

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

CITES : Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction.

dATP : Désoxyadénosine triphosphate

dNTP : Désoxyribonucléique triphosphate

EDTA : Ethylène diamine tétra acétique

GPS: Global Positioning System

IAM: Infinite Allele Model

UICN : Union International pour la Conservation de la Nature

MNP: Madagascar National Park

PCI: Phenol Chloroform Isoamyl

PCR : Polymerase Chain Reaction

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

INTRODUCTION	1
I- DESCRIPTION DES SITES D'ETUDE	4
I-1- Localisation géographique	4
- Marais de Torotorofotsy	4
- Réserve de biosphère de Mananara-Nord	4
I-2- Géologie	4
- Marais de Torotorofotsy	4
- Réserve de biosphère de Mananara-Nord	5
I-3- Climat	5
- Marais de Torotorofotsy	5
▪ Température	5
▪ Précipitation	5
- Réserve de biosphère de Mananara-Nord	6
▪ Température	6
▪ Précipitation	6
I-4- Végétation	7
- Marais de Torotorofotsy	7
- Réserve de biosphère de Mananara Nord	7
II- MATERIELS ET METHODES	8
II-1- Période d'études.....	8
II-2- Présentation de l'espèce étudiée	8
A- Généralités	8
B- Position systématique.....	9
II-3- Technique de collecte	10
II-4- Extraction d'ADN.....	11
II-5- Amplification par « PCR » (Réaction par polymérisation en chaîne)	11
- Condition et éléments utilisés	11
- Vérification des fragments amplifiés par électrophorèse.....	14
II-6- Purification des fragments amplifiés	14
II-7- Séquençage et réaction.....	15
II-8- Lecture par le séquenceur	15

II-9- Méthode d'analyses des données	16
II-9-1- Analyse des données morphométriques	16
II-9-2- Mesure de la diversité génétique	16
A- Détection des erreurs.....	16
B- Test de déséquilibre génotypique.....	17
C- Test d'équilibre de Hardy Weinberg (HWE)	17
D- Diversité et hétérozygotie par population	18
a) Richesse allélique.....	18
b) Fréquences alléliques	18
c) Diversité génique	19
d) Hétérozygotes observés (Ho) et hétérozygotes attendus (He)	19
1. Estimation de la moyenne des hétérozygotes observés (Ho).....	19
2. Estimation de la moyenne des hétérozygotes attendus (He).....	20
e) Coefficient de consanguinité (FIS)	20
II-9-3- Analyse des flux de gènes « Allèles privés et nombre des migrants ».....	21
II-9-4- Test de détermination de l'effet de goulot.....	21
III- RESULTATS ET INTERPRETATIONS	22
III- 1- Analyse morphométrique	22
III- 2- Mesure de la diversité génétique	23
A- Erreurs détectées à partir de Microchecker® et Cervus®.....	23
- Allèles nuls.....	23
B- Déséquilibre de liaison	24
C- Equilibre de Hardy Weinberg (HWE).....	24
D- Diversité et hétérozygotie par population	25
a) Richesse allélique (nombre moyen d'allèles par locus par population).....	25
b) Taille et fréquences des allèles par locus et par population.....	26
1. LOCUS SANZ 56.....	26
2. LOCUS SANZ 11.....	26
3. LOCUS JAM 39	27
4. LOCUS JAM 145	27
5. LOCUS MAD 16.....	28
6. LOCUS MAD 51	29
7. LOCUS MAD 119.....	29

8. LOCUS MAD 229	30
9. LOCUS MAD 251	30
10. LOCUS MAD 282	31
11. LOCUS MAD 290	31
12. LOCUS MAD 316	32
13. LOCUS MAD 369	32
c) Diversité génique par locus et par population	33
d) Hétérozygotes observés (H_o) et hétérozygotes attendus (H_e)	33
e) Coefficient de consanguinité (FIS)	35
III- 3- Fréquences des allèles privés et nombre des migrants	36
III- 4- Test de détermination de l'effet de goulot	36
IV- DISCUSSION	37
IV- 1- Analyse morphométrique	37
IV- 2- Classe d'âge et reproduction	38
IV- 3- Déséquilibre de liaison	38
IV- 4- Equilibre de Hardy Weinberg	39
IV- 5- Diversité génétique	39
IV- 6- Gènes monomorphes et polymorphes	40
IV- 7- Taux d'hétérozygotie	40
IV- 8- Absence d'allèles et fréquences alléliques	41
IV- 9- Flux de gènes et nombre de migrants	41
IV- 10- Données génotypiques	42
IV- 11- Perspectives sur l'avenir de l'espèce	43
IV- 12- Limites de l'étude	43
CONCLUSION	44
RECOMMANDATIONS POUR LA CONSERVATION DE L'ESPÈCE	45
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	47

LISTE DES FIGURES

Figure n° 1 : Courbe ombrothermique de Gaussen représentant le climat de Torotorofotsy	6
Figure n° 2 : Courbe ombrothermique de Gaussen représentant le climat de Mananara-Nord	7
Figure n° 3 : Photo de la partie crânienne d'un <i>Sanzinia</i> adulte	10
Figure n° 4 : Photo d'une femelle de <i>Sanzinia madagascariensis</i>	10
Figure n° 5 : Profil électrophorétique d'amplification d'ADN microsatellites sur gel d'agarose révélé avec du bromure d'éthidium	14
Figure n° 6 : Age des individus de Mananara-Nord	22
Figure n° 7 : Age des individus de Torotorofotsy	22
Figure n° 8 : Fréquence des homozygotes attendus et observés montrant l'évidence d'allèles nuls (Locus MAD 317)	23
Figure n° 9 : Fréquence des homozygotes attendus et observés montrant l'évidence d'allèles nuls (Locus JAM 124)	23
Figure n° 10 : Histogramme des fréquences des allèles du locus SANZ 56 par population	26
Figure n° 11 : Histogramme des fréquences des allèles du locus SANZ 11 par population	27
Figure n° 12 : Histogramme des fréquences des allèles du locus JAM 39 par population	27
Figure n° 13 : Histogramme des fréquences des allèles du locus JAM 145 par population	28
Figure n° 14 : Histogramme des fréquences des allèles du locus MAD 16 par population	28
Figure n° 15 : Histogramme des fréquences des allèles du locus MAD 51 par population	29
Figure n° 16 : Histogramme des fréquences des allèles du locus MAD 119 par population	29
Figure n° 17 : Histogramme des fréquences des allèles du locus MAD 229 par population	30
Figure n° 18 : Histogramme des fréquences des allèles du locus MAD 251 par population	30
Figure n° 19 : Histogramme des fréquences des allèles du locus MAD 282 par population	31
Figure n° 20 : Histogramme des fréquences des allèles du locus MAD 290 par population	31
Figure n° 21 : Histogramme des fréquences des allèles du locus MAD 316 par population	32
Figure n° 22 : Illustration des fréquences alléliques du locus MAD 369 par population	32

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n° 1 : Liste des amorces utilisées, séquences, température de fixation, motifs et marqueurs fluorescents associés (FAM : fluobleu, HEX : fluover).....	13
Tableau n° 2 : Résultats du test de Chi 2.pour la comparaison morphométrique.....	22
Tableau n° 3 : Valeurs de la probabilité P pour chaque locus des deux populations (HWE)	24
Tableau n° 4 : Nombres d`allèles par locus et par populations et leur taille en paire de bases	25
Tableau n° 5 : Diversité génique par locus et par population	33
Tableau n° 6 : Hétérozygotes observés et Hétérozygotes attendus dans l`ensemble des populations ..	34
Tableau n° 7 : Taux des hétérozygotes observés (Ho) et attendus (He) pour chaque population.....	35

LISTE DES ANNEXES

Annexe I

Figure n° 23 : Carte de localisation du site d`étude de Torotorofotsy	I
Figure n° 24 : Carte de localisation du site d`étude de Mananara-Nord.....	I
Figure n° 25 : Illustration schématique d`une amplification par PCR.....	II
Figure n° 26 : Electrophorégramme d`une séquence d`ADN microsatellite	III
Figure n° 27 : He – Ho pour chaque locus (population de Torotorofotsy).....	III
Figure n° 28 : He – Ho pour chaque locus (population de Mananara-Nord).....	III
Figure n° 29 : Principales zones d`impacte des cyclones FAME et IVAN en février 2008.....	IV

Annexe II

Tableau n° 8 : Récapitulatif des solutions utilisées avec leur volume respectif au cours des différentes étapes d'extraction d'ADN	V
Tableau n° 9 : Estimation de la fréquence des allèles nuls (Cervus)	V
Tableau n° 10 : Détails des valeurs du coefficient de consanguinité (FIS) par locus pour chaque population	VI
Tableau n° 11 : Résultats de recherche du phénomène d'effet de goulot » dans la population de Torotorofotsy (IAM)	VI
Tableau n° 12 : Résultats de recherche du phénomène d'effet de goulot dans la population de Mananara-Nord (IAM)	VII
Tableau n° 13 : Probabilité d'excès et de déficit d'hétérozygotes dans la population de Torotorofotsy	VII
Tableau n° 14 : Probabilité d'excès et de déficit d'hétérozygotes dans la population de Mananara-Nord.....	VII
Tableau n° 15 : Données détaillées des mesures morphométriques et bases de données bioécologiques des individus capturés	VIII
Tableau n° 16 : Résultats génotypiques par locus et par population avec les températures optimales de fixation	IX
Tableau n° 17 : Concentration finale des composants de la solution de Longmire.....	X
Tableau n° 18 : Produits utilisés et leurs différentes concentrations lors d'une PCR	X

Données Climatiques de la région de Mananara-Nord

Tableau n° 19 : Normale de Précipitation (en mm et 1/10 arrondie).....	XI
Tableau n° 20 : Normale de Température en degré C et 1/10 arrondie.....	XI

Données Climatiques de la région de Torotorofotsy

Tableau n° 21 : Normale de Précipitation (en mm et 1/10 arrondie).....	XII
Tableau n° 22 : Normale de Température en degré C et 1/10	XII

INTRODUCTION

Disposant d'une diversité herpétofaunique exceptionnelle trouvée nulle part ailleurs, Madagascar possède à elle seule un taux d'endémicité reptilienne à 93 % (Glaw et Vences, 1994). De cette forte endémicité, la grande île est considérée comme l'un des principaux pays à haute diversité biologique impliquant une priorité de conservation (Hannah *et al.*, 1998). Parmi cette richesse herpétofaunique et d'un point de vue biogéographique, *Sanzinia madagascariensis* (Dumeril et Bibron, 1844) est une des espèces de reptiles la plus énigmatique qui soit (Mertens, 1972).

En effet, très peu d'informations sur ses bases de données moléculaires n'ont été fournies sauf très récemment alors que sa distribution géographique apparaît très large : recouvrant toute la partie Sud-est, Est, Nord-ouest et Ouest de l'île (Vences et Glaw, 2003). Les caractères observés sur la diversité morphologique de cette espèce restent souvent insuffisants pour déterminer son origine et sa structure génétique. Cependant dans certains cas, une variation de la couleur de sa peau peut être visible lorsqu'on compare une population à une autre (Vences et Glaw, 2003).

Différentes études ont été déjà réalisées sur cette espèce mais en ce qui concerne les recherches génétiques et biomoléculaires, elles n'ont pris leur ampleur qu'à partir de l'année 2000. La majeure partie de ces études parle de l'évidence moléculaire du genre *Sanzinia* et *Acrantophis* avec ses implications biogéographiques (Vences *et al.*, 2001), de la phylogéographie (Vences et Glaw, 2003) et de la relation phylogénétique entre le boa des arbres et le boa terrestre de Madagascar (Orozco *et al.*, 2008).

L'étude de cette espèce est d'un intérêt vital car mis à part son attrait et son importance dans les zoos (Progscha et Lehmann, 1970), elle possède en outre une forte potentialité à contrôler les rats et beaucoup d'autres animaux libres (Vences et Glaw, 2003). En plus, d'une récente liste de l'Union International pour la Conservation de la Nature (UICN, 2006), *Sanzinia madagascariensis* figure parmi les six espèces de serpents les plus en danger.

De toutes ces allégations, sans parler des innombrables menaces qui frappent la faune herpétologique malgache, cette espèce reste jusqu'à présent mal connue et sa situation demeure préoccupante. Les informations obtenues surtout au niveau moléculaire sont encore minimales et ont besoins d'être complétées. Ainsi, les principaux objectifs de cette étude visent d'une part à consolider les bases de données génétiques et d'autre part, de concevoir une stratégie de conservation à partir des données moléculaires. La mise en œuvre de cette

stratégie se fera à travers les informations obtenues sur le degré de diversité génétique d'une population à partir des analyses d'ADN microsatellites.

Contrairement à la plupart des programmes de conservation existant à Madagascar qui se base surtout sur des études écologiques, éthologiques ou sur le régime alimentaire. Cette recherche sera axée principalement sur des analyses d'ADN microsatellites. La connaissance de la diversité et de la structure génétique constituera après un outil d'aide à la conception de stratégie de conservation des gènes. Ces molécules d'ADN microsatellites présentent de très fréquentes mutations de 10^{-2} à 10^{-5} par gamète par génération dont la plupart sont dues à des erreurs de réplication. Ces erreurs peuvent ainsi provoquer soit une diminution, soit une augmentation du nombre de répétitions (Moxon *et al.* 1999). Par conséquent, ces fragments constituent une source de diversité génétique au sein du génome et permet d'étudier les variations intraspécifiques au niveau d'une population. L'importance de cette partie d'ADN réside en son niveau de polymorphisme très élevé. Il est un excellent outil dans l'étude des populations pour une espèce donnée et peut être utilisé pour étudier la structure et la diversité génétique (Estoup *et al.*, 1995).

L'échantillonnage a été effectué dans deux différents sites dont les marais de Torotorofotsy qui est un site établi d'après la convention de RAMSAR et la réserve de biosphère de Mananara-Nord. Les deux sites sont classés parmi les forêts humides malgaches et sont localisés respectivement sur les parties Est et Nord-Est de l'île. En ce qui concerne les objectifs spécifiques, ils s'intéressent particulièrement au développement de marqueurs microsatellites polymorphiques de *Sanzinia madagascariensis* afin de déterminer la diversité génétique à l'intérieur d'une population et de comparer ensuite la structure génétique de deux populations de différentes localités.

Pour atteindre ces objectifs, des analyses de la structure génétique intra et interpopulation ont été effectuées dans le but de pouvoir :

- Mesurer la diversité génétique.
- Comparer d'après les résultats obtenus la diversité génétique entre la population de Mananara-Nord à celle de Torotorofotsy et vice versa.
- Comprendre les causes probables de cette aire de répartition plus large en essayant d'analyser l'existence ou non de flux de gènes entre la population de Mananara-Nord et de Torotorofotsy.
- Déterminer l'existence ou non d'un effet de goulot dans ces populations.

Le corps du devoir sera alors divisé en quatre grandes parties avec la première partie qui sera consacrée à la description des sites d'études. La deuxième partie s'intéressera aux matériels et méthodes utilisées, la troisième partie occupera la présentation et l'interprétation des résultats. Enfin, avant d'achever avec la conclusion suivie des recommandations, la quatrième et dernière partie donnera place à la discussion incluant les perspectives sur l'avenir de l'espèce afin de pourvoir sa pérennisation.

I. DESCRIPTION DES SITES D'ÉTUDE

I- 1 - Localisation géographique

- Marais de Torotorofotsy

Ces marais se trouvent dans la région d'Alaotra Mangoro, district de Moramanga et dans le fonkontany de Menalamba. Ils sont localisés à 7 km au nord-ouest d'Andasibe (fig. n° 23, annexe I, p. I). La zone humide de Torotorofotsy se trouve parmi les sites marécageux internationaux les plus importants (www.ramsar.org). Elle comprend quatre marais d'origine naturelle dont un permanent, celui de Torotorofotsy et 3 temporaires : Mokaranana, Ankahelava et Ambasimbavy (www.ramsar.org). Le site est inscrit officiellement en mai 2005 parmi les zones humides Ramsar et s'étend entre les coordonnées géographiques 48° 19'- 48° 24' longitude Est et 18° 49'- 18° 56' latitude Sud, d'une altitude comprise entre 900 et 1040 mètres et couvrant une superficie de 9993 ha (www.ramsar.org).

- Réserve de biosphère de Mananara-Nord

La réserve se trouve dans la partie Nord Est de Madagascar (fig. n° 24, annexe I, p. I) et se divise en 5 secteurs dont Sahasoa, Antanambe, Anove, Tanananivo et Sandrakantsy. Elle couvre une superficie de 140 000 ha dont 23 000 ha en parc national terrestre et 1 000 ha en parc national marin, les surfaces restantes avec 116 000 ha correspondent à la zone tampon périphérique du parc. La réserve fait partie de l'une des forêts tropicales de basse altitude de la grande île (altitude comprise entre 50 et + 570 mètres). Elle s'étale entre les coordonnées géographiques 49° 31'- 49° 53' longitude Est et 16° 09'- 16° 36' latitude Sud (Nambena *et al.*, 2000). L'étude a été menée dans le secteur d'Antanambe et d'Anove.

I- 2 - Géologie

- Marais de Torotorofotsy

Ces marais reposent sur un socle cristallin appartenant au système du graphite. Le substrat géologique est constitué essentiellement de graphite et de sillimanite. Il y a prédominance de sols ferrallitiques et de sédiments sableux résultant de l'altération du quartzite (Hervieu, 1960).

- Réserve de biosphère de Mananara-Nord

Quant à la réserve de biosphère, les roches sédimentaires prédominent, les sols sont en général ferrallitiques. Fragilisés par la violence des pluies, ils subissent une très forte érosion quand la forêt disparaît. De fortes pentes et vallées profondes sont souvent observables (Hottin, 1969).

I- 3 - Climat

- Marais de Torotorofotsy

Comme cette région est localisée dans la partie tropicale orientale, elle est soumise au régime d'alizé qui engendre une forte pluviosité. Elle possède ainsi un climat tropical chaud et humide (Donque, 1973). Les données climatiques utilisées dans la présente étude ont été recueillies auprès de la station météorologique d'Ampanomby suivant les normales climatologiques valables pour 30 ans (tableau n° 21 et 22, annexe II, p. XII).

- **Température**

Torotorofotsy est caractérisée par une moyenne de température de 18 °C avec une minimale de 10 °C au mois d'août et une maximale de 26, 2 °C au mois de février (données de la station climatologiques d'Analamazaotra entre 1991-1996). Le climat est frais et sec entre le mois de mars et octobre. Pendant la saison chaude, la température moyenne dépasse les 22 °C.

- **Précipitation**

. Cette région de Torotorofotsy reçoit en moyenne 1650 mm de pluie par an. Deux saisons bien distinctes peuvent être observées telles la saison chaude et pluvieuse qui commence au mois de novembre et se termine en mars. Elle est caractérisée par une forte précipitation et compte en moyenne 200 jours de pluie par an. Pendant cette saison, le niveau du marais permanent augmente jusqu' à inonder les marais temporaires. La saison sèche dure 7 mois, d'avril à octobre avec un climat frais et sec. Elle est marquée par le retrait petit à petit des eaux où les marais temporaires s'assèchent et deviennent des marécages boueux (Donque, 1973). La représentation graphique de la courbe ombrothermique de Gaussen pour le climat de Torotorofotsy est figurée à la page 6.

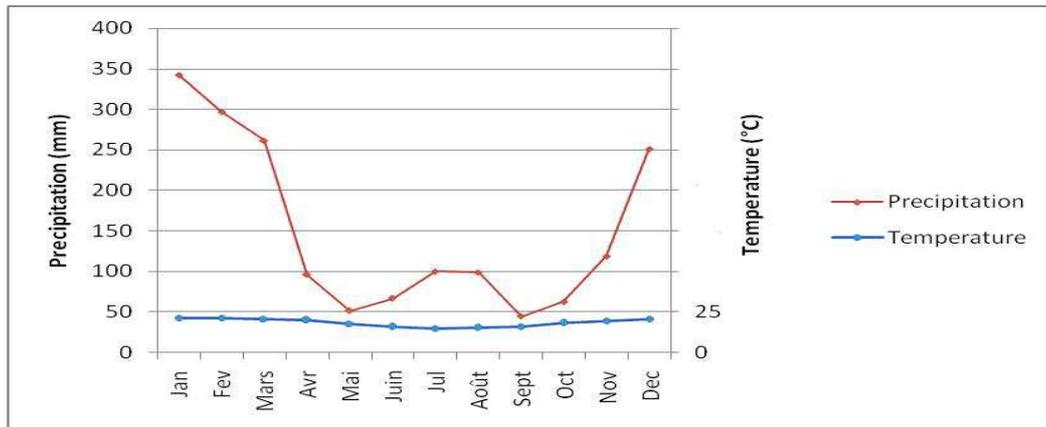


Figure n°1 : Courbe ombrothermique de Gausson, représentant le climat de Torotorofotsy. (Données obtenues auprès de la station météorologique d'Ampanomby, Sept. 2009)

Avec la pluviométrie qui est supérieure au double de la température, la courbe de la figure n° 1 ci-dessus montre l'absence de mois éco-secs pendant toute l'année.

