

Rapport
29 janvier 2016

Contexte

L'ONCFS étudie depuis plusieurs années les populations d'Iguane des petites Antilles (*Iguana delicatissima*) et notamment leur hybridation avec l'Iguane commun (*Iguana iguana*).

Dans le cadre du Plan National d'Actions pour la conservation de l'Iguane des Petites Antilles (PNA IPA), la Cellule Technique Antilles Françaises de l'ONCFS souhaite réaliser des analyses génétiques sur des échantillons des deux espèces récoltés en Guyane, Martinique et Guadeloupe et s'appuyant sur deux types de marqueurs génétiques (microsatellites, ADN mitochondrial).

La prestation attendue comprend :

- les analyses génétiques des échantillons d'iguanes,
- les analyses statistiques et l'interprétation des résultats.

Objectifs

Les principaux objectifs du projet sont :

- identifier l'espèce, voire la sous-espèce, pour chaque échantillon
- évaluer l'éventuel niveau d'hybridation
- caractériser le niveau de diversité génétique des populations
- différencier les différentes populations et leur structuration
- établir les liens phylogénétiques avec les populations connues
- comprendre l'histoire des peuplements (colonisation, hybridation)

à partir des données génétiques produites sur les marqueurs microsatellites et sur l'ADN mitochondrial.

Les échantillons collectés en Martinique et Guadeloupe correspondent essentiellement à des prélèvements de sang conservés avec un anticoagulant (EDTA) et à des prélèvements de phanère conservés dans l'alcool (éthanol 70°).

Travaux réalisés

Le laboratoire ANTAGENE a réceptionné 202 échantillons (190 phanères et 12 sangs). Une extraction et purification d'ADN spécifique à chaque type de prélèvement (phanère, sang coagulé ou non) ont été réalisées.

Un panel de 21 marqueurs microsatellites a été mis au point à partir des 15 marqueurs microsatellites décrits dans les articles Valette et al. (2013) et Vuillaume et al. (2015) et à partir d'une liste de 9 marqueurs microsatellites fournie par l'équipe de Mark Welch (Mississippi State University, USA).

Trois marqueurs ont montré des problèmes d'amplification, d'analyse ou d'interprétation (D136, IgdL2, IgdL3). Nous avons préféré les exclure pour ne pas fausser l'ensemble des données génétiques produites. Les empreintes génétiques avec 21 marqueurs présentent une quantité d'information et un pouvoir de résolution largement suffisant pour distinguer les espèces, évaluer l'hybridation et comparer aux données existantes.

Les marqueurs microsatellites ont été amplifiés, analysés, lus en double aveugle par deux analystes indépendants et confrontés. Lorsque le marqueur n'est pas amplifié ou si sa lecture n'est pas fiable, une donnée manquante (000000) est renseignée.

Une portion du gène ND4 de l'ADN mitochondrial a été amplifiée, séquencée dans les deux sens (forward et reverse) et analysée en utilisant les amorces d'amplification et de séquençage décrite dans l'article Malone et al. (2000).

Résultats

Qualité des échantillons

La qualité des résultats obtenus est présentée dans le tableau suivant pour les principales régions :

	Bon	Moyen	Mauvais	Total
Guadeloupe	62	4	49	115
Martinique	60	3	2	65
Guyane	17	2		19
Mexique	3			3
Total	142	9	51	202

Une qualité « mauvaise » correspond à une très faible amplification de l'ADN sur les marqueurs microsatellites et la plupart du temps sur l'ADN mitochondrial.

Une qualité moyenne correspond à une amplification insuffisante des marqueurs microsatellites (moins de 15 marqueurs sur les 21).

**Analyse génétique d'échantillons
d'Iguane des Petites Antilles et d'Iguane commun
et interprétation des résultats**

La qualité des résultats obtenus est présentée dans le tableau suivant en détaillant les localisations des prélèvements pour les principales régions :

	Bon	Moyen	Mauvais	Total
Guadeloupe				
Bas du fort	2			2
Carangaise	9			9
Désirade - Pointe Colibri			41	41
Désirade - Réserve Nord		3	4	7
Désirade - Réserve Sud			2	2
Petit Cluny	5			5
Petite Terre	2			2
Petite Terre de Bas	5			5
Petite Terre de Haut	38	1	2	41
Trois rivières	1			1
Guyane				
Awala / Yalimapo	5			5
île Royale / îles du Salut	8	2		10
Kourou - Lac Bois Chaudat	1			1
Kourou - Route principale	1			1
Zoo Macouria	2			2
Martinique				
Fort de France	2	1		3
îlet Chancel	52		1	53
Nord Martinique	6	1	1	8
St Joseph		1		1
Mexique				
Barra de Navidad, Oxaca	3			3
Total	142	9	51	202

Quasiment tous les échantillons de mauvaise qualité proviennent de la Désirade, sans que l'on dispose d'explication précise pour l'instant (la conservation dans une substance dégradant l'ADN pourrait expliquer le phénomène observé).

Analyse génétique d'échantillons d'Iguane des Petites Antilles et d'Iguane commun et interprétation des résultats

Données génétiques

Les résultats sont présentés dans un tableau excel fourni en annexe et contenant les informations suivantes pour chaque échantillon :

- le génotype de chaque marqueur microsatellite
- le type mitochondrial
- la probabilité d'assignation statistique à chacune des espèces
- la classification en iguana, delicatissima ou hybride.

Assignation statistique

La différenciation génétique entre les deux espèces au niveau des 21 marqueurs microsatellites est extrêmement élevée (Fst de l'ordre de 70%) ce qui autorise une excellente assignation statistique des individus aux deux espèces et un pouvoir de résolution très élevée pour détecter les hybrides.

L'assignation statistique aux deux espèces (delicatissima ou iguana) ou à des hybrides est présentée dans le tableau suivant par région et localisation :

	delicatissima	hybride	iguana	iguana ID	Total
Guadeloupe					
Bas du fort			2		2
Carangaise	4	3		1	8
Petit Cluny	1	3	1		5
Petite Terre	2				2
Petite Terre de Bas	5				5
Petite Terre de Haut	38				38
Trois rivières			1		1
Guyane					
Awala / Yalimapo			5		5
île Royale / îles du Salut			10		10
Kourou - Lac Bois Chaudat			1		1
Kourou - Route principale			1		1
Zoo Macouria			2		2
Martinique					
Fort de France				2	2
îlet Chancel	52				52
Nord Martinique	6				6
St Joseph				1	1
Mexique					
Barra de Navidad, Oaxaca			3		3
Total	108	6	26	4	144

Les individus classés dans la catégorie « iguana ID » correspondent à des iguanes avec un génome « iguana » mais avec un ADN mitochondrial de type « delicatissima ». Cette configuration correspond probablement à une introgression ancienne, sachant que l'ADN mitochondrial est transmis par la lignée maternelle sans jamais se diluer (le génome nucléaire delicatissima s'étant dilué après de nombreux retro-croisement des hybrides initiaux avec des individus *Iguana iguana*).

