

Phylogénie des *Herpestidae* (*Mammalia*, *Carnivora*)

Blaise Li



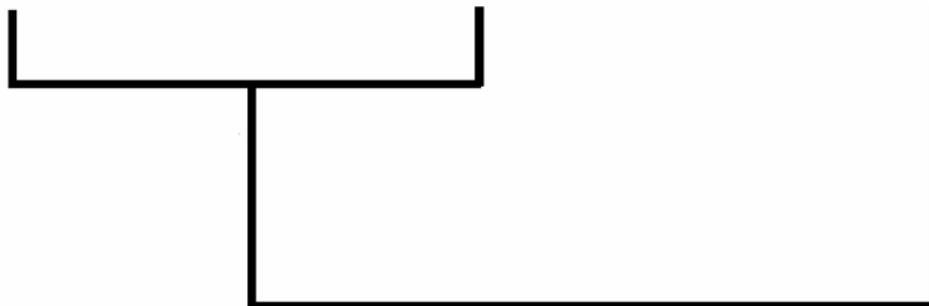
Hyène



Mangouste



Lion



Cadre du stage

Ce stage de DEA a été encadré par Géraldine Veron au Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), dans l'unité USM 601-FRE 2695 “ Origine, Structure et Évolution de la Biodiversité ” et au Service de Systématique Moléculaire ; “ SSM ” (CNRS GDR 1005).

Remerciements

Je remercie Géraldine Veron, le SSM et les collègues, pour tout ce que j'ai appris lors de ce stage, et je remercie également Mélanie Perez pour sa bibliographie sur les mangoustes et son rapport de DEA qui m'ont été bien utiles.

Les animaux qui sont sur la couverture sont tirés de la “ Rubrique-à-Brac ” de Gotlib (éditions Dargaud), albums en vente dans toutes les bonnes librairies.

Par contre, je ne remercie pas l'imbécile qui a implémenté les fonctions “ je-sais-mieux-que-toi-ce-que-tu-veux ” dans Microsoft Word. Je décline donc toute responsabilité quant aux imperfections dans la mise en page (et s'il reste des fautes d'orthographe, c'est aussi de la faute de Word qui m'a énervé avant la relecture).

Remarque préliminaire

Les pluriels de certains mots comme “ taxon ” ou “ scénario ” seront formés à la manière française (taxons, scénarios).

Sommaire	3
1 Introduction	4
1.1 Généralités sur les mangoustes	4
1.2 Systématique de la famille des <i>Herpestidae</i>	4
1.3 Objectifs du travail de DEA	5
2 Matériel et méthodes	5
2.1 Échantillonnage	5
2.2 Obtention des séquences	6
2.3 Établissement d'une matrice de caractères morphologiques et chromosomiques	7
3 Analyses	7
3.1 Analyse des données moléculaires	7
3.1.1 Analyses séparées	8
3.1.2 Analyses combinées	8
3.2 Utilisation des données morphologiques	9
4 Résultats	9
4.1 Séquences obtenues	9
4.2 Caractères morphologiques obtenus	10
4.3 Analyses séparées	10
4.3.1 TrI1	10
4.3.2 Gènes mitochondriaux	11
4.3.3 Morphologie	11
4.4 Analyses combinées	11
4.5 Étude morphologique	13
5 Discussion	17
5.1 De l'apport de TrI1 pour la phylogénie des mangoustes	17
5.2 De la difficulté de définir des caractères morphologiques de qualité	17
5.3 Ce que l'on peut dire des relations de parenté entre mangoustes	18
5.3.1 Les carnivores malgaches	18
5.3.2 Les <i>Herpestinae</i>	18
6 Perspectives et conclusion	19
Bibliographie	20
Annexes	22

1 Introduction

1.1 Généralités sur les mangoustes

Les mangoustes sont de petits mammifères carnivores africains et asiatiques. Seul le genre *Herpestes* est représenté en Asie.

Selon les espèces, leur taille adulte varie de celle d'un rat à celle d'un chien moyen. Leur régime alimentaire est varié : divers arthropodes, fruits, petits mammifères, reptiles et amphibiens, oeufs, certaines espèces étant plus spécialisées que d'autres. Les mangoustes occupent divers types de milieux : forêt, savane, marais, steppe. Il existe des espèces au comportement social relativement complexe, comme le suricate (*Suricata suricatta*) qui vit en grandes colonies dans lesquelles les petits sont élevés en commun (Skinner & Smithers, 1990).

L'homme utilise, ou a utilisé, les mangoustes notamment pour leur rôle de prédateurs, afin de limiter les populations de serpents, de crocodiles (dont elles détruisent les œufs ; Harrison & Bates, 1991) ou de rongeurs. C'est à ce titre que des mangoustes ont été introduites entre autres lieux dans les Antilles où sur des îles de Croatie, ce qui n'est pas sans conséquences sur l'écologie locale. Les mangoustes sont également utilisées pour leurs poils (pinceaux, blaireaux ; De *et al.*, 1998), et comme animaux de compagnie.

1.2 Systématique de la famille des *Herpestidae*

Au sein des *Carnivora*, on distingue les *Caniformia* des *Feliformia*. Les mangoustes (*Herpestidae*) font partie de ce deuxième groupe.

On distingue deux sous-familles (Wozencraft, 1993) ; les *Herpestinae*, d'Afrique et d'Asie, et les mangoustes malgaches ou *Galidiinae*.

Les *Herpestinae* au sens de Wozencraft (1993) comprennent les 14 genres suivants :

Atilax, *Bdeogale*, *Crossarchus*, *Cynictis*, *Dologale*, *Galerella*, *Helogale*, *Herpestes*, *Ichneumia*, *Liberiictis*, *Mungos*, *Paracynictis*, *Rhynchogale*, *Suricata*.

Les *Galidiinae* au sens de Wozencraft (1993) comprennent les 4 genres suivants :

Galidia, *Galidictis*, *Mungotictis*, *Salanoia*.

Cette classification sera utilisée dans ce rapport.

Les précédentes études phylogénétiques du groupe, se basant sur la morphologie (Pocock, 1919 ; Gregory & Hellman, 1939 ; Petter, 1969 ; Wozencraft, 1989 ; Veron, 1995), les chromosomes (Fredga, 1972 ; Couturier & Dutrillaux, 1985) ou les allozymes (Taylor *et al.*, 1991) ne permettent pas de dégager des relations précises et consensuelles car leurs résultats sont conflictuels et ne comprennent pas bon nombre de taxons. Wozencraft (1989) avait toutefois été amené à considérer 3 sous-familles : les *Galidiinae* (*Galidia*, *Galidictis*, *Mungotictis*, *Salanoia*), exclusivement malgaches, les *Herpestinae* (*Atilax*, *Bdeogale*, *Galerella*, *Herpestes*, *Ichneumia*, *Rhynchogale*), africains à l'exception du genre *Herpestes*, qui est aussi asiatique, et les *Mungotinae* (*Crossarchus*, *Cynictis*, *Dologale*, *Helogale*, *Liberiictis*, *Mungos*, *Paracynictis*, *Suricata*) présents exclusivement en Afrique.

Les premières études basées sur des séquences d'ADN permettent d'y voir un peu plus clair. Avec les autres carnivores malgaches (*Cryptoprocta*, *Fossa* et *Eupleres*), les *Galidiinae* forment un groupe monophylétique, groupe-frère des *Herpestinae*, et ces carnivores auraient colonisé Madagascar il y a environ 20 millions d'années (Yoder *et al.*, 2003). Les *Herpestidae* ne sont donc pas monophylétiques si on y conserve les *Galidiinae*. Carnivores malgaches et mangoustes ont pour groupe frère les *Hyaenidae*. Les mangoustes au comportement social le plus complexe (*Suricata*, *Liberiictis*, *Mungos*, *Helogale*, *Crossarchus*) forment un groupe monophylétique et le genre *Herpestes* n'est pas monophylétique (Veron *et al.*, 2004).

Espèce	Famille, Sous-famille	TrI1	ND2	CytB	Morphologie
<i>Atilax paludinosus</i>	Herpestidae, Herpestinae	ADN extrait de tissus FMNH-160388	M. Perez	AF522324	crânes et peaux
<i>Bdeogale crassicauda</i>	Herpestidae, Herpestinae	ADN extrait de tissus TC-320		G. Veron	crânes seulement
<i>Bdeogale nigripes</i>	Herpestidae, Herpestinae	ADN extrait de tissus TC-376	M. Perez	G. Veron	peaux seulement
<i>Canis lupus</i>	Canidae	AF039732	AY170044	AY170103	
<i>Civettictis civetta</i>	Viverridae, Viverrinae	AY170023	AY170048	AY170105	
<i>Crocuta crocuta</i>	Hyaenidae, Hyaeninae	AF039728	AY170057	AY170114	crânes seulement
<i>Crossarchus alexandri</i>	Herpestidae, Herpestinae	ADN extrait de tissus TC-72	M. Perez	AF522326	
<i>Crossarchus obscurus</i>	Herpestidae, Herpestinae	AF039726	AY170041	AY170101	crânes et peaux
<i>Cryptoprocta ferox</i>	Viverridae, Cryptoproctinae	AY170018	AY170036	AY170096	crânes et peaux
<i>Cynictis penicillata</i>	Herpestidae, Herpestinae	AY170024	AY170049	AF511060	crânes et peaux
<i>Dologale dybowskii</i>	Herpestidae, Herpestinae				crânes et peaux
<i>Erignathus barbatus</i>	Phocidae	AF039742	AY170047	AY170104	
<i>Eupleres goudotii</i>	Viverridae, Euplerinae			AY187008 (123 pb seulement)	crânes et peaux
<i>Felis silvestris</i>	Felidae, Felinae	AFO39724	AY170042	AY170102	
<i>Fossa fossana</i>	Viverridae, Euplerinae	AY170019	AY170037	AY170097	crânes et peaux
<i>Galerella pulverulenta</i>	Herpestidae, Herpestinae	ADN extrait de tissus TC-109	M. Perez	AF522329 et AF522330	crânes et peaux
<i>Galerella sanguinea</i>	Herpestidae, Herpestinae	ADN extrait de tissus FMNH-145231 et TC-308	M. Perez	AF522332 et AF522331	crânes et peaux
<i>Galidia elegans</i>	Herpestidae, Galidiinae	AY170020	AY170038	AY170098	crânes et peaux
<i>Galidictis fasciata</i>	Herpestidae, Galidiinae	AY170022	AY170040	AY170100	crânes et peaux
<i>Genetta servalina</i>	Viverridae, Viverrinae	AY170029	AY170058	AY170115	
<i>Helogale hirtula</i>	Herpestidae, Herpestinae	ADN extrait de tissus (taxid 2339)		AF522335	crânes et peaux
<i>Helogale parvula</i>	Herpestidae, Herpestinae	ADN extrait de tissus TC-30	M. Perez	AF522333	crânes et peaux
<i>Hemigalus derbyanus</i>	Viverridae, Hemigalinae	AY170027	AY170052	AF125143	
<i>Herpestes brachyurus</i>	Herpestidae, Herpestinae	ADN extrait à partir du spécimen de collection CG 1965-406			crânes et peaux
<i>Herpestes edwardsii</i>	Herpestidae, Herpestinae	AY170025	AY170049	AF522336	crânes et peaux
<i>Herpestes ichneumon</i>	Herpestidae, Herpestinae	ADN extrait de tissus TC-154 et extrait C-21	M. Perez	AF522337	crânes et peaux
<i>Herpestes javanicus</i>	Herpestidae, Herpestinae	AY170026	M. Perez	AF522338	crânes et peaux
<i>Herpestes naso</i>	Herpestidae, Herpestinae	ADN extrait de tissus TC-226	M. Perez	AF522340	crânes et peaux
<i>Herpestes urva</i>	Herpestidae, Herpestinae	ADN extrait de poils TC-175	M. Perez	G. Veron	crânes et peaux
<i>Ichneumia albicauda</i>	Herpestidae, Herpestinae	ADN extrait de tissus FMNH-157991	M. Perez	AF511058 et AF522341	crânes et peaux
<i>Liberiictis kuhni</i>	Herpestidae, Herpestinae	ADN extrait de poils TC-129 et de tissus TC-143	M. Perez	AF522343	un crâne partiel seulement
<i>Lontra longicaudis</i>	Mustelidae, Lutrinae	AF039734		AF057123	
<i>Mungos gambianus</i>	Herpestidae, Herpestinae				crânes et peaux
<i>Mungos mungo</i>	Herpestidae, Herpestinae	AY170017	AY170035	AY170095	crânes et peaux
<i>Mungotictis decemlineata</i>	Herpestidae, Galidiinae	AY170013 et AY170015	AY170033 et AY170031	AY170091 et AY170093	crânes et peaux
<i>Mustela frenata</i>	Mustelidae, Mustelinae	AF039735		AF498153	
<i>Nandinia binotata</i>	Viverridae, Nandiniinae	AY232613	AY170053	AY170110	
<i>Odobenus rosmarus</i>	Odobenidae	AF039743	NC004029	NC004029	
<i>Panthera leo</i>	Felidae, Pantherinae	AF039725	AY170043	AF053052	
<i>Paradoxurus hermaphroditus</i>	Viverridae, Paradoxurinae	AF039730	AY170056	AY170113	
<i>Procyon lotor</i>	Procyonidae, Procyoninae	AF039736	AY170046	X94930	
<i>Rhynchogale melleri</i>	Herpestidae, Herpestinae	ADN extrait de tissus TC-224	M. Perez	AF522344	crânes et peaux
<i>Salanoia concolor</i>	Herpestidae, Galidiinae			AY187007	crânes et peaux
<i>Suricata suricatta</i>	Herpestidae, Herpestinae	AY170028	AY170054	AY170111	crânes et peaux
<i>Tremarctos ornatus</i>	Ursidae, Ursinae	AF039740	AY170045	U23554	
<i>Ursus arctos</i>	Ursidae, Ursinae	AF039741	NC003427	NC003427	
<i>Viverra tangalunga</i>	Viverridae, Viverrinae	AF039731	AY170055	AF511045	

Tableau 1. Espèces utilisées dans cette étude.

La famille et l'éventuelle sous-famille sont celles données par Wozencraft (1993). Pour les données moléculaires, la source de la séquence ou le matériel utilisé pour le séquençage sont donnés. Pour les données morphologiques, le matériel provient des collections du MNHN (voir en annexe 5 pour quelques références).

D'autres résultats, comme l'existence d'un clade (*Ichneumia*, *Rhynchogale*, *Bdeogale*, *Cynictis*) et d'un clade (*Atilax*, *H. naso*), semblent se dégager d'autres données mitochondriales déjà disponibles (ND2 ; Perez *et al.*, en préparation). Ce placement de *Cynictis* rend l'ancienne sous-famille des *Mungotinae* non monophylétique. Cette étude suggère également un placement de *Suricata* en groupe-frère des autres mangoustes sociales.

La monophylie des *Herpestes* asiatiques reste à tester et les relations entre mangoustes sociales ne sont pas très claires, ni celles entre les différents groupes mis en évidence chez les mangoustes non-sociales. Il n'existe pas de données moléculaires pour les genres *Paracynictis* et *Dologale*, ni pour la majorité des espèces asiatiques.

1.3 Objectifs du travail de DEA

Des jeux de données relativement complets pour les gènes mitochondriaux cytochrome b (CytB) et ND2 sont disponibles (Yoder *et al.*, 2003 ; Veron *et al.*, 2004 ; Perez *et al.*, en préparation). Le but du travail de DEA est de résoudre les noeuds basaux de la phylogénie des mangoustes en utilisant des séquences à évolution un peu plus lente et qui ont déjà fait leurs preuves chez d'autres carnivores. On a choisi l'intron 1 de la transthyréine (TrI1), déjà utilisé pour les carnivores en général par Flynn & Nedbal (1998) et pour des félifformes par Yoder *et al.* (2003) et Gaubert & Veron (2003), donc disponible pour un certain nombre d'espèces. L'analyse combinée des données nucléaires et mitochondriales permettra, on l'espère, d'obtenir une phylogénie détaillée et robuste du groupe, qui permette de discuter de l'évolution des caractères éthologiques et morphologiques des mangoustes, voire d'esquisser des scénarios biogéographiques.

Une autre partie du travail est l'établissement d'une matrice de caractères morphologiques représentant le plus de genres possibles. On pourra alors évaluer l'homoplasie de ces caractères morphologiques par l'étude de leurs transformations sur l'arbre retenu suite à l'analyse des données moléculaires, ou sur un arbre obtenu en combinant ces données morphologiques avec les données moléculaires.

2 Matériel et méthodes

2.1 Échantillonnage

L'ADN de beaucoup d'échantillons avait été extrait à partir de poils ou de tissus par G. Veron et M. Perez pour des études précédentes.

Les quelques extractions d'ADN supplémentaires (*G. pulverulenta* et *L. kuhni*) ont été effectuées au CTAB, à partir de tissus conservés dans de l'alcool, selon le protocole figurant en annexe 1.

De nombreuses séquences ont été récupérées sur Genbank, dont celles d'autres carnivores pouvant servir de groupe externe à l'étude de la phylogénie des mangoustes.

L'échantillonnage pour le travail morphologique a été restreint aux mangoustes, carnivores malgaches et hyènes.

Les observations morphologiques ont été effectuées sur des crânes et des peaux des collections du MNHN. Les caractères chromosomiques ont été recherchés dans la bibliographie (Fredga, 1972 ; Couturier & Dutrillaux, 1985) et ont été ajoutés à la matrice de caractères morphologiques.

Le tableau 1 résume les sources des données utilisées dans cette étude. Le numéro d'accès est donné pour les séquences disponibles sur Genbank.

2.2 Obtention des séquences

L'intron 1 de la transthyréine a été amplifié par PCR (voir annexe 2) à partir des extraits d'ADN avec le cycle suivant :

- 4 minutes à 94 °C (dénaturation de l'ADN)
- 35 fois les trois étapes suivantes :
 - 30 secondes à 94 °C (ouverture des ADN double-brin)
 - 40 secondes à température d'hybridation (hybridation des amorces)
 - 40 secondes à 72 °C (synthèse des brins complémentaires à la suite des amorces)
- 7 minutes à 72 °C (allongement final des éventuels brins incomplets)
- pause à 20 °C

La polymérase employée a été la Taq DNA pol. (Qbiogene).