- Réserve de biosphère de Mananara-Nord

La réserve de biosphère possède un climat tropical humide avec une longue saison pluviale. Les pluies sont réparties presque pendant toute l'année avec une teneur maximum en saison cyclonique de Décembre à Avril (tableaux n° 19 et 20, annexe II, p. XI).

- Température

La zone dans laquelle se trouve la réserve est caractérisée par une température chaude presque toute l'année avec une moyenne de 25, 2 °C.

- Précipitation

Mananara-Nord est une des régions les plus arrosées de Madagascar. Il y tombe 2 900 mm de pluies par an et compte en moyenne 19 jours de pluie par mois, soit une moyenne annuelle de 228 jours. La saison sèche y est pratiquement absente. Néanmoins, une accalmie de pluies se présente entre septembre et mi novembre (Donque, 1973). La courbe ombrothermique de Gausson représentant le climat de Mananara-Nord est figurée à la page 7.

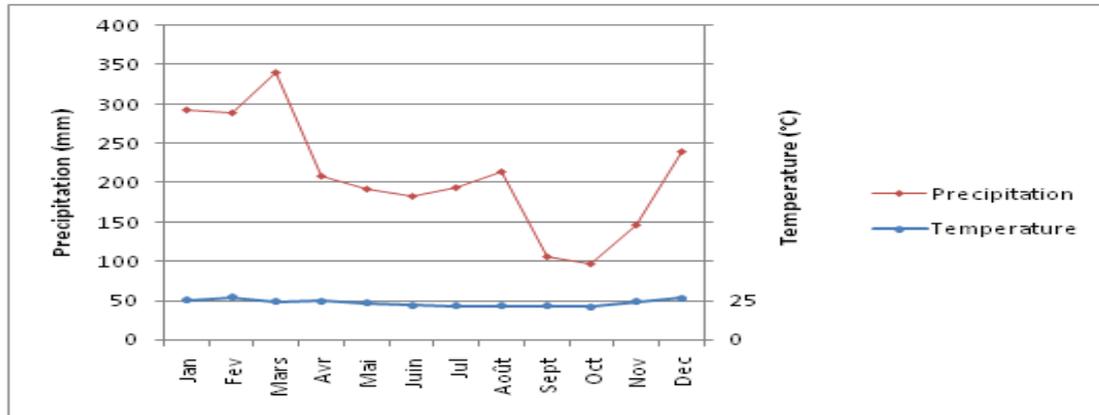


Figure n°2 : Courbe ombrothermique de Gaussen représentant le climat de Mananara-Nord (Données de la station météorologique d'Ampantrianomby, Sept. 2009)

Cette courbe ombrothermique montre l'absence totale de mois éco-secs dans la région de Mananara-Nord. Avec l'importance de volume de précipitation que reçoit cette région, cette courbe confirme l'appartenance de la région de Mananara-Nord à une zone très embuée.

I- 4 – Végétation

- Marais de Torotorofotsy

Soixante dix pourcent de la surface du site sont couvertes d'une prairie marécageuse, conséquence de la permanence des sols tourbeux et imprégnés d'eau. La formation végétale est dominée par trois familles, celles des Cyperaceae, des Poaceae et des Polypodiaceae. Ils sont entremêlés par des espèces ligneuses parfois sous forme d'îlots forestiers restreints à végétation peu dense (Zimmermann, 1999).

- Réserve de biosphère de Mananara-Nord

La prédominance des espèces arborescentes est constatée dans la réserve de biosphère de Mananara-Nord (Dumetz, 1988). La végétation se caractérise par sa pauvreté en espèces avec des formations végétales rencontrées dans les savoka comme *Ravenala madagascariensis* (Strelitziaceae), *Trema orientalis* (Ulmaceae), ou *Psidia altissima* (Asteraceae) (Ramangalahy, 1990).

II. MATERIELS ET METHODES

La comparaison de la diversité génétique de différentes populations repose sur l'étude de son polymorphisme. Pour y parvenir, l'étude a été centrée sur des analyses de la séquence d'ADN microsatellites nucléaires.

Par définition, un microsatellite est une répétition en tandem courte de nucléotides (le plus souvent 1 à 4 nucléotides). C'est un élément indissociable des chromosomes et sont hérités des deux parents. Cette partie génomique est hautement polymorphe et subit des mutations très fréquentes. Cependant, c'est un élément de choix pour étudier la diversité génétique au sein d'une population. Dans la présente étude, les cellules sanguines et plus particulièrement les hématies sont les principaux matériels biologiques pour l'obtention des fragments d'ADN.

II- 1 - Période d'études

L'échantillonnage à été effectuée durant les mois de février et mars 2008 :

- 02 au 12 février 2008 : première descente sur terrain à Torotorofotsy (une semaine).
- 14 au 28 février 2008 : descente sur terrain dans la réserve de biosphère de Mananara-Nord (deux semaines).
- 03 au 10 mars 2008 : deuxième descente à Torotorofotsy pour compléter le premier échantillonnage.

Les études biomoléculaires et génétiques ainsi que statistiques ont été réalisées au Centre de Conservation et de Recherche USA/Nebraska durant la période du 8 avril jusqu'au 5 août 2008.

II- 2 - Présentation de l'espèce étudiée

A - Généralités

Espèce généralement forestière et présentant une aire de répartition plus large (Nord, Est, du Nord au Sud, Ouest et Nord Ouest), *Sanzinia madagascariensis* est un serpent appartenant à la famille des boïdés et endémique de Madagascar. C'est une espèce nocturne, semi-arboricole et

ovovivipare de taille atteignant jusqu'à deux mètres de long et parfois plus (Brygoo, 1982). Elle est caractérisée par une coloration vert olive avec des taches blanches et brunes noirâtres foncées aux motifs compliquées. Elle présente une particularité au niveau des écailles supralabiales, la tête est de forme triangulaire et se distingue nettement du corps. À l'état sauvage, *Sanzinia madagascariensis* se nourrit principalement de rongeurs (C.J. Raxworthy, données non publiées) et de lémuriens (Rakotondravony *et al.*, 1998) mais elle accepte aussi en captivité des proies fraîchement tuées (St Raymond Moynat, 2008). L'âge de maturité sexuelle est atteint vers quatre ans (Glaw et Vences, 1994). L'incubation dure six à sept mois et à la naissance, une femelle peut donner jusqu'à plus de 12 serpenteaux. Chez les individus adultes, le mâle se distingue de la femelle par la présence d'hémipenis, un corps mince et une longue queue pourvue de crochets (Vanderstylen, 2004).

B- Position systématique (Dumeril et Bibron, 1844)

RÈGNE : ANIMALIA

EMBRANCHEMENT : VERTEBRATA

CLASSE : REPTILIA

SOUS CLASSE : DIAPSIDES

ORDRE : SQUAMATES

SOUS ORDRE : (SERPENTES) SAURIENS

FAMILLE : BOIDAE

SOUS FAMILLE : BOINAE

Genre : *Sanzinia* (Gray, 1849)

Espèce : *madagascariensis*

Sous espèce : *madagascariensis, volontany* (Glaw et Vences, 2007)

Nom binomial : *Sanzinia madagascariensis* (Dumeril et Bibron, 1844)

Nom vernaculaire malgache : Manditra, bado

Nom vernaculaire anglais : Madagascar tree boa

Nom vernaculaire français : Boa des arbres



- Ecailles pariétales
- Ecailles préfrontales postérieures
- Ecailles supralabiales
- Ecailles internasales

Figure n° 3 : Partie crânienne d'un *Sanzinia* adulte (Manjaka A. Ramanana, Mananara-Nord. 2008)



Figure n° 4 : Femelle de *Sanzinia* adulte (Manjaka A. Ramanana, Torotorofotsy. 2008)

II - 3 - Technique de collecte

Elle est basée sur la recherche systématique d'individus dans la forêt ou dans les habitats préférés des serpents (autour des villages ou sur les bords de routes à cause de la présence des proies faciles : poussins, rongeurs). La fouille est effectuée chaque jour par une équipe composée de deux personnes (de 8 à 11 heures 30 du matin et de 15 à 17 heures 30 de l'après midi). Chaque personne est responsable d'une surface d'environ 1000 m² recherchant les boas avec une vitesse variant autour de 3 km/h (soit 0,8 m/s). Quand un individu est capturé, il est placé dans un sac en tissu mou et un ruban plastique fluorescent (flag) est posé sur le lieu où l'on a trouvé le spécimen. L'animal est pesé avec une balance de type « Pesola scale » de 100g, 250g et 2000g selon la taille des animaux. Différentes parties du corps sont mesurées à l'aide d'un mètre ruban dont l'extrémité crânienne jusqu'à l'ouverture cloacale (SVL), du cloaque jusqu'à l'extrémité de la queue (TL), la longueur totale du corps est obtenue en additionnant les deux premières mesures (TTL). Deux personnes suffisent pour tenir l'animal dont l'une sur la partie supérieure et l'autre sur la partie inférieure du corps. Ensuite, un volume de 0,2 cc à 0,3 cc de sang est prélevé au niveau de la veine caudale principale à l'aide d'une seringue stérile (0,5 cc). Chaque individu est marqué par un vernis à ongle sur sa partie ventrale et il est par la suite relâché à l'endroit où il était capturé en prenant en même temps leurs coordonnées géographiques. Afin d'éviter toute altération des molécules d'ADN, les échantillons sanguins sont stockés dans une solution de

Longmire (tableau n° 17, annexe II, p. X) (Longmire *et al.*, 1992). Au cours de la collecte sur terrain et jusqu'à l'arrivée au laboratoire, ces échantillons ont été conservés à la température ambiante mais une fois arrivés au laboratoire, ils sont placés dans un congélateur à - 85 °C pour favoriser l'extraction.

II- 4 - Extraction d'ADN

Cette technique est basée sur une extraction par précipitation. En effet, les molécules d'ADN sont hydrosolubles et se précipitent en présence de sel dans un milieu alcoolisé. La solubilité sélective des molécules protéiniques dans des solvants organiques et la solubilité de l'ADN dans les solvants aqueux facilitent la séparation de ces deux types de macromolécules. Cette méthode a pour but de briser la membrane cytoplasmique et nucléaire qui sont constituées essentiellement de double couche phospholipidique et des protéines extra-, intra et transmembranaire afin d'avoir accès aux contenus. La dégradation de ces protéines associées aux acides nucléiques se réalise par une réaction enzymatique de la protéinase-K. Deux microlitres de volume sanguin de chaque individu sont placés dans un tube de 1,5 ml contenant une solution de STE (500 µl), de la protéinase K à 10% (25 µl) et du SDS à 20 % (25 µl) (tableau n° 8, annexe II, p. V). Le mélange est ensuite incubé pendant 3 heures (éventuellement une nuit) dans un bain marie à 55° C. L'ADN est ensuite purifié en utilisant du phénol, du chloroforme et de l'alcool isoamylique (Hillis *et al.*, 1996). La densité optique de la solution d'ADN obtenue est mesurée au spectrophotomètre afin de vérifier si sa concentration est suffisante pour la PCR ou non. Trois microlitres (3 µl) de la solution sont placés dans 300 µl de TRIS (10 mM). Le processus se déroule dans une cuve à spectrophotomètre qui est ensuite placée délicatement dans la machine. L'absorption est calculée avec une longueur d'onde de $\lambda = 260$ nm et $\lambda = 280$ nm correspondant respectivement aux absorptions des acides nucléiques et à celles des protéines.

II- 5 - Amplification par Réaction par polymérisation en chaîne (PCR)

- Condition et éléments utilisés

La PCR est une méthode permettant d'amplifier un fragment d'ADN spécifique voulu (Griffiths *et al.*, 2000). Sachant que la synthèse d'une nouvelle chaîne d'ADN suit le mode semi conservatif selon la direction 5'→3', la région à amplifier correspond à la séquence entre deux

amorces (fig. n° 25, annexe I, p. II). Une paire d'amorce est composée d'un sens et d'un anti-sens. C'est un précurseur d'une copie exacte de microsatellites qui s'apparie par complémentarité de bases en devenant le point de départ de l'élongation par copie de l'ADN matrice. Dans la présente étude, dix sept amorces spécifiques d'ADN microsatellites de trois espèces de boas sont utilisées dont deux amorces (02) provenant de *Sanzinia madagascariensis* (Ramanana *et al.*, 2009), douze amorces (12) provenant d'*Acrantophis madagascariensis* (Matson *et al.*, 2001) et trois amorces (03) provenant de *Epicrates cynchria* (Bailey *et al.*, données non publiées). Le nom d'une amorce est composé d'un sigle formé par des lettres initiales indiquant le genre de l'espèce ou du pays de provenance (**SANZ** : Sanzinia, **JAM** : Jamaïque ou **MAD** : Madagascar), suivi d'un chiffre qui détermine son numéro (Ex. **51**... Nomenclature interne du centre CCR / HDZ). Ensuite, c'est ce nom qui va déterminer le nom du locus correspondant (Ex. : **Locus SANZ 51**).

L'enzyme utilisée est la Taq polymérase (AmpliTaq®, Roche, Perkin Elmer, Foster city, CA) extraite d'une bactérie thermophile : *Thermus aquaticus* et active à 72 °C. Pour se faire, l'ADN avec le mélange réactionnel et les éléments nécessaires à l'amplification sont placés dans un tube de 25 µl (tableau n° 18, annexe II, p. X). Ce dernier est déposé dans un « Thermocycleur », qui réalise automatiquement les différentes conditions de température de la multiplication de l'ADN. Trois étapes principales sont effectuées pendant un cycle tels (fig. n° 25, annexe I, p. II) :

1. **ÉTAPE N° 1 : La Dénaturation** qui dure 30 secondes, entraînant la séparation des deux chaînes monocaténares antiparallèles sous l'action de la température (à 95 °C).

2. **ÉTAPE N° 2 : L'Hybridation** ou fixation des amorces, L'une des amorces se fixe sur l'un des brins et l'autre se fixe sur le brin complémentaire et antiparallèle à ce premier (ici, la température de fixation est spécifique pour chaque amorce et elle varie entre 50 et 60 °C, pendant 30 secondes).

3. **ÉTAPE N° 3 : L'Elongation** ou la synthèse de la nouvelle chaîne à 72 °C pendant 45 secondes.

Les produits obtenus sont conservés à - 4 ° C et à l'abri de la lumière car les fluorescences peuvent disparaître à la suite d'une exposition prolongée à la lumière. Les produits d'amplification sont ensuite vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose.

Tableau n°1 : Liste des amorces spécifiques de boas utilisées au cours de cette étude (séquences, températures de fixation, motifs et marqueurs fluorescents associés (FAM : fluobleu ; HEX : fluovert)

Amorces	Séquences de l'amorce en 5'-3'	Température d'hybridation (°C)	Motifs	Fluorochromes
SANZ 11 F SANZ 11 R	5'-AAA CCT CAT CCA AGC CTA CAG-3' 5'-AAT GGG GAC AGA ATC TCT AAG C-3'	58 °C	(GT) ₁₀	HEX
SANZ 56 F SANZ 56 R	5'-GTC TCC ATT CAA GGC TTT TTT-3' 5'-CTC AGG GCA AAG TTG TTA GTA A-3'	56 °C	(GA) ₂₈	6-FAM
MAD 229 F MAD 229 R	5'-ATG TTT GCT AGG AAT TAC CGC-3' 5'-AGA TTA TCA CAG CAA GAG CAG C-3'	54 °C	(GA) ₂₆ (CA) ₂	6-FAM
MAD 317 F MAD 317 R	5'-TAT CAT CTG AAG TCA AAA GGG G-3' 5'-TCT TGA GTC TGG GGT ATA ATG TG-3'	56 °C	(CA) ₇ CG(CA) ₅ GAG(TA) ₅	HEX
MAD 119 F MAD 119 R	5'-TGA GAG CAC AGG ATA CAT TGA AAC-3' 5'-GCA ATC AGC CCC ATA GAC AC-3'	54 °C	(GT) ₁₀ ATA(CA) ₃ (TA) ₃	6-FAM
MAD 282 F MAD 282 R	5'-CAT TTC AAA ACC CTA GTT CCA AC-3' 5'-GAT AAA GTA GTT AAG GAT ACC AAG CAC-3'	54 °C	(GT) ₈ T(GT) ₃	6-FAM
MAD 316 F MAD 316 R	5'-CCA AAG GCG GCA CTC TAA C-3' 5'-AAG CAA GGA AAA TAA AGA AGC AG-3'	60 °C	(TA) ₅ (CT) ₂ (GT) ₄ GC(GT) ₈	6-FAM
MAD 16 F MAD 16 R	5'-CCA AAG AGC ACA TCA GAA TAG C-3' 5'-GGG AAA ATA GGA GGA GGG AG-3'	60 °C	(ATT) ₅	HEX
MAD 290 F MAD 290 R	5'-GGA AGC ACA TCT AGC CCA CC 3' 5'-TCA GAA AGT AAC AAT GCA GAA ACA G-3'	56 °C	(CA) ₂₁	HEX
MAD 369 F MAD 369 R	5'-TCT GGG GGC TTT ATG ATT C-3' 5'-CAC TGC TCT AAT GTA AGG CTT C-3'	54 °C	((GAAAGA) ₂ (GGA) ₂) ₃ (GAAAGA) ₁₀ (GGA) ₇ (GA) ₁₈	6-FAM
MAD 51 F MAD 51 R	5'-GTG GAG TGT GAA CAT TCT GGA A-3' 5'-TCC TCT TTC TTG ATT TTC TTT TTA TTA-3'	60 °C	(CT) ₁₇ (GT) ₁₄	6-FAM
MAD 970 F MAD 970 R	5'-TTC ACC TGA TTG CTA ATT CTG C-3' 5'-CTA TGG AAA GAG GAA TTG AGG AG-3'	56 °C	(CT) ₁₆	HEX
MAD 989 F MAD 989 R	5'-TAA TTC TGC TTC CTT TCT GAC AC-3' 5'-ATG CAA TCT GTT CCC TGT TAT C-3'	58 °C	(CT) ₁₆	HEX
JAM 145 F JAM 145 R	5'- TAG ACA AGA TGC TAT GGA AT-3' 5'- TGC TTA GAA AAG AAC ATT GGA AA- 3'	60 °C	(CA) ₆ TC (CA) ₉	HEX
JAM 124 F JAM 124 R	5'- TGG CAA CTG ACA GAC TCC G- 3' 5'- GTT TTT TCT TCC CCT GCT GA- 3'	54 °C	(GT) ₁₂	HEX
JAM 39 F JAM 39 R	5'- AGA GGA GGA GGA AAT AAT AAA AGG-3' 5'-GGA TAG TGA CAG ATG ATG GGC- 3'	58 °C	(CA) ₁₈	6-FAM
MAD 251 F MAD 251 R	5'-TCC TGC TTC TCA GTT CAG TGG- 3' 5'- GGA AGA TAG TTT ATT TCA TTA TTA TAG CC- 3'	50 °C	(CA) ₁₆ (TACATA) ₁₁	HEX

F : Forward (sens)

R : Reverse (anti-sens)

- Vérification des fragments amplifiés par électrophorèse

Afin de vérifier la qualité et la taille des fragments amplifiés, l'électrophorèse a été réalisée pendant 20 à 30 minutes sous tension de 100 volts et une intensité électrique de 75 mA. Un aliquote de chaque amplifié (1µl) est déposé sur un gel d'agarose de 0,6% avec une amorce témoin dans l'un des puits servant à détecter une éventuelle contamination. Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migrent plus loin que les molécules de tailles supérieures. Le gel après migration est plongé dans un bain de bromure d'éthidium pendant une minute pour révéler l'ADN. Le rinçage se fait avec de l'eau du robinet pendant 30 minutes. Grâce aux molécules de bromure d'éthidium qui s'intercalent dans la molécule d'ADN, les bandes d'ADN seront visibles sous rayonnements ultraviolets. Le gel d'agarose est photographié avec un appareil photo numérique sous rayonnements ultraviolets et lié directement à l'ordinateur. En effet, l'amplification est bien réussie si chacune des deux amorces d'une paire (sens et anti-sens) s'attache à chaque extrémité de la chaîne d'ADN et arrive à copier correctement un brin matrice. L'ADN témoin, les produits d'amplification et les amorces fixées apparaissent comme une bande blanche sur l'électrophorégramme si l'amplification est positive. Ci-après le profil électrophorétique des fragments d'ADN microsatellites amplifiés.

