



**Rapport d'activité concernant le projet de recherche
Biologie et génétique des populations du Pigeon à couronne blanche,
Patagioenas leucocephala : applications à la gestion et la conservation
de l'espèce**



Cambrone Christopher^{1,2,3}, Etienne Bezault^{1,3}, Frank Cézilly^{2,3}

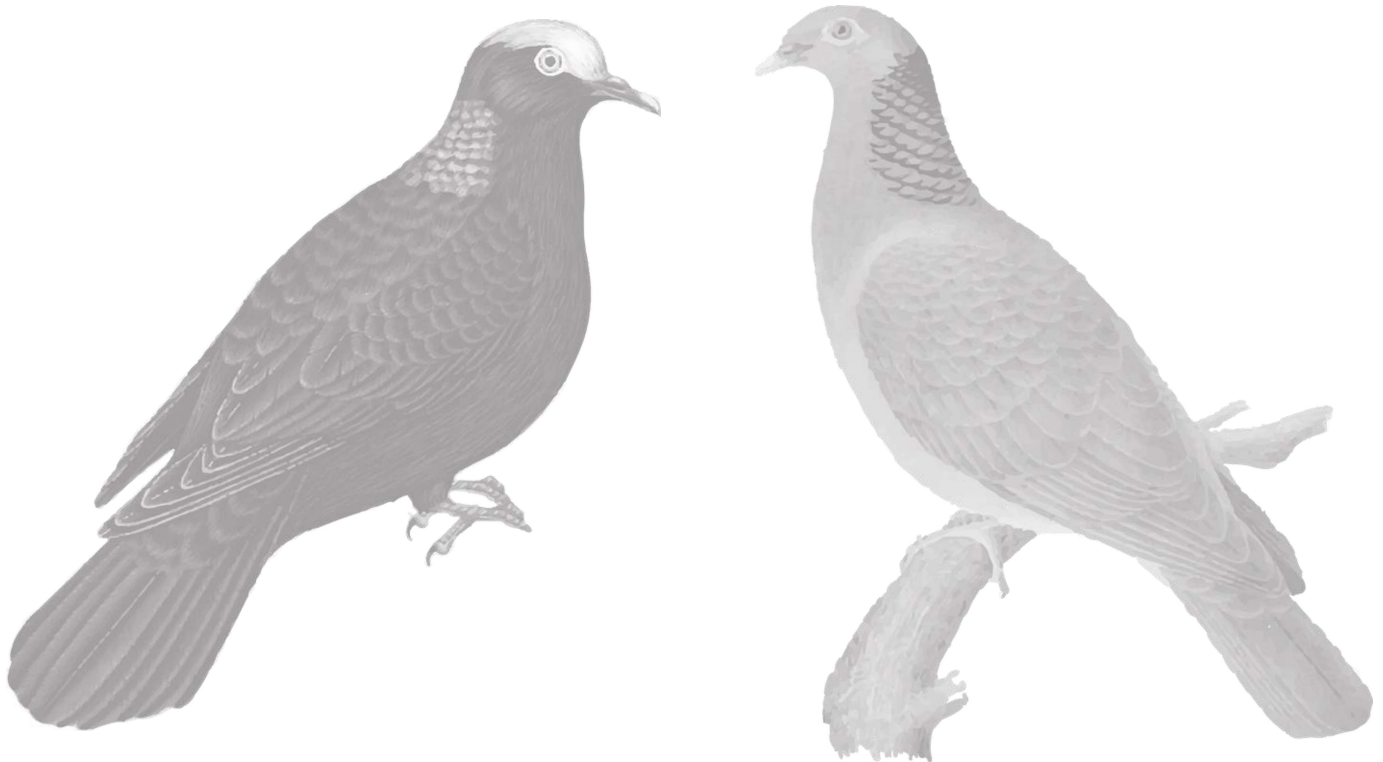
¹ UMR 7208 BOREA, Université des Antilles

² UMR 6282 Biogéosciences, Université de Bourgogne-Franche Comté

³ Caribaea Initiative

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	2
I. Comparaison des deux méthodes de détection et utilisation de l'habitat (En cours de rédaction pour publication scientifique - Cambrone C., Bezault E., Cézilly F.).....	4
II. Analyse de la structure et de la diversité génétique (Travaux en cours - Cambrone C., Cézilly F., Eraud C., Lambourdière J., Wattier R., , Bezault E.)	8
III. Utilisation de l'ADN nucléaire pour analyser la structure génétique du Pigeon à couronne blanche (Travaux en cours - Cambrone C., Cézilly F., Lambourdière J., Bezault E.)	12
IV. Suivi par satellite des déplacements du Pigeon à couronne blanche dans la Caraïbe (Travaux en cours - Cambrone C., Bezault E., Motreuil S., Eraud C., Cézilly F.)	13
V. Conclusion et perspectives	28
Références bibliographiques	30



Préambule

La DEAL Guadeloupe, la Fédération départementale des chasseurs de Guadeloupe, l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage et Caribaea Initiative ont conclu un accord de partenariat visant à développer les recherches scientifiques sur une espèce de *Columbidae* à valeur patrimoniale et cynégétique, le Pigeon à couronne blanche, *Patagioenas leucocephala*, dans le cadre d'un projet de thèse de Doctorat. Ce rapport présente les avancées de ce dernier. Nous y ajoutons des résultats obtenus, de manière indépendante aux financements octroyés par lesdits financeurs, sur une espèce sœur de celle ciblée par ce projet de recherche, le Pigeon à cou rouge, *P. squamosa*. Ils apportent en effet des informations sur l'abondance relative en Guadeloupe, la diversité et la structure génétique des populations de cette espèce, permettant à terme une comparaison avec les résultats qui seront issus de l'analyse génétique des populations du Pigeon à couronne blanche. Ces deux espèces, proches phylogénétiquement, biologiquement et écologiquement, sont soumises aux mêmes menaces, en particulier la pression de chasse et la perte de leurs habitats naturels.

A ce jour, un article scientifique intitulé « Levels of genetic differentiation and gene flow between four populations of the SCALY-NAPED PIGEON, *Patagioenas squamosa*: implications for conservation » a été soumis à la revue scientifique internationale à comité de lecture « *JOURNAL OF ORNITHOLOGY* ». Un second article visant à comparer deux méthodes de détection et à analyser l'utilisation d'habitat du Pigeon à couronne blanche et le Pigeon à cou rouge est en cours de rédaction. Les analyses génétiques des populations de Pigeon à couronne blanche présentées dans ce présent rapport seront complétées prochainement par des échantillons génétiques provenant d'autres îles de la Caraïbe et par d'autres approches génétiques. Enfin, ce rapport présente aussi les travaux de terrain effectués cette année concernant le suivi par satellite des pigeons à couronne blanche.

INTRODUCTION

Le suivi des populations d'espèces à valeur cynégétique est crucial afin de déterminer leur évolution et de détecter, le cas échéant, un déclin significatif de la population. Ces suivis permettent ainsi de proposer des plans de gestion adaptés. Afin de pérenniser la ressource, la taille de population est l'un des principaux déterminants du risque d'extinction (Reed and Frankham 2003). Parallèlement, une étude sur la structure et la diversité génétique d'une population permet d'évaluer plus précisément son risque d'extinction (Frankham 2005). Une perte de diversité génétique induit généralement une réduction, sur le long-terme, de la capacité d'adaptation en réponse aux changements environnementaux, et, par là même, une augmentation de la probabilité d'extinction (Reed and Frankham 2003; Spielman et al. 2004).

Le Pigeon à couronne blanche, *Patagioenas leucocephala*, et le Pigeon à cou rouge, *P. squamosa*, sont des espèces à forte valeur cynégétique et patrimoniale, endémiques respectivement de la partie Nord du Bassin Caribéen et de la Caraïbe insulaire (Figure 1). Le Pigeon à couronne blanche utilise la mangrove et la forêt marécageuse comme habitat de reproduction, mais s'alimente aussi dans les forêts de feuillus situées plus à l'intérieur des terres, alors que le Pigeon à cou rouge fréquente, dans son aire de répartition naturelle, exclusivement les forêts tropicales. Frugivore, ces espèces consomment des fruits de différentes espèces d'arbres. Elles jouent ainsi un rôle important dans la dissémination des graines, participant à la régénération des communautés d'arbres tropicaux caribéens (Strong and Bancroft 1994; Ware 1997; Strong and Johnson 2001). Le caractère erratique et la capacité de vol de ces espèces (150 km sans repos pour le Pigeon à couronne blanche ;

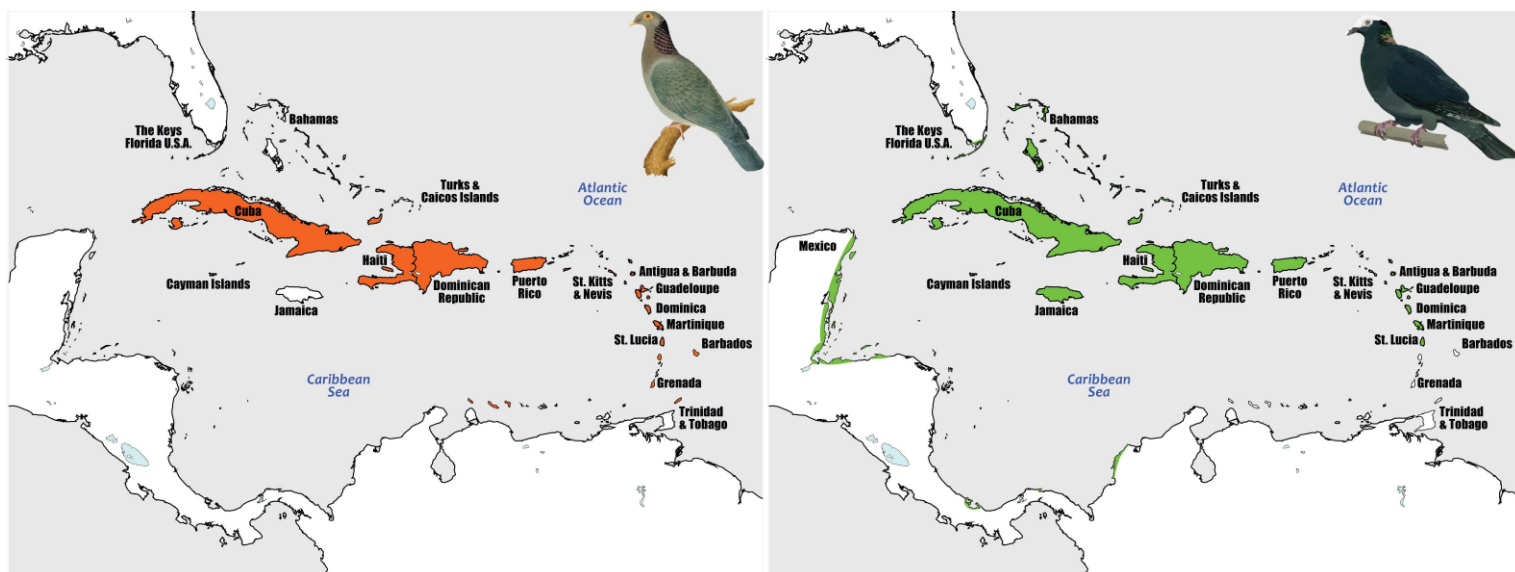


Figure 1: Aire de répartition du Pigeon à cou rouge sur la carte de gauche et du Pigeon à couronne blanche sur la carte de droite

(Bancroft et al. 2000; Bancroft and Bowman 2001) favorisent aussi la dispersion des graines à large échelle. Les principales menaces identifiées pour l'espèce à l'échelle régionale (Hay 2008) sont la destruction anthropique de l'habitat (del Hoyo et al. 1997) et la chasse mal ou non réglementée, incluant le braconnage (Hay 2008; Rivera-Milán et al. 2016).

En Guadeloupe et plus largement dans la région Caraïbe, les deux espèces sont traditionnellement chassées. Depuis la saison de chasse 2017, un plan de gestion spécifique au Pigeon à couronne blanche a été développé en Guadeloupe avec une restriction des prélèvements accompagnée de dispositifs de marquage pour en assurer le contrôle, sans toutefois être basé sur de véritables études scientifiques. En 2018, la chasse de l'espèce fut interdite par mesure de précaution, et en 2019, l'ouverture de la chasse a été repoussée au mois de Septembre afin d'épargner le pic de la saison de reproduction de l'espèce. *A contrario*, aucune restriction n'existe à ce jour pour le Pigeon à cou rouge. Cependant, les données sur l'écologie de ces deux espèces et la démographie de leurs populations dans les Antilles françaises sont très limitées. De fait, le degré de connectivité des différentes populations (i.e. îles) des deux espèces au niveau de la région Caraïbe n'est pas documenté. Dans ce contexte, la présente étude vise, dans un premier temps, à proposer une méthode de comptage pour procéder à des suivis annuels des deux espèces. Pour ce faire, deux méthodes de détection ont été comparées, la méthode dite *passive* qui consiste à détecter les oiseaux à partir de leurs comportements spontanés (chants, déplacements) et la méthode dite *de la repasse* qui consiste à diffuser le chant de l'espèce afin d'induire une réponse comportementale (réponses par le chant ou par des mouvements). Chez une espèce du même genre, le Pigeon à queue barrée, *Patagioenas fasciata fasciata*, la méthode de la repasse apparaît plus efficace que la méthode passive pour détecter les individus, notamment en réduisant le problème de fausse absence (Kirkpatrick et al. 2007). Dans un second temps, l'étude vise à réaliser une analyse de la structure (i.e. connectivité entre populations par l'utilisation d'outils génétiques) et de la diversité génétique des deux espèces. Enfin, elle consiste à documenter la connectivité des différentes îles composant l'aire de répartition du Pigeon à couronne blanche à l'échelle régionale (i.e. région Caraïbe) et locale (i.e. au sein des îles) via l'utilisation de balises GPS-ARGOS.

I. Comparaison des deux méthodes de détection et utilisation d'habitat

(En cours de rédaction pour publication scientifique - Cambrone C., Bezault E., Cézilly F.)

Nous avons comparé l'efficacité des méthodes de détection passive et de la repasse en déterminant l'occurrence et l'abondance de pigeons à couronne blanche et de pigeons à cou rouge sur 17 circuits de comptage, dont six en forêt tropicale et neuf dans des habitats dominés par des mangroves et forêts marécageuses (Figure 2).

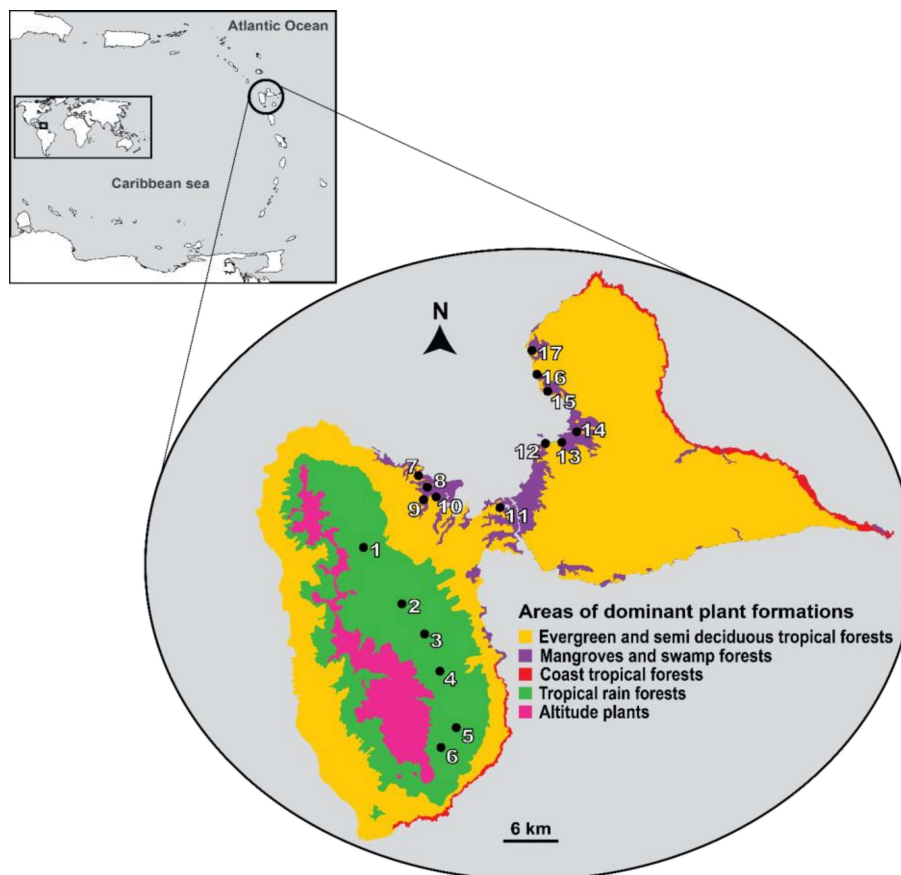


Figure 2 : Carte écologique de Guadeloupe (simplifiée à partir de Rousteau et al. 1996, Parc national de Guadeloupe) représentant les principales formations végétales et les 17 circuits prospectés durant l'étude. (Cambrone et al., en cours de rédaction)

Les comptages ont été réalisés en 2016 et 2017 pour le Pigeon à couronne blanche (2016 et 2017), et uniquement en 2016 pour le Pigeon à cou rouge. En 2016, 12 circuits différents ont été prospectés (1-6 ; 9-10 ; 13-16 sur la Figure 2). Chacun était constitué de 10 points d'écoute, espacés l'un de l'autre de 300 mètres (Thomas et al. 2010). Les circuits ont été visités deux fois le matin, au lever du soleil, et deux fois l'après-midi, au coucher du soleil.

A chaque point d'écoute les deux espèces étaient recensées. La comparaison des méthodes de détections a été mise en place suivant les explications de la Figure 3.

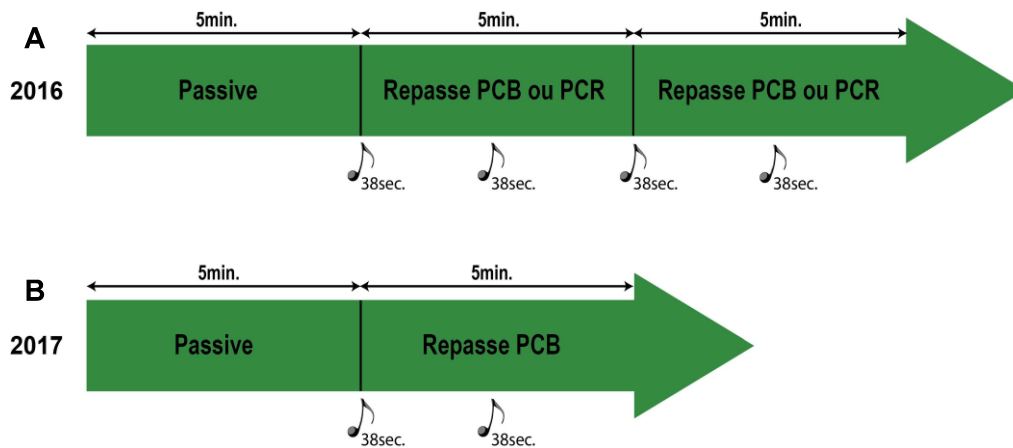


Figure 3: Méthodologie pour la comparaison des méthodes de détection réalisée en 2016 (A) pour le Pigeon à couronne blanche (PCB) et le Pigeon à cou rouge (PCR) et en 2017 pour le Pigeon à couronne blanche uniquement. Durant la méthode de la repasse, le chant du Pigeon à couronne blanche ou du Pigeon à cou rouge est diffusé à deux reprises durant 38 secondes au début du comptage avec repasse et 2.5 min plus tard (symbolisées par les notes de musique). En 2016, d'un point de comptage à l'autre, dans une même session de recensement, et d'un réplica à l'autre, l'ordre du chant diffusé a été inversé.

En 2017, seul le pigeon à couronne blanche a été dénombré suivant la méthode décrite dans la Figure 3 car les données issues des comptages effectués en 2016 étaient insuffisantes pour discriminer une différence statistique entre les méthodes de détection comparées. Lors de cette campagne, les circuits 7 à 13 et, 15 et 17 ont été visités trois fois le matin et trois l'après-midi de manière aléatoire suivant la méthode décrite dans la Figure 3B. Les chants ont été diffusés à l'aide d'un haut-parleur nomade Bluetooth d'une puissance de sortie de 4 Watts (Philips BT2600). Ils provenaient du CD "Oiseaux des Antilles" (CEBA / Fremaux et Associés) et étaient diffusés à volume maximal.

Tableau 1: Comparaison entre la méthode de Passive et celle de la Repasse pour le Pigeon à couronne blanche et le Pigeon à cou rouge. Les lettres P et R signifient respectivement « méthode Passive » et « méthode de la Repasse ». Les moyennes calculées sont couplées à l'écart-type de l'échantillon. Le seuil de significativité des tests statistiques est de 5%. Ces résultats seront prochainement soumis à une revue scientifique internationale à comité de lecture.

Variables	Pigeon à couronne blanche	Pigeon à cou rouge
Abondance total	P=119 ; R=186	P=67 ; R=118
Taux de détection moyen par point d'écoute (pigeon/min)	P=0.20±0.26 ; R=0.31±0.30	P=0.14±0.18 ; R=0.25±0.18
Abondance moyenne par point d'écoute	Moyenne : P=0.99±1.28 ; R=1.55±1.49 Test de Wilcoxon apparié : V=1344 ; P<0.0001	Moyenne : P=0.70±0.90 ; R= 1.23±0.89 Test de Wilcoxon apparié : V=400.5 ; P<0.0001
Présence/absence	Test de Mc Nemar : X ² = 8.86 ; P=0.003	Test de Mc Nemar : X ² =23.56 ; P<0.0001

La méthode de la repasse s'avère être plus efficace que la méthode passive, à la fois pour la détection du Pigeon à couronne blanche et celle du Pigeon à cou rouge (Tableau 1). En effet, l'abondance moyenne de pigeons détectés pour les deux espèces est significativement supérieure en utilisant la méthode de la repasse. De même, en termes de présence/absence, les résultats statistiques du test de Mc Nemar indiquent que la méthode de la repasse permet de détecter des individus, chez les deux espèces, quand la méthode passive ne le permet pas.

Afin de déterminer les types d'habitats fréquentés par les deux espèces étudiées, nous avons délimité un cercle de rayon de 125 mètres autour des points de comptage composant le transect par point d'écoute et identifiés dans cette zone les aires des différents types de végétation. La détermination des formations végétales s'est faite a posteriori sur Google Earth en analysant la texture de la végétation sur les images satellite. La détermination des formations végétales sur image a été vérifiée sur le terrain pour environ 20% des points de comptage. Nous avons donc déterminé cinq formations végétales : la forêt sèche tropicale, les zones ouvertes ou déboisées regroupant les prairies et les terres agricoles, la mangrove, la forêt marécageuse et la forêt tropicale humide.

Comme le montre la Figure 4, les points de comptage où ont été trouvés des pigeons à cou rouge sont composés très majoritairement de forêt tropicale humide, alors que les points

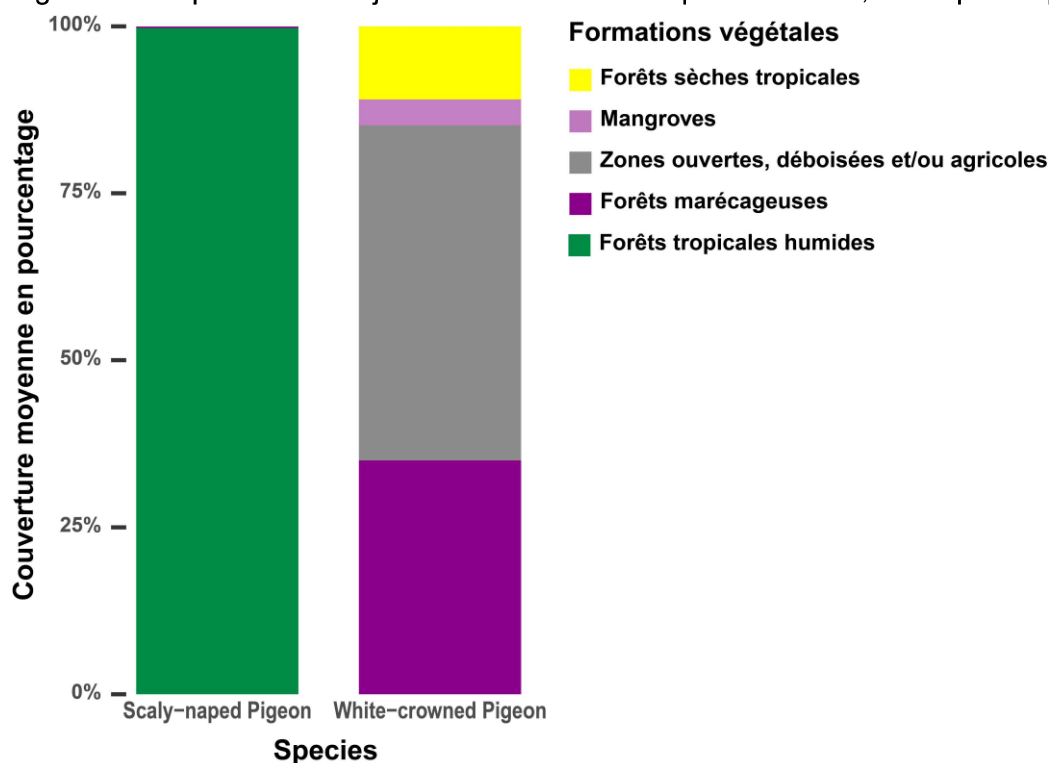


Figure 4: Formations végétales composant les zones fréquentées par le Pigeon à cou rouge et le Pigeon à couronne blanche. Ce résultat sera prochainement soumis à une revue scientifique internationale à comité de lecture.

de comptage où ont été observés des pigeons à couronne blanche sont beaucoup plus diversifiés et correspondent à des zones de forêts inondées (forêts marécageuses et mangroves), de zones ouvertes ou déboisées, et de forêts sèches. La dominance des zones ouvertes ou déboisées n'a pas forcément d'explication écologique ou biologique. Elle peut être simplement due aux faits que les habitats habituellement fréquentés par l'espèce, i.e. forêts inondées (mangroves et forêts marécageuses comme zone de nidification) et forêts sèches (comme zones d'alimentation), sont en partie anthropisées et, donc, fragmentées. Ces résultats montrent clairement que les deux espèces ne fréquentent pas les mêmes habitats en Guadeloupe.