Les 6 hybrides identifiés en Guadeloupe possèdent tous un ADN mitochondrial de type delicatissima, ce qui peut suggérer une hybridation plus courante entre des femelles delicatissima et des mâles iguana.

Diversité génétique

Le tableau ci-dessous affiche les principaux paramètres génétiques pour les Iguanes communs, les Iguanes des petites antilles et les hybrides :

	N	Diversité allélique	Hétérozygotie théorique
Iguana iguana	30	4,50	0,455
Hybrides	6	2,38	0,435
Iguana delicatissima			
Ilet Chancel	52	1,57	0,162
Petite Terre	45	1,29	0,067
Nord Martinique	6	1,81	0,281
Basse Terre	5	1,29	0,093
Total	144		
Moyenne			
Iguana iguana		4,50	0,455
Iguana delicatissima		1,49	0,151

Les Iguanes des petites antilles montrent un niveau de diversité génétique (diversité allélique, hétérozygotie) beaucoup plus faible que les Iguanes communs (de l'ordre de 3 fois plus faible). Les hybrides montrent un niveau de diversité intermédiaires entre les deux espèces.

Les différentes populations d'Iguanes des petites antilles ne montrent pas de différences significatives de diversité allélique malgré les effectifs extrêmement bas pour le Nord Martinique et Basse Terre. La population Nord Martinique montre même un niveau d'hétérozygotie nettement plus élevée que les autres populations avec seulement 6 individus, alors que la population Petite Terre montre un niveau extrêmement faible d'hétérozygotie avec 45 individus.

Analyse génétique d'échantillons d'Iguane des Petites Antilles et d'Iguane commun et interprétation des résultats

Le tableau ci-dessous affiche les principaux paramètres génétiques pour les Iguanes communs, les Iguanes des petites antilles (IPA) et les hybrides, en comparant les données de l'équipe Breuil (Vuillaume et al. 2015) et de l'équipe Welch (Dominique) :

	N			Diversité allélique					Hétérozygotie théorique				
	A	Breuil	Welch	A-21	A-13	Breuil	A-8	Welch	A-21	A-13	Breuil	A-8	Welch
Iguana iguana	30	29	-	4,50	4,00	5,92	5,25	-	0,455	0,406	0,670	0,529	-
Hybrides	6	25	-	2,38	2,15	4,08	2,75	-	0,435	0,378	0,446	0,528	-
Iguana delicatissima													
Martinique/Ilet Chancel	52	29	-	1,57	1,46	1,77	1,75	-	0,162	0,153	0,221	0,177	-
Martinique/Nord	6	-	-	1,81	1,54	-	2,25	-	0,281	0,194	-	0,423	-
Guadeloupe/Petite Terre	45	15	-	1,29	1,15	1,85	1,50	-	0,067	0,041	0,125	0,110	-
Guadeloupe/Basse Terre	5	12	-	1,29	1,00	1,62	1,75	-	0,093	0,000	0,179	0,244	-
Dominique	-	-	NC	-	-	-	-	3,88	-	-	-	-	0,533
Total	144	110											
Moyenne													
Iguana iguana				4,50	4,00	5,92	5,25	-	0,455	0,406	0,670	0,529	-
Iguana delicatissima				1,49	1,29	1,75	1,81	-	0,151	0,097	0,175	0,239	-

A = ANTAGENE

A-21 = les 21 marqueurs analysés par ANTAGENE

A-13 = les 13 marqueurs analysés par ANTAGENE en commun avec l'équipe Breuil

A-8 = les 8 marqueurs analysés par ANTAGENE en commune avec l'équipe Welch

La diversité génétique :

- est très faible pour l'Iguane des Petites Antilles (hors Dominique) quelque soit le jeu de marqueurs utilisés
- est moyenne chez l'Iguane commun (4 à 6 allèles par marqueur)
- est intermédiaire pour les hybrides
- est nettement plus élevée pour les IPA de Dominique par rapport aux IPA de Martinique/Guadeloupe (richesse allélique et hétérozygotie 2 à 3 fois plus élevées)

Malgré la différence de diversité entre la Dominique et la Martinique/Guadeloupe, les Iguanes des Petites Antilles de ces 3 îles présentent un profil génétique proche, et très différent du profil génétique de l'Iguane Commun.

Comparaison des assignations statistiques

Les assignations statistiques conduites sur une simulation des données de l'équipe Welch montrent que tous les individus de la Dominique se classent comme des iguanes associés à l'espèce « delicatissima ». Cela nécessiterait néanmoins de conduire ces analyses statistiques sur les données individuelles (génotypes) produites par l'équipe Welch.

Le diagramme en Annexe 1 présente les probabilités d'assignation des individus analysés par ANTAGENE et par l'équipe Breuil (sur les 13 marqueurs en commun).

Dans ce diagramme, chaque individu est représenté par une barre verticale. La probabilité d'être assigné à l'espèce « delicatissima » est représentée par une barre bleue (un individu assigné à 100% à l'espèce « delicatissima » présente une barre entièrement bleue). La probabilité d'être assigné à l'espèce « iguana » est représentée par une barre verte. Par exemple, un hybride 80% « iguana » et 20% « delicatissima » présente une grande barre verte et une petite barre bleue.

Pour conclure à un hybride, le seuil de 90% est couramment utilisé. En dessous de 10%, ce n'est pas significatif (c'est le bruit de fond). Au dessus de 10%, on peut commencer à raisonnablement penser que l'individu est un hybride.