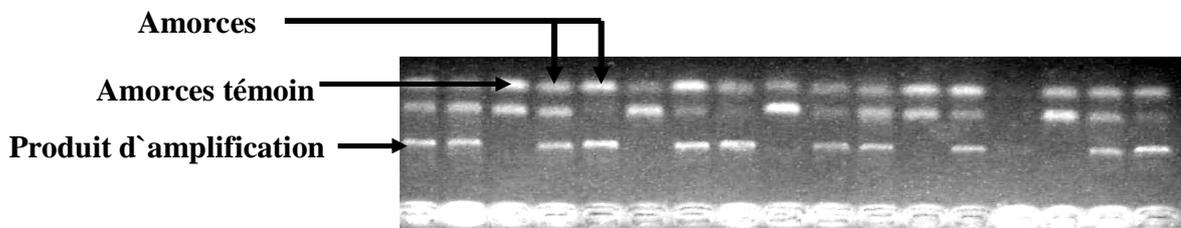


Figure n° 5 : Profil électrophorétique des fragments d'ADN microsatellites amplifiés sur gel d'agarose révélé avec du bromure d'éthidium

II- 6 - Purification des fragments amplifiés

La purification du produit d'amplification a pour but d'isoler l'ADN des nucléotides non incorporés, enzymes, amorces et des autres produits qui restent en suspension dans la solution afin d'obtenir un bon résultat. Le reste de l'amplifié (24 µl) du tube de réaction correspondant à une amplification positive sera purifié avec la méthode de QiaGen utilisant la technique de précipitation de l'ADN en présence d'alcool salé. L'amplifié positif est transvasé dans un tube à filtre du kit QiaGen. Ensuite, 750 µl d'alcool salé (PE-Buffer) est ajouté dans ce tube. L'ensemble

est centrifugé à 3 000 tours par minute. Le filtre retient l'ADN et le filtrat est jeté. Pour assurer la pureté de l'ADN, les mêmes opérations sont répétées deux fois mais seulement avec 750 µl d'alcool salé. La solution d'ADN obtenue est ainsi stockée à - 4° C et sera utilisée pour la réamplification.

II -7- Séquençage et réaction

C'est la phase de détermination de la succession des nucléotides qui composent l'ADN. Un microlitre de chaque produit amplifié est chargé dans une nouvelle plaque de 96 puits, séché et additionné par un mélange de formamide désionisé (10, 5 ul : DIF/ROX). Le DIF/ROX empêche la réassociation des brins d'ADN dissociés (ROX : standard commercial fournissant des maximums standards différents). Seize échantillons (capacité maximale du séquenceur) dont un échantillon représente un individu sont placés dans l'appareil séquenceur ABI 3100 (ABI PRISM® 3100, Hitachi Ltd, Applied Biosystem, CA). Le mélange est dénaturé pendant deux minutes à 96°C et est refroidi jusqu'à 4°C. Les allèles présents chez chaque individu se distinguent ensuite par leur taille où le séquenceur automatique ABI 3100 fonctionne en donnant l'information de la variabilité existante ou « Polymorphism Information Content » (PIC). Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise. Le résultat est présenté par la machine sous forme de courbes présentant la fluorescence détectée et l'interprétation se fait en termes de nucléotides.

II - 8 - Lecture par le séquenceur

Dans le sens 5' - 3', la lecture d'une séquence débute par un codon « start » et se termine par un codon « stop ». A chaque pic sur un graphe correspond une base et chaque base correspondante est représentée en bas de la séquence (annexe I, fig. n° 26, p. III). Un individu homozygote sera représenté par des pics de même dimension. Ainsi, si tous les individus possèdent les mêmes pics, alors la population en question est monomorphe. Un individu hétérozygote possède des pics de différentes amplitudes. Dans le cas des microsatellites, l'hétérozygotie s'observe sur la différence du nombre de répétition des motifs au niveau d'un même locus. L'électrophorégramme pour un échantillon est constitué par deux courbes respectivement de couleur rouge et bleue. La courbe rouge qui présente des pics espacés régulièrement est le standard et sert de référence à la détermination de la taille du pic bleu correspondant au produit d'amplification. Cette taille est

déterminée automatiquement par la machine et les chiffres ainsi obtenus sont enregistrés avec un logiciel tableur.

II-9- Méthode d'analyse des données

II-9-1- Analyse des données morphométriques

En prenant comme paramètre de croissance la mensuration de l'animal, le rapport entre la longueur totale du corps (TTL), la longueur du museau-cloaque (SVL) et le poids total d'un individu ont été calculés. Ceci afin de déceler les classes d'âge qui existent dans chaque population. Le logiciel **Microsoft Excel** a été utilisé pour la réalisation des graphiques et les calculs de base. A part la longueur totale (TTL) du corps, la longueur du museau-cloaque a été prise en compte pour les calculs parce que cette partie du corps de l'animal en rapport avec son poids reflète l'âge estimatif. En plus de ceci, contrairement à la queue, cette partie ne peut être tronquée. Ainsi, sa fiabilité est certaine. Par la suite, les individus supposés être dans la même cohorte seront vérifiés s'ils appartiennent réellement à la même classe d'âge. Après, ils seront comparés afin de voir s'il existe ou non une différence morphologique significative entre les individus des deux populations. Le test du Chi 2 a été effectué avec un degré de tolérance de 5 %.

II-9-2- Mesure de la diversité génétique

Pour mesurer la diversité génétique d'une population, bon nombre de paramètres doivent être considérés et différents programmes doivent être utilisés. En effet, ces paramètres génétiques peuvent être estimés à partir de programmes statistiques et permettent ensuite de simuler une plus grande population d'un site connu (Dieringer et Schlotterer, 2003). Pour y accéder, deux principaux programmes ont été utilisés dont le modèle des allèles infinis « Infinite Allele Model : IAM » et le modèle de mutation pas à pas « Stepwise Mutation Model : SMM ». Ces méthodes statistiques calculent et établissent une simulation d'une population existante. Dans la présente étude, une population est représentée par 10 individus et les estimations obtenues à partir de ces échantillons devraient révéler les valeurs paramétriques d'une population (Hedrick, 2005).

A- Détection des erreurs

Avant d'analyser la diversité génétique proprement dite, il est nécessaire de passer à la détection des erreurs. En effet, les scores alléliques obtenus à partir des analyses génotypiques sont

révisés de façons à déceler s'il y a évidence d'allèles nuls ou d'autres erreurs qui sont souvent causées par des problèmes de concentration d'ADN. Deux programmes ont été utilisés dont Micro checker (Oosterhooft *et al.*, 2004) et Cervus (Marshall *et al.*, 1998).

Par définition, un allèle nul est un allèle non amplifié à cause d'une mutation au niveau du site de fixation de l'amorce (Saleh, 2008). Ces erreurs sont aussi parfois causées tout simplement par des défauts de manipulation. Cette étape est très importante car ces erreurs génotypiques peuvent conduire l'analyse à une surestimation des individus consanguins, du degré du risque d'extinction ou tout simplement d'une fausse évaluation.

B- Test de déséquilibre génotypique

Une fois toutes les bases de données vérifiées et exemptées d'erreurs, le processus d'analyse de la diversité génétique peut commencer. Le programme FSTAT a été utilisé où l'analyse est portée sur la recherche de toute autres liaisons entre les différents loci. Le modèle employé est celui de Weir et Cockerham (1984) où :

- La fréquence haplotypique est égale à $X_{AB}, X_{Ab}, X_{aB}, X_{ab}$
- La fréquence génique : $q_A = X_{AB} + X_{Ab}$ et $q_B = X_{AB} + X_{aB}$
- Le Déséquilibre de liaison $D = X_{AB} (q_A - q_B) = X_{AB}X_{ab} - X_{Ab}X_{aB}$

Cependant, la plus importante condition qui doit être vérifiée en premier lieu est que les loci sont indépendants. Afin de pouvoir émettre ou non l'hypothèse nulle que les génotypes d'un locus ne sont dépendants de tout autre génotype de différents loci.

C- Test d'équilibre de Hardy Weinberg (HWE)

Les données ont été analysées pour chacune des deux populations d'après la proportion de Hardy Weinberg. Dans cette étape, la première option dans le programme du GENEPOP est le test de Fisher pour la détermination de la probabilité exacte d'HWE en incorporant la chaîne algorithmique de Markov (Guo et Thompson, 1992). Le niveau du test de signification est de $P < 0,05$. Par ailleurs, pour chaque population et à chaque locus, les paramètres comme le nombre moyen d'allèles, les fréquences alléliques, le taux d'hétérozygotes attendus et observés ainsi que la proportion génotypique sont déterminés.

En effet, le concept de l'équilibre dans le modèle de Hardy Weinberg est soumis aux hypothèses suivantes :

1. Population panmictique,
2. Population infinie ou une population très large, absence de migration,
3. Il n'y a pas de sélection ou de mutation (pas de perte ou gain d'allèles),
4. Les générations successives sont discrètes.

Dans ces circonstances, la diversité génétique d'une population est souvent maintenue et tend toujours vers un équilibre stable grâce à la distribution au hasard des génotypes. La proportion de Hardy Weinberg se résume par la formule suivante :

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \text{ (Frankham } et al, 2002)$$

Avec **p** la fréquence d'un allèle et **q** la fréquence de l'autre allèle du même gène (biallélique)

D- Diversité et hétérozygotie par population

La différenciation génétique est calculée avec F STATISTIQUE et GENEPOP. Le modèle mathématique de l'allèle infini (IAM) permet de déterminer les mutations génétiques, la taille et la distribution des allèles dans un locus.

a) Richesse allélique

Le nombre moyen d'allèles par locus (**A**), appelé également taux d'allélisme ou richesse allélique, dépend de la taille de l'échantillon et est défini pour n_i allèles au locus i et pour L loci par la formule n° 1.

$$A = 1/L - \sum_{i=1}^L n_i$$

1

b) Fréquences alléliques

La fréquence d'un allèle dans une population pour un locus donné est calculée selon la formule n° 2 de la page 19.

$$f = \frac{2N_{ho} + N_{hé}}{2N}$$

2

Où f est la fréquence allélique,

N est le nombre total des individus échantillonnés,

N_{ho} est le nombre des individus homozygotes ayant l'allèle en question,

$N_{hé}$ est le nombre des individus hétérozygotes pour cet allèle

c) Diversité génique

Se définit comme les différents types de gènes présents au sein d'une population, la diversité génique (Frankham *et al.*, 2002) est calculée pour estimer la variabilité génétique en utilisant le programme F STAT (Goudet, 1995). En effet, à l'intérieur d'une population elle est décrite d'une manière caractéristique par le polymorphisme qui est la proportion d'individus hétérozygotes (H_{OK}) au locus K . Soit par la formule n° 3.

$$H_{OK} = 1 - \sum_{i,j=1}^{a_k} p_{ij}^{(i \neq j)}$$

3

Où P_{ij} est l'estimation de la fréquence du génotype ij au locus k et a_k le nombre d'allèles au locus K .

d) Hétérozygotes observés (H_o) et hétérozygotes attendus (H_e)

1. Estimation de la moyenne des hétérozygotes observés (H_o)

En considérant un locus, le taux d'hétérozygote observé (H_o) est la moyenne de (H_{OK}) suivant l'équation 4 ci-dessous.

$$H_o = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N H_{OK}$$

4

Avec : H_{OK} : Proportion des individus hétérozygotes au locus K.

N : Nombre total d'individus échantillonnés

2. Estimation de la moyenne des hétérozygotes attendus (H_e)

Le taux d'hétérozygotes attendus (H_e) peut être calculé sous l'hypothèse d'équilibre de Hardy Weinberg, à partir des fréquences alléliques déterminées pour chaque locus à l'aide de la formule suivante.

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

5

Avec : p_i : fréquence de l'allèle i

k : total des allèles observés

$\sum_{i=1}^k$ représente la somme des fréquences des homozygotes

Le logiciel FSTAT version 1.2 (Goudet, 1995) a été utilisé pour ce calcul, le niveau du test de signification est de $p > 0,05$.

e) Coefficient de consanguinité (FIS)

Le coefficient de consanguinité FIS (formule n° 6, page 21) pour un individu est la probabilité pour que les deux allèles appartenant à un locus soient identiques, sa valeur varie entre -1 et +1 où FIS = 1 signifie fixation complète (cas d'autofécondation), FIS < 1 démontre un nombre en hétérozygotie élevé, FIS = 0 signifie que la population est en équilibre de Hardy Weinberg. Cet indice permet d'indiquer le degré de consanguinité entre deux ou plusieurs populations. Une valeur biaisée de FIS hautement significative peut être causée éventuellement par l'effet Whalund (Rousset, 2002). Par définition, l'effet Whalund démontre que quand deux populations tendent vers la proportion de Hardy Weinberg, la population résultante dévie vers un excès d'homozygotes ou déficience en hétérozygotes.

$$FIS = (H_e - H_o) / H_e$$

6

II-9-3- Analyse des flux de gènes « Allèles privés et nombre des migrants »

Se définissant comme allèles trouvés uniquement dans une population et qui sont absents dans d'autres (Barton et Slatkin, 1986), la moyenne de la fréquence des allèles privés est calculée à partir des programmes de simulation. Ces simulations peuvent fournir en même temps une simple et robuste estimation sur le nombre d'individus échangés entre des populations locales (Slatkin, 1980). En conséquence, La méthode des allèles privés avec la « comparaison par paire » est employée pour estimer le taux de flux de gènes et le nombre de migrants dans différentes populations (Slatkin, 1995). Ces méthodes établissent les différences caractéristiques entre deux ou plusieurs populations, permettant d'estimer s'il y a un éventuel assemblage génétique entre les populations.

II-9-4- Test de détermination de l'effet de goulot

Ce programme détermine l'évidence ou non d'un effet de goulot dans chaque population. En effet, ce phénomène est une soudaine restriction de la taille d'une population causée par exemple par une catastrophe naturelle et frappe une ou quelques générations pendant une période indéterminée (Frankham *et al.*, 2002). Pour détecter un tel phénomène au sein d'une subdivision M, une relation théorique entre l'excès du nombre d'allèles observé ($K_o - K_e$), comparée avec le nombre d'allèles attendu et le nombre d'allèles observés K_o est prise en compte. K_e correspond au nombre d'allèles attendus dans une population soumise à une « mutation-drift equilibrium » dans le modèle de l'allèle infini suivant la formule d'Ewens (1972) où $M = H(t) / [1 - H(t)]$.

Avec : $H(t) =$ Le taux d'hétérozygote au temps $t = H(\infty) (1 - e^{-(1+4N_e\mu)t})$

Où : $H(\infty) = 4N_e\mu / (1+4N_e\mu)$ (Nei *et al.*, 1975)

Et k_e (nombre d'allèles attendus) = $1 + M/(M+1) + M/(M+2) + \dots + M/(M+n-1)$

Où $M = N_e\mu$

$N_e =$ taille de la population et $\mu =$ taux de mutation observé

III - RESULTATS ET INTERPRETATIONS

III- 1 - Analyse morphométrique

Les graphiques de la longueur museau-cloaque (SVL) et de la longueur totale du corps (TTL) en rapport avec le poids d'un individu sont illustrés par les figures n° 6 et n° 7 ci-dessous.

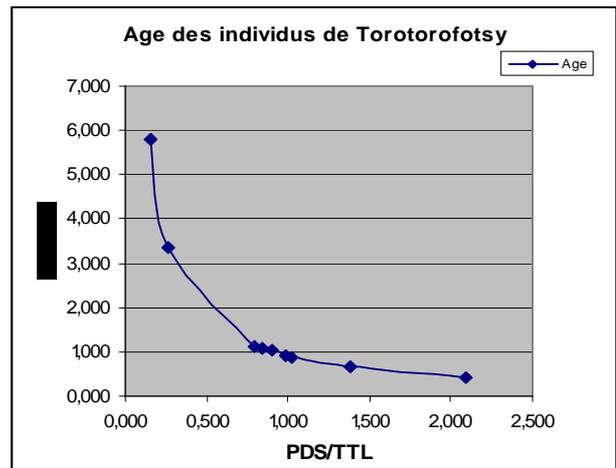
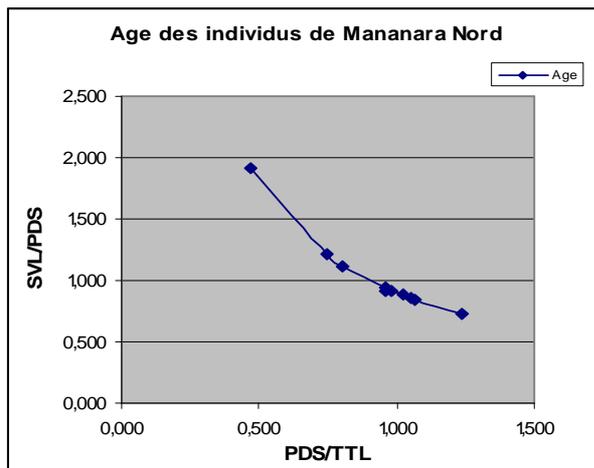


Figure n° 6 : Age des individus de Mananara-Nord Figure n° 7 : Age des individus de Torotorofotsy

Ces graphiques montrent l'âge estimatif de chaque individu des deux populations (représenté par des points). Ces nuages de points pouvant être groupé par quatre expliquent l'existence de quatre cohortes : jeunes éclos, jeunes, sub- adultes et adultes. Cinq individus de la classe d'âge des sub-adultes des deux populations sont testés s'ils appartiennent réellement à la même cohorte afin de les comparer morphologiquement (tableau n° 2 ci-après).

Tableau n° 2 : Résultats du test du Chi 2.pour la comparaison morphométrique

SITES	SEXE	SVL en m	POIDS en Kg	SVL/PDS
Mananara-Nord	mâle	1,22	1,09	1,119
Mananara-Nord	femelle	1,33	1,41	0,943
Mananara-Nord	mâle	1,38	1,5	0,920
Mananara-Nord	mâle	1,36	1,48	0,919
Mananara-Nord	femelle	1,24	1,4	0,886
MOYENNE		1,306	1,376	0,957
Torotorofotsy	mâle	1	0,9	1,111
Torotorofotsy	femelle	1,3	1,2	1,083
Torotorofotsy	femelle	1,14	1,12	1,018
Torotorofotsy	femelle	1,1	1,2	0,917
Torotorofotsy	mâle	1,38	1,55	0,890
MOYENNE		1,184	1,194	1,004
TEST DU Chi 2		0,19 > 0,05	0,32 > 0,05	0,02 < 0,05

Le test du Chi 2 pour la vérification de la classe d'âge des dix individus à comparer indique une valeur non significative. Ce qui signifie que ces individus appartiennent effectivement à la même cohorte. Cependant, le test effectué sur la comparaison de la longueur museau-cloaque (SVL) et le poids montre une valeur largement significative. Ce qui démontre l'existence d'une importante différence morphologique entre ces individus. La valeur du poids moyen des individus (mâles ou femelles) de la population Mananara-Nord présente une nette différence de 0,182 kg de plus par rapport à celle de Torotorofotsy. Par ailleurs, la majorité des individus de la population de Mananara-Nord que ce soit mâle ou femelle présente une taille supérieure à celle de Torotorofotsy.

Les résultats détaillés des données morphométriques ainsi que les bases de données biologiques et écologiques sont représentés dans le tableau n° 15 de l'annexe II, p. VIII.