Les sondes utilisées dans un premier temps ont été celles mises au point par Gaubert & Veron (2003), permettant d'amplifier deux fragments disjoints :

Herp5L : 5' AAG TAG CAR TGY CTT MCT C 3'

Herp459H : 5' ACT GCY GCT RTA GTA ATT C 3'

Position des sondes sur l'intron :

Herp5L _____ <Herp459H

(Couple de sondes développé spécifiquement pour amplifier un " premier fragment " d'environ 450 paires de bases chez les *Herpestinae*.)

Températures d'hybridation utilisées : 50 à 54 °C

et

Vivn504L : 5' ACA AAC TAT TTG GTC CTG TG 3'

Vivn807H : 5' CAG TGA GAG GTC AAC GAA 3'

Position des sondes sur l'intron :

_____ Vivn504L _____ <Vivn807H

(Couple de sondes développé spécifiquement pour amplifier un " deuxième fragment " d'environ 300 paires de bases chez les *Viverrinae*, mais ayant été utilisé avec succès chez les *Herpestinae*.)

Températures d'hybridation utilisées : 48 à 52 °C

Puis, l'amplification se révélant très difficile pour *Liberiictis* (premier fragment), et même impossible dans le cas de *G. pulverulenta* (deuxième fragment), les sondes suivantes ont été définies :

Herp35L : 5' GCC ACC TTG TGT TAC TAG GAC 3'

Herp296L : 5' GTT TAT TTC CCT TCA GCT AAT C 3'

Herp854H : 5' AAA RGA TCT GTT CTT TAT GGT G 3'

Position des sondes sur l'intron :

Herp35L _____ Herp296L _____ <Herp854H

Températures d'hybridation utilisées : 52,5 à 57 °C

Ces sondes ont permis d'obtenir la séquence pour *G. pulverulenta* et de compléter la séquence manquant entre les deux brins pour les autres espèces tout en résolvant certaines ambiguïtés qui subsistaient dans les séquences des fragments déjà obtenus.

L'extrait d'ADN de *C. alexandri* étant quasiment épuisé, seule une PCR a pu être effectuée, qui a permis l'obtention de la séquence partielle du " deuxième fragment ". Une nouvelle extraction d'ADN n'a pas été envisagée, étant donnée la disponibilité dans Genbank de la séquence pour une espèce proche (*C. obscurus*).

Les produits de PCR purifiés suivant le protocole figurant en annexe 3 ont servi à un séquençage par la

méthode des didésoxynucléotides terminateurs à fluorochromes, à l'aide d'un séquenceur automatique (séquenceur *CEQ2000 Beckman à capillaires courts, version 4.3.9*) (voir annexe 4).

Les données brutes lues par le séquenceur automatique ont ensuite été analysées par CEQAnalysis (logiciel associé au séquenceur) ce qui a fourni des chromatogrammes calibrés et une interprétation en terme de séquence nucléotidique. Ces séquences ont été assemblées et réinterprétées "à la main" à l'aide du logiciel Sequencher version 4.1.4 (*Gene Codes Corporation, 2003*), puis alignées "à la main" à l'aide du logiciel Se-Align (Rambaut, 1996).

L'alignement de TrI1 est relativement évident pour les séquences des *Feliformia*. En revanche, la séquence des *Caniformia* comporte une grande insertion assez variable qui a été en grande partie exclue de l'analyse car l'alignement de nombre de ses portions est très ambigu.

Les indels mis en évidence par l'alignement ont été codés dans une matrice supplémentaire qui a été utilisée lors des analyses en maximum de parcimonie comprenant TrI1.

Les séquences du ND2 et du cytochrome b ont été récupérées sur Genbank ou obtenues auprès de Mélanie Perez et Géraldine Veron. L'alignement de ces séquences, qui codent des protéines mitochondriales, se fait sans hésitation possible, car elles ne comprennent pas d'insertions ou de délétions.

2.3 Établissement d'une matrice de caractères morphologiques et chromosomiques

Les caractères crâniens donnés potentiellement informatifs au sein des mangoustes dans l'étude de Veron (1995) ont été repris pour être adaptés à l'échantillonnage étudié ici. Ceci a impliqué des changements dans leur définition et leur codage. D'autres caractères crâniens ont été définis suite à des observations personnelles.

Quelques caractères ont également été définis d'après l'observation de peaux.

Dans la matrice morphologique, le genre *Bdeogale* est composite ; les caractères crâniens sont tirés de l'observation de spécimens de *B. crassicauda* et les caractères externes sont tirés de l'observation de peaux de *B. nigripes*.

Dans la plupart des cas, les caractères ont été vérifiés sur plusieurs échantillons d'une même espèce.

Des caractères concernant le caryotype et le nombre de mamelles ont été tirés de la littérature (Couturier & Dutrillaux, 1985 ; Estes, 1991 ; Fredga, 1972 ; Skinner & Smithers, 1990).

Dans un souci de simplification de la rédaction, on considérera les caractères chromosomiques comme faisant partie des "caractères morphologiques".

3 Analyses

Les analyses ont été effectuées avec le logiciel PAUP* version 4.0b10 (Swofford, 2002), avec pour critère d'optimalité la parcimonie, qui présente l'avantage d'être applicable aussi bien aux données moléculaires (avec codage des introns, dans le cas de TrI1) que morphologiques.

3.1 Analyse des données moléculaires

Diverses espèces de *Feliformia*, dont les séquences pour TrI1, ND2 et CytB étaient disponibles sur Genbank, ont été incluses dans les analyses pour plusieurs raisons :

- vérifier que les hyènes se placent bien comme groupe frère du groupe (mangoustes + carnivores malgaches),
- disposer de taxons apparentés à des degrés divers au groupe d'étude pour polariser au mieux les caractères.

Des *Caniformia* ont été ajoutés comme groupe externe à garder en polytomie basale, ce qui permettra,

en laissant les féliniformes “ s’organiser librement ”, d’avoir une idée des relations entre eux. Ainsi, on pourra vérifier la position des hyènes et éventuellement connaître le deuxième groupe externe le plus proche. On ne s’intéressera pas aux relations entre les *Caniformia*.

En vue des analyses combinées, une matrice a été constituée par l’assemblage des 4 matrices moléculaires (TrI1 et ses indels, ND2, CytB) et comprenant tous les taxons pour lesquels les données manquantes n’étaient abondantes pour aucun des trois gènes. Quelques espèces étaient représentées par les séquences de deux individus, mais pour certains gènes seulement. Dans ces cas (*G. sanguinea*, *G. pulverulenta* et *I. albicauda*), les séquences du seul individu représenté pour les autres gènes ont été dupliquées pour éviter un éventuel biais lié au choix de la séquence à conserver dans le cas où un seul individu aurait été utilisé pour chaque espèce.

Quelques espèces supplémentaires, dont les séquences sont disponibles pour deux marqueurs seulement ont été ajoutées à la matrice. Ces espèces étaient retirées de l’analyse quand elles étaient absentes du (ou de l’un des) jeu(x) de données analysé(s).

Une deuxième matrice a été assemblée par l’ajout à la précédente du jeu de données morphologiques dans lequel les états ont été recodés en lettres (0 -> A, 1 -> T, 2 -> C, 3 -> G).

Toutes les analyses ont été effectuées après retrait des caractères non informatifs.

3.1.1 Analyses séparées

Chaque jeu de données (TrI1 et ses indels, ND2, CytB) a été analysé en maximum de parcimonie.

Une évaluation du caractère non aléatoire des données a été faite en estimant la valeur du g_1 (*skewness*) de la distribution des longueurs des arbres, sur un échantillon aléatoire de 10 000 000 arbres (Hillis & Huelsenbeck, 1992). Un g_1 trop proche de 0 signalerait des données peu structurées.

La recherche des arbres les plus courts a été effectuée par l’algorithme de *Tree Bisection and Reconnection* (TBR) appliqué à 1000 arbres obtenus par une séquence aléatoire d’addition des taxons. Les valeurs de bootstrap des noeuds ont été calculés sur 1000 rééchantillonnages des données, chaque rééchantillonnage étant soumis à une analyse par l’algorithme TBR portant sur 10 arbres obtenus par séquence aléatoire d’addition des taxons.

Les indices de Bremer ont été calculés en effectuant des recherches contraintes pour ne pas contenir le noeud évalué, par TBR sur 100 arbres obtenus par séquence aléatoire d’addition des taxons. Les indices de Bremer relatifs à la longueur des données sur l’arbre (*Relative Bremer Support*, ou RBS) ont été calculés.

3.1.2 Analyses combinées

Les jeux de données moléculaires ont été combinés deux à deux, et les trois ensemble.

Les mêmes analyses que pour les jeux de données séparés ont été effectuées sur les jeux de données combinés. Dans le cas de l’analyse comprenant les trois marqueurs, des indices de Bremer partitionnés ont été calculés selon la méthode expliquée par Baker *et al.* (1998).

Les indices de Bremer partitionnés (ou PBS, pour *Partitioned Bremer Support*) permettent de se faire une idée de l’apport des différentes partitions au soutien des noeuds. Un PBS négatif pour un noeud indique que la partition concernée est contrainte à plus de transformations dans l’arbre le plus parcimonieux contenant le noeud que dans l’arbre le plus parcimonieux ne contenant pas ce noeud. Les valeurs des PBS relatives à la longueur de la partition sur l’arbre le plus parcimonieux (RPBS) ont également été calculées.

3.2 Utilisation des données morphologiques

Pour l’analyse séparée des données morphologiques, *Crocota* (*Hyaenidae*) et les carnivores malgaches

ont été pris comme groupe externe. Cette analyse ne donnant qu'un arbre très peu résolu, il a été décidé de se baser sur les arbres obtenus grâce aux données moléculaires pour discuter des caractères morphologiques. On a donc construit un arbre comprenant les nœuds retenus comme “ bien soutenus ” lors de l'analyse des données moléculaires (arbitrairement définis comme étant les nœuds soutenus par une valeur de bootstrap d'au moins 70 % et un RBS supérieur à 0,06 %), et non contradictoires entre eux (arbre A).

Cet arbre étant entièrement basé sur les données moléculaires, certaines espèces représentées dans la matrice morphologique, mais non dans les matrices moléculaires, n'y sont pas placées (*Dologale dybowskii*, *Eupleres goudotii*, *Herpestes brachyurus* et *Salanoia concolor*).

Une analyse combinée comprenant les données morphologiques et moléculaires a donc été effectuée pour voir comment ces espèces se “ greffent ” sur l'arbre A, sur la base des caractères morphologiques (dans les cas d'*Eupleres* et de *Salanoia*, les séquences disponibles pour le cytochrome B ont également été mises à contribution). Cette recherche a été effectuée par l'application de l'algorithme TBR à 1000 arbres obtenus par séquence aléatoire d'addition des taxons et en imposant l'arbre A comme contrainte de type *backbone* (PAUP* ne retient alors que les arbres pouvant être ramenés à cet arbre par l'élimination des taxons en trop et l'effondrement de certaines branches).

Parmi les 10 arbres obtenus, 5 donnent *Mungos* polyphylétique, ce qui n'est pas soutenu par l'analyse des données morphologiques seules (*Mungos* est même monophylétique dans tous les arbres obtenus par cette analyse). On retient donc le consensus strict des 5 autres arbres (arbre B).

Les séries de transformation des caractères morphologiques ont été visualisées avec MacClade (Maddison & Maddison, 1999) sur le sous-arbre de l'arbre B comprenant les taxons étudiés en morphologie (arbre C).

4 Résultats

4.1 Séquences obtenues

Les séquences TrI1 suivantes ont été obtenues :

Espèce	Longueur (pb)	Taux de A	Taux de C	Taux de G	Taux de T
<i>Atilax paludinosus</i>	794	0.29345	0.22418	0.18892	0.29345
<i>Bdeogale crassicauda</i>	754	0.29443	0.21751	0.19150	0.29656
<i>Bdeogale nigripes</i>	794	0.29471	0.22418	0.18766	0.29345
<i>Crossarchus alexandri</i>	188	0.26064	0.23936	0.21809	0.28191
<i>Galerella pulverulenta</i>	753	0.28590	0.22340	0.19548	0.29521
<i>Galerella sanguinea</i> (séquence composite)	794	0.28967	0.23609	0.18892	0.28532
<i>Helogale hirtula</i>	757	0.28930	0.21929	0.19419	0.29723
<i>Helogale parvula</i>	797	0.28858	0.22836	0.19072	0.29235
<i>Herpestes ichneumon</i> (séquence composite)	758	0.29288	0.22032	0.18997	0.29683
<i>Herpestes naso</i>	794	0.29597	0.22166	0.18892	0.29345
<i>Ichneumia albicauda</i>	758	0.28834	0.22543	0.19657	0.28966
<i>Liberiictis kuhni</i>	748	0.29507	0.22097	0.19118	0.29278
<i>Rhynchogale melleri</i>	795	0.29686	0.22752	0.18365	0.29198

Une séquence d'*Herpestes ichneumon* était déjà disponible sur Genbank (AY232611), mais il semble qu'elle contienne la séquence d'une des sondes (Vivn504L) (comparer aussi AY232612 et AY170018 ; AY232612 est peut-être sujette au même problème). C'est pour cette raison qu'une nouvelle séquence a été faite pour cette espèce. Les séquences de *G. sanguinea* et d'*H. ichneumon* utilisées comprennent des fragments de deux individus chacune, des difficultés ayant entraîné l'usage de plusieurs extraits d'ADN différents. Étant donnée la faible variabilité de TrI1, cela ne devrait pas poser de problèmes.

Caractère	Caractères crâniens	États codés	Ordre éventuel
1	palais:	rectangulaire:0 très légèrement triangulaire:1 largeur entre les molaires nettement supérieure à celle entre les canines:	0<->1<->2
2	ligne (arrière du nasal -> bord antérieur de l'orbite) croise la mâchoire en:	PM3: 0 PM3-PM4:1 PM4:2 M1:3	0<->1<->2<->3
3	contact jugal-lacrymal	oui:0 non:1	
4	bord latéral de l'orbite composé de:	frontal-lacrymal-jugal:0 frontal-maxillaire-jugal-lacrymal:1 frontal-maxillaire-jugal:2	
5	dans la partie antérieure de l'orbite, le maxillaire s'étend un peu sous le lacrymal	oui:0 non:1	
6	dans la partie antérieure de l'orbite, le maxillaire s'étend un peu au dessus du lacrymal	oui:0 non:1	
7	contact prémaxillaire-frontal	oui:0 non:1	
8	contact alisphénoïde-pariétal	oui:0 non:1	
9	canal alisphénoïde:	présent:0 absent:1	
10	foramen postérieur du canal alisphénoïde:	en arrière de la base du processus ptérygoïde:0 à côté:1 nettement en avant:2	0<->1<->2
11	processus du jugal et du frontal:	courts:0 longs:1 ferment nettement l'orbite:2	0<->1<->2
12	méat auditif:	circulaire:0 triangle subéquilatéral:1 aplati:2	
13	foramen postérieur du canal carotidien:	entre entotympanique et basioccipital (ou basisphénoïde):0 dans l'entotympanique:1 entre ento- et ectotympanique:2	
14	tube auditif externe:	absent:0 présent:1	
15	bord interne de l'ectotympanique plus interne que celui de l'entotympanique	oui:0 non:1	
16	ectotympanique:	plutôt arrondi:0 allongé vers l'extérieur:1	
17	l'entotympanique chevauche l'ectotympanique côté interne et remonte assez vers l'avant	non:0 oui:1	
18	l'entotympanique chevauche l'ectotympanique côté interne au moins légèrement	non:0 oui:1	
19	l'entotympanique chevauche légèrement l'ectotympanique côté externe	non:0 oui:1	
20	distance entre le méat auditif et le processus incisives supérieures:	grande:0 moyenne:1 petite:2 nulle:3	0<->1<->2<->3
21	P1:	présente:0 absente:1	
22	p1:	présente:0 absente:1	
23	racine de l'arcade zygomatique:	en avant de M1:0 au niveau de M1:1 en arrière de M1:2	0<->1<->2
24	cuspidé linguale de P3:	absente:0 légère:1 bien marquée:2	0<->1<->2
25	talonide de m1:	assez développé:0 moyennement développé:1 peu développé:2 réduit ou absent:3	0<->1<->2<->3
26	paraconide de m1:	nettement en avant du protoconide:0 peu en avant:1	
27	paraconide et métaconide de m1:	écartés:0 rapprochés:1 très rapprochés:2	0<->1<->2
28	angle à l'arrière du maxillaire:	très marqué:0 moyennement marqué:1 peu marqué:2	0<->1<->2
29	autres caractères		
30	pollex:	présent:0 absent:1	
31	hallux:	présent:0 absent:1	
32	le sillon sur le rhinarium remonte sur le dessus	non:0 oui:1	
33	le sillon sur le rhinarium descend jusqu'à la lèvre	non:0 oui:1	
34	fouffure:	fine:0 intermédiaire:1 épaisse:2	0<->1<->2
35	longueur de la queue par rapport à la longueur entre la base de la queue et les épaules:	nettement inférieure: 0 à peu près égale:1 nettement supérieure:2	0<->1<->2
36	pointe de la queue:	"simple":0 noire:1 plumeau noir:2	
37	queue:	fine:0 intermédiaire:1 épaisse:2	0<->1<->2
38	longs poils à la base de la queue	non:0 oui:1	
39	griffes avant longues et courbes	non:0 oui:1	
40	nombre de chromosomes chez la femelle:	36:0 plus de 36:1	
41	Chromosome Y:	libre:0 transloqué:1	
42	zone nue en arrière du pollex:	plus longue que la zone contenant les doigts:0 à peu près de la même longueur:1 plus courte:2	
43	zone nue en arrière du hallux:	plus longue que la zone contenant les doigts:0 à peu près de la même longueur:1 plus courte:2	
44	mamelles:	4:0 6:1	

Tableau 2. Caractères morphologiques et chromosomiques utilisés dans cette étude.

La séquence de *C. obscurus* est très partielle car l'extrait d'ADN disponible n'a pu servir qu'à une PCR.

Les fragments d'ADN des deux *Herpestes* asiatiques *H. brachyurus* et *H. urva* n'ont malheureusement pas pu être amplifiés ; l'ADN étant probablement trop dégradé.

Les séquences ayant été obtenues à partir de sondes internes, elles ne sont pas tout à fait complètes. Les séquences complètes des autres *Herpestinae* font entre 836 et 838 pb. Parmi les espèces incluses dans les analyses, la séquence la plus longue est celle du loup, avec 1060 pb. On constate un déficit en G et un excès en A et T semblables chez toutes ces espèces.

