger*).

La longueur de la tête varie de 6,2 cm (*Avahi occidentalis*) à 9,3 cm (*Avahi betsileo*).

La longueur du corps varie de 20 cm (*Avahi betsileo*) à 25,9 cm (*Avahi cleesei*).

La longueur de la queue varie de 29,6 cm (*Avahi betsileo*) à 35,4 cm (*Avahi occidentalis*).

La longueur du radius varie de 7,9 cm (*Avahi occidentalis*) à 9,3 cm (*Avahi meridionalis meridionalis*).

La longueur de l'humérus varie de 5,7 cm (*Avahi unicolor*) à 6,9 cm (*Avahi betsileo*).

La longueur du tibia varie de 10,3 cm (*Avahi unicolor*) à 12,8 cm (*Avahi betsileo*).

La longueur du fémur varie de 12,6 cm (*Avahi occidentalis*) à 13,8 cm (*Avahi meridionalis meridionalis*).

**Tableau 1:** Résultats des mensurations morphométriques

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>N</b>	8	4	4	24	4	10	4	7	4
<b>Poids (kg)</b>	0, 94±0,10	0, 84±0, 16	0, 86±0, 13	1, 13±0, 25	0, 98±0, 13	1, 06±0, 17	1, 0±0, 16	1, 12±0, 09	1, 05±0, 14
<b>Tête (cm)</b>	6, 2±0,5	6, 5±0, 1	6, 7±0, 5	6, 8±0, 6	7, 1±1, 0	6, 4±0, 1	9, 3±1, 0	6, 7±0, 4	6, 3±0, 2
<b>Corps (cm)</b>	23, 4±1,2	22, 7±1, 6	25, 9±3, 2	22, 8±1, 9	23, 2±2, 0	24, 1±1, 5	20, 0±2, 0	24, 4±1, 2	25, 2±0, 9
<b>Queue (cm)</b>	35±3, 4	33, 3±2, 4	32, 4±3, 0	33, 0±3, 8	32, 4±6, 4	33, 4±3, 8	29, 6±3, 4	30, 0±1,9	32, 3±1, 5
<b>Radius* (cm)</b>	7, 9±0, 4	8, 0±0, 1	8, 5±0, 8	8, 6±0, 7	8, 6±0, 5	9, 3±0, 6	8, 3±0, 5	8, 4±0, 3	8, 6±0, 8
<b>Humérus* (cm)</b>	6, 2±0, 6	5, 7±0, 7	6, 5±0, 4	6, 5±0, 7	6, 6±0, 6	6, 3±0, 4	6, 9±0, 6	6, 6±0, 5	5, 9±0, 5
<b>Tibia** (cm)</b>	10±0, 9	10, 3±0, 4	11, 5±0, 2	11, 4±1, 0	11±1, 2	11, 3±0, 5	12, 8±0, 9	11, 2±0,6	10, 6±0, 4
<b>Fémur** (cm)</b>	12, 6±0, 3	12, 7±0, 6	13, 0±0, 2	13, 1±1, 3	12, 9±0, 6	13, 8±0, 8	13, 5±0, 5	12, 9±0,7	13, 0±0, 7

**1**= *Avahi occidentalis*

**2**= *Avahi unicolor*

**3**= *Avahi cleesei*

**4**= *Avahi laniger*

**5**= *Avahi meridionalis ramanantsoavani*

**6**= *Avahi meridionalis meridionalis*

**7**= *Avahi betsileo*

**8**= *Avahi peyrierasi 1*

**9**= *Avahi peyrierasi 2*

\*Membre antérieur

\*\*Membre postérieur

#### **IV-2-2-2.- Test de comparaison des moyennes: test “t”**

Pour connaître les différences significatives respectives des moyennes du poids, de la longueur de la tête, de la longueur du corps, de la longueur de la queue, de la longueur du radius, de la longueur de l’humérus, de la longueur du tibia et de la longueur du fémur de *Avahi occidentalis*, *Avahi unicolor*, *Avahi cleesei*, *Avahi laniger*, *Avahi betsileo*, *Avahi peyrierasi 1*, *Avahi peyrierasi 2*, *Avahi meridionalis ramanantsoavani* et *Avahi meridionalis meridionalis*, nous avons comparé les différentes espèces deux à deux avec le test “t” qui consiste à comparer la valeur de la probabilité calculée avec la valeur de la probabilité d’erreur 0, 05. Toute différence de mensuration ayant une valeur de probabilité calculée inférieure à 0, 05 est significative et les résultats des comparaisons des moyennes de chaque variable avec les différences de moyennes sont résumés dans le **tableau 2 (page 42)**.

**Tableau 2:** Résultats du test-t (comparaison des moyennes) de toutes les espèces du genre *Avahi*.

Espèces comparées	Poids	Tête	Corps	Queue	Radius	Humérus	Tibia	Fémur
<i>Avahi laniger</i>	0,0210 (0,28)	0,1365	0,4606	0,4410	0,0823	0,0343 (0,8)	0,0298 (1,1)	0,2607
<i>Avahi unicolor</i>								
<i>Avahi laniger</i>	0,0267 (0,19)	0,0156 (0,5)	0,2603	0,2237	0,0006 (1,1)	0,0787	0,0043 (1,2)	0,0589
<i>Avahi occidentalis</i>								
<i>Avahi laniger</i>	0,0253 (0,27)	0,3646	0,0056 (-3,1)	0,3871	0,4061	0,4921	0,4293	0,0199 (2,7)
<i>Avahi cleesei</i>								
<i>Avahi laniger</i>	0,0157 (0,33)	<0,0001 (-2,5)	0,0066 (2,8)	0,0555	0,2183	0,1494	0,0074 (-1,4)	0,3141
<i>Avahi betsileo</i>								
<i>Avahi laniger</i>	0,0434	0,2575	0,3609	0,3946	0,4724	0,4215	0,2126	0,3985
<i>Avahi meridionalis</i>								
<i>Avahi ramanantsoavani</i>								
<i>Avahi laniger</i>	0,2148	0,0144 (0,4)	0,0294 (-1,3)	0,3906	0,0115	0,2264	0,4175	0,0692
<i>Avahi occidentalis</i>								
<i>Avahi cleesei</i>	0,1424	0,1181	0,0086 (-3,6)	0,2076	0,0115 (-1,0)	0,1130	0,0135 (-1,3)	0,0030 (-0,7)
<i>Avahi occidentalis</i>								
<i>Avahi unicolor</i>	0,1252	0,2499	0,3312	0,3312	0,0300 (-0,5)	0,2050	0,4151	0,1234
<i>Avahi occidentalis</i>								
<i>Avahi betsileo</i>	0,2469	<0,0001 (-3,1)	0,0165 (3,4)	0,0295 (5,4)	0,0123 (-0,4)	0,0225 (-0,7)	0,0005 (-2,8)	0,0007 (-0,9)
<i>Avahi occidentalis</i>								
<i>Avahi meridionalis</i>								
<i>Avahi ramanantsoavani</i>								
<i>Avahi occidentalis</i>	0,2529	0,0580	0,1921	0,2682	0,0023 (-0,7)	0,1033	0,0149 (-1)	0,0266 (-0,3)
<i>Avahi m. meridionalis</i>								
<i>Avahi unicolor</i>	0,0613	0,2916	0,0083 (-0,7)	0,3329	<0,0001 (-0,1)	0,1856	0,0034 (-1,3)	<0,0001 (-1,2)
<i>Avahi betsileo</i>								
<i>Avahi unicolor</i>	0,1222	0,0008 (-2,8)	0,0425 (2,7)	0,0662	0,1965	0,0214 (1,2)	0,0014 (-2,5)	0,0553
<i>Avahi meridionalis</i>								
<i>Avahi ramanantsoavani</i>								
<i>Avahi unicolor</i>	0,3010	0,1587	0,3655	0,4017	0,0530	0,0618	0,0331 (-0,7)	0,2821
<i>Avahi m. meridionalis</i>								
<i>Avahi cleesei</i>	0,0303 (0,22)	0,1158	0,0747	0,4804	0,0009 (-1,3)	0,0493 (-0,6)	0,0038 (-1)	0,0122 (-1,1)
<i>Avahi unicolor</i>								
<i>Avahi cleesei</i>	0,4466	0,2298	0,0636	0,3343	0,1567	0,0531	0,0017 (1,2)	0,1825
<i>Avahi betsileo</i>								
<i>Avahi cleesei</i>	0,1272	0,0022 (-2,6)	0,0110 (5,9)	0,1359	0,3309	0,1489	0,0156 (-1,4)	0,0897
<i>Avahi m. meridionalis</i>								
<i>Avahi cleesei</i>	0,3343	0,2884	0,1027	0,4962	0,4428	0,4278	0,2915	0,4428
<i>Avahi meridionalis</i>								
<i>Avahi ramanantsoavani</i>								
<i>Avahi cleesei</i>	0,0343 (-0,20)	0,0469 (0,3)	0,0905	0,3304	0,0375 (-0,8)	0,2310	0,2798	0,0343 (-0,8)

<i>Avahi meridionalis</i>								
<i>ramanantsoavani</i>	0,2863	<0,0001 (-2,9)	0,0007 (4,1)	0,0584	0,0066 (1)	0,0308(-0,6)	0,0010 (1,5)	0,2168
<i>Avahi betsileo</i>								
<i>Avahi m. meridionalis</i>	0,1692	0,0111 (2,2)	0,0360 (3,2)	0,2380	0,2271	0,2325	0,1323	0,1376
<i>Avahi betsileo</i>								
<i>Avahi m. meridionalis</i>	0,0574	0,0277 (0,9)	0,1780	0,3589	0,0343 (0,7)	0,1903	0,1343	0,0374 (0,9)
<i>Avahi meridionalis</i>								
<i>ramanantsoavani</i>								
<i>Avahi occidentalis</i>	0,0123 (-0,18)		0,0224(-1)			0,0315 (0,4)		
<i>Avahi peyrierasi 1</i>								
<i>Avahi unicolor</i>		<0,0001 (-0,2)					0,0125 (-0,9)	0,0402 (-0,2)
<i>Avahi peyrierasi 1</i>								
<i>Avahi cleesei</i>	0,0012 (-0,26)		0,0335(2,5)		<0,0001(0,1)	0,0003 (-0,1)		
<i>Avahi peyrierasi 1</i>								
<i>Avahi laniger</i>	0,0424 (0,1)	0,0154 (01)					0,0166 (0,2)	0,0225 (0,2)
<i>Avahi betsileo</i>			0,0354 (-3,4)		0,0214 (-0,1)			0,0140 (0,6)
<i>Avahi peyrierasi 1</i>								
<i>Avahi meridionalis</i>								
<i>ramanantsoavani</i>								
<i>Avahi peyrierasi 1</i>		0,0420 (0,4)			0,0324 (0,2)		0,0232 (-0,1)	
<i>Avahi m. meridionalis</i>	0,0342 (0,14)							
<i>Avahi peyrierasi 1</i>								
<i>Avahi occidentalis</i>	0,0148 (-0,11)	0,0354 (-0,1)	0,0021(-1,8)			<0,0001(0,3)		0,0241 (-1)
<i>Avahi peyrierasi 2</i>								
<i>Avahi unicolor</i>			0,0256 (0,2)	0,0024 (-2,5)			0,0328 (-0,3)	
<i>Avahi peyrierasi 2</i>								
<i>Avahi cleesei</i>	0,0054 (-0,19)		<0,0001(0,4)		0,0078 (-0,1)	0,0395 (0,6)		
<i>Avahi peyrierasi</i>								
<i>Avahi laniger</i>			0,0006 (0,8)		0,0054 (0,1)		0,0399 (0,5)	
<i>Avahi betsileo</i>				0,0056 (0,9)				
<i>Avahi peyrierasi 2</i>								
<i>Avahi meridionalis</i>								
<i>ramanantsoavani</i>								
<i>Avahi peyrierasi 2</i>		0,0263 (3)			0,0051(-0,3)			
<i>Avahi m. meridionalis</i>	<0,0001(-0,07)		0,0440 (-2)			0,0328 (0,7)		
<i>Avahi peyrierasi 2</i>								
<i>Avahi peyrierasi 1</i>		<0,0001 (0,4)		0,0056 (-2,3)			0,0252 (0,6)	
<i>Avahi peyrierasi 2</i>								

Les valeurs entre parenthèses indiquent les différences des moyennes entre les deux espèces comparées avec un seuil de 5%.

Entre *Avahi laniger* et *Avahi unicolor* les différences de trois variables sur huit sont significatives: le poids ( $p=0,0210$ ;  $d= 0,28$ ), l'humérus ( $p=0,0343$ ;  $d= 0,8$ ) et le tibia ( $p=0,0298$ ;  $d= 1,1$ ).

Entre *Avahi laniger* et *Avahi occidentalis* les différences de quatre variables sur huit sont significatives: le poids ( $p=0,0267$ ;  $d= 0,19$ ), la couronne de la tête ( $p=0,156$ ;  $d= 0,05$ ), la longueur du radius ( $p=0,0006$ ;  $d= 1,1$ ) et la longueur du tibia ( $p=0,0043$ ;  $d= 1,2$ ).

Entre *Avahi laniger* et *Avahi cleesei* les différences de quatre variables sur huit sont significatives: le poids ( $p=0,0253$ ;  $d= 0,27$ ), la longueur du corps ( $p=0,0056$ ;  $d= -3,1$ ) et la longueur du fémur ( $p=0,0199$ ;  $d= 2,7$ ).

Entre *Avahi laniger* et *Avahi betsileo* les différences de cinq variables sur huit sont significatives: le poids ( $p=0,0157$ ;  $d= 0,33$ ), la couronne de la tête ( $p<0,0001$ ;  $d= -2,5$ ), la longueur du corps ( $p=0,0066$ ;  $d= 2,8$ ) et la longueur du tibia ( $p=0,0074$ ;  $d= -1,4$ ).

Entre *Avahi laniger* et *Avahi meridionalis ramanantsoavani* il n'y a pas de différence sur les huit variables.

Entre *Avahi laniger* et *Avahi meridionalis meridionalis* les différences de cinq variables sur huit sont significatives: la couronne de la tête ( $p=0,0144$ ;  $d= 0,4$ ), la longueur du corps ( $p=0,0294$ ;  $d= -1,3$ ) et la longueur du fémur ( $p=0,0692$ ;  $d= -0,7$ ).

Entre *Avahi occidentalis* et *Avahi cleesei* les différences de quatre variables sur huit sont significatives: la longueur du corps ( $p=0,0086$ ;  $d= -3,6$ ), la longueur du radius ( $p=0,0115$ ;  $d= -1$ ), la longueur du tibia ( $p=0,0135$ ;  $d= -1,3$ ) et la longueur du fémur ( $p=0,0030$ ;  $d= -0,7$ ).

Entre *Avahi occidentalis* et *Avahi unicolor* la différence d'un variable sur huit est significative: la longueur du radius ( $p=0,0300$ ;  $d= -0,5$ ).

Entre *Avahi occidentalis* et *Avahi betsileo* les différences de sept variables sur huit sont significatives: la couronne de la tête ( $p=<0,0001$ ;  $d= -3,1$ ), la longueur du corps ( $p=0,0165$ ;  $d= 3,4$ ), la longueur de la queue ( $p=0,0295$ ;  $d= 5,4$ ), la longueur du radius ( $p=0,0123$ ;  $d= -0,4$ ), la longueur de l'humérus ( $p=0,0225$ ;  $d= -0,7$ ), la longueur du tibia ( $p=0,0005$ ;  $d= -2,8$ ) et la longueur du fémur ( $p=0,0007$ ;  $d= -0,9$ ).

Entre *Avahi occidentalis* et *Avahi meridionalis ramanantsoavani* les différences de trois variables sur huit sont significatives: la longueur du radius ( $p=0,0023$ ;  $d= -0,7$ ), la longueur du tibia ( $p=0,0149$ ;  $d= -1$ ) et la longueur du fémur ( $p=0,0266$ ;  $d= -0,3$ ).

Entre *Avahi occidentalis* et *Avahi meridionalis meridionalis* les différences de quatre variables sur huit sont significatives: la longueur du corps ( $p=0,0083$ ;  $d= -0,7$ ), la longueur du radius ( $p<0,0001$ ;  $d= -0,1$ ), la longueur du tibia ( $p=0,0034$ ;  $d= -1,3$ ) et la longueur du fémur ( $p<0,0001$ ;  $d= 1,2$ ).

Entre *Avahi cleesei* et *Avahi unicolor* la différence d'un variable sur huit est significative: la longueur du tibia ( $p=0,0017$ ;  $d= 1,2$ ).

Entre *Avahi cleesei* et *Avahi betsileo* les différences de trois variables sur huit sont significatives: la couronne de la tête ( $p=0,0022$ ;  $d=-2,6$ ), la longueur du corps ( $p=0,0110$ ;  $d=5,9$ ) et la longueur du tibia ( $p=0,0156$ ;  $d=-1,4$ ).

Entre *Avahi cleesei* et *Avahi meridionalis ramanantsoavani* il n'y a pas de différence significative sur tous les variables.

Entre *Avahi cleesei* et *Avahi meridionalis meridionalis* les différences de quatre variables sur huit sont significatives: le poids ( $p=0,0343$ ;  $d=-0,20$ ), la couronne de la tête ( $p=0,0469$ ;  $d=-0,3$ ), la longueur du radius ( $p=0,0375$ ;  $d=-0,8$ ) et la longueur du tibia ( $p=0,0343$ ;  $d=-0,8$ ).

Entre *Avahi unicolor* et *Avahi betsileo* les différences de quatre variables sur huit sont significatives: la couronne de la tête ( $p=0,0008$ ;  $d= -2,8$ ), la longueur du corps ( $p=0,0425$ ;  $d= 2,7$ ), la longueur de l'humérus ( $p=0,0214$ ;  $d= 1,2$ ) et la longueur du tibia ( $p=0,0014$ ;  $d= -2,5$ ).

Entre *Avahi unicolor* et *Avahi meridionalis ramanantsoavani* la différence est significative sur la longueur du tibia ( $p=0,0331$ ;  $d= -0,7$ ).

Entre *Avahi unicolor* et *Avahi meridionalis meridionalis* les différences de quatre variables sur huit sont significatives: le poids ( $p=0,0303$ ;  $d= 0,22$ ), la longueur du radius ( $p=0,0009$ ;  $d=-1,3$ ), la longueur de l'humérus ( $p=0,0493$ ;  $d= -0,6$ ) et la longueur du fémur ( $p=0,0122$ ;  $d= 1,1$ ).

Entre *Avahi meridionalis meridionalis* et *Avahi betsileo* les différences de cinq variables sur huit sont significatives: la couronne de la tête ( $p<0,001$ ;  $d= 2,9$ ), la longueur du corps ( $p=0,007$ ;  $d= 4,1$ ), la longueur du radius ( $p=0,0066$ ;  $d= 1$ ), la longueur de l'humérus ( $p=0,0308$ ;  $d= -0,6$ ) et la longueur du tibia ( $p=0,0010$ ;  $d=1,5$ ).

Entre *Avahi meridionalis ramanantsoavani* et *Avahi betsileo* les différences de deux variables sur huit sont significatives: la couronne de la tête ( $p=0,011$ ;  $d= 2,2$ ) et la longueur du corps ( $p=0,0360$ ;  $d= 3,2$ ).

Entre *Avahi meridionalis meridionalis* et *Avahi meridionalis ramanantsoavani* les différences de trois variables sur huit sont significatives: la couronne de la tête ( $p=0,0277$ ;  $d= 0,9$ ), la longueur du radius ( $p=0,0343$ ;  $d= 0,7$ ) et la longueur du fémur ( $p=0,0374$ ;  $d=0,9$ ).

Entre *Avahi occidentalis* et *Avahi peyrierasi 1* les différences de trois variables sur huit sont significatives: le poids ( $p=0,0123$ ;  $d=0,18$ ), la longueur du corps ( $p=0,0224$ ;  $d= -1$ ), la longueur de l'humérus ( $p=0,0315$ ;  $d= 0,4$ ).

Entre *Avahi unicolor* et *Avahi peyrierasi 1* les différences de trois variables sur huit sont significatives: la longueur du corps ( $p<0,0001$ ;  $d= -0,2$ ), la longueur du tibia ( $p=0,0125$ ;  $d= -0,9$ ) et la longueur du fémur ( $p=0,0402$ ;  $d= -0,2$ ).

Entre *Avahi cleesei* et *Avahi peyrierasi 1* les différences de quatre variables sur huit sont significatives: le poids ( $p=0,0012$ ;  $d=-0,26$ ), la longueur du corps ( $p=0,0335$ ;  $d= 2,5$ ), la longueur du radius ( $p<0,0001$ ;  $d= 0,1$ ) et la longueur de l'humérus ( $p=0,0003$ ;  $d= -0,1$ ).

Entre *Avahi laniger* et *Avahi peyrierasi 1* les différences de quatre variables sur huit sont significatives: le poids ( $p=0,0424$ ;  $d=-0,1$ ), la longueur de la tête ( $p=0,0154$ ;  $d= 0,1$ ), la longueur du tibia ( $p=0,0166$ ;  $d= 0,2$ ) et la longueur du fémur ( $p=0,0225$ ;  $d= 0,2$ ).

Entre *Avahi betsileo* et *Avahi peyrierasi 1* les différences de trois variables sur huit sont significatives: la longueur du corps ( $p=0,0354$ ;  $d=-3,4$ ), la longueur du radius ( $p=0,0214$ ;  $d= -0,1$ ) et la longueur du fémur ( $p=0,0140$ ;  $d= 0,6$ ).

Entre *Avahi meridionalis ramanantsoavani* et *Avahi peyrierasi 1* les différences de trois variables sur huit sont significatives: la longueur de la tête ( $p=0,0420$ ;  $d=0,4$ ), la longueur du radius ( $p=0,0324$ ;  $d= 0,2$ ) et la longueur du tibia ( $p=0,0232$ ;  $d= -0,1$ ).

Entre *Avahi meridionalis meridionalis* et *Avahi peyrierasi 1* la différence d'un seul variable sur huit est significative: le poids ( $p=0,0342$ ;  $d=0,4$ ).

Entre *Avahi occidentalis* et *Avahi peyrierasi 2* les différences de cinq variables sur huit sont significatives: le poids ( $p=0,0148$ ;  $d=-0,11$ ), la longueur de la tête ( $p=0,0354$ ;  $d= -0,1$ ), la longueur du corps ( $p=0,0021$ ;  $d= -1,8$ ), la longueur de l'humérus ( $p<0,0001$ ;  $d= 0,3$ ) et la longueur du fémur ( $p=0,0241$ ;  $d= -1$ ).

Entre *Avahi unicolor* et *Avahi peyrierasi 2* les différences de trois variables sur huit sont significatives: la longueur de la tête ( $p=0,0256$ ;  $d=0,2$ ), la longueur du corps ( $p=0,0024$ ;  $d= -2,5$ ), la longueur de l'humérus ( $p<0,0001$ ;  $d= 0,3$ ) et la longueur du tibia ( $p=0,0328$ ;  $d= 0,3$ ).

Entre *Avahi cleesei* et *Avahi peyrierasi 2* les différences de quatre variables sur huit sont significatives: le poids ( $p=0,0054$ ;  $d=-0,19$ ), la longueur du corps ( $p<0,0001$ ;  $d=0,4$ ), la longueur du radius ( $p=0,0078$ ;  $d= -0,1$ ) et la longueur de l'humérus ( $p=0,0395$ ;  $d= 0,6$ ).

Entre *Avahi laniger* et *Avahi peyrierasi 2* les différences de trois variables sur huit sont significatives: la longueur de la tête ( $p=0,0006$ ;  $d=0,8$ ), la longueur de la queue ( $p=0,0054$ ;  $d=0,1$ ) et la longueur du tibia ( $p=0,0399$ ;  $d= 0,5$ ).

Entre *Avahi betsileo* et *Avahi peyrierasi 2* la différence d'une seule variable sur huit est significative: la longueur du corps ( $p=0,0056$ ;  $d=0,9$ ).

Entre *Avahi meridionalis ramanantsoavani* et *Avahi peyrierasi 2* les différences de deux variables sur huit sont significatives: la longueur de la tête ( $p=0,0263$ ;  $d=3$ ) et la longueur du radius ( $p=0,0051$ ;  $d=-0,3$ ).

Entre *Avahi meridionalis meridionalis* et *Avahi peyrierasi 2* les différences de trois variables sur huit sont significatives: le poids ( $p<0,0001$ ;  $d=-0,07$ ), la longueur du corps ( $p=0,0440$ ;  $d=-2$ ) et la longueur de l'humérus ( $p=0,0328$ ;  $d=0,7$ ).

Entre *Avahi peyrierasi 1* et *Avahi peyrierasi 2* les différences de trois variables sur huit sont significatives: la longueur de la tête ( $p<0,0001$ ;  $d=0,4$ ), la longueur de la queue ( $p=0,0056$ ;  $d=-2,3$ ) et la longueur du radius ( $p=0,0252$ ;  $d=0,7$ ).

**Tableau 3:** Nombre de différences parmi les huit variables mesurés entre les différentes espèces du genre *Avahi*

	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>	<b>g</b>	<b>h</b>
<b>b</b>	<b>1</b>							
<b>c</b>	<b>4</b>	<b>1</b>						
<b>d</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>					
<b>e</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>				
<b>f</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>			
<b>g</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>5</b>		
<b>h</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	
<b>i</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>

**a**= *Avahi occidentalis*

**b**= *Avahi unicolor*

**c**= *Avahi cleesei*

**d**= *Avahi laniger*

**e**= *Avahi meridionalis ramanantsoavani*

**f**= *Avahi meridionalis meridionalis*

**g**= *Avahi betsileo*

**h**= *Avahi peyrierasi 1*

**i**= *Avahi peyrierasi 2*

### IV-3.- ETUDE DE L'ADN MITOCHONDRIAL

Des études cladistiques sur les lémuriens ont été déjà faites sur la morphologie (Randria, 1998) et sur la séquence d'ADN (Yoder, 2003). Nous avons étudié les séquences du fragment D-loop et des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> afin de déterminer les différences sur les séquences de l'ADN mitochondrial entre chaque groupe d'individus provenant des différents sites de l'Ouest et de l'Est de Madagascar, en effet nous avons étudié 77 individus d'*Avahi*:

\*Au Nord de la rivière Mangoro:

-10 individus capturés à Mananara-Nord qui sont NARA4.1, NARA4.2, NARA4.10, NARA4.11, NARA4.13, NARA4.17, NARA4.18, NARA4.23, NARA4.31 et NARA4.32.

-10 individus capturés à Mantadia qui sont TAD1, TAD2, TAD3, TAD19, TAD36, TAD37, TAD4.3, TAD4.8, TAD4.9 et TAD4.20.

-4 individus capturés à Maromizaha qui sont MIZA10, MIZA12, MIZA13 et MIZA14.

\*Au Sud de la rivière Mangoro:

-5 individus capturés à Fandriana qui sont FAN2.14, FAN2.15, FAN2.19, FAN2.20 et FAN2.21.

-8 individus capturés à Ranomafana qui sont RANO66, RANO67, RANO348, RANO2.10, RANO199, RANO261, RANO319B et RANO320B.

-3 individus capturés à Vohiparara qui sont VOP2.13, VOP2.14 et VOP2.15.

-10 individus capturés à Manombo qui sont M86, M89, M107, M108, M119, M150, M155, M159, MAB4.8 et MAB4.10.

-10 individus capturés à Andohahela qui sont AND4, AND5, AND6, AND11, AND12, AND13, AND14, AND19, AND33 et AND34.

Dans l'Ouest:

\*Au Nord de la rivière Betsiboka:

-4 individus capturés à Antafondro qui sont ANT5.8, ANT5.9, ANT5.10 et ANT5.12.

-8 individus capturés à Mariarano qui sont MAR29, MAR46, MAR52, MAR54, MAR55, MAR56, MAR60 et MAR61.

\*Au Sud de la rivière Betsiboka:

-5 individus capturés à Bemaraha qui sont BEMA8, BEMA9, BEMA12, BEMA13 et BEMA14.

Les individus extragroupes sont des Lémuriens appartenant à différentes familles qui sont:

-Famille des Indriidae: JAR4 et MIZA5. (*Indri indri*), RANO332 (*Propithecus edwardsi*), JAR14 (*Propithecus diadema*), ANAL10 (*Propithecus perrieri*), TAD13 (*Propithecus diadema*), BOR2 (*Propithecus coquereli*), DAR4.2 (*Propithecus tattersalli*), BEMA4 (*Propithecus deckeni*), JAM4.7 (*Propithecus coronatus*) et MOR68 (*Propithecus verreauxi*).

-Famille Lemuridae: FAN21 (*Varecia variegata variegata*), RANO45 (*Eulemur rufus*), ANAL2.23 et GAR9 (*Hapalemur griseus occidentalis*), RANO61 et RANO62 (*Hapalemur griseus griseus*), RANO351 et RANO352 (*Hapalemur aureus*), KIAN124 et RANO33 (*Hapalemur simus*).

-Famille Megalapidae: ANAL5 (*Lepilemur ankaranensis*).

-Famille Cheirogaleidae: ANK7 (*Microcebus ravelobensis*), RANO250 (*Microcebus rufus*), GAR8 (*Cheirogaleus medius*) et RANO229 (*Cheirogaleus major*).

Pour obtenir la séquence de l'ADN mitochondrial de chaque individu, les produits d'amplification de la réaction de séquençage ont été analysés avec la machine ABI 3100 SEQUENCER. Nous avons séquencé 562 paires de bases pour le fragment D-loop et 2364 paires de base pour les fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et d'ARN-t<sup>LEU</sup>.

### **IV-3.-1 ETUDE DU FRAGMENT D-LOOP**

Les séquences du fragment D-loop de chaque individu ont été alignées en utilisant le logiciel Clustal X (Thompson *et al*, 1997) et les différences de bases avec leurs sites respectifs dans la séquence sont résumés dans la (**figure7, pages 50 et 51**); ces différences de base nous ont permis de grouper les individus ayant les mêmes séquences.

		111111112222222233333333333344455555555
		1260155799927777889900011333349902900002244
		6046289245975679785602934234686712925671538
RANO66	ATCGAAACACAGGAATTAAAGTCCTCTACAGCCAAAATCGG	
RANO319B	.....	C
RANO348	.....	C
RANO2.10	.....	
VOP2.13	.....	
VOP2.14	.....	
VOP2.15	.....	
RANO67	.....TTC.....T.....T.....G.....GG.....C	
RANO199	.....TTC.....T.....T.....G.....GG.....C	
RANO320B	.....TTC.....T.....T.....G.....GG.....C	
RANO261	.....TTC.....T.....T.....G.....GG.....C	
M86	.....G.TACT.....T.....T.....GG.....T	
M89	.....G.TACT.....T.....T.....GG.....T	
M107	.....G.TACT.....T.....T.....GG.....T	
M108	.....G.TACT.....T.....T.....GG.....T	
M119	.....G.TACT.....T.....T.....GG.....T	
M150	.....G.TACT.....T.....T.....GG.....T	
M155	.....G.TACT.....T.....T.....GG.....T	
M159	.....G.TACT.....T.....T.....GG.....T	
MAB4.8	.....G.TACT.....T.....T.....GG.....T	
MAB4.10	.....G.TACT.....T.....T.....GG.....T	
FAN2.14	.....C.....TTC.G.....T.....C.....TC.T.....GG.....C	
FAN2.15	.....C.....TTC.G.....T.....C.....TC.T.....GG.....C	
FAN2.19	.....C.....TTC.G.....T.....C.....TC.T.....GG.....C	
FAN2.20	.....C.....TTC.G.....T.....C.....TC.T.....GG.....C	
FAN2.21	.....C.....TTC.G.....T.....C.....TC.T.....GG.....C	
AND4	G.T.G.GTTC.....T.....T.....T.GGG	
AND5	G.T.G.GTTC.....T.....T.....T.GGG	
AND6	G.T.G.GTTC.....T.....T.....T.GGG	
AND11	G.T.G.GTTC.....T.....T.....T.GGG	
AND12	G.T.G.GTTC.....T.....T.....T.GGG	
AND13	G.T.G.GTTC.....T.....T.....T.GGG	
AND14	G.T.G.GTTC.....T.....T.....T.GGG	
AND19	G.T.G.GTTC.....T.....T.....T.GGG	
AND33	G.T.G.GTTC.....T.....T.....T.GGG	
AND34	G.T.G.GTTC.....T.....T.....T.GGG	
TAD1	.....TTC.C.T.....T.....GG.....A	
TAD2	.....TTC.C.T.....T.....GG.....A	
TAD3	.....TTC.C.T.....T.....GG.....A	
TAD19	.....TTC.C.T.....T.....GG.....A	
TAD36	.....G.TTC.C.T.....T.....GG.....A	
TAD37	.....TTC.C.T.....T.....GG.....A	
TAD4.3	.....G.TTC.C.T.....T.....GG.....A	
TAD4.8	.....G.TTC.C.T.....T.....GG.....A	
TAD4.9	.....G.TTC.C.T.....T.....GG.....A	
TAD4.20	.....TTC.C.T.....T.....GG.....A	
MIZA10	.....TTC.C.T.....T.....GG.....A	
MIZA12	.....TTC.C.T.....T.....GG.....A	
MIZA14	.....TTC.C.T.....T.....GG.....A	
MIZA13	.....G.TTC.C.T.....T.....GG.....A	
NARA4.1	.....TTC.C.T.....T.....GG.....	
NARA4.2	.....TTC.C.T.....T.....GG.....	
NARA4.100	.....TTC.C.T.....T.....GG.....	
NARA4.11	.....TTC.C.T.....T.....GG.....	
NARA4.13	.....TTC.C.T.....T.....GG.....	
NARA4.17	.....TTC.C.T.....T.....GG.....	
NARA4.18	.....TTC.C.T.....T.....GG.....	
NARA4.23	.....TTC.C.T.....T.....GG.....	

NARA4.31	.....TTC..C..T.....T.....GG.....
NARA4.32	.....TTC..C..T.....T.....GG.....
ANT5.8	.....A.....TTC..C..T.C.....T..TG..GAT..GG.....
ANT5.9	.....A.....TTC..C..T.C.....T..TG..GAT..GG.....
ANT5.10	.....A.....TTC..C..T.C.....T..TG..GAT..GG.....
ANT5.12	.....A.....TTC..C..T.C.....T..TG..GAT..GG.....
BEMA8	...A.C..TTC..AA.CC...GA...CTG...C...GG.....
BEMA9	...A.C..TTC..AA.CC...GA...CTG...C...GG.....
BEMA12	...A.C..TTC..AA.CC...GA...CTG...C...GG.....
BEMA13	...A.C..TTC..AA.CC...GA...CTG...C...GG.....
BEMA14	...A.C..TTC..AA.CC...GA...CTG...C...GG.....
MAR29	.....TTC..C..T..CG.....T..TG...C..GGG.....
MAR46	.....TTC..C..T..CG.....T..TG...C..GGG.....
MAR52	.....TTC..C..T..CG.....T..TG...C..GGG.....
MAR54	.....TTC..C..T..CG.....T..TG...C..GGG.....
MAR55	.....TTC..C..T..CG.....T..TG...C..GGG.....
MAR56	.....TTC..C..T..CG.....T..TG...C..GGG.....
MAR60	.....TTC..C..T..CG.....T..TG...C..GGG.....
MAR61	.....TTC..C..T..CG.....T..TG...C..GGG.....

**Figure 7:** Les différences de bases de la séquence du fragment D-loop d'*Avahi* avec leurs positions respectives sur la séquence

Les séquences obtenues ont été analysées avec le programme PAUP (Swofford, 2001) pour engendrer des arbres phylogénétiques. 562 paires de base du fragment D-loop de 29 haplotypes d'*Avahi* ont été analysées en utilisant la méthode de vraisemblance maximum (maximum likelihood), 77 individus en utilisant la méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining) et la méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony).

#### **IV-3-1-1.- Méthode de la vraisemblance maximum (maximum likelihood)**

La méthode de vraisemblance évalue tout arbre possible et calcule les vraisemblances pour chaque arbre. Nous avons analysé 29 séquences d'haplotypes d'*Avahi* et de 26 individus extragroupes dont les individus intragroupes sont:

-Des individus de l'Est

\*Au Nord de la rivière Mangoro:

-les individus de Mananara-Nord: NARA 4.1, NARA 4.2, NARA 4.10 et NARA 4.11.

-les individus de Mantadia: TAD 1, TAD 2, TAD 36, TAD 37, TAD 4.3, TAD 4.8 et TAD 4.9.

-les individus de Maromizaha: MIZA 10 et MIZA13.

\*Au Sud de la rivière Mangoro:

-les individus de Fandriana: FAN 2.14 et FAN 2.15.

-les individus de Ranomafana: RANO 66, RANO 67, RANO 199 et RANO 319B.

-les individus de Vohiparara: VOP 2.13.

-les individus de Manombo: M 86 et M 89.

-les individus d'Andohahela: AND 4, AND 6, AND 11 et AND 12.

-Des individus de l'Ouest

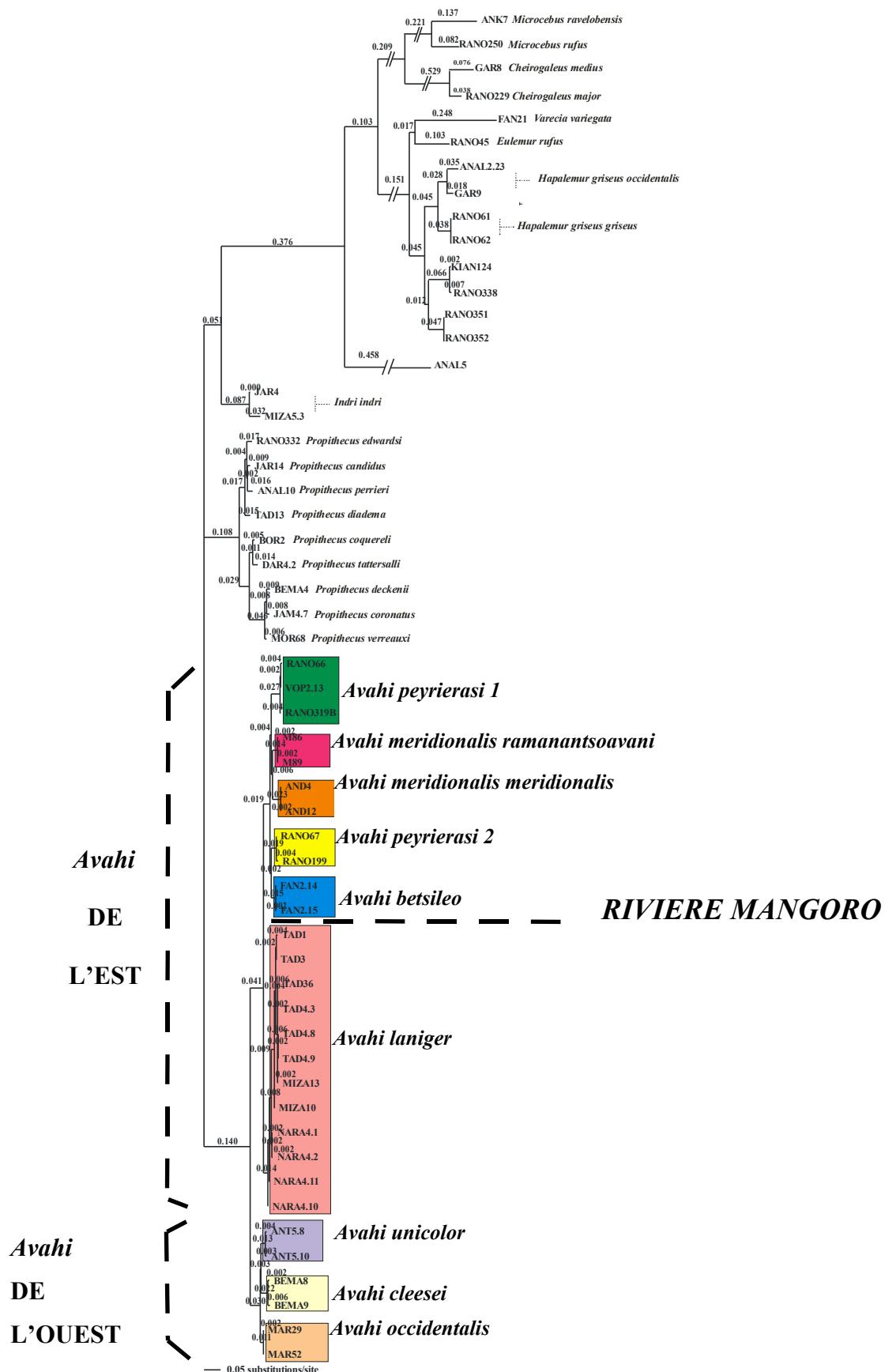
\*Au Nord de la rivière Betsiboka:

-les individus d'Antafodro: ANT5.8 et ANT 5.10.