Les principales conclusions de ce diagramme :

- les « delicatissima ANTAGENE » sont tous des purs Iguanes des Petites Antilles (à presque 100%)
- les « iguana ANTAGENE » sont tous des purs Iguanes communs (seuls 2 individus présentent une probabilité « delicatissima » de 1% et 3%, mais ce n'est pas statistiquement significatif)
- les « delicatissima Breuil » sont massivement classés comme des Iguanes des Petites Antilles, à l'exception de 6 individus avec une probabilité « iguana » non négligeable, et surtout 3 individus avec une probabilité « iguana » comprise entre 12 et 17%
- les « iguana Breuil » sont classés comme des Iguanes communs, à l'exception de 3 individus avec une probabilité « delicatissima » entre 16 et 25%
- les « hybrides ANTAGENE » sont faiblement hybridés « iguana », à l'exception de 2 individus hybridés à 50%
- les « hybrides Breuil » semblent présenter un niveau d'hybridation plus important, à l'exception de 5 individus plus faiblement hybridés (8 à 15%)

Structuration génétique

Le tableau ci-dessous présente deux calculs de distance génétique entre différents jeux de données ou populations :

	Distance Nei	Fst
ANTAGENE vs Breuil		
Ilet Chancel	0,007	0,035
Petite Terre	0,003	0,063
Ilet Chancel vs Petite Terre		
ANTAGENE	0,506	0,782
Breuil	0,473	0,615
ANTAGENE vs Welch		
Basse Terre (5) vs Dominique	0,251	0,206
Petite Terre (45) vs Dominique	0,186	0,260
Nord Martinique (6) vs Dominique	0,165	0,126
Ilet Chancel (52) vs Dominique	0,276	0,295

Seules les populations Ilet Chancel et Petite Terre présentent un effectif suffisant pour pouvoir être comparée en limitant les biais statistiques.

La très faible distance génétique entre les données « ANTAGENE » et « Breuil » confirme la cohérence entre les données produites par ANTAGENE et les données publiées par l'équipe Breuil (Vuillaume et al. 2015).

La très grande distance génétique entre Ilet Chancel et Petite Terre montre une très importante différenciation génétique de populations présentes sur des îles très distantes géographiquement.

Les distances génétiques moyennes entre la population de Dominique (données de l'équipe Welch) et les quatre autres populations (données ANTAGENE) suggèrent que la population de Dominique présente une différenciation génétique intermédiaire entre la Guadeloupe et la Martinique. Il faut noter la proximité génétique entre la Dominique et le Nord Martinique (même si l'effectif très faible du Nord Martinique peut induire un biais statistique important).

Par ailleurs, l'absence de structuration génétique au sein de la population Petite Terre atteste de flux génétiques significatifs entre Petite Terre de Haut et Petite Terre de Bas (même si la sous-représentation de cette dernière localisation pourrait induire des biais statistiques).

Distributions alléliques

La configuration génétique des populations et le très faible effectif du Nord Martinique et de Basse terre compliquent l'analyse de structuration génétique.

Pour cette raison, nous avons choisi de présenter une partie des données brutes en Annexe 2 (marqueurs de l'équipe Breuil) et en Annexe 3 (marqueurs de l'équipe Welch), c'est à dire les distributions alléliques pour certains marqueurs génétiques en les comparant entre espèces et entre populations d'Iguanes des Petites Antilles.

L'analyse globale des graphiques de distributions alléliques conduit aux interprétations suivantes :

- la diversité génétique de l'Iguane des Petites Antilles à l'échelle de l'espèce est très fragmentée au sein des différentes populations
- les distributions alléliques sont extrêmement différentes entre « iguana » et « delicatissima » (ce qui conduit à une structuration génétique très forte entre les deux espèces et à un fort pouvoir de détection de l'espèce et des hybrides)
- les hybrides montrent une distribution allélique intermédiaire entre les distributions alléliques des deux espèces
- les distributions alléliques des 5 populations (Basse Terre, Petite Terre, Dominique, Nord Martinique, Ilet Chancel) confirment que la structuration génétique semble corrélée à la distance géographique et le fait que la population de Dominique soit bien intermédiaire entre les populations de Guadeloupe et les populations de Martinique

Conclusions

En conclusion, les marqueurs génétiques utilisés sont fortement différenciés entre les deux espèces, ce qui permet d'identifier sans ambiguïté les Iguanes Communs, les Iguanes des Petites Antilles, et les hybrides (avec au moins 10% d'hybridation).

Les populations d'Iguanes des Petites Antilles présentent une faible diversité génétique et une très forte fragmentation génétique. Cette situation est probablement due à une forte dérive génétique, due à d'éventuels effets fondateurs historiques et à de faibles effectifs, ces deux phénomènes étant amplifiés par l'isolement sur les îles et îlets.

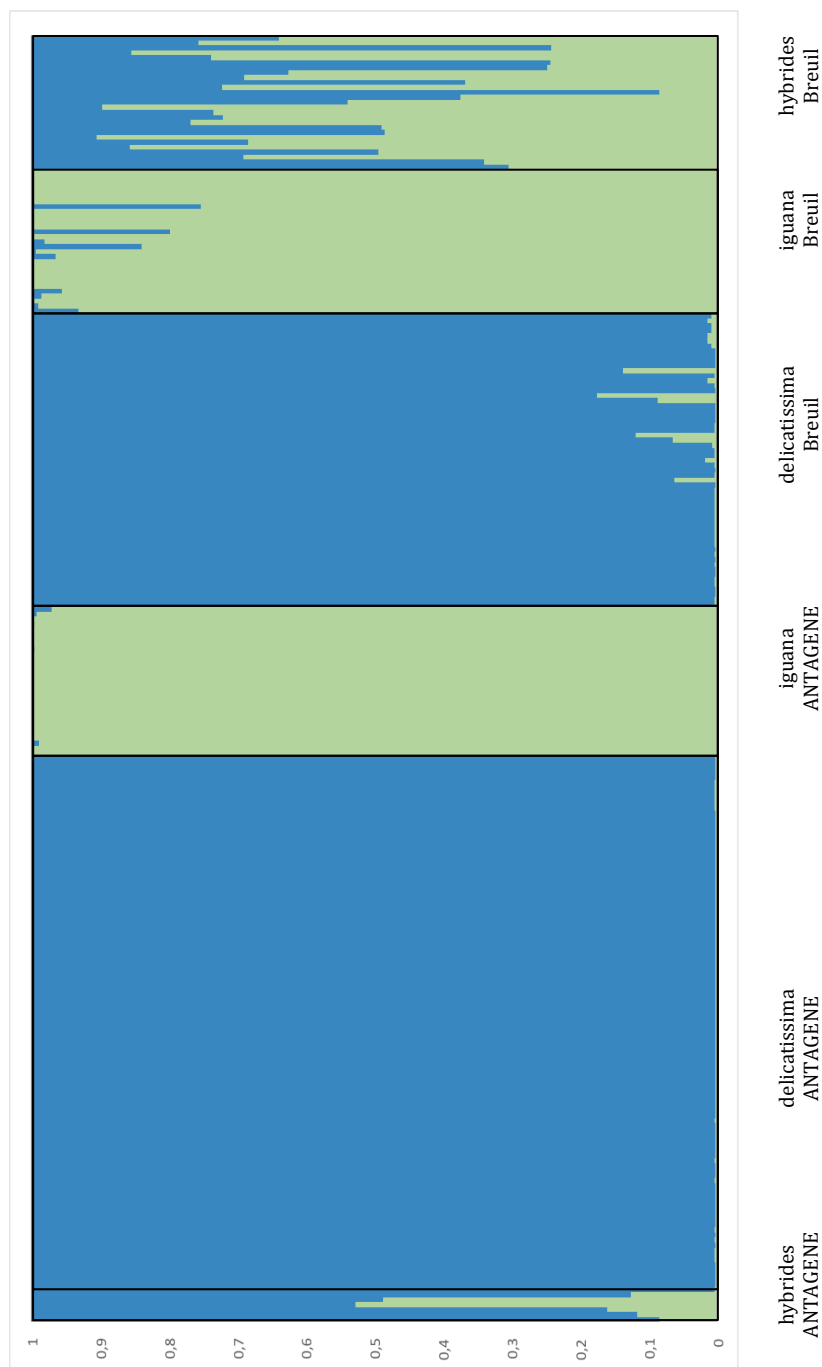
Avec ces données, il est impossible de savoir si cette fragmentation est une situation très ancienne liée à la colonisation des îles et îlets ou si cela correspond à une perte de diversité génétique récente engendrée par des effectifs restés faibles pendant une assez longue période.