L'alignement des séquences TrI1 fait apparaître 36 introns informatifs du point de vue de la parcimonie (si l'on exclut ceux compris dans la partie ambiguë de la grande insertion des caniformes).

4.2 Caractères morphologiques obtenus

Parmi les 44 caractères retenus, nombreux se sont révélés polymorphes au sein d'une même espèce, et dans de nombreux cas, les limites entre états de caractère sont très difficiles à apprécier. Les caractères utilisés sont donnés dans le tableau 2 (on pourra se référer à la planche anatomique présentée en annexe 6). Convention : les dents de la mâchoire inférieure sont notées par une lettre minuscule, celles de la mâchoire supérieure par une majuscule.

La matrice de caractères résultant de cette étude est donnée en annexe 7.

4.3 Analyses séparées

Le tableau suivant résume les résultats des analyses séparées en maximum de parcimonie :

	TrI1	ND2	CytB	morphologie
taxons inclus	44	42	46	34
dont groupe externe	8	6	8	9
caractères informatifs	409	528	510	43
gI	-0,81	-0,42	-0,40	-0,41
nombre d'arbres les plus parcimonieux	120	12	1	208
longueur	830	3140	3706	306
CI	0,649	0,294	0,243	0,647
RI	0,840	0,462	0,438	0,722

4.3.1 TrI1

On peut remarquer une valeur de gI fortement négative pour TrI1, le critère de parcimonie doit donc permettre de discriminer des arbres essentiellement structurés par un signal qu'on suppose " historique " (arbres loin d'être aléatoires).

L'arbre de bootstrap (plus résolu que le consensus strict des arbres les plus parcimonieux) est présenté en figure 1. Il donne *Nandinia* groupe frère des autres féliniformes, soutient bien la monophylie des carnivores malgaches, des *Galidiinae* et des *Herpestinae*. Il soutient bien la monophylie de l'ensemble (*Herpestinae* + carnivores malgaches) mais ne donne pas de façon bien soutenue le groupe-frère de cet ensemble. Il ne donne pas non plus la monophylie des mangoustes sociales et ne résout pas de façon satisfaisante les relations entre les divers groupes d'*Herpestinae*. Certains des regroupements terminaux qui apparaissent dans l'analyse des données mitochondriales (Perez *et al.*, en préparation ; la présente

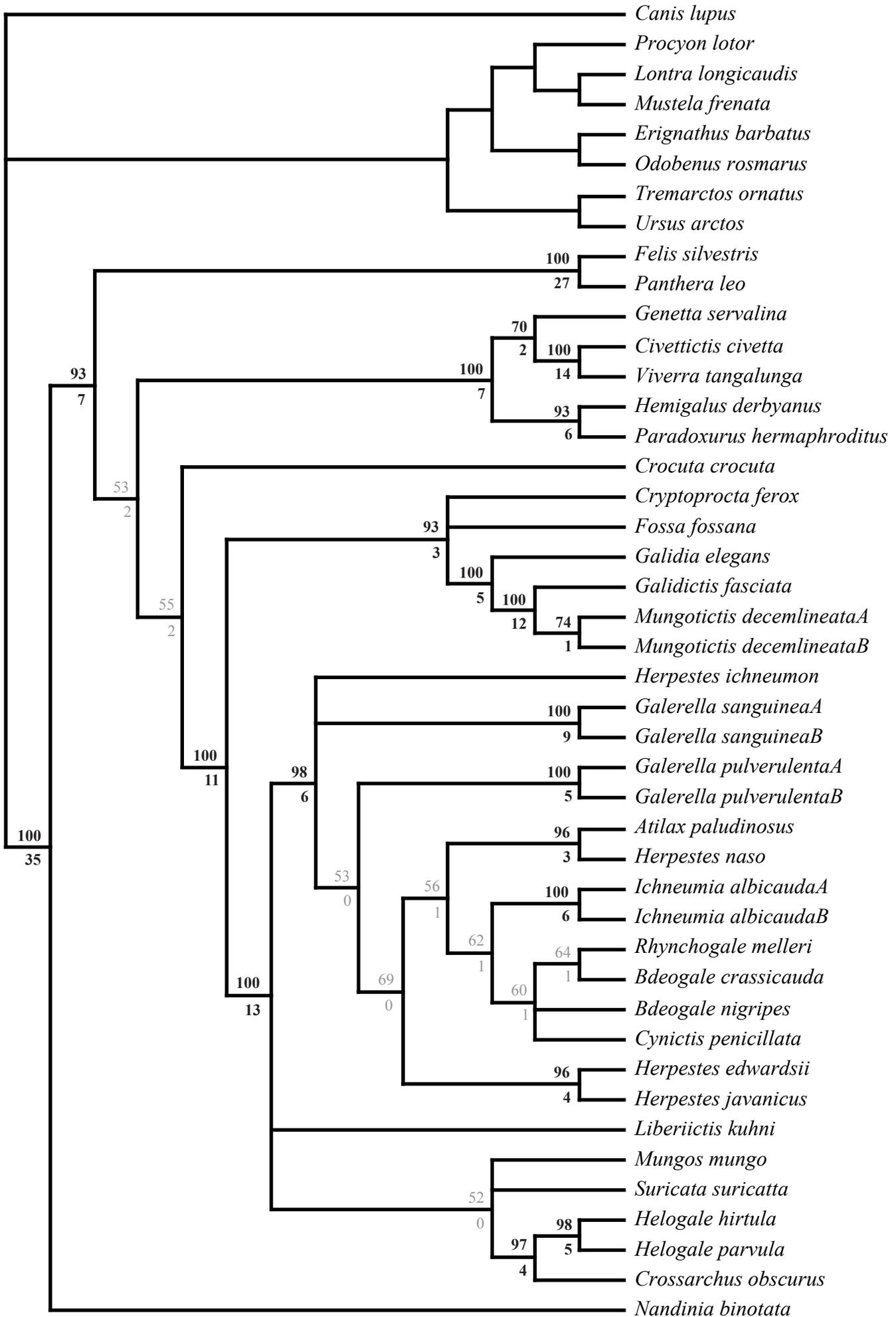


Figure 1. Arbre de bootstrap pour 1000 rééchantillonnages des données TrI1, valeurs de bootstrap au dessus des branches et indices de Bremer en dessous, indices en gras pour les noeuds " bien soutenus "

étude) sont confirmés.

4.3.2 Gènes mitochondriaux

Voir arbres en annexes 8 et 9.

4.3.3 Morphologie

L'analyse des données morphologiques donne 208 arbres dont le consensus est le suivant :

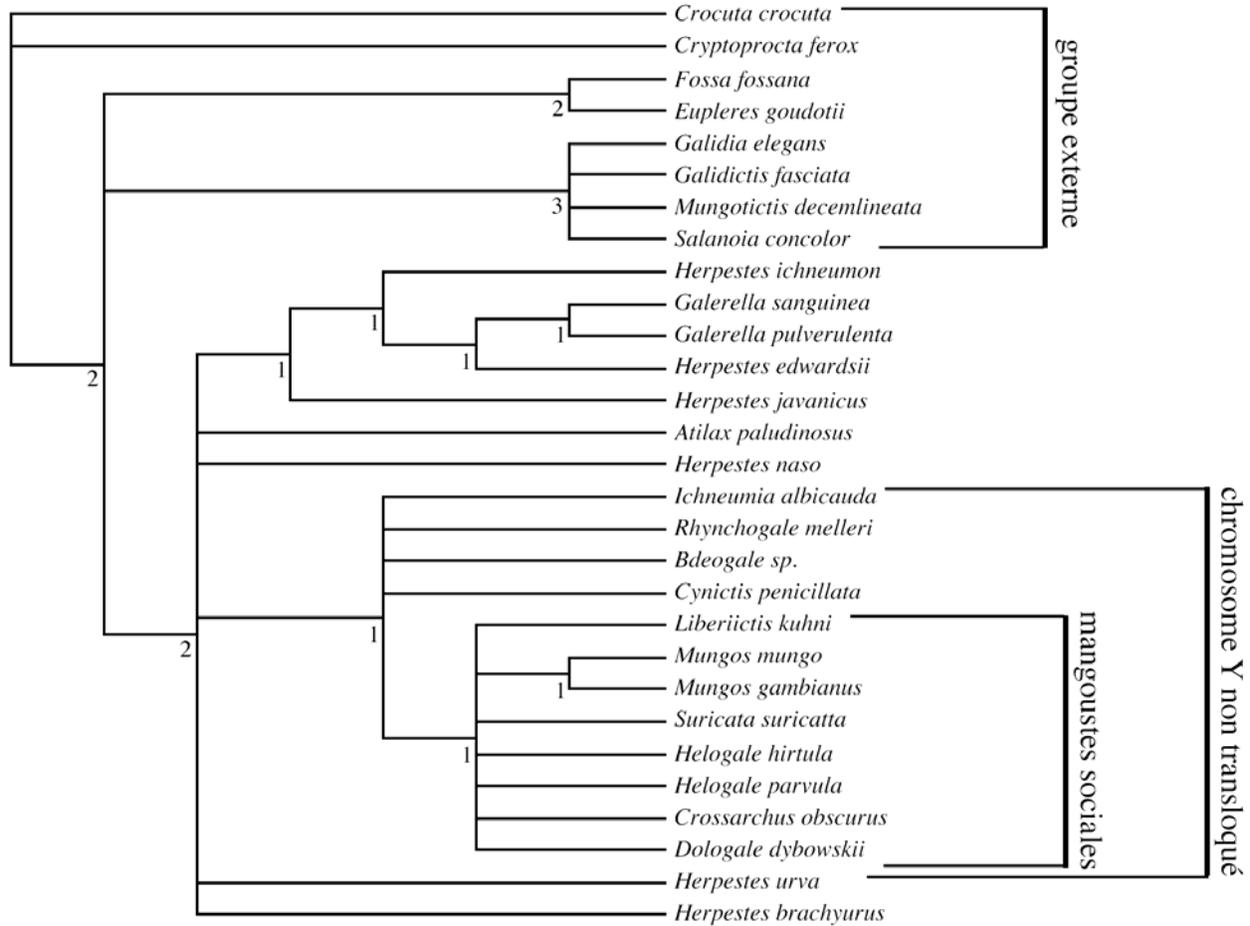


Figure 2. Consensus des 208 arbres les plus parcimonieux obtenus par l'analyse des données morphologiques, indices de Bremer sous les branches

On peut noter que tous les arbres les plus courts donnent la monophylie des mangoustes sociales, et au sein de celles-ci, la monophylie du genre *Mungos*.

4.4 Analyses combinées

Le tableau suivant résume les résultats des analyses combinées en maximum de parcimonie (N désigne ND2 ; C, CytB ; et T, TrI1) :

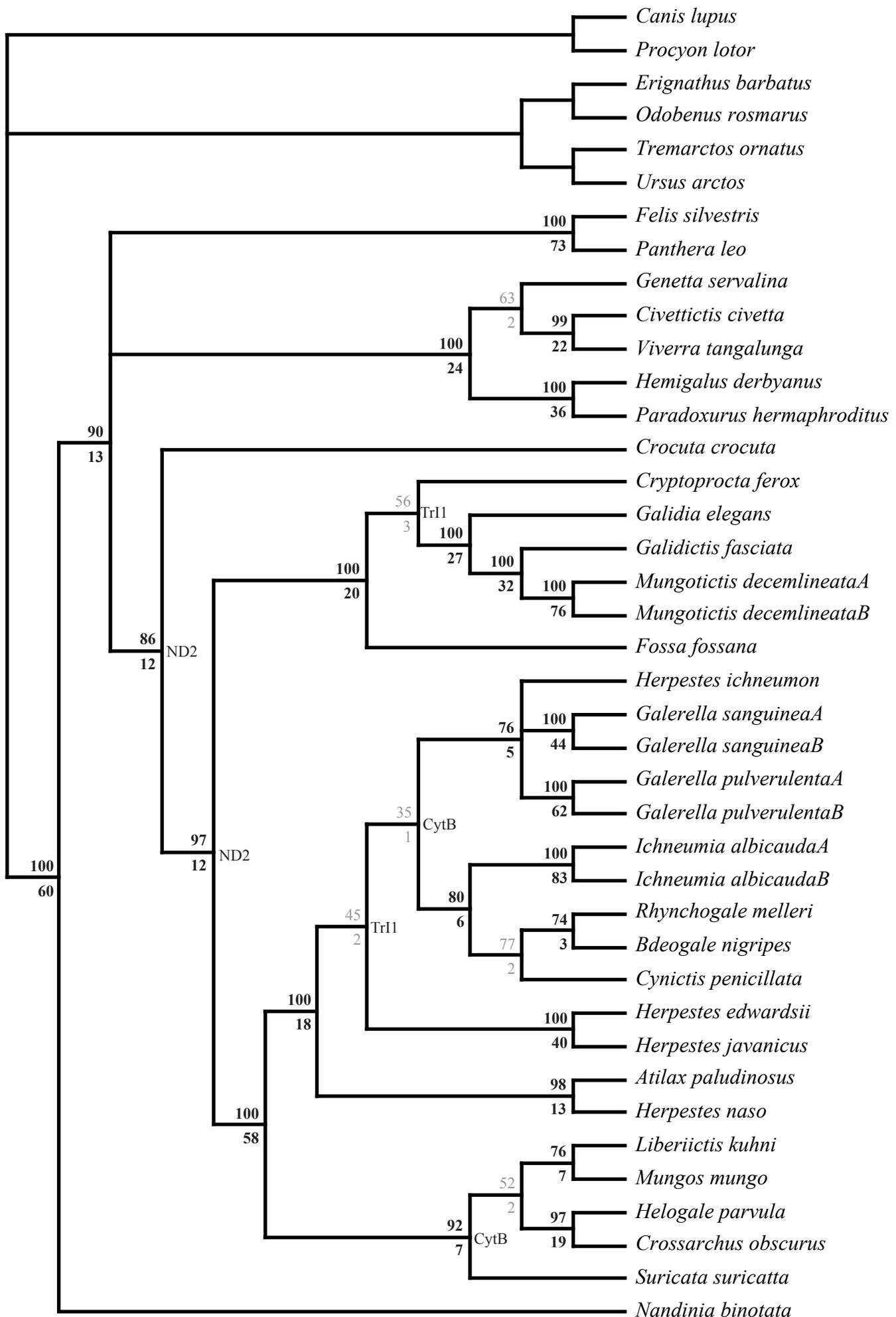


Figure 3. Consensus des 6 arbres les plus parcimonieux pour les données moléculaires combinées, valeurs de bootstrap au dessus des branches et indices de Bremer en dessous, indices en gras pour les noeuds " bien soutenus ", les partitions donnant un RPBS < - 0,06 % sont signalées au noeud concerné

	N+C	T+N	T+C	T+C+N
taxons inclus	42	40	44	40
dont groupe externe	6	6	8	6
caractères informatifs	1028	876	917	1374
g1	-0,44	-0,53	-0,53	-0,48
nombre d'arbres les plus parcimonieux	18	1	1	6
longueur	6524	3772	4452	7060
CI	0,275	0,367	0,321	0,318
RI	0,446	0,558	0,544	0,501

Les arbres obtenus pour l'analyse des données combinées deux à deux sont donnés en annexes 10, 11 et 12.

L'analyse combinée des trois gènes donne 6 arbres les plus parcimonieux dont le consensus strict est présenté en figure 3.

Le graphe suivant donne une idée de la contribution des partitions au soutien des noeuds de l'arbre :

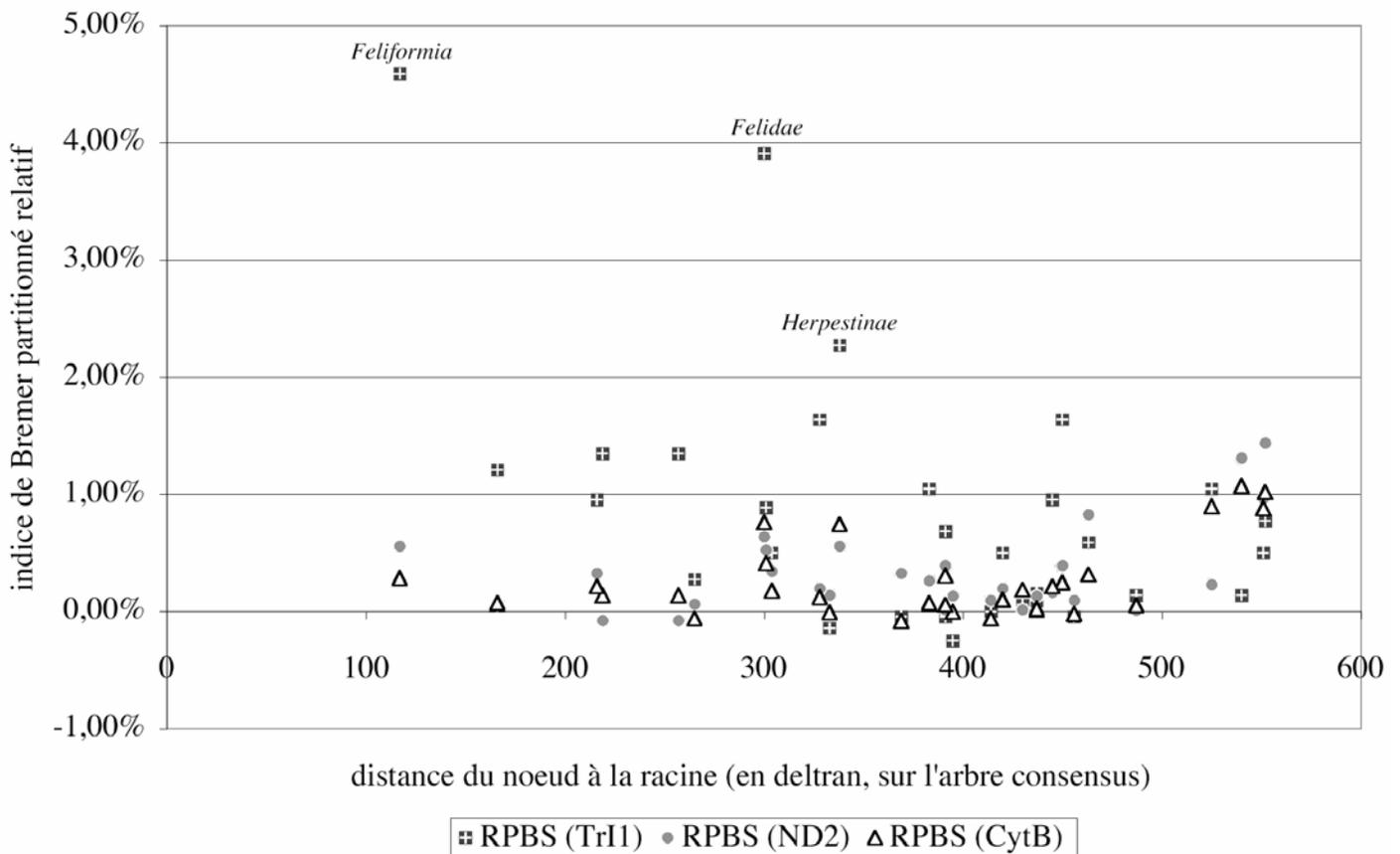


Figure 4. Contribution des trois partitions au soutien des noeuds de différentes profondeurs

RPBS : *Relative Partitioned Bremer Support*

(indices de Bremer partitionnés divisés par la longueur moyenne de la partition sur les arbres les plus courts de l'analyse combinée)

TrI1 semble mieux contribuer aux noeuds " anciens " qu'aux noeuds " récents ", ce qui n'est pas le cas pour les gènes mitochondriaux.