Nos résultats démontrent que la méthode de la repasse permet de significativement détecter plus de pigeons à couronne blanche et de pigeons à cou rouge tout en réduisant le problème de « fausse absence ». Nous pouvons ainsi affirmer que cette méthode améliore la détectabilité de l'espèce, c'est-à-dire notre capacité à détecter un individu quand il est réellement présent sur le point d'écoute (Brewster and Simons 2009). Ce paramètre est important pour l'estimation de l'abondance (e.g. Bart and Earnst 2002; Royle and Nichols 2003; Alldredge et al. 2006; Alldredge et al. 2007; Buckland et al. 2008) et ne peut pas être ignoré quand l'objectif est de comparer spatialement (entre populations différentes) ou temporellement (suivi d'une même population au cours du temps) plusieurs abondances (Sutherland et al. 2004; Alldredge et al. 2007), car un changement en termes de détectabilité et un changement en termes d'abondance se traduisent quantitativement de la même manière. Négliger cet aspect peut avoir une influence négative sur la mise en place de protocoles de gestion de la faune sauvage et l'estimation du taux prélèvement cynégétique compatible avec la pérennité des populations (Blanco et al. 2014).

II. Analyse de la structure et de la diversité génétique (Travaux en cours - Cambrone C., Cézilly F., Eraud C., Lambourdière J., Wattier R., Bezault E.)

Des échantillons biologiques ont été collectés au sein des îles caribéennes et grâce à différentes collaborations établies à travers la région Caraïbe (Tableau 2). Au total, 157 échantillons de plumes et de doigts ont été prélevés pour le Pigeon à couronne blanche contre 133 pour le Pigeon à cou rouge. Pour les échantillons de tissus provenant de pigeons à couronne blanche, l'ADN a été extrait en utilisant le kit d'extraction NucleoSpin (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne), alors que l'ADN issu des échantillons provenant de pigeons à cou rouge l'ont été en utilisant le protocole de la méthode d'extraction par phénol-chloroforme décrite par Hillis et al. (1996). Par amplification d'ADN par PCR (*Polymerase Chain Reaction*), un gène mitochondrial a été étudié : le Cytochrome Oxydase subunit I (*COI* – 652 pb). Dans la littérature scientifique, deux séquences de *COI* provenant de pigeons à couronne blanche collectés au Panama (Schindel et al. 2011) ont été trouvées et utilisées dans cette présente étude comme représentatives de la partie Amérique centrale de l'aire de répartition de l'espèce. Concernant le Pigeon à cou rouge, une analyse de l'ADN nucléaire a aussi été réalisée sur la base de sept loci spécialement développés pour cette espèce (Barker et al. 2011).

Tableau 2: Nombre d'échantillons de tissus pour les analyses génétiques par îles de la région Caraïbe pour le Pigeon à couronne blanche (échantillonnage en cours) et le Pigeon à cou rouge. Le symbole (+ ?) signifie que des échantillons sont prévus d'être collectés et le symbole (+Nombre) signifie que nous avons collectés les échantillons mais qu'ils n'ont pas encore été analysés.

	Pigeon à couronne blanche	Pigeon à cou rouge
Floride (U.S.A.)	12	-
Cuba	(+40)	-
République Dominicaine	8 (+29)	-
Porto-Rico	(+ ?)	32
Iles vierges américaines	(+ ?)	-
Iles Caimans	18	-
Jamaïque	(+ ?)	-
Antigua	(+ ?)	-
Guadeloupe	43 (+ ?)	36
Martinique	22 (+ ?)	28
Barbade	-	37
Panama	2	-
Total	157 (+69 au minimum)	133

Les réseaux d'haplotypes (Figure 5) révèlent onze haplotypes différents pour le Pigeon à couronne blanche et seulement cinq pour le Pigeon à cou rouge. Ces premiers résultats

Rapport d'activité – Pigeon à couronne blanche – DEAL 971 - 2019

tendent à suggérer que le pigeon à couronne blanche posséderait une assez haute diversité génétique. Cependant, ces réseaux d'haplotypes n'indiquent pas de structuration génétique évidente entre les différentes îles échantillonnées pour les deux espèces étudiées. En revanche, les valeurs des Φ_{st} par paire de populations indiquent une structuration entre les pigeons à couronne blanche collectés dans les îles Caïmans et toutes les autres îles échantillonnées (Tableau 3). Pour le Pigeon à cou rouge, une structuration est aussi observée entre les pigeons échantillonnés à la Barbade et ceux échantillonnés en Guadeloupe et en Martinique. En revanche, les pigeons de la Barbade et de Porto-Rico ne sont pas significativement différents sur la base de l'analyse du COI (Tableau 3). Ceci s'explique par le fait que les pigeons à cou rouge échantillonnés à la Barbade et à Porto-Rico possédaient la même séquence nucléotidique, représentée par l'haplotype majoritaire de la Figure 5A. Les résultats de l'analyse de l'ADN nucléaire provenant du Pigeon à cou rouge confirment cette structuration (Figure 6). Ces résultats révèlent en effet que la population de Barbade serait génétiquement différente des autres et que les pigeons provenant de Porto-Rico, Guadeloupe et Martinique formeraient qu'une seule population (i.e. biologiquement, des groupes d'individus interconnectés par des migrations efficaces, autrement dit, avec des événements de reproduction). Cette structuration génétique s'explique par un déficit significatif d'hétérozygotie dans la population de Barbade (Test de *Bottleneck*, $P=0.039$) synonyme d'un effet de fondation (i.e. perte de variabilité génétique due à un événement démographique par

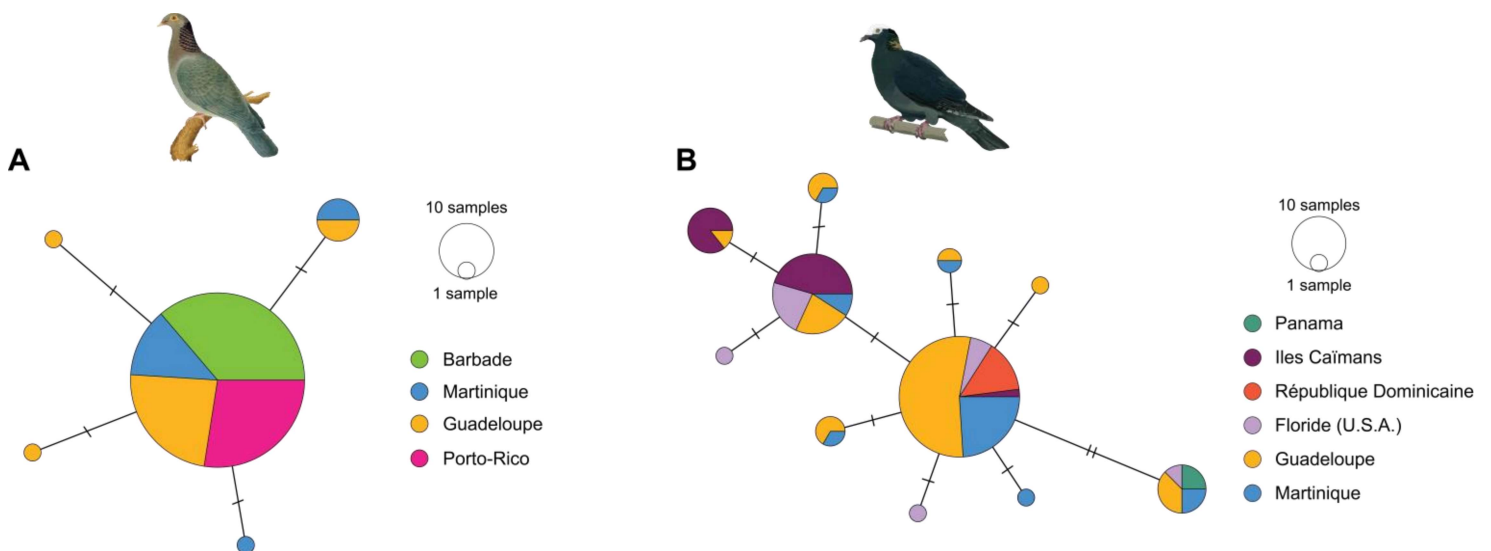


Figure 5 : Réseaux d'haplotypes (*Minimum spanning network*) construit à partir des haplotypes pour une séquence d'ADN mitochondriale de 652 pb (COI) pour le Pigeon à cou rouge (A) et le Pigeon à couronne blanche (B). Chaque cercle représente un haplotype et leur taille est proportionnelle au nombre d'individus partageant l'haplotype. Les tirets noirs indiquent le nombre de différences nucléotidiques ou mutation entre deux haplotypes. Les couleurs correspondent à l'origine géographique des individus et la surface de chaque couleur au sein d'un même cercle indique le nombre d'individus de la même région géographique partageant le même haplotype. Le réseau d'haplotype A est issu de Cambrone et al. 2019, soumis à *Journal of Ornithology*. Le réseau d'haplotypes B est complété au fur à mesure que nous recevons des échantillons et sera publié dans revue internationale à comité de lecture.

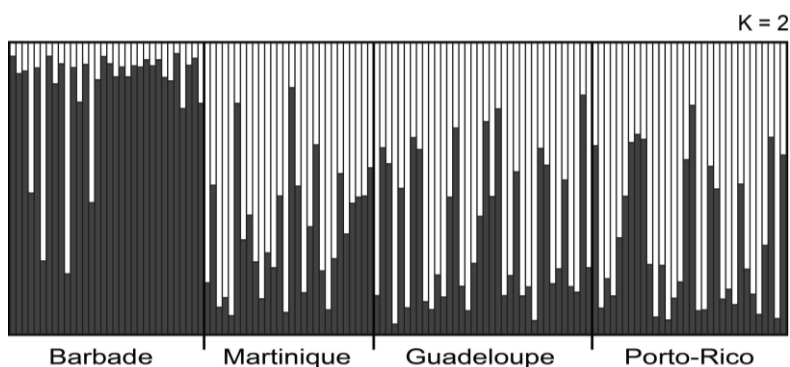


Figure 6 : Structure génétique de quatre populations de pigeons à cou rouge utilisant l'inférence Bayésienne par une analyse Structure. La méthode d'Evanno et al. (2005) a déterminé un nombre optimal de groupe génotypique égal à $K=2$. Ce résultat est issu de Cambrone et al. 2019, soumis à *Journal of Ornithology*.

lequel un sous-effectif d'une population plus grande s'établi dans une zone géographique différente). En effet, l'espèce était historiquement absente de Barbade, mais dans la première moitié du 20^{ème} siècle plusieurs colombophiles ont importé des individus depuis différentes îles (Buckley et al. 2009). Plusieurs d'entre eux se sont échappés des volières et sont retournés à la vie sauvage. Les résultats issus des analyses génétiques nous informent sur la dynamique spatiale des deux espèces. L'absence de structure génétique suggère qu'il y aurait qu'une seule population, pour le Pigeon à couronne blanche comme pour le Pigeon à cou rouge, à l'échelle de la région Caraïbe.

Tableau 3 : Valeurs de Φ_{st} (analogue au F_{st}) pour estimer la différenciation entre les populations étudiées de pigeons à couronne blanche sur la base du gène COI de l'ADN mitochondrial. Les valeurs de Φ_{st} significativement différentes de 0 sont en gras. Le seuil de significativité a été corrigé suivant la procédure de Benjamini-Yekutieli ($\alpha_{BY}=0.0204$, NS = non significatif, * = $P < 0.0151$, ** = $P < 0.00302$, *** = $P < 0.000302$)

	Panama	Iles Caïmans	République Dominicaine	Floride (U.S.A.)	Guadeloupe	Martinique
Panama	-	0.83*	1.00 ^{NS}	0.58 ^{NS}	0.63 ^{NS}	0.58 ^{NS}
Iles Caïmans		-	0.69***	0.23*	0.44***	0.47***
République Dominicaine			-	0.23 ^{NS}	-0.018 ^{NS}	-0.03 ^{NS}
Floride (U.S.A.)				-	0.086 ^{NS}	0.085 ^{NS}
Guadeloupe					-	-0.030 ^{NS}
Martinique						-

Tableau 4: Valeurs de Φ_{st} (analogue au F_{st} – au-dessus de la diagonale) pour estimer la différenciation entre les populations étudiées de pigeons à cou rouge sur la base du gène COI de l'ADN mitochondrial, et valeurs de F_{st} issues de l'analyse de l'ADN nucléaire (en-dessus de la diagonale). Les valeurs significativement différentes de 0 sont en gras. Le seuil de significativité a été corrigé suivant la procédure de Benjamini-Yekutieli ($\alpha_{BY} = 0.0204$, NS = non significatif, * = $P < 0.0204$, ** = $P < 0.00408$, *** = $P < 0.000408$)

	Porto-Rico	Guadeloupe	Martinique	Barbade
Porto-Rico	-	0.0124 ^{NS}	0.0165 ^{NS}	0.0496*
Guadeloupe	0.0903 ^{NS}	-	0.0079 ^{NS}	0.0586*
Martinique	0.201*	-0.0254 ^{NS}	-	0.0594*
Barbade	0.000 ^{NS}	0.112**	0.242**	-

III. Utilisation de l'ADN nucléaire pour analyser la structure génétique du Pigeon à couronne blanche (Travaux en cours - Cambrone C., Cézilly F., Lambourdière J., Bezault E.)

Afin de mener à bien cet axe de recherche, un stage de Master 1 intitulé « Caractérisation de marqueurs microsatellites et amplification croisée pour l'étude des colombidés antillais » a été réalisé par Mme. Emeline Charbonnel et encadré par M. Cambrone et M. Bezault. Le rapport de ce stage est joint en annexe. L'objectif de ce stage consistait à déterminer des marqueurs microsatellites pouvant être utilisés chez le Pigeon à couronne blanche et d'autres espèces de colombidés caribéens, en utilisant des marqueurs déjà existants et développés chez des espèces génétiquement proches, telle que le Pigeon à cou rouge (voir ci-dessus) et la Tourterelle à queue carrée, *Zenaida aurita* (Monceau et al. 2009; Monceau et al. 2013). Parmi les marqueurs microsatellites déjà développés pour deux espèces, *Zenaida aurita* et *P. squamosa*, un panel de 20 marqueurs a été testé sur 6 espèces antillaises. La mise au point des conditions d'amplification, a permis d'obtenir un taux d'amplification hétérospécifique de 62%. De plus, l'amplification de ces marqueurs à partir de sources d'ADN issues de prélèvements plus ou moins intrusifs (doigts et plumes) a été testée. Le taux d'amplification obtenu à partir d'ADN extrait de plume reste élevé (73%). Ces résultats sont uniquement qualitatifs. En effet, ils indiquent uniquement si les amorces de ces marqueurs s'hybrident et s'amplifient bien avec l'ADN issus de pigeons à couronne blanche et d'autres espèces de colombidés antillais. Afin de définitivement déterminer si ces marqueurs peuvent être utilisés dans l'étude de la structure génétique du Pigeon à couronne blanche, nous devons encore estimer la variabilité de ces loci. Ce travail sera fait avant la fin de l'année 2019.

IV. Suivi par satellite des déplacements du Pigeon à couronne blanche dans la Caraïbe (Travaux en cours - Cambrone C., Bezault E., Motreuil S., Eraud C., Cézilly F.)

Afin d'aborder la dynamique spatiale du Pigeon à couronne blanche sous un autre angle, nous avons mis en place un protocole de suivi satellitaire. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps cherché une méthode de capture adaptée à l'espèce. En effet, cette espèce est rarement vue au sol sur la plupart des îles caribéennes composant son aire de répartition, notamment en Guadeloupe où elle est observée en vol, à 15 – 50 mètres d'altitude, ou perchée à la cime des arbres, rendant inadaptée l'utilisation classique de filets japonais pour les capturer. Nous avons donc tenté d'attirer des individus au sol en utilisant des blettes de chasse à la forme de l'espèce, de la nourriture et en utilisant la repasse (c.f. I). Ce dispositif ayant pour objectif d'attirer des individus de l'espèce fut couplé à un dispositif de piégeage du type *clap net*. Les essais de piégeage se sont déroulés en Guadeloupe sur plusieurs jours (~24h de d'observation), au niveau de Sauvia à Morne-à-l'eau (97111) et de Blachon, au Lamentin (97129), soit en disposant le dispositif directement au sol, soit sur une plateforme d'1m20 de hauteur (Photographie 1 et 2). Bien que les pigeons observés semblaient intrigués par le dispositif, aucun n'est venu se poser au sol ou sur la plateforme. Pour l'heure, aucune capture n'a été effectuée en Guadeloupe. Cependant, il a été possible d'organiser une session de capture en République Dominicaine avec l'autorisation des autorités locales. Du 12 au 22



Photographie 1 : Pigeon à couronne blanche équipé d'une balise GPS-Argos, attachée tel un sac à dos avec un harnais en téflon (Hill et al., 1999).

Juillet 2019 des travaux de terrain ont donc été entrepris au niveau du lagon d'Oviedo, dans la partie Sud-Ouest du pays (Cartes 1 et 2) avec les permis nécessaires obtenus auprès des autorités locales. Au total, 29 pigeons à couronne blanche ont été capturés en utilisant trois filets japonais (3x3m, 3x6m, 3x12m). Ceci fût possible car les pigeons à couronne blanche nichent autour et sur des îlets du lagon, et volent à basse altitude en passant près

de ces derniers. Pour chacun d'entre eux, des mesures biométriques ont été réalisées (annexe 1 : tableau biométrique utilisé sur le terrain) et des échantillons de sang, de plumes et de

salives ont été prélevés. Les prélèvements sanguins ont été réalisés à l'aide d'une aiguille hypodermique 22G au niveau de la veine alaire. La goutte de sang qui en résultait a été prélevée à l'aide d'un tube capillaire de 100µL et stockée dans de l'éthanol absolu. La salive, quant à elle, a été prélevée en passant un écouvillon en mousse (VWR international, ref : 149-0333) sur la paroi interne du bec. Chaque écouvillon a été séché à l'air libre durant environ 30 secondes et stocké dans un tube stérile (Vilstrup et al. 2018). Trois à cinq plumes (semi-plumes ou duvet) ont été arrachées au niveau de la poitrine des oiseaux et placées dans des enveloppes. Tous ces échantillons serviront aux analyses génétiques décrites dans la partie II et III de ce rapport. L'ensemble des pigeons à couronne blanche capturés ont été bagués (bagues alphanumériques du CRBPO-Muséum National d'Histoire Naturelle) et sept d'entre eux ont été équipés d'une balise GPS-Argos (Lotek Wireless Inc., PTT PinPoint GPS Argos Solar 6 grams ; Photographie 1). Le poids du dispositif de marquage et de suivi n'excédait pas 4% du poids d'un pigeon (min : 224g (3,6%), max : 268g (3,0%)), ce qui est dans l'intervalle habituellement utilisé dans ce genre d'étude (Gaunt et al. 1997; Bridge et al. 2011; Kays et al. 2015). Pour installer les balises sur les pigeons à couronne blanche, nous avons suivi le protocole décrit en Annexe 2. Les balises ont été programmées pour localiser les pigeons toutes les deux heures entre 06h00 et 18h00 un jour sur deux, soit 7 positions enregistrées tous les deux jours. Le reste du temps, les balises enregistrent la position des individus à 07h00, 12h00 et 18h00. De plus, une localisation est faite toutes les nuits, à minuit. Les informations concernant les individus équipés d'une balise sont dans le Tableau 5.

Tableau 5: Informations générales sur le suivi satellite des sept pigeons à couronne blanche équipés. L'individu souligné continue, au moment de la rédaction de ce rapport, d'émettre des données

Individus	Date Capture	Poids (g)	Longueur aile (cm)		Durée du suivi (jours)	Nombre de positions	Distance totale entre positions (km)
			Droite	Gauche			
PCB19-041	16/07/2019	259	19,15	19,15	5	32	18,24
PCB19-044	16/07/2019	268	18,20	18,05	2	8	4,49
<u>PCB19-054</u>	18/07/2019	258	18,65	18,65	78 (en cours)	592	1118,56
PCB19-063	20/07/2019	250	18,55	18,75	1	4	1,90
PCB19-064	20/07/2019	251	18,35	18,45	18	131	137,44
PCB19-067	21/07/2019	224	18,65	18,55	10	68	17,89
PCB19-068	21/07/2019	230	18,85	18,85	48	205	277,25

Les résultats de ce suivi par satellite ne sont que préliminaires et résultent d'un suivi sur une période de presque 3 mois (du 14 Juillet à la rédaction de ce rapport), alors que nous espérons être mesure de suivre les déplacements de l'espèce pendant deux à trois ans. Le premier bilan de cette expérience est en demi-teinte. En effet, à ce jour seule une balise continue d'émettre des données (Tableau 5). Différentes raisons peuvent expliquer cette perte

de signal. Une défaillance de la balise peut être en cause via des problèmes de batterie ou de recharge solaire, des problèmes dans les communications avec les satellites Argos pour la transmission des données ou avec le réseau des satellites GPS dans l'acquisition des coordonnées géographiques. En dehors de ces défaillances technologiques possibles, la mort des individus équipés est aussi une explication possible. Elle peut être d'origine naturelle (i.e. sénescence, prédation, maladie ou prélèvements d'origine cynégétique) ou causée par le dispositif de suivi, qui pour différentes raisons, pourrait diminuer la capacité d'un individu à survivre (i.e. affectant négativement l'aptitude phénotypique ; Barron et al. 2010; López-López 2016). La perte, au cours du temps, du signal émis par des balises de même type a été reporté à plusieurs reprises dans la littérature scientifique, certaines même n'émettent jamais de signal (e.g. Bertram et al. 2016; Vardanis et al. 2016; Fuglei et al. 2017; Silva et al. 2017; Sullivan et al. 2018; Moore et al. 2019; Exo et al. 2019; Rühmann et al. 2019).

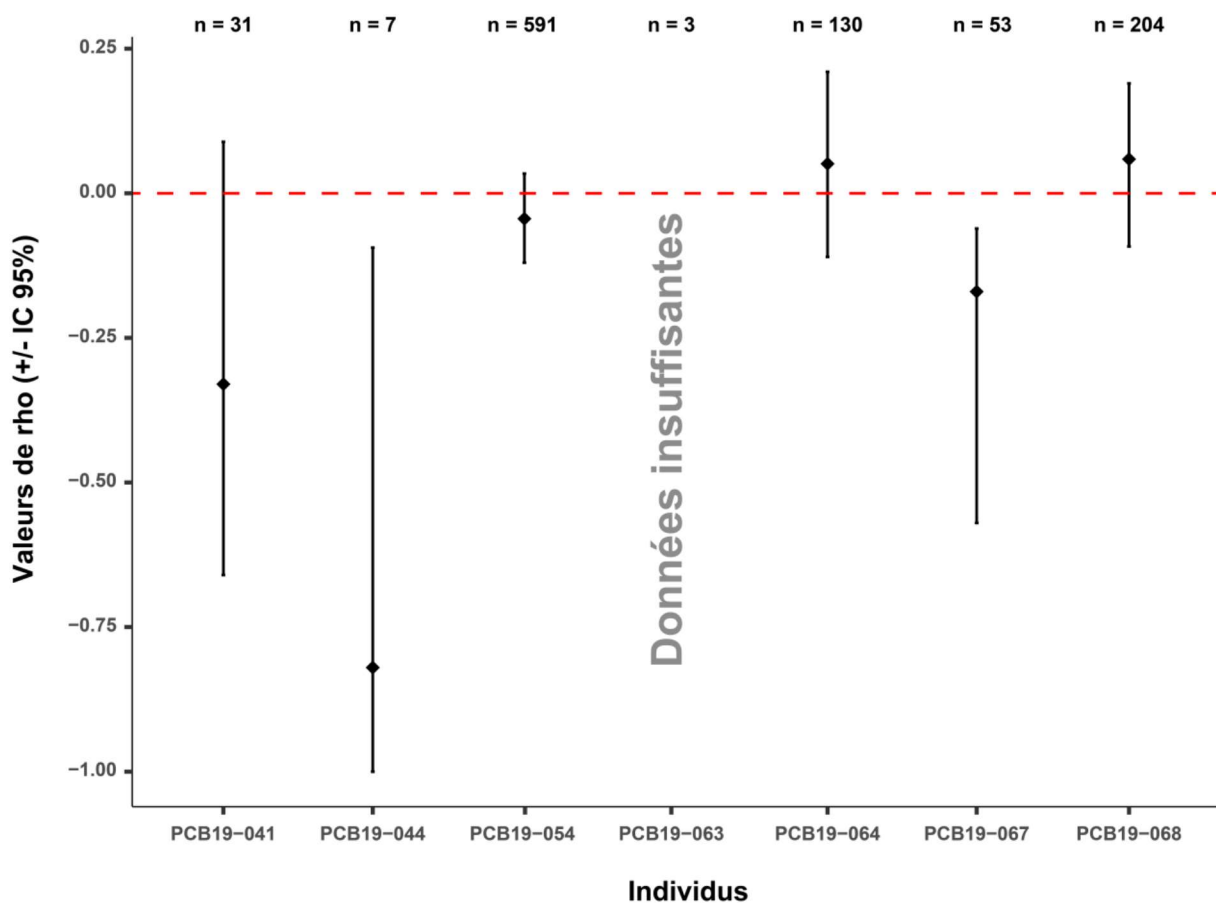


Figure 7: Valeurs des coefficients de corrélation (rho) issues des tests de Spearman testant si la distance parcourue par les différents individus équipés d'une balise GPS reste stable au cours du temps (rho = 0). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance calculées à 95%.