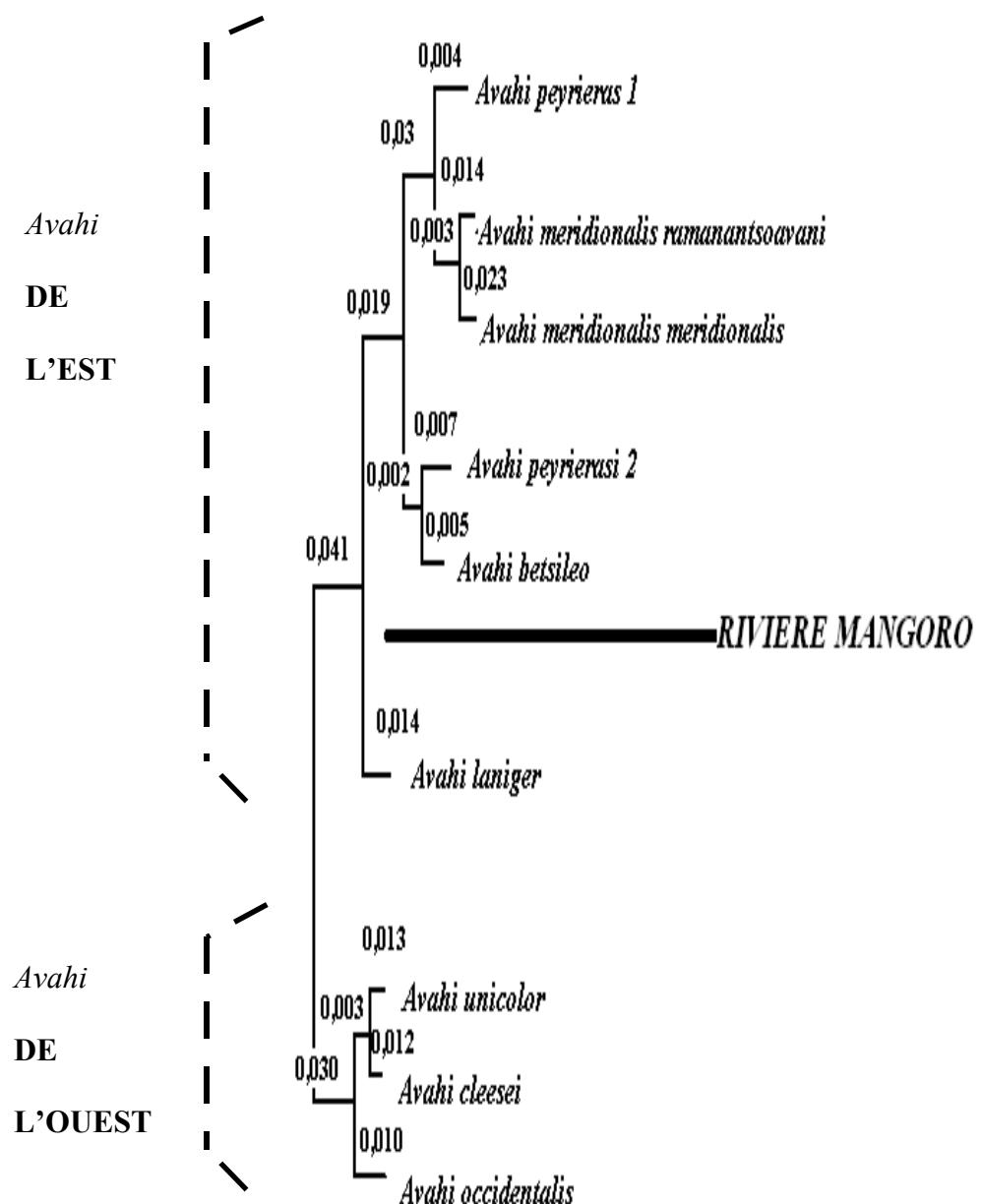
-les individus de Mariarano: MAR 29, MAR 46 et MAR 52.

\*Au Sud de la rivière Betsiboka:

-les individus de Bemaraha: BEMA 8 et BEMA 9



**Figure 8:** Phylogramme de la vraisemblance maximum (maximum likelihood) dérivé de la séquence du fragment D-loop de 29 haplotypes d'*Avahi* et de 26 individus extragroupes.



**Figure 9:** Phylogramme de la vraisemblance maximum (maximum likelihood) dérivé de la séquence du fragment D-loop de *Avahi*.

La topologie de la vraisemblance maximum (maximum likelihood) de la séquence du fragment D-loop de 29 haplotypes d'*Avahi* nous montre deux grands groupes :

-*Avahi* de l'Ouest constitué de 3 clades qui sont le clade de *Avahi unicolor* (ANT 5.8 et ANT 5.10), le clade de *Avahi occidentalis* (MAR 29, MAR 46 et MAR 52) et le clade de *Avahi cleesei* (BEMA 8 et BEMA 9).

-*Avahi* de l'Est constitué de 6 clades:

\*Au Nord de la rivière Mangoro, le clade constitué par les individus de Mananara-Nord (NARA4.1, NARA4.2, NARA4.10, NARA4.11), les individus de Mantadia (TAD 1, TAD 2, TAD 36, TAD 37, TAD 4.3, TAD 4.8 et TAD 4.9) et les individus de Maromizaha (MIZA 10 et MIZA13).

\*Au Sud de la rivière Mangoro, le clade des individus de Fandriana (FAN2.14 et FAN2.15), le clade des individus de Ranomafana avec des individus de Vohiparara (RANO66, RANO319B et VOP2.13), le clade des individus de Ranomafana (RANO 67, RANO 199), le clade des individus de Manombo (M86 et M89) et le clade des individus d'Andohahela (AND 4, AND 6, AND 11 et AND 12.).

Pour *Avahi* de l'Ouest, *Avahi unicolor* et *Avahi cleesei* sont les groupes les plus proches et le clade de ces deux espèces est groupe-frère de *Avahi occidentalis*.

La topologie montre que *Avahi* de l'Est est divisé en Nord et Sud de la rivière Mangoro ce qui montre le rôle de barrière géographique de cette rivière (Pastorini et al, 2003, Mayor et al, 2004, Andriaholinirina (2006).

*Avahi meridionalis ramanantsoavani* est le groupe le plus proche de *Avahi meridionalis meridionalis*. *Avahi betsileo* est le groupe le plus proche de *Avahi peyrierasi* 2

Le clade des individus de Ranomafana avec des individus de Vohiparara (*Avahi peyrierasi* 1) est groupe-frère du clade constitué par des individus de Manombo (*Avahi meridionalis ramanantsoavani*) et Andohahela (*Avahi meridionalis meridionalis*). L'ensemble de ces trois clades est groupe-frère du clade formé par les individus de Ranomafana (*Avahi peyrierasi* 2) et de Fandriana (*Avahi betsileo*). L'ensemble des individus au Nord de la rivière Mangoro est groupe-frère de l'ensemble des individus au Sud de la rivière Mangoro. *Avahi* au Nord de la rivière Mangoro est divisé en deux sous-groupes qui sont le sous-groupe des individus de Mananara-Nord et le sous-groupe des individus de Mantadia et de Maromizaha.

#### **IV-3-1-2.- Méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining)**

La méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining) identifie les plus proches des unités taxonomiques par la distance entre eux et les arbres ont été calculés par similarité des séquences. Nous avons analysé 77 séquences d'*Avahi* et les séquences de 25 individus extragroupes. Les individus intragroupes sont:

-*Avahi* de l'Est

\*Au Nord de la rivière Mangoro:

-individus de Mananara-Nord qui sont NARA4.1, NARA4.2, NARA4.10, NARA4.11, NARA4.13, NARA4.17, NARA4.18, NARA4.23, NARA4.31 et NARA4.32.

-individus de Mantadia qui sont TAD1, TAD2, TAD3, TAD19, TAD36, TAD37, TAD4.3, TAD4.8, TAD4.9 et TAD4.20.

-individus de Maromizaha qui sont MIZA10, MIZA12, MIZA13 et MIZA14.

\*Au Sud de la rivière Mangoro:

-individus de Fandriana qui sont FAN2.14, FAN2.15, FAN2.19, FAN2.20 et FAN2.21.

-individus de Ranomafana qui sont RANO66, RANO67, RANO348, RANO2.10, RANO199, RANO261, RANO319B et RANO320B.

-individus de Vohiparara qui sont VOP2.13, VOP2.14 et VOP2.15.

-individus de Manombo qui sont M86, M89, M107, M108, M119, M150, M155, M159, MAB4.8 et MAB4.10.

-individus d'Andohahela qui sont AND4, AND5, AND6, AND11, AND12, AND13, AND14, AND19, AND33 et AND34.

-*Avahi* de l'Ouest

\*Au Nord de la rivière Betsiboka:

-individus d'Antafondro qui sont ANT5.8, ANT5.9, ANT5.10 et ANT5.12.

-individus de Mariarano qui sont MAR29, MAR46, MAR52, MAR54, MAR55, MAR56, MAR60 et MAR61.

\*Au Sud de la rivière Betsiboka:

-individus de Bemaraha qui sont BEMA8, BEMA9, BEMA12, BEMA13 et BEMA14.

**Tableau 4:** Distances entre les différentes espèces d'*Avahi* obtenues à partir de la séquence du fragment D-loop

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	0,028							
<b>3</b>	0,033	0,030						
<b>4</b>	0,081	0,104	0,108					
<b>5</b>	0,104	0,137	0,142	0,055				
<b>6</b>	0,112	0,144	0,149	0,062				
<b>7</b>	0,110	0,142	0,147	0,042	0,040	0,048		
<b>8</b>	0,092	0,128	0,129	0,042	0,044	0,051	0,049	
<b>9</b>	0,124	0,140	0,145	0,058	0,026	0,046	0,0300	0,048

**1**= *Avahi occidentalis*

**2**= *Avahi unicolor*

**3**= *Avahi cleesei*

**4**= *Avahi laniger*

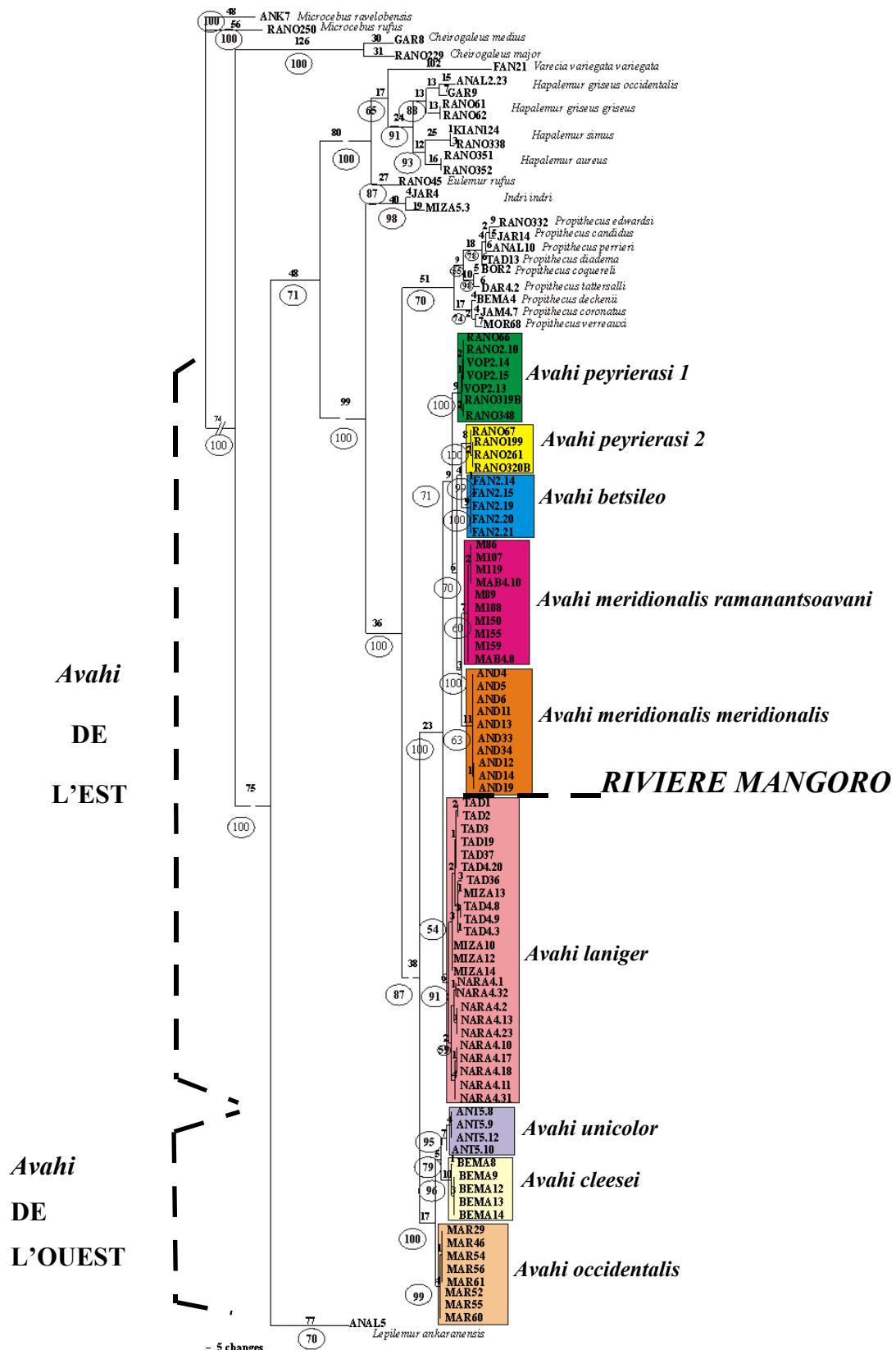
**5**= *Avahi meridionalis ramanantsoavani*

**6**= *Avahi meridionalis meridionalis*

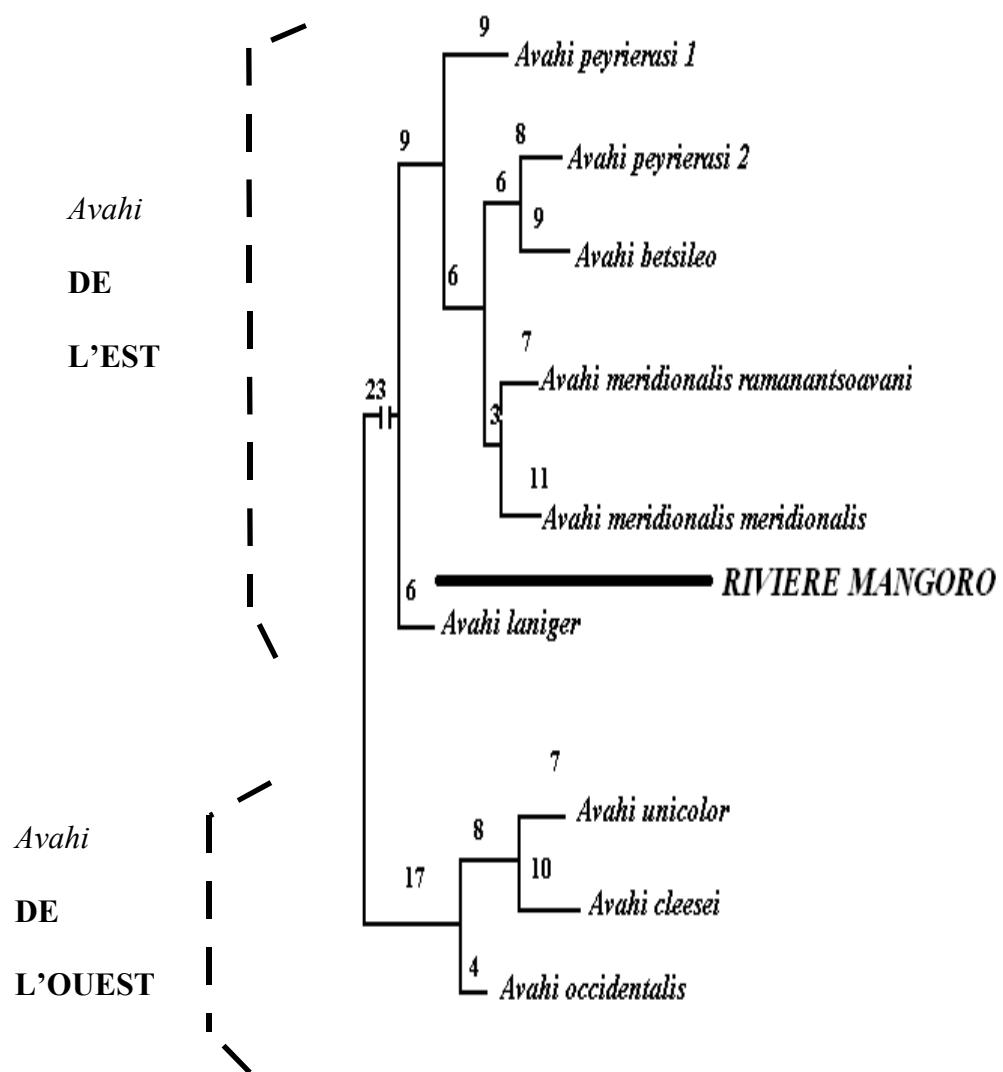
**7**= *Avahi betsileo*

**8**= *Avahi peyrierasi 1*

**9**= *Avahi peyrierasi 2*



**Figure 10:** Phylogramme du groupe le plus proche (neighbor-joining) dérivé de la séquence du fragment D-loop de 77 *Avahi* et 25 individus extragroupes.



**Figure 11:** Phylogramme du groupe le plus proche (neighbor-joining) dérivé de la séquence du fragment D-loop de *Avahi*.

Chaque entrenœud est caractérisé par des changements au cours de la construction de l'arbre et la valeur de chaque changement est indiquée au-dessus de chaque branche; ces changements sont supportés par 100 réplications par la méthode de bootstrap et la valeur de chaque support est représenté en pourcentage au-dessous de chaque branche. La topologie de l'arbre obtenu à partir de la méthode du plus proche voisin (neighbor-joining) de 77 *Avahi* nous montre la division de *Avahi* en Ouest-Est, cette topologie montre 9 clades:

-*Avahi* de l'Est

\*Au Nord de la rivière Mangoro:

-clade des individus de Mananara-Nord (NARA4.1, NARA4.2, NARA4.10, NARA4.11, NARA4.13, NARA4.17, NARA4.18, NARA4.23, NARA4.31 et NARA4.32) avec les individus de Mantadia (TAD1, TAD2, TAD3, TAD19, TAD36, TAD37, TAD4.3, TAD4.8, TAD4.9 et TAD4.20) et les individus de Maromizaha (MIZA10, MIZA12, MIZA13, MIZA14).

\*Au Sud de la rivière Mangoro:

-clade des individus de Ranomafana avec Vohiparara (RANO66, RANO348, RANO2.10, RANO319B, VOP2.13, VOP2.14, VOP2.15).

-clade des individus de Ranomafana (RANO67, RANO199, RANO320B, RANO261).

-clade des individus de Fandriana (FAN2.14, FAN2.15, FAN2.19, FAN2.20, FAN2.21).

-clade des individus de Manombo (M86, M89, M107, M108, M119, M150, M155, M159, MAB4.8, MAB4.10).

-clade des individus d'Andohahela (AND4, AND5, AND6, AND11, AND12, AND13, AND14, AND19, AND33, AND34).

-*Avahi* de l'Ouest

\*Au Nord de la rivière Betsiboka:

-clade de *Avahi unicolor* (ANT5.8, ANT5.9, ANT5.10, ANT5.12).

-clade de *Avahi occidentalis* (MAR29, MAR46, MAR52, MAR54, MAR55, MAR56, MAR60, MAR61).

\*Au Sud de la rivière Betsiboka:

-clade de *Avahi cleesei* (BEMA8, BEMA9, BEMA12, BEMA13, BEMA14).

La topologie est différente de la topologie obtenue par la méthode de vraisemblance maximum (maximum likelihood) mais les individus constituant chaque clade sont les mêmes.

*Avahi meridionalis ramanantsoavani* est le groupe le plus proche de *Avahi meridionalis meridionalis*. *Avahi betsileo* est le groupe le plus proche de *Avahi peyrierasi* 2

Le clade des individus de Ranomafana (*Avahi peyrierasi* 2) est groupe-frère des individus de Fandriana (*Avahi betsileo*) le clade des individus de Manombo (*Avahi meridionalis ramanantsoavani*) est groupe-frère du clade des individus d'Andohahela (*Avahi meridionalis meridionalis*); l'ensemble de ces groupes est groupe-frère du clade des

individus de Ronomafana et de Vohiparara (*Avahi peyrierasi* 1). *Avahi* au Sud et *Avahi* au Nord de la rivière Mangoro sont des groupes-frères

Pour *Avahi* de l'Ouest, *Avahi unicolor* et *Avahi cleesei* sont les groupes les plus proches et le clade de ces deux espèces est groupe-frère de *Avahi occidentalis*.

#### **IV-3-1-3.- Méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony)**

La méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony) est une méthode identifiant l'arbre qui implique le plus petit nombre de mutation nécessaire pour expliquer les différences sur les groupes étudiés. Nous avons analysé 77 séquences d'*Avahi*:

-*Avahi* de l'Est

\*Au Nord de la rivière Mangoro:

-individus de Mananara-Nord qui sont NARA4.1, NARA4.2, NARA4.10, NARA4.11, NARA4.13, NARA4.17, NARA4.18, NARA4.23, NARA4.31 et NARA4.32.

-individus de Mantadia qui sont TAD1, TAD2, TAD3, TAD19, TAD36, TAD37, TAD4.3, TAD4.8, TAD4.9 et TAD4.20.

-individus de Maromizaha qui sont MIZA10, MIZA12, MIZA13 et MIZA14.

\*Au Sud de la rivière Mangoro:

-individus de Fandriana qui sont FAN2.14, FAN2.15, FAN2.19, FAN2.20 et FAN2.21.

-individus de Ronomafana qui sont RANO66, RANO67, RANO348, RANO2.10, RANO199, RANO261, RANO319B et RANO320B.

-individus de Vohiparara qui sont VOP2.13, VOP2.14 et VOP2.15.

-individus de Manombo qui sont M86, M89, M107, M108, M119, M150, M155, M159, MAB4.8 et MAB4.10.

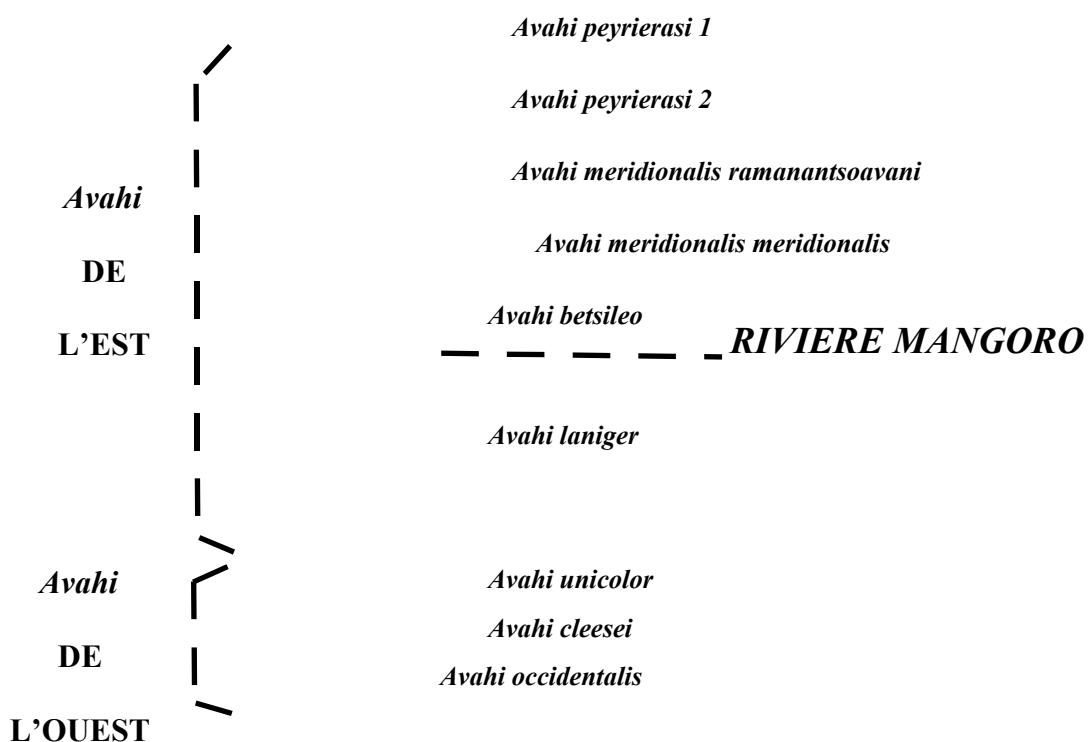
-individus d'Andohahela qui sont AND4, AND5, AND6, AND11, AND12, AND13, AND14, AND19, AND33 et AND34.

-*Avahi* de l'Ouest

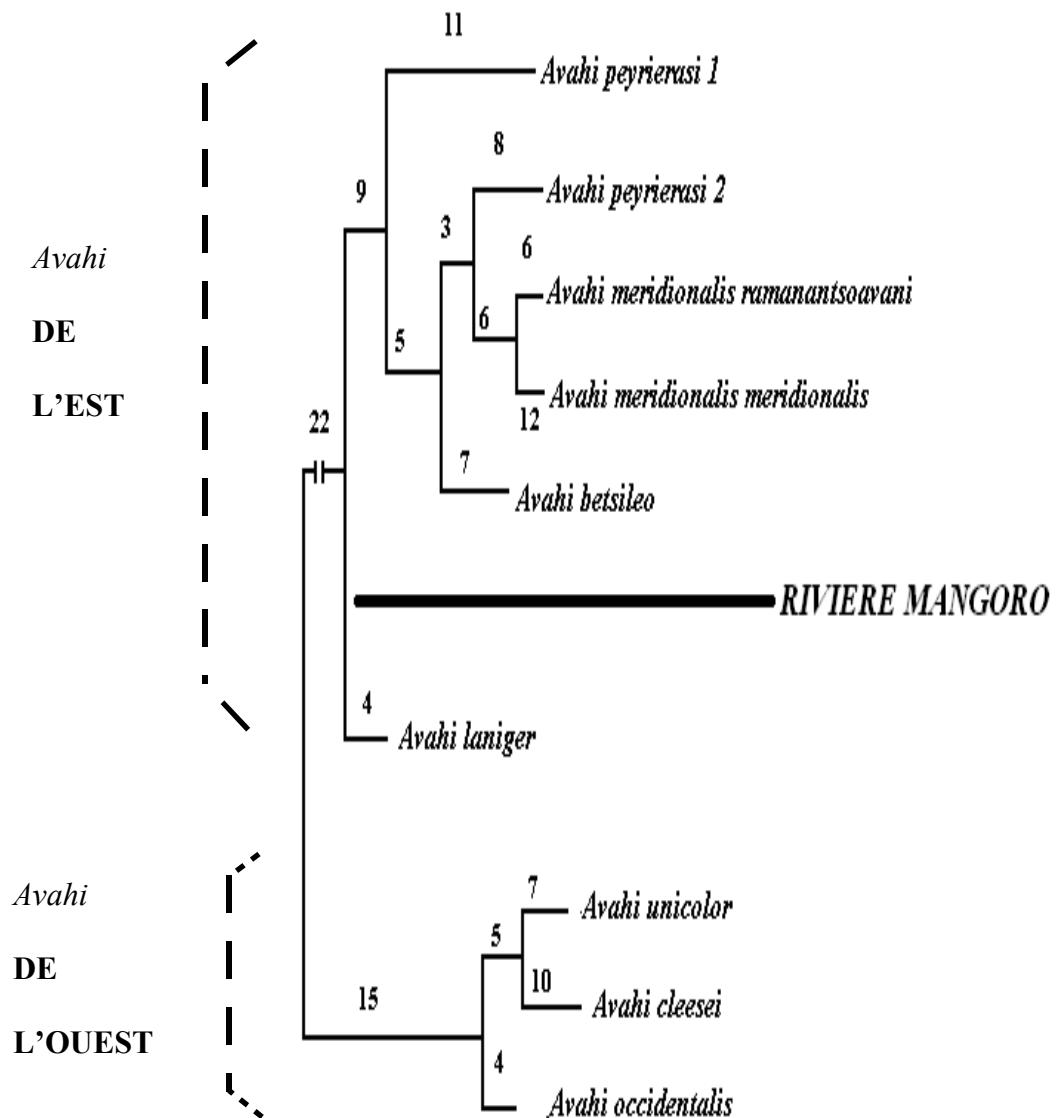
-individus d'Antafondro qui sont ANT5.8, ANT5.9, ANT5.10 et ANT5.12.

-individus de Mariarano qui sont MAR29, MAR46, MAR52, MAR54, MAR55, MAR56, MAR60 et MAR61.

-individus de Bemaraha qui sont BEMA8, BEMA9, BEMA12, BEMA13 et BEMA14.



**Figure 12:** Phylogramme de la parcimonie maximum (maximum parsimony) dérivé de la séquence du fragment D-loop de 77 *Avahi* et de 25 individus extragroupes.



**Figure 13:** Phylogramme de la parcimonie maximum (maximum parsimony) dérivé de la séquence du fragment D-loop de *Avahi*.

Chaque entre nœud est caractérisé par des changements au cours de la construction de l'arbre et la valeur de chaque changement est indiquée au-dessus de chaque branche, ces changements sont supportés par 1000 réplications par la méthode de bootstrap et la valeur

de chaque support est représentée en pourcentage au-dessous de chaque branche. Au cours de la construction de l'arbre, plusieurs arbres ont été possibles et l'arbre le plus court possède une longueur de 1271 dont l'indice de conformité (CI) est de 0,5382), l'indice de rétention (RI) est de 0,8786 et l'indice de conformité de rééchelonnement (RC) est de 0,4728.

La topologie montre 9 clades comme dans la méthode de vraisemblance maximum (maximum likelihood) et la méthode du plus proche voisin (neighbor-joining):

\*Au Nord de la rivière Mangoro:

-clade des individus de Mananara-Nord (NARA4.1, NARA4.2, NARA4.10, NARA4.11, NARA4.13, NARA4.17, NARA4.18, NARA4.23, NARA4.31 et NARA4.32) avec les individus de Mantadia (TAD1, TAD2, TAD3, TAD19, TAD36, TAD37, TAD4.3, TAD4.8, TAD4.9 et TAD4.20) et les individus de Maromizaha (MIZA10, MIZA12, MIZA13, MIZA14).

\*Au Sud de la rivière Mangoro:

-clade des individus de Ranomafana avec Vohiparara (RANO66, RANO348, RANO2.10, RANO319B, VOP2.13, VOP2.14, VOP2.15).

-clade des individus de Ranomafana (RANO67, RANO199, RANO320B, RANO261).

-clade des individus de Fandriana (FAN2.14, FAN2.15, FAN2.19, FAN2.20, FAN2.21).

-clade des individus de Manombo (M86, M89, M107, M108, M119, M150, M155, M159, MAB4.8, MAB4.10).

-clade des individus d'Andohahela (AND4, AND5, AND6, AND11, AND12, AND13, AND14, AND19, AND33, AND34).

-*Avahi* de l'Ouest

\*Au Nord de la rivière Betsiboka:

-clade de *Avahi unicolor* (ANT5.8, ANT5.9, ANT5.10, ANT5.12).

-clade de *Avahi occidentalis* (MAR29, MAR46, MAR52, MAR54, MAR55, MAR56, MAR60, MAR61).

\*Au Sud de la rivière Betsiboka:

-clade de *Avahi cleesei* (BEMA8, BEMA9, BEMA12, BEMA13, BEMA14).

*Avahi meridionalis meridionalis* est le groupe le plus proche de *Avahi meridionalis ramanantsoavani*. Le clade des individus de Ranomafana avec Vohiparara (*Avahi peyrierasi* 1) est groupe-frère des individus d'Andohahela (*Avahi meridionalis*

*meridionalis*), de Manombo (*Avahi meridionalis ramanantsoavani*), du deuxième groupe d'individus de Ranomafana (*Avahi peyrierasi* 2) et de Fandriana (*Avahi betsileo*). Le clade des individus de Fandriana (*Avahi betsileo*) est groupe-frère du clade formé par les individus d'Andohahela (*Avahi meridionalis meridionalis*), de Manombo (*Avahi meridionalis ramanantsoavani*) et du deuxième groupe d'individus de Ranomafana (*Avahi peyrierasi* 2). *Avahi* au Nord de Mangoro est divisé en deux sous-groupes qui sont le sous-groupe de Mananara-Nord et le sous-groupe de Mantadia avec Maromizaha.

Pour *Avahi* de l'Ouest, *Avahi unicolor* et *Avahi cleesei* sont les groupes les plus proches et le clade de ces deux espèces est groupe-frère de *Avahi occidentalis*.

Malgré la différence de la topologie en analysant le fragment D-loop par la méthode du plus proche voisin (neighbor-joining), la méthode de vraisemblance maximum (maximum likelihood) et la méthode de parcimonie maximum (maximum parsimony) les 9 clades sont toujours observés et les individus formant chaque clade sont toujours les mêmes. En utilisant le concept des espèces phylogénétiques 2 nouvelles espèces d'*Avahi* sont découvertes au Sud de la rivière Mangoro:

-*Avahi betsileo*: 5 individus capturés à Fandriana (FAN2.14, FAN2.15, FAN2.19, FAN2.20 et FAN2.21).

-Soit *Avahi peyrierasi* 1: 4 individus capturés à Ranomafana et 3 individus capturés à Vohiparara (RANO66, RANO348, RANO2.10, RANO319B, VOP2.13, VOP2.14, VOP2.15).

-Soit *Avahi peyrierasi* 2: 4 individus capturés à Ranomafana (RANO67, RANO199, RANO320B, RANO261).

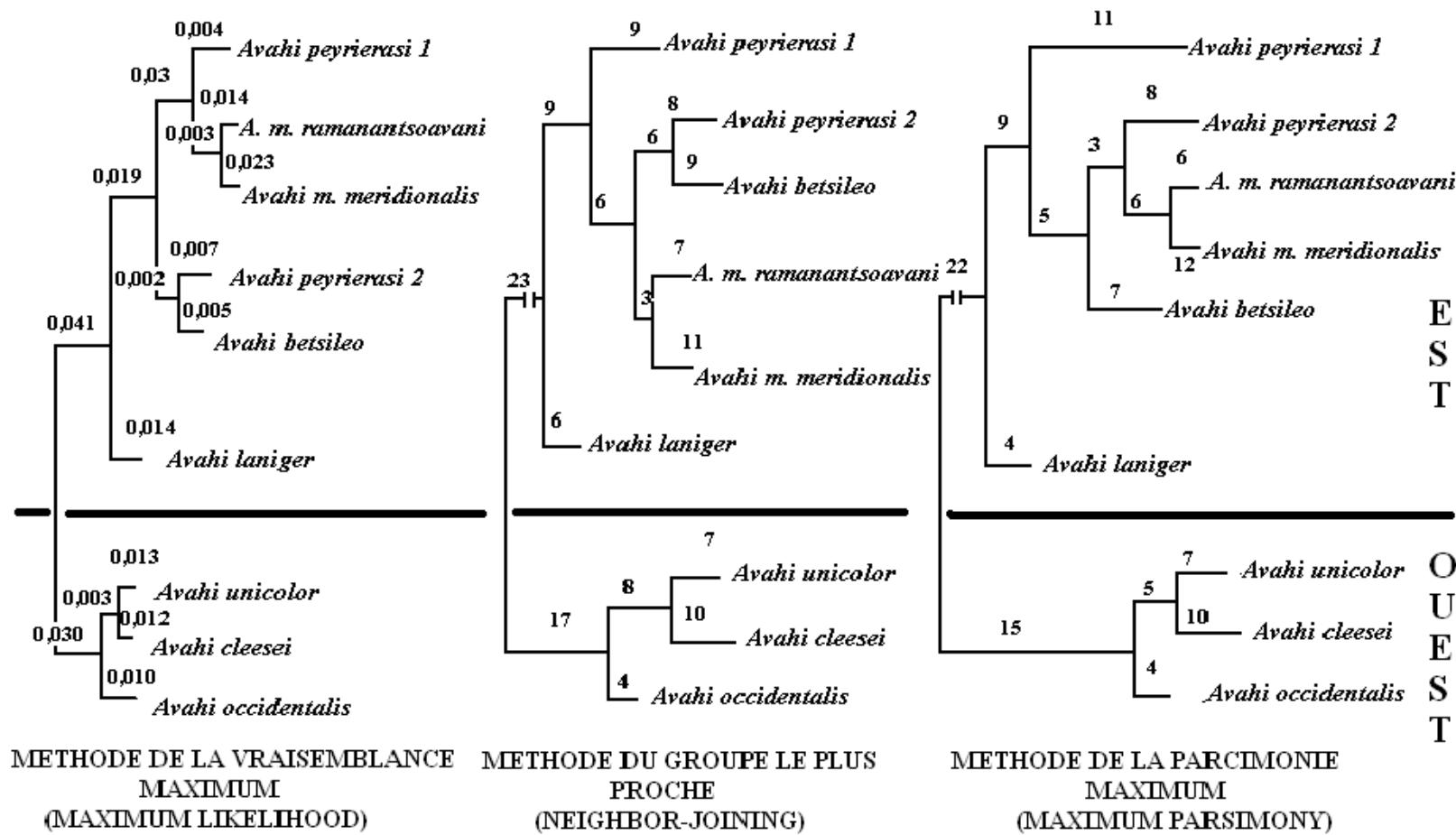
Trois espèces déjà décrites sont trouvées au Sud de Mangoro dont les deux sont:

-*Avahi peyrierasi* qui peut être le type 1 ou le type 2

-*Avahi meridionalis ramanantsoavani*: 10 individus capturés à Manombo (M86, M89, M107, M108, M119, M150, M155, M159, MAB4.8 et MAB4.10).

-*Avahi meridionalis meridionalis*: 10 individus capturés à Andohahela (AND4, AND5, AND6, AND11, AND12, AND13, AND14, AND19, AND33 et AND34).

*Avahi* de l'Ouest est divisée en trois espèces phylogénétiques qui sont *Avahi unicolor* (à Antafondro), *Avahi occidentalis* (à Mariarano) et *Avahi cleesei* (à Bemaraha).



**Figure 14:** Topologies obtenues par la méthode de maximum de vraisemblance (maximum likelihood), la méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining) et la méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony) du fragment D-loop

#### **IV-3-2.- ETUDE DES FRAGMENTS COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup>**

Pour supporter la découverte des nouvelles espèces d'*Avahi* à partir de l'étude de la séquence du fragment D-loop, nous avons analysé la séquence de l'ensemble des fragments COIII, NADH-déhydrogénase sous-unité 3, 4L, 4 (ND3, ND4L, ND4), ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie de l'ARN-t<sup>LEU</sup>.

Les séquences des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie de l'ARN-t<sup>LEU</sup> de chaque individu ont été alignées en utilisant le logiciel Clustal X (Thompson et al, 1997) et les différences de bases avec leurs sites respectifs dans la séquence sont résumés dans la (**figure15, pages 68 et 69**); ces différences de base nous ont permis de grouper les individus ayant les mêmes séquences.



