



Séquençage d'« ADN dégradé » et
taxonomie de spécimens de collection :
Un exemple chez les rongeurs du genre
Gerbillus.

The **Field**
Museum

Présenté par Arame Ndiaye
Saint-Louis, Sénégal
Novembre 2013



Le genre *Gerbillus* constitue l'un des genres le plus important (nombre d'espèces) dans l'ordre des rongeurs et est principalement inféodé aux zones arides et subarides de la zone paléartique.



Sa systématique est cependant mal connue de la même manière que la taxonomie de certains des spécimens appartenant à ce genre

Distribution géographique du genre
Gerbillus

“ Parmi ces questions en suspens nous pouvons citer:

- . L'ensemble *G. nanus*/*G. amoeus* souvent considérés comme une seule et même espèce ou alors comme appartenant à des espèces différentes
- . *Les relations entre G. gerbillus et G. andersoni cette dernière parfois considérée comme sous-espèce par certains auteurs*
- . *Les limites d'espèces dans le groupe G. pyramidum, G. perpallidus, G. floweri...*
- . *A l'intérieur de G. pyramidum la validité de sous-espèces (G. p. elbaensis, G. p. gedeedus, G. p. pyramidum et G. p. floweri) en tant que lignées évolutives distinctes*

→ Réception de prélèvements conservés au « Field Museum de Chicago » sous forme de peaux et crânes (prélèvement au secs) appartenant à cinq espèces dont la taxonomie de par la morphologie semblait confuse (*G. pyramidum*, *G. perpallidus*, *G. nanus*, *G. amoenus*, *G. andersoni* et *G. gerbillus*) et provenant principalement d'Egypte mais aussi d'Asie (Afghanistan et Inde).

→ L'Egypte constitue une zone d'étude de choix (1) de par sa position géographique, (2) les cinq espèces choisies pour cette étude ont par ailleurs été étudiées à partir d'échantillons « frais », ce qui pourra permettre d'éventuels comparaisons et (3) les spécimens utilisés ici proviennent de la série étudiée par Osborn et Helmy (1980).



Dès lors à partir de ces prélèvements nous allons tenter d'amplifier une portion du gène mitochondrial du cytochrome b afin de mieux définir la taxonomie de ces spécimens et répondre à trois principales questions:

→ La taxonomie de ces spécimens, basée jusque là sur des données morphologiques essentiellement, coïncide-t-elle avec la taxonomie actuelle de ce genre également basée sur des données moléculaires et/ou cytogénétiques?

→ Allons nous retrouver la différenciation en deux sous clades au sein de *G. nanus* *s.l.* avec *G. amoenus* (d'origine africaine) et *G. nanus* *ss* (d'origine asiatique) récemment définie suivant les données moléculaires?

→ Qu'en est-il de la taxonomie des deux espèces *G. perpallidus* et de *G. pyramidum* cette dernière comprenant 4 sous-espèces (*G. p. pyramidum*, *G. p. floweri*, *G. p. gedeedus*, et *G. p. elbaensis*)?

Pour répondre à ces différentes questions et à partir de spécimens de collections (Musée), nous allons utiliser une méthode moléculaire particulièrement adaptée à du matériel biologique *à priori* dégradé.

- **45 tissus** obtenus à partir de peaux et crânes de spécimens du genre *Gerbillus* ont été reçus
- L'ADN a été extrait au niveau de la plateforme **LABEX CeMEB** à Montpellier à l'aide du kit « ADN micro QiaAmp » suivant un protocole bien spécifique décrit en trois étapes:
 - Jour 1- Nettoyage de la salle, des paillasses et des appareils (Javel, Dnase Away et UV respectivement)
 - Jour 2 - Préparatif des réactifs (Salle « **Mix** ») et digestion des tissus (Salle « **Extraction** »)
 - Jour 3 - Suite Extraction ADN



Salle « **Mix** »



Salle « **Extraction** »



Tout cela pour de l'ADN....!