La population de Dominique avec des individus purs « delicatissima » et avec un niveau de diversité génétique nettement plus élevé que les autres populations pourrait constituer une source intéressante d'Iguanes des Petites Antilles pour renforcer les populations de Guadeloupe et de Martinique.

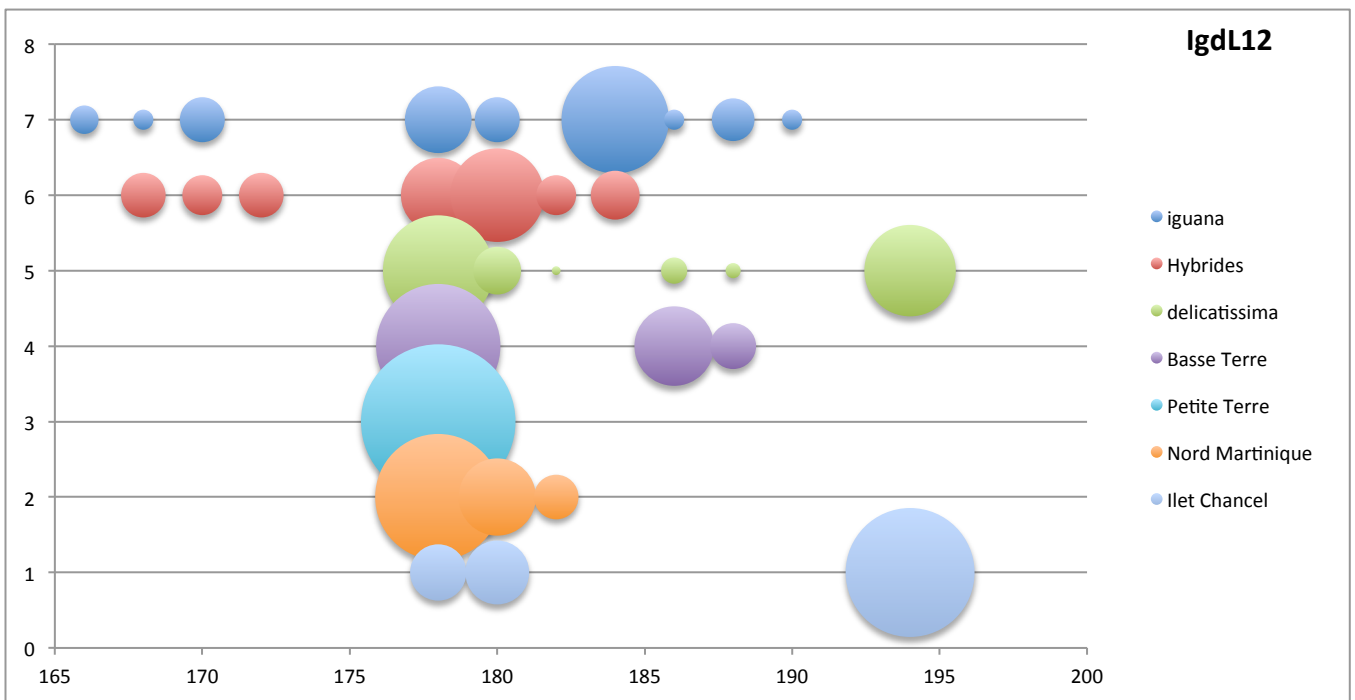
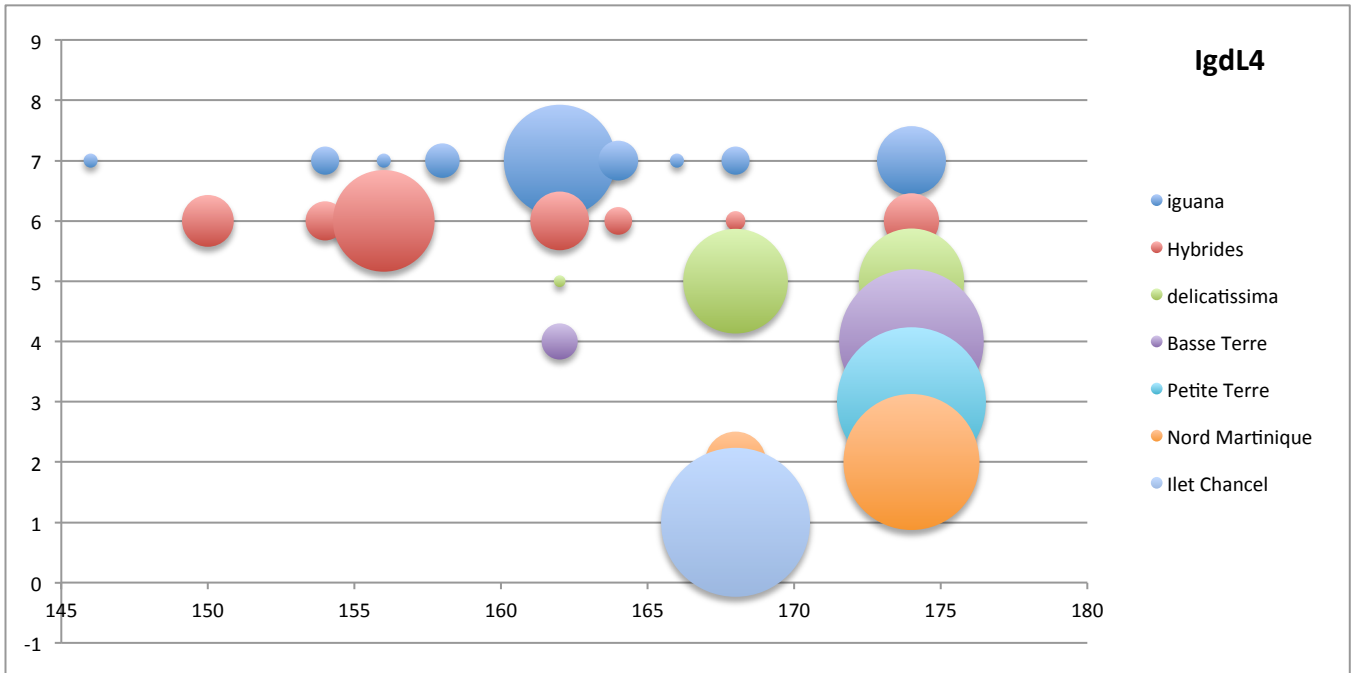
Guillaume QUENEY
Docteur en génétique