Afin de déterminer l'origine de la perte de signal, nous avons regardé ce qui pouvait, biologiquement ou techniquement, expliquer les différences de longévité observée des balises (Tableau 5). Dans un premier temps, une analyse descriptive des cartes 3 à 7 montre que les individus PCB19-063 et PCB19-067 sont très probablement mort après avoir été relâchés.

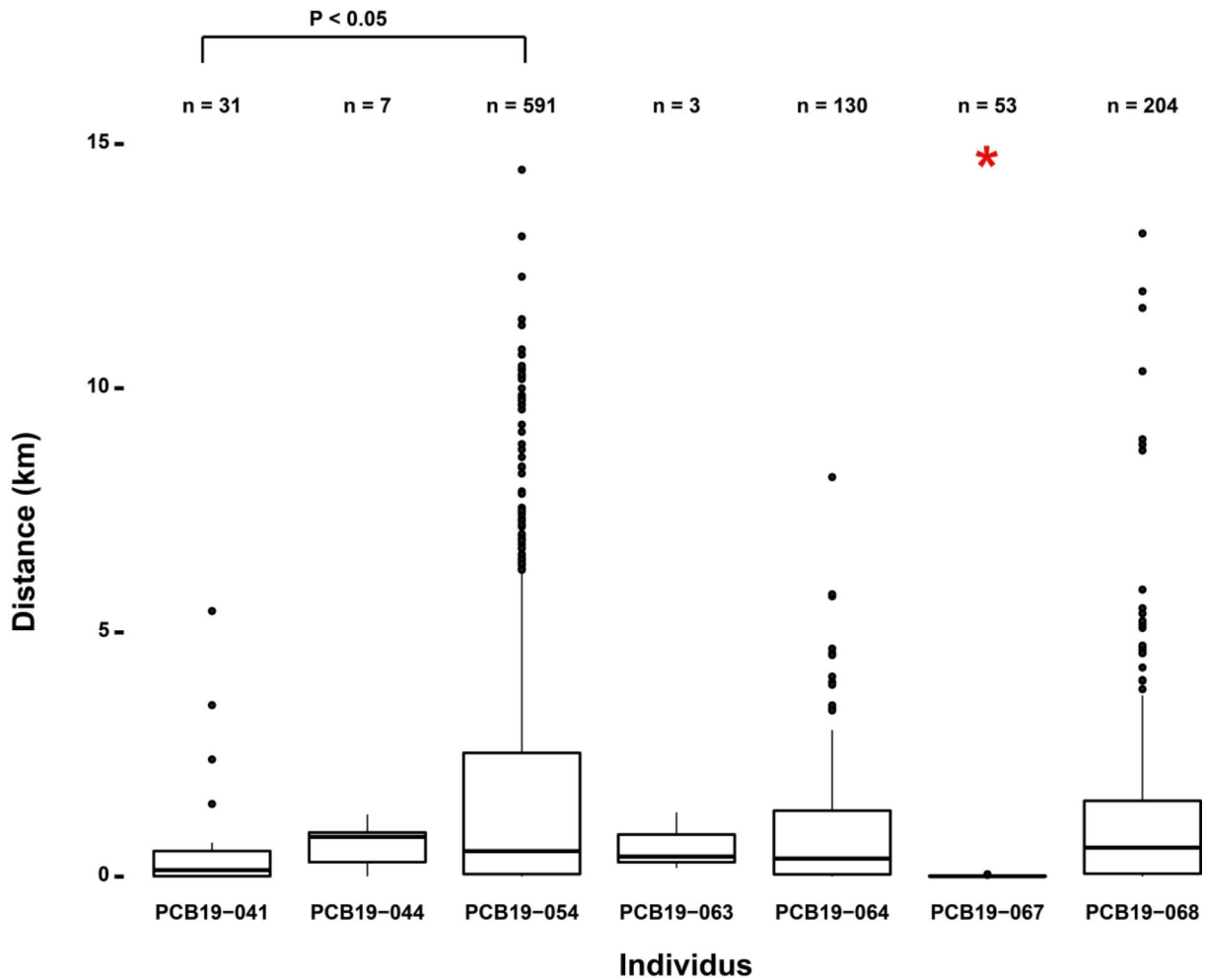


Figure 8: Comparaison de la distance moyenne parcourue entre deux localisations enregistrées successives entre les individus équipés d'une balise. Le test de Kruskal-Wallis ($P < 0.0001$) indique qu'au moins un des individus diffère des autres. Le test a posteriori de Wilcoxon par paire d'échantillons montre que PCB19-067 (astérisque rouge) a parcouru significativement moins de distance que tous les autres individus avec un $P < 0.0001$ pour la comparaison par paire d'échantillons incluant PCB19-041, PCB19-054, PCB19-064 et PCB19-067, un $P < 0.01$ incluant PCB19-044 et un $P < 0.05$ avec PCB19-063. Les valeurs de P ont été calculées suivant la méthode de Benjamin-Yekutieli afin de diminuer le taux d'erreur de Type I suite à ces multiples comparaisons.

Toutes les localisations enregistrées sur les dix jours d'émission de données de la balise déployée sur l'individu PCB19-067 se situent au même endroit, signifiant que ce pigeon ne s'est pas déplacé (Carte 8). En revanche, les quatre localisations émises par la balise de PCB19-063, sur une durée totale de 24 heures, montrent un déplacement du lieu de capture vers le rivage du lagon. Ceci suppose que l'oiseau serait tombé à l'eau et aurait dérivé vers le rivage du lagon. Ces deux individus semblent ne pas avoir toléré la manipulation et/ou la balise.

En revanche, la perte de signal pour les autres individus suivis (PCB19-041, PCB19-044, PCB19-054, PCB19-064 et PCB19-068) semble être due à une raison technique ou à une mort soudaine (notamment par la chasse, voir photographie 2). En effet les distances parcourues entre deux localisations successives restent stables au cours du temps pour les individus PCB19-041, PCB19-054, PCB19-064 et PCB19-068 ($\rho = 0$, Figure 7). En



Photographie 2 : Tableaux de chasse de 2019 après une matinée de chasse en République Dominicaine. Photographie prise après le déploiement de nos balises GPS et obtenues par des contacts locaux.

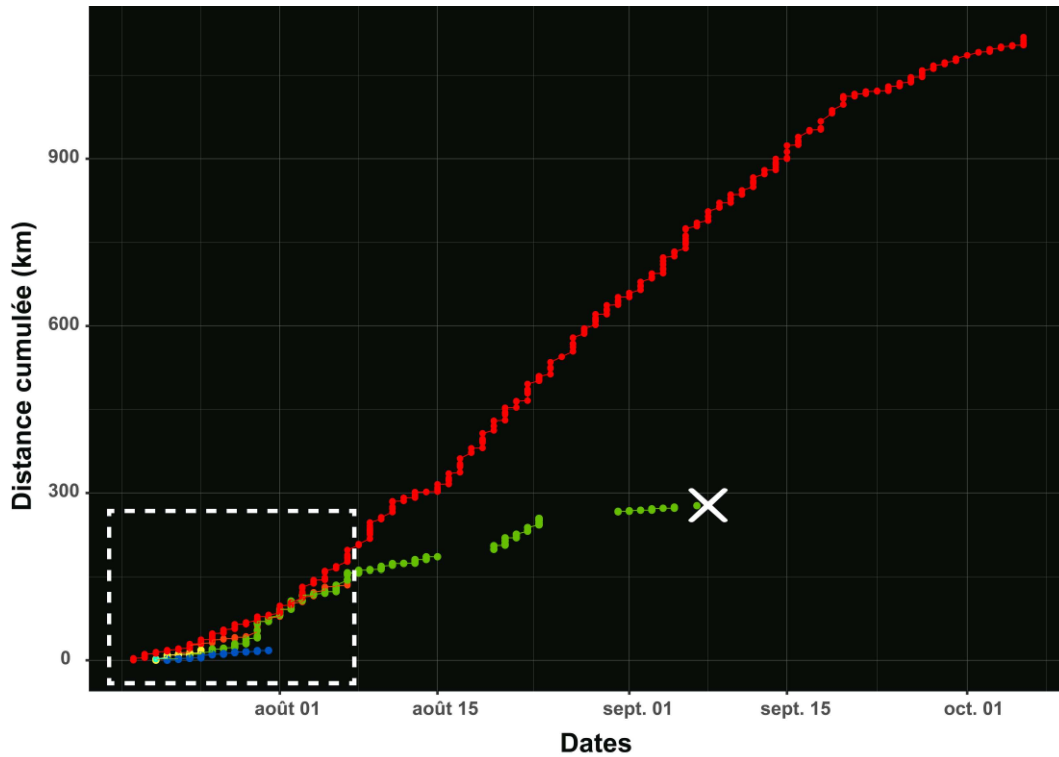
revanche, elles semblent diminuer pour PCB19-044, de même pour PCB19-067, mais cet individu est considéré mort. La variabilité observée en termes d'estimation de localisation géographique, et donc en termes de distances estimées entre deux localisations successives est due à la précision de la balise, équivalant à $\pm 40\text{m}$. Cependant, nous disposons de très peu de données pour cet individu ($n = 7$), ce qui ne nous permet pas d'affiner ce résultat. De plus, les intervalles de confiance à 95% (estimé après 1000 bootstraps) des coefficients de corrélation calculés (ρ) se chevauchent tous plus ou moins, indiquant que ces valeurs ne sont significativement pas différentes l'une de l'autre.

La distance parcourue moyenne entre deux localisations successives diffèrent uniquement entre PCB19-041 ($0.13\text{km} \pm 0.51$; médiane \pm interquartile) et PCB19-054 ($0.52\text{km} \pm 2.48$), et PCB19-067 ($0.0080\text{km} \pm 0.010$) et tous les autres individus (Figure 8). Ceci se confirme avec la Figure 9, où les courbes de distance cumulée au cours de temps des pigeons suivis (hormis PCB19-063 et PCB19-067) se confondent au début du suivi. Cependant, nous pouvons observer un décrochement de la courbe correspondant à PCB19-068 par rapport à la courbe de PCB19-054, indiquant une diminution des distances parcourues au cours du temps entre deux localisations. En comparant les distances parcourues entre deux localisations successives de cet individu à partir de la date correspondant au décrochement de la courbe de la Figure 9 à celles estimées pour PCB19-067, considéré comme mort dès la première émission de ses données, nous constatons que PCB19-068 a en moyenne parcouru une plus grande distance que PCB19-067 (test de Wilcoxon, $W=58$, $P < 0.001$). Ceci suggère que la diminution en termes de distances parcourues, illustré par la Figure 9, n'est pas due à la mort de l'individu, mais plutôt à un changement comportemental soudain, tel qu'une période de couvain, qui dure chez cette espèce de 13 à 14 jours (Gibbs et al. 2001). Nous voyons aussi que la balise de cet individu s'est arrêtée d'émettre trois fois avant que nous perdions totalement son signal. Les balises utilisées fonctionnent grâce à une batterie ayant une durée de vie limitée, mais cette dernière est censée être rechargée par l'énergie solaire. Cependant,

ceci requière que l'oiseau soit exposé au soleil, ce qui n'est pas forcément le cas lors de la période de couvaison. Les interruptions observées pourraient donc être l'illustration de la période de couvaison, pendant laquelle l'oiseau est peu exposé au soleil hormis lorsqu'il quitte son nid, relevé par son partenaire, pour aller se nourrir. Ce cycle de décharge quasi-totale et de recharge partielle de la batterie, illustré par ces interruptions, a pu amener à l'arrêt total de la balise. Pour les individus PCB19-041, PCB19-044 et PCB19-064, nos analyses ne mettent en évidence aucunes explications biologiques quant à l'arrêt prématuré de leur signal. Pour ces derniers, la chasse (Photographie 2) ou une défaillance des balises peuvent être supposées.

Les données collectées, bien qu'insuffisantes pour atteindre l'objectif initial de cette étude, ont permis de mettre en évidence le caractère grégaire de l'espèce. En effet, sur la carte 10 qui montre la localisation géographique des individus à minuit tout au long de leur suivi, nous pouvons voir que les points sont regroupés au sein de deux zones principales, où les pigeons à couronne blanche sembleraient préférentiellement passer leurs nuits. De plus, nous pouvons aussi constater qu'un même individu (e.g. PCB19-054) peut changer de zone d'une nuit à l'autre.

A



B

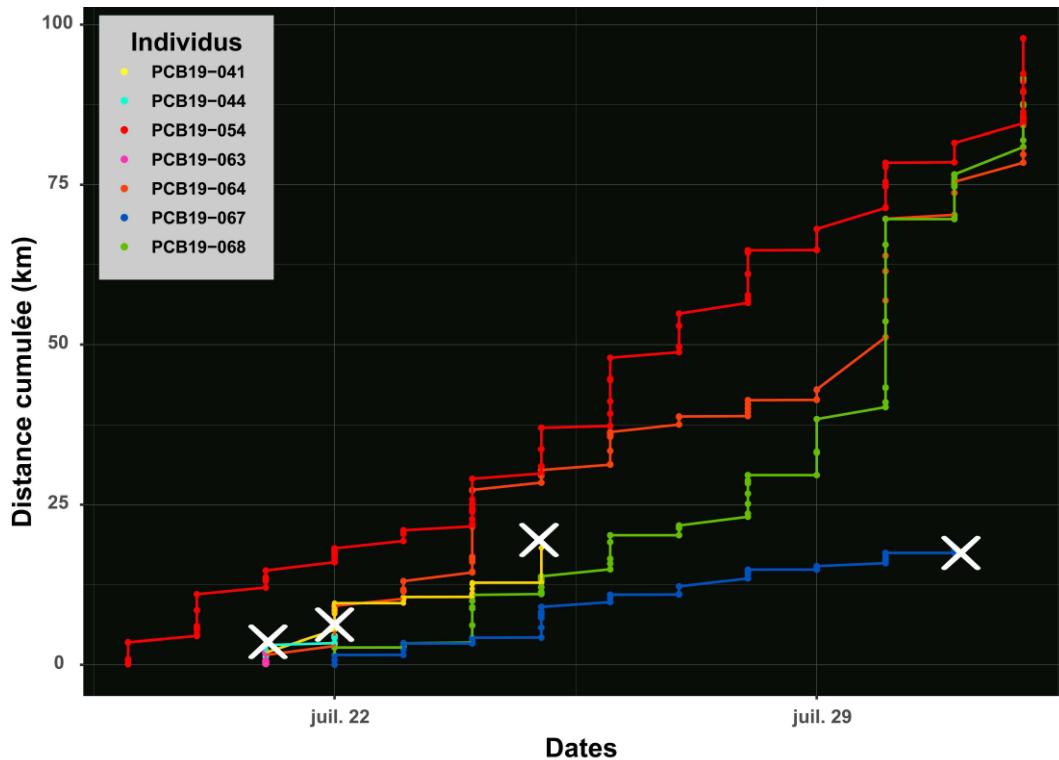
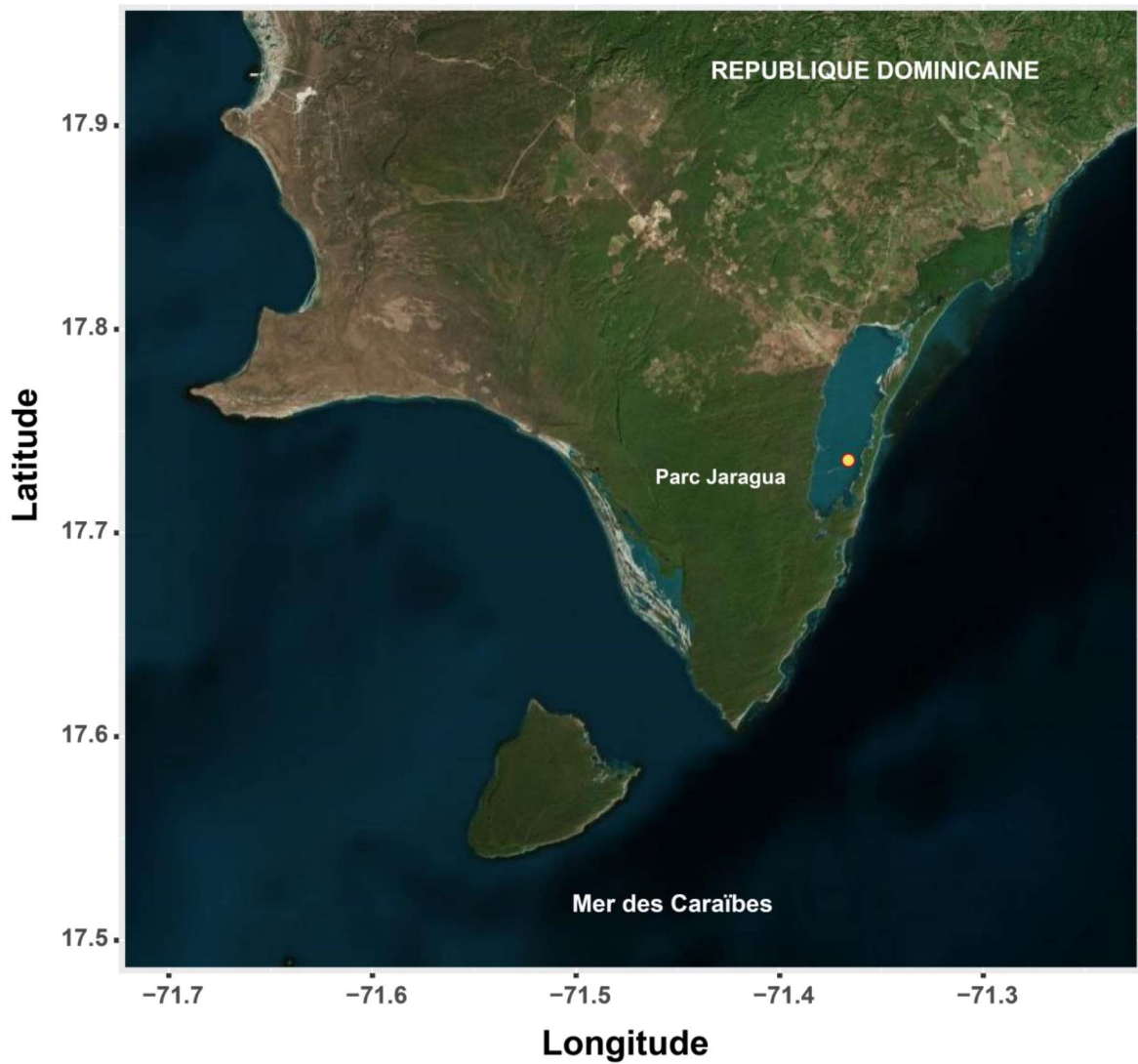


Figure 9: Distance parcourue cumulée au cours du temps par les pigeons à couronne blanche équipés. Le graphique B est un agrandissement de la zone encadrée en pointillés blancs du graphique A. Une interruption de ligne correspond à une interruption de signal sur un temps donné et une croix blanche marque la perte totale de signal.

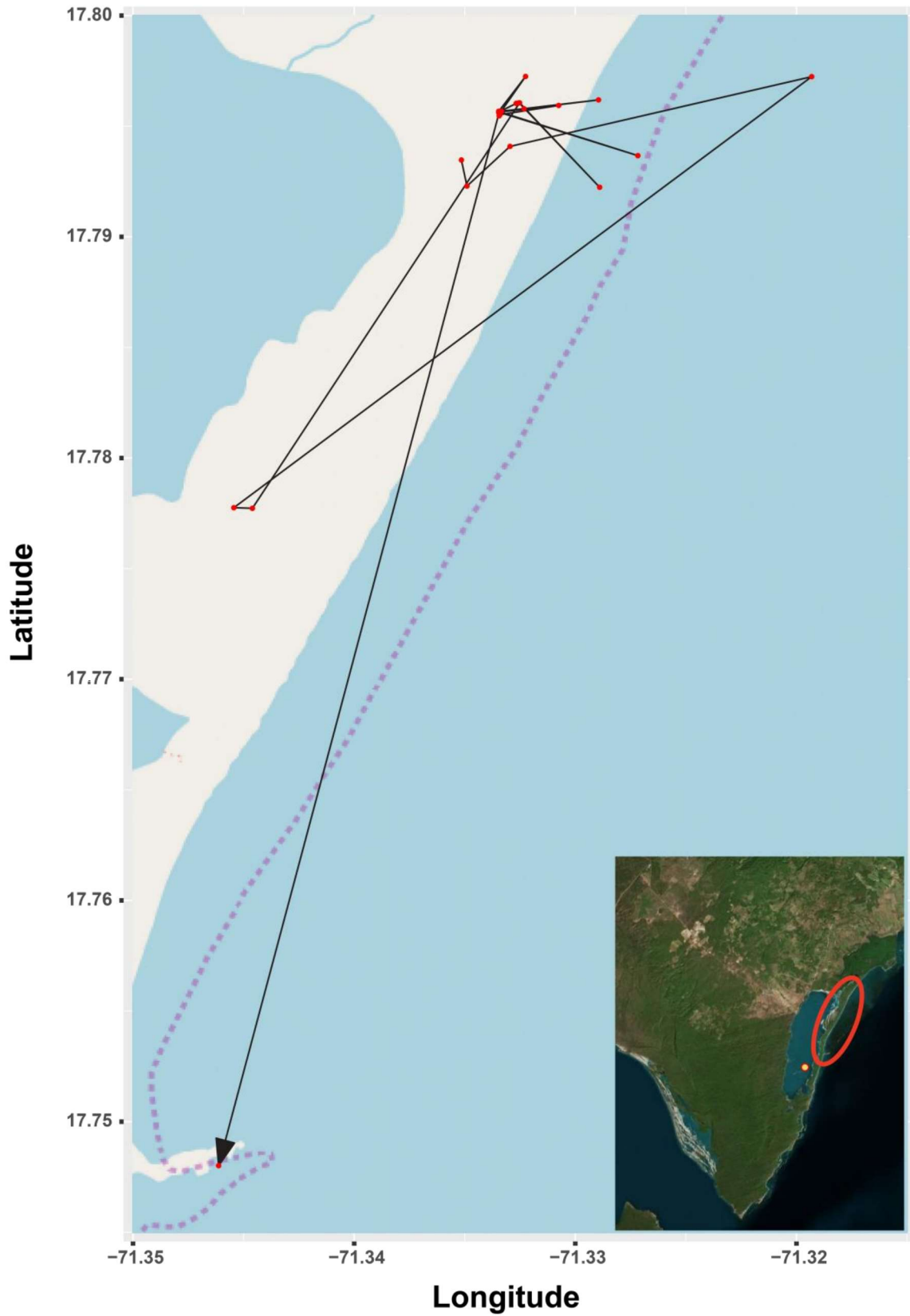
Cartes géographiques (package R OpenStreetMap et move)



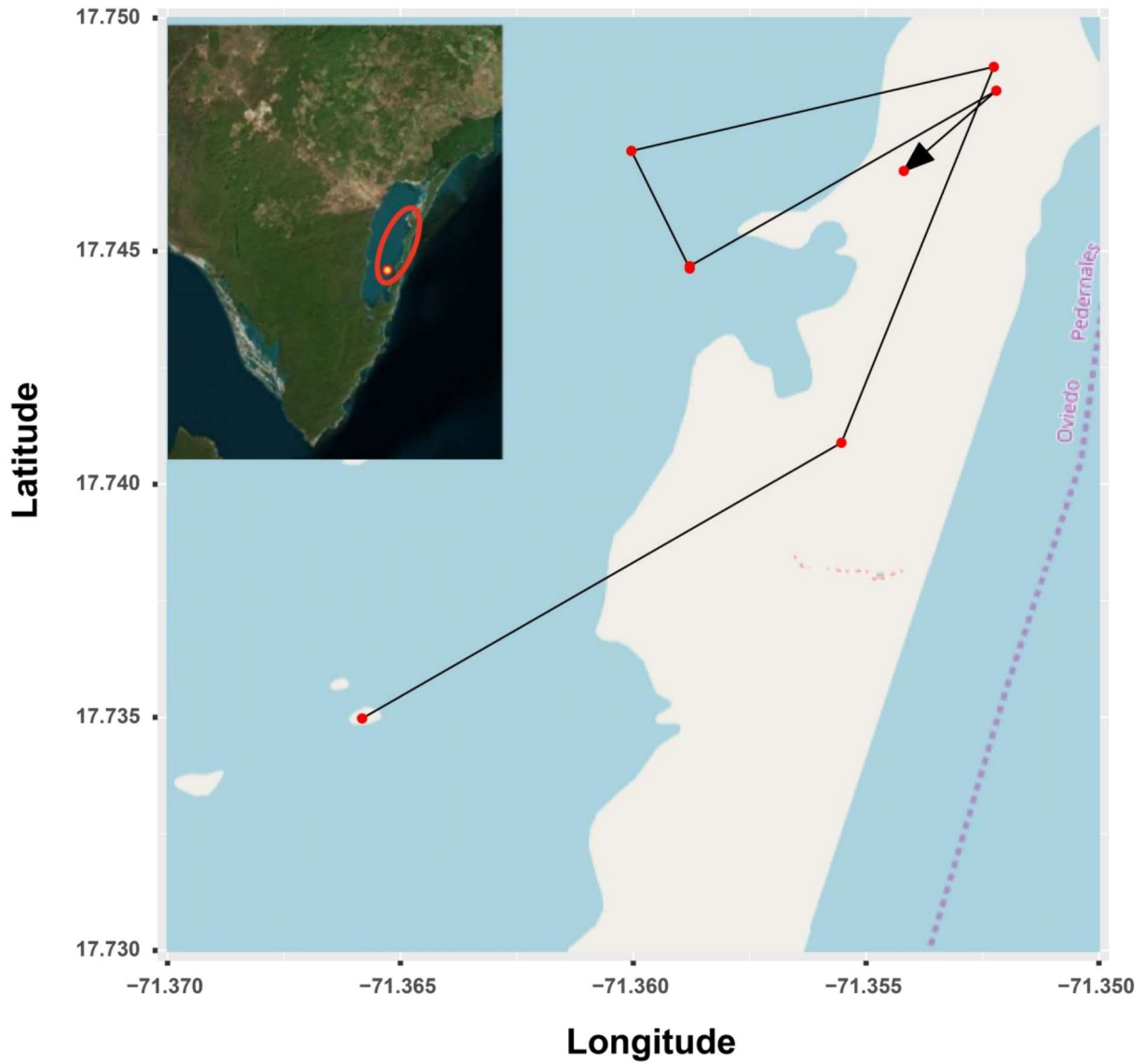
Carte 1: Carte des Grandes-Antilles. L'encadré orange localise le site de l'étude réalisée en Juillet 2019 (voir carte 2).