III- 2 - Mesure de la diversité génétique

A- Erreurs détectées à partir de Microchecker® et Cervus®

- Allèles nuls

Les vingt individus issus des deux populations ont été analysés avec les dix sept paires d'amorces. Le fragment amplifié par une paire d'amorce est considéré comme un locus et sa taille en paires de bases comme allèle. Tous les loci présentent des variations mais afin d'avoir des résultats fiables, il est nécessaire de détecter les éventuelles erreurs. Comme il est indiqué par les deux graphes des figures n° 12 et 13 ci-après, il y a un excès général d'homozygotes pour la plupart des classes d'allèles. Deux loci dont JAM 124 et MAD 317 sont suspectés de présenter des allèles nuls (Microchecker®)

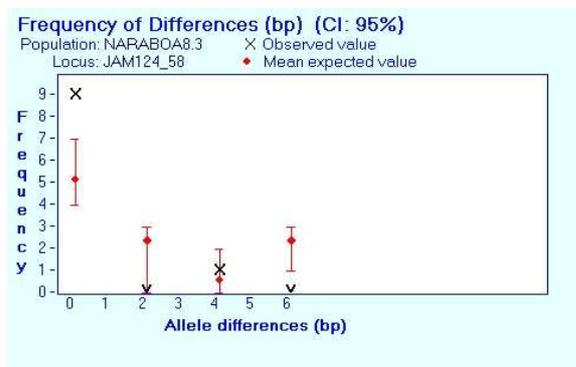


Figure n° 8 : Fréquence des homozygotes attendus et observés montrant l'évidence d'allèles nuls (Locus JAM 124)

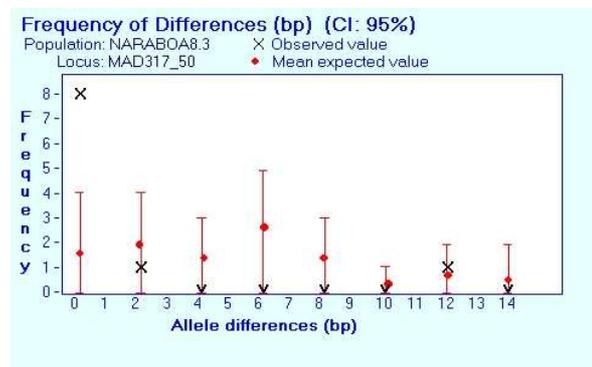


Figure n° 9 : Fréquence des homozygotes attendus et observés, montrant l'évidence d'allèles nuls (Locus MAD 317)

Le locus JAM 124 présente plus de 50% d'allèles se trouvant dans la même classe de dimension. Le locus MAD 317 présente un nombre total d'homozygotes de 1, 95 attendus et 8 observés. A partir du programme Cervus®, quatre loci présentent des fréquences d'allèles nuls très élevées. Les allèles présentant une fréquence supérieure à 10% sont considérées comme nuls et rayés de la liste : JAM 124 ; MAD 317 ; MAD 970 ; MAD 989 (tableau n° 9, annexe I).

B- Déséquilibre de liaison

Pour la suite de l'étude, treize loci microsatellites seront utilisés au lieu de dix sept. La valeur de la probabilité P est de 0, 000641 << 0, 05. D'après ce résultat, cette valeur est non significative pour un intervalle de confiance de 95%. D'ou, le non évidence d'un déséquilibre de liaison pour l'ensemble des 13 loci.

C- Equilibre de Hardy Weinberg (HWE)

La valeur de la probabilité P pour chaque locus dans la population de Torotorofotsy est comprise entre 0,0510 et 1 et entre 0,0786 et 1 pour celle de Mananara-Nord. Ces probabilités expriment la constance génétique d'une population au sein de laquelle les croisements se font au hasard, tel que **P > 0,05** signifie que le modèle utilisé est conforme au modèle attendu de Hardy-Weinberg. Par ailleurs, le test ne montre aucun résultat pour les loci MAD 16 et MAD 282 dans la population de Mananara-Nord, signifiant que l'estimation n'a pas pu être effectuée par le programme.

Tableau n° 3 : Valeurs de la probabilité P pour chaque locus des deux populations

LOCI	TOROTOROFOTSY			MANANARA-NORD		
	Valeur de P pour chaque locus	Chi 2	P : HWE > 0,05	Valeur de P pour chaque locus	Chi 2	P : HWE > 0,05
SANZ 56	0, 8045	0, 0099	0, 5380	0, 3519	0, 0076	0, 7901
SANZ 11	0, 4805	0, 0007		1, 0000	0, 0000	
JAM 39	0, 1361	0, 0007		-	0, 0088	
JAM 145	0, 9011	0, 0029		0, 3828	0, 0067	
MAD 16	1, 0000	0, 0000		-	-	
MAD 51	0, 1126	0, 0026		1, 0000	0, 0000	
MAD 119	0, 3045	0, 0026		1, 0000	0, 0000	
MAD 229	1, 0000	0, 0000		1, 0000	0, 0000	
MAD 251	0, 7260	0, 0065		0, 5753	0, 0146	
MAD 282	1, 0000	0, 0000		-	-	
MAD 290	0, 8425	0, 0024		0, 2214	0, 0029	
MAD 316	0, 0510	0, 0019		0, 7431	0, 0042	
MAD 369	0, 0870	0, 0131		0, 0786	0, 0114	

D- Diversité et hétérozygotie par population

a- Richesse allélique (nombre moyen d'allèles par locus et par population)

Le nombre d'allèles détectés par locus varie de 1 à 14 en considérant les données comme échantillons assemblés. La population de Torotorofotsy présente le plus grand nombre d'allèles. En effet, le nombre d'allèles rencontrés à chacun des loci polymorphes exprime le degré de diversité génétique d'une population. Ainsi, avec une différence de dix allèles, la diversité en nombre diffère d'une population à une autre. D'où à ce niveau, la population de Torotorofotsy présente plus de variation par rapport à celle de Mananara-Nord.

Tableau n° 4 : Nombres d'allèles par locus et par populations et leur taille en paire de bases

LOCI	Nombre d'allèles (Torotorofotsy)	Nombre d'allèles (Mananara-Nord)	Proportion moyenne d'allèles estimés	Taille des allèles (PAIRE DE BASE)
SANZ 56	10	8	10, 852	[294 - 330]
SANZ 11	5	6	1, 999	[188 - 190]
JAM 39	10	4	7, 482	[150 - 170]
JAM 145	6	8	7, 518	[120 - 142]
MAD 16	2	1	2, 756	[219 - 225]
MAD 51	8	10	3, 832	[190 - 212]
MAD 119	3	3	2, 752	[151 - 155]
MAD 229	4	6	2, 641	[239 - 243]
MAD 251	9	4	10, 024	[152 - 214]
MAD 282	2	1	1, 976	[155 - 157]
MAD 290	14	14	4, 269	[228 - 236]
MAD 316	4	4	5, 387	[294 - 330]
MAD 369	4	2	14	[145 - 215]
TOTAL	81	71	-	-
MOYENNE POUR DIX INDIVIDUS DIPLOIDES	6, 23	5, 46	5, 806	-

b- Tailles et fréquences des allèles par locus et par population

Pour une analyse de comparaison facilement compréhensible, les allèles de chaque locus seront attribués par des chiffres allant de 1 à 20. La taille des allèles en paires de bases et les fréquences des allèles par locus pour chaque population sont détaillées ci-après.

1. Locus SANZ 56

Quatorze allèles sont observés dans ce locus de taille comprise entre 294 et 330 pb. La fréquence de ces allèles varie entre 5 à 20 % dans l'ensemble des populations. Trois allèles dont l'allèle 2, 3 (MN) et 6 (T) présentent une fréquence plus élevée et sept allèles montrent une minimale de 5 % (1, 9, 10, 14 : T) et (5, 12, 14 : MN). A cette répartition où la richesse allélique est plus élevée dans la population de Torotorofotsy, cette dernière se trouve plus variée alléliquement par rapport à celle de Mananara-Nord (figure n° 10).

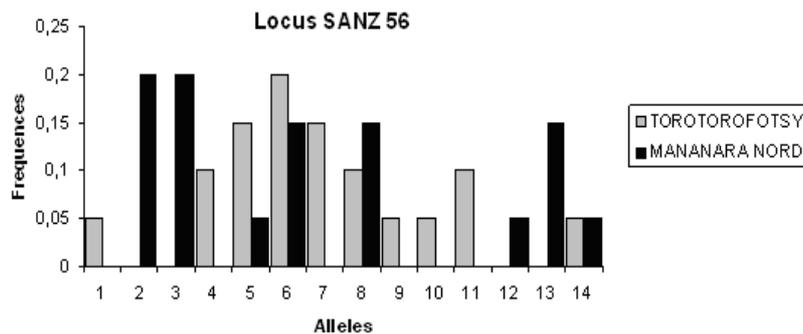


Figure n° 10 : Histogramme des fréquences des allèles du locus SANZ 56 pour chaque population

2. Locus SANZ 11

Ce locus présente six allèles dont la taille est comprise entre 188 et 190 pb. La fréquence des allèles varie entre 5 à 50 %. La population de Mananara-Nord diffère de celle de Torotorofotsy pour un allèle de plus (allèle 6 : 10 %). Par ailleurs, l'allèle commun 1 est représenté à une fréquence de 50 % dans la population de Mananara-Nord contre 45 % à Torotorofotsy. Cette distribution permet à la population de Mananara-Nord de se situer à un niveau de diversité allélique plus élevé par rapport à celle de Torotorofotsy (figure n° 11 de la page 27).

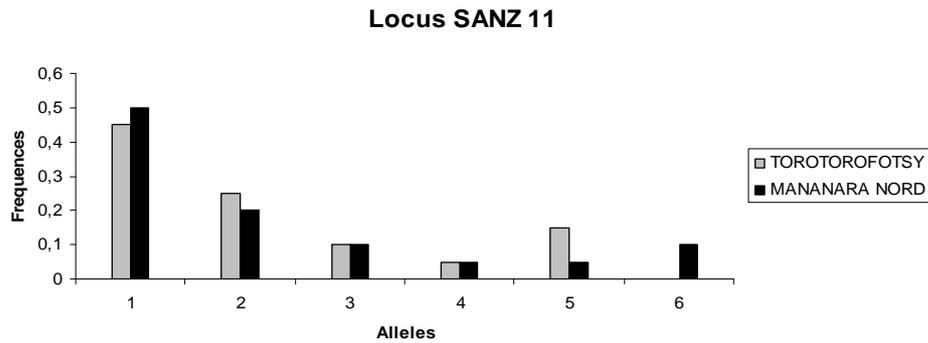


Figure n° 11 : Histogramme des fréquences des allèles du locus SANZ 11 pour chaque population

3. Locus JAM 39

Ce locus présente dix allèles de taille comprise entre 150 et 170 pb. La fréquence des allèles varie entre 5 à 40 %. Quatre allèles sont observés dans la population de Torotorofotsy plus six qui lui sont propres avec une fréquence ne dépassant pas les 10 %. Celle de Mananara-Nord possède quatre allèles avec deux (4 et 6) fortement représentés et deux autres (2 et 5) à une fréquence respective de 15,5 % et 5 %. La population de Torotorofotsy montre plus de variation génétique par rapport à celle de Mananara-Nord car en effet, un locus possédant 10 allèles de fréquences voisines apporte plus de variation génétique à une population qu'un locus n'ayant que quatre allèles dont deux faiblement représentés (Fig. n° 12 ci-dessous).

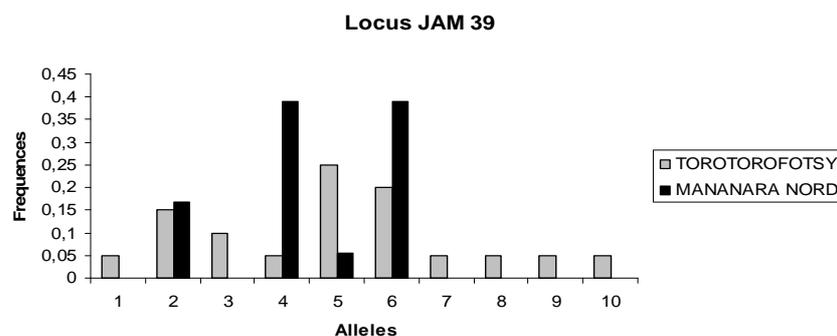


Figure n° 12 : Histogramme des fréquences des allèles du locus JAM 39 pour chaque population

4. Locus JAM 145

Neuf allèles sont observés dans ce locus de taille comprise entre 120 et 142 pb. La fréquence des allèles varie entre 10 à 30 % alors que dans l'autre population elle va de 5 à 35 %. La population de Mananara-Nord possède huit allèles dont trois lui sont propres alors que

celle de Torotorofotsy ne présente que six allèles dont un (6) lui est distinct. Dans la population de Torotorofotsy, La répartition de ces fréquences alléliques offre à la population de Mananara-Nord une diversité allélique plus élevée par rapport à celle de Torotorofotsy (figure n° 13 ci-dessous).

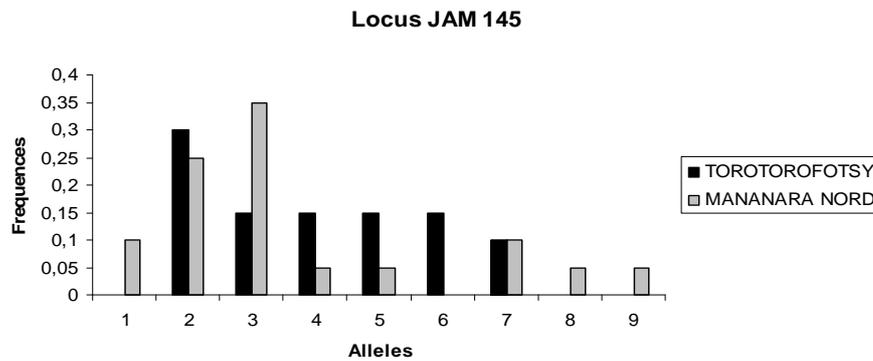


Figure n° 13 : Histogramme des fréquences des allèles du locus JAM 145 pour chaque population

5. Locus MAD 16

C'est le locus présentant le minimum de nombre d'allèles au niveau des deux populations. Deux allèles sont observés de taille comprise entre 219 à 225 pb. Ces allèles sont tous rencontrés dans la population de Torotorofotsy avec l'allèle 2 qui lui est propre tandis qu'un seul allèle est identifié dans la population Mananara-Nord. L'allèle 1 est représenté à une fréquence de 100 % dans la population de Torotorofotsy contre 65 % dans celle de Mananara-Nord. En effet, ce locus tend à être monomorphe pour celle de Mananara-Nord. La population de Torotorofotsy se situe ainsi à un degré de diversité allélique plus importante par rapport à celle de Mananara-Nord (figure n° 14).

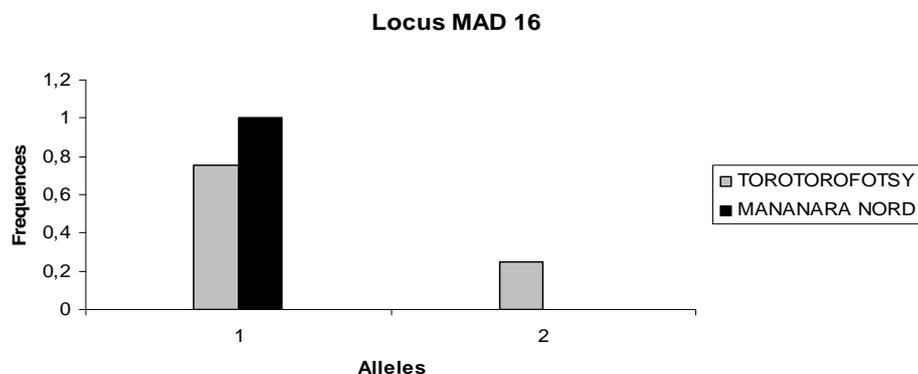


Figure n° 14 : Histogramme des fréquences des allèles du locus MAD 16 pour chaque population

6. Locus MAD 51

Ce locus présente quatorze allèles de taille entre 190 et 212 pb. Une répartition irrégulière des fréquences alléliques est observée (5 à 30 %). Avec dix allèles, la population de Mananara-Nord détient la majorité. Cependant, la population de Torotorofotsy en dispose huit, desquels quatre (5, 6, 10, 13) lui sont propres. Les six allèles propres à la population de Mananara-Nord (fréquences avoisinants les 5 et 10 %) lui offrent une importante diversité alléliques par rapport à celle de Torotorofotsy (figure n° 15).

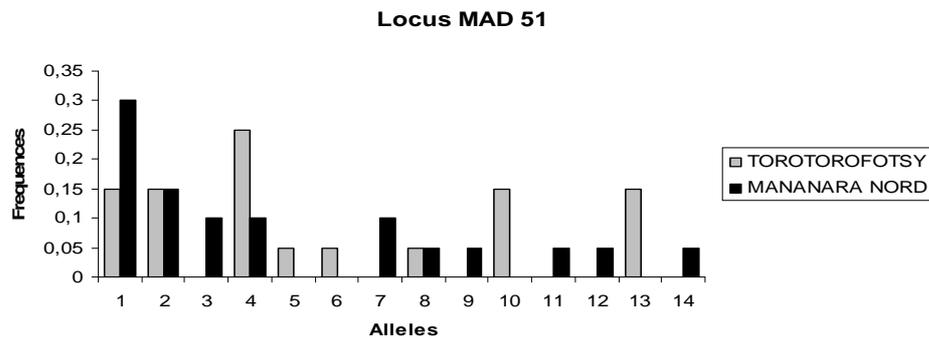


Figure n° 15 : Histogramme des fréquences des allèles du locus MAD 51 pour chaque population

7. Locus MAD 119

Ce locus présente trois allèles communs dont la taille est comprise entre 151 et 155 pb. Les fréquences alléliques varient entre 5 à 80 %. Au niveau des deux populations. L'allèle 2 est représenté à une fréquence de 80 % dans la population de Torotorofotsy contre 75 % dans celle de Mananara-Nord. L'allèle 1 présente une fréquence minimale à 0,5 %. A cette répartition, La variabilité génétique ne diffère pas d'une population à l'autre (figure n° 16 ci-dessous).

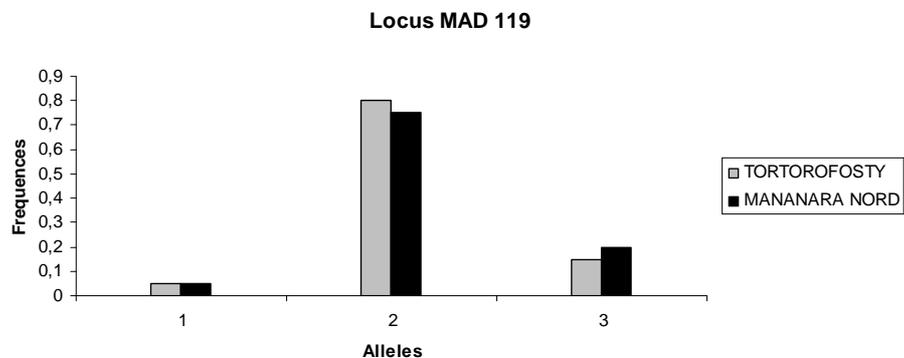


Figure n° 16 : Histogramme des fréquences des allèles du locus MAD 119 pour chaque population



8. Locus MAD 229

Ce locus présente six allèles dont la taille est comprise entre 239 à 243 pb. Avec une fréquence variant entre 10 à 30 %, les six allèles sont tous rencontrés dans la population de Mananara-Nord avec deux (4 et 6) qui lui sont propres. La population de Torotorofotsy ne possède que quatre allèles communs (1, 2, 3, 5) avec une fréquence variant autour de 15 à 45 %. Cette distribution permet à la population de Mananara-Nord de se situer à une diversité allélique plus élevée par rapport à celle de Torotorofotsy.

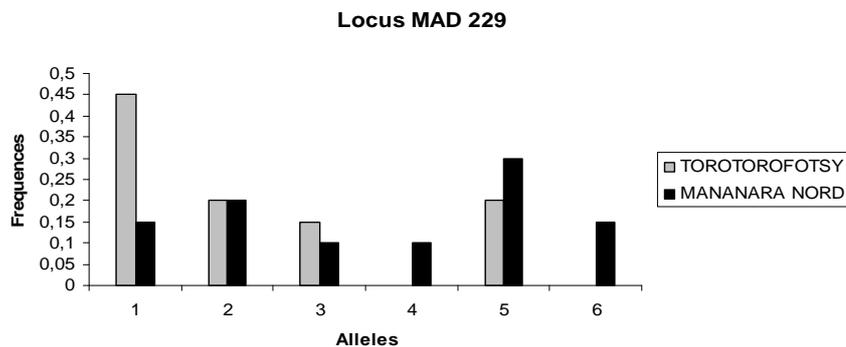


Figure n° 17 : Histogramme des fréquences des allèles du locus MAD 229 pour chaque population

9. Locus MAD 251

Ce locus présente neuf allèles dans l'ensemble des populations de taille comprise entre 152 à 214 pb. Les fréquences alléliques varient entre 5 à 35%. Ces allèles sont tous présents dans la population de Torotorofotsy avec cinq (1, 6, 7, 8, 9) qui lui sont propres. La population de Mananara-Nord possède quatre allèles (2, 3, 4, 5) communs de fréquences variant entre 5 à 35 % et entre 15 à 25 % dans la population de Torotorofotsy. A cette répartition, aucune différence de diversité génétique n'est visible entre les deux populations (figure n° 18 ci-après).