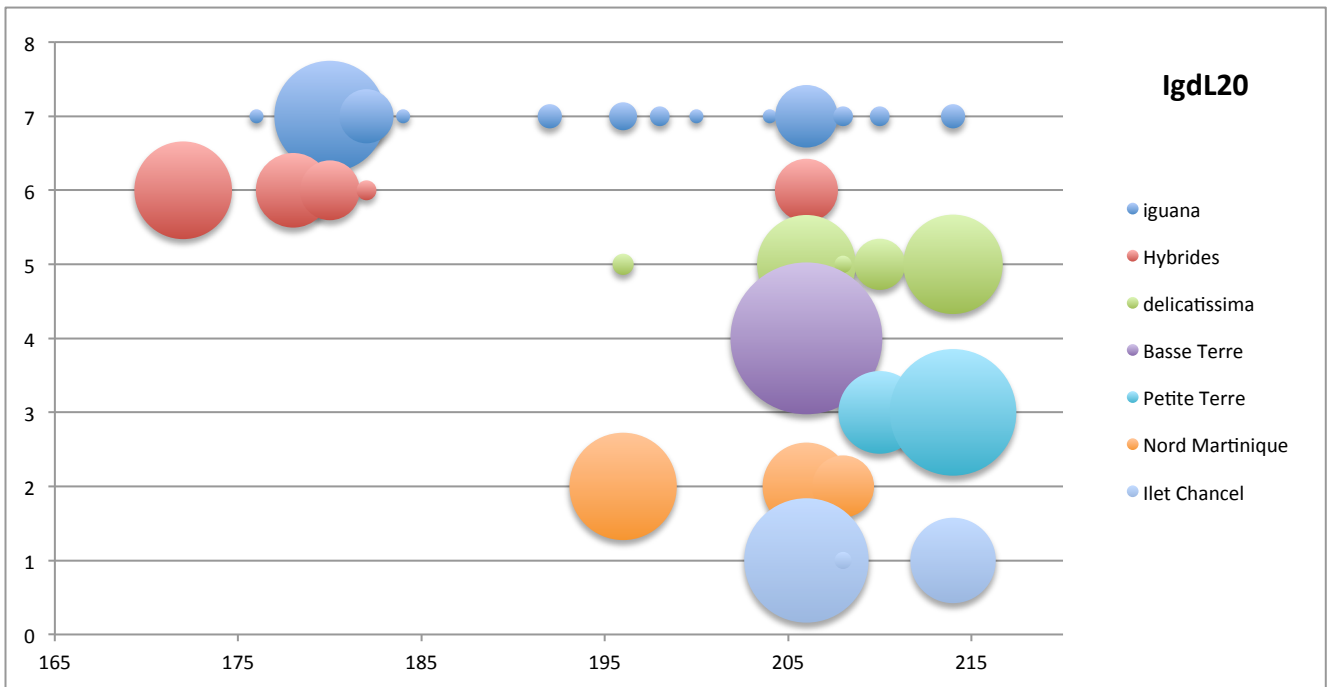
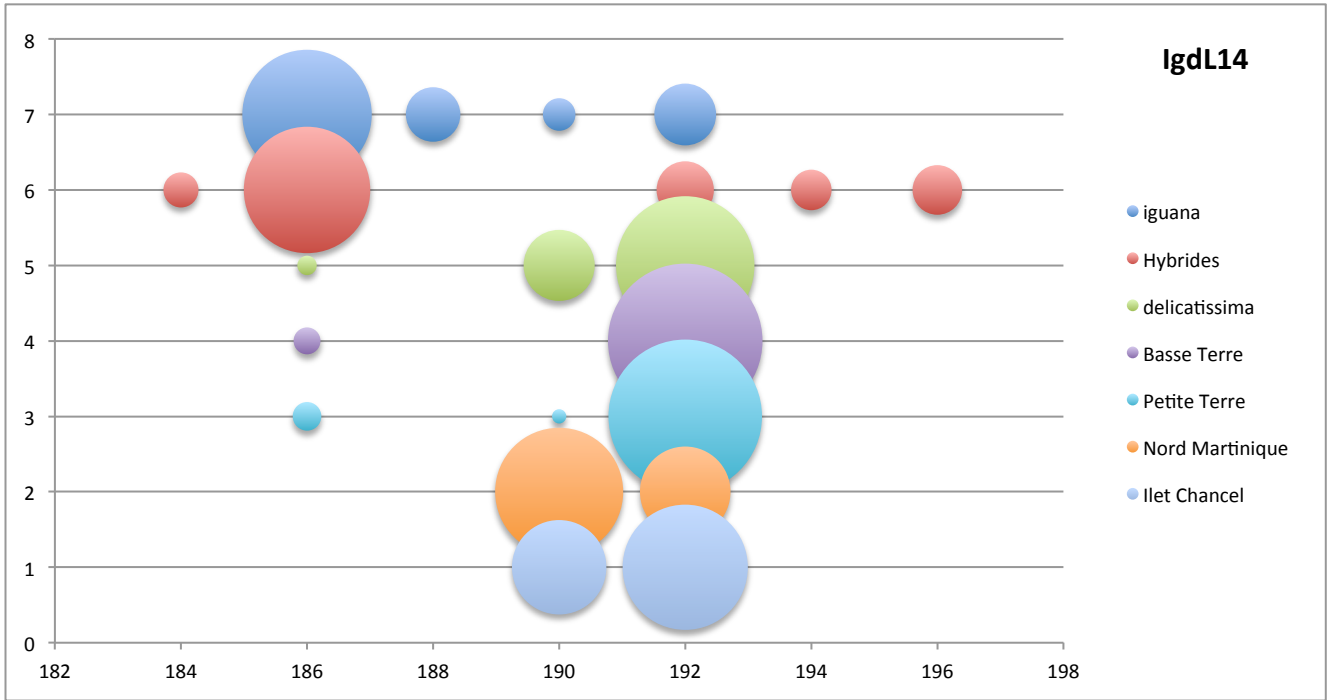
Annexe 1 – Assignment statistique des iguanes
aux deux espèces « *Iguana delicatissima* » (en bleu) et « *Iguana iguana* » (en vert)