AND14	..C..CG.....T...TG.GC...A.C..T.A.....G.....T.GT.C.....C.T.CC..A..C..TGC.....T.TA..T.G..TT...C.AC..A.A.T..T
AND19	..C..CG.....T...TG.GC...A.C..T.A.....G.....T.GT.C.....C.T.CC..A..C..TGC.....T.TA..T.G..TT...C.AC..A.A.T..T
AND33	..C..CG.....T...TG.GC...A.C..T.A.....G.....T.GT.C.....C.T.CC..A..C..TGC.....T.TA..T.G..TT...C.AC..A.A.T..T
AND34	..C..CG.....T...TG.GC...A.C..T.A.....G.....T.GT.C.....C.T.CC..A..C..TGC.....T.TA..T.G..TT...C.AC..A.A.T..T
NARA4.1	..C..C.....T.....T..ATC..T.....T.....G.....C..A..CG..GT.....TA..C..TT..A.C.A..A.A.T..
NARA4.2	..C..C.....T.....T..ATC..T.....T.....G.....C..A..CG..GT.....TA..C..TT..A.C.A..A.A.T..
NARA4.10	..C..C.....T.....T..ATC..T.....T.....G.....C..A..CG..GT.....TA..C..TT..A.C.A..A.A.T..
NARA4.11	..C..C.....T.....T..ATC..T.....T.....G.....C..A..CG..GT.....TA..C..TT..A.C.A..A.A.T..
NARA4.13	..C..C.....T.....T..ATC..T.....T.....G.....C..A..CG..GT.....TA..C..TT..A.C.A..A.A.T..
NARA4.17	..C..C.....T.....T..ATC..T.....T.....G.....C..A..CG..GT.....TA..C..TT..A.C.A..A.A.T..
NARA4.18	..C..C.....T.....T..ATC..T.....T.....G.....C..A..CG..GT.....TA..C..TT..A.C.A..A.A.T..
NARA4.23	..C..C.....T.....T..ATC..T.....T.....G.....C..A..CG..GT.....TA..C..TT..A.C.A..A.A.T..
NARA4.31	..C..C.....T.....T..ATC..T.....T.....G.....C..A..CG..GT.....TA..C..TT..A.C.A..A.A.T..
NARA4.32	..C..C.....T.....T..ATC..T.....T.....G.....C..A..CG..GT.....TA..C..TT..A.C.A..A.A.T..
ANT5.8	A.C..C.GTT.G..AT.....T..C.C..A.TA..T.....TT.C..G.....C.G.A..T..CGA..A..T..GA..A..TTAG..CC.A.TG.A.ATT
ANT5.9	A.C..C.GTT.G..AT.....T..C.C..A.TA..T.....TT.C..G.....C.G.A..T..CGA..A..T..GA..A..TTAG..CC.A.TG.A.ATT
ANT5.10	A.C..C.GTT.G..AT.....T..C.C..A.TA..T.....TT.C..G.....C.G.A..T..CGA..A..T..GA..A..TTAG..CC.A.TG.A.ATT
ANT5.12	A.C..C.GTT.G..AT.....T..C.C..A.TA..T.....TT.C..G.....C.G.A..T..CGA..A..T..GA..A..TTAG..CC.A.TG.A.ATT
BEMA8	.AC..C..TT..C..TA.G..T..C..A..A..T..T..G..C..T..A..G.....T..C..A..T..A..CGA..A..GAT..TA..G..TTA..C..A..T..A..A..T..
BEMA9	.AC..C..TT..C..TA.G..T..C..A..A..T..T..G..C..T..A..G.....T..C..A..T..A..CGA..A..GAT..TA..G..TTA..C..A..T..A..A..T..
BEMA12	.AC..C..TT..C..TA.G..T..C..A..A..T..T..G..C..T..A..G.....T..C..A..T..A..CGA..A..GAT..TA..G..TTA..C..A..T..A..A..T..
BEMA13	.AC..C..TT..C..TA.G..T..C..A..A..T..T..G..C..T..A..G.....T..C..A..T..A..CGA..A..GAT..TA..G..TTA..C..A..T..A..A..T..
BEMA14	.AC..C..TT..C..TA.G..T..C..A..A..T..T..G..C..T..A..G.....T..C..A..T..A..CGA..A..GAT..TA..G..TTA..C..A..T..A..A..T..
MAR29	..C.C.C..TTA..G.T.....T..CA..GA.T.G.T..CC.T..T..C..G.....C..C..CAT..C..CGA..A..TGAA..A..TTA..C..A..T..GT..AGT..T..G..
MAR46	..C.C.C..TTA..G.T.....T..CA..GA.T.G.T..CC.T..T..C..G.....C..C..CAT..C..CGA..A..TGAA..A..TTA..C..A..T..GT..AGT..T..G..
MAR52	..C.C.C..TTA..G.T.....T..CA..GA.T.G.T..CC.T..T..C..G.....C..C..CAT..C..CGA..A..TGAA..A..TTA..C..A..T..GT..AGT..T..G..
MAR54	..C.C.C..TTA..G.T.....T..CA..GA.T.G.T..CC.T..T..C..G.....C..C..CAT..C..CGA..A..TGAA..A..TTA..C..A..T..GT..AGT..T..G..
MAR55	..C.C.C..TTA..G.T.....T..CA..GA.T.G.T..CC.T..T..C..G.....C..C..CAT..C..CGA..A..TGAA..A..TTA..C..A..T..GT..AGT..T..G..
MAR56	..C.C.C..TTA..G.T.....T..CA..GA.T.G.T..CC.T..T..C..G.....C..C..CAT..C..CGA..A..TGAA..A..TTA..C..A..T..GT..AGT..T..G..
MAR60	..C.C.C..TTA..G.T.....T..CA..GA.T.G.T..CC.T..T..C..G.....C..C..CAT..C..CGA..A..TGAA..A..TTA..C..A..T..GT..AGT..T..G..
MAR61	..C.C.C..TTA..G.T.....T..CA..GA.T.G.T..CC.T..T..C..G.....C..C..CAT..C..CGA..A..TGAA..A..TTA..C..A..T..GT..AGT..T..G..

**Figure 15:** Les différences de bases de la séquence des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> d'*Avahi* avec leurs positions respectives sur la séquence

Les séquences obtenues ont été analysées par le programme PAUP 4.0 (Swofford, 2001) pour engendrer des arbres phylogénétiques. 2364 paires de bases ont été analysées pour la séquence de l'ensemble des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> de 77 *Avahi* et 19 individus extragroupes en utilisant la méthode de parcimonie maximum (maximum parsimony), la méthode de vraisemblance maximum (maximum likelihood) et la méthode du plus proche voisin (neighbor-joining). Comme dans le cas du fragment D-loop nous avons étudié des individus provenant de l'Est et de l'Ouest de Madagascar.

\*Au Nord de la rivière Mangoro:

-10 individus capturés à Mananara-Nord qui sont NARA4.1, NARA4.2, NARA4.10, NARA4.11, NARA4.13, NARA4.17, NARA4.18, NARA4.23, NARA4.31 et NARA4.32.

-10 individus capturés à Mantadia qui sont TAD1, TAD2, TAD3, TAD19, TAD36, TAD37, TAD4.3, TAD4.8, TAD4.9 et TAD4.20.

-4 individus capturés à Maromizaha qui sont MIZA10, MIZA12, MIZA13 et MIZA14.

\*Au Sud de la rivière Mangoro:

-5 individus capturés à Fandriana qui sont FAN2.14, FAN2.15, FAN2.19, FAN2.20 et FAN2.21.

-8 individus capturés à Ranomafana qui sont RANO66, RANO67, RANO348, RANO2.10, RANO199, RANO261, RANO319B et RANO320B.

-3 individus capturés à Vohiparara qui sont VOP2.13, VOP2.14 et VOP2.15.

-10 individus capturés à Manombo qui sont M86, M89, M107, M108, M119, M150, M155, M159, MAB4.8 et MAB4.10.

-10 individus capturés à Andohahela qui sont AND4, AND5, AND6, AND11, AND12, AND13, AND14, AND19, AND33 et AND34.

-*Avahi* de l'Ouest

\*Au Nord de la rivière Betsiboka:

-4 individus capturés à Antafondro qui sont ANT5.8, ANT5.9, ANT5.10 et ANT5.12.

-8 individus capturés à Mariarano qui sont MAR29, MAR46, MAR52, MAR54, MAR55, MAR56, MAR60 et MAR61.

\*Au Sud de la rivière Betsiboka:

-5 individus capturés à Bemaraha qui sont BEMA8, BEMA9, BEMA12, BEMA13 et BEMA14.

**Tableau 5:** Distances entre les différentes espèces d'*Avahi* obtenues à partir de la séquence des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup>

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	0,026							
<b>3</b>	0,023	0,024						
<b>4</b>	0,096	0,093	0,098					
<b>5</b>	0,116	0,109	0,114	0,035				
<b>6</b>	0,120	0,113	0,118	0,077	0,019			
<b>7</b>	0,110	0,103	0,110	0,029	0,028	0,028		
<b>8</b>	0,115	0,108	0,113	0,034	0,026	0,030	0,027	
<b>9</b>	0,113	0,106	0,111	0,031	0,031	0,035	0,012	0,030

**1**= *Avahi occidentalis*

**6**= *Avahi meridionalis meridionalis*

**2**= *Avahi unicolor*

**7**= *Avahi betsileo*

**3**= *Avahi cleesei*

**8**= *Avahi peyrierasi 1*

**4**= *Avahi laniger*

**9**= *Avahi peyrierasi 2*

**5**= *Avahi meridionalis ramanantsoavani*

#### IV-3-2-1.- Méthode de la vraisemblance maximum (maximum likelihood)

La méthode de vraisemblance (maximum likelihood) évalue tout arbre possible et calcule les vraisemblances pour chaque arbre. En utilisant la méthode de vraisemblance maximum (maximum likelihood), nous avons analysé 77 séquences d'*Avahi*:

-*Avahi* de l'Est

\*Au Nord de la rivière Mangoro:

-individus de Mananara-Nord qui sont NARA4.1, NARA4.2, NARA4.10, NARA4.11, NARA4.13, NARA4.17, NARA4.18, NARA4.23, NARA4.31 et NARA4.32.

-individus de Mantadia qui sont TAD1, TAD2, TAD3, TAD19, TAD36, TAD37, TAD4.3, TAD4.8, TAD4.9 et TAD4.20.

-individus de Maromizaha qui sont MIZA10, MIZA12, MIZA13 et MIZA14.

\*Au Sud de la rivière Mangoro:

-individus de Fandriana qui sont FAN2.14, FAN2.15, FAN2.19, FAN2.20 et FAN2.21.

-individus de Ranomafana qui sont RANO66, RANO67, RANO348, RANO2.10, RANO199, RANO261, RANO319B et RANO320B.

-individus de Vohiparara qui sont VOP2.13, VOP2.14 et VOP2.15.

-individus de Manombo qui sont M86, M89, M107, M108, M119, M150, M155, M159, MAB4.8 et MAB4.10.

-individus d'Andohahela qui sont AND4, AND5, AND6, AND11, AND12, AND13, AND14, AND19, AND33 et AND34.

*-Avahi de l'Ouest*

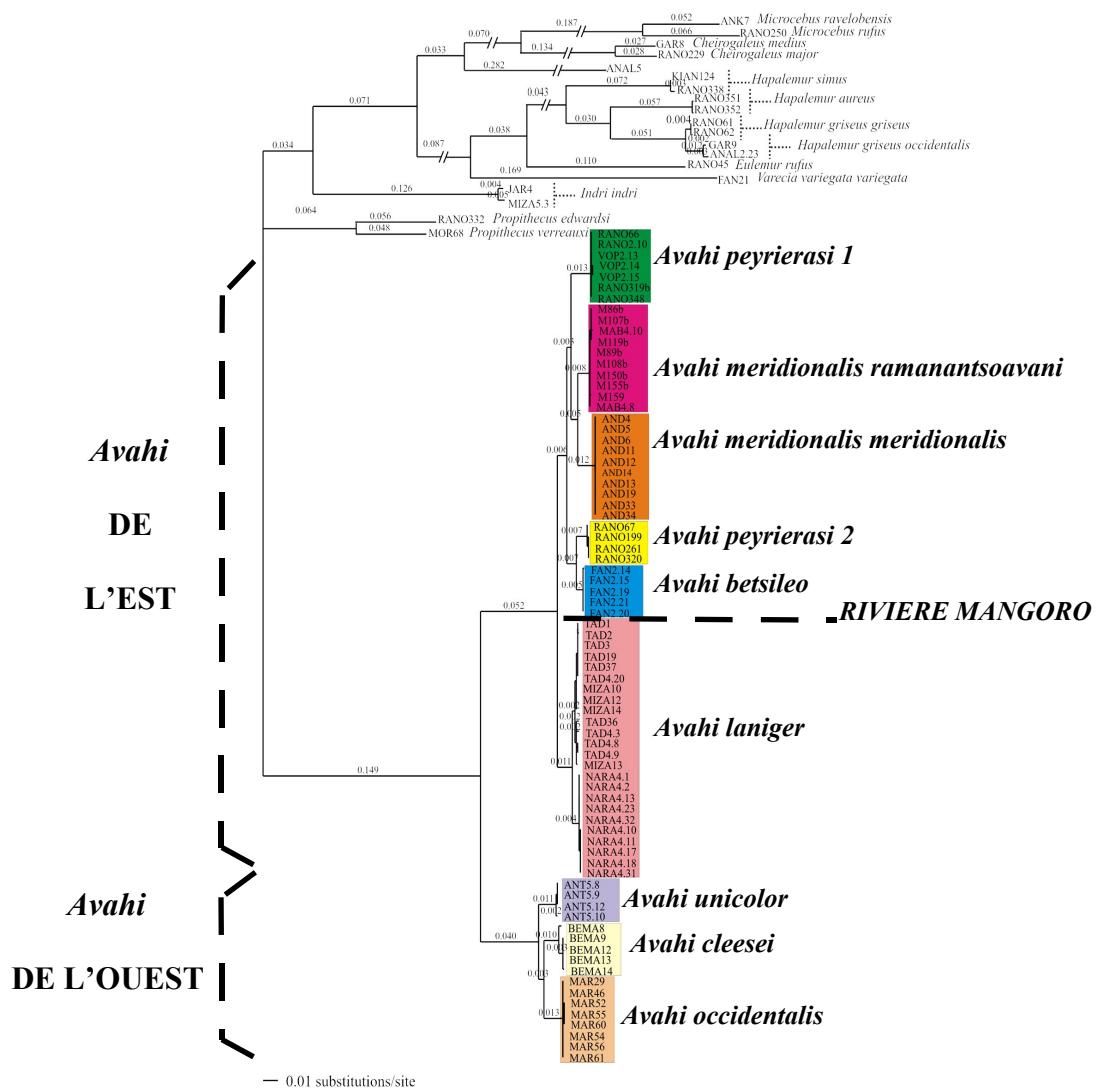
\*Au Nord de la rivière Betsiboka:

-individus d'Antafondro qui sont ANT5.8, ANT5.9, ANT5.10 et ANT5.12.

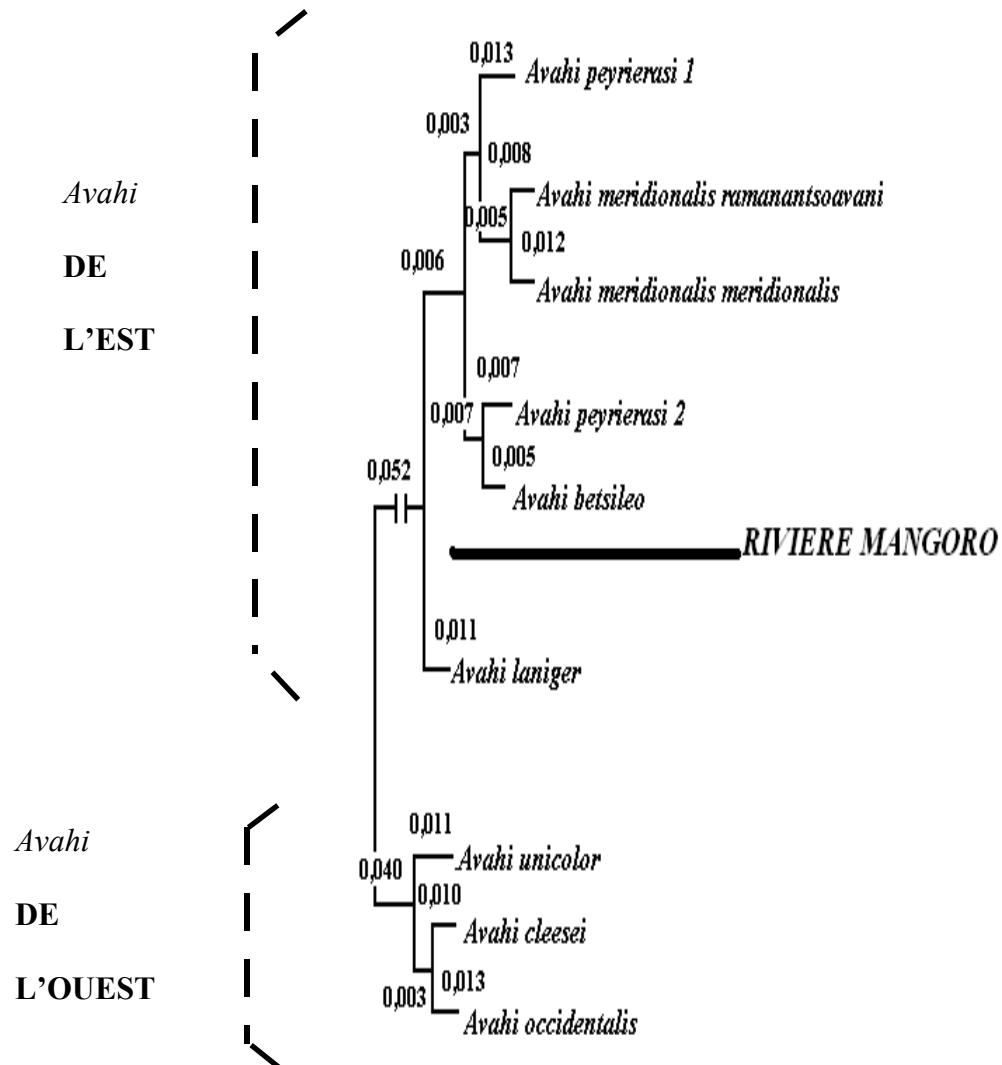
-individus de Mariarano qui sont MAR29, MAR46, MAR52, MAR54, MAR55, MAR56, MAR60 et MAR61.

\*Au Sud de la rivière Betsiboka:

-individus de Bemaraha qui sont BEMA8, BEMA9, BEMA12, BEMA13 et BEMA14.



**Figure 16:** Phylogramme de la vraisemblance maximum (maximum likelihood) dérivé des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> de 77 *Avahi* et de 19 individus extragroupes



**Figure 17:** Phylogramme de la vraisemblance maximum (maximum likelihood) dérivé des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> de *Avahi*

Neuf clades ont été obtenus comme dans le cas de l'étude du fragment D-loop:

-*Avahi* de l'Est

\*Au Nord de la rivière Mangoro:

-clade de *Avahi laniger*: les individus de Mananara-Nord (NARA4.1, NARA4.2, NARA4.10, NARA4.11, NARA4.13, NARA4.17, NARA4.18, NARA4.23, NARA4.31 et NARA4.32) avec les individus de Mantadia (TAD1, TAD2, TAD3, TAD19, TAD36,

TAD37, TAD4.3, TAD4.8, TAD4.9 et TAD4.20) et les individus de Maromizaha (MIZA10, MIZA12, MIZA13, MIZA14).

\*Au Sud de la rivière Mangoro:

-clade de *Avahi peyrierasi* 1: les individus de Ranomafana avec Vohiparara (RANO66, RANO348, RANO2.10, RANO319B, VOP2.13, VOP2.14, VOP2.15).

-clade de *Avahi peyrierasi* 2: les individus de Ranomafana (RANO67, RANO199, RANO320B, RANO261).

-clade de *Avahi betsileo*: les individus de Fandriana (FAN2.14, FAN2.15, FAN2.19, FAN2.20, FAN2.21).

-clade de *Avahi meridionalis ramanantsoavani*: les individus de Manombo (M86, M89, M107, M108, M119, M150, M155, M159, MAB4.8, MAB4.10).

-clade de *Avahi meridionalis meridionalis*: les individus d'Andohahela (AND4, AND5, AND6, AND11, AND12, AND13, AND14, AND19, AND33, AND34).

-*Avahi* de l'Ouest

\*Au Nord de la rivière Betsiboka:

-clade de *Avahi unicolor* (ANT5.8, ANT5.9, ANT5.10, ANT5.12).

-clade de *Avahi occidentalis* (MAR29, MAR46, MAR52, MAR54, MAR55, MAR56, MAR60, MAR61).

\*Au Sud de la rivière Betsiboka:

-clade de *Avahi cleesei* (BEMA8, BEMA9, BEMA12, BEMA13, BEMA14).

*Avahi* de l'Est est divisé en deux groupes par la rivière Mangoro qui sont le groupe des individus de Mananara-Nord, Mantadia et Maromizaha au Nord de la rivière et le groupe des individus de Fandriana, Ranomafana, Vohiparara, Manombo et Andohahela au Sud.

Le clade formé par *Avahi peyrierasi* 1 est groupe-frère du clade formé par *Avahi meridionalis ramanantsoavani* et *Avahi meridionalis meridionalis*. Le clade formé par ces trois groupes d'individus est groupe-frère du clade formé par *Avahi peyrierasi* 2 et *Avahi betsileo*. *Avahi betsileo* est le groupe le plus proche de *Avahi peyrierasi* 2. *Avahi meridionalis ramanantsoavani* est le groupe le plus proche de *Avahi meridionalis meridionalis*.

Pour *Avahi* de l'Ouest, *Avahi cleesei* est le groupe le plus proche de *Avahi occidentalis*; le clade formé par le groupe de *Avahi cleesei* et *Avahi occidentalis* est groupe-frère de *Avahi unicolor*.

#### **IV-3-2-2.- Méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining)**

La méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining) identifie les plus proches des unités taxonomiques par la distance entre eux et les arbres ont été calculés par similarité des séquences. En utilisant la méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining), comme dans la méthode de la vraisemblance maximum (maximum likelihood) nous avons analysé 77 séquences d'*Avahi* et 19 individus extragroupes. Les individus intragroupes sont:

-*Avahi* de l'Est

\*Au Nord de la rivière Mangoro:

-des individus de Mananara-Nord qui sont NARA4.1, NARA4.2, NARA4.10, NARA4.11, NARA4.13, NARA4.17, NARA4.18, NARA4.23, NARA4.31 et NARA4.32.

-des individus de Mantadia qui sont TAD1, TAD2, TAD3, TAD19, TAD36, TAD37, TAD4.3, TAD4.8, TAD4.9 et TAD4.20.

-des individus de Maromizaha qui sont MIZA10, MIZA12, MIZA13 et MIZA14.

\*Au Sud de la rivière Mangoro:

-des individus de Fandriana qui sont FAN2.14, FAN2.15, FAN2.19, FAN2.20 et FAN2.21.

-des individus de Ranomafana qui sont RANO66, RANO67, RANO348, RANO2.10, RANO199, RANO261, RANO319B et RANO320B.

-des individus de Vohiparara qui sont VOP2.13, VOP2.14 et VOP2.15.

-des individus de Manombo qui sont M86, M89, M107, M108, M119, M150, M155, M159, MAB4.8 et MAB4.10.

-des individus d'Andohahela qui sont AND4, AND5, AND6, AND11, AND12, AND13, AND14, AND19, AND33 et AND34.

-*Avahi* de l'Ouest

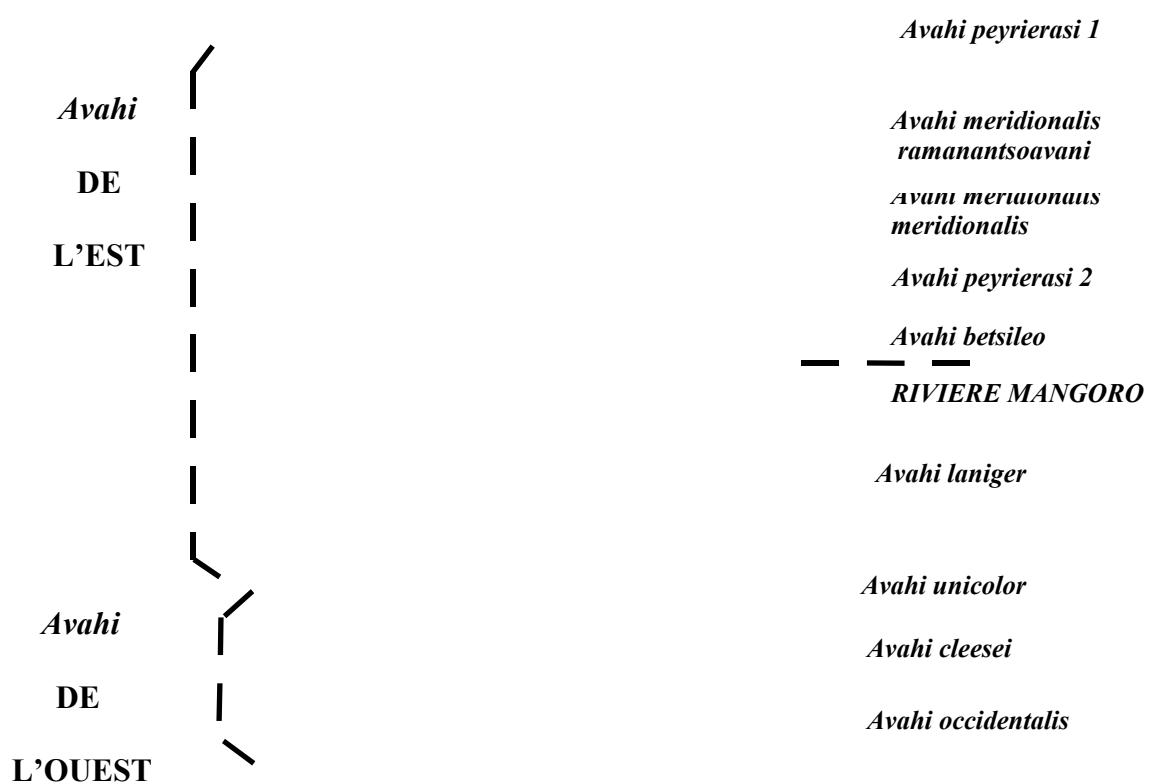
\*Au Nord de la rivière Betsiboka:

-des individus d'Antafondro qui sont ANT5.8, ANT5.9, ANT5.10 et ANT5.12.

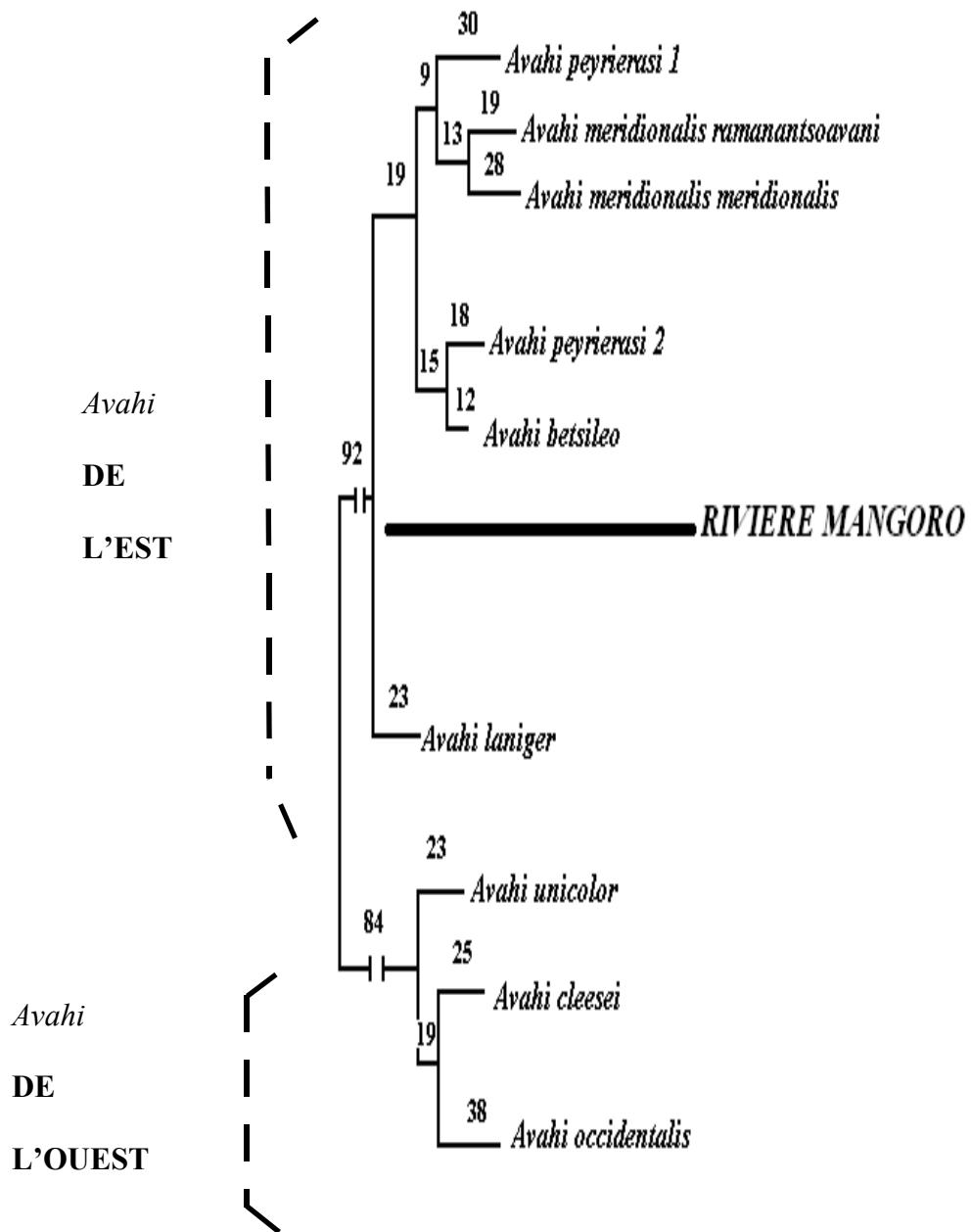
-des individus de Mariarano qui sont MAR29, MAR46, MAR52, MAR54, MAR55, MAR56, MAR60 et MAR61.

\*Au Sud de la rivière Betsiboka:

-des individus de Bemaraha qui sont BEMA8, BEMA9, BEMA12, BEMA13 et BEMA14.



**Figure 18:** Phylogramme du groupe le plus proche (neighbor-joining) dérivé des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> de 77 *Avahi* et de 19 individus extragroupes



**Figure 19:** Phylogramme du groupe le plus proche (neighbor-joining) dérivé des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> de *Avahi*

Les valeurs au-dessus des branches indiquent le nombre de changements entre les nœuds. Les valeurs au-dessous des branches indiquent le support des pseudoréplications de bootstrap avec 1000 réplications.

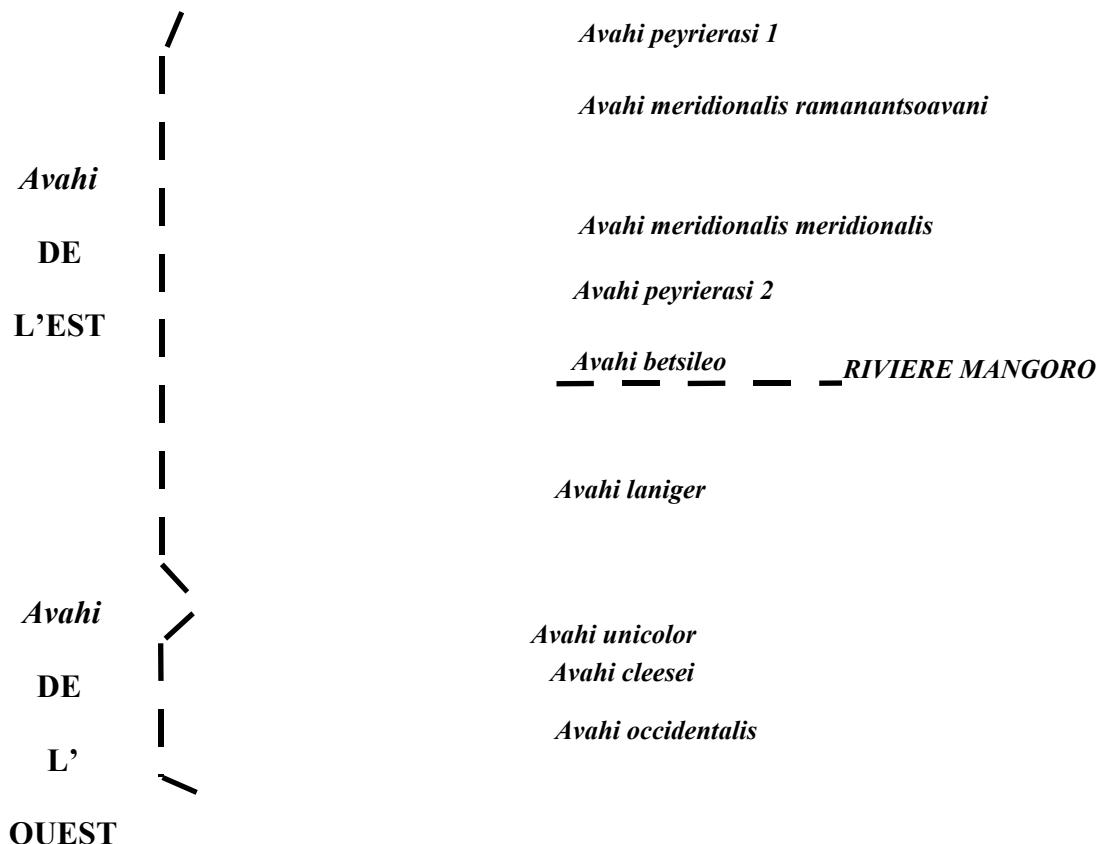
Neuf clades comme dans le cas de la méthode de vraisemblance maximum (maximum likelihood) sont obtenus qui sont le clade de *Avahi peyrierasi 1*, le clade de *Avahi meridionalis ramanantsoavani*, le clade de *Avahi meridionalis meridionalis*, le clade de *Avahi peyrierasi 2*, le clade de *Avahi betsileo*, le clade de *Avahi laniger* pour *Avahi* de l'Est; le clade de *Avahi unicolor*, le clade de *Avahi cleesei* et le clade de *Avahi occidentalis* pour *Avahi* de l'Ouest. La topologie de l'arbre est la même que la topologie de l'arbre obtenu en utilisant la méthode de la vraisemblance maximum (maximum likelihood).

Pour *Avahi* de l'Est *Avahi meridionalis ramanantsoavani* est le groupe le plus proche de *Avahi meridionalis meridionalis*; cet ensemble est groupe-frère de *Avahi peyrierasi 1*. L'ensemble de ces trois groupes est groupe-frère de *Avahi betsileo* et de *Avahi peyrierasi 2*.

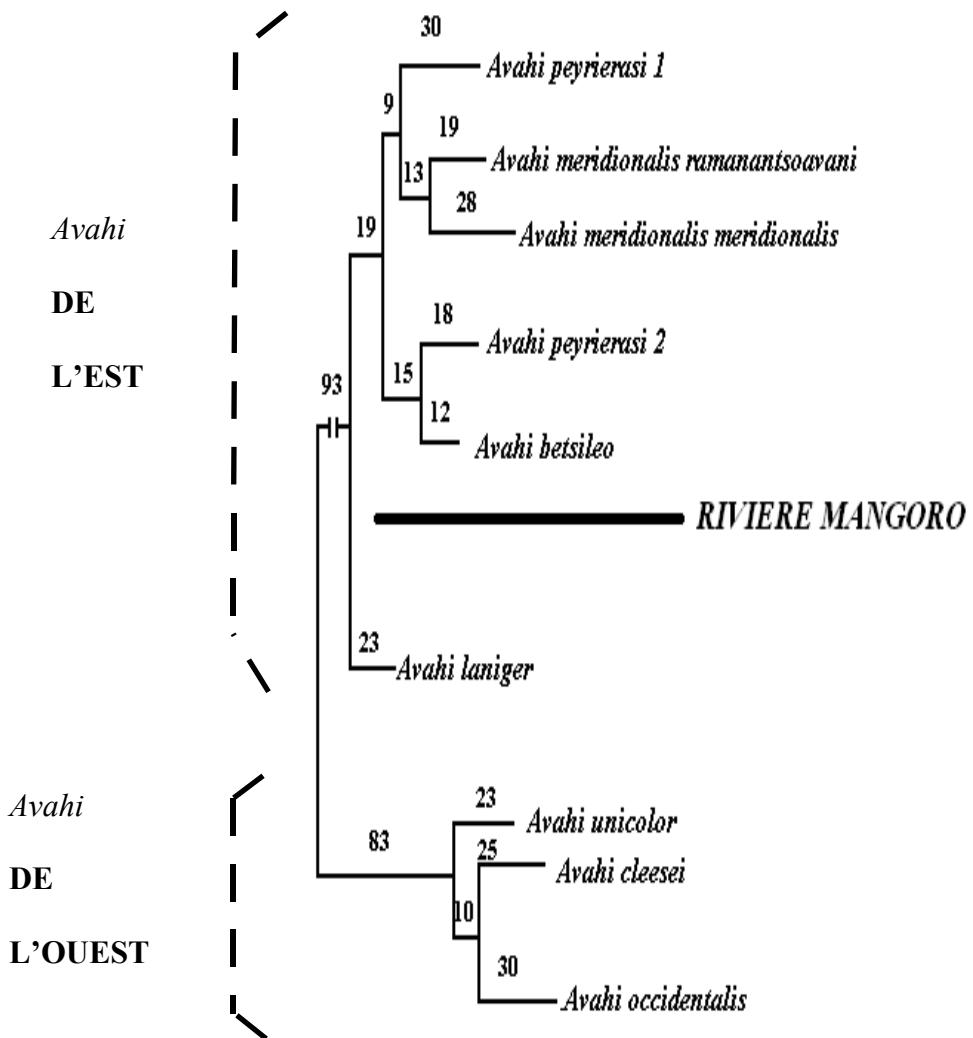
Pour *Avahi* de l'Ouest, *Avahi cleesei* le groupe le plus proche de *Avahi occidentalis*, l'ensemble de ces deux espèces est groupe-frère de *Avahi unicolor*.

#### **IV-3-2-3.- Méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony)**

La méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony) est une méthode qui identifie l'arbre qui implique le plus petit nombre de mutation nécessaire pour expliquer les différences sur les groupes étudiés. Nous avons analysé la séquence des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> des 77 individus avec les 19 individus extragroupes déjà étudiés avec la méthode de la vraisemblance maximum (maximum likelihood) et de la méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining).



**Figure 20:** Phylogramme de la parcimonie maximum (maximum parsimony) dérivé des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> de 77 *Avahi* et de 19 individus extragroupes



**Figure 21:** Phylogramme de la parcimonie maximum (maximum parsimony) dérivé des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> de *Avahi*

Les valeurs au-dessus des branches indiquent le nombre de changements entre les nœuds. Les valeurs au-dessous des branches indiquent le support des pseudoréplications de bootstrap avec 3000 réplications.

Chaque entronœud est caractérisé par des changements au cours de la construction de l'arbre et la valeur de chaque changement est indiquée au-dessus de chaque branche. Ces changements sont supportés par 3000 réplications par la méthode de bootstrap. Au cours de

la construction de l'arbre, plusieurs arbres ont été possibles et l'arbre qui a une longueur de 3551 a été le plus court et a été choisi. L'arbre ainsi obtenu possède un indice de consistance (CI) de 0,4816, un indice de rétention (RI) de 0,8721 et un indice d'uniformité de rééchelonnement (RC) de 0,42. La division de *Avahi* en neuf clades est observée et la topologie est supportée par un fort bootstrap (tous > 50%). En utilisant la méthode de la vraisemblance maximum, la méthode du plus proche voisin et la méthode de la parcimonie maximum la topologie de l'arbre obtenu est la même en étudiant les fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> (**figure 22, page 83**) et les individus formant chaque clade sont toujours les mêmes. En utilisant le concept des espèces phylogénétiques, l'existence des neufs espèces dans l'étude du fragment D-loop est observée dans l'étude des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup>:

-*Avahi betsileo*: 5 individus capturés à Fandriana qui sont FAN2.14, FAN2.15, FAN2.19, FAN2.20 et FAN2.21.

