

Aperçu de la phylogénèse des espèces d'holothuries évoluant en eaux peu profondes (Holothuroidea : Aspidochirotida)

Karim Mezali¹

Résumé

Des analyses phylogénétiques réalisées à partir du séquençage d'une fraction de gène mitochondrial (DNAm 16S) sur 26 individus (appartenant globalement à cinq espèces échantillonnées en divers sites peu profonds du littoral algérien) ont permis de lever des incertitudes taxonomiques. La présente étude montre que : 1) les deux morphes de couleur de *Holothuria* (*H.*) *sanctori*, sujets à débats dans certains écrits scientifiques, forment un clade bien défini ; 2) *Holothuria* (*H.*) *stellati* dont l'identification confuse a toujours été admise, est une espèce distincte des autres espèces sur le plan génétique ; 3) *Holothuria* (*H.*) *tubulosa*, l'espèce la plus répandue et la « mieux connue » de la mer Méditerranée, forme un clade comprenant deux populations bien distinctes. Peu de spécimens d'holothuries analysés dans notre collection ont révélé de séquences d'ADN inhabituelles. Cela dit, de toute évidence, un spécimen donné représentera probablement soit une espèce distincte, qui était jusque là inconnue, soit un hybride entre deux espèces connues [à savoir *H.* (*R.*) *polii* et *H.* (*H.*) *stellati*].

Introduction

Les holothuries (*Holothuroidea*) de l'ordre des Aspidochirotes constituent un groupe bien visible et diversifié au sein des écosystèmes marins. Elles peuplent les sédiments mous et les prairies méditerranéennes de *Posidonia oceanica* (Francour 1990 ; Coulon et Jangoux 1993 ; Mezali 2008). Elles remplissent des fonctions écologiques fondamentales, en améliorant le recyclage des nutriments et la productivité locale des sédiments carbonatés oligotrophiques par leurs activités détritivores et de bioturbation (Uthicke 1999). Elles sont également pêchées pour être transformées en bèches de mer (Conand et Byrne 1993 ; Toral-Granda 2008). Bien que de belle taille, la taxonomie de nombre de ces invertébrés mobiles souvent dominants dans les eaux méditerranéennes peu profondes – ici prélevés en Algérie – demeure incertaine. Cela est dû à la difficulté à appliquer les caractères taxonomiques conventionnels (morphologie générale et squelettale). Nous avons entrepris une analyse phylogénétique des échantillons d'holothuroïdes, à partir des données séquentielles d'un gène mitochondrial (DNAm 16S). Cette étude avait pour objet l'examen systématique des holothuries aspidochirotes algériennes, au moyen de méthodes systématiques de phylogénie moléculaire.

Matériel et méthode employés

Échantillons

La plupart des espèces d'holothuries ont été ramassées à la main en 2006 par des plongeurs autonomes ou en apnée, dans toute la baie d'Alger (Tamentefoust) et la baie de Bou-Ismaïl (Sidi-Fredj) à des profondeurs de 1 à 20 m (figure 1). Trois stations supplémentaires (non signalées

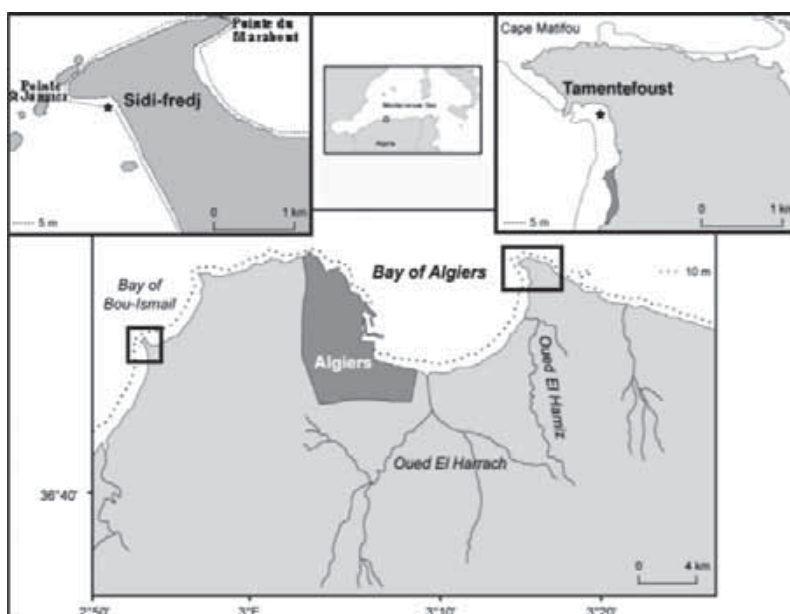


Figure 1. Stations où la plupart des holothuries ont été collectées.