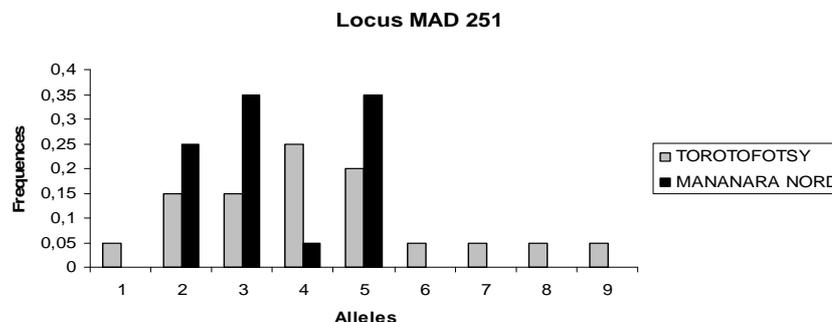


Figure n° 18 : Histogramme des fréquences des allèles du locus MAD 251 pour chaque population

10. Locus MAD 282

Ce locus présente quatre allèles dont la taille est comprise entre 145 à 215 pb. Ces allèles sont tous observés dans la population de Torotorofotsy avec trois (1, 3, 4) qui lui sont distincts. Celle de Mananara-Nord ne présente que l'allèle commun 2 à une fréquence maximale de 100 %. Avec trois allèles (1, 3, 4) caractéristiques de fréquences respectives de 10 %, 5 % et 5 %, la population de Torotorofotsy met en évidence un important polymorphisme par rapport à celle de Mananara-Nord (fig. n° 19 ci-dessous).

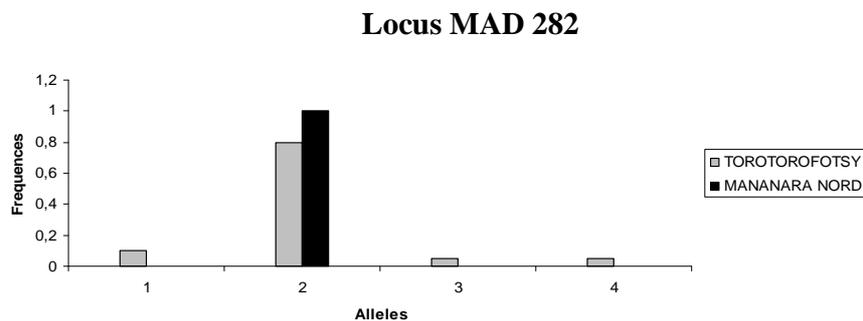


Figure n° 19 : Histogramme des fréquences des allèles du locus MAD 282 pour chaque population

11. Locus MAD 290

Ce locus présente le nombre maximal d'allèles dont la taille est comprise entre 228 à 236 pb. Les fréquences alléliques varient entre 4,5 à 16 %. Six allèles sont caractéristiques de la population de Torotorofotsy et huit autres lui sont partagés. A nombre égal avec les allèles propres de Torotorofotsy, la population de Mananara-Nord en possède six (2, 9, 12, 14, 17 et 18) qui lui sont distincts. La population de Mananara-Nord met davantage une différence de 4, 5 % par rapport à celle de Torotorofotsy pour l'allèle commun 7 et appose une légère diversité allélique de plus par rapport à celle de Torotorofotsy.

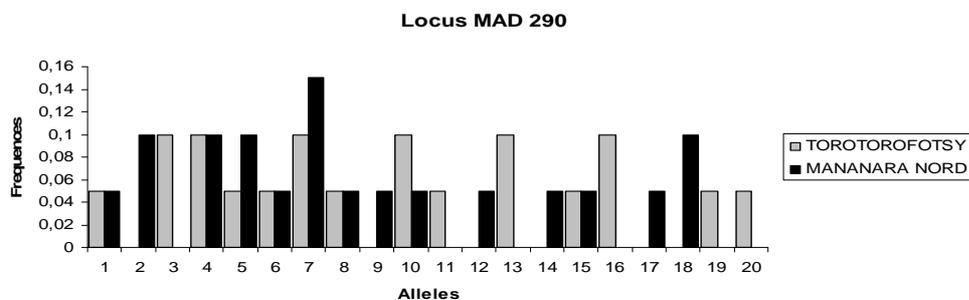


Figure n° 20 : Histogramme des fréquences des allèles du locus MAD 290 pour chaque population

12. Locus MAD 316

Cinq allèles sont identifiés dans ce locus avec la taille comprise entre 294 à 330 pb. Les fréquences alléliques varient entre 5 à 60 %. La population de Torotorofotsy présente quatre allèles (1 ; 2 ; 3 ; 4) dont un (2) lui est propre. A une égale répartition des effectifs alléliques, la population de Mananara-Nord en possède quatre (1 ; 3 ; 4 ; 5) avec un (5) qui lui est distinct. Cependant, en comparant la fréquence des deux allèles privés des deux populations, celle de Mananara-Nord montre une diversité plus large par rapport à celle de Torotorofotsy (figure n° 21).

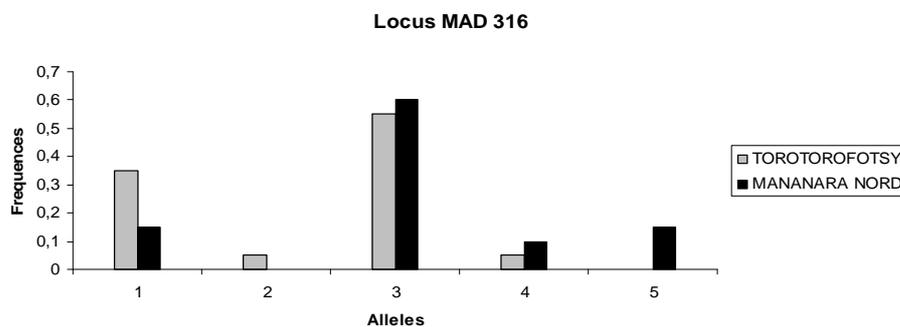


Figure n° 21 : Histogramme des fréquences des allèles du locus MAD 316 pour chaque population

13. Locus MAD 369

Trois allèles sont observés dans ce locus avec la taille variant au nombre de 155 à 157 pb. Les fréquences alléliques varient entre 5 à 90 %. Un allèle (3) reste distinctif de la population de Torotorofotsy tandis qu'un autre (2) pour celle de Mananara-Nord. La fréquence de l'allèle commun 1 montre un maximum de 90 % pour la population de Mananara-Nord contre 80 % pour Torotorofotsy. À cette répartition théoriquement analogue, la diversité allélique au niveau des deux populations ne montre aucune différence (figure n° 22).

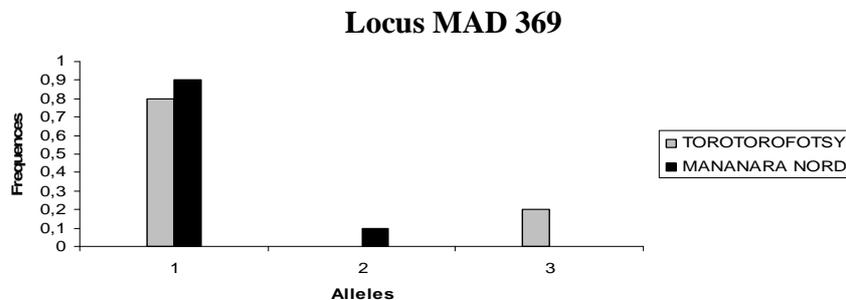


Figure n° 22 : Histogramme des fréquences des allèles du locus MAD 369 pour chaque population

c- Diversité génique par locus et par population

Basée sur la valeur de la moyenne totale de la diversité génique (tableau n° 5), la population de Torotorofotsy montre une légère différence de plus par rapport à celle de Mananara-Nord.

Tableau n° 5 : Diversité génique par locus et par population

LOCI	Population de TOROTOROFOTSY	Population de MANANARA-NORD
SANZ 56	0,922	0,894
SANZ 11	0,433	0,267
JAM 39	0,867	0,817
JAM 145	0,772	0,800
MAD 16	0,361	0,000
MAD 51	0,372	0,433
MAD 119	0,361	0,411
MAD 229	0,267	0,189
MAD 251	0,883	0,889
MAD 282	0,389	0,000
MAD 290	0,600	0,622
MAD 316	0,739	0,761
MAD 369	0,978	0,972
MOYENNE	0,611	> 0,543

d- Hétérozygotes observés (Ho) et hétérozygotes attendus (He)

Comme il a été mentionné auparavant, Treize loci microsatellites ont été utilisés pour déterminer les variations génétiques au niveau de deux populations de *Sanzinia*. En allant plus loin, les résultats suivants vont permettre de connaître davantage cette diversité génétique en l'évaluant par le taux d'hétérozygotes observés (Ho) et attendus (He). Le tableau n° 6 de la page 34 montre les valeurs des hétérozygotes observés (Ho) et celle des attendus (He) dans l'ensemble des populations. D'après ce tableau, Ho et He varient respectivement entre 0,20 à 0,90 et 0,18 à 0,97. En se basant sur la moyenne totale de (Ho) et (He), elles montrent une valeur significative. Ceci signifie l'existence de nombreux individus hétérozygotes au niveau des deux populations. Cependant, ces valeurs d'ensemble ne révèlent pas la différence entre les deux populations mais elles illustrent tout simplement le niveau de diversité génétique interne de ces populations.

Tableau n° 6 : Hétérozygotes observés et Hétérozygotes attendus dans l'ensemble des populations.

LOCI	Hétérozygotes observés (Ho)	Hétérozygotes attendus (He)	Hétérozygotes total (Ht)
SANZ56	0, 850	0, 908	0, 927
SANZ11	0, 450	0, 350	0, 355
JAM39	0, 800	0, 842	0, 845
JAM145	0, 900	0, 786	0, 812
MAD16	0, 200	0, 181	0, 190
MAD51	0, 350	0, 403	0, 394
MAD119	0, 350	0, 386	0, 377
MAD229	0, 250	0, 228	0, 231
MAD251	0, 900	0, 886	0, 896
MAD282	0, 250	0, 194	0, 222
MAD290	0, 550	0, 611	0, 612
MAD316	0, 700	0, 750	0, 734
MAD369	0, 800	0, 975	0, 965
Totale des moyennes	0, 56 > 0, 50	0, 57 > 0, 50	0, 581

L'analyse séparée de He et Ho pour chaque population est après effectuée. Avec les valeurs respectives des hétérozygotes attendus (He) qui sont tous significatives pour l'une ou l'autre population (tableau n° 7, page 35), la population de Torotorofotsy présente une hétérozygotie plus élevée par rapport à celle de Mananara-Nord. En outre, une différence importante est constatée entre les deux populations au niveau de deux loci dont MAD 16 et MAD 282. En effet, ces deux loci sont polymorphes dans la population de Torotorofotsy tandis qu'ils ne le sont pas dans l'autre population. Par conséquent, la population de Torotorofotsy présente plus de variétés d'allèles par rapport à celle de Mananara-Nord.

Tableau n° 7 : Taux des hétérozygotes observés (Ho) et attendus (He) pour chaque population

POPULATION DE TOROTOROFOTSY					
Locus	He	He %	Ho	Ho %	Nombre d'échantillon
SANZ56	9, 2100	0, 92105	9	0, 90	20
SANZ11	4, 4200	0, 44211	6	0, 60	20
JAM39	8, 5200	0, 85263	6	0, 60	20
JAM145	7, 8400	0, 78421	10	1, 00	20
MAD16	3, 6316	0, 36316	2	0, 20	20
MAD51	3, 6316	0, 36316	2	0, 20	20
MAD119	3, 5263	0, 35263	2	0, 20	20
MAD229	2, 6842	0, 26842	3	0, 30	20
MAD251	8, 8421	0, 88421	9	0, 90	20
MAD282	3, 9474	0, 39474	2	0, 20	20
MAD290	6, 0000	0, 60000	6	0, 60	20
MAD316	7, 3684	0, 73684	7	0, 70	20
MAD369	9, 6842	0, 96842	8	0, 80	20
MOYENNE		0, 61012 > 0,5		0, 59	
POPULATION DE MANANARA-NORD					
Locus	He	He %	Ho	Ho %	Nombre d'échantillon
SANZ56	8, 8947	0, 88947	8	0, 80	20
SANZ11	2, 6842	0, 26842	3	0, 30	20
JAM39	8, 2632	0, 82632	10	1, 00	20
JAM145	8, 0000	0, 80000	8	0, 80	20
MAD16	*	0, 00000	*	0	20
MAD51	4, 3684	0, 43684	5	0, 50	20
MAD119	4, 1579	0, 41579	5	0, 50	20
MAD229	1, 8947	0, 18947	2	0, 20	20
MAD251	8, 8947	0, 88947	9	0, 90	20
MAD282	*	0, 00000	*	0	20
MAD290	6, 1579	0, 61579	5	0, 50	20
MAD316	7, 5789	0, 75789	7	0, 70	20
MAD369	9, 6316	0, 96316	8	0, 80	20
MOYENNE		0, 542509 > 0,5		0, 53	

e- Coefficient de consanguinité (FIS)

La population de Mananara-Nord possède un coefficient de consanguinité inférieur (0,008) à celle de Torotorofotsy (0,031). Ceci, signifie qu'il y a accouplement plus fréquent entre

individus apparentés à Torotorofotsy qu'à Mananara-Nord. Les résultats détaillés par locus pour chaque population sont présentés dans tableau n° 10 de l'annexe II, p. VI.

III -3 - Fréquences des allèles privés et nombre des migrants

Les résultats provenant de la méthode des allèles privés montrent une fréquence moyenne de 0,09 et ceux du nombre de migrants par classe est à 1,45241. D'après ces proportions, approximativement 9% d'allèles privés sont rencontrés au niveau des deux populations. La valeur du nombre de migrants par classe justifie l'existence d'un flux génique entre les deux populations.

III- 4 - Test de détermination de l'effet de goulot (valeurs obtenues à partir de l'IAM)

Dans treize loci, seul le locus JAM 39 est suspecté de présenter une valeur significative pour l'évidence d'un effet de goulot (*) au niveau des deux populations (tableau n° 11 et 12 de l'annexe II, page VI et VII). Le tableau n° 13 de la même annexe (p. VII) représente des valeurs permettant de vérifier l'excès ou le déficit d'hétérozygotes dans la population de Torotorofotsy. En utilisant un intervalle de confiance de 95%, la probabilité d'excès d'hétérozygote n'est pas significative : ($H_e = 0,16980 > 0,05$). Ce qui emmène à rejeter l'évidence d'un effet de goulot pour cette population.

Pour la population de Mananara-Nord les résultats présentés dans le tableau n° 12 de l'annexe I ne montrent aucune valeur significative de la probabilité P. Pour les deux loci MAD 16 et MAD 282, il n'y a pas de valeurs car ils sont monomorphes. Toujours dans l'annexe I et donnée par le tableau n° 14 (p. iii), la probabilité d'excès d'hétérozygotes (H_e) n'est pas significative. Ceci explique la non évidence d'un effet de goulot dans la population de Mananara-Nord. Ces résultats sont aussi appuyés par les figures n° 27 et 28 (annexe II, p. vi). Généralement, quand $H_o > H_e$ il y a indication d'un récent effet de goulot or d'après ces graphes, il se trouve que la différence entre H_e et H_o fournit beaucoup plus de valeurs positives.

IV - DISCUSSIONS

IV- 1 - Analyse morphométrique

Les résultats obtenus sur les valeurs moyennes du poids et celles de la longueur du corps montrent une différence significative en comparant les cinq individus de même âge des deux populations. En effet, en plus des observations directes, les individus de la population de Mananara-Nord sont plus lourds et montrent une longueur du corps plus élancée par rapport à celle de Torotorofotsy.

Un des plus importants facteurs pouvant influencer la croissance d'un individu est la nourriture. Les deux sites possèdent une variété remarquable d'animaux pouvant servir de proies. D'un côté, la réserve de biosphère de Mananara-Nord abrite six espèces de rongeurs, huit espèces de tenrecidae (Raheriarisena, 2001) et neuf espèces de lémuriens (Pollock J., 1987). De l'autre, les marais de Torotorofotsy renferment entre autres 88 espèces d'oiseaux (Golder Associates Inc., 1998) et pas moins de onze espèces de lémuriens (Conservation breeding specialist group, SSC/IUCN, 2002). Cependant, c'est la taille et la disponibilité des proies qui diffère d'un site à l'autre et qui explique la différence de taille des serpents. Alors que dans les marais de Torotorofotsy où au moins 40 espèces d'amphibiens sont présentes (Golder Associates Inc., 1998), constituant des proies journalières certes faciles mais de très petite taille, dans la réserve de biosphère de Mananara-Nord les proies sont relativement grandes et sont plus adaptées à leurs besoins en nourriture. En outre, les changements de température, d'humidité et de structure d'habitat engendrés par les différences d'altitude entre les deux sites peuvent affecter la morphologie ou la taille de cette espèce. L'étage d'altitude principal aux limites desquelles les changements apparaissent le plus nettement pour diverses espèces animales se situe vers 800 m (Goodman et Wilmé, 2003) d'autant plus que *Sanzinia madagascariensis* se rencontre principalement dans les régions de basses altitudes (Vences et Glaw, 2003). En effet, Torotorofotsy est situé à une altitude plus élevée où la moyenne de température est plus fraîche. Contrairement à ceci, L'emplacement altitudinal de Mananara-Nord offre une condition thermique plus favorable au mécanisme digestif de *Sanzinia madagascariensis*.

Par ailleurs, la forme plus effilée du corps chez les individus de Mananara-Nord peut être expliquée par la plus grande activité des serpents sur les arbres. En effet, contrairement à la végétation des marais de Torotorofotsy où 70 % de la surface du site sont couvertes de prairie

marécageuse, celle de la réserve de biosphère est prédominée par des espèces arborescentes. Ces différentes formes de végétations peuvent avoir des effets sur la morphologie des serpents.

Malgré ces constatations, en réalité avec un échantillon de 10 individus par population, il se trouve très difficile de comparer les niveaux de divergences morphologiques entre les deux populations. Les résultats obtenus ne montrent que des différences morphologiques superficielles qui ne représentent qu'une infime partie des possibilités de différences permises par le stock génétique. L'utilisation des données morphométriques se place alors dans la présente étude comme un complément de l'analyse génétique. Quoi qu'il en soit, ces variables quantitatives constitueront des résultats préliminaires pour les autres études ultérieures utilisant un échantillonnage plus conséquent.

IV- 2 - Classe d'âge et reproduction

D'après les subdivisions de la figure n° 6 et n° 7 de la page 22, l'ensemble des données est divisé en quatre cohortes dont jeunes éclos, jeunes, sub-adultes et adultes. Ces données permettent d'obtenir plus d'exactitudes sur la période de reproduction qui est encore actuellement peu connue. En effet, la présence des jeunes nouvellement éclos (points carrés les plus hauts de la courbe) démontre que l'échantillonnage a été effectué quelques périodes après l'éclosion. Par conséquent, comme la période d'incubation dure six à sept mois (Glaw et Vences, 1994) et que l'échantillonnage est effectué le mois de février et mars, le début de la période de reproduction serait alors situé vers le mois de juillet. Ces observations sont en concordance avec une étude réalisée par Branch et Erasmus (1976) où trois femelles gravides collectées à Perinet (2) (Tamatave) et à Ambanja (1) (Diégo Suarez) en juillet 1974 donnaient naissance respectivement à des serpenteaux le mois de décembre (1974), janvier et mars (1975).

IV- 3 - Déséquilibre de liaison

La création et l'intensité d'un déséquilibre de liaison sont dépendantes des forces évolutives qui ont construit les deux populations (Ytournal, 2008). Cependant, le résultat obtenu reflète le fait qu'il y a non évidence d'associations préférentielles entre allèles de deux loci marqueurs. Comme le déséquilibre de liaison doit être nécessairement causé par une liaison gamétique (Abed, 2008), ce résultat permettrait de dire que les deux populations sont composées

d'individus très peu apparentés pouvant représenter au mieux la variabilité haplotypique existante.

IV- 4 - Equilibre de Hardy Weinberg

Les valeurs de la probabilité P montrent que les deux populations sont typiquement dans la proportion des attentes d'équilibre de Hardy Weinberg. Néanmoins, le fait que ces deux populations soient considérées en équilibre après un test statistique n'implique pas que toutes les conditions d'application de cette loi soient respectées (effectif infini, absence de mutation, absence de sélection...) (Fleury, 1997). C'est à travers cela qu'on a décelé l'absence de certains allèles dans la population de Mananara-Nord (locus MAD 16 et MAD 282) soupçonnant l'existence d'une éventuelle dérive génétique responsable de la disparition aléatoire d'allèles dans une population (Ytournel, 2008). Il se peut ainsi qu'un équilibre génétique instantané apparent soit observé à un moment donné alors que la population en question est soumise à une forte dérive génétique. La seule hypothèse respectée pour ces deux populations est que les croisements se sont fait au hasard. Cependant, la population de Mananara-Nord présente un peu plus de tendance vers cet équilibre par rapport à celle de Torotorofotsy. Ceci pourrait être expliqué théoriquement par l'inexistence d'un croisement apparent entre les individus de différentes générations. La large distribution de cette espèce pourrait également y contribuer.