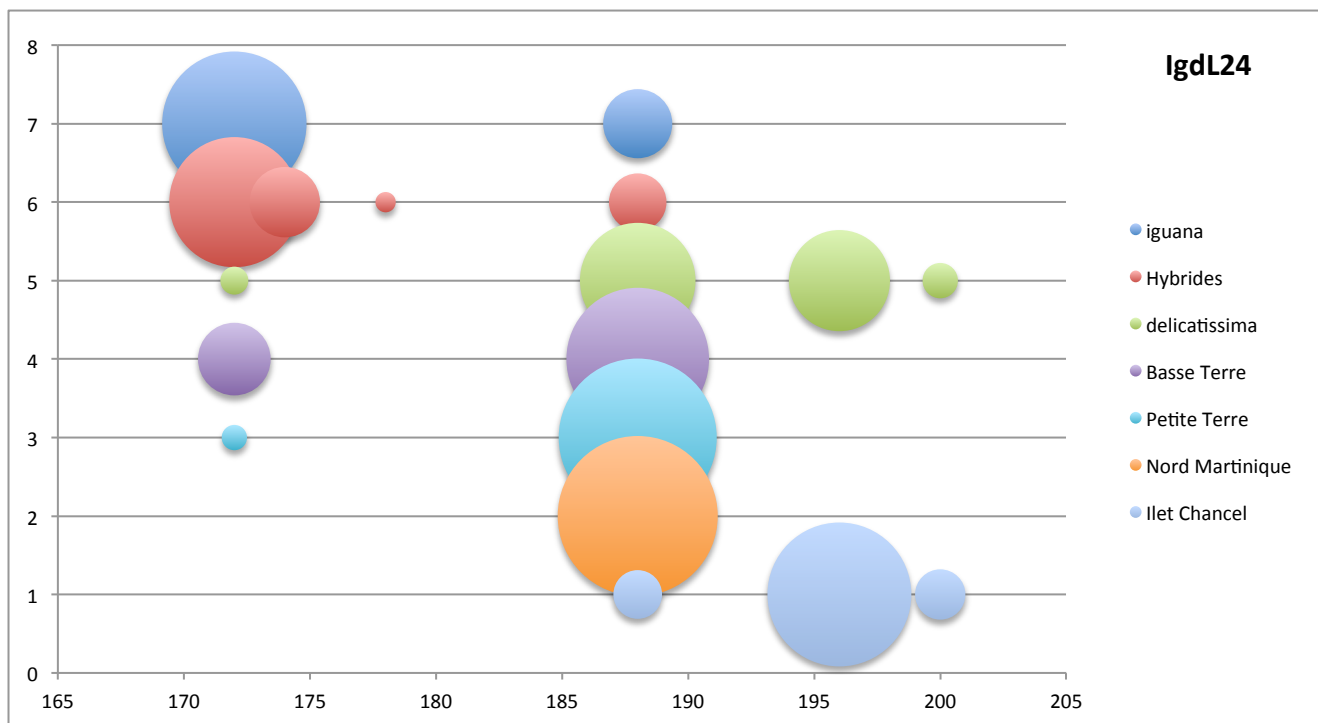
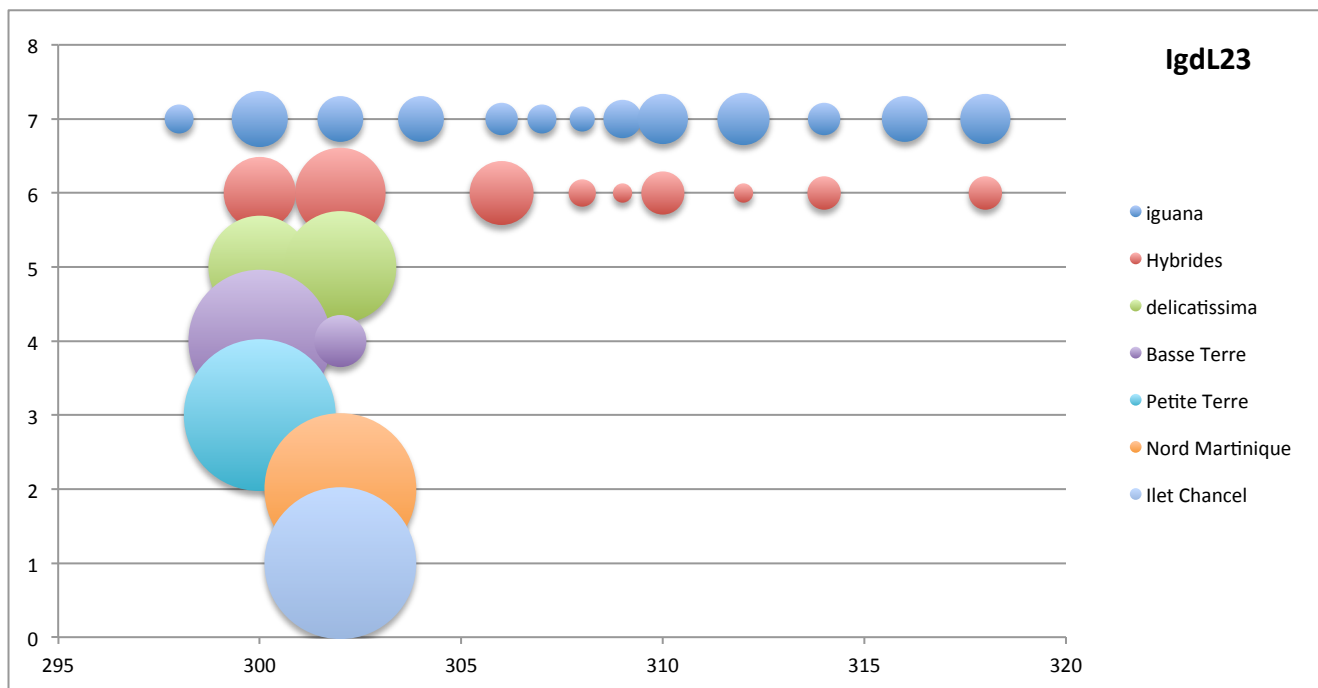
Annexe 2 – Distributions alléliques (A)