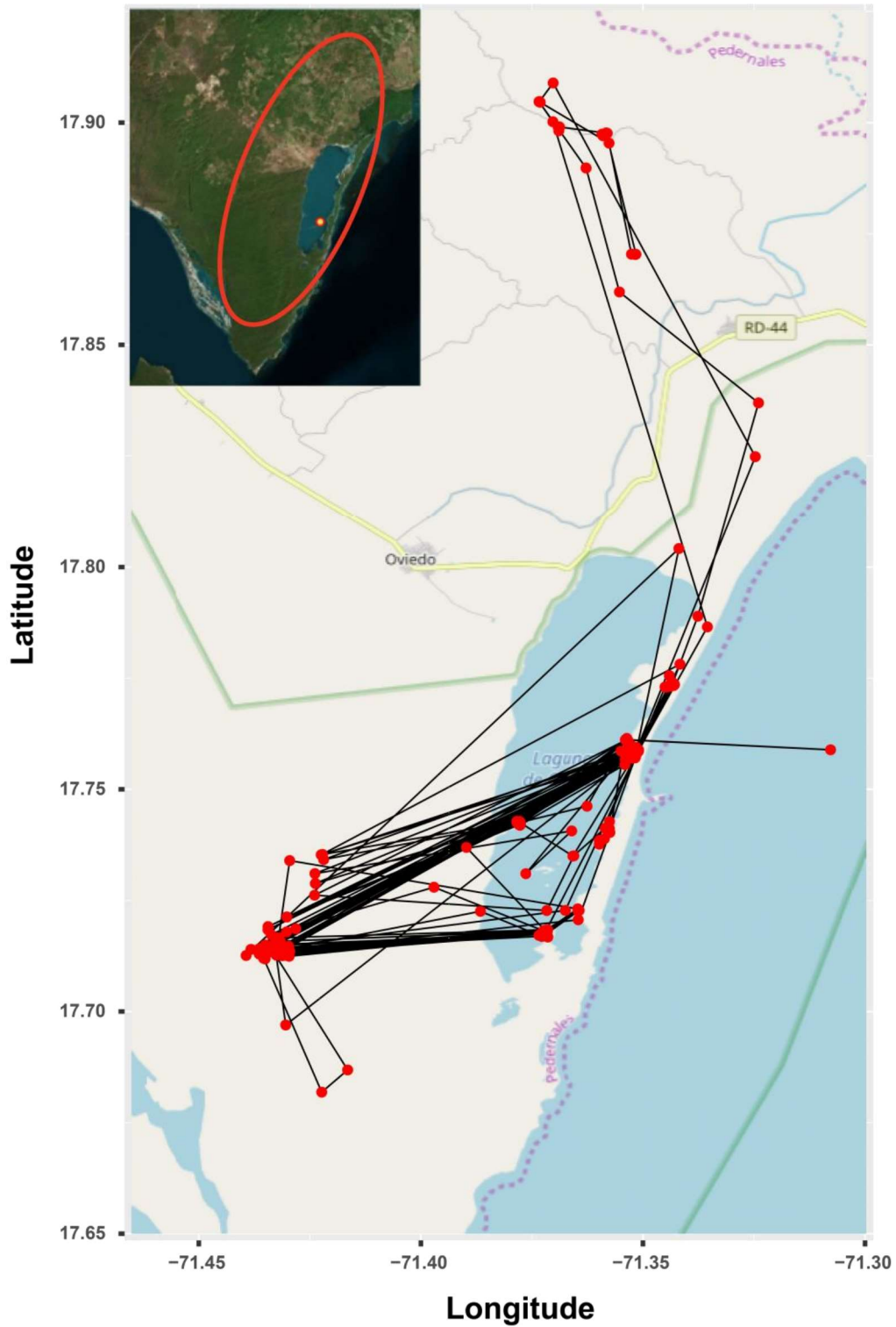
Carte 2: Carte de la partie Nord de la République Dominicaine. Le point jaune bordé de rouge localise le site de piégeage, au niveau du Lagon d'Oviedo, sur l'îlet appelé Puerto-Rico.



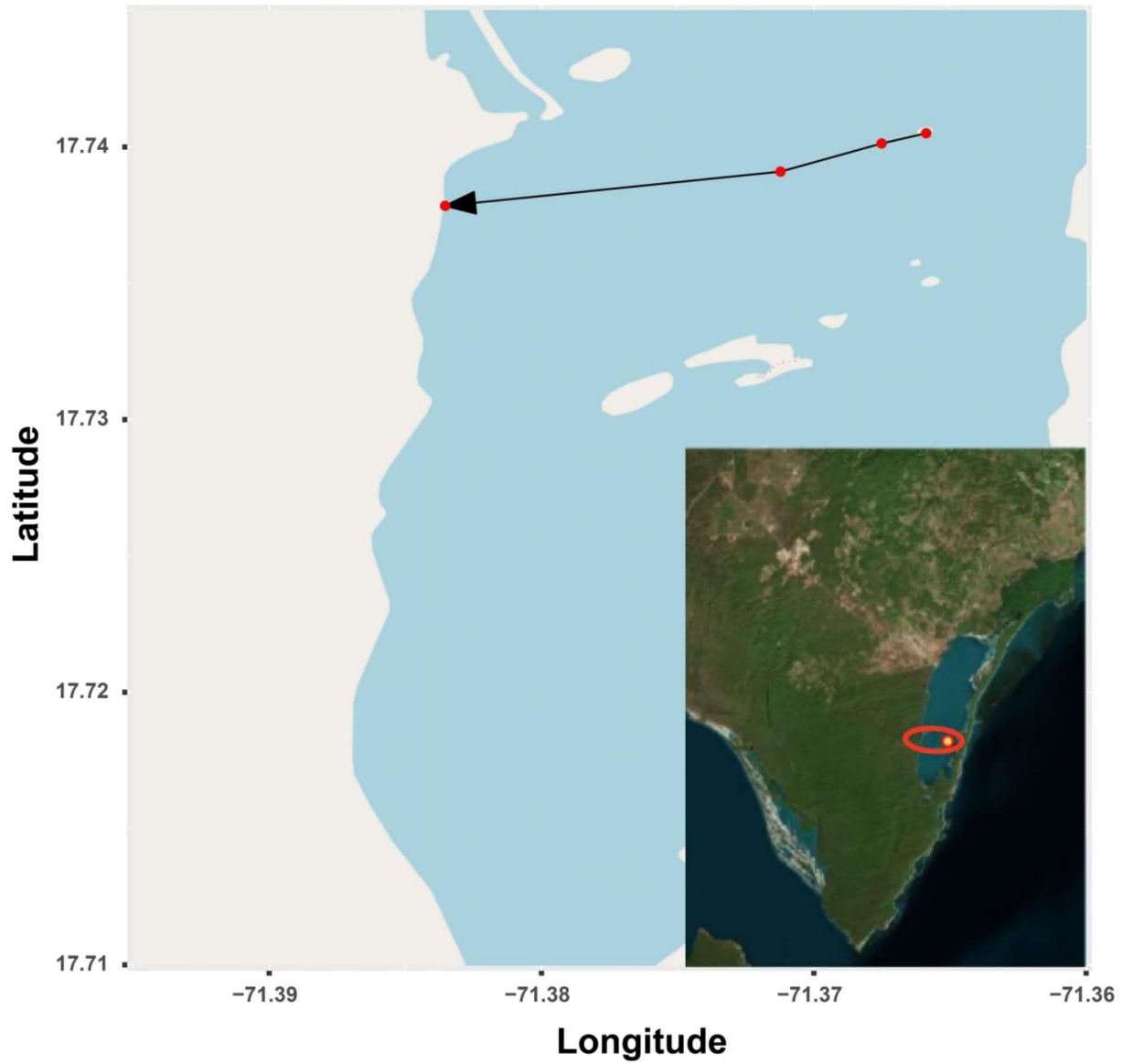
Carte 1: Déplacements enregistrés de l'individu PCB19-041



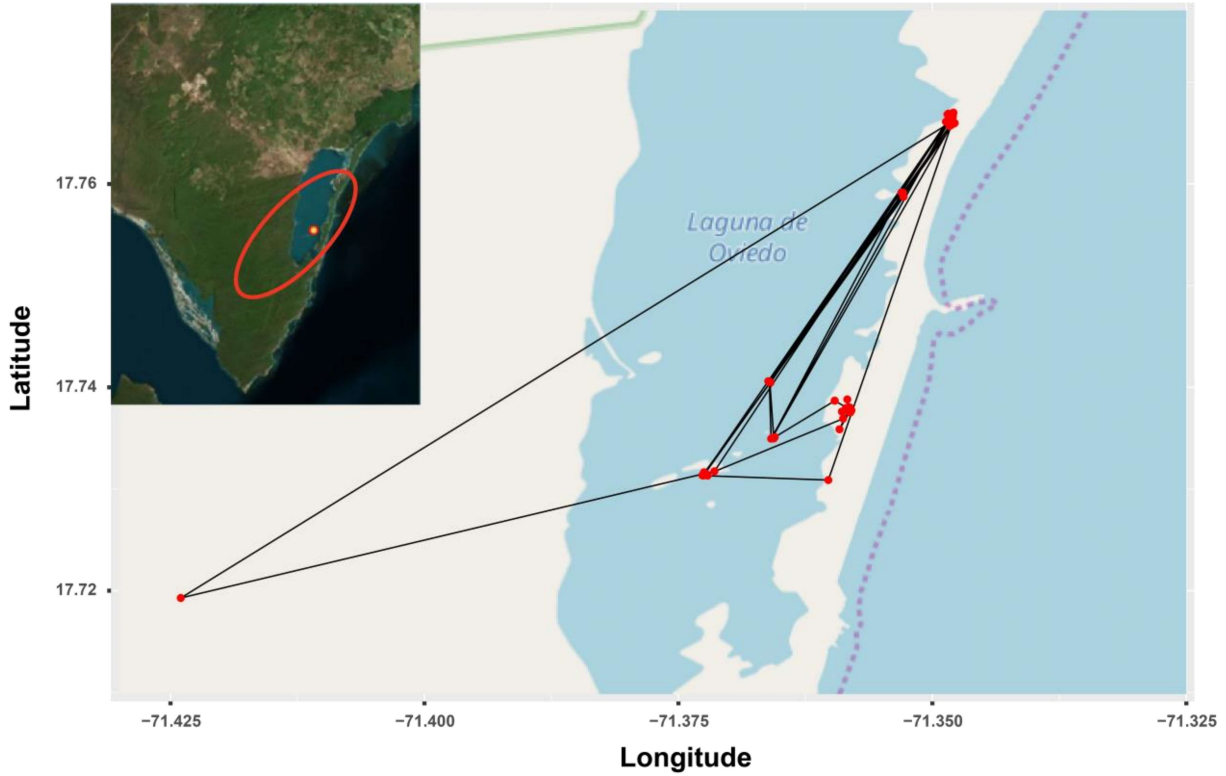
Carte 2: Déplacements enregistrés pour l'individu PCB19-044



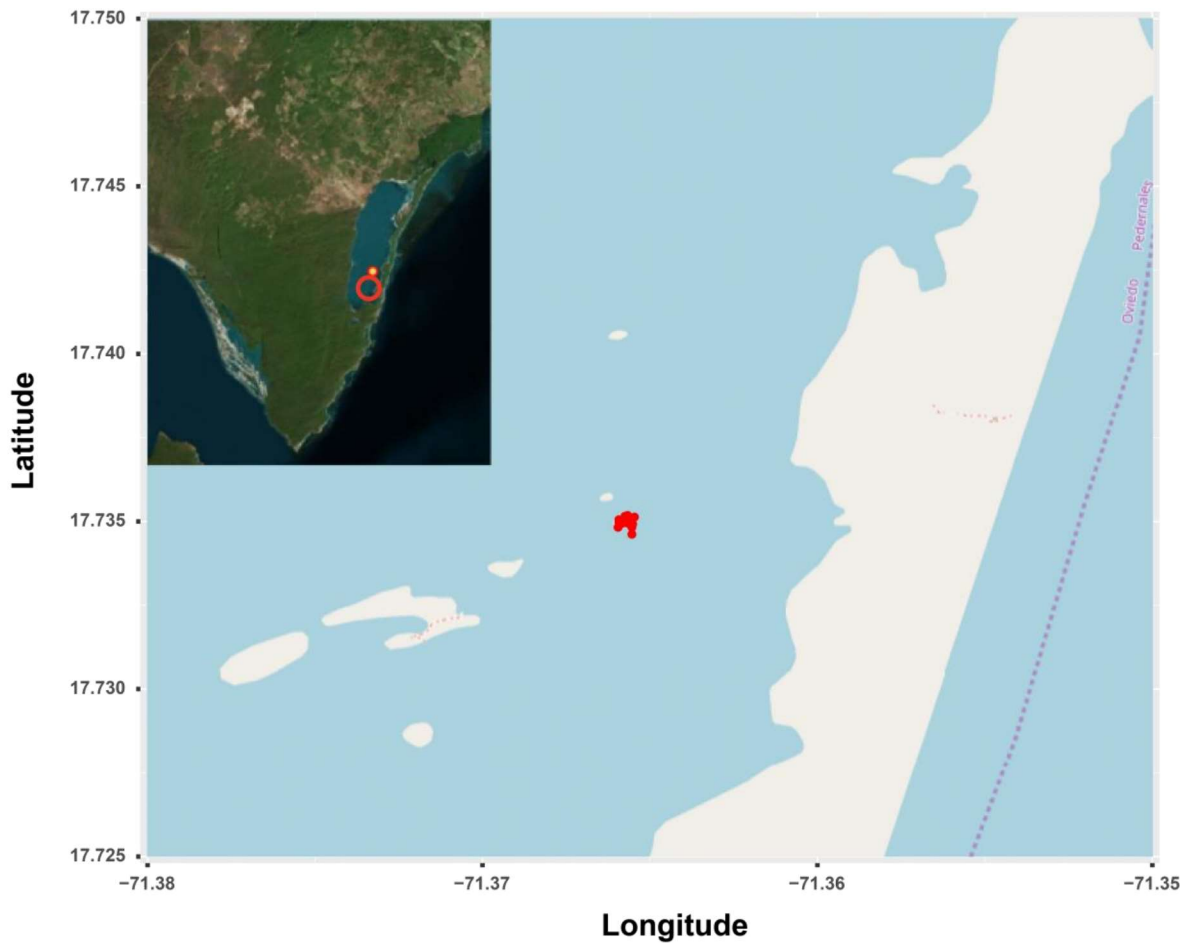
Carte 3: Déplacements enregistrés pour l'individu PCB19-054



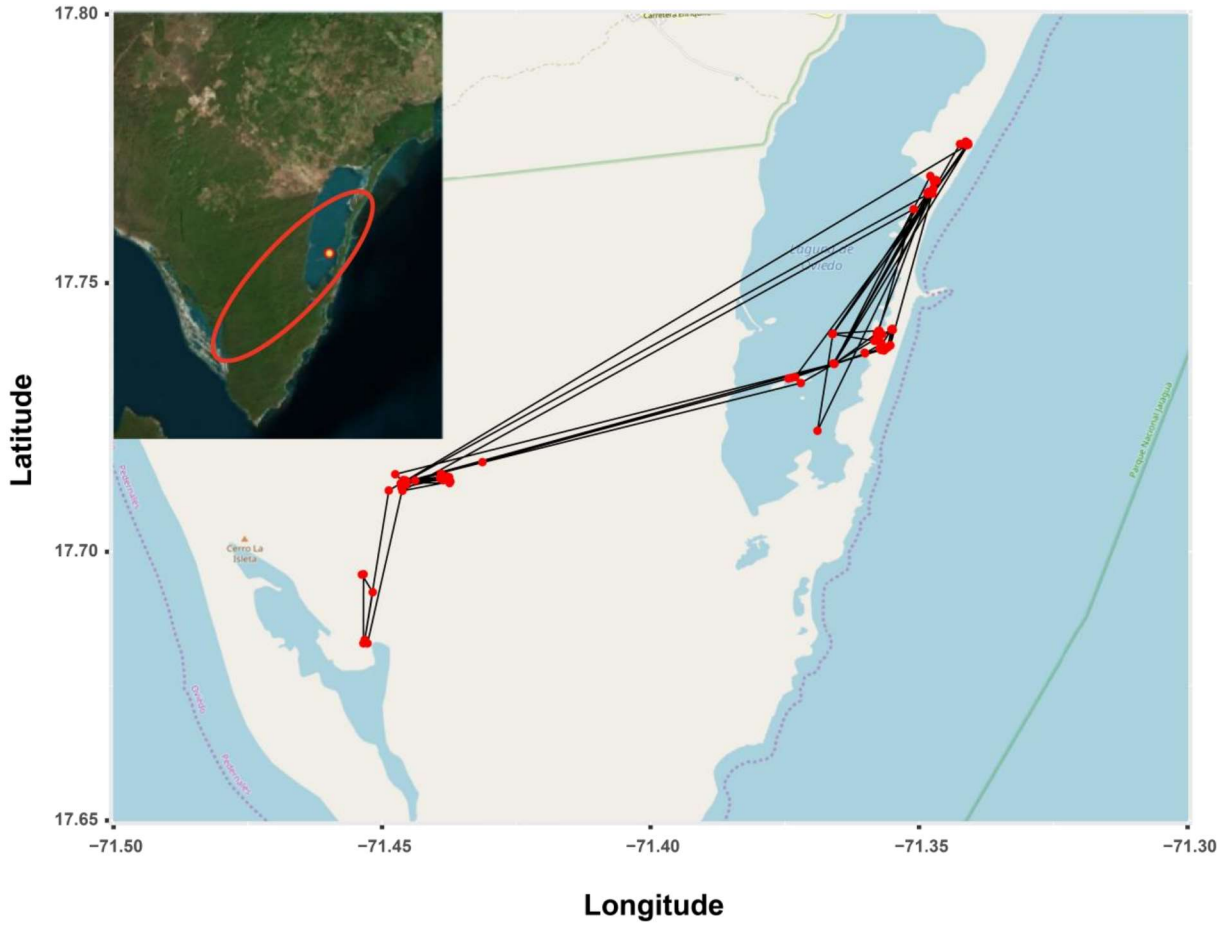
Carte 4: Déplacements enregistrés pour l'individu PCB19-063



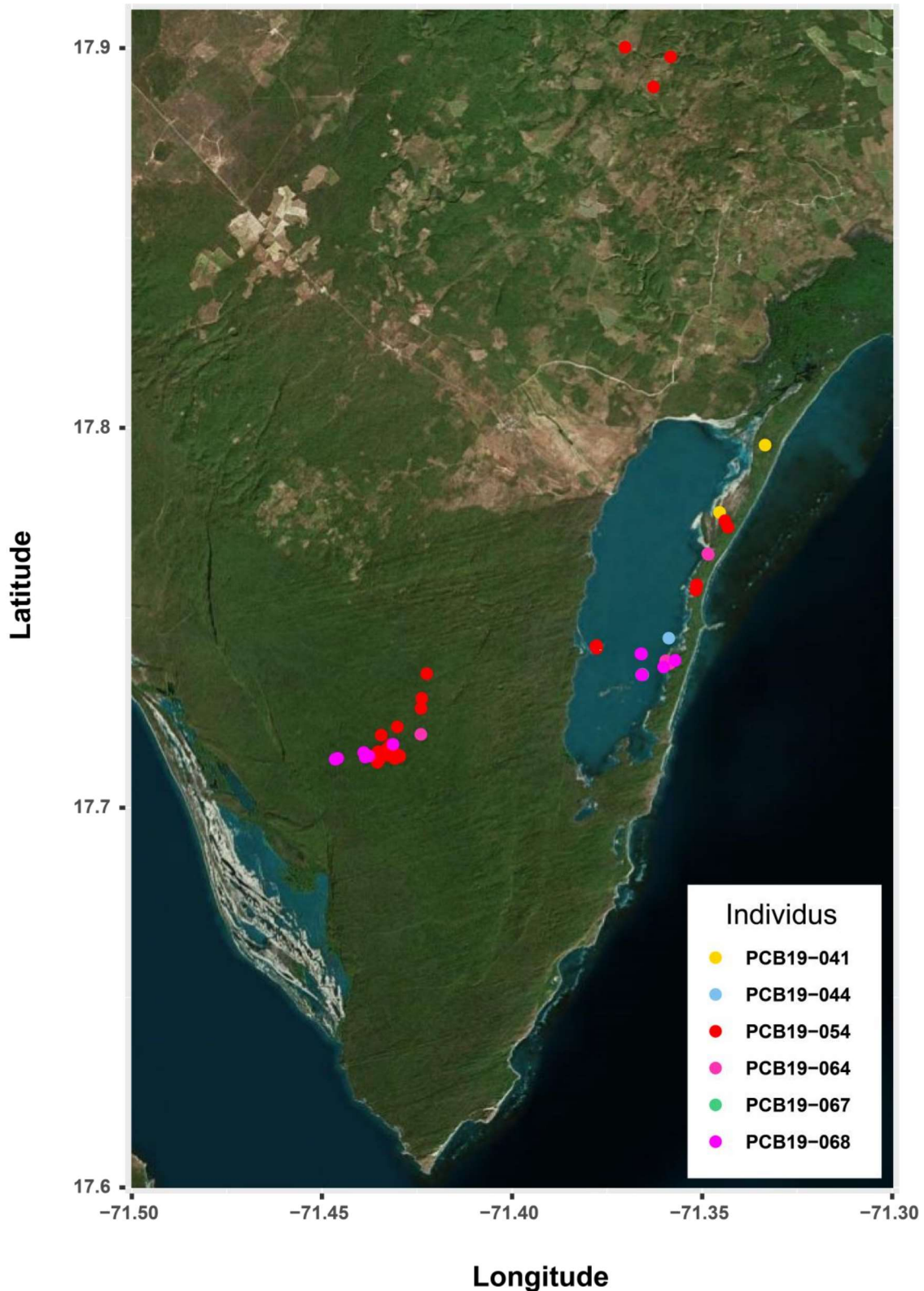
Carte 7: Déplacements enregistrés pour l'individu PCB19-064



Carte 8: Déplacements enregistrés pour l'individu PCB19-067.