À l'issue des 7 analyses moléculaires, les noeuds " bien soutenus " (valeur de bootstrap ≥ 70 % et RBS $> 0,06$ %) sont tous compatibles entre eux (aux taxons manquant pour certains jeux de données près). Ils permettent de définir l'arbre A (figure 5)

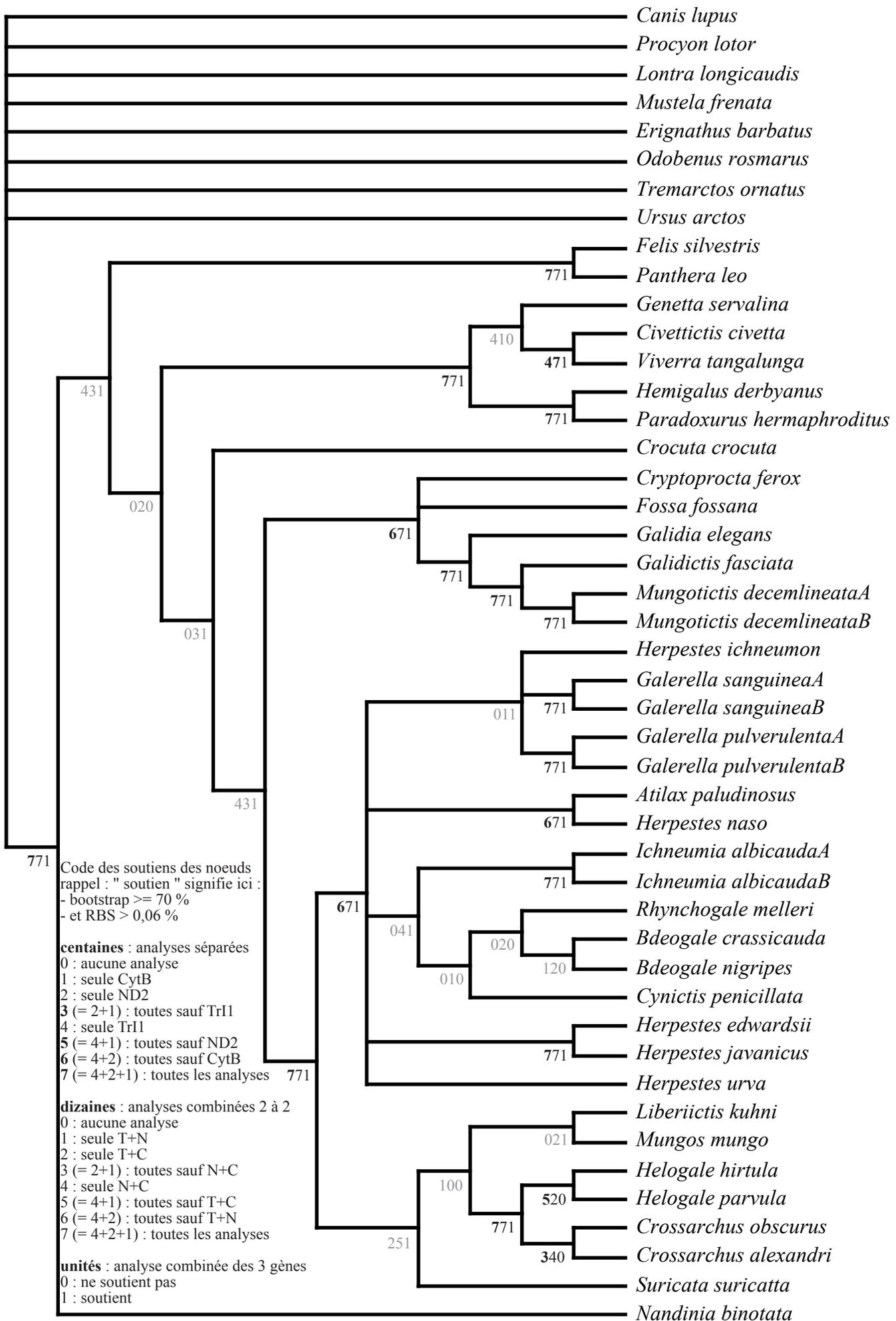


Figure 5. Arbre A, assemblage des noeuds considérés comme bien soutenus par au moins une des analyses des données moléculaires

pour chaque noeud est indiqué quelles analyses soutiennent le noeud ou quelles analyses ne soutiennent pas le noeud (voir code) en gras : portion du code indiquant un soutien par au moins deux analyses indépendantes

L'analyse combinée, incluant la matrice morphologique et les matrices moléculaires, donne les mêmes 10 arbres les plus courts, qu'elle soit contrainte ou non par l'arbre A. Le consensus des 5 arbres où *Mungos* n'est pas polyphylétique (arbre B, présenté en annexe 13) ne présente pas d'autres irrésolutions que celles concernant les mangoustes sociales. Il faut toutefois garder à l'esprit que les relations qu'il donne entre les principaux groupes d'*Herpestinae* ne sont pas toujours bien soutenues. La discussion des caractères morphologiques se basant sur l'arbre C (figure 6), extrait de cet arbre B, demande donc d'être considérée en gardant à l'esprit les réserves nécessaires.

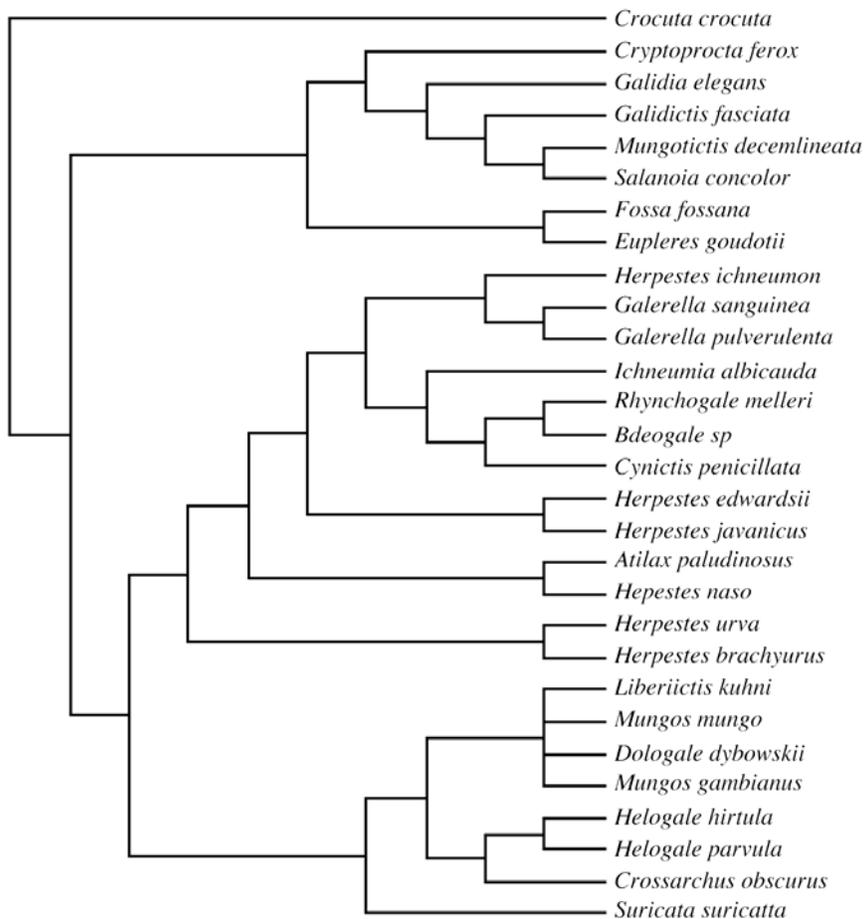


Figure 6. Arbre C, extrait du consensus des 5 arbres les plus parcimonieux ne donnant pas *Mungos* polyphylétique lors de l'analyse des données moléculaires et morphologiques combinées

4.5 Étude morphologique

L'étude des transformations des caractères sur l'arbre C permet de mettre en évidence certains caractères mieux " structurés " que d'autres (CI et RI donnés par MacClade sur l'arbre C) :

Caractère 1 (CI = 0,29 ; RI = 0,58) : on observe chez les *Galidiinae* et chez les *Herpestinae* un palais nettement moins triangulaire que chez les autres espèces.

Caractère 7 (CI = 0,63 ; RI = 0,70) : pourrait soutenir un clade (*Bdeogale*, *Rhynchogale*, *Cynictis*, *Ichneumia*, *Galerella*, *H. ichneumon*, *H. edwardsii*, *H. javanicus*), caractérisé par l'acquisition d'un contact prémaxillaire-frontal. Ce caractère est toutefois variable chez *Rhynchogale* et *Ichneumia*.

Caractère 9 (CI = 0,67 ; RI = 0,75) : soutient le clade des *Galidiinae*, caractérisé par la perte du canal

alispnénoïde.

Caractère 10 (CI = 0,80 ; RI = 0,71) : les *Herpestinae* tendent à présenter un foramen postérieur du canal alispnénoïde plutôt en avant par rapport à la base du processus ptérygoïde.

Caractère 11 (CI = 0,94 ; RI = 0,88) : les *Herpestinae* ont en général des processus du jugal et du frontal plus développés que les autres espèces, donc des orbites plus refermées postérieurement.

Caractère 12 (CI = 0,82 ; RI = 0,80) : soutient un clade (*Helogale*, *Crossarchus*, *Dologale*, *Liberiictis*, *Mungos*), caractérisé par un méat auditif aplati.

Caractère 16 (CI = 0,67 ; RI = 0,88) : les mangoustes “ sociales ” sont caractérisées par une chambre antérieure de la bulle tympanique (ectotympanique) allongée vers l’extérieur (voir figure 7). Ce caractère apparaît également chez *H. urva* et *H. brachyurus* ; il pourrait donc être ancestral chez les *Herpestinae* et avoir subi une réversion chez l’ancêtre d’un clade (*Atilax*, *H. naso*, *H. edwardsii*, *H. javanicus*, *H. ichneumon*, *Galerella*, *Ichneumia*, *Cynictis*, *Rhynchogale*, *Bdeogale*).

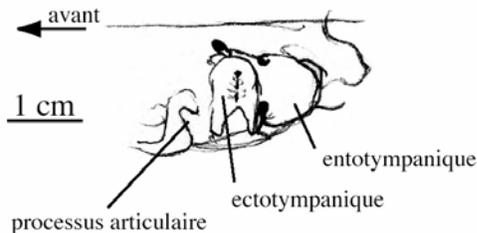


Figure 7. Bulle tympanique droite de *Crossarchus obscurus* (specimen CG 1895-17), vue de dessous

Caractère 17 (CI = 1, RI = 1) : pourrait soutenir un clade (*Cryptoprocta*, *Eupleres*, *Fossa*), caractérisé par une chambre postérieure de la bulle tympanique chevauchant la chambre antérieure sur son bord interne et remontant assez vers l’avant.

Caractère 20 (CI = 0,5 ; RI = 0,62) : il semble que l’on puisse caractériser les mangoustes sociales par une tendance au raccourcissement de la distance séparant le méat auditif du processus articulaire (voir figure 7). Les *Galidiinae* sont caractérisés au contraire par un allongement de cette distance.

Caractère 21 (CI = 0,57 ; RI = 0,57) : certains clades tendent à avoir des incisives supérieures disposées en courbe : (*Bdeogale*, *Rhynchogale*, *Cynictis*, *Ichneumia*), (*Helogale*, *Crossarchus*, *Dologale*, *Liberiictis*, *Mungos*) et (*Eupleres*, *Fossa*).

Caractère 22 (CI = 0,86 ; RI = 0,88) : soutient le clade des mangoustes sociales, caractérisées par la perte de la première prémolaire supérieure, cependant, d’après Nowak (1997), *Liberiictis* possède des prémolaires additionnelles par rapport à *Crossarchus*, ce qui n’était pas vérifiable sur le crâne incomplet disponible au MNHN.

Caractère 23 (CI = 0,6 ; RI = 0,82) : soutient un clade (*Eupleres*, *Fossa*), caractérisé par la présence de la première prémolaire inférieure, et pourrait également soutenir un clade des *Herpestinae* “ non-sociaux ”, possédant cette prémolaire à l’état ancestral ; une nouvelle perte aurait alors eu lieu chez l’ancêtre d’un éventuel clade des *Galerella*. On pourrait aussi envisager des pertes indépendantes chez les hyènes, les *Galidiinae*, les mangoustes sociales et *Galerella*.

Caractère 24 (CI = 0,54 ; RI = 0,63) : malgré le fort polymorphisme, il semblerait que les mangoustes sociales présentent une tendance à avoir la racine de l’arcade zygomatique plutôt en arrière de la première molaire supérieure. De même pour le clade (*Bdeogale*, *Rhynchogale*, *Cynictis*, *Ichneumia*).

Caractère 25 (CI = 0,70 ; RI = 0,73) : soutient le clade (*Bdeogale*, *Rhynchogale*, *Cynictis*, *Ichneumia*), caractérisé par une cuspide linguale de la troisième prémolaire supérieure assez marquée. Les carnivores malgaches présentent une tendance à la réduction voire à la perte de cette cuspide.

Caractère 26 (CI = 0,33 ; RI = 0,60) : il semble y avoir une tendance au développement du talonide de la première molaire inférieure chez les *Herpestinae*, en particulier chez les mangoustes sociales.

Caractère 27 (CI = 0,5 ; RI = 0,88) : soutient le clade (*Bdeogale*, *Rhynchogale*) et le clade des

mangoustes sociales, caractérisés à la première molaire inférieure par un paraconide moins en avant par rapport au protoconide que chez les autres espèces.

Caractère 28 (CI = 0,42 ; RI = 0,36) : soutient le clade (*Bdeogale*, *Rhynchogale*), caractérisé par un fort rapprochement du paraconide et du métaconide de la première molaire inférieure (voir figure 8). Le précédent caractère est en partie lié à celui-ci ; une tendance à un tel rapprochement s'observe d'ailleurs aussi chez les mangoustes sociales.

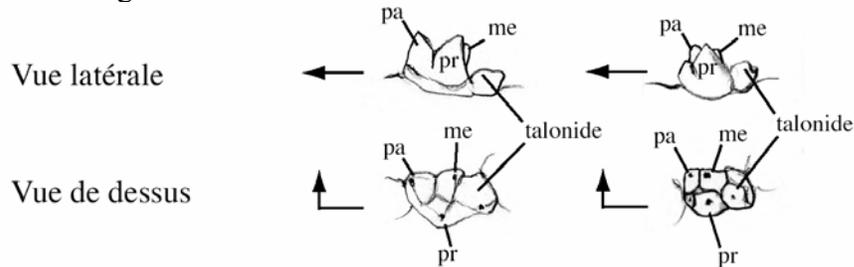


Figure 8. Comparaison entre la première molaire inférieure gauche d'*Atilax paludinosus* (spécimen CG 1995-426, à gauche), et celle de *Bdeogale crassicauda* (spécimen CG 1881-1521, à droite)
pr : protoconide, pa : paraconide, me : métaconide

Caractère 29 (CI = 0,47 ; RI = 0,50) : pourrait soutenir un clade (*Mungotictis*, *Salanoia*), caractérisé par un angle arrière du maxillaire moins marqué que chez les autres *Galidiinae*. Une telle tendance s'observe aussi chez les mangoustes sociales.

Caractère 32 (CI = 0,5 ; RI = 0,75) : soutient le clade des *Galidiinae*, caractérisé par l'extension vers le haut du sillon du rhinarium.

Caractère 33 (CI = 0,33 ; RI = 0,6) : soutient le clade des mangoustes sociales, caractérisé par l'absence de prolongement du sillon du rhinarium jusqu'à la lèvre supérieure. Ce n'est cependant pas le cas pour *Helogale*.

Caractère 35 (CI = 0,25 ; RI = 0,43) : soutient les clades (*H. brachyurus*, *H. urva*) et (*Eupleres*, *Fossa*), caractérisés par une queue nettement plus courte que le corps. Ce caractère pourrait également soutenir les clades (*Galerella*, *H. ichneumon*) et (*H. edwardsii*, *H. javanicus*), caractérisés par une queue nettement plus longue que le corps.

Caractère 37 (CI = 0,2 ; RI = 0,65) : les clades (*Bdeogale*, *Rhynchogale*, *Cynictis*, *Ichneumia*), (*H. brachyurus*, *H. urva*), (*Eupleres*, *Fossa*) et les *Galidiinae* sont caractérisés par une queue épaisse.

Caractère 39 (CI = 0,57 ; RI = 0,57) : pourrait soutenir le clade des mangoustes sociales et le clade (*Mungotictis*, *Salanoia*), caractérisés par une tendance à présenter des griffes particulièrement développées aux pattes avant.

Caractère 40 (CI = 0,5 ; RI = 0,83) : soutient le clade (*Galerella*, *H. ichneumon*), caractérisé par un accroissement du nombre de chromosomes par rapport aux autres *Herpestinae*.

Caractère 41 (CI = 0,5 ; RI = 0,83) : une translocation du chromosome Y sur un autosome pourrait être survenue chez l'ancêtre des mangoustes " non-sociales ", le chromosome Y aurait ensuite retrouvé sa liberté chez l'ancêtre du clade (*Bdeogale*, *Rhynchogale*, *Cynictis*, *Ichneumia*).