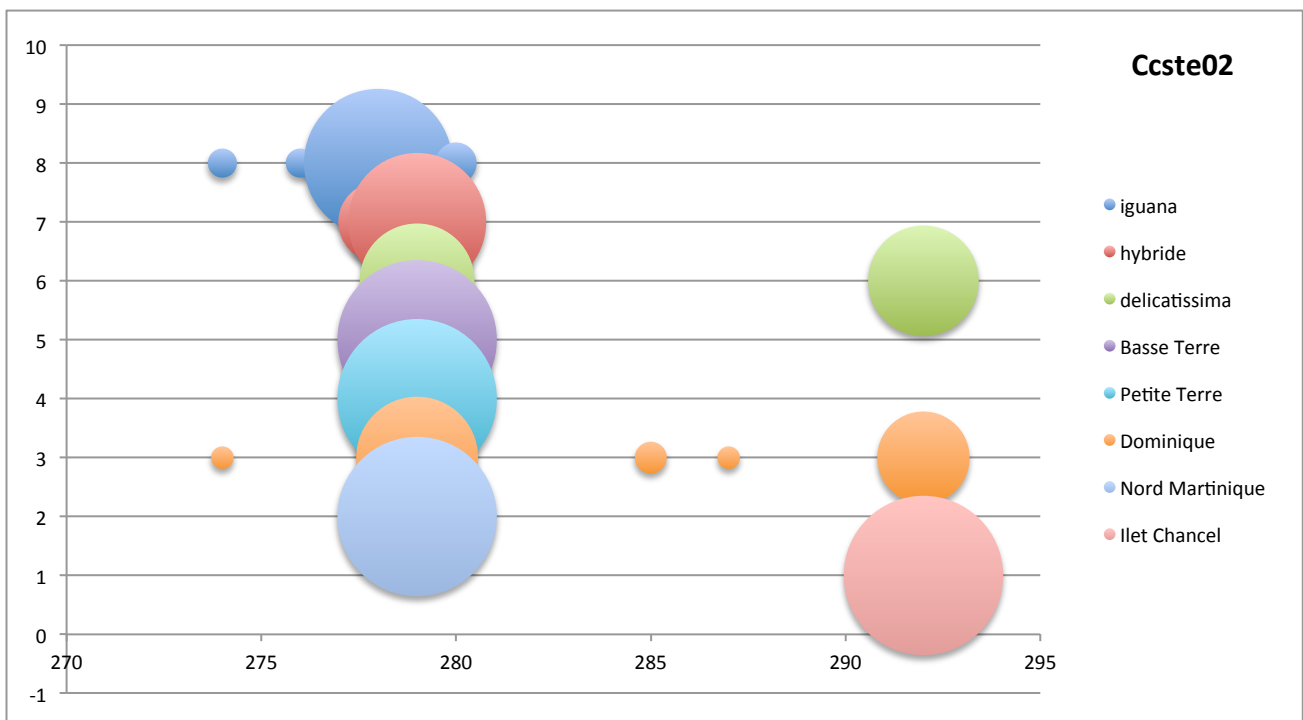
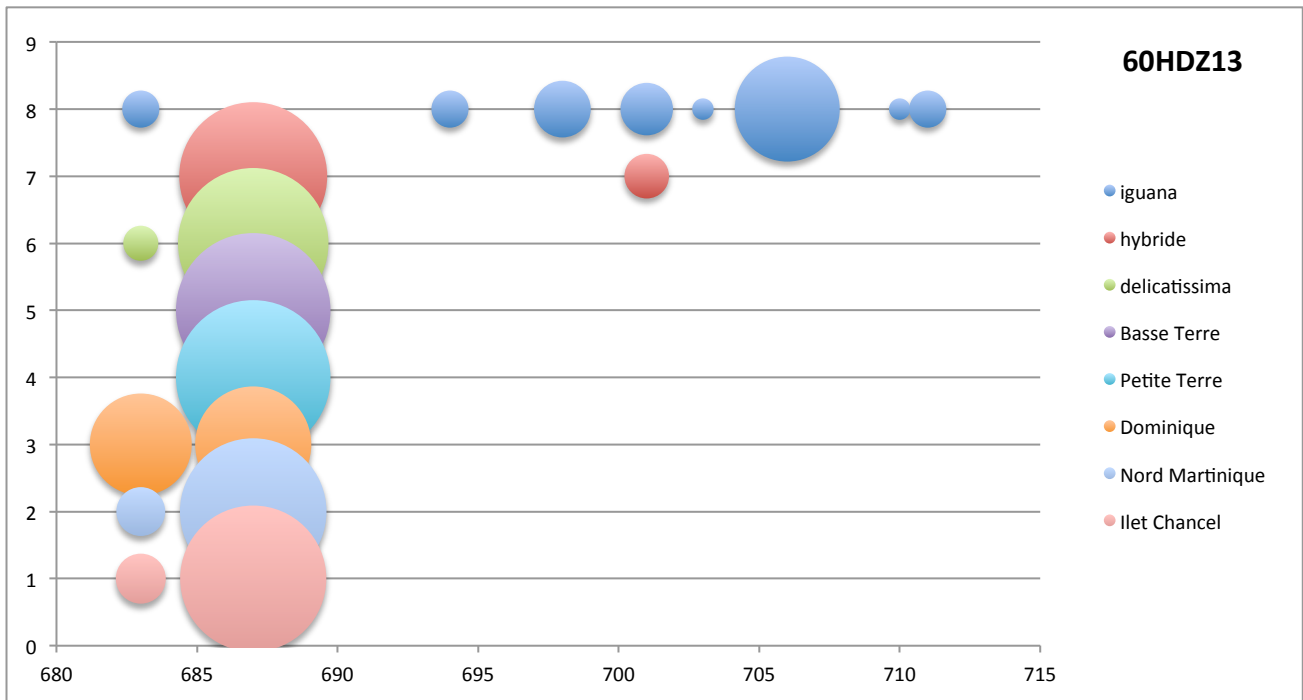
Annexe 2 – Distributions alléliques (B)