Carte 5: Déplacements enregistrés pour l'individu PCB19-068



Carte 6 : Localisation de tous les individus suivis par GPS à minuit. Chaque point représenté d'une couleur spécifique correspond à la localisation d'un individu à minuit à un jour donné. L'image animé jour pour jour pour voir la position des individus nuit par nuit est visualisable sur ce lien <https://nsa40.casimages.com/img/2019/10/18/191018053954877725.gif>

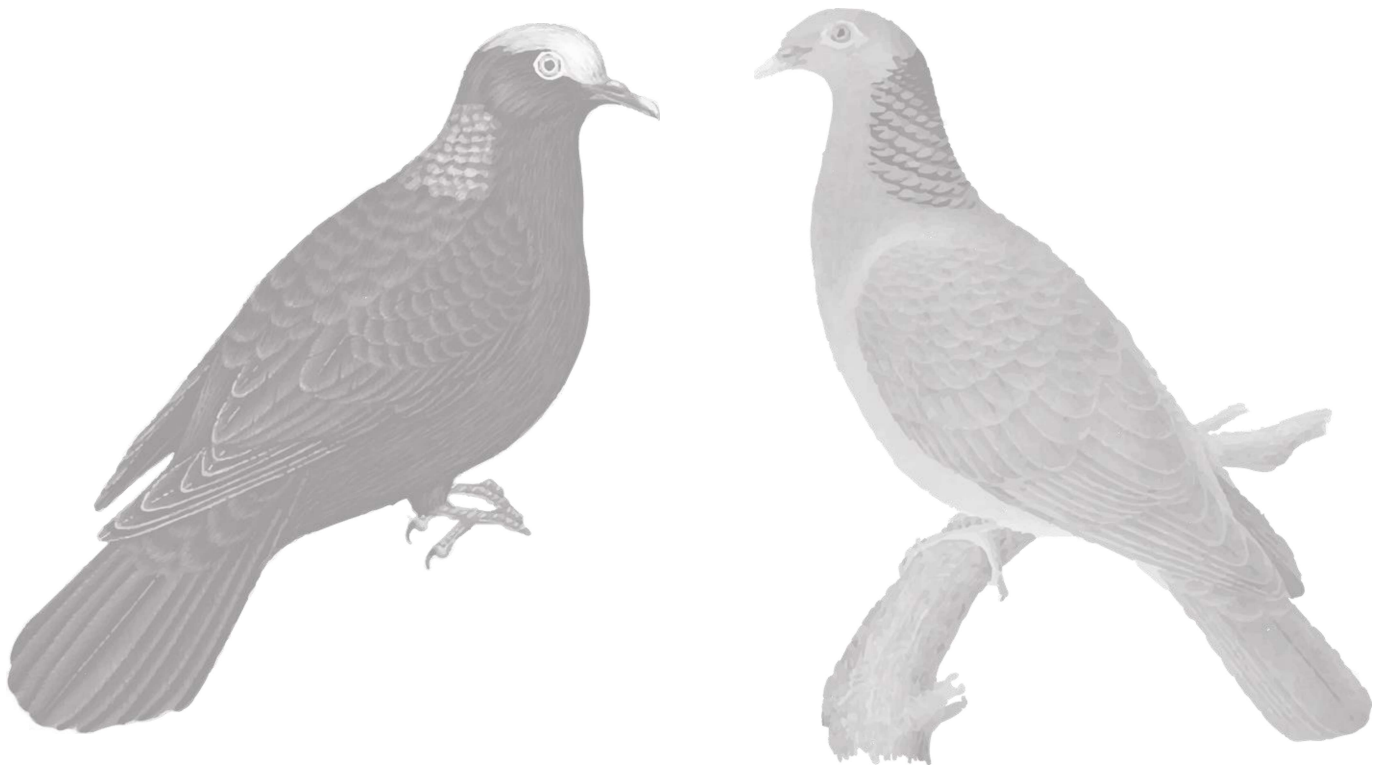
V. Conclusion et perspectives

La présente étude met en évidence certaines informations à prendre en compte pour l'ajustement du statut de conservation, et, par là même, l'établissement d'un plan de gestion cohérent du Pigeon à couronne blanche et du Pigeon à cou rouge en Guadeloupe et à l'échelle caribéenne :

- **La possible existence d'une unique population à l'échelle caribéenne** montrerait qu'un plan de gestion de ces deux espèces ne peut pas être totalement efficace, si ce dernier n'est pas appliqué, de la même manière, dans les différents territoires et états caribéens inclus dans l'aire de répartition de l'espèce. Les résultats génétiques du Pigeon à couronne blanche seront comparés aux suivis satellite qui seront effectués au cours de ce projet de recherche afin de définir plus précisément le ou les unités de gestion de l'espèce, comme recommandé par Paetkau (1999) et Esteban et al. (2016).
- **La méthode de la repasse s'avère la plus efficace** et permet d'avoir une représentation plus juste des fluctuations démographiques au cours du temps. Cette méthode est donc recommandée pour les futurs suivis des deux espèces.
- **Le Pigeon à couronne blanche et le Pigeon à cou rouge ne fréquentent pas les mêmes habitats en Guadeloupe.** Ce résultat est peut-être transposable à d'autres territoires caribéens où les deux espèces résident, mais ceci mériterait de procéder à cette même étude au sein de ces territoires. Ces espèces, dont la plus grande menace est la perte de leurs habitats naturels respectifs, pourraient jouer le rôle d'espèce parapluie dans leurs écosystèmes respectifs. En effet, la gestion et la protection de ces espèces impliquent nécessairement la protection de leurs habitats.
- **Le suivi satellite des déplacements du Pigeon à couronne blanche via l'utilisation de balise GPS-Argos** a pu se mettre en place République Dominicaine. Cependant, nos résultats en demi-teinte nous amènent à repenser notre protocole. En ce sens, nous développons actuellement une collaboration avec The Cayman Turtle Centre, situé dans les Iles Caïmans. Cette entité est un centre de conservation de la faune sauvage qui possède un élevage de Pigeon à couronne blanche. Chaque année des individus sont relâchés afin de renforcer la population naturelle de ces îles. Nous souhaitons tirer avantage de cet élevage afin de réaliser une étude visant à évaluer la fiabilité des balises utilisées et l'impact de ces dernières sur le comportement des pigeons équipés. En outre, des tentatives de captures continueront en Guadeloupe.

- **L'amplification croisée des marqueurs microsatellite développés pour la Tourterelle à queue à carrée et le Pigeon à cou rouge semble envisageable pour le Pigeon à couronne blanche.** Afin de confirmer leur utilisation nous devons évaluer leur niveau de polymorphisme au sein de cette espèce.

Un des axes d'étude de ce projet de recherche n'a pas été présenté dans ce rapport d'activité, à savoir la comparaison de la diversité génétique présente et passée de l'espèce, car il est, à ce jour, peu avancé. Nous avons toutefois répertoriés tous les Muséums possédant des spécimens de Pigeon à couronne blanche et pris contact avec le Musée de l'Homme, chez qui nous devrions analyser les échantillons de tissu ancien. Cette structure, associée au Muséum d'Histoire Naturelle de Paris, possède des laboratoires équipés et dédiés exclusivement à l'analyse d'échantillons de ce type, sensibles à la moindre contamination. Ceci est un point très important dans la démarche de demande d'échantillons auprès des différents Muséums que nous avons pu lister car nous devons prouver notre capacité à analyser ce type d'échantillons, et donc prouver que nous possédons (ou avons accès) le matériel et les infrastructures nécessaires. Sur la base de nos recherches dans les bases de données internet, telle que VetNet ou directement sur les sites internet des muséums, nous avons été en mesure de trouver plus de 800 spécimens. Parmi eux, environ 600 se trouvent dans sept Muséums américains.



Références bibliographiques

- Aldredge MW, Pollock KH, Simons TR (2006) Estimating Detection Probabilities From Multiple-Observer Point Counts. *Auk* 123:1172
- Aldredge MW, Simons TR, Pollock KH (2007) A Field Evaluation of Distance Measurement Error in Auditory Avian Point Count Surveys. *J Wildl Manage* 71:2759–2766 .
- Bancroft GT, Bowman R (2001) White-crowned Pigeon (*Patagioenas leucocephala*). In: *Birds North Am.* Online. http://bna.birds.cornell.edu/BNA/account/White-crowned_Pigeon/RECOMMENDED_CITATION.html
- Bancroft GT, Bowman R, Sawicki RJ (2000) Rainfall, fruiting phenology, and the nesting season of white-crowned pigeons in the upper Florida Keys. *Auk* 117:416–426 .
- Barker FK, Bell JJ, Bogdanowicz SM, Bonatto SL, Cezilly F, Collins SM, Dubreuil C, Dufort MJ, Eraud C, Fuseya R, Heap EA, Jacobsen N, Madders M, Mcewing R, Michel AP, Mougeot F, Ogden RS, Orantes LC, Othman AS, Parent É, Pulido-Santacruz P, Rioux-Paré R, Roberts MF, Rosazlina R, Sakamoto T, De-León PS, Sévigny J-M, St-Onge P, Terraube J, Tingay RE, Tremblay R, Watanabe S, Wattier RA (2011) Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 June 2011-31 July 2011. *Mol Ecol Resour* 11:1124–1126 .
- Barron DG, Brawn JD, Weatherhead PJ (2010) Meta-analysis of transmitter effects on avian behaviour and ecology. *Methods Ecol Evol* 1:180–187 .
- Bart J, Earnst S (2002) Double Sampling To Estimate Density and Population Trends in Birds. *Auk* 119:36–45 .
- Bertram DF, MacDonald CA, O'Hara PD, Cragg JL, Janssen MH, McAdie M, Boyd WS (2016) Marbled Murrelet *Brachyramphus marmoratus* movements and marine habitat use near proposed tanker routes to Kitimat, BC, Canada. *Mar Ornithol* 44:3–9
- Blanco G, Frías Ó, Cuevas J a., González JL, Martínez F (2014) Commonness of not-so-common birds: the need for baseline knowledge of actual population size for the validation of population size predictions. *Bird Study* 61:351–60 .
- Brewster JP, Simons TR (2009) Testing the importance of auditory detections in avian point counts. *J F Ornithol* 80:178–182 .

Bridge ES, Thorup K, Bowlin MS, Chilson PB, Diehl RH, Fléron RW, Hartl P, Kays R, Kelly JF, Robinson WD, Wikelski M (2011) Technology on the Move: Recent and Forthcoming Innovations for Tracking Migratory Birds. *Bioscience* 61:689–698 .

Buckland ST, Marsden SJ, Green RE (2008) Estimating bird abundance: making methods work. *Bird Conserv Int* 18:91–108 .

Buckley PA, Massiah EB, Hutt MB, Buckley FG, Hutt HF (2009) *The Birds of barbados*. British ornithologists' Union

del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J, Cabot J (1997) *Handbook of the Birds of the World, Vol.4: Sandgrouse to cuckoos*. Barcelona: Lynx Edicions

Esteban R, Verborgh P, Gauffier P, Giménez J, Martín V, Pérez-Gil M, Tejedor M, Almunia J, Jepsen PD, García-Tíscar S, Barrett-Lennard LG, Guinet C, Foote AD, de Stephanis R (2016) Using a multi-disciplinary approach to identify a critically endangered killer whale management unit. *Ecol Indic* 66:291–300 .

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620 .

Exo K-M, Hillig F, Bairlein F (2019) Migration routes and strategies of Grey Plovers (*Pluvialis squatarola*) on the East Atlantic Flyway as revealed by satellite tracking. *Avian Res* 10:28

Frankham R (2005) Genetics and extinction. *Biol Conserv* 126:131–140 .

Fuglei E, Blanchet M-A, Unander S, Ims RA, Pedersen ÅØ (2017) Hidden in the darkness of the Polar night: a first glimpse into winter migration of the Svalbard rock ptarmigan. *Wildlife Biol* wlb.00241 .

Gaunt AS, Oring LW, Able KP, Anderson DW, Baptista LF, Barlow JC, Wingfield JC (1997) *Guidelines to the use of wild birds in research*

Gibbs D, Barnes E, Cox J (2001) *Pigeons and doves: a guide to the pigeons and doves of the world*. A&C Black

Hay DB (2008) Report of the White-Crowned Pigeon (*Patagioenas leucocephala*) working group. *J Caribb Ornithol* 21:110–112

Hillis DM, Moritz C, Mable BK, Olmstead RG (1996) *Molecular systematics*. Sinauer Associates Sunderland, MA

Kays R, Crofoot MC, Jetz W, Wikelski M (2015) Terrestrial animal tracking as an eye on life and planet. *Science* (80-) 348:aaa2478 .

Kirkpatrick C, Conway CJ, Hughes KM, Devos JC (2007) Probability of Detecting Band-Tailed Pigeons During Call-Broadcast Versus Auditory Surveys. *J Wildl Manage* 71:231–237 .

López-López P (2016) Individual-Based Tracking Systems in Ornithology: Welcome to the Era of Big Data. *Ardeola* 63:103–136 .

Monceau K, Cézilly F, Moreau J, Motreuil S, Wattier R (2013) Colonisation and diversification of the Zenaida Dove (*Zenaida aurita*) in the Antilles: phylogeography, contemporary gene flow and morphological divergence. *PLoS One* 8:e82189 .

Monceau K, Gaillard M, Harrang E, Santiago-Alarcon D, Parker PG, Cezilly F, Wattier RA (2009) Twenty-three polymorphic microsatellite markers for the Caribbean endemic Zenaida dove, *Zenaida aurita*, and its conservation in related *Zenaida* species. *Conserv Genet* 10:1577–1581 .

Moore JD, Andersen DE, Cooper TR, Duguay JP, Oldenburger SL, Stewart C AI, Kremetz DG (2019) Migratory connectivity of American woodcock derived using satellite telemetry. *J Wildl Manage* 83:1617–1627 .

Paetkau D (1999) Using genetics to identify intraspecific conservation units: a critique of current methods. *Conserv Biol* 13:1507–1509 . doi: 10.1046/j.1523-1739.1999.98507.x

Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conserv Biol* 17:230–237 .

Rivera-Milán FF, Boomer GS, Martínez AJ (2016) Sustainability assessment of Plain Pigeons and White-crowned Pigeons illegally hunted in Puerto Rico. *Condor* 118:300–308 .

Royle JA, Nichols JD (2003) Estimating abundance from repeated presence–absence data or point counts. *Ecology* 84:777–790 .

Rühmann J, Soler M, Pérez-Contreras T, Ibáñez-Álamo JD (2019) Territoriality and variation in home range size through the entire annual range of migratory great spotted cuckoos (*Clamator glandarius*). *Sci Rep* 9:6238 .

Schindel D, Stoeckle M, Milensky C, Trizna M, Schmidt B, Gebhard C, Graves G (2011) Project Description: DNA Barcodes of Bird Species in the National Museum of Natural History,

Smithsonian Institution, USA. *Zookeys* 152:87–91 .

Silva R, Afán I, Gil JA, Bustamante J (2017) Seasonal and circadian biases in bird tracking with solar GPS-tags. *PLoS One* 12:e0185344 .

Spielman D, Brook BW, Frankham R (2004) Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proc Natl Acad Sci* 101:15261–15264 .

Strong AM, Bancroft GT (1994) Postfledging dispersal of white-crowned pigeons: implications for conservation of deciduous seasonal forests in the Florida Keys. *Conserv Biol* 8:770–779 .

Strong AM, Johnson MD (2001) Exploitation of a seasonal resource by nonbreeding Plain and White-crowned pigeons: Implications for conservation of tropical dry forests. *Wilson Bull* 113:73–77 .

Sullivan JD, Takekawa JY, Spragens KA, Newman SH, Xiao X, Leader PJ, Smith B, Prosser DJ (2018) Waterfowl Spring Migratory Behavior and Avian Influenza Transmission Risk in the Changing Landscape of the East Asian-Australasian Flyway. *Front Ecol Evol* 6:1–14 .

Sutherland WJ, Newton I, Green RE (2004) *Bird Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques*

Thomas L, Buckland ST, Rexstad EA, Laake JL, Strindberg S, Hedley SL, Bishop JRB, Marques TA, Burnham KP (2010) Distance software: design and analysis of distance sampling surveys for estimating population size. *J Appl Ecol* 47:5–14 .

Vardanis Y, Nilsson J-Å, Klaassen RHG, Strandberg R, Alerstam T (2016) Consistency in long-distance bird migration: contrasting patterns in time and space for two raptors. *Anim Behav* 113:177–187 .

Vilstrup JT, Mullins TD, Miller MP, McDearman W, Walters JR, Haig SM (2018) A simplified field protocol for genetic sampling of birds using buccal swabs. *Wilson J Ornithol* 130:326–334 .

Ware DM (1997) White-crowned pigeon north of its known range. *Florida F Nat* 25:141–142

Annexes

Annexe 1 : Tableau utilisé pour reporter les mesures biométriques des oiseaux faites sur le terrain

Investigator		
Location		
Date		
Time of day		
Trap		
Species		
#Feathers sample		
#Buccal swab sample		
#Blood sample		
# Metal ring		
Color Rings	LEFT (L)	RIGHT (R)
	MESURE 1	MESURE 2
Color of nails		
Right Tarsus length		
Left Tarsus length		
Right tarsus width		
Left Tarsus width		
Tarsus Plumage length		
Bill colour		
Bill length		
Bill width at nostrils		
Bill width at tip		
Head + bill length		
Color of Lorum		
Color of eyes		
Right wing length		
Left wing length		
Tail length		
Weight		
Ectoparasites	YES	NO
Ectoparasites #		
Comments		

Annexe 2 : Fiches de protocole pour la pose des balises GPS

Technique de pose d'un système balise GPS sur *Columbidae*

1/ Matériel nécessaire



→ Un système balise GPS



→ 50 cm de Ficelle Téflon plate largeur 5mm



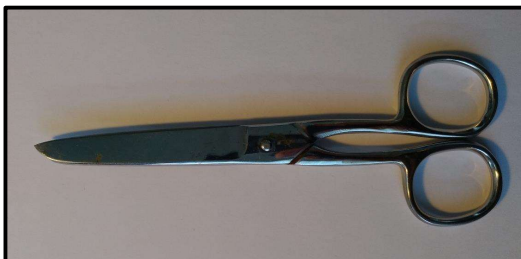
→ 1cm de gaine plastique Souple diamètre 2mm



→ Aiguille à bouilletes



→ Colle super glue en gel



→ Ciseaux



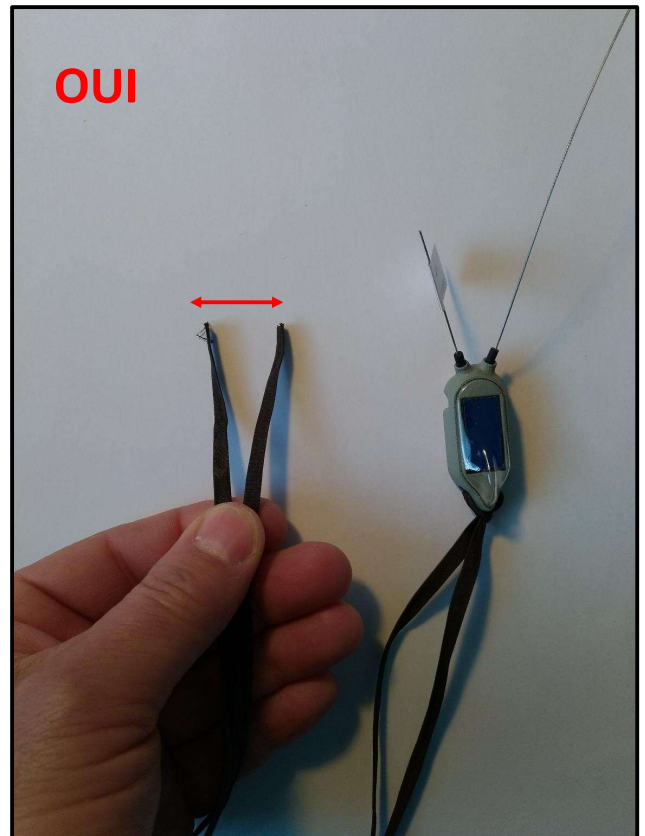
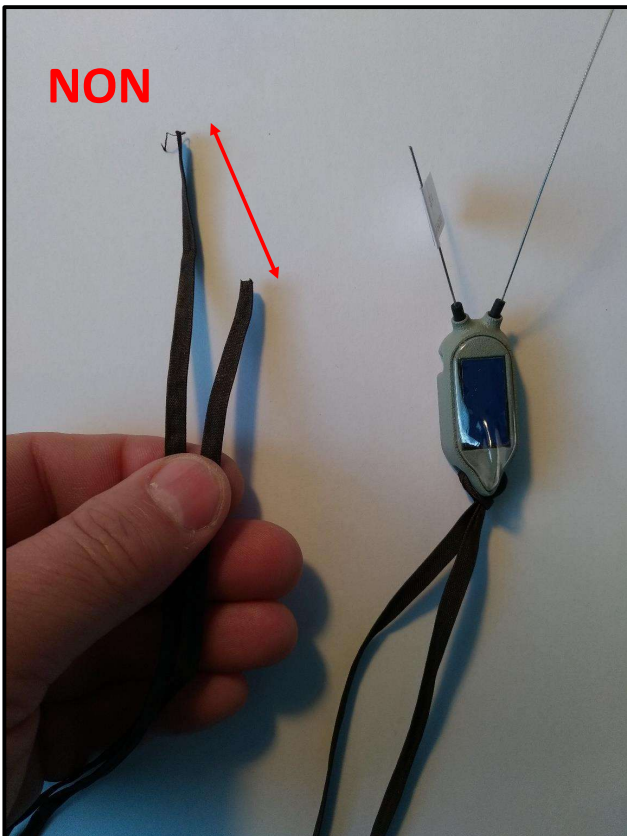
→ Petite chaussette pour masquer les yeux de l'oiseau

Scotch →



Technique de pose d'un système balise GPS sur *Columbidae*

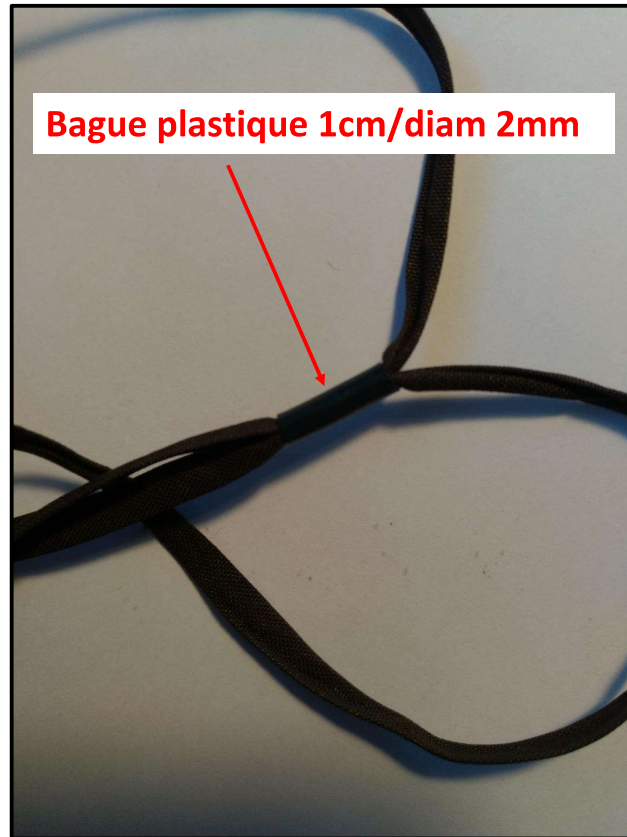
1/ Passer le Téflon dans le trou ce trouvant à l'avant du système



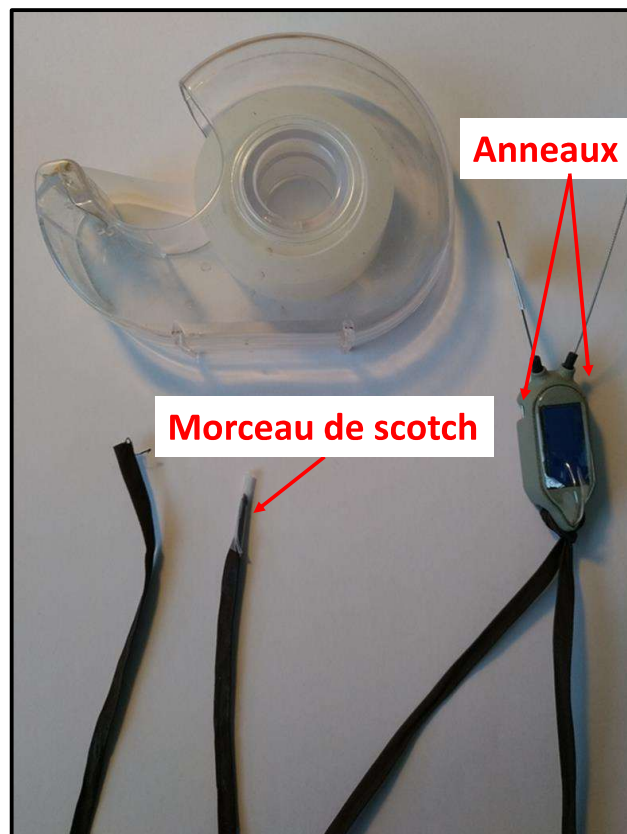
Important, bien vérifier que la ficelle soit bien centrée sur le système

