

# RAPPORT D'ANALYSE

## Objectif

Recherche de séquences microsatellites polymorphes chez *Iguana delicatissima* et *Iguana iguana*.

## Matériel

L'ADN est extrait à partir de fragment de queues d'*Iguana delicatissima* et d'*Iguana iguana* conservés dans de l'éthanol à 70%. Plusieurs séquences microsatellites isolées chez sont amplifiées afin de déterminer leur degré de polymorphisme chez les 2 espèces d'intérêt.

A réception des prélèvements, un code interne unique est attribué selon les règles suivantes : les individus *Iguana delicatissima* sont codés IGD suivi d'un numéro incrémental et les individus *Iguana iguana* sont codés IGI suivi d'un numéro incrémental :

### IGUANA IGUANA

INDIVIDU	CODE
RIVIERE SALEE ID Base 46	IGI-01
FORT DE FRANCE ID Base 36-1	IGI-02
FORT DE FRANCE ID Base 45	IGI-03
LE DIAMANT ID Base 55	IGI-04
FORT DE FRANCE ID Base 36-2	IGI-05
FORT DE FRANCE ID Base 61	IGI-06
FORT DE FRANCE ID Base 62	IGI-07
LE VAUCLIN ID Base 49	IGI-08
FORT DE FRANCE ID Base 48	IGI-09

---

GENINDEXE  
6, rue des Sports  
17000 La Rochelle  
FRANCE

Téléphone : 33(0)5 46 30 69 66  
Télécopie : 33(0)5 46 30 69 68  
E-mail : [contact@genindexe.com](mailto:contact@genindexe.com)  
<http://www.genindexe.com>

SAS au capital de 143 500 €  
SIRET : 438 537 763 00015  
RCS LA ROCHELLE  
Code APE : 731 Z  
N°TVA FR70438537763

IGUANA DELICATISSIMA

INDIVIDU	CODE
6987-BDB	IGD-01
6985-5B5	IGD-02
6987-AOA	IGD-03
6986-DC6	IGD-04
6986-B46	IGD-05
6988-029	IGD-06
6988-628	IGD-07
6986-E35	IGD-08
6987-1C2	IGD-09
6988-8F5	IGD-10
6987-460Q	IGD-11
6985-BED	IGD-12
6987-348	IGD-13
6985-C9E	IGD-14
6985-6BE	IGD-15
6988-28C	IGD-16
6986-43A	IGD-17
6987-8A6	IGD-18
6987-E75	IGD-19
6987-460T	IGD-20
6988-281	IGD-21
06986654	IGD-22
06986D9C	IGD-23
06984EBD	IGD-24
06984FCC	IGD-25
06985078	IGD-26
06985D04	IGD-27
06988327	IGD-28
06986FE3	IGD-29
069872A0	IGD-30
06987FB4	IGD-31
0698663C	IGD-32
069872F0	IGD-33
06986803	IGD-34
06988727	IGD-35
069888CE	IGD-36

## Méthode

A partir de l'ADN extrait fourni, les loci microsatellites suivants sont amplifiés par PCR : MIG-E3, MIG-E4, MIG-E6, MIG-E8, MIG-E10, MIG-E11, MIG-E12, MIG-E13, MIG-E14, MIG-E15, MIG-E16 et Cthe37

Les loci sont d'abord amplifiés deux par deux afin de déterminer les conditions optimales d'amplifications et les plages d'allèles observées. Selon ces différents paramètres, une étape de multiplexage pourra alors être envisagée afin de réduire le coût des analyses.

Schémas d'amplifications :

Test 2 par 2

Locus	Concentration	Fluorochrome	Nom Mix
MIG-E3	0,2 µM	6-FAM	1
MIG-E4	0,2 µM	5HEX	
MIG-E6	0,2 µM	5HEX	2
MIG-E8	0,2 µM	6-FAM	
MIG-E10	0,2 µM	6-FAM	3
MIG-E11	0,2 µM	5HEX	
MIG-E12	0,2 µM	5HEX	4
MIG-E14	0,2 µM	6-FAM	
MIG-E13	0,2 µM	5HEX	5
MIG-E15	0,2 µM	6-FAM	
MIG-E16	0,2 µM	5HEX	6
Cthe37	0,2 µM	6-FAM	