Au vu de ces résultats morphologiques, on peut donc caractériser quelques clades :

Galidiinae : palais peu triangulaire (1), perte du canal alisphénoïde (9), grande distance entre la méat auditif et le processus articulaire (20), perte de p1 (23), sillon sur le rhinarium étendu vers le dessus (32), queue épaisse (37).

Herpestinae (au sens de Wozencraft, 1993) : palais plutôt rectangulaire (1), foramen postérieur du canal alisphénoïde en avant de la base du processus ptérygoïdien (10), orbites relativement refermées

postérieurement (11), développement du talonide de m1 (26), ancestralement 36 chromosomes (40).

(*Bdeogale*, *Rhynchogale*, *Cynictis*, *Ichneumia*, *Galerella*, *H. ichneumon*, *H. edwardsii*, *H. javanicus*) : contact prémaxillaire-frontal (7).

(*Helogale*, *Crossarchus*, *Dologale*, *Liberiictis*, *Mungos*) : méat auditif aplati (12), tendance des incisives supérieures à être disposées en courbe (21)

Mangoustes “ sociales ” : ectotympanique allongé vers l’extérieur (16), tendance au raccourcissement de la distance séparant le méat auditif du processus articulaire (20), perte de P1 (22), tendance à avoir la racine de l’arcade zygomatique plutôt en arrière de M1 (24), développement marqué du talonide de m1 (26), paraconide de m1 peu en avant par rapport au protoconide (27), tendance au rapprochement du paraconide et du métaconide de m1 (28), angle arrière du maxillaire peu marqué (29), sillon du rhinarium non prolongé jusqu’à la lèvre supérieure (sauf pour *Helogale*) (33), tendance à présenter des griffes particulièrement développées aux pattes avant (39).

(*Cryptoprocta*, *Eupleres*, *Fossa*) : entotympanique chevauchant l’ectotympanique sur son bord interne et remontant assez vers l’avant (17).

(*Bdeogale*, *Rhynchogale*, *Cynictis*, *Ichneumia*) : incisives supérieures disposées en courbe (mais pas chez *Cynictis*) (21), tendance à avoir la racine de l’arcade zygomatique plutôt en arrière de M1 (24), cuspside linguale de P3 assez marquée (25), queue épaisse (37), chromosome Y “ libre ” (41).

Euplerinae (au sens de Wozencraft, 1993 ; *Eupleres*, *Fossa*) : incisives supérieures disposées en courbe (21), présence de p1 (23), queue courte (35) et épaisse (37).

Herpestinae “ non-sociaux ” : présence de p1 (23) et chromosome Y transloqué sur un autosome (41), à l’état ancestral.

Galerella : perte de p1 (23).

Carnivores malgaches : réduction de la cuspside linguale de P3 (25)

(*Bdeogale*, *Rhynchogale*) : paraconide de m1 peu en avant par rapport au protoconide (27), paraconide et du métaconide de m1 très rapprochés (28)

(*Mungotictis*, *Salanoia*) : angle arrière du maxillaire peu marqué (29), tendance à présenter des griffes particulièrement développées aux pattes avant (39).

(*H. brachyurus*, *H. urva*) : ectotympanique allongé vers l’extérieur (16), queue courte (35) et épaisse (37).

(*Galerella*, *H. ichneumon*) : queue particulièrement longue (35), accroissement du nombre de chromosomes (40).

(*H. edwardsii*, *H. javanicus*) : queue particulièrement longue (35).

5 Discussion

5.1 De l'apport de TrI1 pour la phylogénie des mangoustes

Ce marqueur n'a pas apporté à la phylogénie des mangoustes la résolution escomptée pour les noeuds basaux. On a pu cependant vérifier, notamment par le calcul des indices de Bremer partitionnés, que son apport au soutien de certains noeuds profonds était important (voir figure 4). Le bon soutien de la monophylie de l'ensemble (mangoustes + carnivores malgaches) et de la position des hyènes en groupe-frère de cet ensemble dépendent de la présence de TrI1 dans le jeu de données analysé (voir l'arbre A). L'intron 1 de la transthyréine manque probablement de variabilité pour le présent sujet (114 caractères informatifs pour l'ensemble (carnivores malgaches + mangoustes), 73 pour les *Herpestinae*). Nous n'avons pu que reproduire les résultats de Flynn & Nedbal (1998) concernant les relations entre les familles de félifformes et renforcer la fiabilité de certains clades obtenus par l'étude seule des données mitochondriales (voir l'arbre A).

Le manque de résolution des noeuds basaux pourrait s'expliquer en partie aussi par la qualité médiocre de la séquence de *Liberiictis*. Celle-ci est en effet un peu courte et comprend quelques positions incertaines, ce qui explique peut-être que *Liberiictis* ne soit pas placée de manière robuste au sein des mangoustes sociales dans l'analyse de TrI1 seul (voir figure 1). Une analyse de TrI1 en maximum de vraisemblance (non présentée) place même *Liberiictis* en groupe-frère des *Herpestinae* "non-sociaux". Il ne semble pourtant pas douteux que *Liberiictis* soit apparentée aux autres mangoustes sociales ; elle partage notamment avec celles-ci une délétion apomorphe située vers les trois quart de la séquence de TrI1 et quelques belles plésiomorphies dans cette séquence, qui la distinguent des *Herpestinae* "non-sociaux", de plus, les analyses des données mitochondriales et morphologiques la placent parmi les mangoustes sociales. On pourrait donc proposer ici l'hypothèse, appuyée par le nombre de prémolaires, que *Liberiictis* se place à la base des mangoustes sociales.

5.2 De la difficulté de définir des caractères morphologiques de qualité

De nombreux caractères morphologiques pris en compte dans cette étude sont par nature continus. Pour pouvoir les utiliser dans une analyse cladistique, il faut les discrétiser. Plusieurs problèmes se posent alors. Doit-on discrétiser en utilisant des mesures absolues sur les spécimens ou des rapports entre les mesures de différents éléments de la morphologie ? Il est possible que des connaissances sur les modalités du développement puissent aider à choisir entre les deux dans certains cas. Par ailleurs, il semble naturel de discrétiser *a posteriori* ; après avoir acquis une certaine vision de la variation du caractère dans le groupe d'étude. Dans ce cas, les limites entre classes peuvent être posées de manière intuitive, ce qui a été tenté ici. Une méthode plus systématique et reproductible aurait été de déterminer par des moyens statistiques des ruptures dans la distribution des valeurs de la grandeur à discrétiser. Le manque de recul quant à ces considérations, et d'expérience dans la morphologie du groupe, a souvent conduit à définir des caractères d'une part difficilement réobservables (cas de codages du type "petit, moyen, grand" ou "nettement, légèrement, pas du tout"), et d'autre part mal discrétisés par rapport à la réalité de la distribution des caractères dans l'échantillonnage. De nombreux cas de polymorphisme au sein d'une espèce auraient sans doute pu être évités en discrétisant les caractères autrement. Un codage en 3 ou 4 états ordonnés a parfois été adopté dans l'espoir que des tendances se dégagent malgré le polymorphisme (Taylor et al. (1991) n'obtiennent de résolution avec leurs données sur le polymorphisme enzymatique qu'en ordonnant leurs caractères). Le polymorphisme est donc ici traité dans PAUP* en tant que tel, et non en tant que caractères incertains (codage des états polymorphes entre parenthèses et non entre accolades).

Ces difficultés expliquent le faible nombre de caractères retenus et le peu de résolution des noeuds par l'analyse des données morphologiques seules. Il aurait peut-être été souhaitable d'être plus strict dans les critères d'adoption des caractères, à défaut d'avoir réussi à mettre en oeuvre une méthodologie plus

performante pour leur définition et leur codage.

Dans le cas plus général de l'étude des félifformes, l'hybridation ADN/ADN (Veron & Catzeflis, 1993) donne des résultats plus proches de l'analyse des données moléculaires (Yoder *et al.*, 2003) que l'analyse cladistique des données morphologique (Veron, 1995). Ceci renforce la confiance que l'on peut avoir dans les données moléculaires relativement aux données morphologiques. Il semble difficile d'obtenir des données morphologiques qui à elles seules puissent être utilisées efficacement dans une analyse cladistique, du moins à l'échelle des groupes étudiés ici.

5.3 Ce que l'on peut dire des relations de parenté entre mangoustes

5.3.1 Les carnivores malgaches

La monophylie des carnivores malgaches est bien établie ; même l'analyse séparée de CytB la fait apparaître, quoique de façon peu robuste. On reproduit donc les résultats de Yoder *et al.* (2003). La monophylie de *Galidiinae* est très bien soutenue, tant par les données moléculaires que par les données morphologiques (indice de Bremer de 3 pour l'analyse des données morphologique seules). Les relations entre *Galidiinae* sont bien résolues dans toutes les analyses séparées et combinées des données moléculaires. L'analyse combinée incluant les données morphologiques et la séquence de CytB disponible pour *Salanoia* permet de proposer le positionnement de cette espèce en groupe-frère de *Mungotictis*, ceci étant soutenu par une valeur de bootstrap de 100 % et un indice de Bremer de 19 (voir arbre B en annexe 13).

Le groupe-frère des *Galidiinae* est encore incertain. On peut toutefois remarquer que la plupart des analyses placent *Cryptoprocta* en groupe-frère des *Galidiinae*, à chaque fois de manière peu soutenue. La morphologie et le petit fragment de CytB disponible pour *Eupleres* indiquent l'existence probable d'un clade des *Euplerinae* (au sens de Wozencraft, 1993 ; *Fossa* + *Eupleres*).

Les *Herpestinae* sont fort probablement le groupe-frère des carnivores malgaches, bien que cela soit mal soutenu par les données mitochondriales.

5.3.2 Les *Herpestinae*

La monophylie des *Herpestinae* est bien soutenue par toutes les analyses des données moléculaires et apparaît aussi dans l'analyse des données morphologiques, soutenue par un indice de Bremer de 2. La monophylie des *Herpestinae* " non-sociaux " est bien soutenue par les données moléculaires, à l'exception de l'analyse séparée de CytB. Celle des mangoustes sociales tient surtout, du point de vue moléculaire, à la présence de ND2 dans les données analysées (voir l'arbre A). La fiabilité du clade des mangoustes sociales est renforcée par un certain nombre de caractères morphologiques, qui permettent d'y placer *Dologale*, et par une délétion dans TrI1. Au sein de ce clade, un clade (*Helogale*, *Crossarchus*) est très bien soutenu par les données moléculaires, mais le manque de données concernant *Dologale* ne permet pas d'exclure la présence de cette espèce dans ce groupe. Les relations entre les autres mangoustes sociales sont encore peu fiables. Mis à part le cas de *Cynictis*, le reste de l'ancienne sous-famille des *Mungotinae* (Wozencraft, 1989) semble donc tenir.

Au sein des *Herpestinae* " non-sociaux ", les relations sont encore très incertaines. Les données moléculaires soutiennent assez bien le clade (*Atilax*, *H. naso*) et le clade (*H. edwardsii*, *H. javanicus*), ce dernier clade étant mis en évidence par l'analyse morphométrique de crânes (Taylor & Matheson, 1999). Le clade (*Ichneumia*, *Cynictis*, *Rhynchogale*, *Bdeogale*) est récurrent, mais peu soutenu par chaque analyse. Un clade (*Rhynchogale*, *Bdeogale*) apparaît dans de nombreuses analyses mais est souvent peu soutenu. Il pourrait être caractérisé par la forme de la première molaire inférieure (voir figure 8).

Un clade (*H. ichneumon*, *Galerella*) apparaît dans certaines des analyses mais reste en général peu

soutenu. Le nombre plus élevé de chromosomes chez ces mangoustes (chez les femelles : 40 pour *G. pulverulenta*, 42 pour *G. sanguinea* et 44 pour *H. ichneumon*) que chez les autres *Herpestinae* (36 chez la femelle) pourrait soutenir un tel clade. La monophylie du genre *Galerella* n'est pas établie par nos données moléculaires, mais semble plausible, si l'on considère les résultats de Taylor *et al.* (1991) basés sur les allozymes.

Les données morphologiques suggèrent un rapprochement entre *H. urva* et *H. brachyurus*, en accord avec les données morphométriques de Taylor & Matheson (1999).

Un certain nombre d'états de caractères sont partagés par les mangoustes sociales et le clade (*Bdeogale*, *Rhynchogale*, *Cynictis*, *Ichneumia*) (chromosome Y libre, incisives disposées en courbe, racine de l'arcade zygomatique en arrière de M1). Étant donnée la faible fiabilité des relations basales au sein des *Herpestinae* "non-sociaux" telles qu'elles apparaissent sur l'arbre B, il est loin d'être exclu que le clade (*Bdeogale*, *Rhynchogale*, *Cynictis*, *Ichneumia*) soit le groupe frère des mangoustes au chromosome Y transloqué, comme le propose Fredga (1972). Notons qu'il manque des données pour *H. urva* et *H. naso* ; il n'est donc pas certain que le chromosome Y soit transloqué chez ces deux espèces.

6 Perspectives et conclusion

Les noeuds basaux des *Herpestinae* ne sont pas encore assez résolus et les espèces asiatiques sont malheureusement trop mal représentées dans cette étude pour que l'on puisse ici proposer un scénario sur les migrations entre Asie et Afrique. Il serait intéressant d'obtenir TrI1 pour *H. urva*, ce qui clarifierait peut-être sa position. Il serait encore plus intéressant d'obtenir des données moléculaires pour les autres *Herpestes* asiatiques manquant : *H. brachyurus*, *H. palustris*, *H. semitorquatus*, *H. smithii*, et *H. vitticollis*. On pourrait espérer que l'ajout de ces espèces aux analyses débrouille en partie l'irrésolution basale des *Herpestinae*. Malheureusement, l'obtention d'échantillons biologiques pour ces espèces est difficile et la tentative d'extraction d'ADN à partir d'un spécimen de collection n'a rien donné pour *H. brachyurus*.

L'utilisation d'un marqueur moléculaire supplémentaire est également une voie à essayer. Des données existent d'ailleurs déjà pour un certain nombre d'espèces pour le gène nucléaire IRBP, utilisé par Yoder *et al.* (2003).

La position au sein des mangoustes "non-sociales" d'*Herpestes ichneumon* ou de *Cynictis penicillata*, qui présentent, au moins dans certaines régions, des comportements à tendance sociale (plus d'un couple d'adultes nichant au même endroit, cris d'alarme, participation d'autres adultes que leurs parents à l'élevage des petits), ne permet pas de faire des hypothèses précises quant à l'origine de la socialité chez les *Herpestinae*.

Les données TrI1 soutiennent bien la monophylie des carnivores malgaches, des *Galidiinae*, des *Herpestinae* et des mangoustes "non-sociales". La combinaison de ces données avec les données mitochondriales le confirme. La monophylie des mangoustes "sociales" est soutenue par l'analyse combinée des données mitochondriales et par une certaine délétion dans TrI1 qui pourrait leur servir de synapomorphie. La division d'une famille des *Herpestidae* en deux sous-familles (*Galidiinae* et *Herpestinae*) ne reflète pas ce que l'on sait de la phylogénie de ces mammifères. On pourrait donc proposer une révision de la classification de Wozencraft (1993) consistant par exemple à reprendre les sous-familles considérées par Wozencraft (1989) ; les *Mungotinae*, comprenant les mangoustes "sociales" mais excluant *Cynictis*, et les *Herpestinae* comprenant les mangoustes "non-sociales", y compris *Cynictis*.

Bibliographie

- Anonyme (2003). Sequencher version 4.1.4. Gene Codes Corporation. <http://www.genecodes.com/>.
- Baker, R. H., Yu, X. & DeSalle, R. (1998). Assessing the Relative Contribution of Molecular and Morphological Characters in Simultaneous Analysis Trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **9** : 427-436.
- Couturier, J. & Dutrillaux, B. (1985). Évolution chromosomique chez les carnivores. *Mammalia* **50A** : 124-162.
- De, J. K., Chakraborty, S. & Chakraborty, R. (1998). Identification of dorsal guard hair of five Indian species of Mongooses, *Herpestes* Illiger (Mammalia : Carnivora). *Mammalia* **62** (2) : 285-295.
- Estes, R. D. (1991). *The Behavior Guide to African Mammals. Including Hoofed Mammals, Carnivores, Primates*. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- Flynn, J. J. & Nedbal, M. A. (1998). Phylogeny of the Carnivora (Mammalia) : Congruence vs Incompatibility among Multiple Data Sets. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **9** : 414-426.
- Fredga, K. (1972). Comparative chromosome studies in mongooses (*Carnivora, Viverridae*). I. Idiograms of 12 species and karyotype evolution in Herpestinae. *Hereditas* **71** :1-74.
- Gaubert, P. & Veron, G. (2003). Exhaustive sample set among Viverridae reveals the sister-group of felids : the linsangs as a case of extreme morphological convergence within Feliformia. *Proceedings of the Royal Society London B* **270** : 2523-2530.
- Gregory, W. K. & Hellman, H. (1939). On the evolution and major classification of the civets (*Viverridae*) and allied fossil and recent Carnivora: a phylogenetic study of the skull and dentition. *Proceedings of the American Philosophical Society* **81** : 309-392.
- Harrison, D. L. & Bates, P. J. (1991). *The mammals of Arabia*. Harrison Zoological Museum, Sevenoaks, Kent, UK.
- Hillis, D. M. & Huelsenbeck, J. P. (1992). Signal, noise and reliability in molecular phylogenetic analysis. *Journal of Heredity* **83** : 189-195.
- Maddison, W. P. & Maddison, D. R. (1999). *MacClade: analysis of phylogeny and character evolution*, v. 3.08a. Sunderland, MA: Sinauer.
- Nowak, R. M. (1997). *Walker's Mammals of the World 5.1 online*. John hopkins University Press. http://www.press.jhu.edu/books/walkers_mammals_of_the_world/prep.html
- Petter, G. (1969). Interprétation évolutive des caractères de la denture des Viverridés africains. *Mammalia* **33** : 607-625.
- Pocock, R. I. (1919) The classification of the mongooses (*Mungotidae*). *Annals and Magazine of Natural History* **3** : 515-524.
- Rambaut, A. (1996). *Se-Al: Sequence Alignment Editor*.

<http://evolve.zoo.ox.ac.uk/software.html?id=seal>

Skinner, J. D. & Smithers, R. H. N. (1990). *The Mammals of the Southern African Subregion*. University of Pretoria, Pretoria.