Technique de pose d'un système balise GPS sur *Columbidae*

2/ Positionner la bague en plastique, laisser suffisamment de place pour passer aisément le coup de l'oiseau



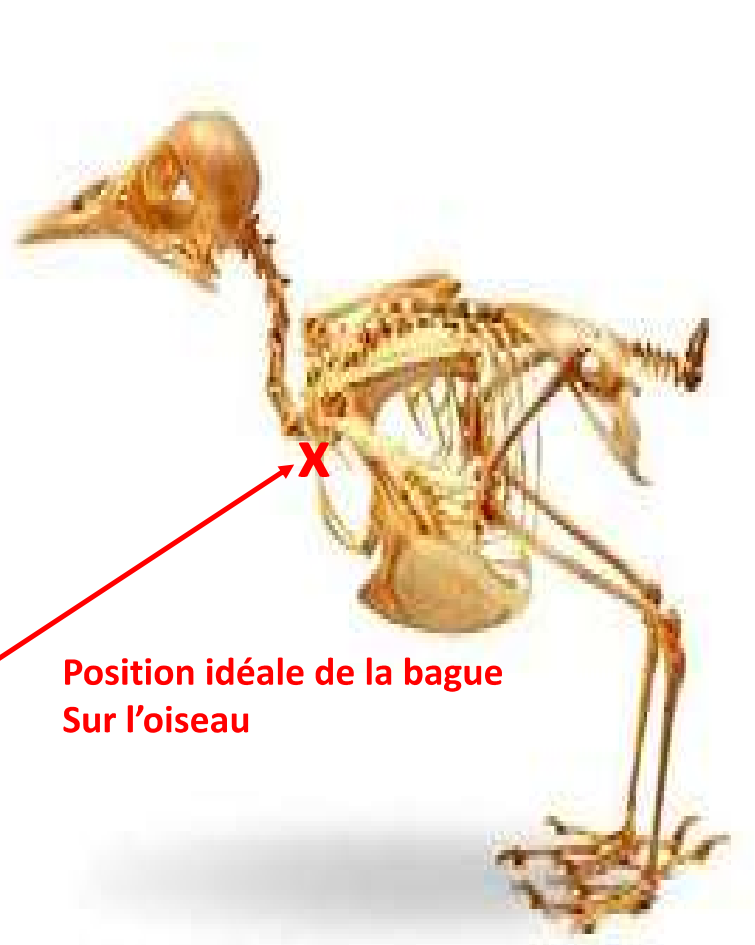
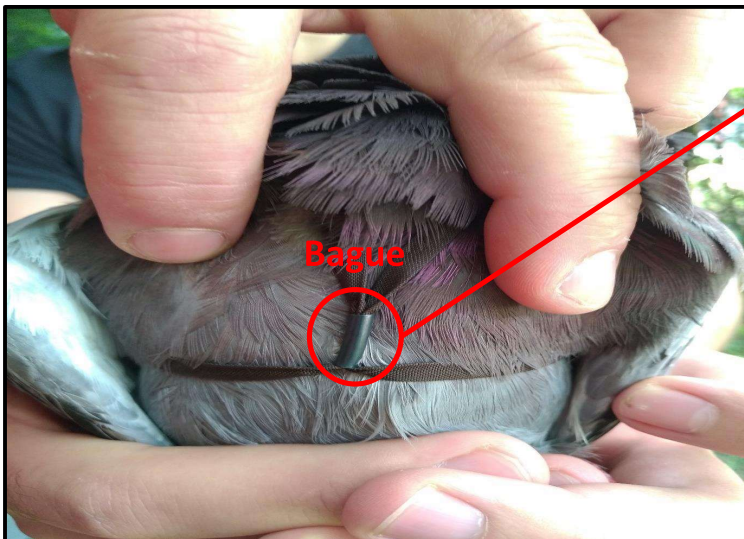
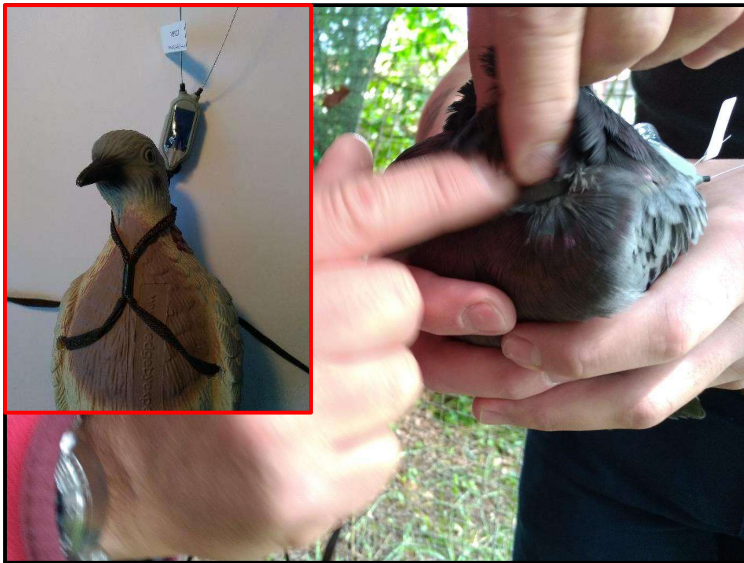
3/ Mettre des bouts de scotch aux deux extrémités de la ficelle pour l'arrêter et la rigidifier en vue du passage dans les anneaux positionnés de chaque côté de la balise GPS



Technique de pose d'un système balise GPS sur *Columbidae*

4/ Idéalement positionner un masque occultant (petite chaussette) sur la tête de l'oiseau le temps de la manipulation.

5/ Mettre la tête de l'oiseau dans la boucle se trouvant entre le système GPS et la bague plastique. Bien faire passer la ficelle sous les plumes du cou de l'oiseau, bien positionner la bague au niveau de la base du cou.



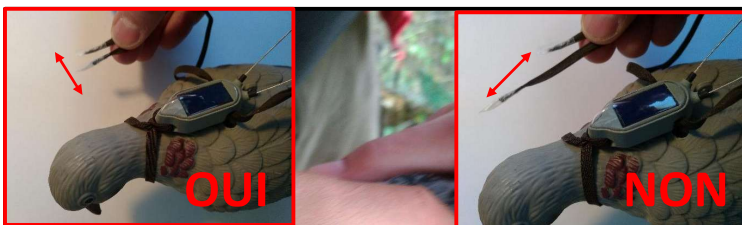
Position idéale de la bague
Sur l'oiseau

Technique de pose d'un système balise GPS sur *Columbidae*

6/ Positionner les bretelles du système en passant la ficelle sous les ailes de l'oiseau en ne bloquant surtout aucune plume de l'aile.



Passer la ficelle dans les anneaux ce trouvant à l'arrière du système GPS

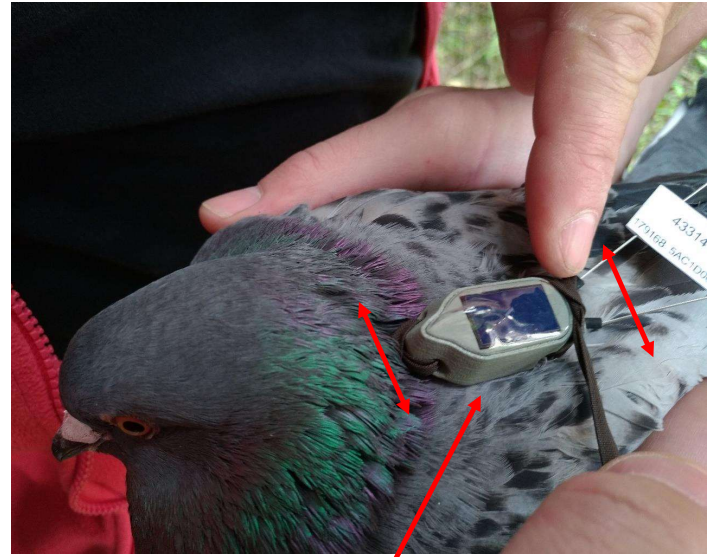


Vérifier que la longueur de la ficelle est bien toujours la même de chaque côté de l'oiseau avant de faire le nœud



Technique de pose d'un système balise GPS sur *Columbidae*

7/ Fixer le système à l'aide d'un nœud au dessus (il ne doit pas être en contact directe de l'oiseau sinon abrasion à long terme).



Vérifier que le système est bien positionné et serré (ne doit pas bouger devant ni derrière sur le dos de l'oiseau).



Au niveau du positionnement sur l'oiseau, on ne doit pas pouvoir mettre un doigt entre la ficelle et l'oiseau, Il ne peut pas y avoir plus d'un demi doigt entre la ficelle et l'oiseau ou le diamètre d'un stylo *Bic*.



Une fois bien positionné, mettre un point de colle sur le nœud pour l'assurer, mouiller pour accélérer le séchage, faire un deuxième nœud par-dessus le premier, mettre un point de colle et couper la ficelle à 3mm du système

***Rapport de stage de Mme Emeline Charbonnel, encadrée
par M. Christopher Cambrone et M. Etienne Bezault***

MASTER EN SCIENCES – TECHNOLOGIES – SANTÉ
MENTION BIODIVERSITÉ, ÉCOLOGIE, ÉVOLUTION

Caractérisation de marqueurs microsatellites et
amplification croisée pour l'étude des colombidés antillais

CHARBONNEL Emeline



Directeurs de stage :

BEZAULT Etienne – CAMBRONE Christopher

Stage effectué du 14 janvier au 23 février 2019.

UMR BOREA – Université des Antilles, Pôle de Guadeloupe –
Campus de Fouillole, 97110 Pointe-à-Pitre

RESUME

La biologie et l'écologie des espèces de colombidés de la Caraïbe dont la majorité présente un statut de conservation UICN sont peu documentés. De par leur importance au sein des écosystèmes il s'avère important de les étudier par des approches d'écologie moléculaire. Parmi les marqueurs microsatellites déjà développés pour deux espèces, *Zenaida aurita* et *Patagioenas squamosa*, un panel de 20 marqueurs a été testé sur 6 espèces antillaises. La mise au point des conditions d'amplification, nous a permis d'obtenir un taux d'amplification hétérosécifique de 62%. De plus, nous avons testé l'amplification de ces marqueurs à partir de sources d'ADN issues de prélèvements plus ou moins intrusifs (doigt et plumes). Le taux d'amplification obtenu à partir d'ADN extrait de plume reste élevé (73%). Ces résultats pourront être mis à profit pour l'étude de ces populations, à l'échelle de la Caraïbe.

Mots-clés : Colombidés, Marqueurs microsatellites, Amplification hétérosécifique, Génétique des populations, Conservation.

ABSTRACT

It is of prime importance to conduct conservation biology studies on Caribbean colombid species, particularly threatened species. Microsatellite markers have already been developed for two species, *Zenaida aurita* and *Patagioenas squamosa*. We tested a set of 20 markers on 6 Caribbean *Colombidae* species, from different *genus*. The development of amplification conditions, on these species, led us to obtain a heterospecific amplification rate of 62%. In addition, we assessed heterospecific amplification from DNA extracted from different tissues requiring more or less intrusive sampling methods: toes vs feathers. Although we pointed out the presence of a "feather effect", the overall amplification rate obtained from feather extracted DNA was relatively high (73%). These results could be useful for the future studies of these populations at the scale of the Caribbean.

Keywords: *Colombidae*, Microsatellite markers, Heterospecific amplification, Population genetics, Conservation.

SOMMAIRE

1. Introduction	p.1
2. Matériels et méthodes	p.3
2.1. Echantillonnage	p.3
2.2. Extraction de l'ADN	p.4
2.3. Quantification de l'ADN	p.5
2.4. Amplification croisée	p.5
2.4.1. Choix des marqueurs	p.5
2.4.2. PCR	p.6
3. Résultats	p.9
4. Discussion	p.14
4.1. Amplification croisée	p.14
4.2. Vers de nouvelles méthodes d'échantillonnage, pour de la biologie de la conservation	p.15
4.3. Perspectives	p.16
5. Remerciements	p.18
6. Bibliographie	p.19

INTRODUCTION

La conservation de la biodiversité devient essentielle à l'égard des nombreuses menaces qu'elle reçoit (Groombridge & Jenkins 2002 ; Frankham et al. 2004 ; Madden 2004 ; Bertorelle et al. 2009 ; Scott Mills 2013). D'origine anthropique, telles que l'érosion et la fragmentation des habitats, la surexploitation des ressources naturelles, les espèces exotiques envahissantes, la pollution et plus récemment le dérèglement climatique, ces menaces ont été identifiées comme responsables du déclin, voire de la disparition, de nombreuses populations d'espèces animales et végétales (Groombridge & Jenkins 2002 ; Bertorelle et al. 2009 ; Ceballos et al. 2017). C'est ainsi que nous faisons face actuellement à la sixième extinction de masse de l'histoire de la Terre, caractérisée par une érosion rapide de la biodiversité (Frankham et al. 2004 ; Ceballos et al. 2017).

La biologie de la conservation est une discipline scientifique récente et fortement pluridisciplinaire (Soulé 1985 ; Frankham et al. 2004). Celle-ci vise, avant tout, à étudier et conserver la biodiversité, aux niveaux tant écosystémique, que spécifique et génétique, et cela à différentes échelles spatiales. Un nombre croissant d'études de biologie de la conservation utilise des outils moléculaires et les théories de la génétique évolutive, et ceci chez différents groupes tant végétaux (Provan et al. 2008) qu'animaux (Schmidt et al. 2011 ; Bühler & Dubey 2017). La diversité génétique peut être en effet considérée comme un indicateur du potentiel adaptatif des espèces pour répondre aux changements environnementaux (Frankham et al. 2004). Pour comprendre les circonstances et les causes de ces déclins, les biologistes de la conservation s'appuient, entre autres, sur des études de génétique des populations, mais aussi de biogéographie et sur la définition d'unités de gestion¹ (Frankham et al. 2004 ; Bertorelle et al. 2009). Ainsi, il est alors possible de mettre en place des plans de restauration, protection et gestion cohérents à l'écologie d'une espèce ou d'une communauté (Soulé 1985 ; Frankham et al. 2004 ; Bertorelle et al. 2009).

L'étude de la diversité génétique d'une espèce s'est largement démocratisée grâce au développement de marqueurs moléculaires et à la simplification de leur utilisation, et parmi eux les marqueurs microsatellites (Allendorf & Luikart 2007 ; Bertorelle et al. 2009 ; Scott Mills 2013). Les microsatellites, ou STR, sont de courtes séquences d'ADN répétées en tandem et dispersées dans le génome. Ce sont des *locus* co-dominants, hyper-variables avec

¹ **Unités de gestion** (Management Units) : « populations d'individus conspécifiques parmi lesquels le degré de connectivité est suffisamment faible pour que chaque population soit surveillée et gérée séparément », traduit de l'anglais Palsboll et al. (2006) inspiré de Taylor & Dizon (1999).

un taux de mutation 10 000 à 100 000 fois plus élevé que le restant du génome (i.e. allèles correspondant à des nombres différents de répétitions de motifs dont l'apparition est due à des glissements lors de la réplication) (Kretschmer et al. 2017; Allendorf & Luikart 2007). Ces loci sont héréditaires, mendéliens et possèdent une diversité allélique importante et par conséquent un taux de polymorphisme nécessaire pour mesurer les variations des fréquences alléliques et génotypiques au sein, ou entre, des populations (Bezault et al. 2012). Ce sont autant de qualités qui font des microsatellites des marqueurs génétiques intéressants à exploiter en biologie de la conservation (Frankham et al. 2004 ; Scott Mills 2013 ; Kretschmer et al. 2017), comme en témoignent de nombreuses études sur différentes espèces d'oiseaux (Busch et al. 2005 ; Banhos et al. 2008 ; Chan et al. 2008 ; Monceau et al. 2013).

La famille des colombidés (*Columbidae* ; pigeons et tourterelles) est constituée de 304 espèces décrites, réparties sur tous les continents, à l'exception de l'Antarctique (Gibbs et al. 2001). Cependant, une proportion importante de ces espèces sont à ce jour en déclin, voire en danger d'extinction pour près de 20% d'entre elles (Bennett & Owens 1997 ; Walker 2007). Divers facteurs extrinsèques contribuent à expliquer ce phénomène, notamment la fragmentation et la perte d'habitat, l'introduction de prédateurs et de pathogènes, ou encore un prélèvement cynégétique non-maîtrisé (Owens & Bennett 2000 ; Walker 2007). Les données disponibles sur l'écologie et la démographie des populations des colombidés restent fragmentaires et éparpillées relativement aux autres familles aviaires (Walker 2007 ; Renaud 2016). Ceci est particulièrement vrai dans la région Caraïbe, où 9 genres et 31 espèces sont présents (Walker 2007) (ANNEXE 1), dont certaines sont endémiques comme le Pigeon à couronne blanche, *Patagioenas leucocephala*, ou encore le Pigeon à cou rouge, *P. squamosa*. Parmi elles, une espèce est en danger critique d'extinction, une est en danger, deux sont classées vulnérables et trois sont presque menacées et 23 en préoccupation mineure, selon la liste rouge de l'IUCN² (BirdLife International 2019). Seule la Tourterelle turque, *Streptopelia decaocto*, venue d'Orient, est classée parmi les espèces exotiques envahissantes dans la région Caraïbe et, d'autres régions du globe (Bagi et al. 2018).

Dans ce contexte, il apparaît primordial d'évaluer les populations de colombidés antillais, en termes de densité, de diversité, de répartition géographique et de connectivité. A cette fin, il est donc nécessaire de disposer de marqueurs moléculaires permettant de réaliser des analyses de génétique des populations. Toutefois actuellement peu de marqueurs sont

² IUCN : International Union for Conservation of Nature

disponibles pour l'ensemble des espèces de colombidés de la Caraïbe. Ainsi, seuls vingt marqueurs microsatellites ont été développés pour deux espèces de colombidés antillais, la Tourterelle à queue carrée, *Zenaida aurita* (Monceau et al. 2013) et le Pigeon à cou rouge, *P. squamosa* (Cezilly et al., non publié ; Barker et al. 2011). Leur utilisation a été testée sur quatre espèces de pigeons et tourterelles antillais, dont le Pigeon à couronne blanche, *P. leucocephala*, la Tourterelle à ailes blanches, *Zenaida asiatica*, la Tourterelle turque, *S. decaocto*, la Colombe rouviolette, *Geotrygon montana*, en réalisant des amplifications interspécifiques (ou croisées). En effet, il est aujourd'hui plus rapide et moins coûteux d'utiliser des marqueurs hétérospécifiques, pour évaluer des populations, que de cloner des marqueurs pour chaque espèce étudiée (Mukesh & Sathyakumar 2011). Ce sont des expériences déjà pratiquées chez de nombreux groupes d'organismes et particulièrement les oiseaux (Primmer et al. 1996) et même chez les colombidés (Mukesh & Sathyakumar 2013).

Considérant le manque de données sur les colombidés antillais (Walker 2007 ; Renaud 2016), et les menaces qui les concernent (Owens & Bennett 2000 ; Walker 2007), nous avons mis en place un protocole d'amplification hétérospécifique à partir de marqueurs microsatellites mis à disposition dans les banques de données (GenBank), afin de pouvoir disposer de marqueurs utilisables à des fins d'écologie moléculaire sur un plus large panel d'espèces de cette famille. De plus l'amplification de ces marqueurs a également été testée à partir de deux méthodes de prélèvements ADN plus ou moins intrusives (doigts et plumes).

MATERIELS ET METHODES

Echantillonnage

L'étude porte sur un panel de 6 espèces de colombidés antillais, appartenant à 4 genres différents, et incluant 6 espèces, dont 5 endémiques de la région (*i.e.* *G. montana*, *P. leucocephala*, *P. squamosa*, *Z. aurita* et *Z. asiatica*) et une espèce exotique envahissante (*i.e.* *S. decaocto*). Nous étudierons un individu par espèce, à l'exception des espèces, *S. decaocto* et *P. leucocephala*, pour lesquelles deux individus ont été sélectionnés. Le nombre total d'individus étudiés s'élève donc à 8, pour lesquels nous avons obtenus des prélèvements de tissus de doigts, fournis par les chasseurs locaux, de Guadeloupe et Martinique, ainsi que par l'ONCFS.

De plus, considérant le statut de protection particulier de ces espèces, nous avons également cherché à tester l'utilisation de ces marqueurs génétiques à partir de prélèvements

non-intrusifs. Nous avons ainsi réalisé une comparaison, entre des prélèvements de tissus de doigts (échantillonnage intrusif) et des prélèvements issus de plumes (échantillonnage non-intrusif), réalisée sur 4 individus de l'espèce *P. leucocephala* pour lesquels nous disposions des 2 types de prélèvements.

Extraction de l'ADN

Nous avons extrait l'ADN à partir d'échantillons de doigts et de plumes en utilisant un kit d'extraction par colonne et membrane de silice (NucleoSpin® Tissue, Macherey-Nagel), comme illustré en figure 1, auquel nous avons apporté quelques modifications (cf. ANNEXE 2). Ce type d'extraction d'ADN se déroule en 4 étapes successives. Dans un premier temps les tissus et les cellules sont lysés [1]. Cela consiste à détruire les membranes cellulaires sous l'action d'un agent mécanique, chimique et/ou biologique (tampon T1), et conjointement la protéinase K permet la dénaturation des protéines et complexes nucléoprotéiques. L'ajout de sels, ou chaotropes, permet une dénaturation totale des macromolécules restantes (tampon B3). Dans l'étape suivante [2], nous avons ajouté de l'éthanol, afin de précipiter l'ADN qui pourra alors être retenu sur une membrane de silice. La membrane et l'ADN retenu ont ensuite été lavés [3] afin d'enlever tous les débris cellulaires et/ou moléculaires formés lors des étapes précédentes. Pour cela, d'autres chaotropes sont utilisés ainsi que de l'alcool (tampons BW et B5). Les débris cellulaires s'écoulent dans le tube de collecte, tandis que l'ADN, maintenant purifié, reste fixé à la membrane. L'ajout d'un tampon d'éluion (tampon BE) nous permet enfin la collecte de l'ADN [4].

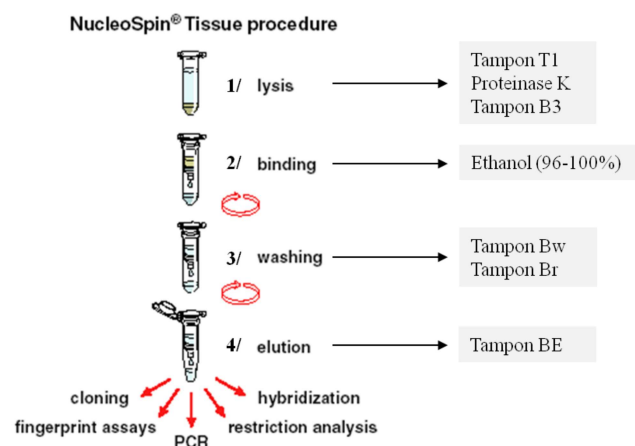


Figure 1 : Protocole d'extraction d'ADN à partir du kit NucleoSpin® pour tissu de Macherey-Nagel. Les flèches rouges enroulées représentent une étape de centrifugation (11.000xg).

Pour les échantillons de plume, nous avons utilisé le même type de kit d'extraction adapté aux échantillons de faible quantité d'ADN (NucleoSpin® Tissue XS, Macherey-Nagel).

Quantification de l'ADN

Pour quantifier la concentration en ADN présente dans les échantillons extraits et connaître la qualité des ADN extraits, nous avons utilisé deux méthodes. La quantification des concentrations d'ADN extrait a été réalisée par approche fluorométrique qui mesure l'absorbance de l'ADN. A partir d'une gamme étalon, il est possible de déterminer la concentration en ADN des échantillons. Le protocole détaillé se trouve en ANNEXE 3A. Cette méthodologie peut être réalisée grâce au fluoromètre Qubit 4 (Invitrogen - ThermoFisher Scientific Inc.) permettant de mesurer la concentration d'ADN contenue dans des échantillons un à un, ou bien grâce à un thermocycleur quantitatif (qPCR - ThermoFisher Scientific Inc.), permettant la quantification simultanée de jusqu'à 96 échantillons. D'après les résultats obtenus, présentés en ANNEXE 3B, nous avons ajusté les concentrations d'ADN pour obtenir une concentration d'environ 200ng/μL (solutions « mères » d'ADN pour stockage), puis réalisé des dilutions au dixième afin d'obtenir des solutions « de travail » à 20ng/μL (pour réalisation des PCR).

Parallèlement, nous avons évalué la qualité de l'ADN, sur gel d'électrophorèse (cf. Boite A), afin de connaître l'état de fragmentation des molécules d'ADN extraits (ANNEXE 3C).