Multiplexage

Locus	Concentration	Fluorochrome	Nom du Mix
MIG-E4	0,2 µM	5HEX	IG-01
MIG-E6	0,1 µM	5HEX	
MIG-E8	0,2 µM	6-FAM	
MIG-E11	0,2 µM	5HEX	
MIG-E12	0,3 µM	5HEX	
MIG-E13	0,2 µM	5HEX	
MIG-E15	0,2 µM	6-FAM	
MIG-E16	0,3 µM	5HEX	
Cthe37	0,2 µM	6-FAM	
MIG-E3	0,2 µM	6-FAM	IG-02
MIG-E10	0,2 µM	6-FAM	
MIG-E11	0,2 µM	5HEX	

Les amplifications ont été réalisées dans un volume final de 10µl selon les recommandations du fournisseur kit commercial « Multiplex PCR kit » (Qiagen, ref 206145)

Composition du mélange réactionnel (volume par réaction)

2X QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	5 µl
10X primer mix , amorces à 2µM	1 µl
H2O RNase free	2 µl
ADN	2 µl

Programme PCR

Etape initiale d'activation	15 min	95°C
35 Cycle PCR		
Dénaturation	30 sec	94°C
Hybridation	1min30	57°C
Elongation	1min30	72°C
Extension finale	30 min	60°C

A la fin de la réaction, 1 µl de produits de PCR est dénaturé en présence de Formamide désionisée (AppliedBiosystems, ref 4311321) et de marqueur de taille GeneScan ROX500 (AppliedBiosystems, ref 401734).

Les données sont analysées sur le logiciel GeneMapper v4.0 (AppliedBiosystems).

Nous avons réalisé en tout 350 PCR (duplex + multiplex) afin d'obtenir les résultats décrits dans la section « résultats » suivante.

## Résultats

La plupart des loci sont monomorphes pour la population *d'Iguana delicatissima* étudiée. Seuls deux loci MIGE8 et Cthe37 présentent une hétérozygotie (Figure 1a et 1b). De plus, pour ces deux loci, les allèles observés diffèrent selon l'espèce considérée.

Les génotypes obtenus sont résumés dans les tableaux 3 et 4.

Tableau 3 : Génotypes Observés (pour les loci monomorphes)

Locus	Iguana delicatissima	Iguana iguana
MIG-E3	178/178	178/178
MIG-E4	235/235	243/243
MIG-E6	136/136	138/138
MIG-E10	192/192	192/192
MIG-E11	162/162	150/150
MIG-E12	195/195	199/199
MIG-E13	267/267	261/261
MIG-E15	128/128	130/130
MIG-E16	211/211	211/211

Tableau 4 : Génotypes Observés (pour les loci polymorphes)

### IGUANA IGUANA

INDIVIDU	CODE	MIG-E8	Cthe37
RIVIERE SALEE ID Base 46	IGI-01	153/161	202/202
FORT DE FRANCE ID Base 36-1	IGI-02	Pas d'amplification	Pas d'amplification
FORT DE FRANCE ID Base 45	IGI-03	Pas d'amplification	Pas d'amplification
LE DIAMANT ID Base 55	IGI-04	153/161	192/192
FORT DE FRANCE ID Base 36-2	IGI-05	Pas d'amplification	Pas d'amplification
FORT DE FRANCE ID Base 61	IGI-06	157/157	202/202
FORT DE FRANCE ID Base 62	IGI-07	153/167	202/202
LE VAUCLIN ID Base 49	IGI-08	Pas d'amplification	Pas d'amplification
FORT DE FRANCE ID Base 48	IGI-09	Pas d'amplification	Pas d'amplification