IV- 5 - Diversité génétique

La quasi-totalité des loci est révélée polymorphe dans les deux populations. Ce résultat indique l'efficacité des loci microsatellites utilisés pour l'analyse de la diversité génétique des populations étudiées. Ces populations présentent toutes une diversité génétique notable. Cependant, malgré la grande similarité observée entre elles, la population de Torotorofotsy semble être plus diverse par rapport à celle de Mananara-Nord. Cette différence de variabilité que montre la population de Torotorofotsy et qui est due à son degré de diversité allélique plus élevé peut être expliquée par son emplacement géographique. En effet, ces marais se trouvent entre 15 à 20 km au Nord-Est de la réserve spéciale d'Analamazaotra et du parc national d'Andasibe-Mantadia. Cette localisation offre à cette population une opportunité d'échange de flux de gènes entre d'autres populations périphériques constituant ainsi une métapopulation. Contrairement à ceci, malgré l'existence de la forêt littorale de Manompana qui se trouve à 80 km au sud de la

réserve de biosphère. La population de Mananara-Nord se trouve pratiquement isolée et a peu de chance pour un éventuel échange de gènes.

IV- 6 - Gènes monomorphes et polymorphes

Les gènes monomorphes n'ont pas de variabilité (Vincent Hubert, 2007). Au niveau des séquences, deux loci (MAD 16 et MAD 282) présentent des gènes polymorphes dans la population de Torotorofotsy alors qu'ils sont monomorphes dans celle de Mananara-Nord. En effet, en comparant cette étude par une analyse faite par Matson en 2000 sur deux genres de boas malagasy (Matson *et al.*, 2000) où dix marqueurs microsatellites étaient tous polymorphes sur 24 individus de *Sanzinia* (12 captifs et 12 sauvages). Ce monomorphisme rencontré dans la population de Mananara-Nord suggère la régression d'une variabilité génétique. La diminution probable de la taille de la population suite au fréquent passage cyclonique et pour d'autres causes d'origine anthropiques pourrait être à l'origine de ce monomorphisme. Toutefois, il n'est pas à écarter l'existence d'une rechute des échanges de flux génétiques liée à la reproduction des individus isolés par des barrières écologiques favorisant la multiplication des mêmes gènes (Barton et Slatkin, 1986).

IV- 7 - Taux d'hétérozygotie

Si le taux d'hétérozygotes observés est inférieur à celui des attendus, il y a une déficience en hétérozygotie (Hedrick, 1992). En analysant l'ensemble des populations, la valeur des hétérozygotes observés est inférieure à celle des hétérozygotes attendus. Ceci s'explique par la plus faible probabilité de dispersion d'un allèle d'une population à l'autre (Slatkin, 1980). Cette diminution du taux d'hétérozygotie peut être liée à l'isolement des populations à cause des barrières naturelles (rivières ; reliefs) ou artificielle (routes ; barrages) ce qui empêchent l'échange des gènes entre les individus. En effet, même si de nouveaux allèles apparaissent par mutation dans une population, leur probabilité de se transmettre dans d'autres populations est relativement faible même s'ils présentent une fréquence élevée dans sa population d'origine. Les deux populations présentent toutes une proportion moyenne en hétérozygotie, signifiant que la différence entre leur diversité génétique n'est pas significativement grande.

IV- 8 - Absence d'allèles et fréquence alléliques

La différence génétique entre les deux populations correspond à la richesse et fréquences alléliques différentes. Par ailleurs, ce qui marque le plus la population de Mananara-Nord, c'est l'absence d'allèles et la forte représentation de l'allèle 1 et 2 (100 %) au niveau des loci MAD 16 et MAD 282. En effet, plus une population est grande moins la fréquence de ses allèles varie alors que dans une petite population l'allèle peut devenir plus fréquent ou même disparaître. De ces valeurs, il est constaté que la taille de la population de Mananara-Nord se trouve relativement petite par rapport à celle de Torotorofotsy et elle présente même la tendance d'une population isolée. En réalité, c'est la fragmentation des habitats qui conduit à l'isolement des populations et à la réduction de leur taille. La réserve de biosphère de Mananara-Nord se trouve parmi le siège de violentes perturbations atmosphériques chroniques (Flash appeal Madagascar, 2008/ Fig. n° 29, annexe VI, p. x). De ces importants réseaux hydrographiques et de la prédominance des roches sédimentaires, en cas de pluies cycloniques les eaux des rivières charrient des charges sédimentaires importantes qui forment de très grandes trouées. La fragmentation commence alors par la formation de ses trouées qui perforent l'habitat. C'est la raison pour laquelle il n'est pas rare de rencontrer dans la réserve de biosphère de Mananara-Nord de fortes pentes et des vallées étroites et profondes bien qu'elle soit une zone de très basse altitude.

En conséquence, cette population est dotée d'une plus faible variabilité génétique et peut avoir un potentiel évolutif limité surtout en cas de conditions environnementales changeantes et hétérogènes. Ceci peut conduire à une augmentation du risque d'extinction locale de cette espèce.

IV- 9 - Flux de gènes et nombre de migrants

Avec les résultats obtenus par la méthode des allèles privés, la valeur de la fréquence moyenne confirme la possibilité d'existence d'un échange de gènes entre ces populations. En effet, avec une distance approximative de 304, 83 km (vol d'oiseau) entre Mananara-Nord et Torotorofotsy une telle migration physique est impossible pour un serpent. Les explications possibles pour ces résultats sont que premièrement, on est en face d'une population continue de *Sanzinia madagascariensis*. Deuxièmement, un facteur a permis de déplacer physiquement les serpents à un autre endroit plus proche de l'un ou l'autre des deux sites et troisièmement, il peut s'agir aussi d'un gène qui n'a jamais évolué au fil du temps. La sous espèce *Sanzinia madagascariensis madagascariensis* (Glaw et Vences, 2007) est localisée uniquement le long de

la côte Est malgache. En effet, lorsqu'une espèce occupe un très large territoire, des différenciations génotypiques ou phénotypiques sont fréquemment observées. Due à une mutation de gènes, cela peut causer une différence locale entre les individus d'une même espèce. Cependant, d'autres études supplémentaires devraient être faites pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

IV- 10 - Données génotypiques

Le monomorphisme observé au niveau des séquences des loci MAD 16 et MAD 282 semble indiquer l'existence d'un effet de goulot dans la population de Mananara-Nord. Or, d'après les résultats obtenus dans le tableau n° 14 (annexe I, p. iii), ce phénomène est rejeté car la probabilité d'excès d'hétérozygote n'est pas significative (He « excess », $0.41553 > 0.05$). Cette perte de la variabilité génétique pourrait être alors due à l'effet fondateur.

En effet, ce dernier se manifeste lorsqu'une population se fragmente et forme des groupes peu nombreux qui sont isolés les uns des autres par des obstacles géographiques qui apparaissent au cours du temps (Goodnight, 1998). Une partie importante de la diversité génétique est perdue lorsque ce phénomène se manifeste et cette perte est souvent liée à l'endogamie suite à cet isolement. C'est le cas des deux loci cités ci-dessus. Pourtant, cette diversité peut parfois se reconstituer ou au moins partiellement. Cet effet fondateur pourrait entraîner aussi une perte de gènes qui se traduit par la faible diversité génétique observée à Mananara-Nord par rapport à la population de Torotorofotsy. Plusieurs phénomènes peuvent être à l'origine de cette manifestation dont les catastrophes naturelles comme les cyclones par exemples. De même, la sécheresse, la prédation pourraient entraîner non seulement une forte mortalité juvénile mais aussi une diminution de la chance à échantillonner les allèles rares. Toutefois, cet isolement peut être aussi à l'origine d'une spéciation allopatrique. Considérant les résultats du séquençage de l'ADN nucléaire avec l'ensemble des données génotypiques, le polymorphisme observé, l'affinité entre la population de Torotorofotsy et Mananara-Nord ainsi que les valeurs de migration entre elles permettraient de dire qu'il s'agit fort probablement d'une seule et même population continue. Ceci parce que du point de vue génétique, les deux populations montrent une grande ressemblance malgré la distance considérable qui existe entre les deux sites. Cependant, cette affirmation reste toujours une simple hypothèse parce que l'étude ne s'est basée que sur 13 loci microsatellites.

IV- 11 - Perspectives sur l'avenir de l'espèce

L'interaction entre le faible transfert de gènes et la destruction continue et illimitée d'habitats peuvent avoir des effets sur la fréquence allélique c'est à dire une diminution de la fréquence de certains allèles (allèles 2 et 3 au niveau des loci MAD 16 et MAD 282) dans la population de Mananara-Nord et en gros sur la diversité génétique. La dominance d'autres allèles dans une population peut conduire à la disparition des allèles rares. De ce fait, il est à craindre de perdre un grand nombre d'individus sous l'effet d'innombrables facteurs calamiteux comme le cyclone entraînant une destruction massive d'habitats. Le monomorphisme exprimé par l'homozygotie peut causer un problème pour la population de Mananara-Nord s'il continue à proliférer car plus loin, quand cette population est homozygote pour beaucoup de ses gènes (généralement fortement consanguine), elle est considérée comme désavantagée et la chance pour ses individus de résister à une maladie est très minime (St Raymond Moynat, 2008). Même indépendamment des maladies, la forte homogénéité génétique d'une population réduit les possibilités de celle-ci à s'adapter à des variations d'environnement.

IV- 12 - Limite de l'étude

Tous les résultats précités ont été estimés à partir des analyses statistiques qui utilisent plusieurs programmes. Ces programmes requièrent un nombre limité d'échantillons rassemblés et ces échantillons ont été considérés être représentatifs d'une population entière. Les résultats de ses analyses ne représentent qu'une première approximation. Cependant, ils montrent la " tendance générale " de la population. Toutefois, d'autres études ultérieures devraient être faites pour confirmer ces résultats.

CONCLUSION

En essayant d'évaluer le degré de différence de diversité génétique entre les deux populations, la présente étude n'a pas tout simplement abouti à une fine comparaison. Elle a aussi apporté d'importantes bases de données moléculaires permettant de consolider les renseignements déjà obtenus afin de voir plus loin d'autres nouvelles stratégies de conservation pour la pérennisation de *Sanzinia madagascariensis*. Malgré cela, les résultats présentés ne constituent qu'une modeste contribution à la caractérisation génétique de cette espèce.

Dix sept marqueurs microsatellites polymorphiques ont été développés pour mesurer la variabilité génétique à l'intérieur de deux populations, quatre loci sont considérés comme nuls car ils présentent des fréquences d'allèles nuls très élevées (le Locus JAM 124, MAD 317, MAD 970 et MAD 989). L'analyse détaillée des fréquences alléliques locus par locus a démontré que la population de Torotorofotsy présente une diversité génétique plus élevée par rapport à celle de Mananara-Nord. Cette diversité qui est souvent fonction de l'état des habitats, s'explique ici par contre par le fait que les marais de Torotorofotsy se trouvent à proximité de deux aires protégées dont la réserve spéciale d'Analamazaotra et le parc national d'Andasibe qui offrent à cette population une opportunité d'échange de flux de gènes entre d'autres populations périphériques et lui redonnent une structure génétique plus diverse par rapport à celle de Mananara-Nord. Il paraît aussi que la migration entre les deux populations est chimérique. Mais résultant de la méthode des allèles privés, la valeur obtenue confirme l'existence d'un échange de gènes entre ces populations sans rejeter l'hypothèse d'une population continue.

Les deux populations ne présentent aucune évidence d'un effet de goulot. La perte de la variabilité allélique au niveau des loci MAD 16 et MAD 282 dans la population de Mananara-Nord est fort probablement liée à une endogamie suite à un effet fondateur.

L'analyse de la diversité génétique des deux populations en question est réalisée purement par le biais des marqueurs d'ADN microsatellites nucléaires. Ainsi, tous les résultats obtenus démontrent en parallèle la grande importance de ces fragments génomiques. Bien que cette diversité ne soit pas tragiquement faible pour les des deux populations, la situation où se trouve *Sanzinia madagascariensis* demeure actuellement préoccupante car de nombreux facteurs dont le cyclone, l'action de l'homme, entre autres la destruction de l'habitat restent toujours des menaces majeures pour cette espèce.

En conséquent, les résultats obtenus représenteront autant d'acquis pour la mise en oeuvre d'un nouveau programme de conservation. En outre, elles pourraient aussi servir de base à des programmes plus conséquents d'études de la diversité génétique de différentes populations.

Au final, plusieurs facteurs dont l'isolement, les cataclysmes naturels et l'histoire évolutive expliquent la structuration génétique actuelle des deux populations de *Sanzinia*. Le maintien de la variation génétique existante au sein d'autres populations constituera une étape importante dans le cadre de la conservation de cette espèce et de ses ressources génétiques.

RECOMMANDATIONS POUR LA CONSERVATION DE L'ESPECE

Même si en ce moment, quelques villageois de certaines régions de Madagascar continuent à croire que trouver ou toucher un boa porte malheur d'où, les fuir est la solution la plus appropriée, d'autres poursuivent l'exploitation de sa chair et de sa peau. D'innombrables mesures de conservation ont été déjà appliquées par les autorités compétentes comme le MNP, le ministère de l'environnement et les différents organismes non gouvernementaux œuvrant sur l'environnement. Pourtant peu d'études ont été réalisées sur la structure génétique des boas en vue d'apporter d'autres meilleures stratégies de conservations pour son avenir. Du point de vue génétique, des exemples pour maintenir la diversité sont suggérés ci après :

- Envisager des réintroductions d'individus dans des sites où la population s'appauvrit en allèles ou même en nombre (dans la présente étude, la population de Mananara-Nord est la plus concernée). Ceci pourrait apporter une diversification génétique d'une population et même apporter d'autres nouveaux allèles rares.
- Les serpents ne souffrent à peu près jamais de carence nutritionnelle, puisque leurs proies contiennent tout ce dont ils ont besoin (si ce dernier est sain) (Bulliot, 2001). Le problème s'observe alors après les cataclysmes naturels sur l'incapacité de résistance des gènes aux maladies bactériennes. Ainsi, il est à recommander de faire de nouvelles études génétiques en sélectionnant les gènes des individus qui ont résisté à un cataclysme afin de comprendre quel matériel biologique rend cette espèce plus résistant sur ces maladies.
- Pour échapper aux prédateurs, les juvéniles après éclosions peuvent être pris en captivité pendant une période définie et relâchés au même endroit lorsqu'ils sont aptes à vivre dans les conditions naturelles. La durée de l'application de cette idée a besoin d'une étude pour ne pas

déranger l'équilibre étho-écologique des animaux réintroduits. Cette activité diminuera l'effet de la sélection naturelle et permette la survie de certains allèles.

Du point de vue physique et habitats :

- Les études concernant les maladies épidémiologiques sur la faune herpétologique après passage d'une catastrophe naturelle sont rares à Madagascar voir inexistant. D'où à ce niveau, voir la faisabilité d'autres études fusionnant la recherche vétérinaire à la conservation. En attendant, il serait intéressant d'effectuer une désinfection adéquate post-cyclonique dans le but de contrôler les colonies parasites responsables de la réduction de la taille de la population de cette espèce, ne serait-ce que pour un minimum de désinfection territoriale.

- Assurer l'intégrité des habitats pour que les boas puissent vivre et se reproduire. Ceci est possible en continuant la sensibilisation des habitants locaux pour pouvoir diminuer les tavy dans ces régions (notamment dans la région de Mananara-Nord). Cette sensibilisation doit être accompagnée d'une installation de pare-feu à l'extérieur et à l'intérieur des forêts.

- Concernant la prédation humaine, envisager des élevages en captivité pour la consommation locale (restaurants), exemple de la « Croc Farm » qui est une société d'élevage de crocodiles située à Ivato.

- Continuer ce genre d'étude dans le but d'apporter de nouvelles perspectives tout en se basant sur la technologie biomoléculaire car nos résultats sont encore insuffisants

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **ABED, D. (2008).** Mémoire de maîtrise en mathématiques. *Tests de déséquilibre de liaison et leur application à un gène candidat à l'hyperactivité.* Université de Québec Montréal, pp. 24.
2. **BARTON, N. H. et SLATKIN, M. (1986).** *A quasi-equilibrium theory of the distribution of the rare alleles in a subdivided population.* Department of Genetics and Biometry, University College, 4 Stephenson Way, London, NW1 2HE, U K. department of zoology, University of California, Berkeley, CA 94720, U.S.A, *Heredity* 56: 409-415.
3. **BRANCH, W. R. AND H. ERASMUS, (1976).** *Reproduction in Madagascar ground and tree boas, Acrantophis madagascariensis and Sanzinia madagascariensis.* Yearbook No.16 pp. 78-80.
4. **BRYGOO, E.R. (1982).** Les ophidiens de Madagascar. *Memorias do instituto Butantan* 46: 19-58.
5. **CONSERVATION BREEDING SPECIALIST GROUP (SSC/IUCN). (2002).** *Evaluation et Plans de Gestion pour la Conservation (CAMP) de la Faune de Madagascar: Lémuriens, Autres mammifères, Reptiles et Amphibiens, Poissons d'eau douce et Evaluation de la Viabilité des Populations et des Habitats de Hypogeomys antimena (Vositse).* CBSG, Apple, Valley, MN.
6. **DIERINGER, D. et SCHLOTTERER, C. (2003).** Microsatellite analyzer (MSA): *A platform independent analysis tool for large microsatellite data sets.* *Molecular Ecology Notes.* Vol. 3, issue 1, pp. 167-169.
DONQUE, G. (1973). *Ebauche de la classification des climats de Madagascar selon les critères de Koppen.* Madagascar Revue de géographie n° 20.
7. **DUMERIL, AMC., BIBRON, G. (1844).** *Erpétologie Générale ou Histoire Naturelle Complète des Reptiles.* Paris, FRA, pp. 549.
8. **DUMETZ, N. (1988).** Mémoire de diplôme d'Etudes Approfondies. *Inventaire botanique et régénération forestière de la réserve naturelle de Mananara-Nord (Madagascar).* Université de Paris VI (Pierre et Marie Curie), Paris (France), pp. 50.
9. **ESTOUP, A., GARNERY, L., SOLIGNAC, M. AND CORNUET, J. M. (1995).** *Microsatellite variation in honey bee (Apis mellifera L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation model/* *Genetics* 140, 679-695.
10. **EWENS, W. J. (1972).** *The sampling theory of selectively neutral alleles.* *Theoretical population biology* 3: 87-112.
11. **FRANKHAM R., BALLOU J. D. et BRISCOE D. A. (2002).** *Introduction to Conservation Genetics.* pp.75-85.
12. **GLAW, F. et VENCES, M. (1994).** *A Field guide to the Amphibian and reptiles of Madagascar,* Frosh Verlag: Cologne, pp. 231 and 326.
13. **GLAW, F. et VENCES, M. (2007).** *A Field guide to the amphibians and reptiles of Madagascar.* Third edition. Cologne, pp. 406.
14. **GOLDER ASSOCIATES Inc. (1998).** *Notification des mesures de gestion environnementale pour le projet d'exploitation d'Ambatovy et Analamay de Phelps Dodge de Madagascar.* Rapport préparé pour Phelps Dodge de Madagascar. ONE, Antananarivo.