1. Département des Ressources Halieutiques, Faculté des Sciences Exactes, de la Nature et de la Vie. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem, BP 300 rue Hocine Hamadou, 27000, Mostaganem, Algérie. Courriel : mezalikarim@yahoo.fr

sur la figure 1) ont également été explorées au cours de cette même année (Stidia et Sidi-Medjdoub dans la baie de Mostaganem et Figuiers-plage dans la baie de Zemmouri-Boumerdes). Les holothuries fraîchement ramassées ont été regroupées en 10 morphotypes : 1) la classique *Holothuria (Holothuria) tubulosa* A et 2) *Holothuria (Holothuria) stellati*, caractérisées par un bivium rond distinct et un trivium plat. *Holothuria (H.) stellati* se distingue de la classique *H. (H.) tubulosa* A de par ses importantes protubérances ; 3) *Holothuria (Holothuria) tubulosa* B possède un tégument en forme de gourde, pas très épais en position de repos ; 4) De consistance molle, *Holothuria (Holothuria) tubulosa* C a un bivium arqué avec des verrucosités coniques en pointes ; 5) *Holothuria (Holothuria) tubulosa* D a une forme légèrement cylindrique, un trivium aplati et un tégument épais. Ces espèces présentent des verrucosités coniques visibles, disposées en plusieurs lignes sur le bivium ; 6) le trivium de la classique *Holothuria (Roweothuria) poli* A est recouvert de pédicelles blancs ; 7) *Holothuria (Roweothuria) poli* B a le même aspect que *H. (H.) stellati* (grandes protubérances) et que *H. (R.) poli* A (pédicelles blancs régulièrement répartis sur le trivium ; 8) *Holothuria (Panningothuria) forskali* a un corps cylindrique souple et noir (lorsqu'il est vivant), et un grand nombre de pédicelles blancs sur le trivium ; 9) *H. (Platyperona) sanctori* A est brun tandis que 10) *H. (Platyperona) sanctori* B est facilement reconnaissable dans l'eau en raison de ses taches blanches. Les sept premières espèces décrites ci-dessus n'ont pas de tubes de Cuvier. Les espèces 8, 9 et 10 ont des tubes de Cuvier.

Extraction d'ADN, protocoles PCR et séquençage

Les échantillons de tissus conservés dans l'éthanol (90 %) ont été prélevés sur un tentacule de chaque individu. Au total, les données de séquences de 26 individus (toutes espèces confondues) ont été obtenues. Le Musée d'Histoire naturelle de Floride (États-Unis d'Amérique) nous a confié des données de séquences complémentaires (issues

des eaux méditerranéennes françaises). L'ADN a été extrait d'un fragment de tissu macéré (10–20 mg) placé dans un tube de microcentrifugeuse de 1,5 ml et extrait avec 750 µL de DNAzol et 5 µL de protéinase K. Des fractions de l'important sous-groupe de gènes de l'ADN ribosomal 16S (ADNr 16S) ont été amplifiées au moyen de primers 16SA-R (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') et 16SB-R (5'GCCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') (Palumbi et al. 1991).

L'amplification PCR a été réalisée dans 49 µL contenant : ddH₂O (30,8 µL) ; 10X (5 µL) ; dNTP (5 µL) ; AR (2 µL) ; BR (2 µL) ; TAQ polymérase (0,2 µL) ; MgCl₂ (4 µL) et 1 µL de solution d'ADN spécifique. Les relations PCR impliquaient une dénaturation à 95°C pendant 60 secondes, suivie par 40 cycles de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une étape d'hybridation à 55°C pendant 30 secondes, puis une extension à 72°C pendant 80 secondes, et enfin une extension finale de 10 mn. Les amplicons de PCR ont été purifiés à l'aide d'un kit de purification de PCR d'ADN sur gel. Tous les séquençages ont été réalisés par le Centre interdisciplinaire de recherche biotechnologique de l'université de Floride (www.biotech.ufl.edu/staff.html). Les séquences ont été alignées au moyen de l'application Se-Al 2.011 avec les paramètres par défaut et ont été contrôlées à l'œil nu.