Amplification hétérospécifique

Choix des marqueurs

A ce jour, les banques de données (GenBank et Molecular Ecology Resources Databases) répertorient au total 38 marqueurs microsatellites clonés à partir de deux espèces de colombidés présentes aux Antilles, respectivement *Z. aurita* et *P. squamosa* (Monceau et al. 2009 ; Cezilly et al. non publié ; Barker et al. 2011). Dans le cadre de cette étude, nous avons sélectionné, parmi cet ensemble, un lot de marqueurs issu en chacune de ces espèces, en privilégiant ceux de *P. squamosa*, espèce phylogénétiquement plus proche de nos espèces d'intérêt que *Z. aurita*.

Les vingt-trois marqueurs déterminés chez *Z. aurita* correspondent tous à des loci polymorphes pour cette espèce et ont été testés sur d'autres colombidés du genre *Zenaida* et l'espèce *Colombina passerina* (Monceau et al. 2009). D'après les résultats obtenus par Monceau et al. (2009), nous avons sélectionnés les marqueurs pour lesquels le

polymorphisme et le taux d'amplification interspécifique étaient les plus élevés. Nous avons ainsi sélectionné six marqueurs : ZaA5 (GF091766), ZaD121 (GF091765), ZaD108 (GF091762), ZaD7 (GF091757), ZaD1 (GF091754), ZaA113 (GF091747). Les marqueurs développés pour *P. squamosa* n'ont été, à ce jour, jamais testés chez d'autres espèces de colombidés (Barker et al. 2011). Nous les avons donc tous sélectionnés, à l'exception d'un, car très peu polymorphe chez *P. squamosa*. Il s'agit des loci PsD107 (GF111047), PsD103 (GF111046), PsD102 (GF111045), PsD10 (GF111044), PsD5 (GF111043), PsD4 (GF111042), PsD2 (GF111041), PsC128 (GF111040), PsC120 (GF111039), PsC117 (GF111038), PsC103 (GF111037), PsC101 (GF111036), PsC11 (GF111035), PsA130 (GF111034). Les vingt marqueurs sélectionnés pour cette étude, et des informations supplémentaires (motif du microsatellite, amorces et taille du marqueur, température de demi-dénaturation T_m), sont répertoriés en ANNEXE 4.

PCR

La réaction de polymérisation en chaîne, ou PCR (« polymerase chain reaction »), est une technique d'amplification des acides nucléiques qui rend, entre autres, possible une analyse directe de certaines séquences cibles d'ADN ou d'ARN, à partir d'amorces spécifiques de ces régions.

Le principe repose sur le processus de réplication de l'ADN. L'ADN est synthétisé, dans le sens 5'-3', grâce à l'ADN polymérase à partir d'un brin d'ADN matrice à amplifier. Des amorces, s'hybridant de part et d'autre de la séquence d'intérêt, sont nécessaires pour initier le processus. Ainsi, la séquence d'intérêt est multipliée un très grand nombre de fois, ce qui facilite les analyses futures, tel que le séquençage. A ces éléments sont ajoutés des nucléotides (dNTPs) permettant la construction du nouveau brin, une solution tampon qui fournit un environnement chimique optimal à la Taq polymérase, du chlorure de magnésium ($MgCl_2$) et parfois de l'albumine de sérum bovin, ou BSA (Bovine serum albumin) qui renforcent la réaction. Les conditions PCR sont propres à chaque marqueur, ou groupe de marqueurs. Ainsi, afin de maximiser les résultats d'amplification, nous avons ajusté certains paramètres du protocole PCR tels la température d'hybridation des amorces spécifiques, la durée de chaque étape PCR et la quantité de chaque produit réactionnel (principalement $MgCl_2$). C'est ainsi que nous avons réalisé une série de tests.

La PCR se déroule en trois principales étapes. La dénaturation de l'ADN (1), par chauffage à 94-95°C permet de rompre les liaisons hydrogènes des molécules. Puis par

abaissement de la température, variant de 50 à 60°C, les amorces peuvent s'hybrider au brin matrice, c'est l'étape d'hybridation (2). Enfin, la polymérisation de l'ADN, et formation du brin complémentaire, est réalisée à 72°C, lors de l'étape d'élongation (3). Ces 3 étapes forment un cycle et sont répétées plusieurs fois (de 30 à 40 cycles). L'ensemble des cycles est précédé par une étape initiale de dénaturation à 94-95°C, et est suivi d'une dernière étape d'élongation finale à 72°C

Nous avons dans un premier temps réalisé une PCR (protocole détaillé dans le tableau 1) dans les conditions les plus proches de celles fournies par Monceau et al (2009). Il est suggéré d'utiliser une température d'hybridation de 46°C. Or, à cette température, très basse, il est très probable que les amorces ne se fixent pas spécifiquement au locus correspondant. Ainsi, nous avons fait le choix de tester les vingt marqueurs à une température d'hybridation de 48°C et 55°C. Pour cette expérience, nous avons utilisé une Taq Polymérase, et la solution tampon correspondante, de la marque Solis BioDyme.

Tableau 1 : Protocole PCR testé sur 8 individus, pour 20 marqueurs. Température d'hybridation de 48 et 55°C, ou avec un gradient thermique.

Mix PCR	Taq Polymérase	0.05 U/μL
	Solution tampon	1.0 X
	Amorce (x2)	0.20 μM (x2)
	dNTPs	0.200 mM
	MgCl ₂	2.50 mM
	BSA	0.05 mg/μL
	H ₂ O	Qsp = 7 μL
ADN		3μL

95°_5' + (95°_30"; 48°_45"; 72°_1'00") x35 + 72°_15'
95°_5' + (95°_30"; 55°_45"; 72°_1'00") x35 + 72°_15'
95°_5' + (95°_30"; gradient_45"; 72°_1'00") x35 + 72°_15'

De plus pour les marqueurs ne présentant pas un patron d'amplification satisfaisant à l'une ou l'autre des températures testées initialement, une PCR avec un gradient de température a aussi été réalisée, dans les mêmes conditions que précédemment (tableau 1) afin de connaître la température d'hybridation la plus adaptée à chaque marqueur (i.e. taux d'amplification élevé et absence d'aspécificité). Ainsi, nous avons testé trois températures en plus de celles testées précédemment : de la moins à la plus stringente, 52°C, 54°C et 58°C.

Nous avons enfin testé l'amplification des marqueurs ayant été mis au point favorablement comparativement à partir d'ADN extrait à partir de plumes et de doigts. En revanche, le protocole PCR a du être modifié. En effet, la présence d'inhibiteurs, qui risquent

de bloquer la PCR est fréquente dans l'ADN extrait de plumes. Ainsi, pour palier leur effet, nous avons utilisé moins d'ADN (1 µL au lieu de 3 µL). Ce test est réalisé sur quatre individus, pour lesquels nous avons des échantillons de plumes et de doigts, afin d'être en mesure de comparer l'efficacité de la PCR selon l'origine de l'ADN.

Tableau 2 : Protocole PCR testé sur 8 échantillons issus de 4 individus (4 échantillons de plumes et 4 échantillons de doigts), pour 11 marqueurs. Température d'hybridation de 55°C.

Mix PCR	Taq Polymérase	0.05 U/µL
	Solution tampon	1.0 X
	Amorce (x2)	0.20 µM (x2)
	dNTPs	0.200 mM
	MgCl ₂	2.50 mM
	BSA	0.05 mg/µL
	H ₂ O	Qsp = 9 µL
ADN		1 µL

95°_5' + (95°_30"; 55°_45"; 72°_1'00") x35 + 72°_15'
--

Les résultats d'amplification sont visualisés sur gel d'électrophorèse, à partir duquel il est possible d'évaluer la présence/absence d'amplification, la taille de l'amplicon et sa qualité (cf. Boite A). A partir de ces données qualitatives, nous avons calculé des taux d'amplification des marqueurs pour chaque espèce, chacun des genres et clades.

BOITE A

Electrophorèse

L'électrophorèse est une méthode de séparation des molécules organiques dans un gel (agarose, amidon, acrylamide) sous l'action d'un champ électrique, en fonction de leur charge et taille. En ce qui concerne l'ADN, chargé négativement, les molécules vont migrer sous l'effet du champ électrique (100V), étant plus ou moins retenues par la densité du gel. Ainsi, plus les molécules d'ADN seront longues et moins elles migreront rapidement.

Les résultats de quantification et d'amplification sont lus sur gel d'agarose à 3%, *via* électrophorèse, dans lequel nous avons ajouté 2 µL de Midori Green. Ce fluorochrome permet de révéler les acides nucléiques sous lumière UV. Aux extraits d'ADN ou aux produits PCR, pour lesquels nous avons utilisés 3 µL, ont été ajoutés 1 µL de solution de charge, contenant du bleu de bromophénol et du glycérol, et 2 µL d'eau. Le bleu de bromophénol permet de suivre la bonne migration des molécules dans le gel et le glycérol permet de lester l'échantillon afin de faciliter son dépôt dans les puits d'électrophorèse.

Pour l'analyse qualitative des solutions d'ADN extrait, selon la distance de migration des molécules d'ADN dans le gel, il est possible de connaître leur état de dégradation. Plus la migration dans le gel est importante, plus les molécules sont fragmentées – car de faible poids moléculaire – et donc dégradées, ce qui peut être comparé à la migration d'un marqueur de poids moléculaire (ou *ladder*) composé de fragments d'ADN de différentes tailles (en pb). De plus, de manière très relative, il est possible d'apprécier la concentration en ADN des échantillons en fonction de l'intensité des bandes. Une bande plus intense est susceptible de contenir une plus forte concentration d'ADN.

Afin de connaître les résultats d'amplification, il est nécessaire d'observer la présence de bandes. Dans le cas contraire, il n'y aura pas eu d'amplification. La taille des fragments amplifiés peut être estimée comparativement à la migration d'un marqueur de poids moléculaire (ou *ladder*). De plus, la présence de plusieurs bandes de migration, pour un marqueur, est signe d'aspécificité : dans ce cas les amorces utilisées n'amplifient pas uniquement la séquence d'intérêt mais aussi d'autres parties du génome, ce qui peut nuire à la lecture des résultats.

RESULTATS

Différents profils d'électrophorèse ont été obtenus suite à l'amplification croisée de l'ensemble des 20 marqueurs sélectionnés avec le panel de test composé de 8 individus appartenant à 6 espèces de colombidés de la Caraïbe. Les photographies des gels d'électrophorèse montrant l'ensemble de ces résultats sont présentées en ANNEXE 5.

Pour certains marqueurs, nous constatons la présence d'amplification pour les deux températures d'hybridation testées, 48 et 55°C (figure 2A). Cette amplification est spécifique au locus ciblé, car la distance de migration correspond à la taille attendue du locus. De plus, l'intensité élevée des bandes témoigne d'un important taux d'amplification. Ceci a été obtenu pour les marqueurs ZaA5, ZaD121, ZaA113, PsD102, PsD10, PsD5 et PsD4 (ANNEXE 5A).

Dans d'autres cas, nous avons obtenus des résultats différents selon la température d'hybridation. En effet, une température d'hybridation de 48°C est souvent trop peu stringente. Nous constatons alors une amplification aspécifique à faible température, ce qui n'est pas le cas à température d'hybridation plus élevée/stringente, de 55°C (figure 2B). A cette température, les bandes sont plus ou moins intenses et à une distance de migration

correspondant à la taille attendue du locus amplifié. Ceci est observable pour les loci PsD107, PsD2, PsC120 et PsC117 (ANNEXE 5A).

Enfin, une troisième situation s'est présentée pour les marqueurs ZaD108, ZaD7, ZaD1, PsD103, PsC128, PsC103, PsC101, PsC11 et PsA130 (ANNEXE 5A) où quelle que soit la température d'hybridation, 48 ou 55°C, les amplifications présentent des patterns aspécifiques. En effet, plusieurs bandes, très souvent sur une gamme de taille assez étendue, et généralement de faible intensité sont présentes (figure 2C).

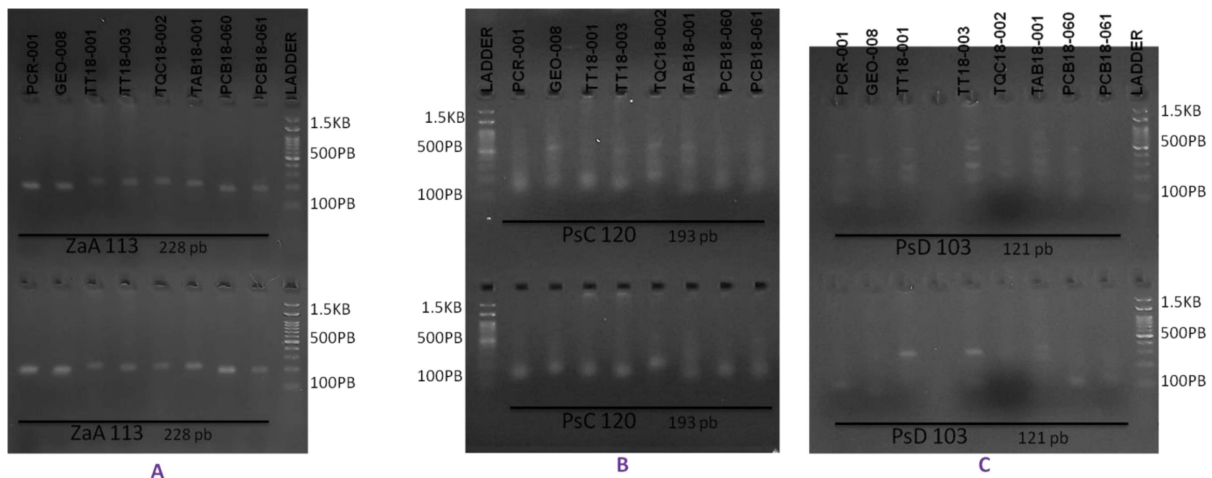


Figure 2 : Exemples de gels d'électrophorèse de produit PCR. En haut, température d'hybridation de 48°C. En bas, température d'hybridation de 55°C. A : marqueur ZaA113, d'une taille de 228 pb. B : marqueur PsC120, mesurant 193 pb. C : marqueur PsD103, de 121 pb.

Parmi les neuf marqueurs présentant des conditions d'amplification non-optimales pour les 2 conditions de température initialement testées, cinq ont montré des patterns d'amplification de très faible intensité et/ou de forte aspécificité quelles que soient les conditions testées. Il n'a donc pas été possible ici de déterminer des conditions optimales d'amplification pour ces cinq marqueurs : PsD103, PsC101, PsC11, ZaD108 et ZaD7. En revanche, compte tenu de leurs patterns d'amplification à 48°C et 55°C, les loci ZaD1, PsC128, PsC103 et PsA130 ont fait l'objet d'une PCR en gradient de température pour 3 conditions supplémentaires, afin de tester leurs conditions d'amplification sur une plage allant de 48°C et 58°C (ANNEXE 6B). Pour les loci PsC128, PsC103 et PsA130, au vu de l'ensemble des résultats, nous constatons finalement que la température d'hybridation, pour laquelle il y a une amplification importante et la moins aspécifique possible, est de 55°C. Le locus ZaD1 s'est quant à lui montré aspécifique quelle que soit la température.

L'ensemble de ces résultats est répertorié en ANNEXE 7, tandis que les taux d'amplification calculés à partir de ces résultats sont donnés dans le tableau 3(a et b).

Le test d'amplification croisée à partir d'ADN de plumes s'est révélé probant. Pour seulement deux marqueurs, PsD10 et ZaD121, sur onze testés, il n'y a pas eu d'amplification ou de très faible intensité sur les échantillons d'ADN de plumes. Nous noterons toutefois que l'amplification est aussi faible, pour ces marqueurs, sur les échantillons d'ADN de doigts. L'amplification des neuf autres marqueurs est de forte intensité, spécifique aux loci sélectionnés, quelle que soit la nature de l'ADN. En revanche, l'amplification de l'ADN des plumes des individus PCB16-21P et PCB16-42P est, pour tous les marqueurs, nettement plus faible que les autres échantillons. Il en est de même pour l'échantillon d'ADN de doigt PCB16-40D.

Tableau 4 : Taux d'amplification obtenus sur les extraits d'ADN de plumes, *versus* les extraits d'ADN de doigts, de *P. leucocephala* ; en fonction des marqueurs et de leur espèce de clonage.

Marqueurs	Taux d'amplification	
	Plumes	Doigts
ZaA 5	0.50	1.00
ZaD 121	0.00	0.83
ZaA 113	1.00	1.00
tx moyen d'amplification	0.50	0.94
PxD 107	1.00	1.00
PxD 102	0.75	0.83
PxD 10	0.25	1.00
PxD 5	0.75	1.00
PxD 4	1.00	1.00
PxD 2	1.00	1.00
PxC 120	1.00	1.00
PxC 117	0.75	1.00
tx moyen d'amplification	0.81	0.98
tx moyen d'amplification	0.73	0.97

Tableau 3-a : Caractérisation de marqueurs microsatellites et amplification croisée pour l'étude des colombidés antillais d'amplifications obtenues par espèce et genre, ainsi que les conditions PCR optimales retenues

Marqueurs	Nb d'amplifications chez <i>Patagioenas</i>			Nb d'amplifications chez <i>Streptopelia</i>			Nb d'amplifications chez <i>Zenaida</i>			Nb d'amplifications chez <i>Geotrygon</i>	Condition PCR (°C)	Remarques
	<i>P. squamosa</i>	<i>P. leucocephala</i>	<i>P. decapcto</i>	<i>S. decaocto</i>	<i>S. decaocto</i>	<i>S. decaocto</i>	<i>Z. aurita</i>	<i>Z. asiatica</i>	<i>G. montana</i>			
ZaA5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	55		
ZaD121	1	1	1	1	1	1	1	1	1	55		
ZaD108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Éliminé		
ZaD7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Éliminé		
ZaD1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Éliminé		
ZaA113	1	1	1	1	1	1	1	1	1	55		
PsD107	1	1	0	0	0	0	0	0	0	55	Spécifique au genre <i>Patagioenas</i>	
PsD103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Éliminé		
PsD102	1	1	1	1	0	0	0	0	1	55		
PsD10	1	1	1	1	0	0	0	0	0	55	Spécifique aux genres <i>Patagioenas</i> et <i>Streptopelia</i>	
PsD5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	55		
PsD4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	55		
PsD2	1	1	0	0	1	1	1	1	1	55	Aspécificité	
PsC128	1	1	1	1	1	1	1	1	1	55	Aspécificité	
PsC120	1	1	1	1	1	1	1	1	1	55	Aspécificité	
PsC117	1	1	1	1	1	1	1	1	1	55		
PsC103	1	1	1	1	1	1	1	1	1	55	Faible intensité	
PsC101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Éliminé		
PsC11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Éliminé		
PsA130	1	1	1	1	1	1	1	1	1	55	Aspécificité	

Caractérisation de marqueurs microsatellites et amplification croisée pour l'étude des colombidés antillais

Tableau 3-b : Résultats des tests d'amplification hétéroséquences conduits sur les 20 marqueurs sélectionnés, dont 6 clonés chez et 14 clonés chez, et un panel de 6 espèces cibles. Taux d'amplification calculés, à partir des résultats Tableau 3-a, pour chacune des espèces testées, par genre, par clade ainsi que pour l'ensemble des espèces testées.

	Nb d'amplifications chez <i>Patagioenas</i>		Nb d'amplifications chez <i>Streptopelia</i>	Nb d'amplifications chez <i>Zenaidura</i>		Nb d'amplifications chez <i>Geotrygon</i>
	<i>P. squamosa</i>	<i>P. leucocephala</i>		<i>Z. aurita</i>	<i>Z. asiatica</i>	
<i>Marqueurs développés chez Z. aurita</i>						
Espèce	0.5	0.5		0.5	0.5	
Genre	0.50		0.50			0.50
Clade		0.50		0.50		
Taux moyen d'amplification	0.50					
<i>Marqueurs développés chez P. squamosa</i>						
Espèce	0.79	0.79		0.57	0.57	
Genre	0.79		0.64	0.57		0.64
Clade		0.74			0.60	
Taux moyen d'amplification	0.67					
<i>Tous marqueurs confondus</i>						
Espèce	0.70	0.70		0.55	0.55	
Genre	0.70		0.60	0.55		0.60
Clade		0.67			0.57	
Taux moyen d'amplification	0.62					

DISCUSSION

Amplification hétérosécificique

Il existe, à ce jour, un véritable manque de données, écologiques et génétiques, sur les colombidés. Ceci est d'autant plus vrai pour les espèces présentes dans la région Caraïbe et à plus fine échelle géographique, des Antilles françaises (Renaud 2016). En effet, il n'existe des études génétiques pour seulement deux espèces endémiques de ces îles, *P. squamosa* (Cambrone et al., en préparation) et *Z. aurita* (Monceau et al. 2013). Il était donc nécessaire de s'intéresser à un plus large panel d'espèces pour combler ce déficit de connaissances. Pour cela, nous avons utilisé la méthode d'amplification croisée, ou « *cross-priming* » afin de mettre au point un panel de marqueurs permettant de réaliser des études de génétique susceptibles de fournir des données nécessaires à la compréhension de l'évolution et de l'écologie des espèces de colombidés antillais.

Dans cette étude, nous avons obtenu un taux global d'amplification intersécificique, pour les vingt marqueurs testés, intéressant (62%). Les marqueurs clonés chez *Z. aurita* ont présenté un taux d'amplification de 50% au sein de toutes les espèces testées, tandis que ceux développés chez *P. squamosa* ont présenté un taux de 67%. Toutefois, il est à noter que ces taux d'amplification sont largement impactés par six marqueurs pour lesquels nous ne sommes pas parvenus à obtenir de condition optimale d'amplification quels que soient les tests réalisés. L'amplification hétérosécificique peut alors être réalisée, avec succès non négligeable, grâce aux quatorze autres marqueurs, dans les conditions PCR définies par cette étude.

Les résultats obtenus sont en accord avec la phylogénie définie par Johnson et al. (2010). En effet, il est attendu que le taux d'amplification intersécificique soit inversement proportionnel à la distance évolutive entre l'espèce de clonage du marqueur et l'espèce testée (Primmer et al. 1996). C'est ce que nous constatons globalement grâce à nos résultats. Plus nous nous éloignons de l'espèce de clonage, de son genre ou de son clade, et plus les taux d'amplification évalués diminuent.

Nous avons ainsi réalisé une représentation phylogénétique simplifiée d'après Johnson (2010), présentée en figure 3. Il s'avère que le taux d'amplification des marqueurs développés chez l'espèce *Z. aurita* ne suit pas la distance phylogénétique par rapport à l'espèce de clonage de ces marqueurs, en fait certains marqueurs présentent une conservation de leur

amplification sur l'ensemble des espèces testées et à l'inverse d'autres marqueurs présentent une importante aspécificité indépendamment des relations phylogénétiques. En revanche, le taux d'amplification hétérosppécifique des marqueurs clonés chez *P. squamosa* retrace bien les relations phylogénétiques entre espèces testées. Cela peut être illustré par le fait que certains marqueurs développés chez *P. squamosa*, soient spécifiques à ce genre (ou clade). En effet, pour les marqueurs PsD107 et PsD10, nous observons la présence d'amplification uniquement pour les espèces appartenant, respectivement, au genre *Patagioenas* ou au clade A (figure 3). Le marqueur PsD102, quant à lui, n'est pas amplifié chez le genre *Zenaida*, ce qui peut être le résultat d'une mutation (de la séquence complémentaire des amorces) spécifique à ce genre.

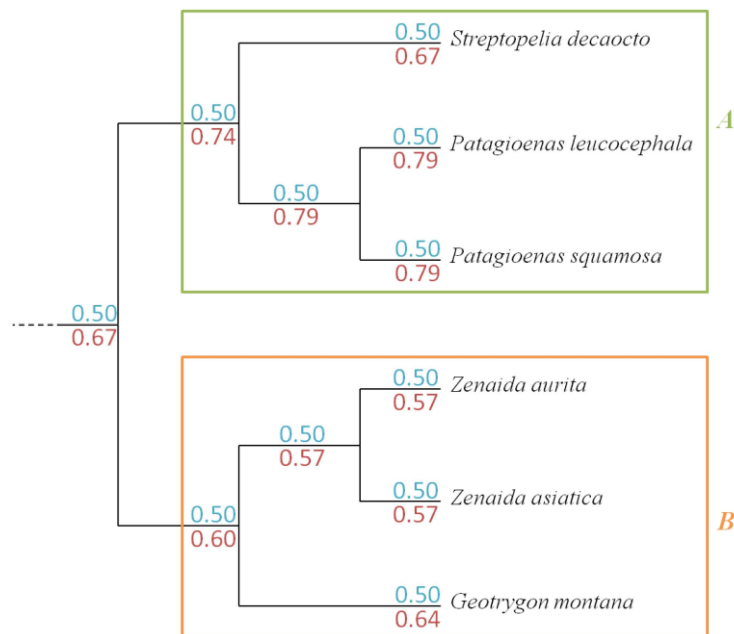


Figure 3 : Représentation phylogénétique simplifiée issue de Johnson et al. (2010), et indication des taux d'amplification hétérosppécifique des marqueurs microsatellites testés. En bleu, les taux d'amplification calculés à partir du nombre de succès d'amplification pour les marqueurs de *Z. aurita*. En rouge, ceux pour les marqueurs clonés chez *P. squamosa*.