15. GOODMAN, M. STEVEN et WILME, L. (2003). Recherches pour le développement, série sciences biologiques numéro 19. *Nouveaux résultats d'inventaires biologiques faisant référence à l'altitude dans la région des massifs montagneux de Marojeje et d'Anjanaharibe-Sud*. pp. 302.
16. GOODNIGHT, C. J. (1998). *Epistasis and the effect of founder events on the additive genetic variance*. *Evolution* 42 : 441-454.
17. GOUDET, J. (1995). FSTAT version 1.2, un programme machine pour calculer des statistiques de F. *Journal de l'hérédité* 86 (6) : 485-486
18. GRAY. (1849). *Catalogue of snakes British. museum*. pp. 98.
19. GUO, S. W. et THOMPSON, E. A. (1992). *Performing the exact test of Hardy Weinberg proportions for multiple alleles*. *Biometrics* 48: 361-372.
20. GRIFFITHS, ATHONY, J.F., MILLER, J. H., SUZUKI, DAVID, LEWONTIN, RICHARD C., GELBART, WILLIAM, M. FREEMAN, W. H. (2000). *An introduction to genetic analysis*. Seventh edition pp. 2.
21. HANNAH, L., RAKOTOSAMIMANANA, B., GANZHORN, J., MITTERMEIER, R. A., OLIVIERI, S., LYER, L., RAJAABELINA, S., HOUGH, J., ANDRIAMIALISOA, F., BOWLES, I. et TIKIN, G. (1998). *Participatory planning, scientific priorities and landscape conservation in Madagascar*. *Environmental conservation*, 25: 30-36
22. HEDRICK, P.W. et MILLER, P. S. (1992). *Conservation génétique. Techniques and fundamentals Ecologicals applications*, 2: 30-46.
23. HEDRICK, P. W. (2005). *Genetics of populations 3rd edition*, Jones and Bartlett, pp 737. Publishers. Sudbury, Massachusetts Arizona State University.
24. HERVIEU, J. (1960). *Notice sur les cartes pédologiques de reconnaissance au 1/200 000*. Feuille N° 33 Brickaville-Moramanga. Publ. I.R.S.M.
25. HILLIS, D. M., MABLE, B. K., LARSON, A., DAVIS, SK. et ZIMMER, EA. (1996). *Nucleic acids IV: Sequencing and cloning*. In : Hillis DM, Moritz C, Zimmer EA (eds) *Molecular systematics*, 2nd Sinauer Associates Inc., Sunderland. pp. 321-381.
26. HOTTIN, G. (29 Mars 1969). *Les terrains cristallins du centre-nord et Nord-est de Madagascar- Pétrographie. structure, stratigraphie*-Thèse, [Andriantefison Razafiniparany, Rapport annuel du service géologique. pp. 93, 1969]
27. LONGMIRE, J. L., GEE, G. F., HARDEKOFF, C. L. et MARK, G. A. (1992). *Establishing paternity in whooping cranes (Grus Americana) by DNA analysis*. *The Auk* 109: 522-529.
28. MARSHALL, TC., SLATE, J., KRUK, L. et PEMBERTON, JM. (1998). *Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations*. *Molecular Ecology* 7(5): 639-655.
29. MATSON, COLE W., WILLIAMSON, J. E., HUEBINGER, RYAN M. et LOUIS E. E. Jr. (2000). *Characterization of polymorphic microsatellite loci from the two endemic genera of Madagascar boids, Acrantophis and Sanzinia*. Department of wildlife and Fisheries Sciences, Texas A & M University, College Station, TX 77843-2258, USA, Center for Conservation and Research, Henry Doorly Zoo, 3701 So.10th St., Omaha, NE 68107-2200, USA.

Références bibliographiques

30. **MERTENS, R. (1972).** *Madagaskars Herpetofauna und die Kontinentaldriefft. Studien uber die Reptilienfauna Madagaskars VI.* – Zoologische Mededelingen, 46: 91-98.
31. **MOXON, RICHARD, E. et CHRISTOFFER, W. (1999).** “DNA Microsatellites: Agents of Evolution”. *Scientific American*. pp. 94-99.
32. **NAMBENA, S. M., RANDRIA, I. et BRAND, J. (2000).** **Mandat d’élaboration du Plan de Gestion de la Réserve de Biosphère de Mananara-Nord.** Rapport succinct du module A1 : Elaboration des cartes de base. MAB-UNESCO & DEC, Antananarivo, multigr., 12 pp + 5 cartes.
33. **NEI, M., T. MARWAMAAN D. R., CHAKRABORTY, (1975).** *The bottleneck effect and genetic variability in populations.* *Evolution* 29: 1-10.
34. **OOSTERHOOT, C.V., HUTCHINSON, W.F., WILLS, D., SHIPLEY, P. (2004).** *Estimating genotyping error software.* *Molecular Ecology Note* 4: 535-538.
35. **OROZCO-TERWENGEL PABLO, ZOLTAN, T., NAGY, DAVID, R. V., VENCES, M., LOUIS E. E. Jr. (2008).** *Phylogeography and phylogenetic relationships of Malagasy tree and ground boas.* *Biological journal of the Linnean Society*, 95, 640-652.
36. **POLLOCK, J. (1987).** *Etat de Conservation et distribution des Lémuriens dans les forêts de l'Est de Madagascar in Priorités en matière de Conservation des espèces à Madagascar.* - in MITTERMEIER et al., 1987, *ibid.*
37. **PROGSCHA, K.H. et LEHMANN, H. D. (1970).** *Angeborene Mißbildungen in einem Wurf von Sanzinia madagascariensis (Reptilia, Boidae).* – *Salamandra*, 6: 108-114.
38. **RAHERIARISENA, M. (2001).** *Inventaire biologique des petits mammifères non volants dans la réserve de Biosphère de Mananara-Nord.* Rapport non publié.
39. **RAKOTONDRAVONY, D., GOODMAN, S.M. et SOARIMALALA , V. (1998).** Predation hapalemur griseus griseus by boa manditra (Boidae) in the littoral forest of eastern Madagascar. *Folia Primatologica (Basel)*, 69: 405-408.
40. **RAMANANA A. MANJAKA, A., CAROLYN, A. BAILEY, GARY, D. SHORE, RAMILJAONA OLGA, RICK, A. BRENNEMAN. LOUIS, E. E. Jr. (2009).** *Characterization of 20 microsatellites marker loci in the Malagasy tree boa (Sanzinia madagascariensis madagascariensis).* pp. 2.
41. **RAMANGALAHY, D. (1990).** *Contribution à l’étude floristique (diversité et structure) de quelques types de « Savoka » de la région de Mananara-Nord [Mémoire de diplôme d’Etudes Approfondies].* Université de Tananarive (Madagascar), pp. 95.
42. **ROUSSET, F. (2002).** *Inbreeding and relatedness coefficients.* *Heredity*, 88 : 371-380.
43. **SALEH DOUNIA. (2008).** Master II Recherche, *Structuration génétique des populations de l’aleurode Bemisia tabaci.* pp. 11. Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, centre international d’études supérieures en sciences agronomiques.
44. **SLATKIN, M. (1980).** *The distribution of mutant alleles in a subdivided population.* *Genetica* 95, pp. 503–524.
45. **SLATKIN, M. (1995).** *A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies.* *Genetics*. 139: pp. 457-462.

46. SAINT RAYMOND, MOYNAT J., DELPHIN, DENISE et DELPHINE. (2008). Thèse pour le doctorat vétérinaire, *Les affections cutanées des reptiles*. Faculté de médecine de Créteil, pp. 25.
47. VANDERSTYLEN DAVID. (2004). Thèse pour le doctorat vétérinaire. *Anatomie descriptive et topographique des Boïdés*. Faculté de Médecine de Créteil, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, pp. 58-59.
48. VENCES, M., GLAW, F. (2003). *Phylogéographie, systématiques and conservation status of boid snakes from Madagascar* (Sanzinia and Acrantophis). *Salamandra* 39 (3/4): pp. 181-206.
49. VENCES, M., GLAW, F., JOACHIM KOSUCH, WOLFGANG, BOHME, et MICHAEL VEITH. (2001)(4). Phylogeny of South American and Malagasy Boinae Snakes: *Molecular Evidence for the Validity of Sanzinia and Acrantophis and Biogeographic Implications*. *Journal Copeia*, pp. 1151-1154.
50. VINCENT-HUBERT, F. (2007). *Diversité génétique et adaptation des espèces aquatiques en milieu anthropique*. pp. 15, R.INT.DCN-BE-EX/2007.01/Nantes.
51. WEIR, B. S. et COCKERHAM, C.C. (1984). *Estimating F-Statistics for the analysis of Population structure*. *Evolution*. 38: 1358-1370.
52. YTOURNEL, FLORENCE. (2008). Thèse pour obtenir le grade de docteur d'Agro Paris Tech, discipline : génétique animale. *Déséquilibre de liaison et cartographie de QTL en population sélectionnée*, pp. 221.
53. ZIMMERMANN, H. (1999). *Etude préliminaire des forêts et marais de Torotorofotsy à Andasibe*. Rapport soumis au Ministère des eaux et forêts.

Autres sources d'Informations

Webographie :

1. www.ramsar.org / www.iucn.org
2. FLASH APPEAL MADAGASCAR. (2008). In consolidated Appeals Process (CAP), United Nations, www.humanitarianappeal.net
3. FLEURY, F. (1997). Génétique des populations plus rubrique cours, chapitre 2 : *la variabilité génétique dans les populations naturelles, polymorphisme des protéines* : <http://gen-net-pop.univ-lyon1.fr/> Centre National de la Promotion Rurale, Marmillat, BP 100, 63370 Lempdes.
4. UICN. (2006). *Liste rouge des espèces menacées de l'UICN*, www.iucn.org: Union International pour la Conservation de la Nature.

Convention :

1. RAMSAR, Iran (1971). *Convention relative aux zones humides d'importance internationale, particulièrement comme habitats des oiseaux d'eau*. pp. 4-9.

ANNEXE

ANNEXE I

Torotorofotsy

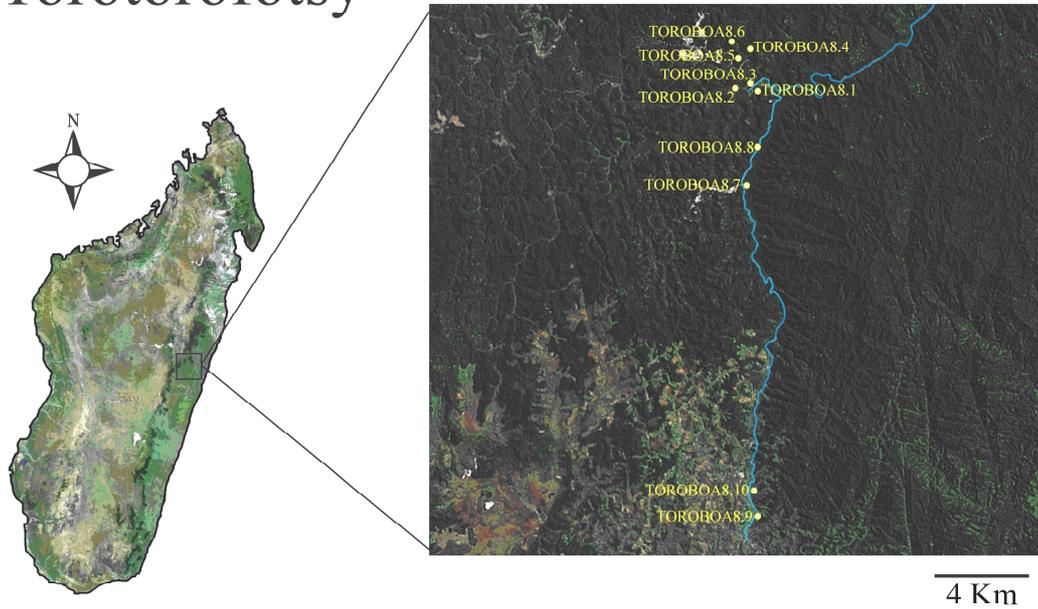


Figure n° 23 : Carte de localisation du site d'étude de Torotorofotsy
(Lisa Kimmel, Omaha / NE, 2008)

Mananara-Nord

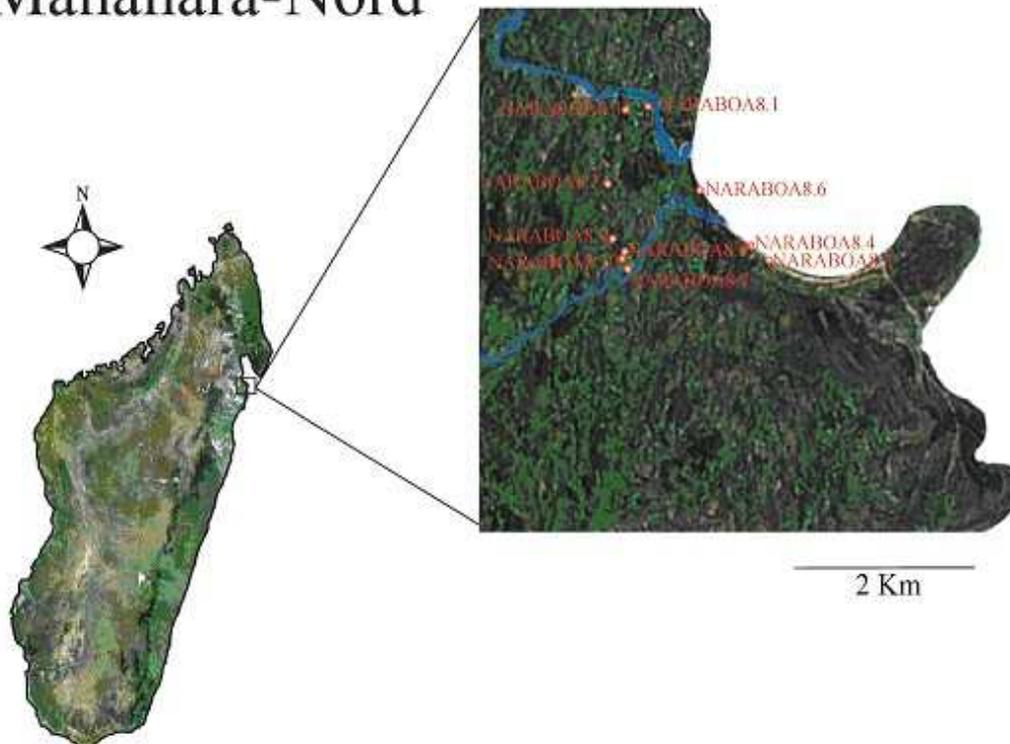
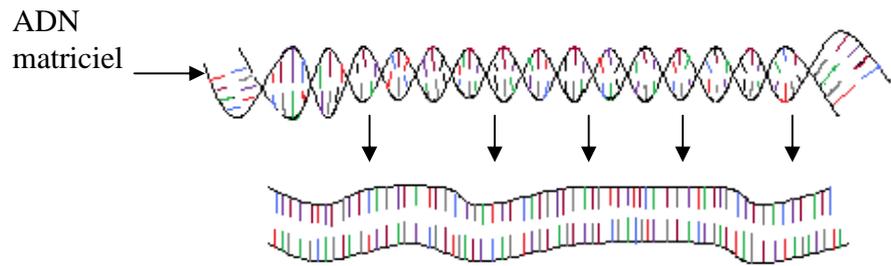


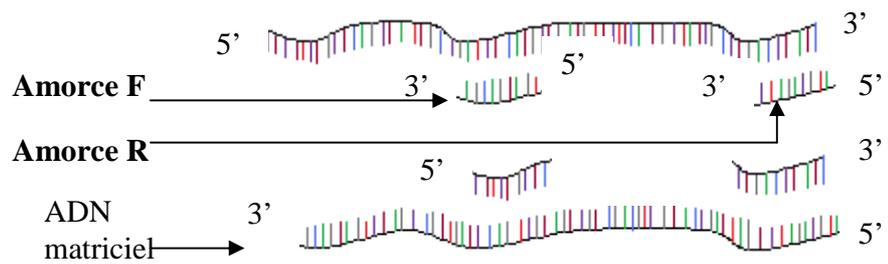
Figure n° 24 : Carte de localisation du site d'étude de Mananara-Nord
(Lisa Kimmel, Omaha / NE, 2008)

II

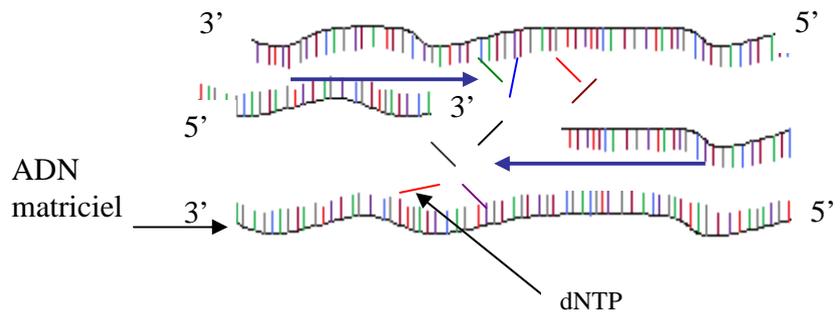
**ÉTAPE N° 1 :
DÉNATURATION**



**ÉTAPE N° 2 :
HYBRIDATION**



**ÉTAPE N° 3 :
ÉLONGATION**



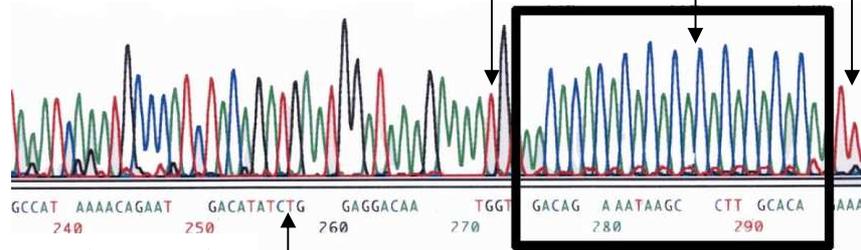
 : Sens d'elongation

Figure n° 25 : Illustration schématique d'une amplification par PCR

III

Pic rouge standard

Pic bleu: produits d'amplification



Base correspondante au pic

Microsatellite

Figure n° 26 : Electrophorogramme d'une séquence d'ADN microsatellite

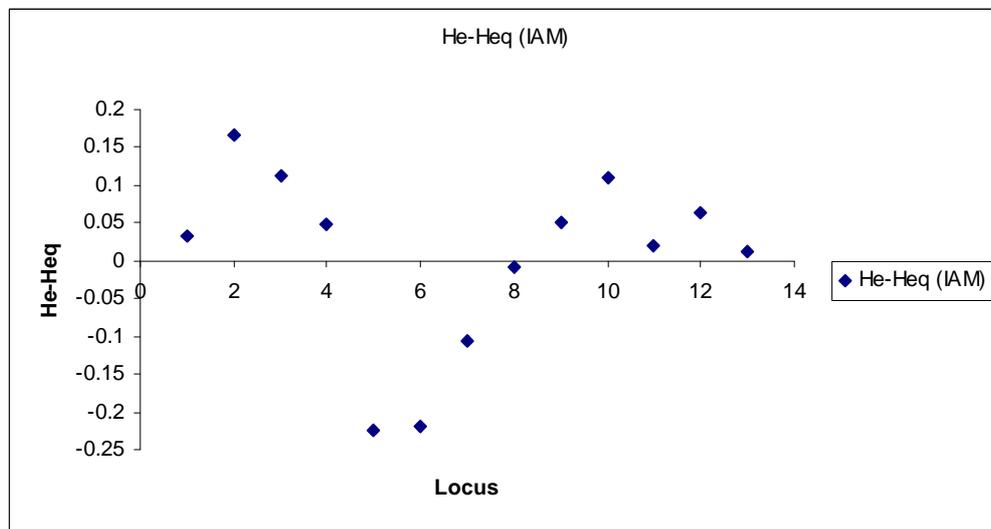


Figure n° 27 : He – Ho pour chaque locus (population de Torotorofotsy)

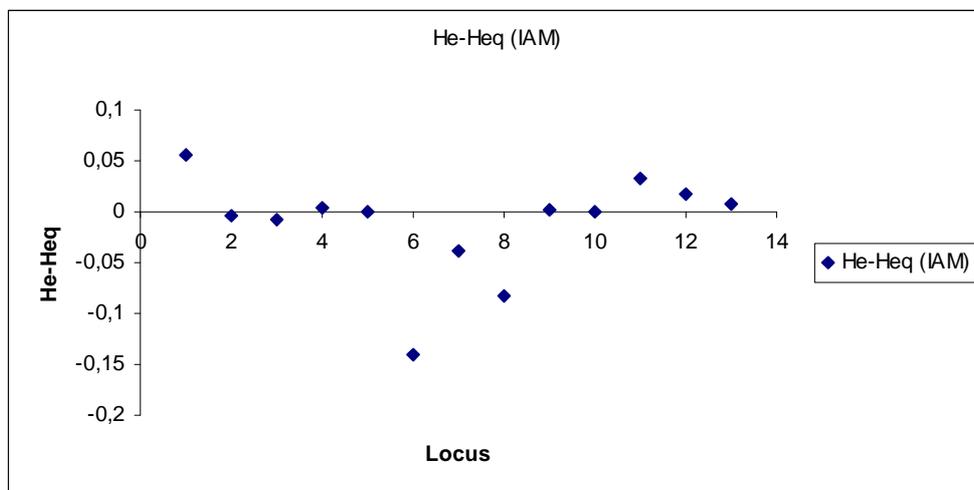


Figure n° 28 : He – Ho pour chaque locus (population de Mananara Nord)