Analyses des séquences et phylogénèse

Après avoir coupé quelques paires de bases au début et à la fin des séquences, la taille de la séquence d'ADNr 16s était de 600 bp. Ces données de séquences utilisées dans les analyses phylogénétiques ont été traitées par le logiciel Sequencher 4,8 pour réaliser un assemblage de plusieurs séquences d'ADN relativement courtes, afin de créer des séquences plus longues dites « contiguës ». Des analyses bayésiennes ont été réalisées avec le logiciel MRBayes (v.3.1, Ronquist et al. 2005). Avant les analyses, nous avons testé le modèle de substitution nucléotidique

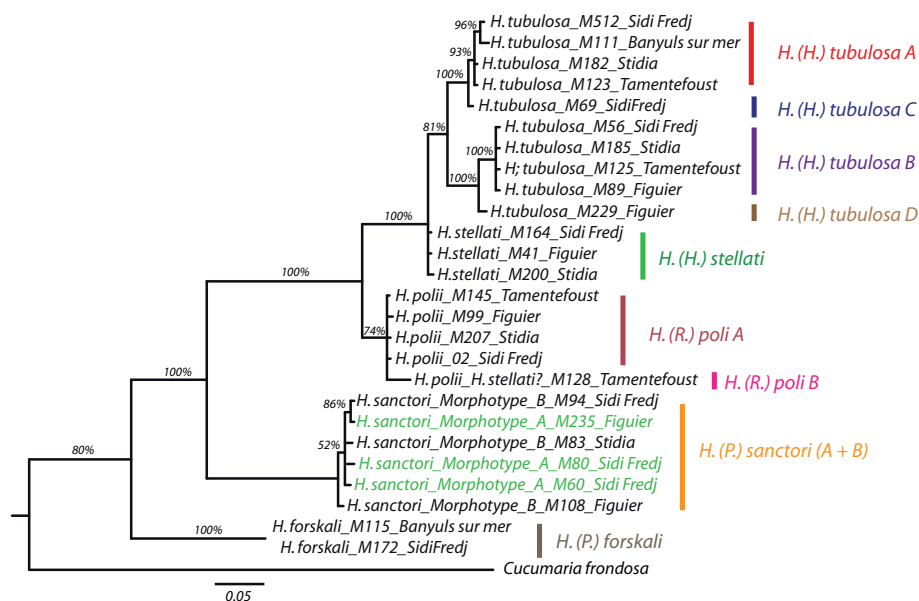


Figure 2. L'arbre consensus obtenu par analyse bayésienne basée sur ADNr 16s. Les valeurs indiquées au-dessus des branches représentent les probabilités postérieures (PP en %).

le plus approprié avec Modeltest 3.06 (Posada et Crandall 1998). Pour évaluer la fiabilité des arbres reconstitués, nous avons effectué un test statistique basé sur les probabilités bayésiennes postérieures à l'aide du modèle GTR (General Time Reversible). La séquence du groupe externe utilisée provenait de l'espèce *Cucumaria frondosa*, provenant de Genbank.

Résultats

Les arbres consensus obtenus par l'analyse bayésienne présentent en général cinq clades monophylétiques, avec des probabilités postérieures correspondant aux cinq espèces examinées (figure 2). *Holothuria (H.) tubulosa* est représentée par deux clades bien soutenus (AC et BD). *Holothuria (H.) stellati* est monophylétique et bien distincte des deux groupes (A et B) de *H. (H.) tubulosa* (100 % de fortes probabilités postérieures). L'arbre consensus obtenu par l'analyse bayésienne ne montre aucune différence entre les deux morphotypes de *Holothuria (P.) sanctori* (A et B). La classique *Holothuria (R.) poli A* est monophylétique et bien distincte des deux groupes de *H. (H.) tubulosa* (A et B) avec 100 % de fortes probabilités postérieures. *Holothuria (R.) poli B* incluse dans le clade de la classique *H. (R.) poli A* est légèrement différente (valeur élevée de probabilités postérieures 74 %), et différente de *H. (H.) stellati* (valeur élevée de probabilités postérieures 100 %).