-*Avahi peyrierasi* 1: 4 individus capturés à Ranomafana et 3 individus capturés à Vohiparara qui sont RANO66, RANO348, RANO2.10, RANO319B, VOP2.13, VOP2.14, et VOP2.15.

-*Avahi peyrierasi* 2: 4 individus capturés à Ranomafana qui sont RANO67, RANO199, RANO320B et RANO261.

-*Avahi meridionalis ramanantsoavani*: 10 individus capturés à Manombo qui sont M86, M89, M107, M108, M119, M150, M155, M159, MAB4.8 et MAB4.10.

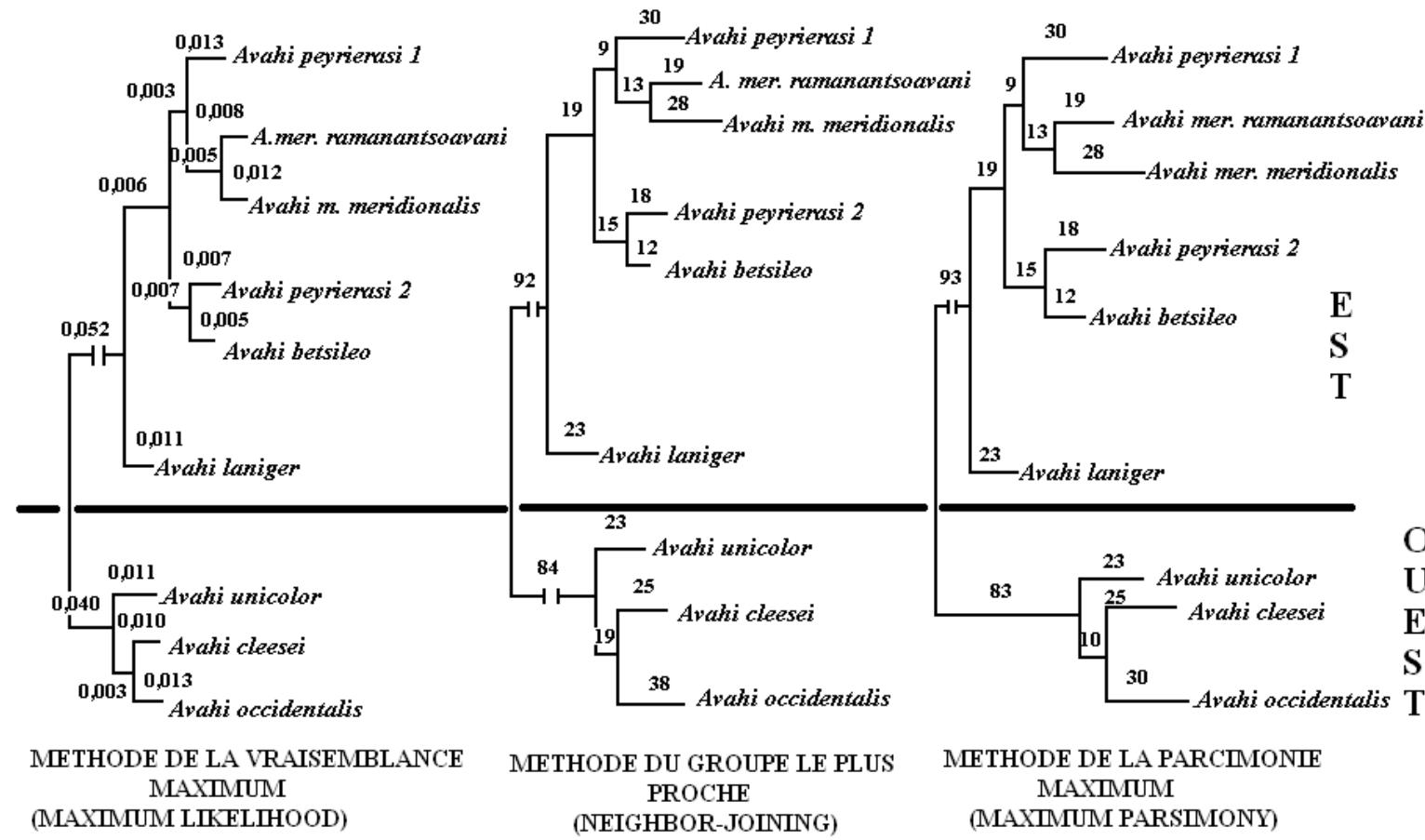
-*Avahi meridionalis meridionalis*: 10 individus capturés à Andohahela qui sont AND4, AND5, AND6, AND11, AND12, AND13, AND14, AND19, AND33 et AND34.

-*Avahi laniger*: 24 individus capturés à Mananara-Nord, Mantadia et Maromizaha qui sont NARA4.1, NARA4.2, NARA4.10, NARA4.11, NARA4.13, NARA4.17, NARA4.18, NARA4.23, NARA4.31, NARA4.32, TAD1, TAD2, TAD3, TAD19, TAD36, TAD37, TAD4.3, TAD4.8, TAD4.9, TAD4.20, MIZA10, MIZA12, MIZA13, MIZA14.

-*Avahi unicolor*: 4 individus capturés à Antafondro qui sont ANT5.8, ANT5.9, ANT5.10 et ANT5.12

-*Avahi occidentalis*: 7 individus capturés à Mariarano qui sont MAR29, MAR46, MAR52, MAR54, MAR55, MAR56, MAR60 et MAR61.

-*Avahi cleesei*: 7 individus capturés à Bemaraha qui sont BEMA8, BEMA9, BEMA12, BEMA13 et BEMA14.



**Figure 22:** Topologie de l'arbre obtenu en utilisant la méthode de vraisemblance maximum (maximum likelihood), la méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony) et la méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining) dérivé de la séquence des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup>.

#### **IV-3-3.- ETUDE DE LA COMBINAISON DE LA SEQUENCE DU FRAGMENT D-loop ET DES FRAGMENTS COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et ARN-t<sup>LEU</sup>**

Pour supporter l'existence des nouvelles espèces d'*Avahi*, les séquences du fragment D-loop et des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> de 39 haplotypes d'*Avahi* ont été combinées et analysées en utilisant la méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining) et la méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony). Au total 2926 paires de base par individu ont été analysées par le programme PAUP 4.0 (Swofford, 2001) pour engendrer des arbres phylogénétiques. Les individus haplotypes étudiés sont:

-*Avahi* de l'Est

\*Au Nord de la rivière Mangoro:

- des individus de Mananara-Nord qui sont NARA 4.1, NARA 4.2, NARA 4.10 et NARA4.11.
- des individus de Mantadia qui sont TAD 1, TAD 2, TAD 36, TAD 37, TAD 4.3, TAD4.8, et TAD 4.9.
- des individus de Maromizaha qui sont MIZA 10 et MIZA 13.

\*Au Sud de la rivière Mangoro:

- des individus de Fandriana qui sont FAN2.14 et FAN2.15
- des individus de Ranomafana qui sont RANO 66, RANO 67, RANO 199 et RANO319B.
- un individu de Vohiparara qui est VOP 2.13.
- des individus de Manombo qui sont M86 et M89.
- des individus d'Andohahela qui sont AND 4, AND 5, AND 6, AND 11 et AND 12.

-*Avahi* de l'Ouest

\*Au Nord de la rivière Betsiboka:

- des individus d'Antafondro qui sont ANT5.8 et ANT5.10.
- des individus de Mariarano qui sont MAR29, MAR46 et MAR52.

\*Au Sud de la rivière Betsiboka:

- des individus de Bemaraha qui sont BEMA8 et BEMA9.

**Tableau 6:** Distances entre les différentes espèces d'*Avahi* obtenues à partir de la combinaison de la séquence du fragment D-loop et des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et d'ARN-t<sup>LEU</sup>

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	0,026							
<b>3</b>	0,024	0,026						
<b>4</b>	0,101	0,094	0,101					
<b>5</b>	0,118	0,111	0,117	0,037				
<b>6</b>	0,122	0,115	0,121	0,041	0,022			
<b>7</b>	0,114	0,102	0,105	0,032	0,031	0,035		
<b>8</b>	0,134	0,111	0,117	0,037	0,029	0,033	0,031	
<b>9</b>	0,117	0,107	0,114	0,34	0,034	0,037	0,016	0,033

**1**= *Avahi occidentalis*

**2**= *Avahi unicolor*

**3**= *Avahi cleesei*

**4**= *Avahi laniger*

**5**= *Avahi meridionalis ramanantsoavani*

**6**= *Avahi meridionalis meridionalis*

**7**= *Avahi betsileo*

**8**= *Avahi peyrierasi 1*

**9**= *Avahi peyrierasi 2*

**Tableau 7:** Nombre de différence de bases entre les différentes espèces d'*Avahi* à partir de la combinaison des séquences du fragment D-loop et des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup>

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	46							
<b>3</b>	48	45						
<b>4</b>	44	42	42					
<b>5</b>	54	48	49	23				
<b>6</b>	63	59	57	32	41			
<b>7</b>	50	46	48	25	33	28		
<b>8</b>	64	62	61	35	43	53	43	
<b>9</b>	49	47	46	21	28	38	26	43

**1**= *Avahi occidentalis*

**2**= *Avahi unicolor*

**3**= *Avahi cleesei*

**4**= *Avahi laniger*

**5**= *Avahi meridionalis ramanantsoavani*

**6**= *Avahi meridionalis meridionalis*

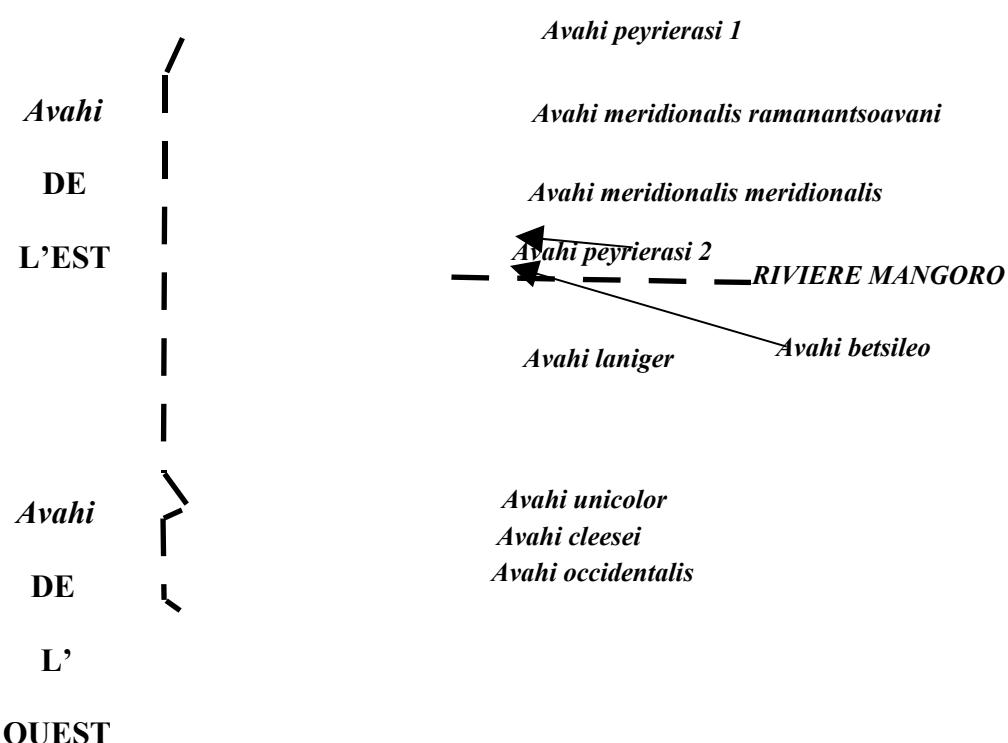
**7**= *Avahi betsileo*

**8**= *Avahi peyrierasi 1*

**9**= *Avahi peyrierasi 2*

#### IV-3-3-1.- Méthode du plus proche voisin (neighbor-joining)

La méthode du plus proche voisin (neighbor-joining) est basée sur la distance entre deux séquences. Cette méthode identifie les plus proches des unités taxonomiques par la distance entre eux et les arbres ont été calculés par similarité des séquences; l'analyse de la séquence de 39 haplotypes d'*Avahi* permet d'obtenir le phylogramme de la **figure 23 (page 86)**.



**Figure 23:** Phylogramme du groupe le plus proche (neighbor-joining) de la combinaison du fragment D-loop et des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> de 39 haplotypes d'*Avahi* et de 19 individus extragroupes.

L’analyse de la combinaison des séquences du fragment D-loop et des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d’ARN-t<sup>LEU</sup> avec la méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining) montre la même topologie que toute analyse de la séquence des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d’ARN-t<sup>LEU</sup> par la méthode du plus proche voisin (neighbor-joining), la méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony) et de la méthode de la vraisemblance maximum (maximum likelihood).

Neuf clades ont été obtenus:

-*Avahi* de l’Est

\*Au Nord de la rivière Mangoro:

-clade de *Avahi laniger*: NARA 4.1, NARA 4.2, NARA 4.10, NARA4.11, TAD 1, TAD 2, TAD 36, TAD 37, TAD 4.3, TAD4.8, TAD 4.9, MIZA 10 et MIZA13.

\*Au Sud de la rivière Mangoro:

-clade de *Avahi betsileo*: FAN2.14 et FAN2.15

-clade de *Avahi peyrierasi* 1: RANO 66, RANO319B et VOP 2.13.

-clade de *Avahi peyrierasi* 2: RANO 67 et RANO 199.

-clade de *Avahi meridionalis ramanantsoavani*: M86 et M89.

-clade de *Avahi meridionalis meridionalis*: AND4, AND5, AND6, AND11 et AND12.

-*Avahi* de l’Ouest

\*Au Nord de la rivière Betsiboka:

-clade de *Avahi unicolor*: ANT5.8 et ANT5.10.

-clade de *Avahi occidentalis*: MAR29, MAR46 et MAR52.

\*Au Sud de la rivière Betsiboka:

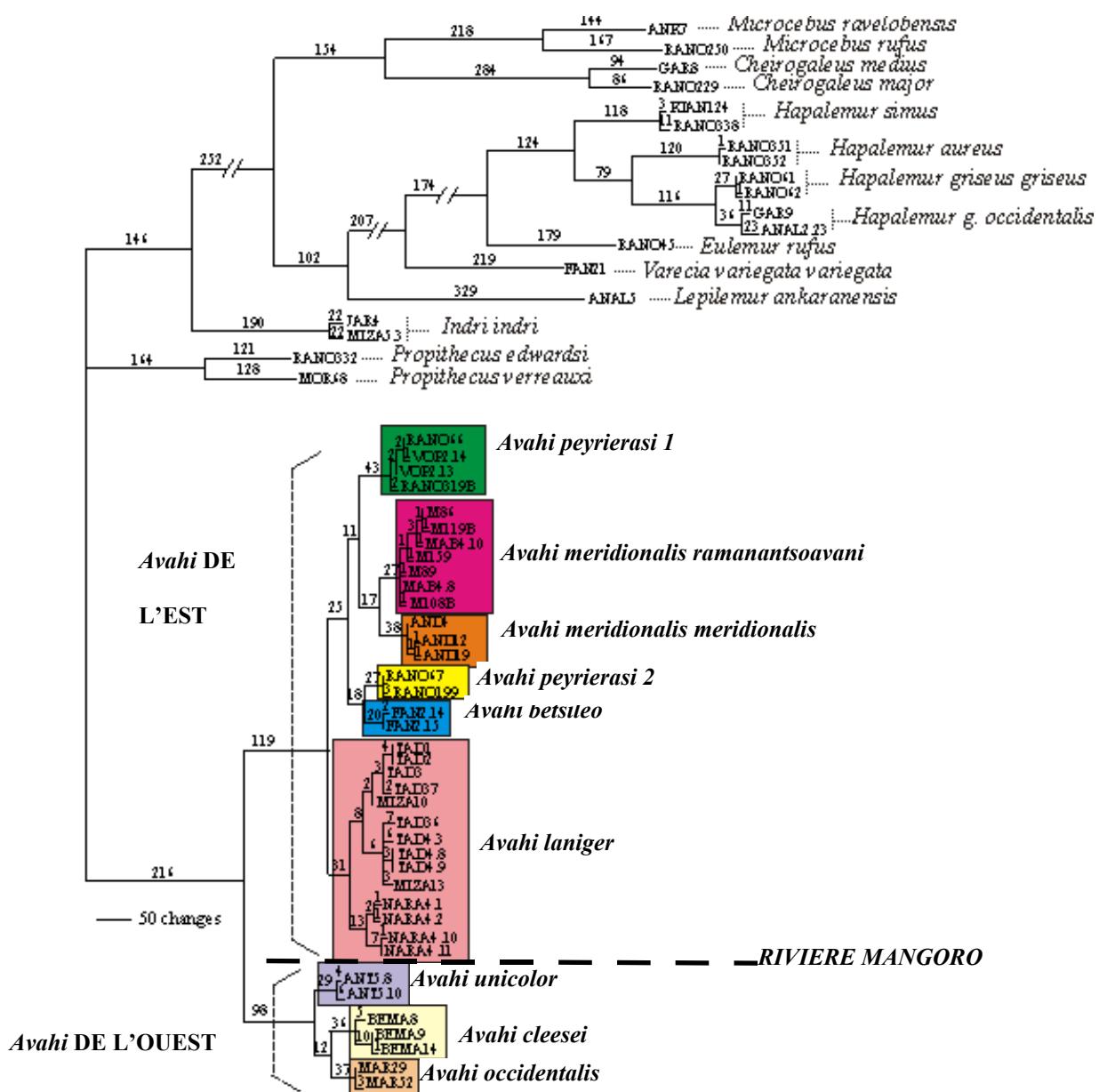
-clade de *Avahi cleesei*: BEMA8 et BEMA9

*Avahi peyrierasi* 1 est groupe-frère du clade formé *Avahi meridionalis ramanantsoavani* et *Avahi meridionalis meridionalis*. Le clade formé par ces trois groupes d’individus est groupe-frère du clade formé par *Avahi peyrierasi* 2 et *Avahi betsileo*. *Avahi betsileo* et *Avahi peyrierasi* 2 sont des groupe-frères.

Pour *Avahi* de l’Ouest, *Avahi cleesei* est groupe-frère de *Avahi occidentalis* et le clade formé par le groupe de *Avahi cleesei* et *Avahi occidentalis* est groupe-frère de *Avahi unicolor*.

### IV-3-3-2 Méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony)

La méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony) est une méthode qui identifie l'arbre qui implique le plus petit nombre de mutation nécessaire pour expliquer les différences sur les groupes étudiés. Nous avons étudié les mêmes 39 haplotypes d'*Avahi* que nous avons analysé avec la méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony) et nous avons obtenu le phylogramme de la **figure 24 (page 88)**.



**Figure 24:** Phylogramme de la parcimonie maximum (maximum parsimony) de la séquence combinée de 39 haplotypes d'*Avahi* et de 19 individus extragroupes.

Chaque entraîneur est caractérisé par des changements au cours de la construction de l'arbre et la valeur de chaque changement est indiquée au-dessus de chaque branche. Ces changements sont supportés par 4000 réplications par la méthode de bootstrap. Au cours de la construction de l'arbre, plusieurs arbres ont été possibles et l'arbre qui a une longueur de 4999 a été le plus court et a été choisi. L'arbre ainsi obtenu possède un indice de consistance (CI) de 0,5141, un indice de rétention (RI) de 0,8392 et un indice d'uniformité de rééchelonnement (RC) de 0,4314. La topologie est complètement la même que celle obtenue en utilisant la méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining) pour l'analyse de la combinaison de la séquence du fragment D-loop et de la séquence des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> présentant les neufs clades avec leurs groupe-frères respectifs.

Comme dans l'étude du fragment D-loop et l'étude des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup>, l'étude de la combinaison des séquences du fragment D-loop et les fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> montre l'existence de neuf groupes d'individus dont les individus composant chaque groupe sont toujours les mêmes quelque soient le fragment étudié et la méthode utilisée ce qui supportent l'existence de neuf espèces d'*Avahi*:

-*Avahi* de l'Est

\*Au Nord de la rivière Mangoro:

-*Avahi laniger*: NARA 4.1, NARA 4.2, NARA 4.10, NARA4.11, TAD 1, TAD 2, TAD 36, TAD 37, TAD 4.3, TAD4.8, TAD 4.9, MIZA 10 et MIZA13.

\*Au Sud de la rivière Mangoro:

-*Avahi betsileo*: FAN2.14 et FAN2.15  
- *Avahi peyrierasi* 1: RANO 66, RANO319B et VOP 2.13.  
- *Avahi peyrierasi* 2: RANO 67 et RANO 199.  
- *Avahi meridionalis meridionalis*: M86 et M89.  
- *Avahi meridionalis ramanantsoavani*: AND4, AND5, AND6, AND11 et AND12.

-*Avahi* de l'Ouest

\*Au Nord de la rivière Betsiboka:

-*Avahi unicolor*: ANT5.8 et ANT5.10.

-*Avahi occidentalis*: MAR29, MAR46 et MAR52.

\*Au Sud de la rivière Betsiboka:

-*Avahi cleesei*: BEMA8 et BEMA9

#### IV-3-3-3.- Méthode de NETWORK

Les séquences des haplotypes d'*Avahi* ont été analysées avec le logiciel NETWORK4.11 (Bandelt *et al*, 1999) permettant de grouper les individus similaires pour former un groupe. Neuf groupes sont observés dont la différence de nucléotides dans les raccordements de deux groupes est supérieure à 10 et la différence de nucléotides dans le raccordement des individus d'un même groupe est inférieure à 10; ils s'agissent de:

\**Avahi laniger*: les individus de Mananara-Nord avec Mantadia et Maromizaha (TAD36, TAD4.3, TAD4.6, TAD1, TAD3, TAD4, MIZA10, MIZA13, NARA4.1, NARA4.2, NARA4.10, NARA4.11)

\**Avahi peyrierasi* 1: les individus de Ranomafana avec Vohiparara (RANO66, RANO319, VOP2.13).

\**Avahi betsileo*: les individus de Fandriana (FAN2.14, FAN2.15).

\**Avahi meridionalis ramanantsoavani*: les individus de Manombo (M86, M89).

\**Avahi meridionalis meridionalis*: les individus d'Andohahela (AND4, AND12).

\**Avahi peyrierasi* 2: les individus de Ranomafana (RANO67, RANO199).

\**Avahi occidentalis*: les individus de Mariarano (MAR29, MAR52).

\**Avahi unicolor*: les individus de Antafondro (ANT5.8, ANT5.10).

\**Avahi cleesei*: les individus de Bemaraha (BEMA8, BEMA9).

Le résultat obtenu par la méthode de NETWORK confirme l'existence des neuf espèces d'*Avahi* (**figure 25, page 91**).

*Avahi meridionalis ramanantsoavani*

*Avahi meridionalis meridionalis*

*Avahi peyrierasi 2*

*Avahi betsileo*

*Avahi peyrierasi 1*

*Avahi laniger*

*Avahi cleesei*

*Avahi occidentalis*

*Avahi unicolor*

**Figure 25:** Réseau d'enjambement minimum (NETWORK) à partir de la combinaison de la séquence du fragment D-loop et des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> des haplotypes d'*Avahi*

Le nombre indique les différences de liaisons entre deux groupes, chaque nombre a été calculé en utilisant les logiciels Arlequin Version2 0 (Schneider *et al*, 2000) et Network version 4.11 (Bandelt *et al*, 1999; Forster *et al*, 2001).

## IV-4.- ETUDE DE L'ADN NUCLEAIRE

L'ADN nucléaire est formé de  $3.10^9$  paires de base (Franckham, 2003). L'étude de l'ADN nucléaire décrit les variations génétiques dans la population, détermine expérimentalement et théoriquement les variations existant dans les populations naturelles, et explique l'importance de ces variations. La génétique de population est l'étude du polymorphisme génétique (variation d'ADN) et leur divergence, elle joue un rôle important sur:

- \*l'estimation de la variabilité génétique et du flux génique
- \*la conservation des espèces en danger ou menacées par connaissance de la variabilité génétique.
- \*la prise des mesures pour une population n'ayant pas une bonne santé génétique

Après l'analyse des données du génotype par les logiciels MICROCHECKER (Oosterhout et al, 2004) et MICROSAT ANALYSER (Dieringer et Schlötterer, 2003), aucune erreur de génotypage a été observée et les données du génotype ont été analysées avec GENEPOP3.1 (Raymond et Rousset, 1995) pour estimer le taux d'hétérozygotie, la diversité génétique et la moyenne du nombre d'allèle par loci.

### IV-4-1.- ETUDE AU NIVEAU DE CHAQUE POPULATION

#### IV-4-1-1 Test de l'équilibre de Hardy-Weinberg

En analysant les données génotypiques de tous les individus avec le logiciel GENEPOP3.1 (Raymond et Rousset, 1995), nous avons obtenu la valeur de l'hétérozygotie attendue et la valeur de l'hétérozygotie observée respectives de chaque population (**tableau 8, page 93**) dont les sites de l'Est sont Anjanaharibe-Sud, Masoala, Marotandrano, Mananara-Nord, Zahamena, Betampona, Mantadia, Maromizaha, Anjozorobe, Tsinjoarivo, Fandriana, Ranomafana, Vohiparara, Tolongoina, Andringitra, Manombo, Midongy du Sud, Andohahela et les sites de l'Ouest sont Mariarano, Ankrafantsika et Bemaraha.

**Tableau 8:** Résultat du test de l'équilibre de Hardy-Weinberg des populations d'*Avahi*

Populations	Hétérozygotie attendue.	Hétérozygotie observée.
ANJANAHAARIBE -SUD	0, 819	0, 642
MASOALA	0, 757	0, 736
MAROTANDRANO	0, 798	0, 721
MANANARA-NORD	0, 827	0,747
ZAHAMENA	0, 837	0, 692
MANTADIA	0, 839	0, 784
MAROMIZAHA	0, 845	0, 764
BETAMPONA	0, 818	0, 668
ANJOZOROBE	0, 836	0, 632
TSINJOARIVO	0, 768	0, 759
FANDRIANA	0, 784	0, 715
RANOMAFANA	0, 812	0, 73
VOHIPARARA	0, 807	0, 721
TOLONGOINA	0, 798	0, 721
ANDRINGITRA	0, 782	0, 717
MANOMBO	0, 782	0, 66
MIDONGY DU SUD	0, 773	0, 691
ANDOHAHELA	0, 746	0, 705
MARIARANO	0, 78	0, 59
ANKARAFANTSINKA	0, 701	0, 563
BEMARAH	0, 761	0, 67

La valeur de l'hétérozygotie attendue est supérieure à la valeur de l'hétérozygotie observée pour toutes les populations étudiées ce qui indique que toutes les populations ne suivent pas l'équilibre de Hardy-Weinberg (Triantafyllidis *et al*, 2002) et devront passer le test de structure de population et le test de goulot démographique (bottleneck).

Pour la population de l'Est, la différence entre l'hétérozygotie attendue et l'hétérozygotie observée est maximum pour la population d'Anjozorobe dont l'hétérozygotie attendue est de 0, 836 et l'hétérozygotie observée est de 0, 632; la population de Tsinjoarivo possède la différence minimale entre l'hétérozygotie attendue et l'hétérozygotie observée dont l'hétérozygotie attendue est de 0, 768 et l'hétérozygotie observée est de 0, 759.

Pour la population de l'Ouest la population de Mariarano possède la plus grande différence entre l'hétérozygotie attendue (0,78) et l'hétérozygotie observée (0,59) et la

population de Bemaraha possède la plus petite différence (l'hétérozygotie attendue est de 0,761 et l'hétérozygotie observée est de 0,67).

#### IV-4-1-2.- La diversité génétique

La diversité génétique permet de déterminer la santé génétique d'une population, une valeur supérieure à 70% indique que la population est encore en sécurité génétique. L'analyse des données génotypiques avec le logiciel GENEPOL3.1 (Raymond et Rousset, 1995) permet d'avoir les résultats de la diversité génétique des différentes populations étudiées (**tableau 9, page 94**).

**Tableau 9:** La diversité génétique des populations d'*Avahi*

Populations	Diversité génétique
ANJANAHARIBE -SUD	0, 84
MASOALA	0, 763
MAROTANDRANO	0, 805
MANANARA-NORD	0, 79
ZAHAMENA	0, 85
MANTADIA	0, 842
MAROMIZAHA	0, 866
BETAMPONA	0, 83
ANJOZOROBE	0, 837
TSINJOARIVO	0, 759
FANDRIANA	0, 752
RANOMAFANA	0, 824
VOHIPARARA	0, 737
TOLONGOINA	0, 813
LAKIA	0, 605
ANDRINGITRA	0, 788
MANOMBO	0, 787
MIDONGY DU SUD	0, 78
ANDOHAHELA	0, 749
MARIARANO	0, 65
ANKARAFANTSINKA	0, 676
BEMARAH	0, 692

Pour *Avahi* de l'Est, la diversité génétique de chaque population est assez haute (supérieure à 70%) à l'exception la population de Lakia dont la population de Maromizaha possède la plus haute diversité génétique (0,866) et la population de Lakia possède la plus petite (0,605).

Pour *Avahi* de l'Ouest la diversité génétique est inférieure à 70% pour les trois populations étudiées qui sont les populations de Mariarano, d'Ankarafantsika et de Bemaraha dont celle de la population de Mariarano possède la plus petite diversité génétique (0,65) et la population de Bemaraha la plus grande (0, 692).

#### IV-4-1-3.- Le nombre moyen d'allèles par loci et la richesse allélique

Le nombre moyen d'allèles par loci indique la quantité d'allèle par loci et la richesse allélique indique la qualité des allèles. Le nombre moyen d'allèles par loci et les fréquences alléliques sont obtenus en analysant les données génotypiques de chaque population avec le logiciel GENEPOP3.1 (Raymond et Rousset, 1995) (**tableau 10, page 95**).

**Tableau 10:** Moyenne du nombre d'allèles par loci et richesse allélique des populations d'*Avahi*

Populations	Nombre moyen d'allèles par loci	Richesse alléliques
ANJANAHAARIBE -SUD	5, 052	2, 757
MASOALA	3, 684	2, 852
MAROTANDRANO	5, 894	2, 997
MANANARA-NORD	7, 526	3, 132
ZAHAMENA	6, 473	3, 172
MANTADIA	7, 894	3, 179
MAROMIZAHA	4, 947	3, 096
BETAMPONA	6, 473	3, 098
ANJOZOROBE	4, 684	3, 17
TSINJOARIVO	4, 578	2, 845
FANDRIANA	4, 631	2, 906
RANOMAFANA	6, 526	3, 095
VOHIPARARA	3, 736	2, 926
TOLONGOINA	5, 684	3, 021
LAKIA	2, 821	2, 421
ANDRINGITRA	5, 56	2, 944
MANOMBO	6, 421	2, 961
MIDONGY DU SUD	5, 421	2, 916
ANDOHAHELA	5, 526	2, 794
MARIARANO	4, 42	2, 507
ANKARAFANTSIIKA	4, 526	2, 581
BEMARAH	4, 157	2, 663

Pour *Avahi* de l'Est, la population de Mantadia possède le plus grand nombre moyen d'allèles par loci (7,894) et la population de Lakia possède le plus petit nombre moyen d'allèles par loci (2,821). Les populations de Masoala et de Vohiparara ont un faible nombre

moyen d'allèles par loci qui sont respectivement 3,684 et 3,736. Les populations de Mananara-Nord (7, 526), de Zahamena (6, 473), de Mantadia (7, 894), de Betampona (6, 473), de Ranomafana (6, 526) et de Manombo (6, 421) ont des nombres moyen d'allèles par loci élevées.

Pour les populations de l'Ouest, les nombres moyens d'allèles sont tous inférieurs à 5 dont la population de Bemaraha possède la plus faible nombre moyen d'allèles par loci (4,157).

La richesse allélique de toutes les populations est faible et il n'y a pas de grande différence sur la richesse allélique de toutes les populations. La population de Mantadia possède la plus grande richesse allélique (3, 179) et la population de Lakia possède la plus faible richesse allélique (2,421). La richesse allélique est presque la même les trois populations de l'Ouest qui sont 2,507 pour la population de Mariarano, 2,581 pour la population d'Ankarafantsika et 2,663 pour la population de Bemaraha.

#### **IV-4-1-4.- Le coefficient de consanguinité ( $F_{IS}$ )**

Le coefficient de consanguinité a été estimé en analysant les données génotypiques avec le logiciel FSTAT (Goudet, 1995). Une valeur négative du coefficient de consanguinité indique un excès d'hétérozygote et il n'y a pas de consanguinité; une haute valeur du coefficient de consanguinité indique un excès d'homozygote et il y a tendance vers la consanguinité. Les coefficients de consanguinité de toutes les populations étudiées sont indiqués dans le **tableau 11 (page 97)**.

**Tableau 11:** Coefficient de consanguinité ( $F_{IS}$ ) des populations d'*Avahi*

Populations	$F_{IS}$
ANJANAHARIBE-SUD	0, 236
MASOALA	0, 034
MAROTANDRANO	0, 104
MANANARA-NORD	0, 102
ZAHAMENA	0, 185
MANTADIA	0, 069
MAROMIZAHA	0, 104
BETAMPONA	0, 95
ANJOZOROBE	0, 26
TSINJOARIVO	-0, 012
FANDRIANA	0, 049
RANOMAFANA	0, 108
VOHIPARARA	0, 128
TOLONGOINA	0, 113
LAKIA	-0, 174
ANDRINGITRA	0, 095
MANOMBO	0, 163
MIDONGY DU SUD	0, 113
ANDOHAHELA	0,059
MARIARANO	0, 141
ANKARAFANTSIIKA	0, 21
BEMARAH	0, 133

La population de Lakia possède le coefficient de consanguinité le plus bas ( $F_{IS} =-0,174$ ) suivie par la population de Tsinjoarivo ( $F_{IS} =-0,012$ ), la population de Betampona possède le plus haut coefficient de consanguinité ( $F_{IS} =0,95$ ). Les populations de Masoala ( $F_{IS} =0,034$ ), de Mantadia ( $F_{IS} =0,069$ ), de Fandriana ( $F_{IS} =0,049$ ), d'Andringitra ( $F_{IS} =0,095$ ) et d'Andohahela ( $F_{IS} =0,059$ ) possèdent un coefficient de consanguinité.

Les populations de Marotandrano ( $F_{IS} =0,104$ ), de Mananara-Nord ( $F_{IS} =0,102$ ), de Maromizaha ( $F_{IS} =0,104$ ), de Ranomafana ( $F_{IS} =0,108$ ), de Vohiparara ( $F_{IS} =0,128$ ), de Tolongoina ( $F_{IS} =0,113$ ), de Midongy du Sud ( $F_{IS} =0,113$ ) et de Bemaraha ( $F_{IS} =0,141$ ) possèdent du coefficient de consanguinité modéré.

Les populations d'Anjanaharibe-Sud ( $F_{IS} =0,236$ ), de Zahamena ( $F_{IS} =0,185$ ), d'Anjozorobe ( $F_{IS} =0,26$ ), de Manombo ( $F_{IS} =163$ ), d'Ankarafantsika ( $F_{IS} =0,21$ ) et de Mariarano ( $F_{IS} =0,141$ ) possèdent du coefficient de consanguinité élevé.

Pour la population de l'Ouest, la population de Bemaraha possède le plus petit coefficient de consanguinité (0,133) et celle d'Ankarafantsika le plus grand (0, 21).

#### IV-4-1-5.- Test du goulot démographique (bottleneck)

Lorsque la population ne suit pas l'équilibre de Hardy-Weinberg, elle devra passer le test de goulot démographique (BOTTLENECK v1.2.02) avec le test de Wilcoxon s'il y a eu diminution de la taille de la population à un certain moment; seulement l'analyse avec 10 individus au minimum par site peuvent donner un résultat fiable.

Pour toute population d'*Avahi*, seulement cinq populations (**tableau 12, page 98**) ont atteint le nombre minimal significatif (10 individus) pour pouvoir attribuer au test de goulot démographique qui sont les populations de Mananara-Nord, d'Anjozorobe, de Mantadia, de Manombo et de Midongy du Sud. Des études ultérieures devront être faites pour les populations d'Anjanaharibe-Sud, de Marotandrano, de Masoala, de Betampona, de Zahamena, de Maromizaha, de Tsinjoarivo, de Fandriana, de Ranomafana, de Tolongoina, de Vohiparara, de Lakia, d'Andringitra, d'Ankarafantsika, d'Andohahela, de Mariarano et de Bemaraha lorsque le nombre des échantillons par site atteignent le nombre de 10 individus.

**Tableau 12:** Probabilité d'excès d'hétérozygote (IAM, test de Wilcoxon  $\alpha<5\%$ ) de 5 populations d'*Avahi*

Sites	Probabilité d'excès d'hétérozygotie
Mananara-Nord	0, 00357
Anjozorobe	0, 00071
Mantadia	0, 02228
Manombo	0, 00004
Midongy du Sud	0, 00001

Le résultat du test de BOTTLENECK1.2.02 (Cornuet et Luikart, 1996 ; Cornuet et al, 1999 ; Piry et al, 1999) nous informe que du goulot démographique (bottleneck) a eu lieu dans les 5 populations testées (probabilité d'hétérozygotie inférieure à 0,05) dont la population de Midongy du Sud possède la plus faible probabilité d'excès d'hétérozygotie ( $p=0,00001$ ) et la population de Mantadia la plus grande (0,0228).

## **IV-4-2.- ETUDE INTERPOPULATION**

### **IV-4-2-1.- La différenciation génétique entre populations**

Le coefficient de différenciation  $F_{ST}$  a été estimé en analysant les données génotypiques avec le logiciel FSTAT (Goudet, 1995). Une valeur de  $F_{ST}$  entre 0 et 0,05 indique une diversification faible entre deux populations, entre 0,05 et 0,15 indique une diversification modérée, entre 0,15 et 0,25 indique une diversification importante et une valeur de  $F_{ST}$  supérieure à 0,25 indique une diversification très importante. Les résultats de la diversification des populations deux à deux sont indiqués sur le **tableau 13 (page 100)**

**Tableau 13:** Diversification ( $F_{ST}$ ) entre deux populations d'*Avahi*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
2	0,1387																				
3	0,1287	0,0977																			
4	0,1187	0,0943	0,0771																		
5	0,1175	0,989	0,0679	0,0568																	
6	0,169	0,1325	0,1168	0,1234	0,1143																
7	0,1149	0,099	0,0863	0,0749	0,0642	0,0787															
8	0,1042	0,0876	0,1195	0,1042	0,0947	0,105	0,0957														
9	0,1188	0,104	0,0646	0,0385	0,0284	0,1046	0,0649	0,1133													
10	0,1165	0,0805	0,0587	0,043	0,0313	0,0823	0,0504	0,0948	0,0342												
11	0,1449	0,1148	0,0838	0,0755	0,083	0,0966	0,0637	0,1072	0,0662	0,0762											
12	0,1586	0,118	0,1071	0,1258	0,1207	0,163	0,1186	0,129	0,1142	0,1207	0,1326										
13	0,0604	0,1298	0,1126	0,1005	0,0979	0,1615	0,0915	0,1057	0,0903	0,082	0,1215	0,1563									
14	0,1156	0,0793	0,1075	0,0728	0,0754	0,1102	0,0725	0,0747	0,0806	0,0605	0,0919	0,1289	0,1002								
15	0,1243	0,0832	0,0983	0,074	0,0725	0,1278	0,0816	0,0813	0,078	0,0604	0,0985	0,1442	0,1087	0,0803							
16	0,1571	0,1438	0,0827	0,065	0,0835	0,1571	0,0819	0,1331	0,0631	0,0615	0,0679	0,1451	0,1412	0,1128	0,0996						
17	0,1405	0,851	0,0906	0,0872	0,0862	0,1237	0,0856	0,0805	0,1097	0,0714	0,1007	0,1595	0,1259	0,0856	0,0518	0,1354					
18	0,1313	0,0791	0,0676	0,0425	0,0357	0,0953	0,0545	0,115	0,0319	0,0187	0,0605	0,0927	0,0875	0,0639	0,0736	0,0521	0,0079				
19	0,1899	0,1506	0,1707	0,1209	0,1425	0,2268	0,1516	0,1424	0,142	0,1307	0,1842	0,2355	0,1903	0,1148	0,1393	0,2164	0,169	0,1143			
20	0,2277	0,1882	0,1683	0,1717	0,1579	0,1923	0,162	0,2115	0,1559	0,1557	0,1745	0,1986	0,1964	0,1847	0,1852	0,2195	0,19	0,1449	0,1563		
21	0,2429	0,2065	0,1794	0,1908	0,2002	0,1906	0,1749	0,2293	0,1648	0,182	0,16	0,2294	0,1893	0,2138	0,22	0,2221	0,232	0,1649	0,147	0,2931	
22	0,2185	0,1851	0,1584	0,1597	0,1786	0,181	0,1489	0,1993	0,148	0,1322	0,1581	0,2194	0,204	0,1668	0,1838	0,1979	0,172	0,151	0,1469	0,2559	0,174

**Populations:** 1=Andohahela, 2=Andringitra, 3=Anjanaharibe-Sud, 4=Anjozorobe, 5=Betampona, 6=Fandriana, 7=Mananara-Nord, 8=Manombo, 9=Mantadia, 10=Maromizaha, 11=Marotandrano, 12=Masoala, 13=Midongy du Sud, 14=Randomafana, 15=Tolongoina, 16=Tsinjoarivo, 17=Vohiparara, 18=Zahamena, 19=Lakia, 20=Ankarafantsika, 21=Mariarano, 22=Bemaraha,

Les résultats montrent une diversification importante entre la population de l'Est et la population de l'Ouest ( $F_{ST}>0,15$ ). Les populations de Masoala, d'Andohahela, de Midongy du Sud et de Fandriana possèdent respectivement les plus grandes diversifications avec les autres populations de l'Est. La plus importante diversification est entre la population de Mariarano et la population d'Ankarafantsika (0,2931).