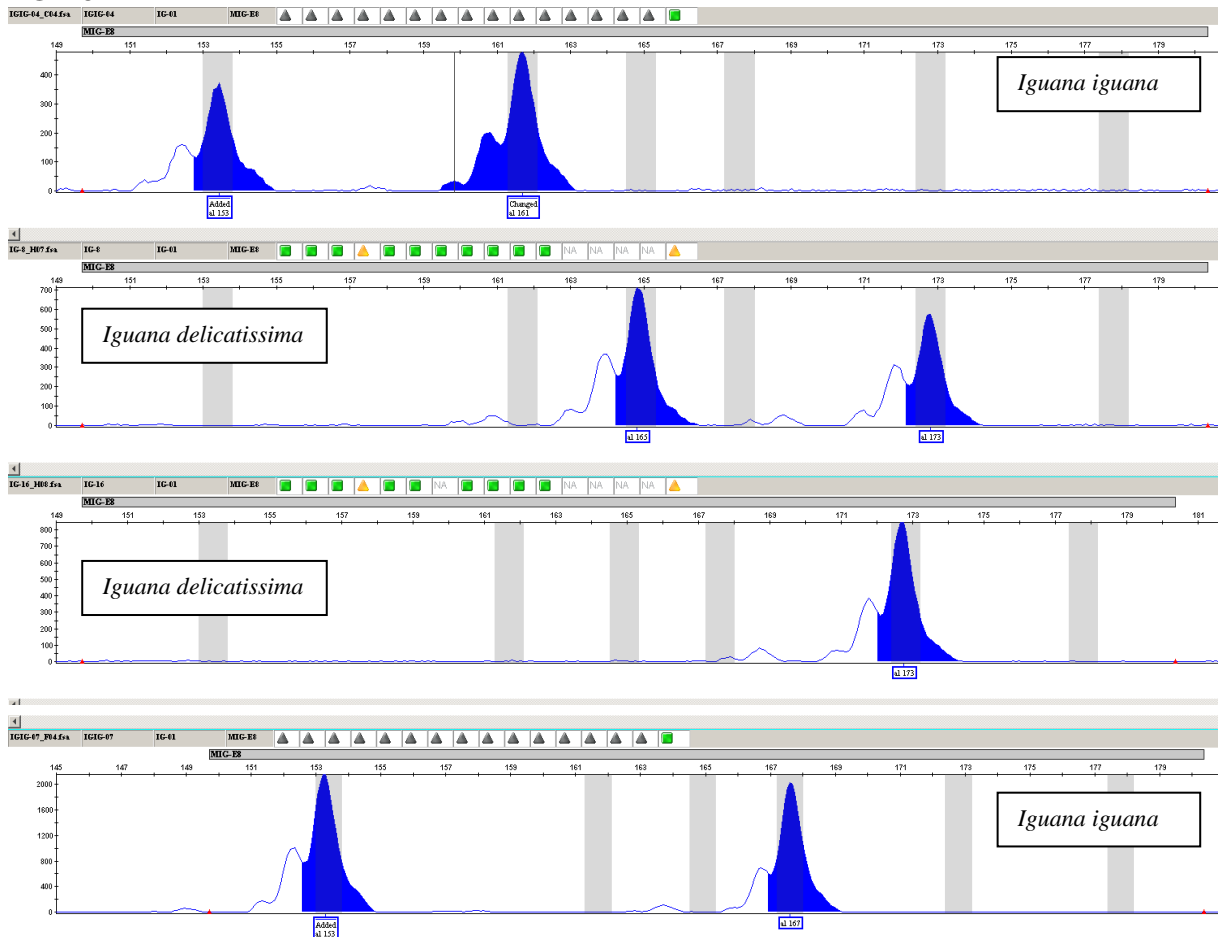
IGUANA DELICATISSIMA

INDIVIDU	C O D E	MIG-E8	Cthe37
6987-BDB	IGD-01	165/165	
6985-5B5	IGD-02	165/173	192/192
6987-AOA	IGD-03	165/165	
6986-DC6	IGD-04	165/173	202/202
6986-B46	IGD-05	165/173	192/192
6988-029	IGD-06	165/173	202/202
6988-628	IGD-07	165/173	194/202
6986-E35	IGD-08	165/173	194/202
6987-1C2	IGD-09	165/173	
6988-8F5	IGD-10	165/173	
6987-460Q	IGD-11	165/165	194/202
6985-BED	IGD-12	165/165	202/202
6987-348	IGD-13	165/165	
6985-C9E	IGD-14	165/165	
6985-6BE	IGD-15	165/165	194/202
6988-28C	IGD-16	173/173	194/194
6986-43A	IGD-17	165/173	194/202
6987-8A6	IGD-18	173/173	194/202
6987-E75	IGD-19	165/165	202/202
6987-460T	IGD-20	165/165	192/194
6988-281	IGD-21	165/165	
06986654	IGD-22	165/173	
06986D9C	IGD-23		
06984EBD	IGD-24		
06984FCC	IGD-25		
06985078	IGD-26		
06985D04	IGD-27		
06988327	IGD-28		202/202
06986FE3	IGD-29		
069872A0	IGD-30		
06987FB4	IGD-31		
0698663C	IGD-32		
069872F0	IGD-33		
06986803	IGD-34		
06988727	IGD-35		
069888CE	IGD-36		