Swofford, D. L. (2002). *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Taylor, P. J., Campbell, G. K., Meester, J. A. J. & van Dyck, D. (1991). A study of allozyme evolution in African mongooses (Viverridae, Herpestinae). *Zeitschrift für Säugetierkunde* **56** : 135-145.

Taylor, M. E. & Matheson, J. (1999). A craniometric comparison of the African and Asian mongooses in the genus *Herpestes* (Carnivora : Herpestidae). *Mammalia* **63** (4) : 449-464.

Veron, G. (1995). La position systématique de *Cryptoprocta ferox* (Carnivora). Analyse cladistique des caractères morphologiques de carnivores Aeluroidea actuels et fossiles. *Mammalia* **59** (4) : 551-582.

Veron, G. & Catzeflis, F. (1993). Phylogenetic relationships of the endemic Malagasy Carnivore *Cryptoprocta ferox* (Aeluroidea): DNA/DNA hybridization experiments. *Journal of Mammalian Evolution* **1** (3):169-185.

Veron, G., Colyn, M., Taylor, P. & Gaubert, P. (2004). Molecular systematics and origin of sociality in mongooses (Herpestidae, Carnivora). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30** : 582-598.

Wozencraft, W. C. (1989). Classification of the Recent Carnivora. In : Gittleman, J. (Ed), *Carnivore Behavior, Ecology, and Evolution*. Cornell University Press, Ithaca, NY, pp. 569-593.

Wozencraft, W.C., (1993). Order Carnivora. In: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), *Mammal Species of the World*. Smithsonian Institution Press, Washington & London, pp. 279-348.

Yoder, A. D., Burns, M. M., Zehr, S., Delefosse, T., Veron, G., Goodman, S. M. & Flynn, J. J. (2003). Single origin of Malagasy Carnivora from an African ancestor. *Nature* **421** : 734-737.

Annexes

Annexe 1. Extraction d'ADN

Le premier travail est de briser les membranes cytoplasmiques pour avoir accès au contenu cellulaire grâce à la digestion des tissus par un mélange de “ CétylTriméthylAmmonium Bromide ” (CTAB), de mercaptoéthanol et de détergent, qui a pour effet de désintégrer les membranes cellulaires. Les tissus sont donc placés dans des microtubes de 2 mL (jusqu'à 0,3 g par tube) puis recouverts de 600 µL à 1 mL de tampon CTAB préchauffé à 60 °C, et laissés à incuber 2 à 24 heures au bain-marie à 60 °C. Le liquide cellulaire libéré lors de la rupture des membranes contient principalement des protéines et des acides nucléiques (ADN nucléaire, mitochondrial, et ARN). La purification se poursuit donc par une phase de déprotéinisation : un volume égal de CIA (“ *Chloroform Isoamyllic Alcohol* ”) est ajouté à la solution d'extrait. Le tout est alors doucement mélangé à la main pendant 2 min, puis centrifugé 10 min à 15 000 g à 4 °C. La phase aqueuse supérieure, lavée de ses protéines, est récupérée dans un tube microtube de 1,5 mL. Cette solution contient principalement des acides nucléiques, ADN et ARN. L'ajout de 2/3 d'isopropanol froid à cette phase aqueuse (le tout laissé 1 h à -20 °C ou une nuit à 4 °C) provoque la précipitation de l'ADN. Après centrifugation 10 min à 15 000 g à 4 °C, le surnageant est jeté et remplacé par de l'alcool à 70 ° pour rincer le culot d'ADN lors d'une nouvelle centrifugation 10 min à 15 000 g à 4 °C. L'alcool est jeté et le tube est laissé ouvert et retourné jusqu'à complète évaporation de l'alcool et séchage du culot. Enfin, le culot, selon son importance, est repris dans 25 à 150 µL d'eau bidistillée et le tout est laissé 20 min au bain-marie à 60 °C pour une meilleure re-suspension.

Annexe 2. PCR

Un cycle d'amplification par PCR présente trois étapes :

1) Dénaturation de l'ADN matrice, en approchant la température de 100°C tout en restant dans le domaine de tolérance de l'enzyme. Pour cela, il faut utiliser une ADN polymérase thermo-résistante, la Taq polymérase, issue d'une archéobactérie thermophile (*Thermus aquaticus*), qui supporte la température de 94 °C. À l'issue de cette étape, l'ADN est simple brin.

2) Hybridation des amorces (“ *annealing* ”) avec leurs séquences complémentaires sur le brin d'ADN matrice, à la température optimale d'appariement calculée à partir de la composition en bases des amorces et adaptée en fonction des résultats obtenus.

3) Élongation du brin complémentaire par la Taq polymérase à partir de l'extrémité 3'OH des amorces, à 72 °C, température d'activité optimale de cette enzyme. Au bout d'un cycle, le nombre de copies du fragment est multiplié par deux. Puisque chaque brin nouvellement copié peut servir de matrice pour l'amplification suivante, le nombre de copies du fragment désiré augmente de façon exponentielle : à l'issue de 35 cycles, et si les réactifs sont en large excès, il est copié théoriquement 2^{35} fois.

Chaque PCR se déroule dans un microtube de 1 mL. Le mélange réactionnel contient tous les éléments nécessaires au fonctionnement de l'enzyme : l'ADN matrice, chacune des deux amorces, du DMSO lorsque cela est jugé nécessaire (diméthyl sulfoxyde, agent dénaturant de l'ADN), des désoxynucléotides triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), et le tampon spécifique de la Taq polymérase.

Le mélange réactionnel utilisé pour amplifier un fragment, donc pour un couple d'amorces est le suivant :

H ₂ O.....	20 µL
DMSO.....	1,3 µL
Mix (dNTP).....	1 µL à 6,6 mM

Tampon Taq.....	2,5 μ L
Amorce L.....	0,3 μ L à 50 pm / μ l
Amorce H.....	0,3 μ L à 50 pm / μ l
Taq Polymérase.....	0,15 μ L à 5 U / μ l
ADN.....	de l'ordre de 0,5 μ L d'extrait d'ADN, éventuellement dilué, quantité à adapter selon les résultats

Chaque tube est alors placé sur un thermocycleur *Biometra TRIO-Thermoblock*, qui assure avec précision les cycles de température. Selon les taxons et la longueur du fragment à amplifier le programme est ajusté pour optimiser les résultats.

Contrôle de l'amplification

Le résultat de la PCR est visualisé en faisant migrer un prélèvement du produit de PCR sur un gel d'agarose comportant un agent intercalant.

Composition du gel : 0,6 g d'agarose en poudre dans 40 ml de tampon TBE 0,5 X. Ce mélange est chauffé aux micro-ondes pour dissoudre l'agarose, puis on y ajoute 0,7 μ l de BET, le Bromure d'ETHidium, qui s'intercale dans le grand sillon de l'ADN et fluoresce lorsqu'il est soumis à un rayonnement ultra-violet. Ceci permet de visualiser l'ADN sur le gel après migration.

Dépôt : 3 μ l de produit de PCR + 1,5 μ l de tampon de charge 6 X (glycérol, bleu de bromophénol, xylène-cyanol).

Après migration, le gel est placé sur une table à UV pour révéler l'ADN, qui apparaît sous la forme de bandes fluorescentes, et photographié. Chaque bande correspond à un ensemble de très nombreuses copies toutes identiques du fragment amplifié qui se retrouvent au même endroit sur le gel, puisqu'elles sont de même taille.

Annexe 3. Purification

Purification directe par kit " PCR-Montage " Millipore : ce kit permet de purifier un produit PCR par l'arrêt des fragments d'ADN amplifiés sur une membrane qui joue le rôle d'un filtre de taille. Seuls les fragments de taille compris entre 130 pb et 10 kb sont arrêtés, ce qui permet l'élimination des sondes et des dNTP non utilisés au cours de la PCR. Le produit PCR est dilué dans un volume d'eau de manière à avoir un volume final de 400 μ L. Ces 400 μ L sont déposés sur la colonne du kit placée sur un microtube de récupération de 1,5 mL. Après 15 min de centrifugation à 1000 g, la colonne est placée sur un nouveau microtube de 1,5 mL. 20 μ L d'eau y sont déposés et laissés au contact quelques minutes pour resuspendre l'ADN. La colonne est retournée et centrifugée 2 min à 1000 g. Taux de récupération de 90 à 94 %.

Cette solution d'ADN est dosée par spectrophotométrie afin de déterminer le volume nécessaire au séquençage (il doit contenir entre 75 et 100 femtomoles d'ADN).

Annexe 4. Séquençage

Le principe du séquençage selon la méthode de Sanger *et al.* (1977) est une sorte de PCR interrompue aléatoirement. Elle repose sur l'élongation d'un grand nombre de copies d'un brin matrice d'ADN par une polymérase à partir de l'extrémité 3'OH d'une amorce, avec arrêts aléatoires de la copie, provoqués par l'ajout de didésoxynucléotides (ddNTP). De tels nucléotides n'ont pas de groupement hydroxyle en 3' du désoxyribose, ce qui empêche la poursuite de l'élongation, puisque ce sucre ne peut plus créer de liaison covalente avec le groupement phosphate du nucléotide suivant. La conséquence de ces arrêts aléatoires est la synthèse de brins de toutes les tailles possibles.

Chaque réaction de séquençage se déroule dans l'un des 96 puits (8 x 12) d'une plaque adaptée au chargement dans le séquenceur automatique. Chaque puits contient 8 µl de prémix du kit *Beckman CEQ2000 Dye terminator cycle Sequencing Quick start kit* (qui contient la Taq DNA polymérase, son tampon spécifique, des dNTP et des ddNTP marqués avec un fluorochrome) ainsi qu'1 µl d'amorce à 10 pm / µl (correspondant au brin L ou H) et 1 à 8 µl d'ADN contenant l'équivalent de 70 à 150 femtomoles. La quantité d'ADN est ajustée en fonction de la taille du fragment à séquencer : 70 femtomoles pour une séquence de 350 pb, et jusqu'à 150 femtomoles pour une séquence de 800 pb. Une fois la plaque remplie, elle est placée sur un thermocycleur *MWG AG BIOTECH Primus 96^{plus}* à couvercle chauffant et à pression pour éviter toute évaporation.

Le programme de séquençage est le suivant :

étape 1 : 4 minutes à 96 °C

étape 2 : 40 secondes à 96 °C

étape 3 : 40 secondes à 50 °C

étape 4 : 4 minutes à 60 °C

étape 5 : Retourner à l'étape 2, faire 30 fois ce cycle

pause indéfinie à 4 °C

La température d'élongation n'est pas une température d'élongation classique, mais c'est celle à laquelle travaille la polymérase du kit *Beckman*. Le temps d'élongation long est dû au fait que l'enzyme a du mal à incorporer les ddNTP marqués avec des fluorochromes, car ce sont des molécules volumineuses.

Pour que ces réactions de séquence puissent être lues par le séquenceur automatique, il faut qu'elles soient très propres : il est nécessaire de les purifier en supprimant les excès de dNTP, ddNTP marqués, et d'amorces. La purification est faite de manière classique en ajoutant un mélange de sels et d'éthanol provoquant la précipitation de l'ADN :

Na ₂ EDTA 100 mM pH = 8.....	1,5 µl / puits
Acétate de sodium 3M pH = 5,2.	1,5 µl / puits
Glycogène.....	0,75 µl / puits
Éthanol 95 ° à - 20°C.....	50 µl / puits

Le glycogène aide à la précipitation et la récupération des petits fragments d'ADN.

L'ADN précipité est ensuite centrifugé 30 minutes à 3000 g et à 4 °C, puis le culot est rincé dans une solution d'éthanol à 70 ° (200 µl / puits : l'eau contenue dans cet alcool dilué pompe les sels qui ont précipité avec l'ADN) puis séché pour éliminer toute trace d'éthanol et enfin repris dans 30 µl de *Sample Loading Solution* du kit.

La plaque est ensuite placée sur un agitateur 15 minutes, puis une goutte d'huile est ajoutée dans chaque puits (pour éviter l'évaporation) avant de charger la plaque dans le séquenceur.

Séparation et lecture du produit par le séquenceur automatique

Comme les ddNTP sont marqués chacun d'un fluorochrome différent, il est possible d'identifier le dernier nucléotide de chaque brin synthétisé, et puisque toutes les tailles de brins possibles ont été générées, il est possible, en séparant les différents brins selon leur taille, de relier la longueur relative du brin avec la nature de son nucléotide terminateur. On accède alors à la séquence du brin matrice utilisé lors des réactions de séquençage.

Dans le séquenceur automatique *CEQ2000 Beckman à capillaires courts, version 4.3.9*, huit capillaires (dans lesquels est injecté un gel dénaturant de polyacrylamide semi-liquide) plongent chacun dans un des puits d'une ligne de la plaque contenant le produit des réactions de séquençage. Les différents brins migrent dans les capillaires selon leur taille, comme dans une électrophorèse classique : les petits

fragments migrent plus vite que les gros, et donc sont détectés avant eux. C'est donc une succession de brins différant d'un seul nucléotide en longueur qui migre dans les capillaires, dans l'ordre de taille croissante.

Les étapes et paramètres de la migration sont les suivants :

Mise à température des capillaires : la migration ne commence que lorsqu'ils ont atteint 50 °C

Dénaturation des séquences : 120 secondes à 90 °C

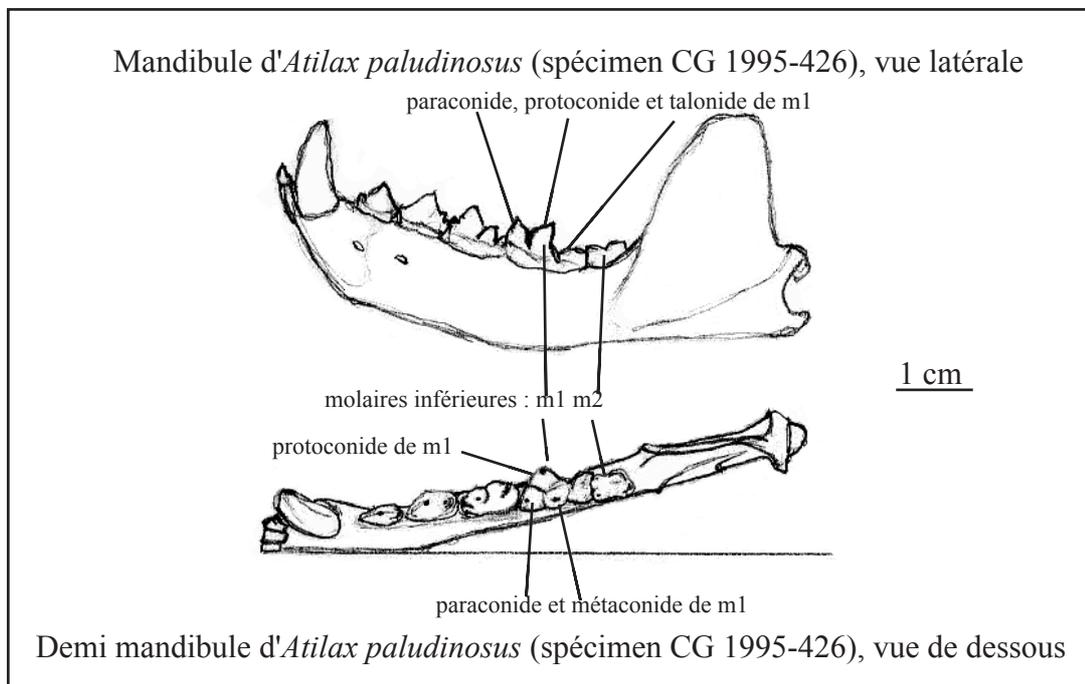
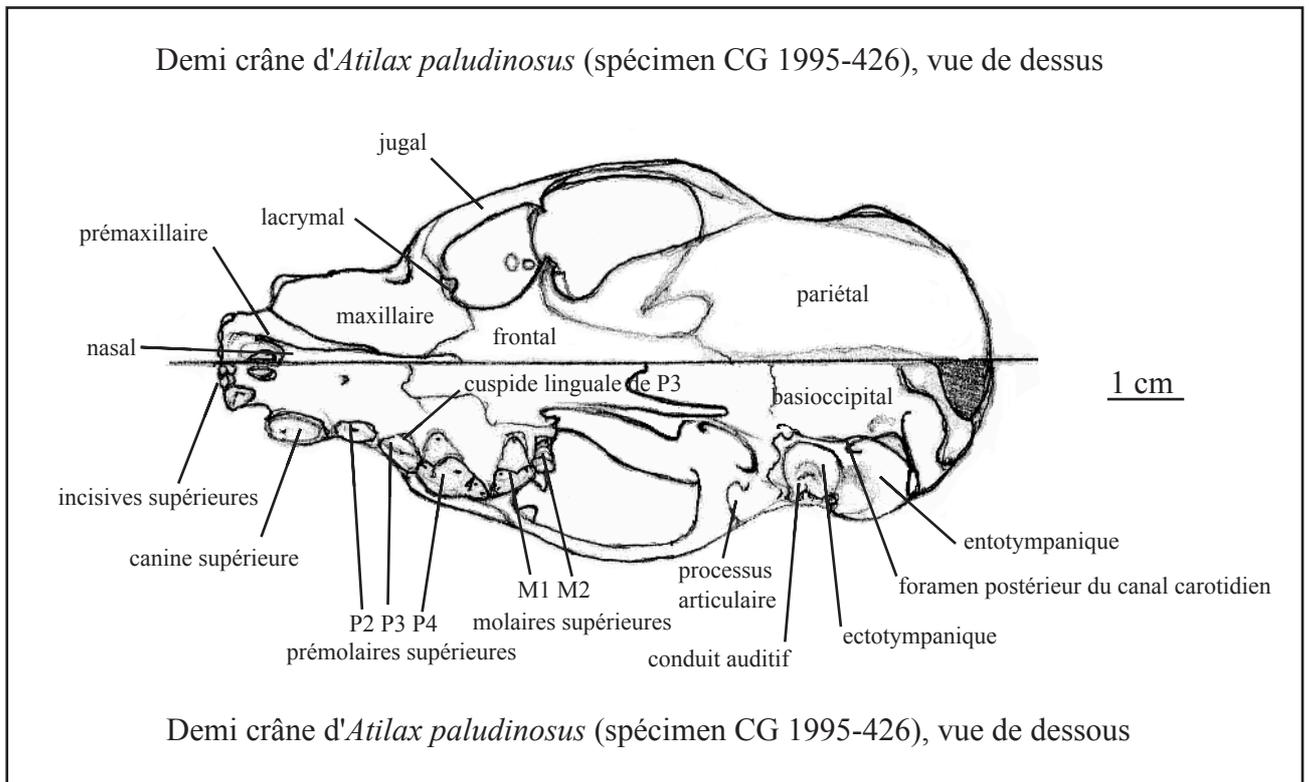
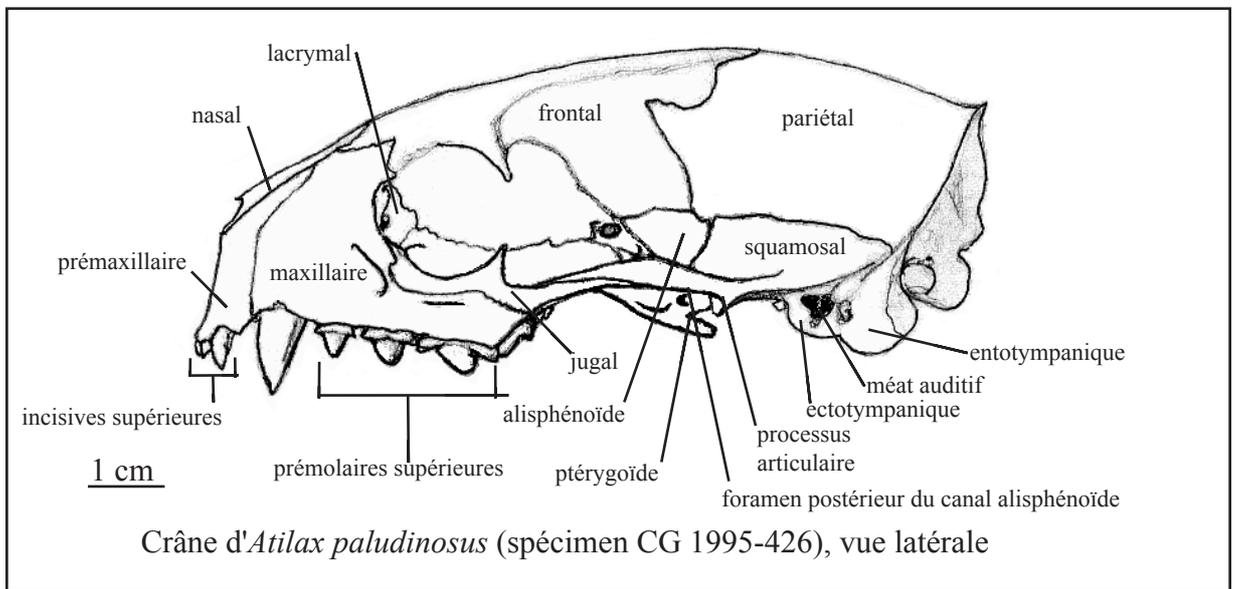
Injection du produit des réactions de séquençage dans les capillaires : 2000 Volts pendant 15 secondes