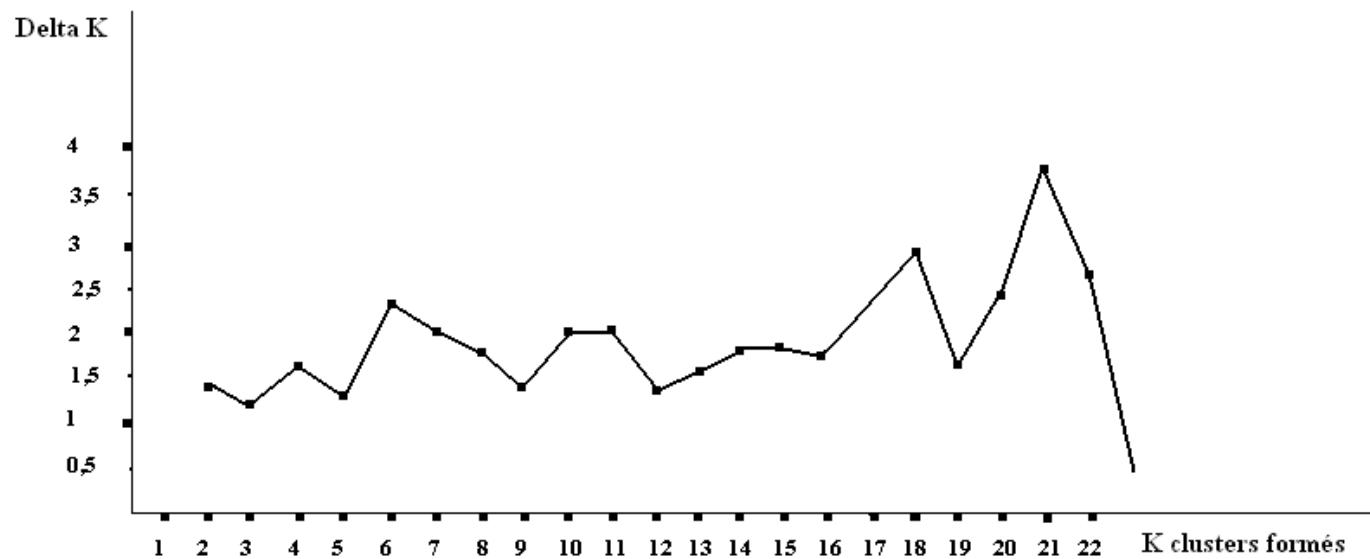
La diversification est faible entre les populations suivantes Mantadia-Anjozorobe ( $F_{ST}=0,0385$ ), Mantadia-Betampona ( $F_{ST}=0,0204$ ), Maromizaha-Mantadia ( $F_{ST}=0,0430$ ), Maromizaha-Betampona ( $F_{ST}=0,0313$ ), Zahamena-Anjozorobe ( $F_{ST}=0,0425$ ), Zahamena-Betampona ( $F_{ST}=0,035$ ) et Zahamena-Mantadia ( $F_{ST}=0,0319$ ). qui sont les moins diversifiées.

Entre les populations de l'Ouest, la diversification est très importante entre la population de Bemaraha et la population d'Ankarafantsika ( $F_{ST}=0,2559$ ), entre la population de Mariarano et la population d'Ankarafantsika ( $F_{ST}=0,2931$ ).

#### **IV-4-2-2.- Test de la structure**

Pour connaître s'il y a population cryptique au sein des populations étudiées, les données génotypiques de ces populations ont été analysées avec le test STRUCTURE 2.0 (Pritchard et al, 2002) qui regroupe les populations qui se ressemblent entre elles en formant un cluster, ce procédé établit une matrice de comparaison par pair de  $F_{ST}$ .

Les analyses par test STRUCTURE 2.0 (Pritchard et al, 2002) de toutes les populations montre la présence de 22 clusters confirmant que toutes ces populations sont indépendantes les unes des autres (**figure 26, page 102**). La population de Mariarano présente la plus grande valeur de Delta K ayant une très grande différence avec celles des autres populations, ce qui exprime l'isolation de cette population.



**Figure 26:** Résultat du test de la structure des populations d'*Avahi*

Populations: 1=Andohahela, 2=Andringitra, 3=Anjanaharibe-Sud, 4=Anjozorobe, 5=Betampona, 6=Fandriana, 7=Mananara-Nord, 8=Manombo, 9=Mantadia, 10=Maromizaha, 11=Marotandrano, 12=Masoala, 13=Midongy du Sud, 14=Ranomafana, 15=Tolongoina, 16=Tsingoarivo, 17=Vohiparara, 18=Zahamena, 19=Lakia, 20=Ankarafantsika, 21=Mariarano, 22=Bemaraha,

## V.-DISCUSSION

L'étude génétique permet de:

- caractériser la taxonomie de l'espèce
- connaître l'architecture génétique de la population (la structure de la population, la diversité génétique, la dynamique de population)

La génétique de conservation est une importante discipline permettant d'estimer et de maintenir la diversité génétique d'une population ainsi que le maintien de son environnement écologique pour sa conservation (Tilman et al, 1994). Elle contribue à minimiser le risque d'extinction par définition de la magnitude de la variabilité génétique et d'estimer la solution de la perte de la diversité génétique due à l'augmentation de la consanguinité et d'autres problèmes génétiques (Templeton and Read, 1994). Ainsi, la génétique de conservation nous emmène au potentiel approche des problèmes concernant des espèces:

- résolution des problèmes taxonomiques
- identification de la dynamique de population
- connaissance de l'hybridation des espèces
- estimation de la consanguinité et ses effets par la perte de la diversité génétique (Frankham et al, 2003).

Au cours des vingt dernières années, l'apparition et le développement des études moléculaires, de même que les outils mathématiques et statistiques de plus en plus performants ont permis de résoudre les problèmes phylogénétiques (Hubby et Throckmorton, 1965). En effet, l'étude de l'ADN mitochondrial et de l'ADN nucléaire est un puissant matériel pour résoudre les "Unités de Gestion de la Faune" (Wildlife Management Units) (Moritz, 1994) et sa relation avec l'écosystème (Joseph et al, 1995).

### V-1.- ETUDE DE LA SEQUENCE DE L'ADN MITOCHONDRIAL

Actuellement, 1,5 millions d'espèces ont été identifiées dans le monde entier, au moins le double de ce nombre reste encore à identifier (May, 1992) et beaucoup d'espèces ont été disparues avant même qu'on les a identifiés, des études approfondies seront particulièrement à faire pour comprendre le statut de ces populations. Jusqu'à présent, la connaissance sur la biologie d'une espèce est encore limitée, celle-ci deviendra plus complète en utilisant les études génétiques telles sont les cas de plusieurs espèces

lémuriennes récemment découvertes (Louis *et al*, 2006; Zaramody *et al*, 2006) afin de pouvoir les classifier dans le statuts de conservation de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN).

La classification des lémuriens a été basée sur des caractères morphologiques, sur l'ostéologie, sur la dentition, sur l'appareil locomoteur; la classification actuelle fait intervenir l'étude moléculaire. Dans le passé, la biologie de conservation a été concentrée sur l'écologie mais actuellement elle nécessite beaucoup les approches génétiques (Avise et Hamrick, 1996). La détermination d'une catégorie taxonomique particulière conduit au déterminisme du statut de conservation d'un groupe particulier parce qu'une espèce est prioritaire dans les stratégies de conservation et c'est l'espèce qui est l'unité primaire concernée en biodiversité, en conservation et en études biologiques (Robert et Robert, 2001); en effet, les analyses d'ADN mitochondrial sont de plus en plus utilisées pour distinguer les espèces voisines présentant de fortes similitudes morphologiques parce que les données génétiques fournissent des caractérisations taxonomiques des espèces et sous-espèces comme la découverte des nouvelles espèces de *Microcebus* (Kappeler *et al*, 2005; Louis *et al*, 2006), nouvelles espèces de *Lepilemur* (Louis *et al*, 2006) et de nouvelles espèces d'*Avahi* (Zaramody *et al*, 2006).

Les séquences des nucléotides des gènes permettent la résolution de la variation génétique. Lors de l'alignement des séquences, il est possible d'identifier les locations des insertions et des délétions à partir d'une séquence de référence. 3 cas peuvent apparaître:

- il n'y a pas de changement de la séquence par rapport à la séquence de référence
- il y a insertion ou délétion
- il y a substitution qui peut être:
  - \*une transition qui est un changement d'une base purine en une autre base purine ou d'une base pyrimidine en base pyrimidine
  - \*une transversion qui est un changement d'une base purine en base pyrimidine ou vis-versa.

Le bon alignement permet la construction de l'arbre phylogénique afin de déterminer les liens entre deux individus. Pour une délétion dans une séquence d'un individu comparée avec la séquence de référence, la base absente est représentée par un tiret (-), les bases non identifiées lors de la détermination des séquences sont représentées par "N". Les six états de caractères (A, C, G, T, tiret et N) seront tous pris en compte lors de l'analyse de la séquence de l'ADN mitochondrial.

Comme l'a décrit Davis et Nixon (1992) concernant la nomination d'une espèce phylogénétique, la présence ou l'absence de caractères qui différencie deux populations permettent de distinguer une espèce. Ainsi nous avons utilisé la présence ou l'absence d'une base à une certaine position sur la séquence comme trait de caractère dans la séquence du fragment D-loop et des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> de tous les individus d'*Avahi* étudiés; cette méthode a été valable pour résoudre le problème de la phylogénie des lémuriens (Pastorini, 2000) et pour nommer une espèce (Louis *et al*, 2006a, 2006b). En comparant les séquences de ces fragments de l'ADN mitochondrial, des différences ont été observées sur les différents groupes d'individus étudiés.

En analysant le cytochrome b constitué de 1140 paires de bases *Avahi* au Sud de la rivière Mangoro a été divisée en *Avahi peyrierasi*, *Avahi meridionalis ramanantsoavani* et *Avahi meridionalis meridionalis* (Zaramody *et al*, 2006). Basée sur les inférences phylogénétiques des analyses par la méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining), la méthode de la vraisemblance maximum (maximum likelihood) et la méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony) de la séquence du fragment D-loop, de la séquence des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> et de la combinaison de la séquence de ces différents fragments (au total 2926 paires de base) *Avahi* forme un groupe paraphylétique et nous avons trouvé neuf espèces dont sept ont été déjà décrites (*Avahi occidentalis*, *Avahi cleesei*, *Avahi unicolor*, *Avahi laniger*, *Avahi peyrierasi*, *Avahi meridionalis meridionalis* et *Avahi meridionalis ramanantsoavani*) et deux nouvellement découvertes (*Avahi betsileo* et *Avahi peyrierasi* 1 ou 2). L'holotype de *Avahi laniger* a été collecté à Betanimena situé entre Maroantsetra et Mananara-Nord (Jenkins, 2000), c'est pourquoi que *Avahi* de Mananara-Nord est *Avahi laniger*.

La topologie de l'arbre obtenu avec l'analyse des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup>, en utilisant la méthode de la vraisemblance maximum (maximum likelihood), la méthode du plus proche voisin (neighbor-joining) et la méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony), est la même que la topologie de l'arbre obtenu avec l'analyse de la combinaison de tous ces différents fragments. Par contre la topologie n'est pas la même pour l'analyse du fragment D-loop avec la méthode de la vraisemblance maximum (maximum likelihood), la méthode du plus proche voisin (neighbor-joining) et la méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony) mais la division de *Avahi* en neuf clades est toujours observée et les

individus constituant chaque clade sont toujours les mêmes. Par conséquent la désignation des nouvelles espèces reste toujours valable, telle est la nomination de *Microcebus mittermeieri*, *Microcebus simmonsi* et *Microcebus jollyae* en analysant 561 paires de base du fragment D-loop et 2378 paires de base des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> (Louis *et al*, 2006 a), ce cas a été aussi observé lors de l'analyse de vingt espèces de Mammifères par laquelle 477 substitutions ont été observées et les topologies des arbres obtenus en utilisant la méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony) et la méthode du plus proche voisin (neighbor-joining) ne sont pas les mêmes (Irwin *et al*, 1991). Vu le statut en danger des lémuriens qui sont indiqués dans l'annexe I CITES, avec les possibilités technologiques et moléculaires actuellement, la désignation d'une nouvelle espèce de Primate a été acceptée avec l'utilisation des données morphologiques, des photographies et des séquences du fragment de l'ADN mitochondrial (Thalmann et Geissmann, 2005; Louis *et al*, 2006).

En étudiant le cytochrome b (1140 paires de bases) et sans *Avahi unicolor* la distance génétique entre *Avahi cleesei* et *Avahi occidentalis* est relativement basse et cytogénétiquement la distinction de *Avahi cleesei* avec *Avahi occidentalis* est discutable (Zaramody *et al*, 2006) mais d'après notre étude toutes les espèces de l'Ouest ont été étudiées (avec *Avahi unicolor*); vue la grande distance génétique (**figures 14, page 66 et figure 22, page 83**), le nombre de différences de bases entre *Avahi cleesei* et *Avahi occidentalis* (**tableau 7, page 85**) en étudiant 2926 paires de bases et la grande distance géographique entre les deux sites, l'existence de l'espèce *Avahi cleesei* a été prouvée phylogénétiquement.

De même la distance génétique est élevée entre *Avahi meridionalis meridionalis* et *Avahi meridionalis ramanantsoavani* (**figures 14, page 66 et figure 22, page 83**) et le grand nombre de différences de bases (**tableau 7, page 85**), ainsi nous proposons d'élever ces deux sous-espèces en espèces respectivement *Avahi ramanantsoavani* et *Avahi meridionalis*.

En plus nous désignons deux autres nouvelles espèces d'*Avahi* dans l'Est de Madagascar en se basant sur le concept des espèces phylogénétiques (Wilson, 1981) et la nomenclature zoologique internationale (Ride *et al*, 1999):

\**Avahi betsileo*:

-Série type: Des échantillons sanguins de FAN2.14 qui est un male adulte, de FAN2.15 qui est une femelle adulte et de FAN2.20 qui est un male adulte ont été déposés au musée de l'Université de Texas.

-FAN2.14, FAN2.15 et FAN2.20 ont été collectés respectivement le 13 juillet 2002, 13 juillet 2002 et 15 juillet 2002.

-Localité: Madagascar, province de Fianarantsoa, région Amoron'i Mania, District de Fandriana, Forêt de Bemosary approximativement S20°20'60.1'', E047°33'36.1''.

*Avahi betsileo* diffère de *Avahi laniger* par 9 paires de bases pour le fragment D-loop et 16 paires de bases pour les fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> (25 paires de base au total), diffère de *Avahi peyrierasi 1* par 13 paires de bases pour le fragment D-loop et 30 paires de bases les fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> (43 paires de bases au total), diffère de *Avahi peyrierasi 2* par 10 paires de bases pour le fragment D-loop et 16 paires de bases pour les fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> (26 paires de bases au total).

-Etymologie: le nom *betsileo* a été proposé à l'honneur de la tribu betsileo résidant dans la région dans laquelle est trouvée l'espèce.

\**Avahi nova species*: elle s'agit soit *Avahi peyrierasi 1* soit *Avahi peyrierasi 2*. Pour déterminer la nouvelle espèce une étude comparative devra être faite avec *Avahi peyrierasi* de Mahasoarivo, aux environs de Ranomafana (E47°26' S21°16') (Zaramody *et al*, 2006)

-*Avahi peyrierasi 1* diffère de *Avahi laniger* par 8 paires de bases pour le fragment D-loop et 27 paires de bases pour les fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> (35 paires de bases au total), diffère de *Avahi peyrierasi 2* par 10 paires de bases pour le fragment D-loop et 33 paires de bases les fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> (43 paires de bases au total), diffère de *Avahi meridionalis ramanantsoavani* par 10 paires de bases pour le fragment D-loop et 33 paires de bases pour les fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> (43 paires de bases au total) et diffère de *Avahi betsileo* par 13 paires de bases pour le fragment D-loop et 30 paires de bases pour les fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> (43 paires de bases au total).

-*Avahi peyrierasi 2* diffère de *Avahi laniger* par 3 paires de bases pour le fragment D-loop et 18 paires de bases pour les fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> (21 paires de bases au total), diffère de *Avahi peyrierasi 1* par 10 paires de bases pour le fragment D-loop et 33 paires de bases pour les fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie

d'ARN-t<sup>LEU</sup> (43 paires de bases au total), diffère de *Avahi meridionalis ramanantsoavani* par 5 paires de bases pour le fragment D-loop et 23 paires de bases pour les fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> (28 paires de bases au total) et diffère de *Avahi betsileo* par 10 paires de bases pour le fragment D-loop et 16 paires de bases pour les fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> (26 paires de bases au total).

Le long de la côte Est de Madagascar du nord au sud de grandes forêts et des fragments de forêt restent encore mais beaucoup d'entre eux ne sont pas encore explorées donc les aires de répartition de ces nouvelles espèces sont encore mal définies donc des recherches restent encore à faire sur ce domaine.

## V-2.- ETUDE DE L'ADN NUCLEAIRE

Il est avantageux de choisir le microsatellite comme marqueur génétique pour différentes raisons:

-c'est un locus spécifique différent du minisatellite

-il est codominant et son utilisation lors de la réaction d'amplification de la chaîne par polymérisation (ACP) ne nécessite qu'une faible quantité de tissu

-il est hautement polymorphique

Le microsatellite est très important sur l'étude de la génétique de conservation pour différentes raisons:

-le microsatellite est utilisé pour étudier la diversité génétique au sein du génome, le degré de consanguinité entre les individus d'une population, la migration et la relation entre les populations; ce qui nous permet à faire des études de différentes populations appartenant à une même espèce.

-il est aussi utilisé pour calculer la fréquence d'un allèle donné dans une population.

-il permet aussi d'évaluer l'histoire démographique et la magnitude du flux génique entre les populations

-le microsatellite présente un très haut niveau de polymorphisme et possède plusieurs allèles par locus (Morin *et al.* 1994).

-la diversité génétique trouvée par les microsatellites est typiquement plus élevée donc plus informative pour l'étude de la population

Les loci polymorphiques de l'ADN microsatellitaire sont très importants pour connaître le niveau de la diversité génétique d'une population et peuvent être utilisés pour identifier une population à risque d'extinction en connaissant la diversité génétique (Gotteli *et al*, 1994).

L'étude de la génétique de population est l'étude du concept pour quantifier et mesurer la variation génétique chez une population naturelle en se référant sur les données obtenues en utilisant les analyses par des marqueurs génétiques (Hedrick, 2005). Des analyses ont été faites sur la fréquence des allèles sur plusieurs loci pour estimer l'architecture génétique et pour étudier la dynamique de la population en se référant sur l'étude génétique.

### **V-2-1.- HETEROZYGOTIE**

Le taux de consanguinité est élevé chez les populations insulaires (Rabarivola, 1998), ainsi que chez les isolats dus à la fragmentation de l'habitat (Frankham, 1997, 1998); le taux de consanguinité augmente la proportion des homozygotes et diminue la proportion des hétérozygotes.

Pour toutes les populations d'*Avahi* étudiées l'hétérozygotie attendue est supérieure à l'hétérozygotie observée indiquant une tendance vers la consanguinité due à la fragmentation de l'habitat qui a pour effet le manque d'échange de flux génique entre populations. Pour impliquer la conservation, cette échange de flux génique entre populations est très importante pour faire augmenter le taux d'hétérozygotie observée d'une population pour qu'elle soit en bonne santé génétique; cette augmentation l'hétérozygotie devra être faite sur des populations comme la population de Betampona qui a une grande différence de l'hétérozygotie attendue et de l'hétérozygotie observée (0,15) avec une haute valeur de coefficient de consanguinité (0,95). L'effet de cette fragmentation de l'habitat sur l'hétérozygotie conduisant à une tendance vers la consanguinité est observée chez *Eulemur sanfordi* d'Analamerana, d'Ankarana et de la Montagne d'Ambre, respectivement une différence de 0,324 entre hétérozygotie attendue et hétérozygotie observée pour la population d'Analamerana, 0,050 pour la population d'Ankarana et 0,071 pour la population de Montagne d'Ambre (Ramanamahafa, 2007). Cet effet de l'échange de flux génique sur l'hétérozygotie a été observé aussi chez *Cleithrionomys californicus* (Cricetidae) qui a été victime de la fragmentation de son habitat; en 1990 l'hétérozygotie attendue a été 0,89 et l'hétérozygotie observée a été 0,64, après réintroduction d'autre population en 1998

l'hétérozygotie attendue est de 0,85 et l'hétérozygotie observée est de 0,77 (Tallmon *et al*, 2002).

## V-2-2 LA DIVERSITE GENETIQUE

C'est la diversité génétique qui permet à une population de s'adapter aux changements environnementaux (Lande et Shanon, 1996; Mitton, 1997), les populations ayant une basse valeur de diversité génétique sont vulnérables aux facteurs qui contribuent à l'extinction comme le changement environnemental, la maladie et la compétition (Jiménez *et al*, 1994, Pimm et Askins, 1995); tel est le cas de *Lemur catta* à Andringitra possédant une fourrure plus épaisse par rapport à leurs congénères dans le Sud qui se sont adaptés à un milieu géographique plus frais (Jolly, 2003). La diminution de la diversité génétique peut être due à la diminution de la taille de la population par suite d'un isolement ou par l'existence d'une barrière empêchant la relation avec d'autres populations ou suite à un cataclysme naturel ou par la chasse (Grant et Bowen, 1998). La génétique de conservation nous permet d'établir des données utilisées pour estimer des solutions face aux problèmes des espèces en danger par la consanguinité due à la perte de la diversité génétique et la structuration de la population; c'est le flux génique qui est le facteur de maintenance de la diversité génétique. La valeur de la diversité génétique d'une population dépend essentiellement de l'état de l'habitat et de sa continuité avec les autres habitats qui permet l'existence d'échange de flux génique entre populations, la maintenance de la diversité génétique est l'objectif primaire de la gestion des populations menacées.

Dans notre étude toute la population de l'Est possède une haute diversité génétique dont la population de Maromizaha possède la plus grande (0,866); pour la population lémurienne de l'Est il y a eu presque continuité de l'habitat, malgré la fragmentation qui s'accentue actuellement, ce qui a favorisé l'échange de flux génique entre différentes populations, tels sont les cas des populations d'Andohahela et Midongy du Sud dont il y a continuation de la chaîne Anosyenne et le Parc National de Midongy du Sud qui est la plus large aire protégée à Madagascar. C'est aussi le cas la population d'Andringitra et la population de Ranomafana dont ces deux parcs nationaux sont connectés par un corridor, il y a aussi la connexion de la forêt de Ranomafana et la forêt de Tolongoina tandis qu'au Nord de la rivière Mangoro la forêt est continue jusqu'au nord à Anjanaharibe-Sud et à Marotandrano.

L'effet de cette continuation de la forêt au Nord de la rivière Mangoro sur la diversité génétique par l'existence de flux génique est observée aussi chez *Indri indri* dont

les diversités génétiques sont hautes, 0,841 pour la population d'Anosibe An'Ala, 0,809 pour la population de Maromizaha et 0,843 pour la population de Zahamena (Zaonarivelo, 2007).

Les trois populations de l'Ouest étudiées possèdent chacune une diversité génétique inférieure à 0,70. Pour la population de Mariarano, la diversité génétique est très basse due à l'isolation complète de cette forêt et à la petite superficie de la forêt 1580 ha (Andriantomphahava et al, 2005); en plus du manque d'échange de flux génique avec d'autres populations d'*Avahi* d'autres sites, la population étudiée est presque isolée dans une forêt galerie et il n'y a pas d'échanges de flux génique avec d'autres populations dans la même forêt de Mariarano. Pour la population d'Ankarafantsika, la population étudiée vit dans une zone hors de la chasse à cause du tabou mais son territoire n'est pas assez large et elle forme un isolat. La population de Bemaraha possède le plus vaste habitat dans l'Ouest et n'est pas menacée par la chasse mais l'échange de flux génique entre les différentes populations est perturbé par l'état de l'habitat sous-forme de fragments. Cet effet de la chasse et de l'isolement de la population sur la diversité génétique est observé chez les populations d'*Eulemur coronatus* et *Eulemur sanfordi* d'Ankarana, Analamerana et Montagne d'Ambre où la diversité génétique est inférieure à 0,70: pour *Eulemur coronatus* 0, 586 pour la population d'Ankarana, 0, 488 pour la population d'Analamerana et 0, 624 pour la population de Montagne d'Ambre; pour *Eulemur sanfordi* 0, 567 pour la population d'Ankarana, 0, 639 pour la population d'Analamerana et 0, 574 pour la population de Montagne d'Ambre (Ramanamahefa, 2007).

## **V-2-3 LE NOMBRE MOYEN D'ALLELES PAR LOCI ET LA RICHESSE ALLELIQUE**

Les différentes formes d'un gène s'appellent allèles, lorsque les individus ont des gènes légèrement différents, il y a une diversité génétique. La diversité génétique est haute chez une population panmictique dont les échanges génétiques avec d'autres populations ont eu lieu, l'isolation d'une population limite les échanges du matériel génétique qui augmente la vraisemblance des allèles qui peut emmener jusqu'à la perte de la diversité génétique. La première évaluation de la diversité génétique est le polymorphisme qui est le nombre d'allèle d'un même gène repéré dans la population. Lorsque tous les membres de la population ont le même allèle dans un gène, cette population est dite avoir une basse diversité génétique pour ce gène. Si plusieurs variant d'allèle existent chez plusieurs gènes, cette population possède une haute diversité génétique. Le taux de consanguinité ne change

pas la fréquence des allèles dans une population mais le changement de la fréquence allélique est du à la présence ou à l'absence de flux génique (Hedrick, 2005).

Les populations de Mantadia, Zahamena et Mananara-Nord possèdent un haut nombre moyen d'allèles par loci par rapport aux autres populations respectivement 7, 894, 6,473 et 7, 526 à cause de l'existence de l'échange du flux génique par la continuité de la forêt. L'effet de cette continuité de l'habitat sur le nombre moyen d'allèles par loci du à l'échange du flux génique est observé chez la population d'*Indri indri* avec 7,90 pour la population de Mantadia, 8, 150 pour la population de Zahamena (Zaonarivelo, 2007); il en est de même pour la population de *Varecia variegata rubra* de Masiaposa (nombre d'allèles par loci est de 5) où il y a beaucoup de groupes de *Varecia variegata rubra* et il y a eu échanges de flux génique entre ces populations (Razakamaharavo, 2006). La population de Lakia possède le plus petit nombre moyen d'allèles par loci mais ce résultat n'est pas informatif à cause de l'insuffisance du nombre d'individu capturé (N=2). Dans le parc National de Ranomafana la population de Vohiparara est pauvre en nombre d'allèles par loci (3,736) comparée à la population de Talatakely (6,526) à cause son isolation et de la présence de la route qui constitue une barrière avec les autres populations, en plus auparavant cet habitat a été victime de la pratique du "tavy" diminuant l'échange de gène avec d'autres populations; l'effet de cet isolement sur le nombre moyen d'allèles par loci est trouvé dans la population d'*Indri indri* de Betampona formant un isolat dont la valeur du nombre moyen d'allèles par loci est faible (5,800) par rapport aux autres populations d'*Indri indri* qui sont la population d'Anosibe An'Ala ( $N_{allèle}=7,450$ ), la population de Mantadia ( $N_{allèle}=7,900$ ) et 8,150 la population de Zahamena ( $N_{allèle}=8,150$ ) (Zaonarivelo, 2007).

Les populations de Mariarano ( $N_{allèle}=4, 42$ ), Ankrafantsika ( $N_{allèle}=4, 526$ ) et Bemaraha ( $N_{allèle}=4, 157$ ) sont pauvres en nombre d'allèle par loci dus à l'isolement de leurs habitats respectifs.

#### **V-2-4.- LA CONSANGUINITE**

Le taux de consanguinité varie avec la relation phylogénétique des parents (Frankham *et al*, 2003), plus les parents ont un haut degré de parenté plus le taux de consanguinité des descendants est élevé; en effet si les deux parents ne sont pas liés, le taux de consanguinité est zéro, si la relation des parents est frère-sœur ou mère-fils ou père-fille, le taux de consanguinité est 0,25, si la relation entre parents est cousin-cousine, le taux de consanguinité est 0,0625 (Frankham *et al*, 2003).

Une valeur négative du coefficient de consanguinité indique un excès d'hétérozygotie ou elle peut être due au petit nombre d'individus étudiés, c'est le cas de la population de Lakia que nous n'avons capturé que deux individus et le coefficient de consanguinité  $F_{IS}$  est de -0,174). Due à l'isolement complète de son habitat et la rareté d'individus, la population de Betampona présente un coefficient de consanguinité très élevé ( $F_{IS} = 0,95$ ) ce qui exprime leur mauvaise situation dans le domaine de la consanguinité. Actuellement les populations d'Anjanaharibe-Sud et d'Anjozorobe subissent l'effet de la présence des routes sur la consanguinité qui ont respectivement un coefficient de consanguinité 0,236 et 0,26; ces routes jouent le rôle de barrière pour la rencontre de deux individus provenant de deux groupes non liés ayant pour effet d'augmenter le taux de consanguinité des descendants. Cet effet de la présence de la route est observé dans le cas d'*Indri indri* d'Anjanaharibe-Sud dont le coefficient de consanguinité est élevé ( $F_{IS} = 0,233$ ) (Zaonarivelo, 2007).

Les populations d'Andohahela, d'Andringitra, de Mantadia et de Masoala ont du coefficient de consanguinité assez bas à cause de la continuation de la forêt et elles ne subissent pas l'effet de la chasse ce qui favorisent la formation du couple provenant de deux groupes non liés. Le coefficient de consanguinité est bas chez la population de Fandriana mais la forêt est actuellement très fragmentée due à la pratique du "tavy", en conséquent ces individus tendent à être isolés ce qui favorisera la consanguinité et la diminution de la diversité génétique.

L'habitat de la population de Mantadia n'est pas menacé par la fragmentation et la population n'est pas menacée par la chasse malgré la présence de plusieurs pièges dans le parc national qui sont destinées pour *Eulemur fulvus* et *Hapalemur griseus griseus*, en effet la rencontre entre différents individus pour former un couple non lié est probable c'est que le coefficient de consanguinité est bas ( $F_{IS} = 0,069$ ).

Dans le Parc National de Masoala, le site de capture à Masiaposa est situé à proximité du centre de recherche de l'ANGAP et dans un milieu très isolé donc la population n'est pas soumise à la pression anthropique, seulement les dégâts cycloniques qui peuvent endommager l'habitat pour faire isoler la population c'est que son coefficient de consanguinité est très bas ( $F_{IS} = 0,034$ ).

La forêt de Tsinjoarivo est très fragmentée et dans plusieurs cas ils ne restent plus que des fragments au sommet des collines; les échantillons collectés proviennent de plusieurs fragments isolés et les individus ne sont pas liés. En analysant globalement la population il semble que le degré de consanguinité est très bas ( $F_{IS} = -0,012$ ) pour cette

population mais en réalité il y a consanguinité à cause de la fragmentation de la forêt qui a eu lieu depuis longtemps et les individus du couple qui peut se former ont toujours une liaison génétique et ses descendants tendent vers la consanguinité. L'effet de cette fragmentation de la forêt sur le coefficient de consanguinité est trouvé aussi sur les populations d'*Indri indri* d'Anosibe An'Ala ( $F_{IS}=0,211$ ) et d'Ambatovaky ( $F_{IS}=0,157$ ) (Zaonarivelo, 2007).

Par son comportement strictement arboricole pas comme *Propithecus* qui se déplace sur le sol en certain moment, la présence d'une route ou l'effet des dégâts cycloniques constitue une barrière entre deux populations d'*Avahi* ce qui les fait séparer qui peut emmener jusqu'à un haut degré de consanguinité, c'est le cas de la population d'Anjozorobe où la route utilisée par les exploitants constitue une barrière entre les populations de chaque côté et le coefficient de consanguinité est assez élevé ( $F_{IS}=0,26$ ) et la population d'Anjanaharibe-Sud ( $F_{IS}=0,236$ ); ce cas implique aussi la population de *Indri indri* d'Anjanaharibe-Sud dont le coefficient de consanguinité  $F_{IS}$  est de 0,233 (Zaonarivelo, 2007).

Pour les populations de Mananara-Nord et de Marotandrano, la principale menace de la population d'*Avahi* est la fragmentation de la forêt et la chasse; il nous a été dit que "même la viande de *Avahi* n'est pas délicieux comme celle de *Eulemur fulvus*, *Avahi* est chassé parce qu'il est facile à capturer par son immobilité durant le jour". En effet l'isolement et la diminution de la taille de la population impliquent sur le degré de consanguinité des populations de Mananara-Nord ( $F_{IS}=0,102$ ) et de Marotandrano ( $F_{IS}=0,104$ ).

Du à l'effet combiné de l'isolement et de la fragmentation de l'habitat dans l'Ouest de Madagascar, toutes les populations d'*Avahi* dans l'Ouest possèdent un coefficient de consanguinité assez élevé dont la population d'Ankarafantsika possède la plus haute valeur ( $F_{IS}=0,21$ ), suivie par la population de Mariarano ( $F_{IS}=0,141$ ) et enfin la population de Bemaraha ( $F_{IS}=0,133$ ).

## V-2-5.- LA DIVERSIFICATION

Les résultats nous montrent une diversification importante entre *Avahi* de l'Est et *Avahi* de l'Ouest et elle est faible entre les populations suivantes Mantadia-Anjozorobe ( $F_{ST}=0,0385$ ), Mantadia-Betampona ( $F_{ST}=0,0204$ ), Mantadia-Maromizaha ( $F_{ST}=0,0430$ ), Maromizaha- Betampona ( $F_{ST}=0,0313$ ), Zahamena-Anjozorobe ( $F_{ST}=0,0425$ ), Zahamena- Betampona ( $F_{ST}=0,035$ ) et Zahamena-Mantadia ( $F_{ST}=0,035$ ). La diversification est faible

entre ces populations à cause de l'échange de flux génique qui a eu lieu entre elles due à la continuité de la forêt. L'effet de la continuité de la forêt sur la diminution de la diversification entre deux populations est marqué sur les populations de *Indri indri*, entre les populations de Mantadia et Anjozorobe ( $F_{ST} = 0, 086$ ), entre les populations de Mantadia et Maromizaha ( $F_{ST} = 0, 055$ ), entre les populations de Zahamena et Anjozorobe ( $F_{ST} = 0, 075$ ), entre les populations de Mantadia et Zahamena ( $F_{ST} = 0, 044$ ), entre les populations de Maromizaha et Zahamena ( $F_{ST} = 0, 056$ ) (Zaonarivelo, 2007).

Pour *Avahi* de l'Est les populations de Masoala, Andohahela et Midongy du Sud possèdent chacune une grande diversification avec les autres population due à leur éloignement des autres populations. Cet effet de l'éloignement entre deux sites sur la diversification génétique a été prouvé sur l'étude de l'ours de Kermode (*Ursus americanus*) en Colombie Britannique (Marshall *et al*, 2002) où onze sites ont été étudiés, entre les populations de Yeo et de la Péninsule de Don qui sont proches l'un de l'autre  $F_{ST}$  est de 0,038, entre les populations de Yeo et Nimpkish  $F_{ST}$  est de 0,191 et entre les populations de la Péninsule de Don et Nimpkish qui sont les plus éloignés l'un de l'autre  $F_{ST}$  est de 0,203.

La diversification est grande entre la population d'*Avahi* de l'Est et la population d'*Avahi* de l'Ouest due à la séparation de ces deux groupes. La plus importante diversification est entre la population de Mariarano et la population d'Ankarafantsika ( $F_{ST} = 0,2931$ ) ce qui marque l'isolement de ces deux sites depuis longtemps empêchant l'échange de flux génique entre ces deux populations. En effet, la présence d'une barrière géographique et l'isolement d'une population augmente sa diversification avec d'autres populations comme le cas de la population de coyote en Californie du Sud où la présence d'autoroute est une barrière pour l'échange de flux génique dont la valeur de la diversification entre la population 1 et la population 2 vivant sur le même côté de l'autoroute est de 0,004 et les diversifications de ces deux populations avec la population de l'autre côté de l'autoroute sont respectivement 0,03 et 0,037 (Riley *et al*, 2006).

## V-2-6.- LE GOULOT DEMOGRAPHIQUE

Les résultats du test de goulot démographique nous indiquent une forte réduction de la taille de la population en un certain moment pour les populations de Mananara-Nord (probabilité d'excès d'hétérozygotie=0,00357), Anjozorobe (probabilité d'excès d'hétérozygotie=0, 00071), Manombo (probabilité d'excès d'hétérozygotie=0, 00004) et Midongy du Sud (probabilité d'excès d'hétérozygotie=0, 00001). Le cyclone Gretelle a endommagé en 1997 les forêts de Midongy du Sud et de Manombo ce qui ont tué beaucoup

d'animaux, ce phénomène a concerné aussi la population de *Varecia variegata variegata* de Manombo (Louis *et al*, 2005); en plus de l'effet du cyclone, les populations de Mananara-Nord et d'Anjozorobe ont subi la chasse provoquant le phénomène de goulot démographique.

L'effet du phénomène de goulot démographique sur l'hétérozygotie a été prouvé en étudiant les populations d'éléphants (*Loxodonta africana africana*) dans le parc National de Kruger et le parc National d'Addo en Afrique du Sud dont les probabilités d'excès d'hétérozygote sont respectivement 0,0098 et 0,0090 mais après une réintroduction d'éléphant provenant de Mozambique à Kruger elles deviennent les populations d'éléphants les moins consanguins en Afrique du Sud (Whitehouse *et al*, 2001). La diminution de la taille de la population présente donc un effet négatif sur la conservation de la population par diminution de l'hétérozygotie.

#### **V-2-7 TEST DE LA STRUCTURE**

L'analyse de la structure de la population permet de tester la vraisemblance des populations, dans cette étude, la population de Mariarano présente une structure due à son isolement complète; les données génétiques supportent cette structuration: une basse diversité génétique (0,65), un coefficient de consanguinité élevé ( $F_{IS}=0,141$ ), diversification génétique avec les autres populations importantes (toutes les valeurs de  $F_{ST}$  supérieures à 0,15). L'effet de cet isolement sur la structure a été aussi observé chez la population de carnivores (*Martes pennanti*) en Sierra Nevada qui est isolée de 100km des autres populations dont la diversification avec la plus proche population est de 0,45 et la diversité génétique est basse (0,52); due à cette structuration et à cette faible diversité génétique, cette population est vulnérable à l'extinction par sa faible capacité d'adaptation aux changements environnementaux (Wisely *et al*, 2004).