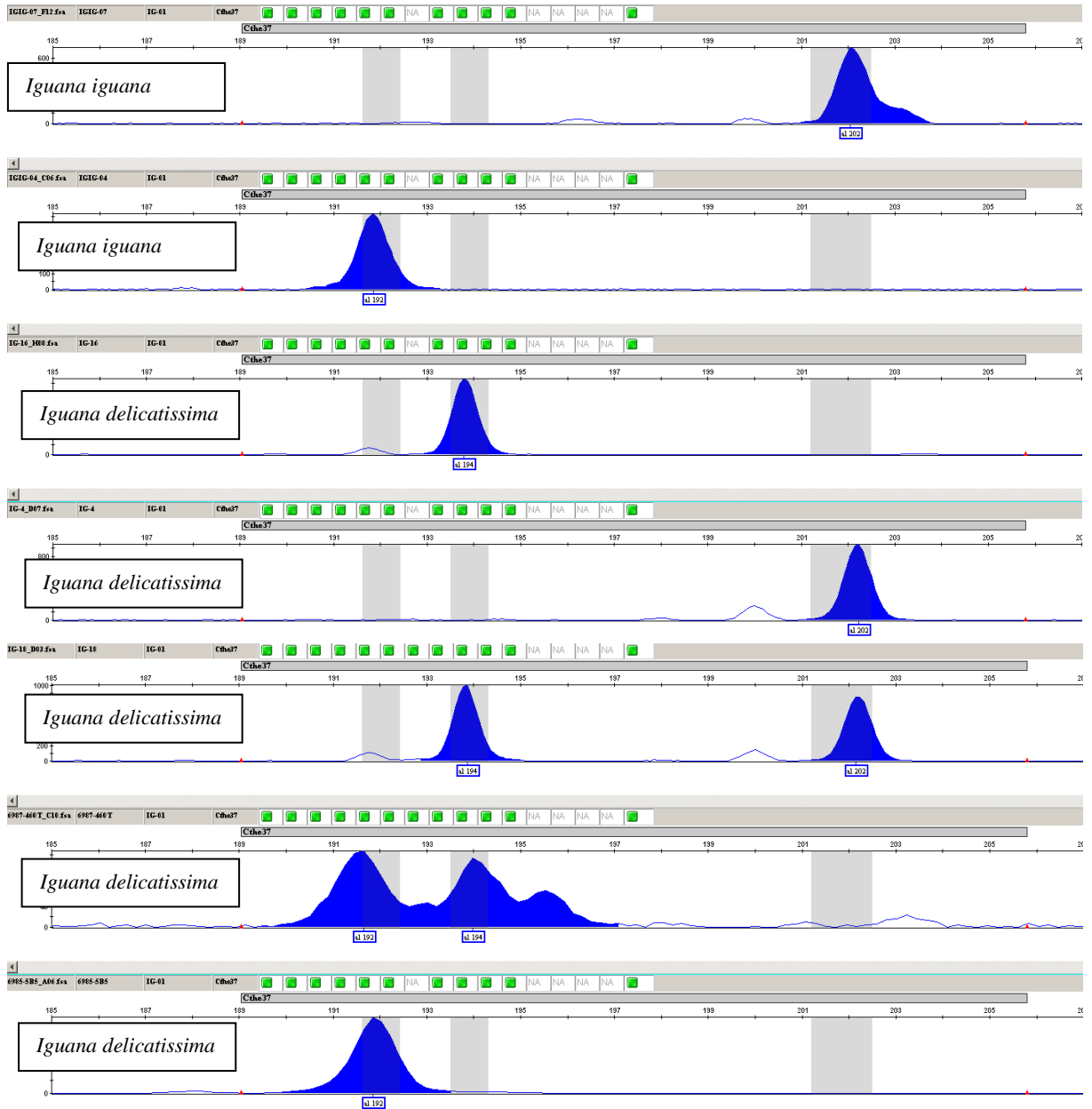
Les cellules vides signifient qu'aucun signal interprétable n'a pu être obtenu.