Séparation des brins, migration et lecture : 4200 Volts pendant 85 minutes

Un laser placé face à la fenêtre de lecture des capillaires excite les fluorochromes à leur passage dans son faisceau, et la succession de couleurs émises par les brins en migration est détectée par un lecteur optique, puis transmise à un ordinateur où un logiciel la convertit en équivalents A, T, G, C.

Espèce	Crâne	Peau
<i>Atilax paludinosus</i>	CG 1995-426, CG 1961-117, CG 1950-266	CG 1995-427
<i>Bdeogale crassicauda</i>	CG 1881-1521, CG 1893-23, CG 1981-29	
<i>Bdeogale nigripes</i>		CG 1966-65
<i>Crossarchus obscurus</i>	CG 1911-857, CG 1895-17, CG 1959-186, CG 1976-333	CG 1952-495
<i>Cynictis penicillata</i>	CG 1936-1535, CG 1962-2116, CG 1962-2117	CG 1936-1535
<i>Dologale dybowskii</i>	CG 1897-548, CG 1892-2054	CG 1892-2054
<i>Galerella pulverulenta</i>	CG 1962-357, CG 1962-1114, CG 1962-358	CG 1962-358
<i>Galerella sanguinea</i>	CG 2000-1060, CG 1875-286, CG 1902-533	CG 1938-1304
<i>Helogale hirtula</i>	CG 1998-1937, CG 1977-20	CG 1998-1937
<i>Helogale parvula</i>	CG 1987-176, CG 1969-73, CG 1962-327	CG 1886-869
<i>Herpestes brachyurus</i>	CG 1884-1818, CG 1884-1820, CG 1974-309	CG 1965-406
<i>Herpestes edwardsii</i>	CG 1959-187, CG 1962-1742	CG 1970-87
<i>Herpestes ichneumon</i>	CG 1962-1740, CG 1933-2318, CG 1897-633	CG 1960-3684
<i>Herpestes javanicus</i>	CG 1985-162, CG 1882-12, CG 1982-107	CG 1982-107, CG 1982-161
<i>Hepestes naso</i>	CG 1988-278, CG 1990-89, CG 1933-2337	CG 1933-2337
<i>Herpestes urva</i>	CG 1899-335, CG 1874-500, CG 1929-381	CG 1929-381
<i>Ichneumia albicauda</i>	CG 1938-848, CG 1995-412, CG 1981-442	CG 1955-657
<i>Liberiictis kuhni</i>	SS5 9.7.2000	
<i>Mungos gambianus</i>	CG 1950-265, CG 1970-287, CG 1981-555	CG 1970-287
<i>Mungos mungo</i>	CG 1904-2005, CG 1926-255, CG 1962-2078	CG 1939-192
<i>Rhynchogale melleri</i>	CG 1882-1212, CG 1962-992, CG 1902-531	CG 1962-992
<i>Suricata suricatta</i>	CG 1936-1534, CG 1962-171, CG 1998-113	CG 1936-1534
<i>Galidia elegans</i>	CG 1962-2070, CG 1932-3534, CG 1932-3527	CG 1974-316
<i>Galidictis fasciata</i>	CG 1932-3531, CG 1880-1962, CG 1932-3527	CG 1955-601
<i>Mungotictis decemlineata</i>	CG 1867-591, CG 1992-1670, CG 1881-288	CG 1964-236
<i>Salanoia concolor</i>	CG 1961-974, CG 1866-233, CG 1882-1611	CG 1962-325
<i>Cryptoprocta ferox</i>	CG 1977-556, CG 1977-554, CG 1940-1211	CG 1940-1211
<i>Eupleres goudotii</i>	CG 1962-2091, CG 1962-1121, CG 1912-128	CG 1932-3542
<i>Fossa fossana</i>	CG 1962-1597, CG 1882-1589, CG 1962-1598	CG 1932-3558
<i>Crocuta crocuta</i>	CG 1973-125, CG 1972-400	

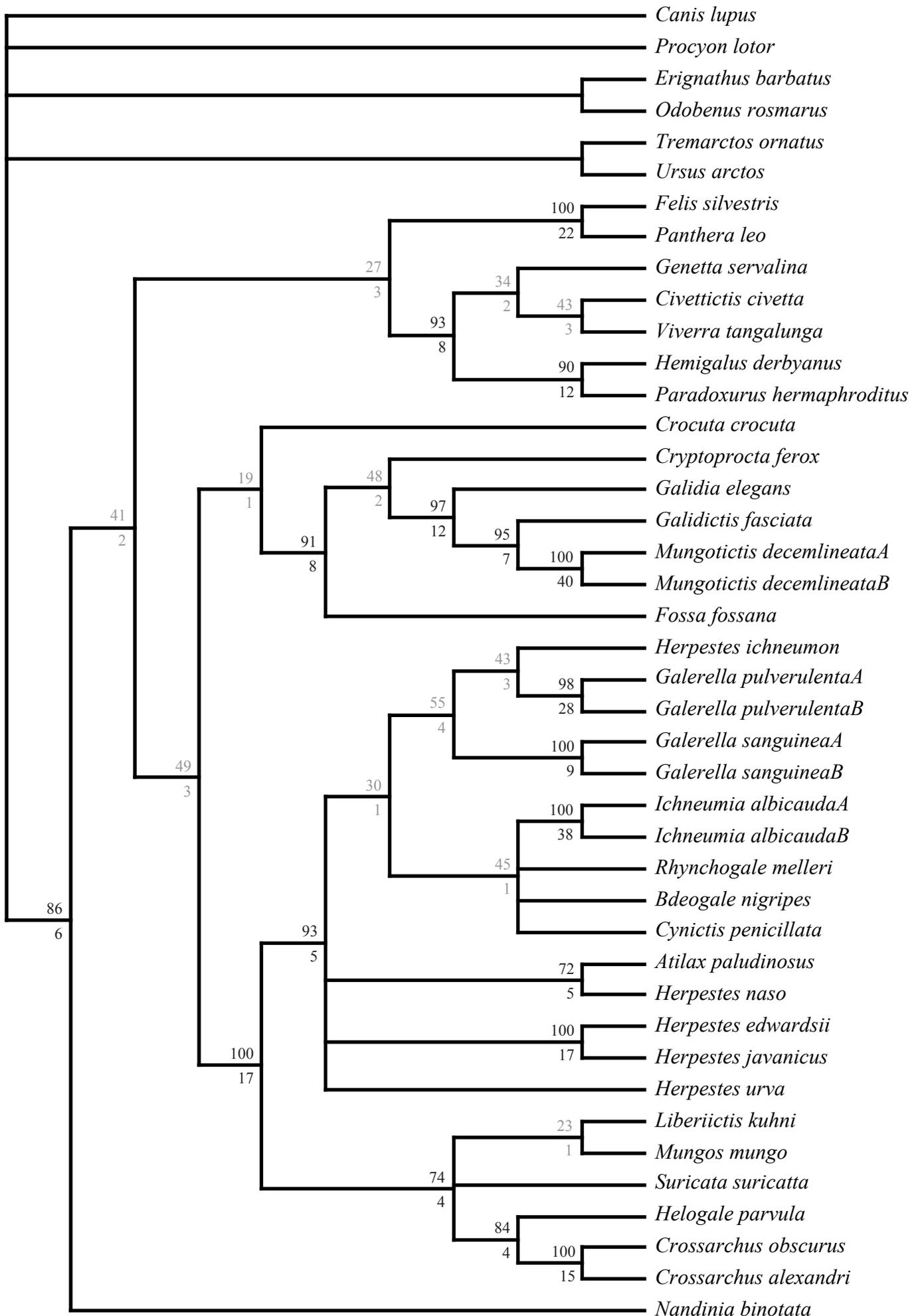
Annexe 5. Quelques-uns des spécimens utilisés pour l'étude des caractères morphologiques



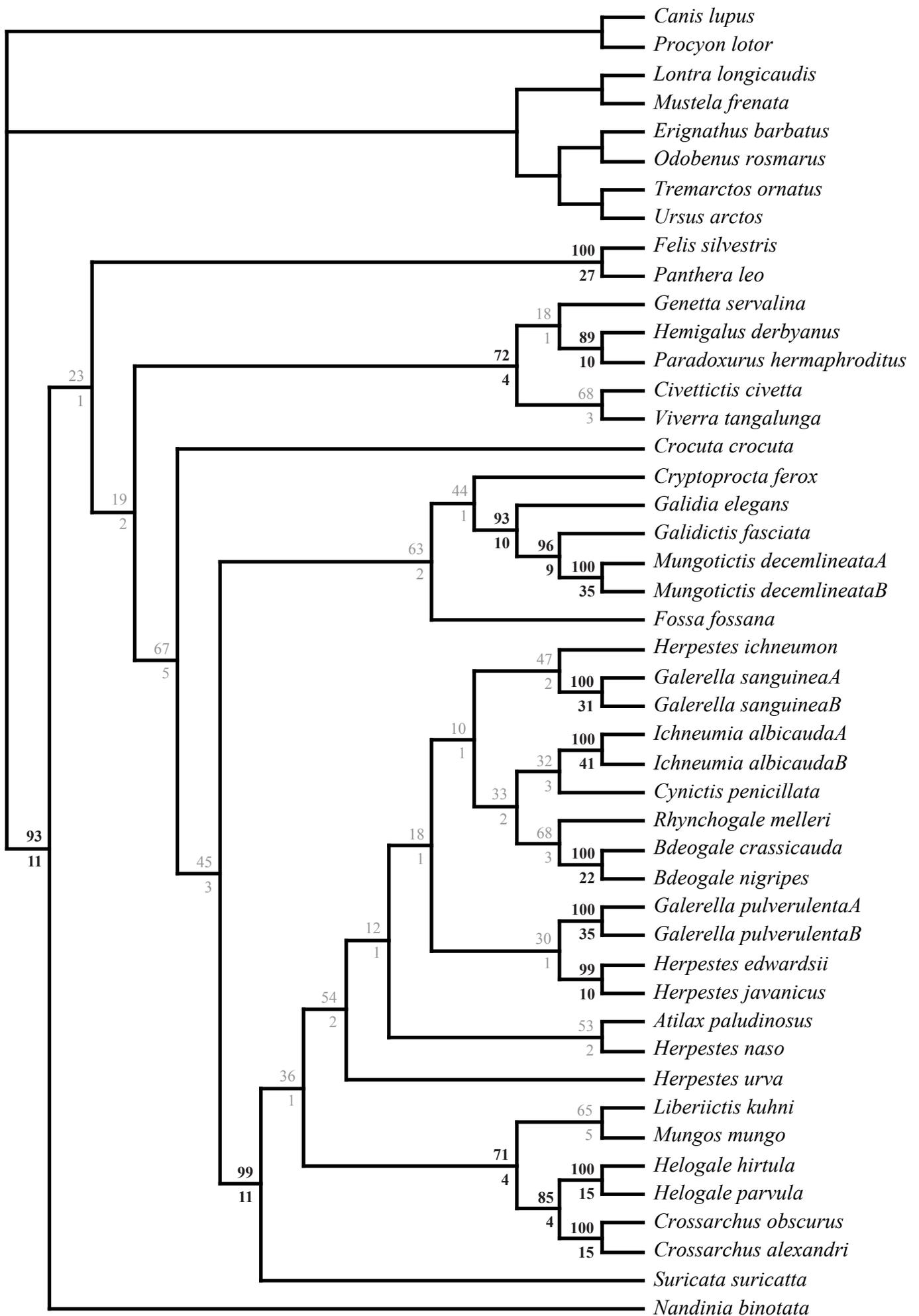
Espèce \ Caractère	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>Atilax paludinosus</i>	0	2	(01)	1	1	0	1	0	0	(12)	(12)	1	1	1	1	0	0	1	1	1
<i>Bdeogale crassicauda</i>	0	2	0	0	1	1	0	0	0	(12)	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
<i>Bdeogale nigripes</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>Crossarchus obscurus</i>	1	2	0	(01)	1	(01)	1	1	(01)	2	(01)	2	1	1	1	1	0	0	1	2
<i>Cynictis penicillata</i>	0	1	?	1	0	1	0	0	0	1	2	1	2	1	0	0	0	0	1	2
<i>Dologale dybowskii</i>	1	1	0	0	1	1	1	?	0	2	?	2	1	1	1	1	0	0	1	2
<i>Galerella pulverulenta</i>	1	1	0	1	0	1	0	0	0	2	(12)	1	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Galerella sanguinea</i>	0	1	0	(02)	0	(01)	0	0	0	2	(12)	(12)	(01)	1	0	0	0	0	1	0
<i>Helogale hirtula</i>	0	2	0	1	0	1	0	0	0	2	(01)	2	(12)	1	1	1	0	0	1	2
<i>Helogale parvula</i>	0	1	0	(01)	1	(01)	0	0	0	(12)	(01)	2	2	1	(01)	1	0	0	1	(23)
<i>Herpestes brachyurus</i>	1	2	?	?	?	?	?	?	0	1	(12)	(12)	(01)	1	1	(01)	0	1	1	1
<i>Herpestes edwardsii</i>	1	1	?	?	?	?	0	?	0	2	(12)	1	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Herpestes ichneumon</i>	1	0	(01)	1	0	0	0	0	0	2	(12)	1	1	1	1	0	0	0	1	(01)
<i>Herpestes javanicus</i>	1	(02)	0	(01)	1	(01)	0	0	0	2	(12)	(12)	(12)	1	(01)	0	0	1	1	1
<i>Herpestes naso</i>	0	2	?	?	?	?	1	0	0	2	(12)	1	1	1	1	0	0	1	1	1
<i>Herpestes urva</i>	1	2	0	1	0	1	1	0	0	(12)	(12)	(12)	1	1	1	1	0	1	1	1
<i>Ichneumia albicauda</i>	0	2	(01)	1	(01)	(01)	(01)	(01)	0	2	(12)	1	1	1	1	0	0	1	1	1
<i>Liberiictis kuhni</i>	?	?	?	?	?	?	?	1	0	2	?	2	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Mungos gambianus</i>	1	2	?	?	?	?	?	?	0	(12)	1	2	1	1	1	1	0	0	1	2
<i>Mungos mungo</i>	1	2	0	(01)	(01)	(01)	(01)	0	0	2	(01)	2	(12)	1	1	1	0	0	1	2
<i>Rhynchogale melleri</i>	0	2	?	1	?	0	(01)	(01)	0	2	(12)	1	1	1	1	0	0	1	1	1
<i>Suricata suricatta</i>	0	1	0	0	1	1	0	0	0	(01)	2	(12)	1	1	0	1	0	0	1	3
<i>Galidia elegans</i>	1	2	0	(01)	(01)	1	0	1	1	?	0	2	0	1	1	0	0	1	1	0
<i>Galidictis fasciata</i>	1	2	?	1	?	0	1	?	1	?	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0
<i>Mungotictis decemlineata</i>	1	?	0	0	1	1	(01)	(01)	1	?	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0
<i>Salanoia concolor</i>	1	2	0	1	1	0	1	1	1	?	0	(012)	(02)	1	1	0	0	1	1	0
<i>Cryptoprocta ferrox</i>	2	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
<i>Eupleres goudotii</i>	2	3	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
<i>Fossa fossana</i>	2	2	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	(01)	1	0	1	1	0	1
<i>Crocuta crocuta</i>	2	2	1	2	0	1	1	0	1	?	0	0	?	1	0	0	0	0	0	3