La dégradation et la fragmentation de l'habitat conduit à l'augmentation de l'isolement des populations régionales, résultant d'une perte de la diversité génétique (Leberg *et al*, 1994) et l'isolement des populations limite les échanges des matériels génétiques, les espèces possédant une basse diversité génétiques sont particulièrement vulnérables et les individus deviennent dans un énorme risque d'extinction due à la réduction cette diversité génétique par manque de flux génique (Pimm et Askins, 1995). En effet le taux de risque d'extinction est élevé chez les populations à faible répartition comme celle de Mariarano par perte d' hétérozygosité due à la diminution du nombre d'individu et à la consanguinité; cette baisse de l'hétérozygosité (réduction des allèles due à la perte de la

variabilité génétique) diminue la capacité d'adaptation au changement écologique, la résistance aux maladies et la capacité de se reproduire (Jiménez et al, 1994) jusqu'au risque d'extinction d'où la conservation de l'habitat pour une population est très importante.

Ainsi la génétique de conservation nous permet d'établir des données utilisables pour estimer des solutions aux problèmes des populations ou des espèces en danger par la consanguinité due à la perte de la diversité génétique et la structuration de la population.

## CONCLUSION

Les analyses de la séquence du fragment D-loop et des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup>, en utilisant la méthode du groupe le plus proche (neighbor-joining), la méthode de vraisemblance maximum (maximum likelihood) et la méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony), montrent que *Avahi* forme un groupe paraphylétique et nous permettent de découvrir deux nouvelles espèces phylogénétiques dans l'Est de Madagascar: *Avahi betsileo* (à Fandriana) et *Avahi nova species* (à Ranomafana) qui sera nommée ultérieurement. *Avahi meridionalis meridionalis* et *Avahi meridionalis ramanantsoavani* peuvent être élevées en espèces et l'existence de *Avahi cleesei* a été prouvée phylogénétiquement.

L'analyse génotypique de l'ADN nucléaire nous informe sur les valeurs des paramètres génétiques des différentes populations d'*Avahi* étudiées: l'hétérozygotie attendue varie de 0,701 à 0,836, l'hétérozygotie observée de 0,59 à 0,784, la diversité génétique de 0,605 à 0,866, le nombre moyen d'allèle par loci de 2,821 à 7,894, la richesse allélique de 2,421 à 7,894, le coefficient de consanguinité de -0,174 à 0,95, la probabilité d'excès d'hétérozygote pour le phénomène de goulot démographique de 0,00001 à 0,22228, la différenciation génétique entre deux populations de 0,0284 à 0,2931 et la population de Mariarano présente une structure.

Toutes les populations d'*Avahi* étudiées ont une hétérozygotie attendue supérieure à l'hétérozygotie observée, une faible richesse allélique et une diversité génétique assez élevée à l'exception la population de l'Ouest. La population de Betampona possède un très haut coefficient de consanguinité du à son isolation complète; les populations de Midongy du Sud et de Manombo ont subi le plus fort goulot démographique (bottleneck). La diversité génétique de chaque population est élevée mais des études restent à faire afin de déterminer l'évolution de cette diversité génétique; cette étude est encore une ligne de base à cause de l'insuffisance de recherches sur la génétique de conservation auparavant. Chaque population de l'Ouest présente une diversification importante avec les populations de l'Est due à leur isolement respectif dont la population de Mariarano est la plus isolée.

L'analyse de l'ADN nucléaire nous permet pour chaque population de conclure que:  
-La population d'Anjanaharibe-Sud présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{\text{attendue}}=0,819$ ;  $H_{\text{observée}}=0,642$ ), une haute diversité génétique (0,84), un faible nombre

moyen d'allèle par loci (5, 052), une faible richesse allélique (2, 757), un haut coefficient de consanguinité (0, 236). Cette population est n'est pas en bonne santé génétique par son haut degré de consanguinité.

-La population de Masoala présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{attendue} = 0, 757$ ;  $H_{observée} = 0, 736$ ), une haute diversité génétique (0, 763), un faible nombre moyen d'allèles par loci (3, 684), une faible richesse allélique (2, 852), un faible coefficient de consanguinité (0, 034). Malgré sa faiblesse en richesse allélique cette population est encore en bonne santé génétique par son faible degré de consanguinité et sa haute diversité génétique.

-La population de Marotandrano présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{attendue} = 0,798$ ;  $H_{observée} = 0, 721$ ), une haute diversité génétique (0, 805), un faible nombre moyen d'allèles par loci (5, 894), une faible richesse allélique (2, 997), un moyen coefficient de consanguinité (0, 104). Cette population est encore en bonne santé génétique.

-La population de Mananara-Nord présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{attendue} = 0,827$ ;  $H_{observée} = 0,747$ ), une haute diversité génétique (0, 79), un faible nombre moyen d'allèles par loci (7, 526), une faible richesse allélique (3, 132), un haut coefficient de consanguinité (0, 102). Elle a subi un goulot démographique ( $p=0, 00357$ ) mais en bonne santé à cause de son degré de consanguinité moyen.

-La population de Zahamena présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{attendue} = 0,837$ ;  $H_{observée} = 0, 692$ ), une haute diversité génétique (0, 85), un faible nombre moyen d'allèles par loci (6, 473), une faible richesse allélique (3, 172), un haut coefficient de consanguinité (0,185). Cette population n'est pas en bonne santé par son coefficient de consanguinité assez haut.

-La population de Mantadia présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{attendue} = 0, 839$ ;  $H_{observée} = 0, 784$ ), une haute diversité génétique (0, 842), un faible nombre moyen d'allèles par loci (7, 894), une faible richesse allélique (3, 179), un faible coefficient de consanguinité (0, 069). Elle a subi un goulot démographique (0, 02228) mais son habitat pas fragmenté; cette population est en en bonne santé à cause de sa haute diversité génétique et son faible coefficient de consanguinité.

-La population de Maromizaha présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{attendue} = 0,845$ ;  $H_{observée} = 0, 764$ ), une haute diversité génétique (0, 866), un faible nombre moyen d'allèles par loci (4, 947), une faible richesse allélique (3, 096), un moyen coefficient de consanguinité (0, 104). Cette population est encore en bonne santé génétique par sa haute diversité génétique et son degré de consanguinité moyen.

-La population de Betampona présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{attendue} = 0,818$ ;

$H_{\text{observée}}=0,668$ ), une haute diversité génétique (0, 83), un faible nombre moyen d'allèles par loci (6, 473), une faible richesse allélique (3, 098), un haut coefficient de consanguinité (0, 95). Cette population est très en danger génétique par sa pauvreté en allèle et son degré de consanguinité très haut.

-La population d'Anjozorobe présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{\text{attendue}}=0,836$ ;  $H_{\text{observée}}=0,632$ ), une haute diversité génétique (0, 837), un faible nombre moyen d'allèles par loci (4, 684), une faible richesse allélique (3, 17), un haut coefficient de consanguinité (0,26). Elle a subi un goulot démographique (0, 00071) et n'est pas en bonne santé génétique à cause de son degré de consanguinité assez haut.

-La population de Tsinjoarivo présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{\text{attendue}}=0,768$ ;  $H_{\text{observée}}=0,759$ ), une haute diversité génétique (0, 759), un faible nombre moyen d'allèles par loci (4, 578), une faible richesse allélique (2, 845), un faible coefficient de consanguinité (-0, 012). Cette population n'est pas en bonne santé génétique à cause de la fragmentation de son habitat malgré son faible coefficient de consanguinité.

-La population de Fandriana présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{\text{attendue}}=0,784$ ;  $H_{\text{observée}}=0,715$ ), une moyenne diversité génétique (0, 752), un faible nombre moyen d'allèles par loci (4, 631), une faible richesse allélique (2, 906), un faible coefficient de consanguinité (0, 049). Cette population est en bonne santé génétique mais menacée par la fragmentation de son habitat.

-La population de Ranomafana présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{\text{attendue}}=0,812$ ;  $H_{\text{observée}}=0,73$ ), une haute diversité génétique (0, 824), un faible nombre moyen d'allèles par loci (6, 526), une faible richesse allélique (3, 095), un moyen coefficient de consanguinité (0, 108). Cette population est encore en bonne santé génétique.

-La population de Vohiparara présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{\text{attendue}}=0,807$ ;  $H_{\text{observée}}=0,721$ ), une moyenne diversité génétique (0, 737), un faible nombre moyen d'allèles par loci (3, 736), une faible richesse allélique (2, 926), un haut coefficient de consanguinité (0, 128). Cette population n'est pas en bonne santé génétique.

-La population de Tolongoina présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{\text{attendue}}=0,798$ ;  $H_{\text{observée}}=0,721$ ), une haute diversité génétique (0, 813), un faible nombre moyen d'allèles par loci (5, 684), une faible richesse allélique (3, 021), un moyen coefficient de consanguinité (0, 113). Cette population est en bonne santé génétique.

-La population d'Andringitra présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{\text{attendue}}=0,782$ ;  $H_{\text{observée}}=0,717$ ), une haute diversité génétique (0, 788), un faible nombre moyen d'allèle par loci (5, 56), une faible richesse allélique (2, 944), un faible coefficient de consanguinité

(0,095). Cette population est en bonne santé génétique par son faible degré de consanguinité.

-La population de Manombo présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{attendue}=0,782$ ;  $H_{observée}=0,66$ ), une haute diversité génétique (0, 787), un faible nombre moyen d'allèles par loci (6, 421), une faible richesse allélique (2, 961), un haut coefficient de consanguinité (0,163). Elle a subi un goulot démographique (0, 00004) et n'est pas en bonne santé génétique par son degré de consanguinité assez haut.

-La population de Midongy du Sud présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{attendue}=0,773$ ;  $H_{observée}=0,691$ ), une haute diversité génétique (0, 78), un faible nombre moyen d'allèles par loci (5, 421), une faible richesse allélique (2, 916), un haut coefficient de consanguinité (0, 113). Elle a subi un goulot démographique (0, 00001) mais en bonne santé génétique.

-La population d'Andohahela présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{attendue}=0,746$ ;  $H_{observée}=0,705$ ), une moyenne diversité génétique (0, 749), un faible nombre moyen d'allèles par loci (5, 526), une faible richesse allélique (2, 794), un faible coefficient de consanguinité (0,059). Cette population est encore en bonne santé génétique par son faible degré de consanguinité.

-La population de Mariarano présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{attendue}=0,78$ ;  $H_{observée}=0,59$ ), une basse diversité génétique (0, 65), un faible nombre moyen d'allèles par loci (4, 42), une faible richesse allélique (2, 507), un haut coefficient de consanguinité (0,141). Cette population n'est pas en bonne santé génétique.

-La population d'Ankarafantsika présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{attendue}=0,701$ ;  $H_{observée}=0,563$ ), une basse diversité génétique (0, 676), un faible nombre moyen d'allèles par loci (4, 526), une faible richesse allélique (2, 581), un haut coefficient de consanguinité (0, 21). Cette population n'est pas en bonne santé génétique.

-La population de Bemaraha présente une tendance vers la consanguinité ( $H_{attendue}=0,761$ ;  $H_{observée}=0,67$ ), une faible diversité génétique (0, 692), un faible nombre moyen d'allèles par loci (4, 157), une faible richesse allélique (2, 663), un haut coefficient de consanguinité (0, 133). Cette population n'est pas en bonne santé génétique.

Ces valeurs ne nous permettent pas de donner des informations sur l'évolution de la santé génétique des différentes populations d'*Avahi* à cause du manque de références sur la génétique de population des lémuriens et c'est encore une ligne de base pour l'étude de la dynamique de population et de prendre des mesures vis-à-vis de la situation génétique d'une population afin d'éviter le risque d'extinction par manque de flux génique. Pour évaluer

l'évolution de la santé génétique des populations d'*Avahi*, des captures d'individus dans les mêmes sites devront être faites ultérieurement et les analyses génotypiques devront être réalisées avec utilisation des mêmes marqueurs génétiques que nous avons utilisé au cours de notre étude.

## **Recommandations**

-La loi interdit la population en dehors de l'organisme gérant la forêt d'y faire des activités comme la coupe, la chasse sans autorisation alors qu'une partie des besoins quotidiens des populations riveraines dépend de la forêt; la principale solution de ces problèmes c'est la prise de mesures d'accompagnement pour remplacer ses besoins dépendant de la forêt comme le bois de chauffage, le bois de construction, la chasse, la pratique du "tavy" pour culture vivrière. En plus des populations riveraines, les exploitants forestiers devront être aussi contrôlés strictement.

-Le deuxième problème sur la conservation est l'effet de la fragmentation qui diminue l'échange de flux génique entre les populations. Des reforestations devront être faites pour connecter les différents fragments afin d'assurer d'une façon permanente les échanges de flux géniques entre populations pour maintenir une haute diversité génétique des populations, telles sont les cas des forêts de Lakia, de Tolongoina et d'Anaborano (dans laquelle est trouvée *Avahi unicolor*).

-Des reforestations devront être faites dans les différents corridors, qui sont tous actuellement menacés par la pratique du "tavy", pour qu'il y aura échange de flux géniques entre les différentes populations lémuriennes pour maintenir la haute diversité génétique.

-Pour la forêt de Fandriana la seule solution pour la protéger c'est de la transformer en aire protégée à cause de la fragmentation de plus en plus poussée de cette forêt.

-La forêt classée de Tsingy de Bemaraha est très fragmentée en plusieurs lambeaux de forêt, afin de sauvegarder la diversité génétique de *Avahi* des translocations d'*Avahi* dans quelques fragments devront être réalisées pour qu'il y aura échange de flux génique entre populations.

-Des réintroductions devront être faites dans les sites dont la population possède un haut degré de consanguinité afin de diminuer le taux de consanguinité des descendants. Telle est la population de Betampona ayant un taux de consanguinité très élevé, afin de diminuer le taux de consanguinité de cette population la solution c'est d'y réintroduire des populations d'*Avahi laniger* provenant d'autres sites.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1- Albignac, R. (1981). Variabilité dans l'organisation territoriale et l'écologie de *Avahi laniger* (Lémurien nocturne de Madagascar). *Compte Rendu Académie Science Paris* 292 série III: 331-334.
- 2- An J., Sommer J. A., Shore G. D., Williamson J. E., Brenneman R. A., Edward L. E. J. (2004). Characterization of 20 microsatellite marker loci in the West Indian rock iguana (*Cyclura nubila*). *Conservation Genetics* 5: 121-125.
- 3- Anderson, B., Bankier, A.T., Barrel, B.G., de Brujin, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R., Young, I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-464.
- 4- Andriaholinirina, V.N. (2006). *Contribution à la révision systématique de deux genres d'Indriidae (Avahi, Jourdan 1834 et Propithecus, Bennet 1832) de la côte Est de Madagascar*. Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.
- 5- Andriantompohavana R., Randriamanana J.C., Sommer J.A., Brenneman, Edward E.L.J. (2004). Characterization of 22 microsatellite loci developed from the genome of the Wooly lemur (*Avahi laniger*). In *Molecular Ecology*, 4: 400-403.
- 6- Andriantompohavana, R., J.R.Zaonarivelo, S.E. Engberg, R. Randriamampionona, S.M. McGuire, G.D. Shore, R. Rakotonomenjanahary, R.A. Brenneman, and E.E. Louis. 2006. Mouse Lemur of Northern Madagascar with a Description of a New Species at Lokobe Special Reserve. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University* 259:I +1-24..
- 7- Andriantompohavana, R., J.R. Zaonarivelo, Randriamampionona, R., Razafindraibe, J.F.X., R.A., Brenneman, Louis, E.E. (2006). A preliminary study on resident lemur populations in the Mariarano Classified Forest. *Lemur News* 11: 21-24.
- 8- Avise, J., C. (1994). *Molecular Markers. Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York..
- 9- Avise, J.C., Hamrick, J.L. (1996). *Conservation genetics-Case Histories from Nature*. New York, Chapman, Hall.
- 10- Bandelt, H-J., Forster, P. and Rohl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16: 37-48.

- 11- Cavalli-Sforza, L.L. and Edwards, A.W.F. (1967). Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *Evolution* **32**: 550-570.
- 12- Centre d'Echange d'Information de Madagascar (2003). La diversité biologique de Madagascar. Programme National d'Actions Environnementales. Données disponibles sur <http://www.madatours.com/biodiversite/bioaquatique2.htm>
- 13- Cornuet JM and Luikart G (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*. **144**: 2001-2014.
- 14- Cornuet JM, Piry S, Luikart G, Estoup A and Solignac M.(1999). New methods employing multi-locus genotypes to select and exclude populations as origins of individuals. *Genetics*. **153**: 1989-2000.
- 15- Davis, J.I. and Nixon, K.C. (1992). Population, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Systematic Biology*. **41**: 421-435.
- 16- Dieringer, D. and Schötterer, C. (2003). Microsatellite analyzer (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* **3**: 167-169.
- 17- Eldridge, M.D.B, King J.M., Loupis A.K., Spencer P.B.S., Taylor A.C., Hall G.P., 1999. Unprecedented low levels of genetic variation and inbreeding depression in an island population of the black-footed rock-wallaby. *Conservation Biology* **13**: 531-541.
- 18- Estoup A., Tailliez C., Cornuet J.M., Solignac M. (1995) Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Molecular Biology and Evolution*, **12**: 1074-1084.
- 19- Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611-2620.
- 20- Farris, J.S.(1982). Outgroup parsimony. *Systematic Zoology* **31**: 328-334.
- 21- Felsenstein J., (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**:368-376.
- 22- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An Approach using the bootstrap. *Evolution*, **39 (4)**: 783-791.
- 23- Forster, P., Torroni, A., C. Renfrew and Rohl, A. (2001). Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 1864-1881.

- 24- Franckham R. (1997). Do island populations have lower genetic variation than mainland populations? *Heredity* **78**: 311-327.
- 25- Franckham R. (1998). Inbreeding and Extinction: island populations. *Conservation Biology* **12**: 665-675.
- 26- Frankham R., Balou J. D., Briscoe D. A. (2003). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, 3<sup>rd</sup> edition, 566 pages.
- 27- Garbutt, N. (1999). *Mammals of Madagascar*. Yale University Press. New Haven and London, 304 pages.
- 28- Goudet J. 1995. Fstat version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *J. Heredity* **86**:485-486.
- 29- Goodman, S.M. and Benstead, J.B. (2003). *The Natural History of Madagascar*. (eds) the University of Chicago Press. Chicago.
- 30- Goodman, S.M. and Patterson, B.D. (1997). *Natural change and Human impact in Madagascar*. Washington DC: Smithsonian institution Press.
- 31- Gotteli, D., Sillero-Zubri, Applebaum, G.D. (1994). Molecular Genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. *Molecular Ecology* **3**: 301-312.
- 32- Goudet J. (1995). FSTATv-1.2: A computer program to calculate F-statistics. *J. Heredity* **86**: 485-486.
- 33- Green, C., Sussmann, R.W. (1990). Deforestation history of the rain forest of Madagascar from satellite images. *Sciences* **248**: 212-215.
- 34- Hawkins, A.F.A., Chapman, P., Ganzhorn, J.U., Bloxam, Q.M.C., Barlow, S.C., and Tonge, S.J. (1990). Vertebrate conservation in Ankarana Special Reserve, northern Madagascar. *Biological Conservation* **54**: 83-110.
- 35- Hedrick, P.W. (2005). *Genetics of populations*, 3<sup>rd</sup> Edn. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA.
- 36- Heig S.M. and Avise J.C. (1996). Avian Conservation genetics. In *Conservation Genetics: Case studies from Nature* (eds. Avise J.C. and Hamrick J.L.) pp. 160-189. Chapman Hall, New York.
- 37- Helfert, M.R. and Wood, C.A. (1986). Shuttle photos show Madagascar erosion. *Geotimes* **31(3)**: 4-5.
- 38- Heywood, V.H. (1995). *Global Diversity Assessment*. (eds) Cambridge University Press.
- 39- Hillis, D.M., Mable, B.K., Larson, A., Davis, S.K. and Zimmer, E.A. (1996). Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning. In *Molecular systematics*. Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K., 2<sup>nd</sup> eds Sunderland, Massachusetts, USA

- 40-Hubby, J.L. and Throckmorton, L.H. (1965). Protein differences in *Drosophila* II. Comparative species genetics and evolutionary problems. *Genetics* **52**: 203-215.
- 41-Irwin D.M., Kocher T.D., Wilson A.C. 1991. Evolution of the Cytochrome *b* Gene of Mammals. *Journal of Molecular Evolution* **32**: 128 – 144).
- 42-Jenkins P.D. (1987). *CATALOGUE of Primates in the British Museum (National History) and elsewhere in the British Isles. Part IV: Suborder Strepsirrhini, including the subfossil Madagascan lemurs and Family Tarsiidae.* British Museum (Natural History) London.
- 43-Jiménez, J.A., Hughes, K.A., Alaks, G., Graham, L. and Lacy, R.C. (1994). An experimental study of inbreeding depression in a natural habitat. *Science* **266**: 271-273.
- 44-Jolly, A.(2003); Lemur catta, Ring-tailed Lemur, Maky. In S.M. Goodman and J.P. Benstead (eds). *The Natural History of Madagascar*, pp. 1329-1331. The University of Chicago Press. Chicago and London.
- 45-Joseph L., Moritz C., Hugall A(1995). Molecular support for vicariance as source of diversity in rain forests. *Proceeding of the Royal Society London B.* **260**, 177-182.
- 46-Kandpal, R.P., Kandpal, G., Weissman, S.M. (1994). Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-species markers. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the USA* **91**: 88-92.
- 47-Kappeler, P.M., Rasoloarison, R.M., Razafimanantsoa, L., Walter, L. and Ross, C. (2005). Morphology, Behaviour and Molecular Evolution and Giant Mouse lemur (*Mirza spp.*) GRAY, 1870,with description of a new species. *Primate Report* **71**:3-26.
- 48-Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotides sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111-120.
- 49-Kimura M and Crow JF. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* **49**: 725-738.
- 50-Kluge, A.G. and Farris, J.S. (1969). Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology* **18**: 1-32.
- 51-Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villla blanca, F.X., Wilson, A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA contribution in Mammals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **75**: 6196-6200.

- 52- Kocher, T.D., White T.J., 1989. Evolutionary analysis via PCR. In Erlich, H.A.(ed) *PCR technology. Principles and applications for DNA amplification*. Stockton Press, New York, pp 137-147.
- 53- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei (1993). *MEGA: Molecular Evolutionary genetics Analysis, Version 2.1*. Pennsylvania State University, University Park Press, Baltimore.
- 54- Lande R., Shanon S. (1996). The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing environment. *Evolution* 50:434-437.
- 55- Lawton, J.H. and May,R.M.(1995). *Extinction rates*. (eds) Oxford University Press, Oxford.
- 56- Leakey, R. and Lewin,R. (1996). *The Sixth Extinction Patterns of Life and the Future of Humankind*. Doubleday, New York.
- 57- Lelberg P.L., Stangel P.W., Hillestad H.O., Marchiton R.L., Smith M.H. (1994). Genetic structure of reintroduced wild turkey and white-tailed deer populations. *Journal of Wildlife Management*, **58**: 698-711.
- 58- Litt M., Luty J. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actine gene. *American Journal of Human Genetics*, **44**: 397-401.
- 59- Longmire, J. L., G. F. Gee, C. L. Hardekoff, and G. A. Mark. 1992. Establishing paternity in whooping cranes (*Grus americana*) by DNA analysis. *The Auk* **109**: 522-529.
- 60- Louis E.E.Jr., Coles M.S., Andriantompohavana R., Sommer J.A., Engberg S.E., Zaonarivelo J.R., Mayor M.I. and Brenneman R. (2006 a). Revision of the Mouse Lemurs (*Microcebus*) of Eastern Madagascar. *International Journal of Primatology*: 164-291.
- 61- Louis E.E.Jr., M.S. Coles, R. Andriantompohavana, J.A. Sommer, S.E. Engberg J.R. Zaonarivelo, M.I Mayor, and Brenneman R. (2006 b). Revision of the Mouse Lemurs (*Microcebus*) of Eastern Madagascar. *International Journal of Primatology* **27**: 164-291.
- 62- Louis, E.E.Jr, Engberg, S.E., Lei, R., Geng, H., Sommer, J.A., RAndriamampionona, Randriamanana, J.C.,Zaonarivelo, J.R., Andriantompohavana, R, Randria, G., Prosper, Ramaromilanto, B., Rakotoarisoa, G., Rooney, A., and R.A.Brenneman.2006. Molecular and Morphological Analyses of the Sportive Lemurs (Family Megaladapidae: Genus *Lepilemur*) Reveals 11 Previously Unrecognized Species. *Specials Publications of the Museum of Texas Tech University* **49**: 1-47.

- 63- Luikart, G. (1997). *Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks and monitoring genetic change*. Ph.D. Thesis. University of Montana, Missoula, USA.
- 64- Maddison, W.P., M.J., Donoghue, D.R., Maddison (1984). Outgroup analysis and parsimony. *Systematic Zoology* **33**: 83-103.
- 65- Maddison, W.P. and D.R., Maddison (1992). *Mac Clade: analysis of phylogeny and character evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts..
- 66- Marshall, H.D. and Ritland, K. (2002). Genetic diversity and differentiation of Kermode bear populations. *Molecular Ecology* **11**: 685-697.
- 67- May, R.M. (1992). How many species inhabit the Earth? *Sc. Am.* **267**: 42-48.
- 68- Mayor, M.I., J.A. Sommer, M.L. Houck, J.R. Zaonarivelo, P.C. Wright, C. Ingram, S.R. Engel, and E.E. Louis, Jr (2004). Specific status of *Propithecus* spp. *International Journal of Primatology* **25**: 875-900.
- 69- Mc Neely, J.A., Miller, K.R., Reid, W.V., Mittermeier, R.A., Werner, T.B. (1990). *Conserving the World's Biological Diversity*. IUCN, World Resources Institute, Conservation International, WWF-US and the World Bank, Washington DC.
- 70- Mittermeier, R.A., Konstant, W.R., Hawkins, F., Louis, E.E., Langrand, O., Ratsimbazafy H.J., Rasolosarison, R.M., Ganzhorn, J.U., Rajaobelina, S., Tattersall, I. and Meyers D.M. (2006). *Lemurs of Madagascar*. Editor, Conservation International Tropical Field Guide. Conservation International, Washington, D.C. 2<sup>nd</sup> edn.
- 71- Mittermeier, R.A., Robles, G.P., Hoffmann, M., Pilgrine, J., Brooks, T., Mittermeier, C.G., Lamoureaux, J., da Fonsceca, G.A.B., 2004. *Hot spots*.
- 72- Mittermeier, R.A., Tattersall, I. Konstant, W.R., Meyers, D., Mast, R.B. (1994). *Lemur of Madagascar*. Editor, Conservation International Tropical Field Guide. Conservation International, Washington, D.C. 1<sup>st</sup> edn.
- 73- Mitton J., 1997. *Selection in natural populations*. Oxford: Oxford University Press.
- 74- Moraga-Amador, D., Farmerie, D.A., Brazeau, D., Clark, G. (2001). *Tool for Developing Molecular markers, Interdisciplinary Center for Biotechnology Research Laboratory Manual*, pp 11-65. The University of Florida, Gainsville, FL. [http://www.biotech.ufl.edu/WorkshopsCourses/Word\\_files/Molecular%20Markers%20Manual%202001.doc](http://www.biotech.ufl.edu/WorkshopsCourses/Word_files/Molecular%20Markers%20Manual%202001.doc).
- 75- Morin, P.A., Wallis, J., Moore J. J., Woodruff D. S., (1994). Paternity exclusion in a community of wild chimpanzees using hypervariable simple sequence repeats. *Molecular Ecology* **3**: 469-478.

- 76- Moritz, C. (1994a). Application of mitochondrial DNA analysis in conservation: critical review. *Molecular Ecology* **3**: 401-411.
- 77- Moritz C. (1994b). Defining evolutionary significant units for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **9**:373-375.
- 78- Mullis, K. B and F.A., Faloona (1987). Specifics synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymology* **155**: 335-350.
- 79- Nei M. T. Maruyama R. Chakraborty (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* **29**: 1-10
- 80- Nei, M., Roychoudhury, A.K. (1974). Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* **76**:379-390. (97-98).
- 81- Nixon, K.C. and Wheeler, Q.D. (1990). An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics* **6**: 211-223.
- 82- Oosterhout, C.V., Hutchinson, W.F., Wills D. and Shipley, P (2004). Estimating genotyping error software. *Molecular Ecology Notes* **4**: 535-538.
- 83- Pastorini, J., 2000. *Molecular systematics of Lemurs*. Thèse de Doctorat Sciences Nature. Université Zurich.
- 84- Petter, J.J., R. Albignac aand Y. Rumpfer (1977). Mammifères: lémuriens (Primates prosimiens). *Faune de Madagascar N°44*. ORSTOM-CNRS, Paris.
- 85- Pimm, S.L. and Askins R.A. (1995). Forest losses predict bird extinctions in eastern North America. In *Proceedings National Academy of Science USA*. **92**: 9343-9347.
- 86- Piry S, Luikart G and Cornuet JM. (1999). BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*. **90**: 502-503.
- 87- Population Référence Bureau (2001). Données disponibles sur <http://www.prb.org/pdf/Madagascar-Eng.pdf>.
- 88- Primack, R.B. and Ratsirarson, J. (2005). *Principe de Base de la Conservation de la Biodiversité*. ESSA, CITE, The Mac Arthur Foundation (ed), Antananarivo, Madagascar.
- 89- Pritchard, J.K., Rosenborg, N.A., Weber, J.L., Cann, H.M., Kidd, K.K., Zhivostovski, L.A., Feldman, M.W. (2002). The genetic structure of human population. *Sciences* **298**: 2381-2385.
- 90- Rabarivola, C.J. (1998). *Etude génétique comparative des populations insulaires et continentales de Eulemur macaco. Utilisation simultanée des dermatoglyphes et des marqueurs sanguins et de l'ADN (RAPD) pour étudier la différenciation de Eulemur*

*macaco en deux sous-espèces: Eulemur macaco macaco et Eulemur macaco flavifrons.*  
Thèse de Doctorat d'Etat ès-Sciences Naturelles. Université d'Antananarivo, Faculté des Sciences.

- 91- Ramanamahefa, R. (2007). Dynamique de la population de deux espèces lémuriennes (*Eulemur coronatus* et *Eulemur sanfordi*) à Analamerana, Montagne d'Ambre et Ankarana. Mémoire DEA, Département de Paléontologie et d'Anthropologie Biologique, Faculté des Sciences Université d'Antananarivo.
- 92- Randria, G.F.N. (1998). Morphologie, Analyses phénétique et cladistique des LEMURIDAE (GRAY, 1821). Thèse de Doctorat d'Etat ès-Sciences naturelles. 2 tomes. Faculté des Sciences Université d'Antananarivo.
- 93- Randrianandrianina, B.N., Andriamahafaly, L.R., Harisoa, F.M. and Nicoll, M.E. (2003). The role of the Protected Areas in the management of the Island's Biodiversity. In S.M. Goodman and J.P. Benstead (Eds). *The Natural History of Madagascar*. The University of Chicago Press, Chicago.
- 94- Ravaoarimanana, B., R. Tiedemann, D. Montagnon, and Y. Rumpler (2004). Molecular and cytogenetic evidence for cryptic speciation with a rare endemic Malagasy lemur, the northern sportive lemur (*Lepilemur septentrionalis*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31:440-448.
- 95- Raxworthy, C.J. and Rakotondraparany F. (1988). Mammals report. In: *Manongarivo Special Reserve (Madagascar), 1987/1988 Expedition report*. Madagascar Environmental Research Group, U.K.
- 96- Raymond M., Rousset F. (1995). GENEPOP (version 3.1): Population genetics software for exact tests and ecumunicisms. *Journal of Heredity*, **86**: 248-249.
- 97- Razakamaharavo, R.V. (2006). Dynamique de la population de *Varecia rubra* dans deux sites du Parc National Masoala. Mémoire DEA, Département de Paléontologie et d'Anthropologie Biologique, Faculté des Sciences Université d'Antananarivo
- 98- Ride, W.D.L., Cogger, H.G., Dupuis, C., Kraus, O., Minelli, A., Thompson, F.C., Tubbs, P. K. (1999). International Code of Zoological Nomenclature (ICZN). In *The International Trust for Zoological Nomenclature 1999*.
- 99- Riley, S.P.D., Pollinger, J.P., Sauvagoy, R.M., York, E.C., Bronley, C., Fuller, T.K. and Wayne, R.K. (2006). A Southern Californian freeway is a physical and social barrier to gene flow in carnivores. *Molecular Ecology* **15**: 1733-1741.
- 100- Robert, D.B. and Robert, J.B. (2001). A test of the genetic species concept: cytochrome b sequences and Mammals. *Journal of Mammalogy* **82**(4): 960-973.

- 101- Rosen,D. (1979). Fishes from the uplands and termontane basins of Guatemala: revisionary studies and comparative geography. *Bulletin of American Museum of Natural History* **162**: 267-376.
- 102- Rowe, N. (1996). *The pictural guide to the living Primates*. Pogonial Press East Hampton, New York, USA.
- 103- Rumpler, Y., Warter, SQ., Rabarivola C., Petter, J.J., and Dutrillaux, B., 1990. Chromosomal evolution in Malagasy Lemurs: X. Chromosomal banding study of *Avahi laniger occidentalis* (syn: *Lichenotus laniger occidentalis*) and cytogenetic data in favour of its classification in a species a part. *Avahi occidentalis*. *American Journal of Primatology* **21**:307-316.
- 104- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R.H., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1985). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Sciences* **239**: 487-491.
- 105- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **6**: 406-425.
- 106- Sambrook K.J., Fritsh E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> edition, Cold Springs Harbor Laboratory Press, New York.
- 107- Schneider, S., Roessli, D. and Excofier, L. (2000). *Arlequin: a software for population genetics data analysis. Version 2.000*. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland.
- 108- Smith R.J. and Jungers W.L. (1997). Body mass in comparative Primatology. *Journal of Human Evolution* **32**: 523-559.
- 109- Sterling, E., Mc Fadden, K. (2000). Rapid census of lemur populations in the Parc National de Marojejy, Madagascar. Pp 265-274 in: S.M. Goodman (eds), *A Flora and Fauna Inventory of the Parc National de Marojejy, Madagascar: With Reference to Elevational Variation*. *Fieldiana: Zoology*, New Series 97.
- 110- Swofford, D.L. (2001). PAUP\*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods)*. Version 4.0b5. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- 111- Taberlet P, Waits LP, Luikart G, 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *TREE*. **14**:323-327.
- 112- Tallmon, D.A., Draheim, H.M., Millis, L. and Allendorf, F.W. (2002). Insights into recently fragmented vole populations from combined genetic and demographic data. *Molecular Ecology* **11**: 699-709.

- 113- Tamura, K. and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzee. *Molecular Biology and Evolution* **10**:512-526.
- 114- Tautz D. (1989). *Hypervariability* of a simple sequences as a general source polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research*, **17**, 6463-6471.
- 115- Templeton, A.R., Read, B. (1994). Inbreeding-Oneword, several meanings, much confusion. In Løeschke V., Tomiuk J., Jain (eds): *Conservation Genetics*: Basel, Birkhäuser pp 91-105.
- 116- Thalmann, U. (2003). Avahi, Woolly lemur, Fotsy-fe, Ampongy, Tsarafangitra, Dadintsifaky. *Mammals Systematic*, 1340-1342.
- 117- Thalmann, U. and Geissmann, T. (2000). Distribution and geographic variation in the western woolly lemur (*Avahi occidentalis*) with description of a new species (*Avahi unicolor*). *International Journal of Primatology* **21**(6):915-941.
- 118- Thalmann, U. and Geissmann, T. (2005). New Species of Woolly Lemur *Avahi* (Primates: Lemuriformes) in Bemaraha ( Central Western Madagascar). *American Journal Of Primatology* **67**: 371-376.
- 119- Thalmann, U. and Rakotoarison, N. (1994). Distribution of lemurs in central western Madagascar, with a regional distribution hypothesis. *Folia Primatologica* **63**: 156-161.
- 120- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997). The ClustalX-Windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**: 4876-4882.
- 121- Tilman, D., Ray, R. M., Lehman, C.L., Nowak, M.A. (1994). Habitat destruction and the extinct debt. *Nature* **371**: 65-66.
- 109- Triantafyllidis, A., Abatzopoulos, T.J., leonardos, J. Guyomard, R. (2002). Microsatellite analysis of the genetic population structure of native and translocated Aristotle's catfish (*Silurus aristotelis*). *Aquatic Living Ressources* **15**: 351-359.
- 121- U.S. Fishes and Wildlife Service (1973). *US Endangered Species Act*. FWS-F-037
- 122- Wahlund, S. (1928). Composition of populations from the perspective of the theory of heredity. *Hereditas* **11**: 65-105.
- 123- Watrous, L.E., Whealer, Q.D. (1981). The outgroup comparison method of character analysis. *Systematic Zoology* **30**: 1-11.

- 124- Weber, J., May, P.E., 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Human Genetic* **44**: 388-39.
- 125- Wheeler, Q.D. and Platnick, N.I. (2000). The phylogenetic Species Concept. In Wheeler, Q.D. and R. Meier (eds): *Species concepts and phylogenetic theory*: **55-69**. Columbia University Press, New York.
- 126- Whitehouse, A.M. and harley, E.H. (2001). Postbottleneck genetic diversity of elephant population in South Africa, reveal using microsatellite analysis. *Mol. Ecol.* **10**: 2139-2149.
- 127- Wiley, E.O., Siegel-Causey, D., Brooks, D.R. and Funk, V.A. (1991). The compleat Cladist. A primer of phylogenetic procedures. *Special publication N°19 The University of Kansas Museum of Natural History*.
- 128- Wilson, O. (1981). *Phylogenetics: the theory and practice of phylogenetic systematics*. Wiley Interscience, New York.
- 129- Wright S, 1969. *Evolution and the genetics of populations*. Vol. 2. The theory of gene frequencies. University of Chicago Press.
- 130- Wyner, Y.M., Amato, G. and De Salle, R. (1999). Captive breeding, reintroduction, and the conservation genetics of black and white ruffed lemurs, *Varecia variegata variegata*. *Molecular Ecology* **8**: S107-S115.
- 131- Xu X., Arnason U. (1997). The complete mitochondrial DNA sequence of the white rhinoceros, *Ceratotherium simum*, and comparison with the mtDNA sequence of the Indian rhinoceros, *Rhinoceros unicornis*. *Molecular Phylogenetic and Evolution* **7**: 189-194.
- 132- Yoder, A.D. (2003). Phylogeny of the Lemurs. In S.M. Goodman and Benstead J.P. (eds). *The Natural History of Madagascar*, pp. **1242-1247**. The University of Chicago Press, Chicago and London. 2003.
- 133- Zaonarivelo, J.R. (2007). *Revision systematique et dynamique de population du genre Indri indri* (Gmelin, 1788). Thèse de Doctorat-ès-Sciences, Faculté des Sciences Université d'Antananarivo, Madagascar.
- 134- Zaramody, A., Fausser, J-L., Roos, C., Zinner, D., Andriaholinirina, N., Rabarivola, C., Norscia, I., Tattersal, I. and Rumpler, Y. (2006). Molecular phylogeny and taxonomic revision of the eastern woolly lemurs (*Avahi laniger*). *Primate Report* **74**: 9-23.