Figure 1 : Résultats des amplifications multiplexes au niveau des loci MIG-E8 (a) et Cthe37(b). On observe une hétérozygotie et des allèles différents selon l'espèce considérée.

1a : locus MIG-E8



1b : locus Cthe37





## Autres Résultats

Un contact a été pris avec Catherine STEPHEN afin de poursuivre cette étude avec un objectif de collaboration et d'échange de données entre les différentes équipes de recherche impliquées dans l'étude des Iguanes dans le monde. Ce contact, très positif, a mis en évidence la possibilité de détecter des hybrides *Iguana delicatissima* X *Iguana iguana* par l'étude « simplifiée » de 2 gènes nucléaires et un gène mitochondrial (PCR RFLP).

Nous avons eu communication des séquences de ces 3 gènes d'intérêt dans plusieurs espèces issues de différents territoires :

>NT3\_delicatissima\_Dominica

```
AAAGGAGTTTACCAGAAGAGTCAATAAATTCTCTTATTATAAACTTATTC
AAGCTGATATTCTGAAAAACAAGATATCCAAGCAGATGGTAGATGTCAAAAATAATG
TTCAAATACAATGAAGAAAATGGACACTATTGAGCCATATACAGATGGCAATGACA
ATATGAAATTGGATTTCCAGCCAGTTATTTTCGATAGAAAACAGAATTATTGAGGCAGC
AGAAGCACTACAGCTCCCCCAGGGTCCTCTTGAGTGACAATACCCCATTTGGAACCCC
CACCATTGTATCTTATGGAGGATTACATTGGTGACTCTGAGGTGAAGAACCGAACAT
CTCGGCAGAGGAGGTTTGCTGAAAAACAAGAGCCACCGTGGGGAGTATTCTGTGTGTG
ACAGTGAAAGCCGATGGGTGACAGACAAATCTTCAGCTATTGACATTAGAGGACACC
AGGTAAGTGTGCTGGGAGAGATCAAAATGGGTCTCTTCCC
```

>NT3 iguana\_Mexico

```
AAAGGAGTTTACCAGAAGAGTCAATAAATTCTCTTATTATAAACTTATTC
AAGCTGATATTCTGAAAAACAAGATATCCAAGCAGATGGTAGATGTCAAAAATAACG
TTCAAATACAATGAAGAAAATAGACACTATTGAGCCATATACAGATGGCAATGACA
ATATGAAATCGGATTTCCAGCCAGTTCTTTTCGATAGAAAACAGAATTATTGAGGCAGC
AGAAACACTACAGCTCCCCCAGGGTCCTCTTGAGTGACAATACCCCATTTGGAACCCC
CACCATTGTATCTTATGGAGGATTACATTGGTGGCTCTGAGGTGAAGAACCGAACAT
CTCGGCAGAGGAGGTTTGCTGAAAAACAAGAGCCACCGTGGGGAGTATTCTGTGTGTG
ACAGTGAAAGCCGATGGGTGACAGACAAATCTTCAGCTATTGACATTAGAGGACACC
AGGTAAGTGTGCTGGGAGAAATCAAAATGGGTCTCTTCCC
```

>NT3 iguana\_Suriname

```
AAAGGAGTTTACCAGAAGAGTCAATAAAATTCTCTTATTATAAAAATTATTC
AAGCTGATATTCTGAAAAACAAGATATCCAAGCAGATGGTAGATGTCAAAAATAACG
TTCAAATACAATGAAGAAAATAGACACTATTGAGCCATATAYAGATGGCAATGACA
ATATGAAATTGGATTTCCAGCCAGTTATTTTCGATAGAAAACAGAATTATTGAGGCAGC
AGAAGCACTACAGCTCCCCCAGGGTCTCTTGAGTGACAATACCCATTGGAACCCC
CACCATTGTATCTTATGGAGGATTACATTGGTGGCTCTGAGGTGAAGAACCGAACAT
CTCGGCAGAGGAGGTTTGTGTAACAAGAGCCACCGTGGGGAGTATTCTGTGTGTG
ACAGTGAAAGCCGATGGGTGACAGACAAATCTTCAGCTATTGACATTAGAGGACACC
AGGTAACGTGCTGGGAGAAATCAAATGGGTCTTCCC
```