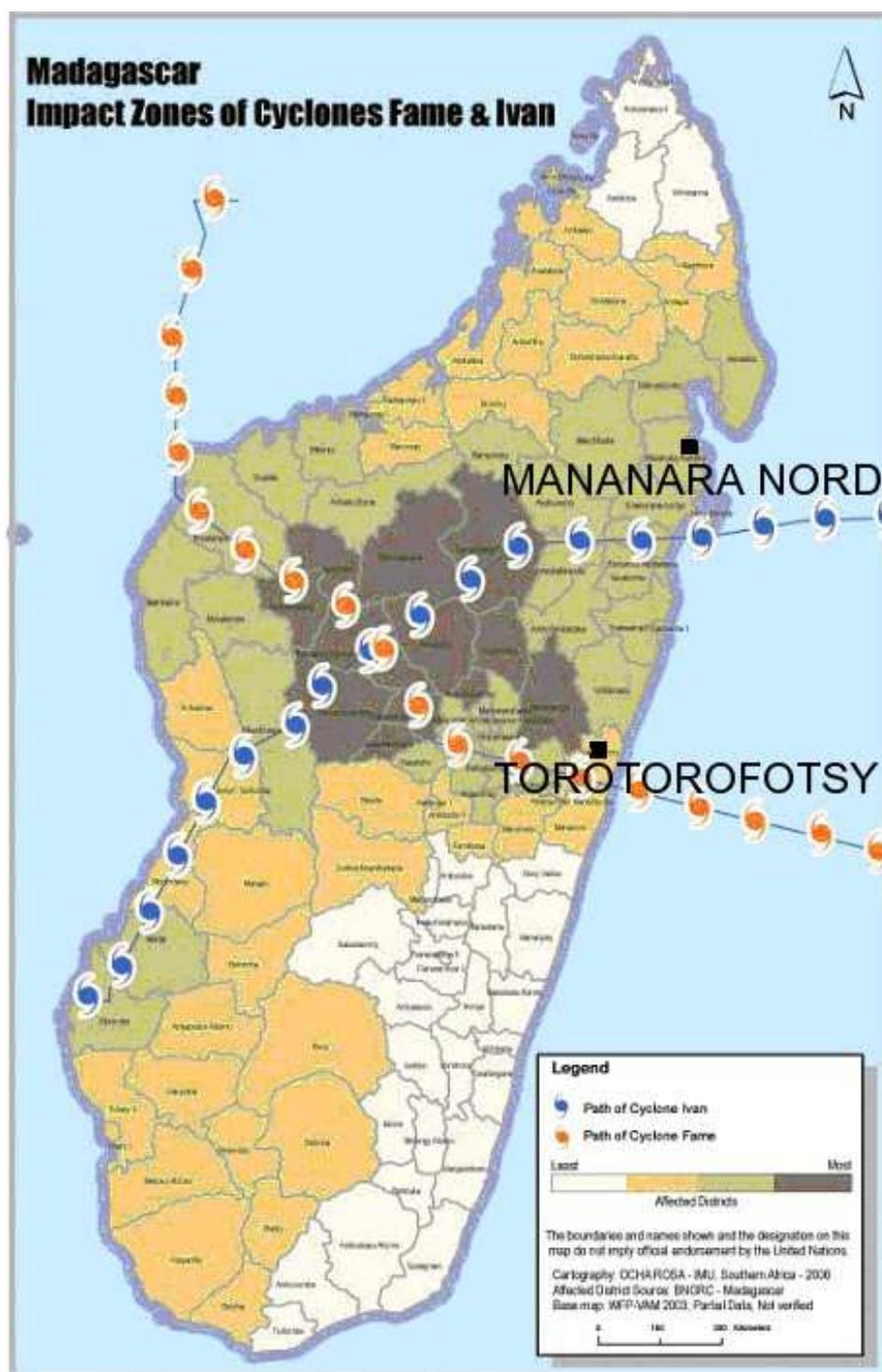


Figure n° 29 : Principales zones d'impacts des cyclones FAME et IVAN en février 2008
(Photo extraite du document Flash appeal Madagascar, 2008)

ANNEXE II

Tableau n° 8 : Récapitulatif des solutions utilisées ainsi que leur volume respectif au cours des différentes étapes d'extraction d'ADN

Etapes d'extraction	Nature de la réaction	Composants de la solution	Volumes utilisés (µl)
DIGESTION DES PROTÉINES	Enzymatique	Solution tampon TE (10 mM/ 1 mM), pH : 7, 5	500
		Proteinase-K (10%)	25
		SDS (20%)	25
ÉPURATION DE L'ADN	-	Phenyl Chloroform Isoamyl (PCI) (50%/ 50%/ 1% ; v/v)	500
	-	Chloroforme (min. 99%)	500
	Précipitation	NaOAc 3M	50
		Isopropanol 100%	1250
		EtOH 70%	500
	-	Tris (0,1 M, pH 7, 5)	50

Tableau n° 9 : Estimation de la fréquence des allèles nuls
(Résultats à partir du programme Cervus)

LOCI	FREQUENCES DES NULS ALLELES
SANZ 56	+0, 0307
SANZ 11	-0, 1259
JAM 39	+0, 0143
JAM 124	+0, 3251* > 0,1
JAM 145	-0, 0651
MAD 16	-0, 0442
MAD 51	+0, 0176
MAD 119	+0, 0091
MAD 229	-0, 0595
MAD 251	-0, 0193
MAD 282	-0, 0620
MAD 290	+0, 0429
MAD 316	+0, 0228
MAD 317	+0, 3761* > 0,1
MAD 369	+0, 0772
MAD 970	0, 1488* > 0,1
MAD 989	0, 1572* > 0,1

NB : La valeur d'une fréquence négative est comparable à zéro.

Tableau n° 10: Détails des valeurs du coefficient de consanguinité (FIS) par locus pour chaque population.

LOCI	TOROTOROFOTSY	MANANARA-NORD
SANZ56	0, 024	0, 106
SANZ11	-0, 385	-0, 125
JAM39	0, 308	-0, 224
JAM145	-0, 295	0
MAD16	-0, 108	0
MAD51	0, 463	-0, 154
MAD119	0, 446	-0, 216
MAD229	-0, 125	-0, 059
MAD251	-0, 019	-0, 013
MAD282	-0, 286	0
MAD290	0	0, 196
MAD316	0, 053	0, 080
MAD369	0, 182	0, 177
FIS	0, 031	0, 008

Tableau n° 11 : Résultats de recherche du phénomène d'effet de goulot dans la population de Torotorofotsy (IAM)

TOROTOROFOTSY				
LOCI	He	Ho	E.S.	Prob : P
SANZ56	0, 921	0, 888	0, 032	0, 111
SANZ11	0, 442	0, 275	0, 156	0, 261
JAM39	0, 853	0, 741	0, 08	0, 014*
JAM145	0, 784	0, 736	0, 081	0, 341
MAD16	0, 363	0, 587	0, 125	0, 113
MAD51	0, 363	0, 583	0, 127	0, 121
MAD119	0, 353	0, 458	0, 150	0, 304
MAD229	0, 268	0, 276	0, 153	0, 539
MAD251	0, 884	0, 832	0, 050	0, 123
MAD282	0, 395	0, 284	0, 155	0, 361
MAD290	0, 600	0, 580	0, 126	0, 489
MAD316	0, 737	0, 673	0, 105	0, 338
MAD369	0, 968	0, 956	0, 013	0, 134

Effet de goulot (*) < 0, 05

VII

Tableau n° 12 : Résultats de recherche du phénomène d'effet de goulot dans la population de Mananara-nord (IAM)

MANANARA-NORD				
LOCI	He	Ho	E.S.	Prob : P
SANZ56	0, 889	0, 834	0, 048	0, 052
SANZ11	0, 268	0, 272	0, 154	0, 536
JAM39	0, 826	0, 833	0, 050	0, 383
JAM145	0, 8	0, 796	0, 061	0, 455
MAD16	0	-	-	-
MAD51	0, 437	0, 578	0, 126	0, 191
MAD119	0, 416	0, 454	0, 147	0, 391
MAD229	0, 189	0, 271	0, 156	0, 492
MAD251	0, 889	0, 888	0, 033	0, 443
MAD282	0	-	-	-
MAD290	0, 616	0, 584	0, 125	0, 492
MAD316	0, 758	0, 740	0, 082	0, 542
MAD369	0, 963	0, 956	0, 013	0, 372

Tableau n° 13 : Probabilité d'excès et de déficit d'hétérozygotes dans la population de Torotorofotsy

Modèles	Probabilité de déficit d'hétérozygotes	Probabilité d'excès d'hétérozygotes
IAM	0, 84729	0, 16980 > 0.05

Tableau n° 14 : Probabilité d'excès et de déficit d'hétérozygotes dans la population de Mananara-nord

Modèles	Probabilité de déficit d'hétérozygotes	Probabilité d'excès d'hétérozygotes
IAM	0, 61768	0, 41553 > 0.05

VIII

Tableau n° 15 : Données détaillées des mesures morphométriques et bases de données bioécologiques des individus capturés

NOM SCIENTIFIQUE	DATE	PHOTOS	SITES	POIDS en g	TTL en cm	Altitude	Latitude	Longitude	SEXE	SVL en cm	TL en cm	biopsie
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	2/14/2008	DSC_0003.JPG 14:10	Mananara-nord	1410	147	25 mètres	S 16°25'01.5"	E049°49'21.7"	femelle	133	14	0.2cc
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	2/17/2008	DSC_0007.JPG 14:48	Mananara-nord	1480	154	28 mètres	S 16°25'31.1"	E049°50'05.9"	mâle	136	18	0.2cc
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	2/17/2008	DSC_0008.JPG 17:11	Mananara-nord	1900	154	30 mètres	S 16°25'03.6"	E049°49'12.4"	mâle	139	15	0.2cc
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	2/20/2008	DSC_0015.JPG 09:40	Mananara-nord	1660	156	27 mètres	S 16°25'58.1"	E049°50'11.0"	mâle	139	17	0.2cc
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	2/20/2008	DSC_0024.JPG 10:12	Mananara-nord	1090	136	7 mètres	S 16°25'53.1"	E049°50'03.9"	Juvenile mâle	122	14	0.2cc
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	2/20/2008	DSC_0025.JPG 10:26	Mananara-nord	1000	134	12 mètres	S 16°25'32.5"	E049°49'43.6"	femelle	121	13	0.2cc
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	2/20/2008	DSC_0027.JPG 10:38	Mananara-nord	1400	137	28 mètres	S 16°25'02.8"	E049°49'14.6"	femelle	124	13	0.2cc
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	2/21/2008	DSC_0062.JPG 09:52	Mananara-nord	1770	168	25 mètres	S 16°25'56.1"	E049°49'13.0"	mâle	153	15	0.2cc
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	2/21/2008	DSC_0047.JPG 09:27	Mananara-nord	500	107	6 mètres	S 16°25'51.1"	E049°50'07.9"	Juvenile mâle	96	11	0.2cc
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	2/21/2008	DSC_0059.JPG 09:44	Mananara-nord	1500	153	14 mètres	S 16°25'58.1"	E049°49'11.9"	mâle	138	15	0.2cc
POIDS MOYENNES				1371	144,6	TAILLE MOYENNE						
NOM SCIENTIFIQUE	DATE	PHOTOS	SITES	POIDS en g	TTL en cm	Altitude	Latitude	Longitude	SEXE	SVL en cm	TL en cm	biopsie
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	7/2/2008	DSC_0007.JPG 18:16	Torotorofotsy	250	94	996 mètres	S 18°46'13.3"	E048°25'41.6"	Juvenile mâle	84	10	0.2cc
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	7/2/2008	DSC_0005.JPG 18:16	Torotorofotsy	1550	152	952 mètres	S 18°46'10.2"	E048°25'21.8"	mâle	138	14	0.2cc
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	8/2/2008	DSC_0048.JPG 16:25	Torotorofotsy	100	64	936 mètres	S 18°46'06.3"	E048°25'34.9"	Juvenile femelle	58	6	0.2cc
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	9/2/2008	DSC_0082.JPG 18:19	Torotorofotsy	1990	144	952 mètres	S 18°45'37.2"	E048°25'35.4"	femelle	130	14	0.2cc
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	9/2/2008	DSC_0076.JPG 17:56	Torotorofotsy	2950	141	950 mètres	S 18°45'35.0"	E048°25'23.1"	femelle	125	16	0.2cc
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	9/2/2008	DSC_0083.JPG 18:40	Torotorofotsy	1120	125	987 mètres	S 18°45'30.5"	E048°25'18.7"	femelle	114	11	0.2cc
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	1/3/2008	CIMG0004.JPG 22:59	Torotorofotsy	1200	143	899 mètres	S 18°47'27.4"	E048°25'29.6"	femelle	130	13	0.2cc
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	5/3/2008	CIMG0009.JPG 16:27	Torotorofotsy	2000	144.5	893 mètres	S 18°47'00.6"	E048°25'40.6"	mâle	130	14.5	0.2cc
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	5/3/2008	CIMG0011.JPG 16:40	Torotorofotsy	1200	122	949 mètres	S 18°52'20.7"	E048°25'35.8"	femelle	110	12	0.2cc
<i>Sanzinia madagascariensis m.</i>	5/3/2008	CIMG0016.JPG 16:41	Torotorofotsy	900	113	946 mètres	S 18°51'58.8"	E048°25'32.9"	mâle	100	13	0.2cc
POIDS MOYENNES				1326	124,2	TAILLE MOYENNE						

Tableau n° 16 : Résultats génotypiques par locus et par population avec les températures optimales de fixation

Individus	Location	SANZ56 56°C	SANZ11 58°C	JAM39 58°C	JAM145 60°C	MAD16 60°C	MAD51 60°C	MAD119 54°C	MAD229 54°C	MAD251 50°C	MAD282 54°C	MAD290 56°C	MAD316 60°C	MAD369 54°C
TOROBOA8.1	Torotorofotsy	308316	188190	160160	126132	221225	190190	153153	239239	158166	155157	228228	124126	169193
TOROBOA8.2	Torotorofotsy	312330	188188	154160	124142	221221	190190	153153	239239	190202	155157	232232	126132	175195
TOROBOA8.3	Torotorofotsy	310312	188190	154162	124126	221221	190190	153153	239239	158202	155155	232232	126132	159181
TOROBOA8.4	Torotorofotsy	306310	188188	162164	124134	221221	190190	155155	239243	154190	155157	228230	128130	163163
TOROBOA8.5	Torotorofotsy	312314	188190	158162	124134	219221	190190	153153	239243	152190	155155	228232	124124	175183
TOROBOA8.6	Torotorofotsy	294320	188190	154154	124128	221221	190194	153153	239239	158174	155157	228232	126132	145177
TOROBOA8.7	Torotorofotsy	318320	188190	156156	124132	221223	190212	153153	239243	152158	155155	228232	124124	165195
TOROBOA8.8	Torotorofotsy	310310	188188	158164	124126	221221	198198	153153	239239	168202	155155	232232	124128	189189
TOROBOA8.9	Torotorofotsy	306308	188188	154154	126128	219221	190190	153155	239239	152158	155157	228232	124126	181215
TOROBOA8.10	Torotorofotsy	308314	188190	156158	124126	221221	190190	151153	239239	154154	155155	232234	124124	159207
NARABOA8.1	Mananara-Nord	310324	188188	156166	124124	221221	190198	153153	239239	154170	155155	232236	124130	175187
NARABOA8.2	Mananara-Nord	314324	188188	150160	122130	221221	190190	153155	239239	152198	155155	228236	126138	163169
NARABOA8.3	Mananara-Nord	302302	188190	150154	122130	221221	190202	153153	239239	152158	155155	228228	124132	163175
NARABOA8.4	Mananara-Nord	304314	188188	154156	120124	221221	190194	153153	239239	156174	155155	232234	124132	179193
NARABOA8.5	Mananara-Nord	304304	188190	158164	120128	221221	190194	153155	239239	186214	155155	232234	124124	199199
NARABOA8.6	Mananara-Nord	304322	188190	154156	122124	221221	190190	153153	239241	152196	155155	232232	126126	165165
NARABOA8.7	Mananara-Nord	308314	188188	156170	122126	221221	190190	153153	239239	152170	155155	232232	124138	155181
NARABOA8.8	Mananara-Nord	302310	188188	154156	124124	221221	190190	151153	239239	154154	155155	232232	124128	145197
NARABOA8.9	Mananara-Nord	324330	188188	156164	122132	221221	190198	153155	239239	152158	155155	232236	124124	175191
NARABOA8.10	Mananara-Nord	302310	188188	154156	122124	221221	190190	153155	239241	152156	155155	232232	126132	155177

X

Tableau n° 17 : Concentration finale des composants de la solution de Longmire

Composants de la solution mère	Concentration finale pour 1 litre de solution
Tris 0,1 M	12, 11g
Na ₂ EDTA 0,1M	37, 22g
SDS 2%	20g

Tableau n° 18 : Produits utilisés et leurs différentes concentrations lors d'une PCR

Produits (µl)	Volume utilisé (µl)	Concentration initiale	Concentration finale
ADN matriciel	1, 0	50ng/ml	2ng/ml
Amorce (F)	0,2	10ng/ml	0, 4ng/ml
Amorce (R)	0, 2	10ng/ml	0, 4ng/ml
Eau distillée	19, 2	-	-
MgCl ₂	1, 5	25mM	1mM
Désoxyribonucléotide Triphosphate (dNTP)	0, 2	-	-
Taq-buffer (pH=8)	2, 5	0, 5M	0, 5M
Taq-polymérase (Enzyme)	0, 2	500 U.I./µl	5 U.I./µl
Volume total	25	-	-

Données Climatiques de la région de Mananara-nord

Tableau n° 19 : Normale de Précipitation (en mm et 1/10 arrondie)

Tableau n° 20 : Normale de Température en °C et 1/10 arrondie

MOIS	Janvier	Fevrier	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Aout	Sept	Oct	Nov	Dec
Normales de précipitation	293.1	288.4	339.3	208.8	192.1	182.1	193.9	213.4	105.4	96.5	146.6	238.6
Nbr de jour	17.8	16.3	17.0	15.4	16.5	16.7	20.8	21.2	16.1	15.9	12.7	16.0
Max de 24h	141.5	185.0	194.4	122.6	241.2	103.9	142.1	114.6	47.9	72.2	149.3	190.9
Date	21/1960	18/60	14/65	23/29	24/52	26/66	31/58	22/51	21/52	30/67	04/68	29/53

MOIS	Janv	Fev	Mars	Avril	Mai	Juin	Juill	août	Sept	Oct.	Nov.	Dec
Normale TN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TM Absolue	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNA	16.0/ 63	19.7/ 63	15.5/ 61	17.6/8	15.5/6	15.5/6	14.1/9	14.0/6	13.6/9	11.0/6	17.4/9	19.1/6
TXA	34.8/ 63	34.0/ 61	33.5/ 61	32.2/6	31.5/6	28.8/9	29.5/6	29.2/9	29.5/9	31.4/9	31.0/9	33.9/6

(Données des normales climatologiques obtenues auprès de la station météorologique d' Ampandrianomby, Sept. 2009)

Données Climatiques de la région de TOROTOROFOTSY

Tableau n° 21 : Normale de Précipitation (en mm et 1/10 arrondi)

MOIS	Janvier	Fevrier	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Aout	Sept	Oct	Nov	Dec
Normales de précipitation	342.6	296.8	261.7	95.9	51.3	66.5	99.7	99.0	44.5	62.5	118.5	250.8
Nbr de jour	20.5	19.2	21.5	16.6	15.3	15.6	19.6	19.3	12.6	12.9	14.8	19.6
Max de 24h	247.5	285.7	292.7	227.0	38.6	50.7	40.3	63.0	47.8	46.6	66.9	117.6
Date	15/1988	13/72	15/86	7/70	4/75	24/83	10/88	30/67	21/82	16/63	30/89	16/63

Tableau n° 22 : Normale de Température en °C et 1/10

MOIS	Janv	Fev	Mars	Avril	Mai	Juin	Juille	août	Sept	Oct.	Nov.	Dec
Normale TN	16.0	16.2	15.9	14.7	12.8	10.6	10.2	10.1	10.6	12.4	14.2	15.7
TX	26.1	26.2	25.3	24.6	22.6	20.7	19.5	19.9	21.5	23.6	25.0	25.9
TM Absolue	21.1	21.2	20.6	19.7	17.7	15.7	14.9	15.0	16.1	18.0	19.6	20.8
TNA	11.3/8 5	11.5/ 78	9.5/7 8	8.5/76	3.9/7 4	00.2/ 74	02.4/7 4	3.4/64	3.9/7 2	5.0/8 9	6.9/66	9.0/8 5
TXA	33.0/8 8	32.1/ 69	32.0/ 89	31.0/6 1	31.2/ 61	28.0/ 77	29.0/7 7	28.5/7 7	31.0/ 88	31.0/ 78	33.0/8 0	32.1/ 72

(Données des normales climatologiques obtenues auprès de la station météorologique d' Ampandrianomby, Sept. 2009)