## ANNEXES

### I.- AMPLIFICATION DE l'ADN: amplification de la chaîne par polymérisation ou (ACP)

Le but de l'amplification de la chaîne par polymérisation est de produire une multitude de double brin d'ADN copiée à partir d'une région particulière de gène. Pour amplifier l'ADN par l'amplification de la chaîne par polymérisation, il est nécessaire d'utiliser une enzyme thermostable ADN polymérase (Mullis et Falloona, 1987). L'amorce s'attache à un seul brin d'ADN et crée un brin complémentaire. L'enzyme utilisée est extraite d'une bactérie vivante dans du geyser qui peut vivre jusqu'à 110°C. Cette bactérie est endémique aux sources thermales naturelles du Parc National de Yellowstone et s'appelle *Thermus aquaticus*, l'enzyme est appelée *Taq* polymérase. La méthodologie de l'amplification de la chaîne par polymérisation (ACP) suit le mécanisme intracellulaire lors de la réplication de l'ADN; actuellement l'amplification de la chaîne par polymérisation est réalisée dans la machine programmée "Thermocycler" ou "Biometra Model UNOII Thermocycler (Biometra, Inc, Tampm, FL)".

#### Les différentes étapes de l'amplification de la chaîne par polymérisation

(Figure 27, page 138)

L'amplification de la chaîne par polymérisation est une méthode biologique moléculaire pour amplifier (créer des copies multiples) un segment d'ADN in vitro dans un mélange contenant les quatre bases d'ADN (A, T, C, G) et deux fragments d'ADN appelés amorces qui seront respectivement fixés à un bout du brin principal. L'amorce est une mixture d'oligonucléotides utilisés dans la réaction pour initialiser la synthèse d'ADN et qui sont complémentaires aux deux simples brins; elle est usuellement formée de 20 à 30 nucléotides.

L'amplification comprend 3 phases principales:

- la dénaturation
- l'appariement
- l'extension

La région cible est amplifiée selon la méthode d'amplification de la chaîne par polymérisation en utilisant deux amorces qui agissent séparément dans deux sens contraires avec utilisation de la *Taq* polymérase qui sera liée avec du dNTP; le sens de la synthèse est toujours (5'→3') avec 5' et 3' sont respectivement les numéros de l'atome du carbone des

sucres de l'ADN. Au cours de la réaction, un contrôle négatif c'est-à-dire un tube sans ADN mais avec tous les autres réactifs est toujours utilisé pour servir de témoin qu'il n'y a pas de contamination au cours de la préparation du mélange (**tableau 15, page 137**).

### **I.1.- Dénaturation**

Sous l'action de la chaleur les liaisons hydrogènes entre les deux brins sont brisées et ils se forment deux simples brins d'ADN; cette haute température arrête aussi toute réaction enzymatique. Généralement cette phase de dénaturation est à 96°C pendant 30 s et elle est précédée d'une phase de prédénaturation durant 1 mn.

### **I.2.- Appariement**

L'amorce se fixe sur l'extrémité de chaque brin de l'ADN. Sous l'action de la *Taq* polymérase et un excès de dNTPs, les oligonucléotides qui s'apparentent spécifiquement à la séquence cible peuvent initier la synthèse de nouveau ADN. La température d'appariement varie d'une amorce à un autre.

### **I.3.-Extension (élongation)**

Pendant cette phase la synthèse de brin complémentaire s'accomplice. Cette phase est activée par l'enzyme thermostable (*Taq* polymérase) et se déroule à 72°C pendant 45s. A la fin de l'extension, tout produit d'amplification par polymérisation obtenu subit une nouvelle dénaturation et 34 cycles se déroulent durant la réaction. Au bout de ces 34 cycles, la température se stabilise à 72°C pendant 10 mn et à la fin de toute réaction la température se stabilise automatiquement à 4°C pour arrêter toute action enzymatique.

**Tableau 14:** Produits utilisés pour l'amplification de la chaîne par polymérisation

PRODUITS UTILISES	VOLUME
d <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O	19,2µl
0,5M KCl tampon Taq	2,5µl
25mM MgCl <sub>2</sub>	1,5µl
dNTP	0,2µl
Amorce F	0,2µl
Amorce R	0,2µl
<i>Taq</i> polymérase	0,2µl
ADN (50ng/µl)	1µl
<b>TOTAL</b>	<b>25µl</b>

**Tableau 15:** Produits utilisés pour le contrôle négatif

PRODUITS UTILISES	VOLUME
d <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O	19,2µl
0,5M KCl tampon Taq	2,5µl
25mM MgCl <sub>2</sub>	1,5µl
dNTP	0,2µl
Amorce F	0,2µl
Amorce R	0,2µl
<i>Taq</i> polymérase	0,2µl
<b>TOTAL</b>	<b>24µl</b>

**Tableau 16:** Les différentes étapes de l'amplification de la chaîne par polymérisation

CYCLE	TEMPERATURE	DUREE
1-Prédénaturation	96°C	1mn
2-Dénaturation	96°C	30s
3-Appariement*	X°C	45s
4-Extension**	72°C	45s
5-Elongation complémentaire	72°C	10mn
	4°C	illimitée

\*La température est spécifique de chaque amorce

\*\* Les produits obtenus subiront une nouvelle dénaturation pendant 34 cycles

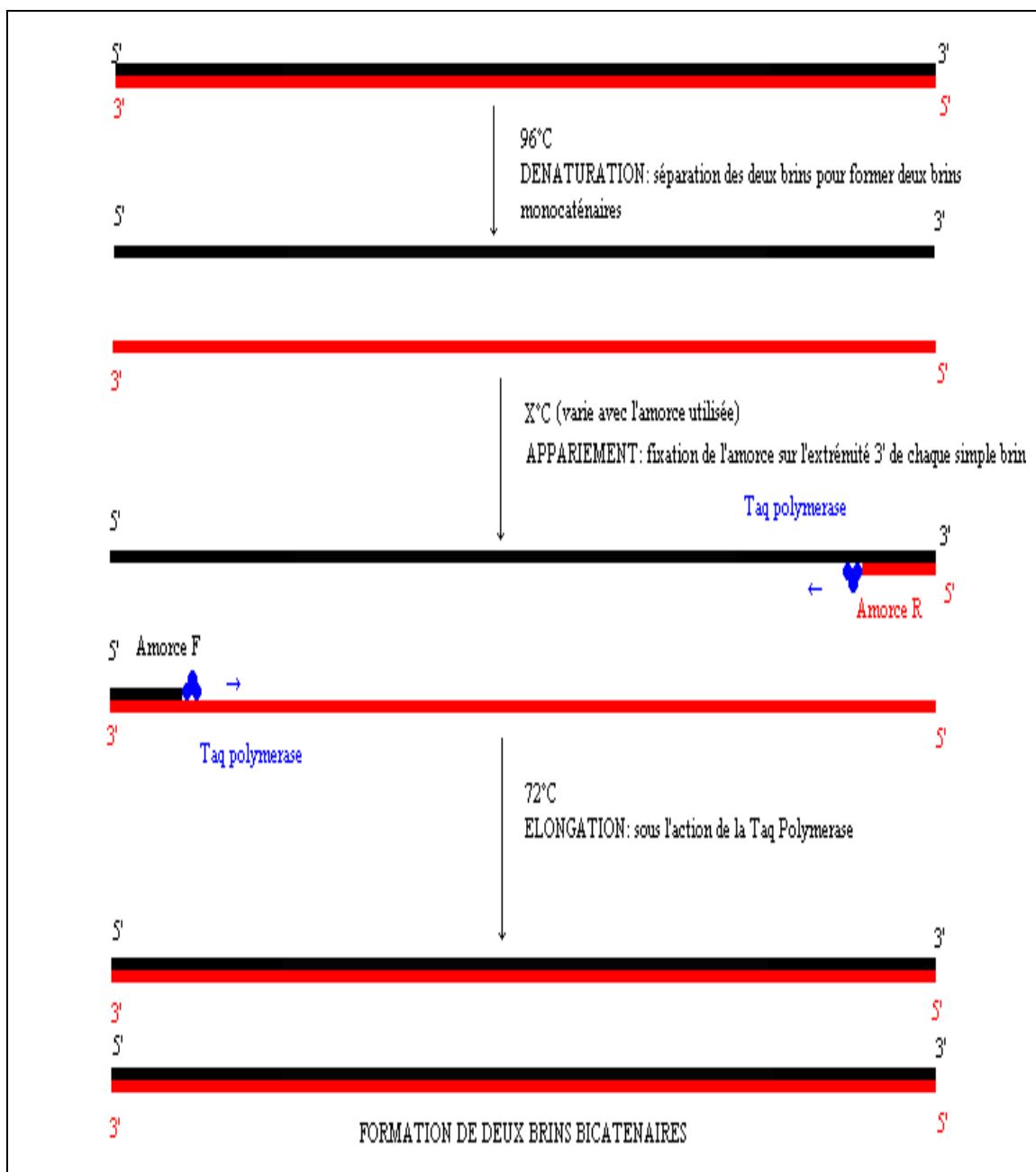


Figure 27: Les différentes étapes de l'amplification de la chaîne par polymérisation

Deux nouvelles chaînes d'ADN formée chacune d'un brin bicaténaire identiques à l'ADN initial sont synthétisées et vont subir une nouvelle dénaturation. 35 cycles auront lieu dans la machine et à partir d'un brin d'ADN une multitude de modèle d'ADN est obtenue (pour 30 cycles,  $10^9$  copies d'ADN sont synthétisées).

## **II.- ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE**

### **II-1.- Principe de la migration électrophorétique des fragments d'ADN**

Cette technique permet de séparer les molécules en fonction de leur taille et de leur charge en utilisant un courant électrique. Lorsqu' une molécule est placée dans un champ électrique, elle migre vers l'anode ou vers la cathode suivant sa charge électrique; l'acide nucléique est chargé négativement du à son squelette phosphate donc migre vers l'anode. Plus le fragment a une taille élevée, moins la migration électrophorétique sera importante, à l'opposé, les fragments de petite taille auront une distance de migration plus élevée. L'ADN a été analysé et purifié dans un gel d'agarose et sa détection sur ce gel a été réalisée par exposition aux rayons UV après réaction avec un réactif spécifique comme le bromure d'éthidium qui est un agent intercalant entre les brins d'ADN.

L'agarose est un polysaccharide extrait d'une algue marine et elle a été utilisée avec une concentration de 0,5 à 2%. Cette poudre a été mélangée avec une solution tampon 10X TAE (Tris- acétate éthylène diamine tétracétate) permettant une bonne séparation des larges fragments. Il est préférable d'utiliser le gel d'agarose parce qu'il est facile à préparer, permet de parcourir verticalement et horizontalement et il n'est pas toxique pas comme le polyacrylamide.

### **II-2.- Préparation du minigel d'agarose**

Nous avons pesé 0,6 g d'agarose et nous l'avons mis dans un erlenmeyer.

Nous avons ajouté 50 ml de solution tampon TAE.

Nous les avons cuit à la microonde 2x30 secondes jusqu'à ce qu'il n'y avait pas de bulles.

Nous l'avons versé dans la cuve à électrophorèse avec un peigne à l'une des extrémités.

Nous l'avons laissé refroidir.

### **II-3.- Chargement des échantillons et électrophorèse**

Lorsque le gel a été refroidi, nous avons enlevé le peigne laissant des trous sur le gel solidifié.

Au premier trou, nous avons ajouté 5 µl d'ADN λ (bleu de bromophénol).

Nous avons ajouté 5 µl d'échantillon dans chaque trou correspondant.

Nous avons versé 500 ml de tampon TAE dans la cuve pour immerger le gel. TAE est la meilleure solution tampon et permet une bonne séparation des larges fragments.

Nous avons branché les électrodes à la source électrique.

Nous avons attendu 30 minutes pour que l'électrophorèse se soit déroulé

## **II-4.- Photographie de l'ADN**

Nous avons utilisé des gants pour se protéger contre le bromure d'éthidium qui est un produit cancérigène.

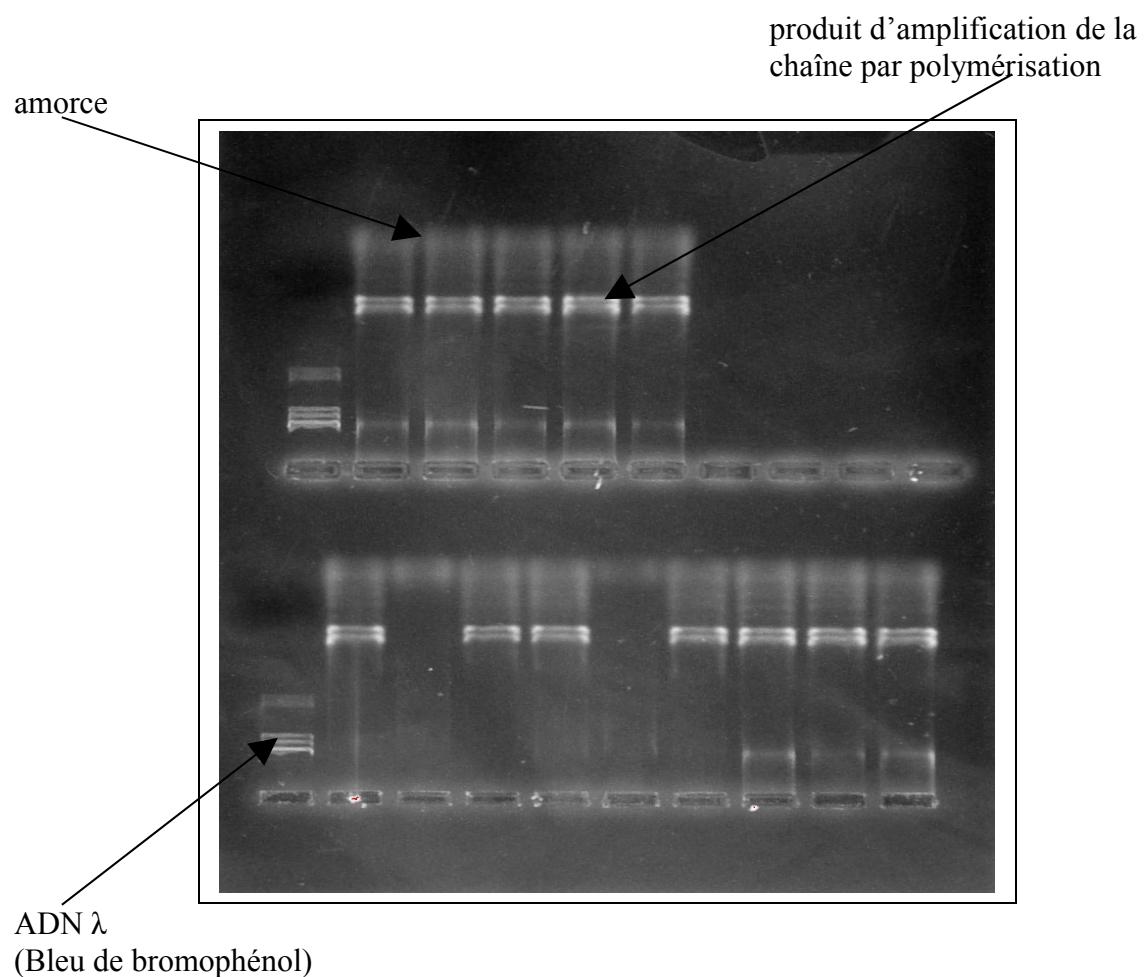
Nous avons enlevé le gel de la cuve à électrophorèse et nous l'avons mis dans une autre cuve.

Nous avons versé du bromure d'éthidium dans la cuve et nous l'avons immergé pendant 1 minute.

Nous avons enlevé le gel et nous l'avons lavé avec de l'eau du robinet.

Nous avons agité le gel dans de l'eau sur un agitateur pendant 15 à 30 minutes dans une chambre noire.

Pour le photographier avec l'appareil NEW KODAK IDE36 SYSTEM exposé au rayon ultraviolet, nous avons mis le gel dans la chambre noire de la caméra. Cette photo a été transférée à un ordinateur; l'ADN d'un individu a été visible sous-forme de bande blanche (**Figure 28, page 141**) mais si la réaction ne s'était pas bien déroulée au cours de l'amplification de la chaîne par polymérisation, seule la bande de l'amorce a été visible sur la photo.



**Figure 28:** Produits d'amplification de la chaîne par polymérisation après électrophorèse sur gel d'agarose

La bande blanche la plus nette représente le produit d'amplification de la chaîne par polymérisation et la bande blanche la moins nette, plus loin du trou de départ, est l'amorce; elle migre plus loin parce qu'elle a une plus petite taille que le produit d'amplification de la chaîne par polymérisation. Le trou situé à gauche contient de l'ADN standard qui est du bleu de bromophénol (ADN  $\lambda$ ).

### III.- SEQUENCAGE DE L'ADN MITOCHONDRIAL

#### III-1.- Amplification de la chaîne par polymérisation

Nous avons suivi le même processus que dans l'**annexe II, page 135**

##### III-1-1.- pour le fragment D-loop

Nous avons utilisé comme amores DLPavahi11F, DLPavahi11R, AWESTMT3F et AWESTMT3R dont la température d'appariement est de 47°C.

-DLPavahi11F agit à partir de l'extrémité 5' d'un brin et sa séquence est

TAT GWA TGG GGA RAG GC

-DLPavahi11R agit à partir de l'extrémité 5' de l'autre brin et sa séquence est

CGC CTT TCC CCA TTC ATA

-AWESTMT3F agit à l'intérieur d'un brin dans le sens 3' et sa séquence est

CGA ACC GAA TGT GCT TTG

-AWESTMT3R agit à l'intérieur de l'autre brin dans le sens 3' et sa séquence est

CGC CTT TCC CCA TTC ATA

**R** peut être A ou G

**W** peut être A ou T

La synthèse des séquences obtenues en utilisant ces quatre amores constitue la séquence du fragment D-loop d'un individu.

**Tableau 17: Réactifs utilisés lors de l'amplification de la chaîne par polymérisation du fragment D-loop**

PRODUITS	VOLUME
d <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O	19,2µl
0,5M KCl tampon Taq	0,2µl
25mM MgCl <sub>2</sub>	0,2µl
dNTP	0,2µl
DLP F	2,5µl
DLP R	1,5µl
Taq Polymérase	0,2µl
ADN (50ng/µl)	1µl
<b>TOTAL</b>	<b>25µl</b>

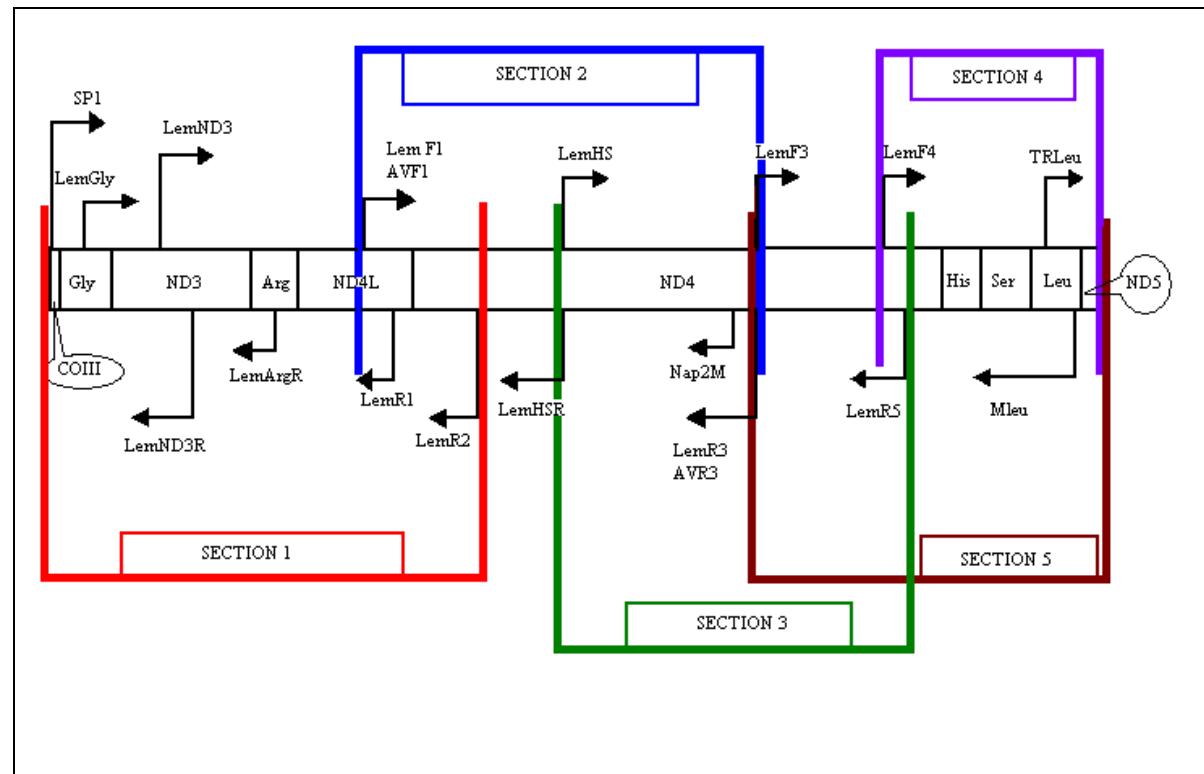
### **III-1-2.- Pour les fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup>**

Ces fragments sont constitués par un fragment du gène COIII, une séquence complète du fragment NADH-déshydrogénase sous-unité 3, 4L, 4 (ND3, ND4L, ND4), le fragment ARN-t<sup>GLY</sup>, le fragment ARN-t<sup>ARG</sup>, le fragment ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup>. L'étude de ce fragment a été divisée en 5 sections (Pastorini, 2000) (**Figure 29, page 144**):

- section 1 formée par COIII, GLY, ND3, ARG, ND4L, ND4
- section 2 formée par ND4, ND4L
- section 3 formée par d'une partie de ND4
- section 4 formée par une portion de ND4, HIS, SER, LEU, ND5
- section 5 formée par une partie de ND4, HIS, SER, LEU

Nous avons utilisé les amores publiées par Pastorini (**tableau 18, page 145**) dont chaque amorce agit à un site bien précis. Lors de la réaction d'amplification de la chaîne par polymérisation les amores utilisées diffèrent d'une section à une autre et la température d'appariement est 50°C.

- Section 1: nous avons utilisé comme amores SP1 et LemR2
- Section 2: nous avons utilisé comme amores AVF1 et AVR3
- Section 3: nous avons utilisé comme amores LemHS et LemRS
- Section 4: nous avons utilisé comme amores LemF4 et Mleu
- Section 5: nous avons utilisé comme amores LemF3 et Mleu



**Figure 29:** Fragments étudiés par Pastorini: COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> (Pastorini, 2000)

**Tableau 18:** Séquence des amorces de Pastorini (Pastorini, 2000)

AMORCE	SEQUENCE
AvF1	CTT CTA GTA TTC GCA GCG TG
AVR3	AGT GAC TTT AAA TCT GTC TGT CG
LEMND3R	TTA GAT TAT TTG TTT GGG TCG C
LEMARGR	GTT AGT CAT AAT CTA ATG AGT C
LEMF1	CTC CTA GTC TTC GCR GCC TG
LEMF3	ATC TGC CTA CGA CAA ACA GAC CTA AAA TC
LEMF4	GTA ACT ATA ACA TCC TT <del>Y</del> TCA TGA TC
LEMGLY	TTG ACT TCC AAT CAA TTA ACT TCG G
LEMHS	GGT AAC CAA ACA GAA CGA TTA AAC GC
LEMHSR	CCT GCG TTT AGT CGT TCT GT <del>Y</del> TG
LEMND3	CCC TTT TCC ATA AAA TTT TT <del>Y</del> CTA GTA GC
LEMND3R	TAT AAG TTT TAG GTT AGT TGT TTG GGA TGC
LEMR1	GCT AGG CCT ACA GCT GCT TCG CGA GCT AA
LEMR2	GTG ATG TTG GCT WGC TAT AAT
LEMR3	AGT GAT TTT AGR TCT GTT TGT CG
LEMR5	ATG GTA TGT GAG TTT TCC TCG TTG TG
MLeu	TAC TTT TAT TTG GAG TTG CAC CA
Nap2M	TTA GCT TCA ACG TGG GCT TT
SP1	GAA GCT GCA GTC TGA TAC TGA CAT TT
TRleu	ATA TTT ACC TCA ACA CAA CGA GG
PROND3	CCA TTC TCT ATA AAA TTC TTC CTG GTA GC

-R peut être A ou G

-Y peut être C ou

-W peut être A ou

T

T

## **\*Section 1**

- amorce aller
  - SP1 a débuté à partir de COIII
  - LemGly a débuté au milieu de GLY
  - Lem ND3 et ProND3: a débuté au milieu de ND3
  - AVF1 et LemF1: a débuté au milieu de ND3
- amorce reverse
  - LemR2 a débuté à partir d'une portion de ND4
  - LemR1 a débuté au niveau de ND4L
  - LemArg a débuté au milieu d'ARG
  - LemND3R a débuté au milieu de ND3

## **\*Section 2**

- amorce aller
  - LemF1 ou AVF1: a débuté au milieu de ND3
  - LemHS a débuté au milieu de ND4
- amorce reverse
  - LemR3 ou AVR3 a débuté au milieu de ND4
  - Nap2M a débuté à une certaine distance qu'a débuté AVR3
  - LemHSR a débuté au milieu de ND4
  - LemR2 a débuté à une certaine distance de l'extrémité de ND4

## **\*Section 3**

- amorce aller
  - LemHS: comme dans la section 2 mais la séquence obtenue est plus longue
- LemF3 a débuté sur ND4
- amorce reverse
  - LemR5 a débuté à la dernière partie de la section 3, sur ND4
  - LemR3 ou AVR3: comme dans la section 2 mais la séquence est plus courte

## **\*Section 4**

- amorce aller
  - LemF4 a débuté sur ND4, à l'extrémité de cette section
  - TRLeu a débuté sur LEU et la séquence obtenue est jusqu'à ND5

-amorce reverse

-MLEu a débuté à l'extrémité de LEU

### **\*Section 5**

-amorce aller

-Lem F3: comme dans la section 3 mais la séquence obtenue est plus longue

-LemF4: comme dans la section 4

-TRLeu: comme dans la section 4

-amorce reverse

-MLEu: comme dans la section 4 mais la séquence obtenue est plus longue

-LemR5: comme dans la section 3 mais la séquence obtenue est plus courte.

## **III-2.- Electrophorèse sur gel d'agarose (annexeII, page 139)**

### **III-3.- Purification des produits par QIAGEN®**

Pour chaque produit d'amplification de la chaîne par polymérisation, nous avons utilisé un tube à filtre du kit QIAGEN® muni d'un autre tube pour recueillir le liquide filtré.

Nous avons ajouté 125µl de tampon PB dans le tube filtre à du kit QIAGEN® et à l'aide d'une micropipette, nous avons enlevé le produit d'amplification de la chaîne par polymérisation et nous l'avons transféré dans le tube QIAGEN®. Nous avons centrifugé les tubes pendant 1 minute avec une vitesse de rotation de 13 000 tours par minute, l'ADN a été retenu par le filtre. Nous avons enlevé le filtrat transféré dans le tube inférieur de réception.

Nous avons ajouté 750µl de tampon PE précédemment mixé avec éthanol dans le tube filtre QIAGEN® et nous l'avons centrifugé pendant 1 minute avec une vitesse de rotation de 13 000 tours par minute; nous avons enlevé le liquide dans le tube inférieur. Une deuxième fois, nous l'avons centrifugé avec la même vitesse pour dégager totalement l'éthanol et le tampon PE.

Nous avons remplacé le tube inférieur de réception par un tube de microcentrifuge 1,5ml et nous avons ajouté 50µl de d<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O dans le tube à filtre du kit QIAGEN® et nous l'avons centrifugé avec une vitesse de rotation de 13 000 tours par minute pendant 1 minute. L'ADN purifié a été dissout dans le d<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O et a été transféré dans le tube de microcentrifuge. Ce produit purifié était le produit final utilisé à la réaction de cycle de séquençage.



### III-4.- Réaction de cycle de séquençage

Le but de cette étape est d'obtenir des fragments des longueurs différentes et marqués avec des fluorescences à l'extrémité. La réaction de cycle de séquençage est basée sur la terminaison en chaîne de didéoxynucléotide en utilisant la réaction en polymérase linéaire pour amplifier un brin d'ADN étiqueté qui est complémentaire à l'ADN cible. Une molécule d'amorce appropriée est fixée à simple brin d'ADN complémentaire en présence de déoxynucléotide triphosphate (dNTPs) et de didéoxynucléotide triphosphate (ddNTPs) la synthèse d'ADN est catalysée par l'enzyme thermostable *Taq* polymérase. La dénaturation du double brin d'ADN permet la fixation d'une amorce étiquetée à un simple brin. Le cycle se répète plusieurs fois. Des fragments radioactifs dans les 4 éléments sont séparés par électrophorèse sur gel polyacrylamide et visualisés par autoradiographie.

Une aliquote de l'ADN amplifié et purifié sera réamplifié selon la technique ACP en utilisant le mélange "Terminator Ready Reaction Mix" ou "Big Dye Terminator®", fourni par la compagnie "Roche-Perkin Elmer". Ce mélange contient l'enzyme *Taq* polymérase, la solution tampon pour l'action de l'enzyme, les ions magnésium, les quatre désoxynucléotides et les quatre didéoxynucléotides marqués différemment. Les deux chaînes doivent être séparées avant le séquençage pour que le séquenceur automatique puisse lire la séquence correctement.

Comme amorce, nous avons utilisé pour chaque individu en premier lieu l'amorce F, en deuxième l'amorce R, en troisième lieu l'amorce interne F et enfin l'amorce interne R.

**Tableau 19:** Réactifs utilisés lors de la réaction du cycle de séquençage

REACTIFS	VOLUME
d <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O	6,5µl
Tampon de Big Dye	2,5µl
Amorce F ou R	0,5µl
Big Dye	1,0µl
Produit QIAGEN®	0,5µl
<b>TOTAL</b>	11µl

Au cours de la cour de la manipulation, chaque tube a été placé dans de la glace parce que le fluorescent "Big Dye Terminator®", ne fonctionne pas à haute température. Nous avons utilisé un tube contenant un contrôle négatif c'est-à-dire sans produit QIAGEN®

pour vérifier si la réaction est contaminée par d'autre ADN ou pas. La réaction de cycle de séquençage s'est déroulée suivant le programme "Cycle Sequencing" de la machine Thermocycler.

La prédénaturation s'est fait pendant 1 minute à 96°C, la dénaturation proprement dite à 96°C pendant 45 secondes, l'appariement 45 secondes et l'extension à 65°C pendant 3 minutes. Après l'extension, le produit obtenu a subi une nouvelle dénaturation. Au total, 24 cycles se sont déroulés dans la machine Thermocycler. A la fin de toutes réactions, la température se stabilisait à 4°C pour arrêter toute action enzymatique.

**Tableau 20:** Les différentes étapes de la réaction du cycle de séquençage

CYCLE	TEMPERATURE	DUREE
1-Prédénaturation	96°C	1mn
2-Dénaturation	96°C	45s
3-Appariement*	X°C	45s
4-Extension**	65°C	3mn
	4°C	illimitée

\*la température varie avec le fragment amplifié.

Pour le fragment D-Loop, la température d'appariement est 47°C et pour les fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup>, cette température est 50°C.

\*\*Les produits obtenus subiront une nouvelle dénaturation pendant 24 cycles

### **III-5.- Purification des produits par du Sephadex G-50**

Nous avons utilisé deux méthodes:

- purification manuelle
- purification utilisant du plat avec 96 tubes

#### **III-5-1.- Préparation du sephadex G-50:**

Nous avons pesé 2,5 g de sephadex G-50 et nous l'avons mis dans un tube Falcon®, nous avons ajouté de l'eau stérile en ajustant le tout à 40 ml. Nous avons agité le tube et nous n'avons pas pu utiliser ce sephadex G-50 qu'après un jour.

#### **III-5-2.- Purification manuelle**

Nous l'avons utilisé si nous avons peu d'échantillon à purifier

Nous avons agité rigoureusement le sephadex G-50

Nous avons mis 400  $\mu$ l de sephadex G-50 dans un tube "CENTRISEP Columns" (Princeton Separations, Inc.)

Nous l'avons centrifugé avec une vitesse de rotation de 3 000 tours par minute pendant 3 minutes.

Nous avons mis le tube avec filtre dans un tube pour microcentrifuge de 1, 5 ml.

Nous avons transféré l'échantillon qui a subi la réaction de cycle de séquençage au milieu du sephadex G-50.

Nous l'avons centrifugé avec une vitesse de rotation de 3 000 tours par minute pendant 3 minutes; tout l'échantillon s'est transféré dans le tube 1, 5 ml et nous l'avons séché à la machine Speed Vac. Cet échantillon séché a été stocké dans le congélateur jusqu'à ce que nous l'ayons traité à l'ABI PRISM SEQUENCER.

### **III-5-3.- Purification avec machine**

Nous avons utilisé cette méthode pour plusieurs produits à purifier. Nous avons utilisé du plat à 96 tubes avec du filtre; à chaque trou correspond l'ADN d'un individu. Le plat a été associé avec un autre plat de réception pour recevoir l'eau après centrifugation

Nous avons ajouté 400  $\mu$ l de sephadex G-50 dans chaque trou

Nous avons centrifugé le plat dans la machine SORVALL avec une vitesse de rotation 1840 tours par minute pendant 3 minutes

Pour transférer l'échantillon correspondant à chaque individu dans chaque trou; nous avons utilisé du plat ABI Sequencing pour recevoir les échantillons du plat de type ABI Sequencing avec 96 tubes.

Nous avons mis l'échantillon de chaque individu au milieu du sephadex G-50 dans chaque tube.

Nous l'avons centrifugé avec la machine SORVALL avec une vitesse de rotation 1840 tours par minute pendant 3 minutes.

Nous avons séché l'échantillon à sec dans la machine Refrigerated Vapor Trap RTV 400. Une fois séché, nous avons recouvert le plat avec un bouchon plat en caoutchouc et nous l'avons conservé dans un congélateur de -20°C jusqu'à ce que nous ayons traité ces échantillons à l'ABI PRISM SEQUENCER.

## **III-6.- Lecture sur la machine AUTOMATED 3100 SEQUENCER**

### **III-6-1.- Chargement à l'AUTOMATED 3100 SEQUENCER**

Le cycle de séquençage est performé en utilisant de l'ABI Prism Big Dye Terminator Ready Reaction-kit contenant de l'Ampli Taq ® DNA Polymerase. La solution Ready Reaction a été diluée 1:1 avec une solution 5X tampon de sulfate d'ammonium (ASB) pour faire une "demi réaction". Une solution 10X ASB contient 200mM de Tris-HCl pH 8,8, 15mM de MgCl<sub>2</sub>, 100mM de KCl. Pour chaque demi réaction (8µl) est ajoutée 4 pico moles d'amorce (4µl) et 8µl de produit de PCR avec 5% de DMSO. Les réactions ont été dénaturées à 95°C pendant 5mn. Le cycle commence avec la dénaturation à 95°C pour 15 secondes, appariement à 55°C pour 15 secondes et extension pour 3 minutes à 60°C; le cycle se répète au total 100 fois dans l'appareil Biometra Model UNOII Thermocycler (Biometra, Inc, Tampm, FL). Les réactions ont été purifiées à la résine Sephadex G-25 par centrifugation pour enlever le fluorescent Terminator Big Dye qui n'entre pas dans la réaction. Les réactions ont été séchées à sec par centrifugation et elles ont été reconstituées dans une solution tampon formamide/TrisEDTA avec une proportion 4:1, dénaturées pendant 3mn et placées dans de la glace. Les échantillons ont été chargés dans du gel obtenu par un mélange de 5% d'acrylamide et 6M d'urée. L'électrophorèse a été faite pendant 10 heures à 51°C dans l'ABI PRISM MODEL 377 Automated DNA Sequencer (PE Biosystems, Foster City, CA) équipée d'un ordinateur Macintosh G<sub>3</sub> Power PC avec ABI PRISM 377-96 Collection Software (version 2.5) et Sequencing Analysis Software (version 3:3).

### **III-6-2.- Préparation du gel pour électrophorèse**

Pour préparer un gel de 4mm d'épaisseur, 60 ml de solution contenant 30g d'urée ont été bouillis avec une quantité variable d'acrylamide (7,5ml pour un gel de 5%), 6ml de tampon TBE, 300 µl d'APS 10% et 33 µl de "temed". La totalité de cette solution a été introduite entre les deux lames de verre (500mm x 300mm) par l'intermédiaire d'une seringue en évitant les bulles d'air. Après avoir monté le gel en solution, le peigne de gel ou espacer a été immédiatement placé à l'extrémité supérieure du gel (du côté de la largeur du gel). Cet espacer engendrera 36 encoches sur le gel après solidification. Après deux heures le gel se solidifiait, l'espacer a été enlevé et les encoches ont été visibles à l'œil nu. Le gel solide entre les deux lames a été monté verticalement sur la machine dans une solution tampon pour l'électrophorèse, avec les encoches en haut, encore vide. L'ensemble a été

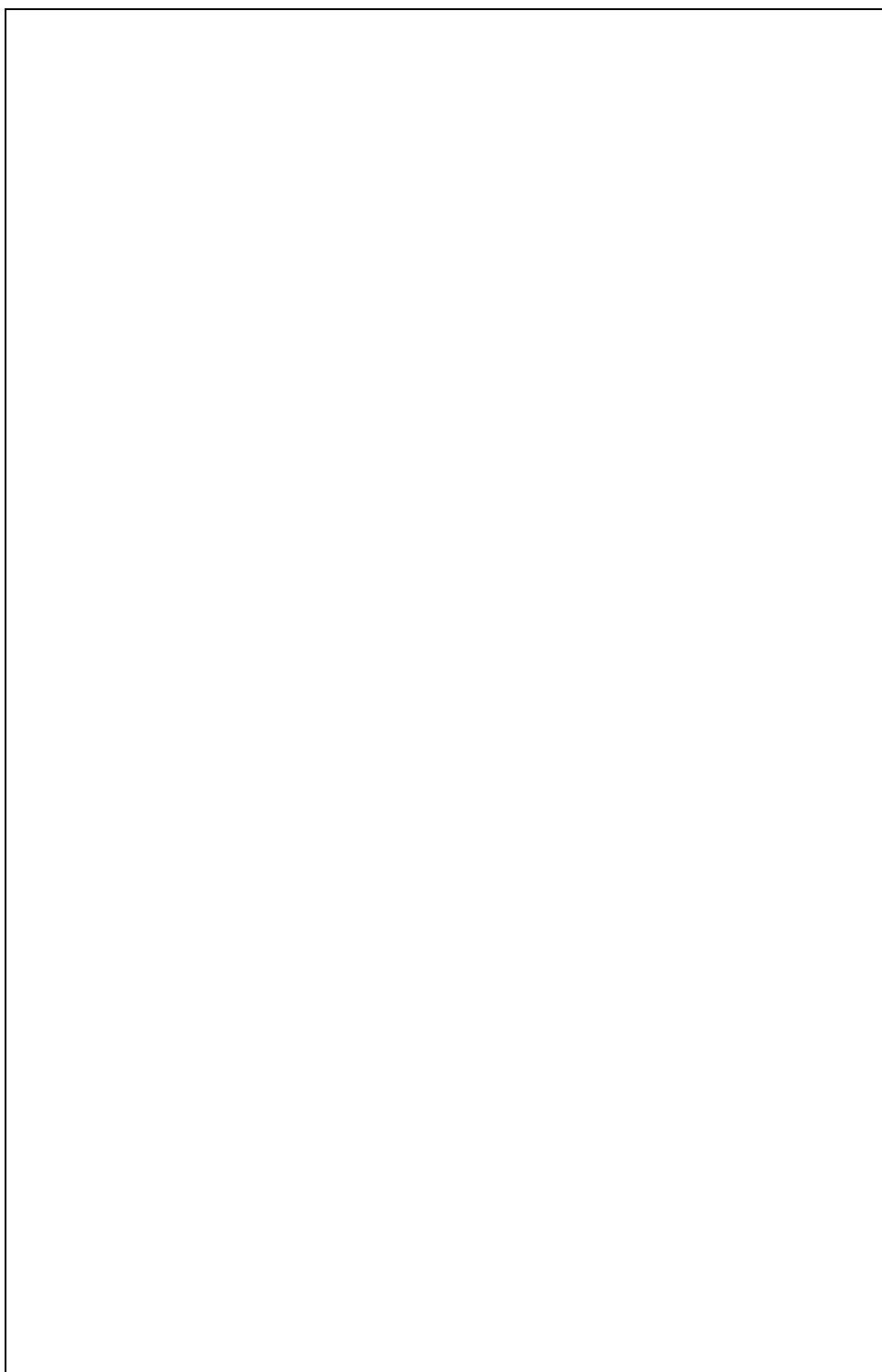
branché sous tension pendant 5 minutes pour pré-marcher les appareils et pour éviter les erreurs avant de déposer les produits à séquencer.