- Changement de gant/échantillon
- Port de charlotte et masque
- Port de chaussure
- Port de la blouse

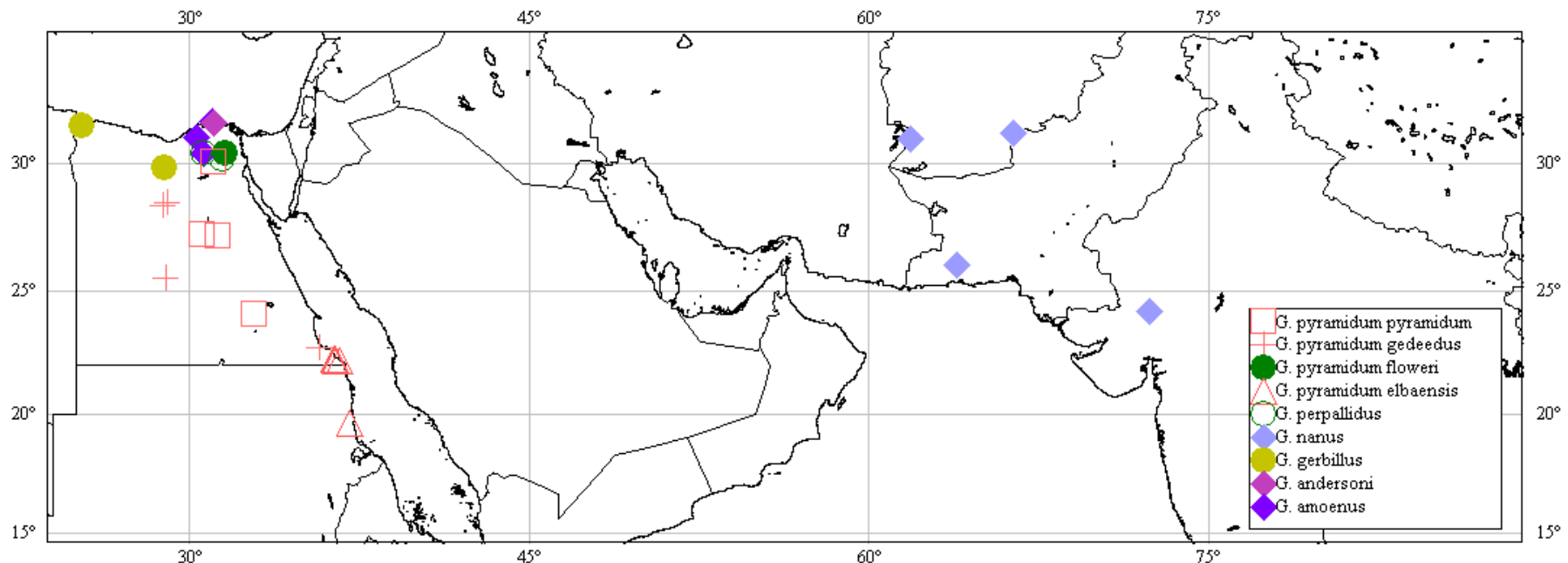
- **Amplification par PCR** d'un court fragment du cytochrome b (238pb) à l'aide d'amorces nouvellement définies (**GerbCytb-F2** et **GerbCytB-R3**)

- L'amplification s'est faite à **deux concentrations ADN (1 et 2 μ l)** afin de vérifier la congruence entre les séquences ainsi obtenues (éviter les artéfacts et/ou copies nucléaires fréquentes dans ce genre)