Discussion

Les analyses phylogénétiques utilisant l'ADNr 16s ont fourni un aperçu des relations au sein de l'espèce des holothuries aspidochirotes du littoral algérien. L'espèce actuellement la plus reconnue formait deux clades distincts, soutenus par des valeurs élevées de probabilités postérieures, et les espèces formaient des clades concordant avec les révisions taxonomiques basées tant sur la morphologie que sur l'anatomie (Mezali 2008). Le phylogramme montre que *H. (H.) tubulosa* compte deux populations bien distinctes (A et B). *Holothuria (H.) stellati* est bien distincte de *H. (H.) tubulosa* (A et B). Ce résultat moléculaire obtenu sur des échantillons frais de *H. (H.) stellati* contredit le résultat obtenu par Borrero-Pérez et al. (2009), qui considère que *H. (H.) stellati* est un synonyme subjectif junior de *H. tubulosa*. *Holothuria (R.) poli B* se retrouve dans le même clade que la classique *H. (R.) poli A*. On peut considérer qu'*Holothuria (R.) poli B* est une forme intermédiaire entre *H. (H.) stellati* et *H. (R.) poli A* car ses caractéristiques morphologiques sont communes aux deux espèces. Ce qui nous suggère que *H. (R.) poli B* est une espèce hybride. La taxonomie de certains des spécimens analysés de notre collection reste à confirmer. Les deux spécimens de *H. (H.) tubulosa* (C et D) ont fourni des séquences d'ADN inhabituelles. L'usage d'autres marqueurs moléculaires (à savoir ITS et COD) pourrait servir à déterminer à l'avenir la taxonomie précise de ces deux spécimens.

Remerciements

Cette étude fait partie intégrante d'une recherche effectuée par l'auteur dans le cadre de sa thèse de doctorat (PhD 2008), financée en partie par une bourse du Ministère algérien de l'enseignement supérieur et de la

recherche. L'auteur remercie le professeur Gustav Paulay pour son hospitalité et l'accès aux installations du Laboratoire de Malacologie du Musée d'histoire naturelle de Floride à Gainesville, Floride, USA.

Bibliographie

- Borrero-Perez G.H., Perez-Ruzafa A., Marcos C. and Gonzalez-Wanguemert M. 2009. The taxonomic status of some Atlanto-Mediterranean species in the subgenus *Holothuria* (Echinodermata:Holothuroidea: Holothuriidae) based on molecular evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society* 157:51-69.
- Conand C. and Byrne M. 1993. A review of recent developments in the world sea cucumbers fisheries. *Marine Fisheries Review* 55(4):1-13.
- Coulon P. and Jangoux M. 1993. Feeding rate and sediment reworking by the holothuroid *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) in a Mediterranean seagrass bed off Ischia Island, Italy. *Marine Ecology Progress Series* 92:201-204.
- Francoeur P. 1990. Dynamique de l'écosystème à *Posidonia oceanica* dans le parc national de Port-Cros. Analyse des compartiments matre, litière, faune vagile, échinodermes et poissons. Thèse de Doctorat Université Pierre et Marie Curie, Paris. 373 p.
- Mezali K. 2008. Phylogénie, Systématique, dynamique des populations et nutrition de quelques espèces d'holothuries aspidochirotes (Holothuroidea: Echinodermata) inféodées aux herbiers de *Posidonies* de la côte algéroise. Thèse de Doctorat d'état. Institut des Sciences Biologiques/ Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Alger, Algérie. 208 p.
- Palumbi S. R., Martin A., Romano S., McMillan W.O., Stice L. and Grabowski G. 1991. A simple fool's guide to PCR, vers. 2.0. Special publication of the University of Hawaii Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii, Honolulu.
- Posada D. and Crandall K.A. 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. and Van Der Mark P. 2005. MrBayes 3.1 manual. [http:// www.ece.ualberta.ca/~birch/birchhomedir/dat/GDE/GDEHELP-OSX-Mac/doc/mrbayes/mr3.1_manual.pdf](http://www.ece.ualberta.ca/~birch/birchhomedir/dat/GDE/GDEHELP-OSX-Mac/doc/mrbayes/mr3.1_manual.pdf).
- Toral-Granda V. 2008. Galapagos Islands: A hotspot of sea cucumber fisheries in Latin America and the Caribbean. p. 231-253. In: Toral-Granda V., Lovatelli A. and Vasconcellos M. (eds). *Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade*. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 516, Rome FAO.
- Uthicke S. 1999. Sediment bioturbation and impact of feeding activity of *Holothuria (Halodeima) atra* and *Stichopus chloronotus*, two sediment feeding holothurians, at Lizard Island, Great Barrier Reef. *Bulletin of Marine Science* 64:129-141.