### **III-6-3.- Préparation du produit à analyser et déroulement de l'électrophorèse**

L'ensemble a été chauffé à 94°C pour couper toutes les liaisons hydrogènes afin d'empêcher les conformations secondaires et tertiaires comme les repliements en U des chaînes. Le mélange a été déposé dans une encoche du gel (un mélange par encoche) à l'aide d'une micropipette. La machine a été reliée à un ordinateur utilisant le logiciel Genescan Analysis. La liste des échantillons (en précisant l'identification et l'amorce utilisé pour chaque échantillon), ainsi que leur ordre sur le gel ont été enregistrés dans la fenêtre "feuille d'échantillon" de ce logiciel. L'électrophorèse s'est fait à 51°C pendant 8 heures sous tension de 1680volts et 21.9mA avec la machine ABI-377. La puissance du laser a été fixée à 40mW. Après cette période, la machine s'est arrêtée automatiquement et tous les résultats ont été enregistrés dans l'ordinateur sur la fenêtre "résultat". L'analyseur du séquenceur a détecté le type de fluorescence sur le gel. Cette fluorescence a été affichée sous-forme de courbe d'électrophérogramme qui a été traduite directement en une séquence par le logiciel avec des couleurs caractéristiques dont la coloration verte représente **A**, la coloration bleue **C**, la coloration noire **G** et la coloration rouge **T** (**figure 30, page 153**)

### **III-6-4.- Alignement des séquences**

Les séquences des fragments ont été alignées pour engendrer une séquence de consensus en utilisant le Sequencher (Gene Corp: Ann Arbor, MI) et par Clustal X (Thompson *et al.* 1997). Le bon alignement des séquences a permis la construction de l'arbre phylogénique et de déterminer les liens entre deux organismes. Les séquences obtenues ont été entrées dans le programme PAUP 4.0 ou "Phylogenetic Analysis Using Parsimony" (Swofford, 2001). En comparant des séquences d'ADN, il a été possible de créer un arbre phylogénétique qui a montré le degré de parenté entre des individus ou des populations.



**Figure 30:** Séquence d'acide nucléique

## IV.- METHODE UTILISEE POUR AVOIR UNE AMORCE

### IV-1.- Clonage

Un clone correspond à un grand nombre de molécule ou de cellules identiques provenant d'un seul ancêtre. Le clonage nucléique consiste à l'insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur dont le vecteur le plus utilisé est du plasmide. Ce vecteur est introduit dans une bactérie pour pouvoir se répliquer.

Pour répliquer l'ADN lors du développement du microsatellite, nous avons utilisé le plasmide de l'université de Californie (pUC19) qui possède un gène de résistance à l'ampicilline donc il n'est pas sensible à l'effet de cet antibiotique. Il possède une séquence particulière appelée "MCS (Multicloning Site)" qui est un site d'ouverture par les enzymes de restriction et au niveau duquel va être inséré l'ADN à répliquer pour former un ADN recombinant. Il possède un gène appelé Lac Z qui code pour la  $\beta$ -galactosidase dans l'opéron lactose. Il possède une région appelée "polylinker" qui a pour rôle de permettre l'insertion d'ADN étranger. L'insertion de fragment d'ADN étranger dans le pUC19 aboutit à l'inactivation du gène qui code pour la  $\beta$ -galactosidase. Pour vérifier la présence ou non de l'activité enzymatique  $\beta$ -galactosidase, nous utilisons du X-galactose dont la couleur passe de l'incoloré au bleu lorsqu'il est clivé par la  $\beta$ -galactosidase. Pour pouvoir métaboliser du X-Gal, la cellule doit être exposée à un inducteur qui est l'IPTG (isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside). En culture, et, en présence d'IPTG et de X-Gal, les bactéries résistantes à l'ampicilline et transformées par les plasmides recombinants se présentent sous forme de colonies blanchâtre car elles perdent leur capacité de clivage de l'équivalent coloré du lactose (le X-Gal) par la  $\beta$ -galactosidase. Par contre, les bactéries résistantes à l'ampicilline mais non transformées par les plasmides recombinants se présentent sous-forme de colonies bleues et ne sont pas nécessaires. Les colonies blanchâtres seront piquées une à une manuellement ou par le Biorobot. Pour détecter les microsatellites, l'ADN dans les colonies blanchâtres vont être traitées à l'amplification de la chaîne par polymérisation et au séquençage. Nous utilisons comme amorce M13F et M13R lors du séquençage. Après le séquençage, le microsatellite est facilement repérable par son motif répété sur l'électrophorégramme (**figure 31, page 156**).

#### Préparation des plasmides

Les bactéries avec plasmides sont mises en culture. Elles sont traitées avec de l'antibiotique comme l'ampicilline ce qui empêche leur croissance sans affecter la

réPLICATION DES PLASMIDES lorsque la concentration bactérienne est suffisante. La culture est centrifugée pour récupérer les bactéries et les plasmides seront purifiés par chromatographie. L'insertion d'une séquence d'ADN dans un plasmide nécessite un traitement préalable par une enzyme de restriction qui coupe le plasmide à un site spécifique dans la séquence plasmique. Après l'action de l'enzyme de restriction (l'enzyme de restriction *EcoRI* qui coupe entre A et G d'une séquence GAATTC) et le plasmide circulaire est linéarisé. Pour maintenir la linéarisation, il est indispensable de traiter le plasmide linéaire par une phosphatase alcaline qui enlève les groupements phosphates en 5'. Le plasmide linéarisé et traité par la phosphatase alcaline est ajouté au fragment d'ADN déjà traité avec le même type d'enzyme de restriction en présence d'une ligase et on obtient le plasmide recombinant. Ce plasmide sera incorporé dans une bactérie (*Escherichia coli*) qui sera transformée. Si la bactérie est tuée, il n'y a pas de transformation mais si la bactérie n'est pas tuée, il y a transformation bactérienne par le plasmide; après avoir été amplifié à l'amplification de la chaîne par polymérisation, l'ADN sera séquencé en utilisant l'amorce M13.

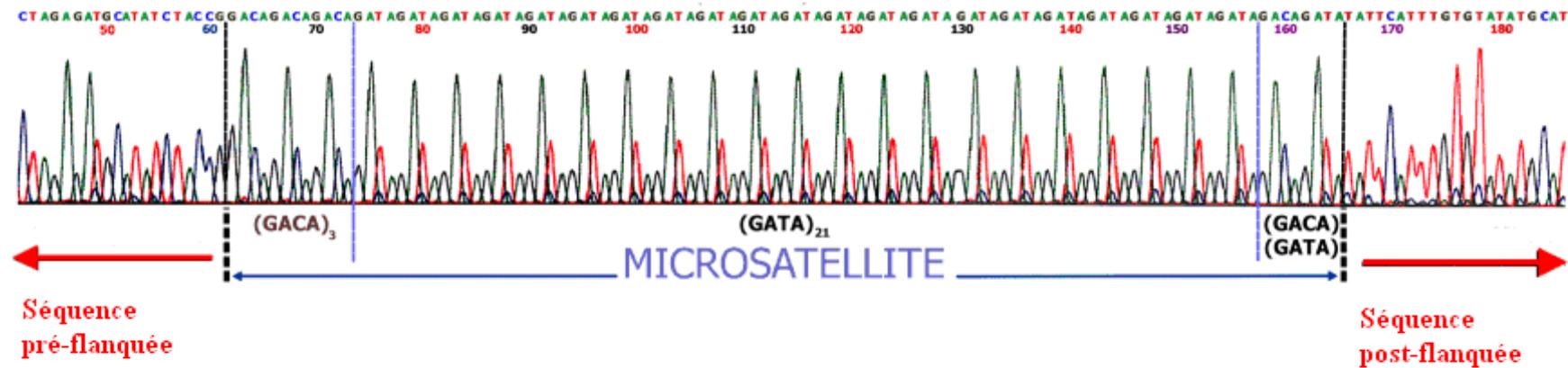
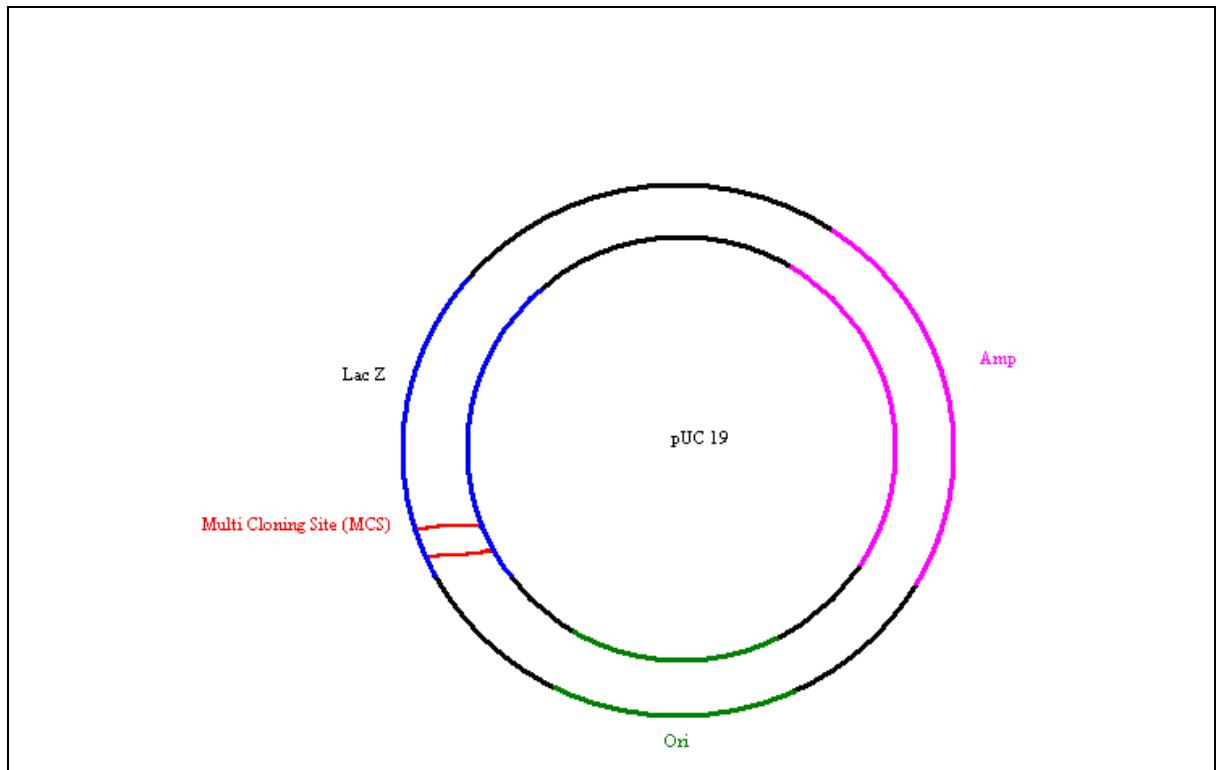
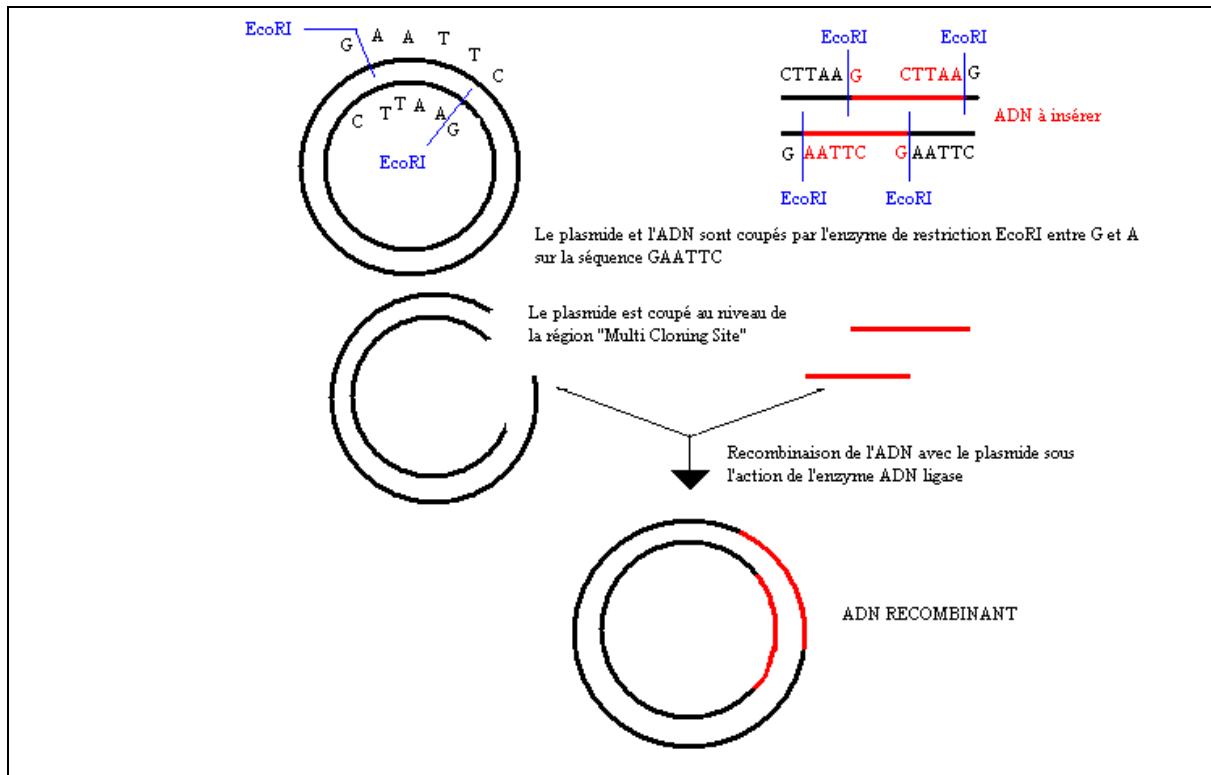


Figure 31: Eléctrophérogramme du microsatellite



**Figure 32:** PUC 19 (plasmide de l'université de Californie)



**Figure 33:** Insertion d'ADN dans le plasmide

## IV-2.- Séquençage

La méthode utilisée pour développer des microsatellite spécifiques est basée sur la méthode de Moraga-Amador *et al.* (2001) qui est une modification de la méthode de Kandpal *et al.* (1994).

-Nous avons extracté de l'ADN génomique à partir du tissu d'*Avahi laniger* capturé dans le Parc National Ranomafana.

-Nous avons digéré cet ADN génomique par l'enzyme de restriction *Sau3AI* à 37°C.

-Pour vérifier si cette enzyme de restriction agit, nous avons amplifié l'ADN génomique digéré par électrophorèse sur 0,08% d'agarose.

-Pour connaître la taille de chaque fragment d'ADN, nous avons utilisé du "Chroma Spinn Columns (Clontech Laboratories, Chroma Spin+ TE-400).

-Les amorces *SAULA* 5'-GCGGTACCCGGGAAGCTTGG-3' et *SAULB* 5'-GATCCAAGCTTCCGGGTACCGC-3' en présence de NaCl crée un double brin attacheur avec une séquence GATC à l'extrémité sous l'action de l'enzyme de restriction *Sau3AI*. L'attacheur a été fixé à l'ADN pour déterminer le site d'initiation de l'ACP.

CCTA ↑ GATCTTCAGCCCATTGCTGATGGCTAGCTAACGTCACAACTAG ↑ TTC  
*Sau3AI* *Sau3AI*

-7,5µl d' attacheur fixé à l'ADN a été amplifié avec une seule amorce *SAUL* dans 50µl de réaction suivant les phases suivantes:

\*dénaturation à 94°C pendant 3mn qui est suivi de 25 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1mn

\*appariement à 68°C pendant 1mn

\*extension à 72°C pendant 2mn

\*extension finale à 72°C pendant 10mn

Les concentrations des réactifs utilisés sont 1xBiolase Taq Buffer, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de chaque dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,5 µM d'amorce *SaulA* ou *SaulB*, 1 unité de Biolase Taq Polymerase (Bioline).

-L'ADN génomique digéré par *Sau3AI* a été dénaturé à 98°C pendant 10mn puis refroidi dans de la glace pendant 2mn.

-L'ADN génomique dénaturé a été hybridisée avec 0,5ng de "biotinylated oligoprobe" (5'-(CA)<sub>15</sub>TATAAGATA-Biotine) dans 0,5mM de phosphate de sodium, pH7,4, 1% de BSA dont le volume total est 38 µl à 48°C pendant une nuit.

-A la fin de l'hybridization, la mixture a été mixée avec une préparation de matrice de Vectrex Avidin D pendant 30mn à 37°C la sonde biotynilée.

-Le produit a été amplifié par la méthode d'amplification de la chaîne par polymérisation (ACP).

-L'ADN lié a été transformé dans la bactérie *Escherichia coli*

-Les clones positives ont été sélectionnés avec du "Quick-light Hybridization Kit" par "Lifecodes Corporation (Stamford, CT)".

-Après que les clones positives ont été identifiés, l'ADN a été isolé du plasmide (Hillis *et al*, 1996) et séquencé en utilisant M13F et M13R pour vérifier la présence ou non de microsatellite. La séquence de l'amorce aller (F) et celle de l'amorce retour (R) sont obtenues sur la séquence avant et après le microsatellite (séquence préflanquée et séquence postflanquée). Cette séquence de l'amorce utilisée pour le génotypage a été obtenue en utilisant les programmes Mac Vector 6.5.3 (Molecular Group, Campbell, CA) et l'OSP (Oligo Selection Programm) [National Biosciences, Inc, Plymouth MN] à partir des régions flanquées de la séquence de l'ADN.

### IV-3.- Test de la température

Il s'agit d'un test pour connaître la température à laquelle une amorce se fixe sur le simple brin d'ADN pendant laquelle la synthèse va se faire. En effet, le processus est le même que pour l'amplification de la chaîne par polymérisation (**annexe II, page 135**) mais nous avons travaillé avec différentes températures avec les mêmes individus.

Nous avons choisi 4 individus pour faire le test de la température en suivant les processus de l'amplification de la chaîne par polymérisation avec une concentration d'ADN de 50ng/µl. Nous avons testé de 48°C à 60°C tous les 2°C en utilisant la machine "Biometra" ou "MBS Thermocycler". Après que l'amplification de la chaîne par polymérisation a été terminée, le produit a été amplifié par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2% (**annexe II, page 139**). La température choisie comme température d'appariement a été celle qui présente la plus nette bande d'ADN sur le gel.

Pour détecter et connaître la taille des fragments des produits d'amplification de la chaîne par polymérisation sur la machine l'ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER, une des

deux amores (F ou R) doit être étiquetée avec un groupe de colorant fluorescent. Une fois que cette température a été déterminée, une amplification de la chaîne par polymérisation a été faite dont l'amorce avec fluorescent a été utilisée pour vérifier si le fluorescent est compatible avec cette température. Si l'amorce avec fluorescent agit à cette température, c'est la température d'appariement utilisée lors de la réaction d'amplification de la chaîne par polymérisation utilisée pour le génotypage.

#### **IV-4.- Test de polymorphisme**

Lorsque la température d'appariement a été connue le marqueur génétique a été testé s'il est polymorphe ou non. Nous avons choisi l'ADN de 10 individus dont l'ADN de chacun a été amplifié par amplification de la chaîne par polymérisation en utilisant l'amorce à tester et a été amplifié à l'électrophorèse sur gel d'agarose. Le produit d'amplification a été amplifié sur la machine ABI PRISM 377 pour connaître l'allèle du locus si le marqueur génétique est polymorphe, nous avons utilisé ce marqueur avec tous les échantillons collectés, par contre s'il est monomorphe, il sera abandonné. Notons que si l'allèle d'un locus a été représenté par le même génotype c'est-à-dire représenté avec le même nombre comme (142/142), l'individu est dit homozygote à ce locus pour cet allèle, dans le cas contraire comme (140/142), il est dit hétérozygote. 140 veut dire que l'allèle provenant de l'un des parents est constitué de 140 paires de base et 142 veut dire que l'allèle provenant de l'autre parent est constitué de 142 paires de base. Un locus qui a des génotypes identiques sur plusieurs individus est dit monomorphes. Un locus qui a des génotypes différents sur plusieurs individus est dit polymorphe.

**Tableau 21:** Séquences des amorces utilisées pour le génotypage d'*Avahi* (Andriantompohavana *et al.*, 2004)

AMORCE	SEQUENCES DES AMORCES	MOTIF REPETE	TEMPERATURE (°C)	NUMERO A LA BANQUE DE GENE
WOOL12F	TAA GTG CTA TGG CTT TAA CAG AAG	(TA) <sub>4</sub> (CA) <sub>3</sub> TA(CA) <sub>17</sub>	52	AY515519
WOOL12R	GGG AGG CTT GGA TAC TAA ACA			
WOOL13F	GAT CAT AAG ACT ACC TAG CCA TAC ACA	(CA) <sub>20</sub>	54	AY515520
WOOL13R	TAT TGG CAA CAG TAA CTG GGG			
WOOL53F	GTA ATA GCT GAG GAA AAG GTG GTC	(CA) <sub>20</sub>	56	AY515521
WOOL53R	GAT CCC AGC CCT AGT ATT CTC C			
WOOL64F	ATT CAT ACA CCT TCC CCC AG	(AC) <sub>12</sub> CC(AC) <sub>9</sub>	50	AY515522
WOOL64R	CAC AGT GGT CTT CAA TAG AG			
WOOL70F	GGG GAG GGT CCT AAT GTT CTA	(CA) <sub>8</sub> GA(CA) <sub>5</sub> GA(CA) <sub>5</sub>	60	AY515523
WOOL70R	AGT AGA AGC TCT AGG AAA GGG GTG			
WOOL90F	AGA AGT TAT TTC CAC CCT GAT GTA A	(CA) <sub>15</sub> TG(CA) <sub>5</sub>	60	AY515524
WOOL90R	TGC AGT GAT ACC AAT TAG AGT CTC TC			
WOOL112F	TGG TAT CTA ATG TAT CTC AGG AAC TG	(CA) <sub>3</sub> CG(CA) <sub>14</sub>	54	AY515525
WOOL112R	CCA AGA GTA TTT TGC TGT GTT TG			
WOOL114F	CGT AGC CTT GGA GCC TGT G	(GT) <sub>18</sub>	60	AY515526
WOOL114R	GCC CCT TCT TGT GAT AAA CCT C			
WOOL136F	GGC TTT TCA GCT TCC ATA ATT G	(GT) <sub>19</sub>	56	AY515527
WOOL136R	GCT CCT TTT CAT TTT ATT CTC TGT C			
WOOL157F	AAA AAA AGG TGA GTG AGG CAG	(AC) <sub>14</sub>	54	AY515528
WOOL157R	GGT TGT GGG ATG ATG TAT GTA AAG			
WOOL183F	CAC TTG GCA GGC AGG AAT C	(GT) <sub>11</sub>	56	AY515529
WOOL183R	GAT CCA TGA TAG ATA CAT ACA TAC TTG C			
WOOL235F	AAG ATA AGT ATG TGG GGT AAT GC	(GT) <sub>13</sub>	56	AY515530
WOOL235R	TCA GAT TTT CAG GTT AGA GAT GC			
WOOL245F	CAA GGT AGG TCA TAA AAA ATC CAT	(CA) <sub>12</sub>	54	AY515531
WOOL245R	GCT CTC CTG AGT CTC TCC AAG TAG			
WOOL285F	CAG TAT TAG TGG GTG TGC GAG TAG	(AC) <sub>16</sub>	50	AY515532
WOOL285R	GGG CTT TAG GAG TTT AGG AGC			

WOOL338F	CCA AGT TGA AGG CAA TGC G	(AC) <sub>20</sub>	52	AY515533
WOOL338R	CCA GGG AGT CAT CTA AGA ACA GTG			
WOOL437F	ATC CAC AGT TTT CTG GCT ACT AA	(GT) <sub>14</sub>	54	AY515534
WOOL437R	TTC TAT CCA TTT CTT TCG TTT ACA			
WOOL682F	CGA GTG GAG TAA CGA CCC C	(GT) <sub>14</sub> CT(GT) <sub>6</sub> CT(GT) <sub>3</sub>	50	AY515535
WOOL682R	GGA TTT TGG TGA TGA GAG AAC G			
WOOL746F	TGC CAG ACA CCT TAG TTA AAT GAG	(GA)A(TG) <sub>27</sub> (AG) <sub>13</sub>	62	AY515536
WOOL746R	GAG GTT CAT ATT CAA TGG TAG CG			
WOOL789F	ATC GCT TGA GCC CAG GAG	(AC) <sub>16</sub>	54	AY515537
WOOL789R	CTT GTT TGT TTG ATG AAG TCT TGG			
WOOL802F	AAT CT GTA TTT GCA GTT GC	(GT) <sub>13</sub> AT(GT) <sub>4</sub> AT(GT) <sub>2</sub>	56	AY515538
WOOL802R	AAT AGA TAG CGT AGA AGT CAC CAG			
WOOL825F	GTT GAA TCC CTA ATC CCC AG	(AC) <sub>19</sub>	54	AY515539
WOOL825R	ATC TCC TTG CTG TGT CTT TAC G			
WOOL829F	ACC CAA AGA GAA GTA ACA AAG GG	(GT) <sub>17</sub>	54	AY515540
WOOL829R	CCT GGG GTG AGA GAG ATG AG			

**Tableau 22:** Les échantillons étudiés pour la phylogénie

Numéro d'identification	Site	Espèce	GPS	Numéro du transpondeur	
RANO66	Ranomafana (Talatakely)	<i>Avahi peyrierasi</i> 1	S21°14'90.0"	E047°25'26.6"	PAS
RANO319B	Ranomafana (Talatakely)	<i>Avahi peyrierasi</i> 1	S21°14'90.0"	E047°25'26.6"	PAS
RANO2.10	Ranomafana (Talatakely)	<i>Avahi peyrierasi</i> 1	S21°14'84.7"	E047°25'26.6"	4261735255
VOP2.13	Ranomafana (Vohiparara)	<i>Avahi peyrierasi</i> 1	S21°14'69.0"	E047°22'34.5"	PAS
RANO348	Ranomafana (Talatakely)	<i>Avahi peyrierasi</i> 1	S21°14'90.0"	E047°25'26.6"	PAS
VOP2.14	Ranomafana (Vohiparara)	<i>Avahi peyrierasi</i> 1	S21°14'69.0"	E047°22'34.5"	PAS
VOP2.15	Ranomafana (Vohiparara)	<i>Avahi peyrierasi</i> 1	S21°14'69.0"	E047°22'34.5"	PAS
RANO67	Ranomafana (Talatakely)	<i>Avahi peyrierasi</i> 2	S21°14'90.0"	E047°25'26.6"	PAS
RANO199	Ranomafana (Talatakely))	<i>Avahi peyrierasi</i> 2	S21°14'90.0"	E047°25'26.6"	PAS
RANO261	Ranomafana (Talatakely))	<i>Avahi peyrierasi</i> 2	S21°14'90.0"	E047°25'26.6"	PAS
RANO320B	Ranomafana (Talatakely))	<i>Avahi peyrierasi</i> 2	S21°14'90.0"	E047°25'26.6"	PAS
M86	Manombo	<i>Avahi meridionalis ramanantsoavani</i>	S23°01'69.5"	E047°43'84.1"	PAS
M89	Manombo	<i>Avahi meridionalis ramanantsoavani</i>	S23°01'69.5"	E047°43'84.1"	PAS
M107	Manombo	<i>Avahi meridionalis ramanantsoavani</i>	S23°01'69.5"	E047°43'84.1"	PAS
M108	Manombo	<i>Avahi meridionalis ramanantsoavani</i>	S23°01'69.5"	E047°43'84.1"	PAS
M119	Manombo	<i>Avahi meridionalis ramanantsoavani</i>	S23°01'69.5"	E047°43'84.1"	PAS
M150	Manombo	<i>Avahi meridionalis ramanantsoavani</i>	S23°01'69.5"	E047°43'84.1"	PAS
M155	Manombo	<i>Avahi meridionalis ramanantsoavani</i>	S23°01'69.5"	E047°43'84.1"	PAS
M159	Manombo	<i>Avahi meridionalis ramanantsoavani</i>	S23°01'69.5"	E047°43'84.1"	PAS
MAB4.8	Manombo	<i>Avahi meridionalis ramanantsoavani</i>	S23°01'23.0"	E047°41'53.4"	4318561221
MAB4.10	Manombo	<i>Avahi meridionalis ramanantsoavani</i>	S23°01'37.5"	E047°43'46.2"	4318555C43
FAN2.14	Fandriana	<i>Avahi betsileo</i>	S20°20'60.1"	E047°33'36.1"	PAS
FAN2.15	Fandriana	<i>Avahi betsileo</i>	S20°20'60.1"	E047°33'36.1"	PAS
FAN2.19	Fandriana	<i>Avahi betsileo</i>	S20°21'15.5"	E047°33'97.7"	PAS
FAN2.20	Fandriana	<i>Avahi betsileo</i>	S20°21'15.5"	E047°33'97.7"	PAS
FAN2.21	Fandriana	<i>Avahi betsileo</i>	S20°21'15.5"	E047°33'97.7"	PAS
AND4	Andohahela (Manangotry)	<i>Avahi meridionalis meridionalis</i>	S24°45'55.4"	E046°51'45.0"	43544F292D
AND5	Andohahela (Manangotry)	<i>Avahi meridionalis meridionalis</i>	S24°45'59.2"	E046°51'44.4"	44260A715C
AND6	Andohahela (Manangotry)	<i>Avahi meridionalis meridionalis</i>	S24°45'59.2"	E046°51'44.4"	44270E5014

AND11	Andohahela (Manangotry)	<i>Avahi meridionalis meridionalis</i>	S24°45'40.4"	E046°51'47.0"	442A505B46
AND12	Andohahela (Manangotry)	<i>Avahi meridionalis meridionalis</i>	S24°45'38.7"	E046°05'43.3"	4428603D1E
AND13	Andohahela (Manangotry)	<i>Avahi meridionalis meridionalis</i>	S24°45'38.7"	E046°51'43.3"	442C2E1C3F
AND14	Andohahela (Manangotry)	<i>Avahi meridionalis meridionalis</i>	S24°45'38.7"	E046°51'43.3"	442A614006
AND19	Andohahela (Manangotry)	<i>Avahi meridionalis meridionalis</i>	S24°45'44.8"	E046°51'47.4"	4423221653
AND33	Andohahela (Manangotry)	<i>Avahi meridionalis meridionalis</i>	S24°45'41.6"	E046°51'33.6"	43187F6166
AND34	Andohahela (Manangotry)	<i>Avahi meridionalis meridionalis</i>	S24°45'41.6"	E046°51'33.6"	43183A0F0D
TAD1	Mantadia	<i>Avahi laniger</i>	S18°48'49.0"	E048°25'47.8"	42772C2740
TAD2	Mantadia	<i>Avahi laniger</i>	S18°48'49.0"	E048°25'47.8"	4277610377
TAD3	Mantadia	<i>Avahi laniger</i>	S18°48'49.0"	E048°25'47.8"	427A714273
TAD19	Mantadia	<i>Avahi laniger</i>	S18°48'49.0"	E048°25'47.8"	427B643449
TAD36	Mantadia	<i>Avahi laniger</i>	S18°48'49.0"	E048°25'47.8"	PAS
TAD37	Mantadia	<i>Avahi laniger</i>	S18°48'49.0"	E048°25'47.8"	PAS
TAD4.3	Mantadia	<i>Avahi laniger</i>	S18°48'34.4"	E048°25'38.0"	4317306B18
TAD4.8	Mantadia	<i>Avahi laniger</i>	S18°48'56.7"	E048°25'44.5"	43317B656D
TAD4.9	Mantadia	<i>Avahi laniger</i>	S18°48'56.7"	E048°25'44.5"	431524D58
TAD4.20	Mantadia	<i>Avahi laniger</i>	S18°48'47.7"	E048°25'46.4"	43171A6474
MIZA10	Maromizaha	<i>Avahi laniger</i>	S18°58'25.5"	E048°27'52.6"	4578566764
MIZA12	Maromizaha	<i>Avahi laniger</i>	S18°58'47.0"	E048°27'49.4"	457964340C
MIZA13	Maromizaha	<i>Avahi laniger</i>	S18°58'47.0"	E048°27'49.4"	45796C645C
MIZA14	Maromizaha	<i>Avahi laniger</i>	S18°58'12.5"	E048°27'43.2"	457977100A
NARA4.1	Mananara-Nord (Ivontaka-Sud)	<i>Avahi laniger</i>	S16°18'22.1"	E049°47'02.0"	4556095A11
NARA4.2	Mananara-Nord (Ivontaka-Sud)	<i>Avahi laniger</i>	S16°18'15.6"	E049°46'56.0"	45567D1701
NARA4.10	Mananara-Nord (Ivontaka-Sud)	<i>Avahi laniger</i>	S16°18'25.0"	E049°47'06.4"	45556F640A
NARA4.11	Mananara-Nord (Ivontaka-Sud)	<i>Avahi laniger</i>	S16°18'25.0"	E049°47'06.4"	4556740954
NARA4.13	Mananara-Nord (Ivontaka-Sud)	<i>Avahi laniger</i>	S16°18'13.5"	E049°46'53.2"	4559137F32
NARA4.17	Mananara-Nord (Ivontaka-Sud)	<i>Avahi laniger</i>	S16°18'15.3"	E049°47'08.9"	4555134345
NARA4.18	Mananara-Nord (Ivontaka-Sud)	<i>Avahi laniger</i>	S16°18'15.3"	E049°47'08.9"	45590D156A
NARA4.23	Mananara-Nord (Ivontaka-Sud)	<i>Avahi laniger</i>	S16°18'22.7"	E049°47'03.9"	4554223564
NARA4.31	Mananara-Nord (Ivontaka-Sud)	<i>Avahi laniger</i>	S16°18'07.4"	E049°46'45.9"	45554F6E6F
NARA4.32	Mananara-Nord (Ivontaka-Sud)	<i>Avahi laniger</i>	S16°18'07.4"	E049°46'45.9"	45541B4F2A
ANT5.8	Antafondro	<i>Avahi unicolor</i>	S14°02'53.9"	E048°12'42.7"	4663477500
ANT5.9	Antafondro	<i>Avahi unicolor</i>	S14°02'51.3"	E048°12'40.4"	457A7A3055
ANT5.10	Antafondro	<i>Avahi unicolor</i>	S14°02'54.8"	E048°12'45.6"	4570557557
ANT5.12	Antafondro	<i>Avahi unicolor</i>	S14°02'54.8"	E048°12'45.6"	4573220F57

BEMA8	Tsingy de Bemaraha	<i>Avahi cleesei</i>	S19°01'89.1"	E044°46'48.8"	431474673A
BEMA9	Tsingy de Bemaraha	<i>Avahi cleesei</i>	S19°01'89.1"	E044°46'48.8"	4313736841
BEMA12	Tsingy de Bemaraha	<i>Avahi cleesei</i>	S19°01'97.3"	E044°46'46.3"	433C0F6549
BEMA13	Tsingy de Bemaraha	<i>Avahi cleesei</i>	S19°01'97.3"	E044°46'46.3"	433A086D5B
BEMA14	Tsingy de Bemaraha	<i>Avahi cleesei</i>	S19°01'97.3"	E044°46'46.3"	PAS
MAR29	Mariarano	<i>Avahi occidentalis</i>	S15°28'47.4"	E046°41'35.3"	457B5C6747
MAR46	Mariarano	<i>Avahi occidentalis</i>	S15°28'50.7"	E046°41'23.8"	4576546869
MAR52	Mariarano	<i>Avahi occidentalis</i>	S15°28'50.6"	E046°41'32.7"	4576397D17
MAR54	Mariarano	<i>Avahi occidentalis</i>	S15°29'03.7"	E046°41'32.5"	4574030C0C
MAR55	Mariarano	<i>Avahi occidentalis</i>	S15°29'03.7"	E046°41'32.5"	4570445302
MAR56	Mariarano	<i>Avahi occidentalis</i>	S15°29'03.7"	E046°41'32.5"	4575422458
MAR60	Mariarano	<i>Avahi occidentalis</i>	S15°29'50.0"	E046°41'31.6"	456C1C3F0E
MAR61	Mariarano	<i>Avahi occidentalis</i>	S15°29'50.0"	E046°41'31.5"	457A143526

Nom: RAMBININTSOA

Prénom: Andriantompohavana

Adresse: lot II-N 170 ter Anjanahary (101) Antananarivo

E-mail: [radambyhdz@yahoo.fr](mailto:radambyhdz@yahoo.fr), Téléphone: 033 12 283 68

Laboratoire de Primatologie, Département de Paléontologie et d'Anthropologie Biologique

**Titre de la thèse: Contribution à la révision systématique et dynamique de population du genre *Avahi* (Jourdan, 1834).**

---

## RESUME

*Avahi* se rencontre sur la partie Est de Madagascar depuis Anjanaharibe-Sud au Nord jusqu'à Andohahela au Sud, et sur la partie Ouest depuis Antafondro au Nord jusqu'à Bemaraha au Sud. Des analyses du fragment D-loop et des fragments COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> et une partie d'ARN-t<sup>LEU</sup> de l'ADN mitochondrial ont été faites pour l'étude phylogénétique de *Avahi* entre Mananara-Nord et Andohahela en utilisant la méthode du plus proche voisin (neighbor-joining), la méthode de la parcimonie maximum (maximum parsimony) et la méthode de vraisemblance maximum (maximum likelihood). Des études de l'ADN nucléaire ont été faites pour estimer les paramètres de la génétique de population en utilisant vingt deux marqueurs génétiques polymorphiques, les données génotypiques ont été testées avec les logiciels MICROCHECKER, GENEPOLP3.1, BOTTLENECK v. 1.2.02 et STRUCTURE 2.0. Au total, neuf espèces d'*Avahi* ont été observées en utilisant le concept des espèces phylogénétiques dont deux sont des nouvelles espèces qui sont *Avahi betsileo* découverte à Fandriana et *Avahi nova species* découverte à Ranomafana. Toutes les populations des 22 sites étudiés présentent une tendance vers la consanguinité dont la population de Betampona possède un très haut degré de consanguinité ( $F_{IS}=0,95$ ). Les populations de Midongy du Sud, Manombo, Anjozorobe, Mananara-Nord, Mantadia ont subi le phénomène de goulot démographique (bottleneck). La population de Mariarano présente une structure.

**Mots-clé:** *Avahi*, étude phylogénétique, nouvelles espèces, génétique de population, marqueurs génétiques, consanguinité, goulot démographique, structure.

## ABSTRACT

*Avahi* is found from Anjanaharibe-Sud to the north through Andohahela to the South in the eastern part, and from Antafondro through Bemaraha in the western part of Madagascar. D-loop fragment and COIII, ND3, ND4L, ND4, ARN-t<sup>GLY</sup>, ARN-t<sup>ARG</sup>, ARN-t<sup>SER</sup> fragments are analysed for *Avahi*'s phylogenetic study from Mananara-Nord through Andohahela using neighbor-joining, maximum parsimony and maximum likelihood. Nuclear DNA is analysed for estimating population genetic parameters using twenty two polymorphic genetic markers; genotypic data are analysed with MICROCHECKER, GENEPOLP3.1, and BOTTLENECKv.1.2.02 and STRUCTURE 2.0 softwares. Nine *Avahi* species are observed using phylogenetic species concept which two are new species: *Avahi betsileo* from Fandriana and *Avahi nova species* from Ranomafana. All populations studied on population genetic strained to inbreeding with the highest is the Betampona population ( $F_{IS}=0, 95$ ). The Midongy du Sud, Manombo, Anjozorobe, Mananara-Nord and Mantadia populations undergo the bottleneck event. The Mariarano population presents structure

**Keywords:**  
bottleneck, structure

genetic markers, inbreeding,