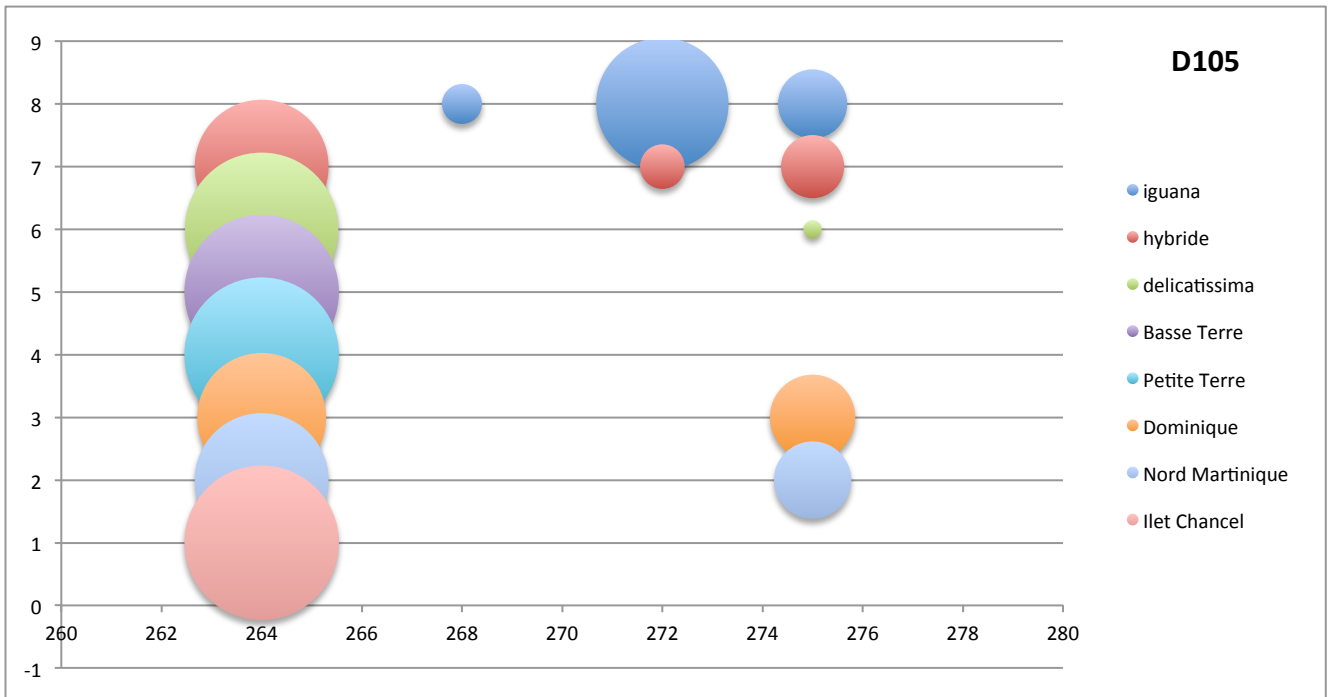
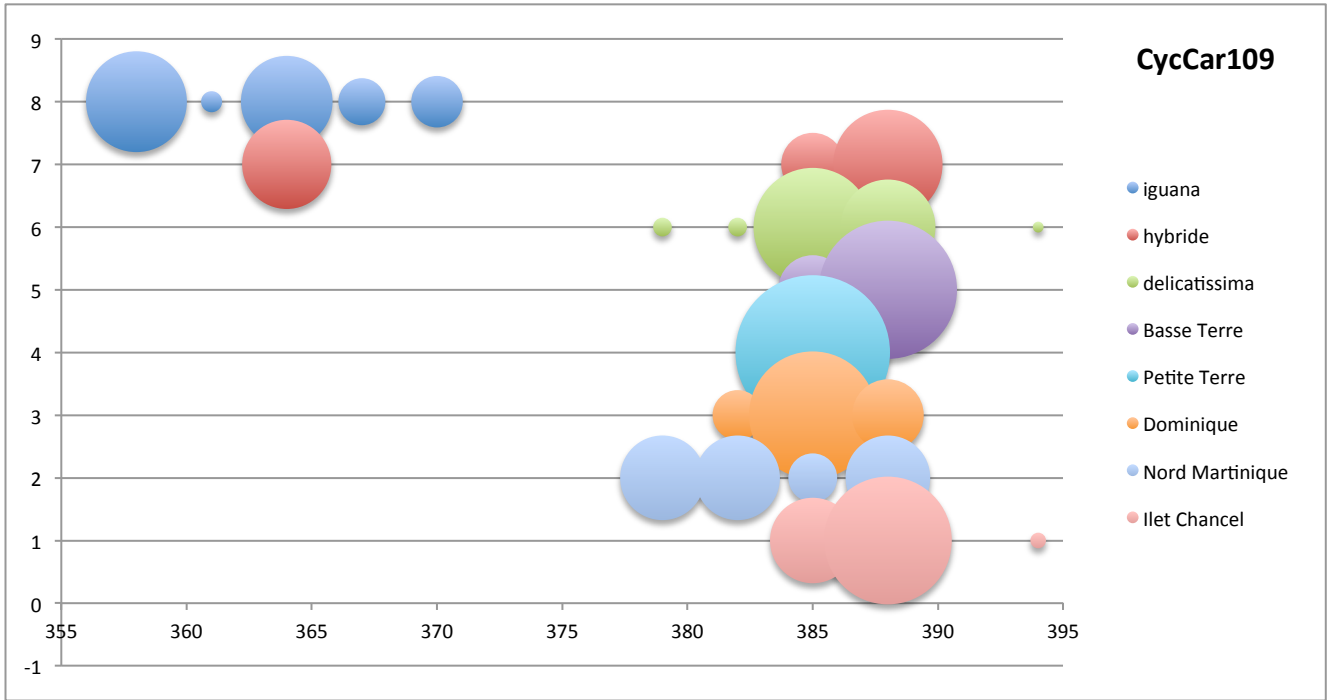
Annexe 2 – Distributions alléliques (C)



Annexe 3 – Distributions alléliques (A)



Annexe 3 – Distributions alléliques (B)



Annexe 3 – Distributions alléliques (C)