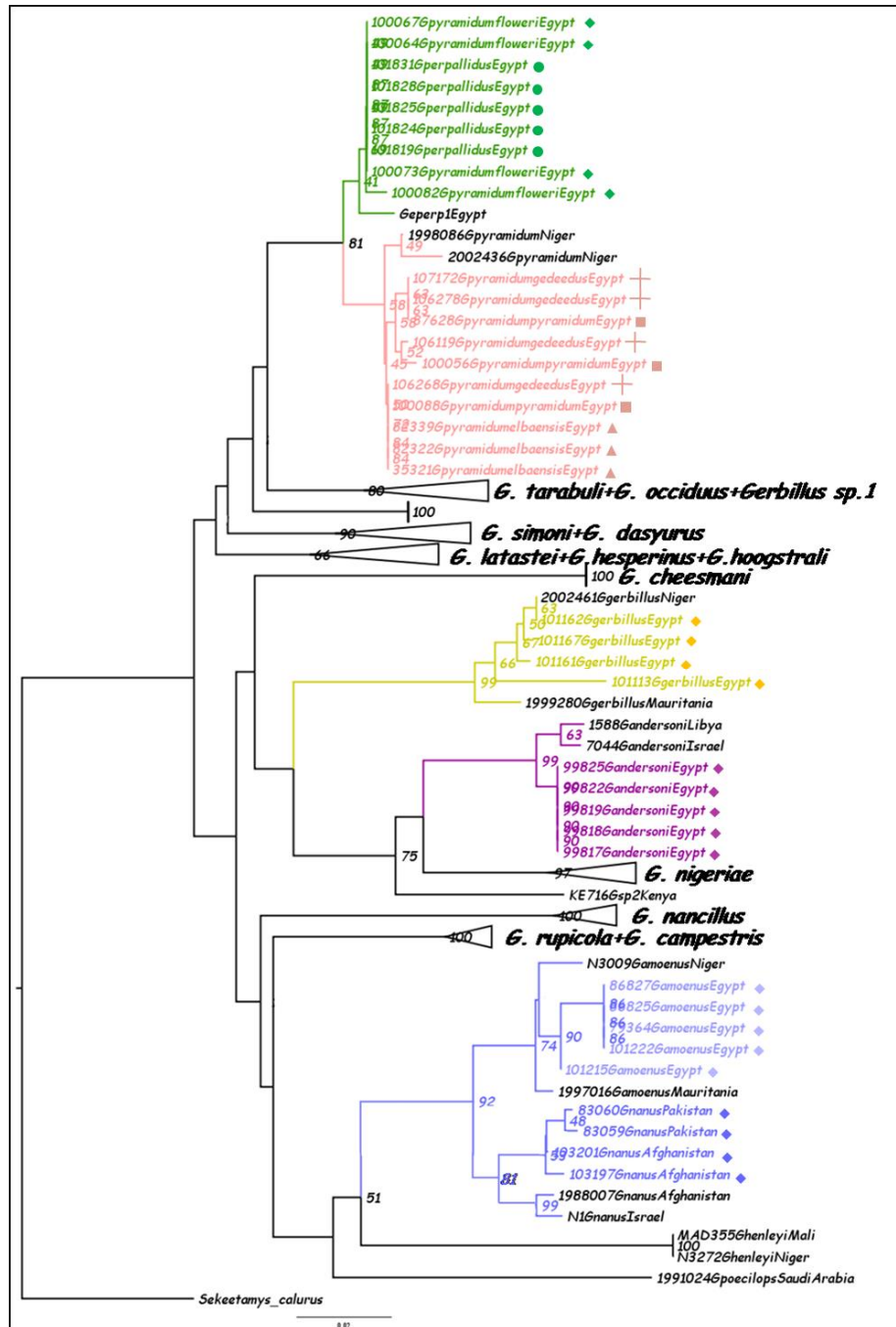
- Les séquences sont envoyés à Eurofins MWG Operon (France), récupérées sur Seqscape (Applied Biosystem) puis traitées sous BioEdit v.7.1.3.0 et Seaview v.4.2.12

→ Par la suite des reconstructions phylogénétiques (NJ et BI) ont été réalisées sous SeaView v.4.2.12 et MrBayes v.3.1.2 respectivement

→ 40 séquences de spécimens du genre *Gerbillus* bien définis sont rajoutées à la matrice et *Sekeetamys calurus* est utilisé comme groupe externe



Origine des échantillons étudiés



→ Sur les 45 tissus reçus au départ: pas d'ampli pour 1 individu, et séquences ambiguës pour 7 individus retirés de la suite des analyses.