Annexe 7. Matrice des caractères morphologiques

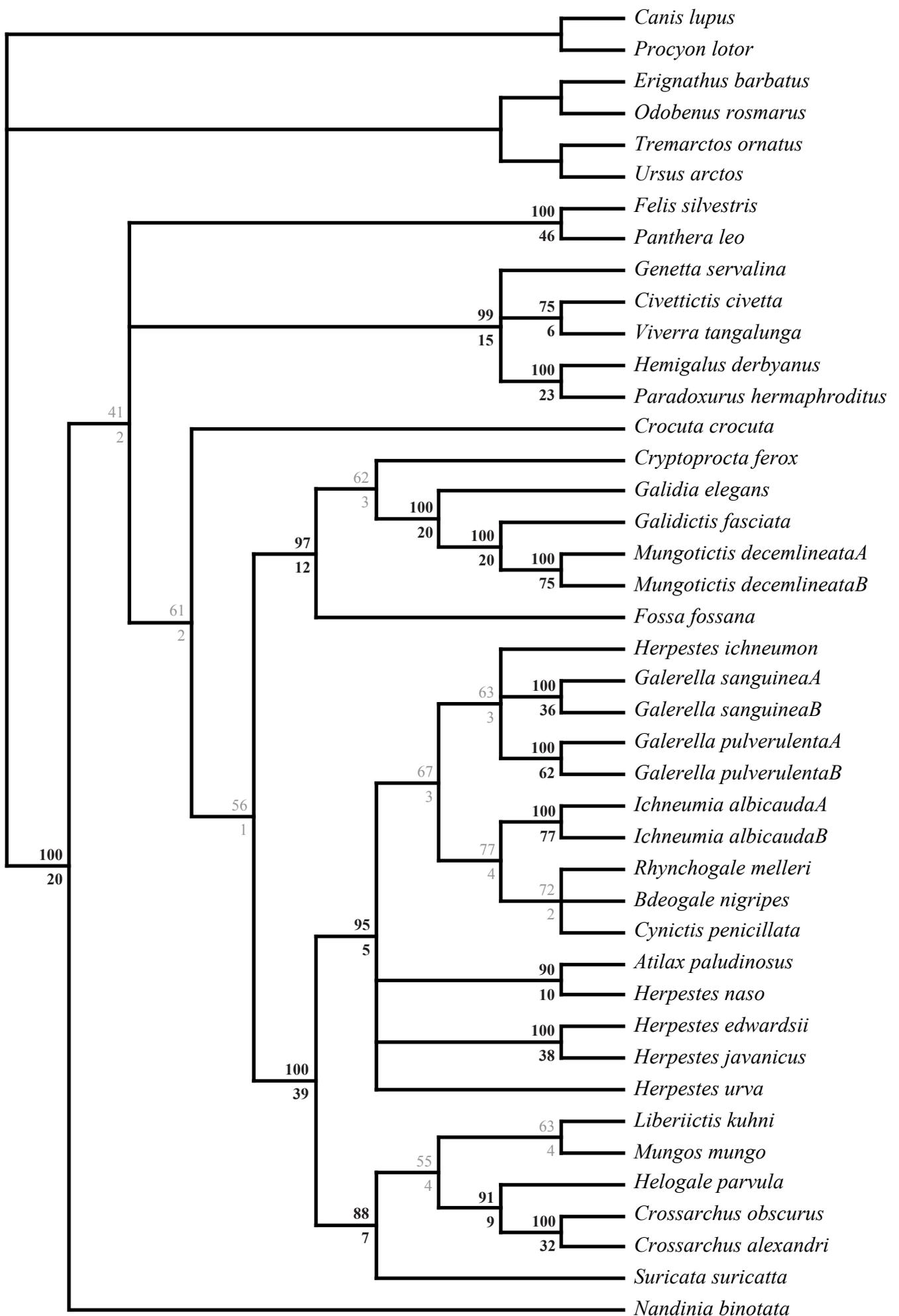
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	31	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
1	(01)	(01)	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	?	0	0	1	2	1	1
0	0	0	(21)	2	1	1	2	(21)	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
0	1	1	2	(21)	0	1	1	(21)	0	0	0	0	1	0	0	0	?	1	0	0	2	1	?
1	0	0	(21)	2	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0	2	?	1
0	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	?	?	1	?	
0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	?	?	?	
1	(01)	1	0	(01)	2	0	(01)	0	0	0	1	1	1	2	0	2	0	0	?	?	1	?	
1	(01)	1	1	0	2	0	1	1	0	0	1	1	0	2	0	2	0	1	?	?	1	?	
1	(01)	1	0	(01)	3	0	?	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	?	
0	0	0	2	0	2	0	0	2	0	0	0	1	1	0	0	2	0	1	?	?	1	?	
0	0	0	(21)	0	1	0	0	(21)	0	0	1	1	1	0	0	2	0	?	?	?	2	?	
1	0	1	0	1	3	0	?	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	0	?	?	



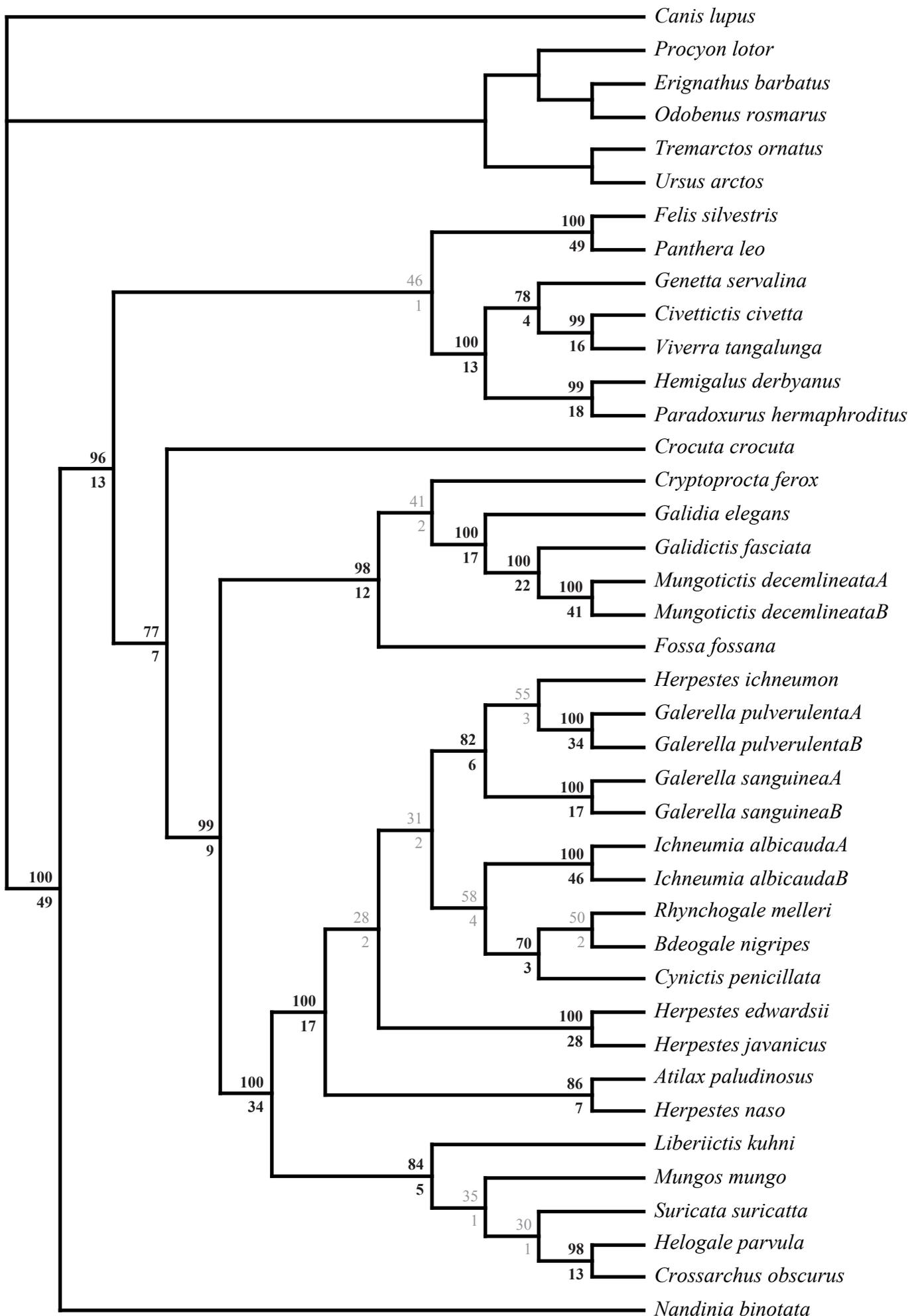
Annexe 8. Consensus des 12 arbres les plus parcimonieux pour les données ND2, valeurs de bootstrap au dessus des branches et indices de Bremer en dessous, indices en gras pour les noeuds " bien soutenus "



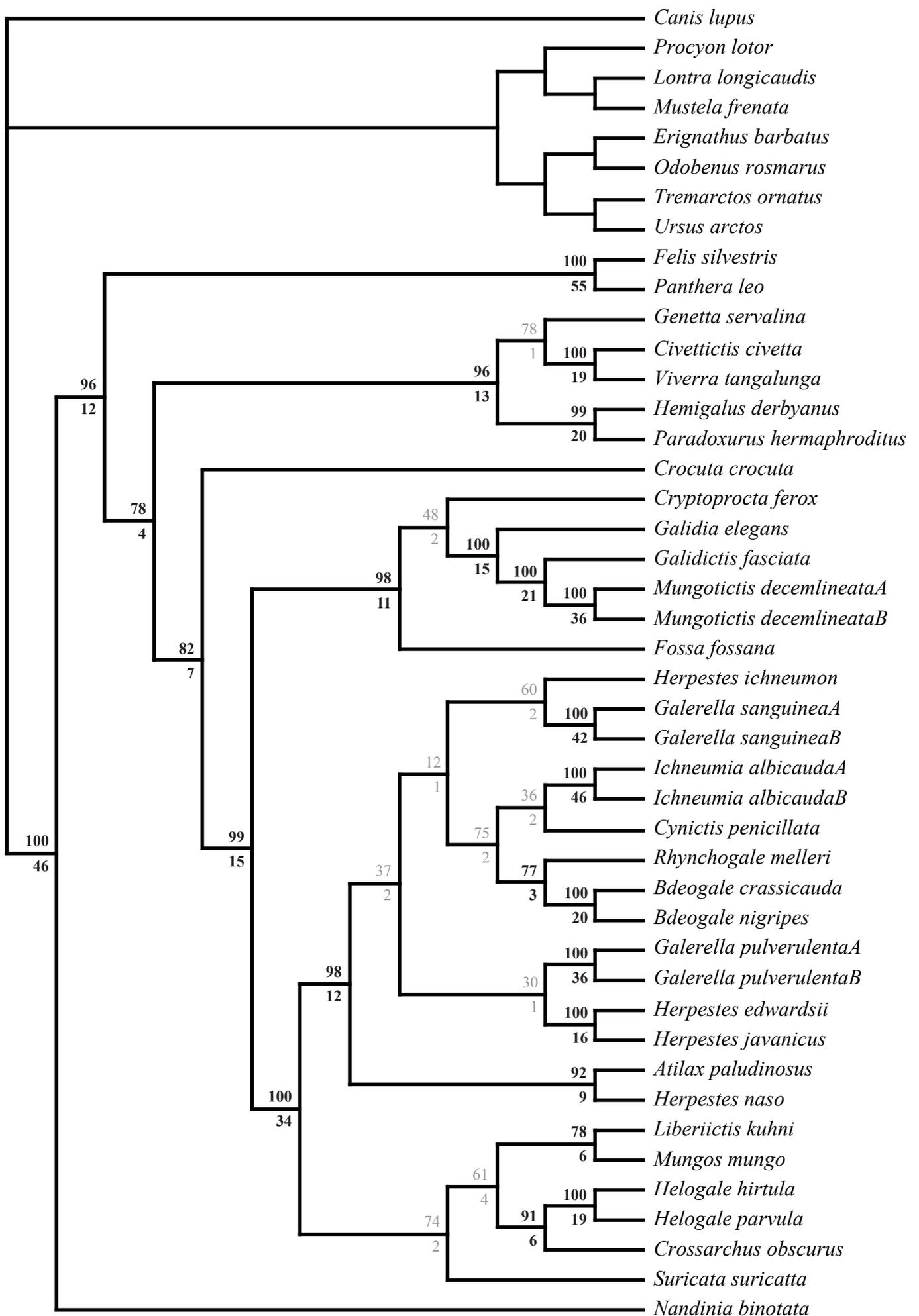
Annexe 9. Arbre le plus parcimonieux pour les données CytB, valeurs de bootstrap au dessus des branches et indices de Bremer en dessous, indices en gras pour les noeuds " bien soutenus "



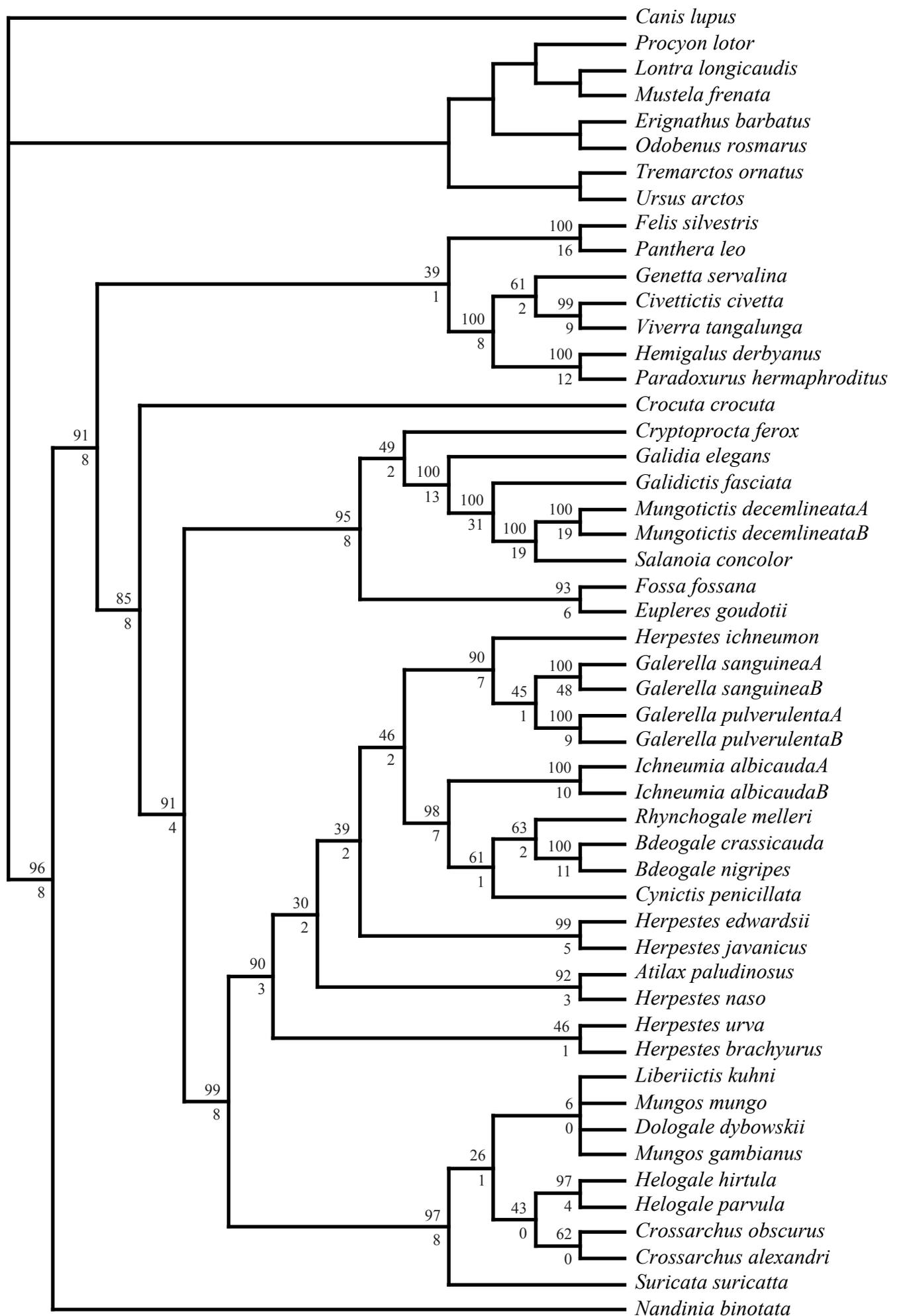
Annexe 10. Consensus des 18 arbres les plus parcimonieux pour les données mitochondriales combinées, valeurs de bootstrap au dessus des branches et indices de Bremer en dessous, indices en gras pour les noeuds " bien soutenus "



Annexe 11. Arbre le plus parcimonieux pour les données TrI1 et ND2 combinées, valeurs de bootstrap au dessus des branches et indices de Bremer en dessous, indices en gras pour les noeuds " bien soutenus "



Annexe 12. Arbre le plus parcimonieux pour les données TrI1 et CytB combinées, valeurs de bootstrap au dessus des branches et indices de Bremer en dessous, indices en gras pour les noeuds " bien soutenus "



Annexe 13. Arbre B, consensus des 5 arbres les plus parcimonieux ne donnant pas Mungos polyphylétique lors de l'analyse des données moléculaires et morphologiques combinées, valeurs de bootstrap au dessus des branches et indices de Bremer en dessous

Résumé

Les mangoustes (*Herpestidae*), sont un groupe de mammifères carnivores dont la phylogénie interne est assez mal connue. Le présent travail s'inscrit dans une série de travaux moléculaires qui clarifient peu à peu les relations de parenté au sein de cette famille. Les données moléculaires acquises (13 séquences de l'intron 1 de la transthyrétine ; TrI1), s'ajoutent aux séquences déjà disponibles pour former un jeu de données permettant de couvrir quasiment tous les genres de mangoustes pour trois marqueurs (Cytochrome B, ND2 et TrI1). Les analyses séparées, combinées deux à deux, et les trois ensemble de ces jeux de données permettent de discerner un certain nombre de clades, plus ou moins fiables. Sur la base de ces résultats moléculaires et de l'observation des collections du Muséum National d'Histoire Naturelle, l'évolution d'un certain nombre de caractères, essentiellement crâniens, est discutée. Quelques synapomorphies putatives sont proposées pour les clades mis en évidence. Les relations entre ces clades restent encore assez incertaines, notamment en raison de la faible représentation des taxons asiatiques.