>NT3 gene iguana\_venezuela

```
AAAGGAGTTTACCAGAAGAGTCAATAAAATTCTCTTATTATAAAAATTATTC
AAGCTGATATTCTGAAAAACAAGATATCCAAGCAGATGGTAGATGTCAAAAATAACG
TTCAAATACAATGAAGAAAATAGACACTATTGAGCCATATACAGATGGCAATGACA
ATATGAAATTGGATTTCCAGCCAGTTATTTTCGATAGAAAACAGAATTATTGAGGCAGC
AGAAGCACTACAGCTCCCCCAGGGTCTCTTGAGTGACAATACCCATTGGAACCCC
CACCATTGTATCTTATGGAGGATTACATTGGTGGCTCTGAGGTGAAGAACCGAACAT
CTCGGCAGAGGAGGTTTGTGTAACAAGAGCCACCGTGGGGAGTATTCTGTGTGTG
ACAGTGAAAGCCGATGGGTGACAGACAAATCTTCAGCTATTGACATTAGAGGACACC
AGGTAACGTGCTGGGAGAAATCAAATGGGTCTTCCC
```

>Cmos delicatissima Dominica

```
CAGTTTGGCATCACGGCAGAGTTTCTGGGCAGAATTAATGTGGCACATCT
TGAACATAAAAATGTGGTACGTGTAATAGCTGCTAGCACATGTGCCCTGCCAGTCA
GGATAGTTTGGGCACCATTATAATGGAATATGTAGGTAACAGCACTCTGCACCACAT
TATCTATGGGACTGACTGCAAGACAGCAAAGAAGAAGGATGATGGGCTTGGATGTGG
CCATGTGTCTTTGAGCATAACTGAGGCATTAGGTTATTCCTGTGACATTGCAGCAGG
TCTAGTCTTCTCCATTACATTTGATTGTGCACTTGGATTTAAAACCTGCTAATGT
ATTCATCACAGAACAAAATGTTTGCAAG
```

>Cmos iguana Mexico

```
CAGTCTGGCATCACGGCAGAGTTTCTGGGCAGAATTAACGTGGCACATCTTGAACA
TAAAATGTGGTACGTGTAATAGCTGCTAGCACATGTGCCCTGCCAGTCAGGATAG
TTTGGGCACCATTATAATGGAATATGTAGGTAACAGCACTCTGCACCACATTATCTA
TGGGACTGACTGCAAGACAGCAAAGAAGAAGGATGATGGGCTTGGATGTGGCCGTGT
GTCTTTGAGCATAACTGAGGCATTAGGTTATTCCTGTGACATTGCAGCAGGCTAGT
CTTTCTCCATTACATTTGATTGTGCACTTGGATTTAAAACCTGCTAATGTATTTCAT
CACAGAACAAAATGTTTGCAAG
```

>Cmos iguana Suriname

```
CAGTCTGGCATCACGGCAGAGTTTCTGGGCAGAATTAACGTGGCACATCT
TGAACATAAAAATGTGGTACGTGTAATAGCTGCTAGCACATGTGCCCTGCCAGTCA
GGATAGTTTGGGCACCATTATAATGGAATATGTAGGTAACAGCACTCTGCACCACAT
TATCTATGGGACTGACTGCAAGACAGCAAAGAAGAAGGATGATGGGCTTGGATGTGG
CCGTGTGTCTTTGAGCATAACTGAGGCATTAGGTTATTCCTGTGACATTGCAGCAGG
TCTAGTCTTCTCCATTACATTTGATTGTGCACTTGGATTTAAAACCTGCTAATGT
ATTCATCACAGAACAAAATGTTTGCAAG
```

Un test PCR RFLP est en cours de mise au point sur les échantillons d'ADN détenus au laboratoire.