→ Reconstructions phylogénétiques effectuées: NJ (présenté ici) semblait correspondre le mieux aux relations trouvées dans ce genre sur la base d'un échantillonnage plus complet avec *G. gerbillus* et *G. andersoni* identifiés sans ambiguïté (BP=99%, PP=1).

(1) L'ensemble *G. nanus* / *G. amoenus* (BP = 92%) est structuré en deux sous-clades bien soutenus, justifiant de la distinction entre *G. amoenus* (origine africaine) et *G. nanus* (origine asiatique).

(2) Un clade *G. perpallidus* / *G. pyramidum* (BP = 82%, PP = 0.99) structuré en deux sous-clades avec d'une part *G. perpallidus* et *G. p. floweri* (une sous-espèce de *G. pyramidum*, souvent considérée comme une bonne espèce)

(3) Les trois autres sous-espèces de *G. pyramidum* (*G. p. elbaensis*, *G. p. gedeedus* et *G. p. pyramidum*) forment un sous clade (BP<50% et PP<0,5) sans structuration particulière.

(1) La structuration *G. nanus* / *G. amoenus* observée ici confirme les résultats obtenus par ailleurs avec de l'ADN "frais"

(2) Dans le cas de *G. pyramidum* / *G. perpallidus*, le regroupement de *G. perpallidus* avec *G. p. floweri* observé ici correspond aux observations de Osborn et Helmy (1980) selon lesquelles elles constituent deux formes très proches.

(3) Les trois autres sous-espèces de *G. pyramidum* ne semblent cependant pas correspondre à des ensembles génétiques réciproquement monophylétiques

Malgré les résultats préliminaires obtenus ici, la taxonomie des espèces étudiées ici à partir de spécimens de collection et grâce à une technique moléculaire adaptée pour de l'ADN dégradé montre:

(1) L'ensemble *G. amoenus*/*G. nanus* constitue bien deux espèces différentes suggérant ainsi la présence de deux espèces "vicariantes" qui se seraient différenciées de part et d'autre de la Mer Rouge.

(2) Concernant *G. pyramidum*/*G. perpallidus*, les données obtenus ici confirment les observations de Osborn et Helmy (1980) où *G. p. floweri* et *G. perpallidus* seraient très proches morphologiquement. Sur la base des données moléculaires présentées ici, nous proposons même la mise en synonymie de ces deux taxons sous le nom *G. floweri* (règle d'antériorité).

(3) Dans le cas des trois autres sous-espèces de *G. pyramidum*, les données moléculaires ne coïncident cependant pas avec la taxonomie réalisée à partir de la morphologie pour ces spécimens reçus avec des lignées non différenciées génétiquement

Discussion

→ La taxonomie de ces spécimens reçues, effectuée à partir de données morphologiques essentiellement, coïncide bien avec la taxonomie actuelle basée sur des données moléculaires à l'exception du cas *G. floweri* / *G. perpallidus* et des trois sous-espèces de *G. pyramidum*

Il conviendrait néanmoins pour la suite de confirmer les résultats obtenus ici dans le cas de *G. perpallidus* / *G. (p.) floweri* par d'autres méthodes (Pons *et al.*, 2006)

Hormis les résultats obtenus ici, la méthodologie utilisée ici (à partir de spécimens de collection) nous montre qu'il n'y a plus de limites dans l'étude de taxons ambigus avec la possibilité de disposer de divers tissus pour éventuellement des études comparatives basées sur la biologie moléculaires et incluant les spécimens de collections

Conclusion et Perspectives

Remerciements:

Christelle Tougard

Fabienne Justy

Marie Pagès

Caroline Tatard

Bill Stanley

...

Merci de votre aimable attention