Vers de nouvelles méthodes d'échantillonnage, pour de la biologie de la conservation

D'un point de vue éthique, les techniques utilisées en écologie et d'autant plus en biologie de la conservation se veulent être les moins invasives possibles pour les espèces et/ou populations étudiées. En effet, l'étape d'échantillonnage de tissu peut perturber les individus et affecter leur survie et/ou fitness (Frakham et al. 2004 ; Scott Mills 2013). Les échantillons « intrusifs » de tissus de doigts, utilisés dans notre étude, permettent d'obtenir une grande quantité de matériel génétique de bonne qualité, et sont relativement aisés à obtenir, car issus de l'échantillonnage causé par la chasse (i.e. partenariat ONCFS et Fédération des Chasseurs). Mais cette méthode implique la mort de l'individu pour rendre accessible ces prélèvements de tissus. Il existe de nombreuses autres méthodes d'échantillonnage, applicables aux oiseaux,

tels que des prélèvements fécaux, d'urines, de coquilles d'œufs, buccaux, de sang et de plumes (DeSalle & Amato 2004 ; Frankham et al. 2004), toutefois nombre de ces prélèvements peuvent s'avérer difficile à obtenir, en fonction de la biologie des espèces considérées. Dans tous les cas, le plus important est de collecter un matériel biologique dont l'ADN est non ou très peu dégradé et non contaminé (Frankham et al. 2004). Nous nous sommes ici plus particulièrement intéressés aux échantillons d'ADN issus de prélèvements de plumes, couramment utilisée dans les études aviaires (Primmer et al. 1996 ; Banhos et al. 2008), notamment comparer l'efficacité de l'amplification croisée de marqueurs microsatellites réalisée à partir d'ADN extrait de plumes, à celle réalisée à partir d'ADN extrait à partir de tissu de doigts. Les taux d'amplification obtenus à partir de l'ADN de doigts sont plus élevés (97%) que ceux des plumes (73%), tous marqueurs confondus. Or, en considérant uniquement les marqueurs développés chez *P. squamosa*, pour étudier des individus de l'espèce *P. leucocephala*, les taux d'amplifications réalisées s'élèvent alors, respectivement à 98 et 81%, pour les extraits d'ADN de doigts et de plumes. Cela a nécessité de modifier le protocole PCR (tableau 2) pour palier à la faible quantité et qualité de l'ADN, notamment la diminution de la quantité d'ADN matrice pour la PCR et l'ajout de BSA pour pallier à la présence d'inhibiteurs dans ce type de solution d'ADN. Nous en concluons que l'échantillonnage via des plumes est une méthode qui peut être facilement utilisée chez *P. leucocephala* pour les marqueurs clonés chez *P. squamosa*, et plus délicatement pour ceux clonés chez *Z. aurita*.

Perspectives

Afin de mettre en place des stratégies de conservation adaptées aux populations, et scientifiquement appuyées, il est, à courts termes, envisagé de réaliser une étude de génétique des populations et phylogéographie à partir des loci que nous venons de sélectionner et mettre au point. Ce génotypage peut se réaliser à partir des produits PCR issus d'un multiplexage, nécessitant le marquage des amorces de chacun des locus. En effet, nous avons, durant toute notre étude, eu l'objectif de standardiser la température d'hybridation et nous avons éliminé les marqueurs trop aspécifiques, susceptibles de gêner l'identification des produits d'amplification (i.e. génotypage des allèles). Le taux de polymorphisme des marqueurs estimés, la diversité génétique des populations pourra alors être évaluée au sein des populations de colombidés présents dans la région Caraïbe. Nous rappellerons que la diversité génétique peut être considérée comme une mesure indirecte du risque d'extinction d'une population (Frankham et al. 2004 ; Banhos et al. 2008). Plus une population possède de la

diversité génétique et plus elle est à même de faire face aux menaces et changements environnementaux qu'elle subit (Frankham et al. 2004). De plus, les données de génotypage seront aussi essentielles pour déterminer l'existence d'une structuration des populations (Frankham et al. 2004 ; Allendorf & Luikart 2007), ou pour définir des flux de gènes, et donc la connectivité des populations, entre les différentes îles qui composent la Caraïbe. Il s'agira de définir des unités de gestion ou « management units » (Frankham et al. 2004 ; Bertorelle et al. 2009), si cela est possible, et ainsi les stratégies de conservation à mettre en place ne seront pas les mêmes si une population est structurée ou si elle ne l'est pas. En effet, si, par exemple, il existe deux populations distinctes d'une espèce de colombidés en Caraïbe, alors la réintroduction d'une espèce peut être néfaste à la population locale de cette espèce. L'espèce locale peut être amenée à plus rapidement s'éteindre. En revanche, une réintroduction justifiée ne sera que bénéfique à la population (Frankham et al. 2004 ; Allendorf & Luikart 2007 ; Banhos et al. 2008).

Les analyses basées sur des marqueurs microsatellites peuvent également s'avérer intéressantes afin d'étudier les pressions de sélection, notamment de chasse, braconnage ou élevage clandestin, que subissent les populations (Banhos et al. 2008). Ces pratiques, tout comme les effets de la pollution et/ou de la fragmentation d'habitat peuvent augmenter l'effet du goulot d'étranglement (« bottleneck ») et les effets de la dérive génétique (Allendorf & Luikart 2007), pouvant impacter la diversité génétique local comme globale, chez ces espèces. Les colombidés antillais ne sont pas épargnés par ces types de pressions anthropiques comme l'indique l'arrêté du 17 février 1989 fixant la liste des espèces de gibier dont la chasse est autorisée sur le territoire du département de la Guadeloupe (mis à jour le 21 février 2019, DEAL Guadeloupe). Ce sont des informations essentielles à connaître avant d'envisager un maintien de la réglementation en vigueur ou la mise en place d'un plan de gestion durable, ou encore par exemple, une réintroduction d'individus dans un milieu.

Enfin, une autre, et non la dernière possible, application envisageable à partir des marqueurs microsatellites conservés chez les différentes espèces testées serait, comme nous en avons déjà eu un aperçu, de réévaluer la phylogéographie comparée des différentes espèces de colombidés présents dans la région Caraïbe. Cela s'appuiera essentiellement sur les données de polymorphisme des mêmes marqueurs chez différentes espèces. La divergence génétique des espèces de colombidés de la région Caraïbe, pourra ainsi être étudiée, de même que leur évolution (Bertorelle et al. 2009 ; Mukesh & S. Sathyakumar 2011).

Cette étude fait partie des premiers essais d'amplification hétérospécifique de marqueurs génétiques au sein des colombidés de la Caraïbe. Elle a permis d'évaluer l'applicabilité des marqueurs microsatellites déjà connus sur des espèces différentes de l'espèce de clonage, et qui en sont plus ou moins éloignées phylogénétiquement. Ces premiers résultats étaient essentiels à obtenir afin d'envisager l'acquisition de davantage de connaissances génétiques et écologiques sur ces oiseaux, aujourd'hui potentiellement menacés, en vue de leur connaissance et de leur conservation.

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier mes directeurs de stage, M. Etienne Bezault, maître de conférences à l'Université des Antilles, et M. Christopher Cambrone, doctorant à l'Université des Antilles ; tous deux membres de l'UMR Biologie des Organismes et Ecosystème Aquatiques (MNHN, CNRS 7208, Sorbone Université, IRD 207, UCN, UA) ; pour leur accueil, leur sympathie et pour toute la confiance qu'ils ont su m'accorder dans le travail qu'ils m'ont confié. Ils m'ont apporté nombres de connaissances et expériences dont j'ai pu me servir durant ce stage et qui ne me sont qu'enrichissantes pour la suite de mes études et travaux.

Je tiens aussi à remercier Mme Josie Lambourdière, ingénieure de recherche au CNRS, pour son aide précieuse et le temps qu'elle a su me consacrer.

BIBLIOGRAPHIE

- Allendorf FW, Luikart G, 2007. *Conservation and the Genetics of Populations*. Blackwell Publishing.
- Bagi Z, Dimopoulos EA, Loukovitis D, Eraud C, Kusza S, 2018. MtDNA genetic diversity and structure of Eurasian Collared Dove (*Streptopelia decaocto*). Chiang T-Y (ed.). *PLoS One* **13**:e0193935.
- Banhos A, Hrbek T, Gravena W, Sanaiotti T, Farias IP, 2008. Genomic resources for the conservation and management of the harpy eagle (*Harpia harpyja*, *Falconiformes*, *Accipitridae*). *Genet Mol Biol* **31**:146–54.
- Barker FK, Bell JJ, Bogdanowicz SM, Bonatto SL, Cezilly F et al., 2011. Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 June 2011-31 July 2011. *Mol Ecol Resour* **11**:1124–6.
- Bennett PM, Owens IPF, 1997. Variation in extinction risk among birds: chance or evolutionary predisposition? *Proc R Soc London Ser B Biol Sci* **264**:401–8.
- Bertorelle G, Bruford MW, Hauffe HC, Rizzoli A, Vernesi C, 2009. *Population Genetics for Animal Conservation*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bezault E, Rognon X, Gharbi K, Baroiller J-F, Chevassus B, 2012. Microsatellites Cross-Species Amplification across Some African Cichlids. *Int J Evol Biol* **2012**:7.
- BirdLife International, 2019. Data Zone, *Colombidae*.
- Busch JD, Katzner TE, Bragin E, Keim P, 2005. Tetranucleotide microsatellites for aquila and haliaeetus eagles. *Mol Ecol Notes* **5**:39–41.
- Ceballos G, Ehrlich PR, Dirzo R, 2017. Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines. *Proc Natl Acad Sci* **114**:E6089–96.
- Chan C-H, Zhao Y, Cheung M-Y, Chambers GK, 2008. Isolation and characterization of microsatellites in the kakerori (*Pomarea dimidiata*) using feathers as source of DNA. *Conserv Genet* **9**:1067–70.
- Csencsics D, Gugerli F, 2017. *Naturschutzgenetik*. Eidg. Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft WSL.
- DeSalle R, Amato G, 2004. The expansion of conservation genetics. *Nat Rev Genet* **5**:702–12.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA, McInnes KH, 2004. *A Primer of Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Gibbs D, Barnes E, Cox J, 2001. Review : *Pigeons and Doves: A Guide to the Pigeons and Doves of the World*. A&C Black. *The Auk* **118**:1117-1118.
- Groombridge B, Jenkins MD, 2002. *World Atlas of Biodiversity Earth's Living Resources*. UNEP-WCMC.
- Johnson KP, Clayton DH, Dumbacher JP, Fleischer RC, 2010. The flight of the Passenger Pigeon: phylogenetics and biogeographic history of an extinct species. *Mol Phylogenet Evol* **57**:455–8.
- Kretschmer R, de Oliveira TD, de Oliveira Furo I, Oliveira Silva FA, Gunski RJ et al., 2018. Repetitive DNAs and shrink genomes: A chromosomal analysis in nine Columbidae species (*Aves*, *Columbiformes*). *Genet Mol Biol* **41**:98–106.
- Madden F, 2004. Creating Coexistence between Humans and Wildlife: Global Perspectives on Local Efforts to Address Human–Wildlife Conflict. *Hum Dimens Wildl* **9**:247–57.

- Mills SL, 2013. *Conservation of Wildlife Populations: Demography, Genetics, and Management*. 2nd ed. Wiley-Blackwell.
- Monceau K, Cézilly F, Moreau J, Motreuil S, Wattier R, 2013. Colonisation and diversification of the Zenaida Dove (*Zenaida aurita*) in the Antilles: phylogeography, contemporary gene flow and morphological divergence. *PLoS One* **8**:e82189.
- Monceau K, Gaillard M, Harrang E, Santiago-Alarcon D, Parker PG et al., 2009. Twenty-three polymorphic microsatellite markers for the Caribbean endemic Zenaida dove, *Zenaida aurita*, and its conservation in related *Zenaida* species. *Conserv Genet* **10**:1577–81.
- Mukesh, Sathyakumar S, 2013. Eighteen polymorphic microsatellites for domestic pigeon *Columba livia* var. *domestica* developed by cross species amplification of chicken markers. *J Genet* **92**:86–9.
- Owens IPF, Bennett PM, 2000. Ecological basis of extinction risk in birds: Habitat loss versus human persecution and introduced predators. *Proc Natl Acad Sci* **97**:12144–8.
- Palsboll PJ, Berube M, Allendorf FW, 2006. Identification of management units using population genetic data. *Trends Ecol Evol* **22**:11–6.
- Primmer CR, Møller AP, Ellegren H, 1996. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Mol Ecol* **5**:365–78.
- Provan J, Wilson S, Portig AA, Maggs CA, 2008. The importance of reproductive strategies in population genetic approaches to conservation: an example from the marine angiosperm genus *Zostera*. *Conserv Genet* **9**:271–80.
- Renaud M, 2016. *Etude Bibliographique et Propositions d'actions En Faveur de l' Avifaune Des Antilles*.
- Schmidt K, Ratkiewicz M, Konopiński MK, 2011. The importance of genetic variability and population differentiation in the Eurasian lynx *Lynx lynx* for conservation, in the context of habitat and climate change. *Mamm Rev* **41**:112–24.
- Soulé ME, 1985. What Is Conservation Biology? *Bioscience* **35**:727–34.
- Taylor BL, Dizon AE, 1999. First policy then science: why a management unit based solely on genetic criteria cannot work. *Mol Ecol* **8**:S11–6.
- Walker JS, 2007. Geographical patterns of threat among pigeons and doves (*Columbidae*). *Oryx* **41**:289–99.

ANNEXES

Annexe 1 : (A) Liste des genres de colombidés présents à travers le globe, leur répartition géographique et (B) leur position dans la liste rouge de l'IUCN 2006. Données extraites de la revue, Geographical patterns of threat among pigeons and doves (Columbidae), de Jonathan S. Walker (2007).

A

Distribution of columbid genera and species following the taxonomy and geographic divisions adopted by BirdLife International (2007). Vagrants and introduced species are not included.

Genus	Americas					Europe, Africa, the Middle East & Central Asia				Asia, Australasia & Oceania			Total ¹	
	S Antarctica	Andes America	C America	N Caribbean	N America	Africa	Europe	Middle East	C Asia	Asia	Australasia	Oceania		
<i>Columba</i>	1	1	1	1	1	16	6	5	6	17	3	2	35	
<i>Streptopelia</i>				1	1	10	3	6	3	5			13	
<i>Stigmatopelia</i>						1	1	1	1	2			2	
<i>Treron</i>						5		1		18			23	
<i>Oena</i>						1		1					1	
<i>Patagioenas</i> ²	8	13	9	8	4								17	
<i>Leptotila</i>	3	9	5	4	1								11	
<i>Columbina</i>	7	7	4	4	3								9	
<i>Zenaida</i> ¹ ³	2	5	4	4	4								7	
<i>Geotrygon</i>	4	7	9	6	2								16	
<i>Claravis</i>	2	2	2	1									3	
<i>Metriopelia</i>	4	3											4	
<i>Uropelia</i>	1	1											1	
<i>Starnoenas</i>				1									1	
<i>Ectopistes</i> ⁴					1								1	
<i>Nesoenas</i>						2							2	
<i>Dysmoropelia</i> ⁴						1							1	
<i>Alectroenas</i>						5							5	
<i>Aplopelia</i>						1							1	
<i>Turtur</i>						5							5	
<i>Gallucolumba</i>										10	7	6	20	
<i>Ducula</i>										23	16	5	37	
<i>Ptilinopus</i>										30	19	15	50	
<i>Caloenas</i>										1	1	1	1	
<i>Geopelia</i>										4	3		5	
<i>Macropygia</i>										8	3		9	
<i>Reinwardtoena</i>										1	2		3	
<i>Chalcophaps</i>										2	2		2	
<i>Gymnophaps</i>										2	2		3	
<i>Goura</i>										3	2		3	
<i>Trugon</i>										1	1		1	
<i>Otidiphaps</i>										1	1		1	
<i>Hemicophaps</i>										1	2		2	
<i>Phapitreron</i>										4			4	
<i>Tuacoena</i>										2			2	
<i>Cryptophaps</i>										1			1	
<i>Microgoura</i> ⁴												1	1	
<i>Phaps</i>											3		3	
<i>Ocyphaps</i>											1		1	
<i>Geophaps</i>											3		3	
<i>Petrophassa</i>											2		2	
<i>Leucosarcia</i>											1		1	
<i>Lopholaimus</i>											1		1	
<i>Drepanoptila</i>											1		1	
<i>Hemiphaga</i>											1		1	
<i>Didunculus</i>												1	1	
Total genera	1	9	9	7	9	8	10	3	4	3	20	23	6	44
Total species	1	32	48	34	30	17	47	10	14	10	136	78	30	317

¹Represents the total number of species within each genus, not the row total, which is sometimes higher because species can occur in more than one region.

²Formed from splitting *Columba* in 2003

³Eared dove *Zenaida auriculata* occurs on South Georgia and the South Sandwich Islands

⁴Extinct genus

B
Table 1 Numbers of Extinct, Threatened and Near Threatened columbid species in the Americas, Europe, Africa, the Middle East and Central Asia, and Asia, Australia and Oceania, and in regions within these three areas.

Area & region	All species ¹										Threatened species (CR, EN & VU)			
	No. (% of total)	No. RR ²	EX	EW	CR	EN	VU	NT	LC	DD	No. (% of total)	% RR ²	Continental	Insular
Americas														
Antarctica ³	1 (0.3)	0							1		0	0.0		
N America	17 (5.4)	0	1					1	15		0	0.0		
C America	35 (11.1)	6		1		1	1	2	30		2 (5.8)	100.0	2	
Caribbean	30 (9.5)	4			1	1	2	3	23		4 (12.9)	50.0		4
Andes America	47 (14.9)	7				1	2	2	42		3 (6.4)	100.0	3	
S America	33 (10.1)	9			2				31		2 (6.1)	0.0	2	
<i>Total</i>	72 (22.7)	18	1	1	3	3	5	4	55		11 (15.3)	63.6	7	4
Europe, Africa, the Middle East and Central Asia														
Europe	10 (3.2)	3				1		2	7		1 (10.0)	100.0		1
Middle East	14 (4.4)	0					1		13		1 (7.1)	0.0		1
Africa	47 (14.9)	11	4			1	2	3	36	1 ⁴	3 (6.4)	100.0		3
C Asia	11 (3.5)	0					1		10		1 (9.1)	0.0	1	
<i>Total</i>	55 (17.4)	14	4			2	3	5	40	1	5 (9.1)	80.0	1	4
Asia, Australia and Oceania														
Asia	136 (43.0)	50	2		5	4	17	16	92		26 (19.4)	76.9	4 ⁵	22
Australasia	78 (24.7)	24	4			2	6	9	57		8 (10.8)	75.0		8
Oceania	30 (9.5)	25	1		2	4	6	6	11		12 (41.4)	100.0		12
<i>Total</i>	203 (64.0)	98	7		8	10	26	29	123		44 (74.6)	86.4	4	20
Global⁶	317	130	12	1	10	15	34	38	206	1	59 (19.4)	86.4	11	48

¹EX, Extinct; EW, Extinct in the wild; CR, Critically Endangered; EN, Endangered; VU, Vulnerable; NT, Near Threatened, LC, Least Concern; DD, Data Deficient

²With restricted range

³Eared dove *Zenaidura macroura* occurs on South Georgia and the South Sandwich Islands

⁴Insufficient data are available to assess accurately the threat status of the Somali pigeon *Columba olivacea*.

⁵Large green pigeon *Treron capellei* is both a continental and insular species, and treated here as continental.

⁶11 species occur in more than one area: 9 occur in Asia, Australasia and Oceania and Europe, Africa, the Middle East and Central Asia; and 2 occur in all three areas.

Annexe 2 : Protocole d'extraction d'ADN à partir du kit NucleoSpin® Tissue de Macherey-Nagel. Les cadres grisés contiennent les modifications que nous avons apportées.

NucleoSpin® Tissue

5 Standard protocol for human or animal tissue and cultured cells

Before starting the preparation:

- Check if Buffer B5 and Proteinase K were prepared according to section 3.
- Set an incubator or water bath to 56 °C.

1 Prepare sample

Tissue

Cut 25 mg human or animal tissue into small pieces. Place the sample in a microcentrifuge tube (not provided). Proceed with step 2.

Samples that are difficult to lyse can be ground under liquid nitrogen or may be treated in a mechanical homogenizer (Polytron®, Ultra-Turrax®): Add 25 mg of tissue to a 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided), add 50–75 µL phosphate buffered saline (PBS) and homogenize.

Cultured cells

Resuspend up to 10⁷ cells in a final volume of 200 µL Buffer T1. Add 25 µL Proteinase K solution and 200 µL Buffer B3. Vortex to mix and incubate the sample at 70 °C for 10–15 min. Proceed with step 4.

2 Pre-lyse sample

Add 180 µL Buffer T1 and 25 µL Proteinase K solution. Vortex to mix. Be sure that the samples are completely covered with lysis solution.

If processing several samples, Proteinase K and Buffer T1 may be premixed directly before use. Do not mix Buffer T1 and Proteinase K more than 10–15 min before addition to the sample: Proteinase K tends to self-digest in Buffer T1 without substrate.



+ 180 µL T1
+ 25 µL Proteinase K

Mix

Seulement 20 µL de Protéinase K sont utilisés

Incubate at 56 °C until complete lysis is obtained (at least 1–3 h). Vortex occasionally during incubation or use a shaking incubator.

Samples can be incubated overnight as well. If RNA-free DNA is crucial for downstream applications, a RNase digest may be performed: Add 20 µL RNase A (10 mg/mL) solution (not included; see ordering information) and incubate for an additional 5 min at room temperature.



56 °C,
1–3 h
or
56 °C,
overnight

Incubation durant une nuit, sans ARNase.










3 Lyse sample

Vortex the samples. Add 200 µL Buffer B3, vortex vigorously and incubate at 70 °C for 10 min. Vortex briefly.

If insoluble particles are visible, centrifuge for 5 min at high speed (e.g., 11,000 x g) and transfer the supernatant to a new microcentrifuge tube (not provided).



+ 200 µL B3
70 °C,
10 min

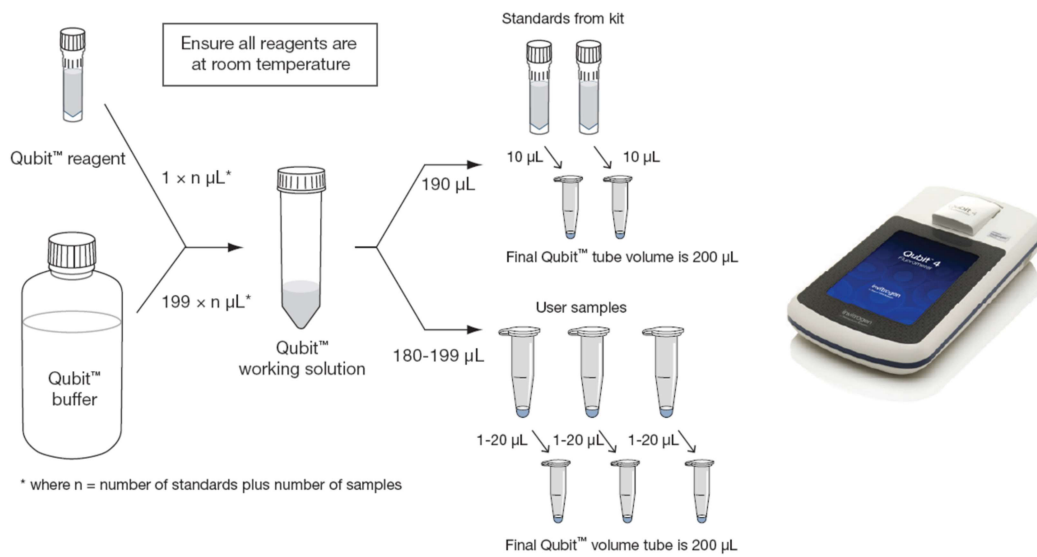
<p>4 Adjust DNA binding conditions</p> <p>Add 210 µL ethanol (96–100%) to the sample and vortex vigorously.</p> <p><i>After addition of ethanol a stringy precipitate may become visible. This will not affect the DNA isolation. Be sure to load all of the precipitate on the column in the following step.</i></p>		<p>+ 210 µL ethanol</p> <p>Vortex</p>
<p>5 Bind DNA</p> <p>For each sample, place one NucleoSpin® Tissue Column into a Collection Tube. Apply the sample to the column. Centrifuge for 1 min at 11,000 x g. Discard Collection Tube with flowthrough and place the column in a new Collection Tube (provided).</p> <p><i>If the sample is not drawn completely through the matrix, repeat the centrifugation step at 11,000 x g. Discard flowthrough.</i></p>		<p>Load samples</p>
		<p>11,000 x g, 1 min</p>
<p>6 Wash silica membrane</p> <p>1st wash</p> <p>Add 500 µL Buffer BW. Centrifuge for 1 min at 11,000 x g. Discard flowthrough and place the column back into the Collection Tube.</p>		<p>+ 500 µL BW</p> <p>11,000 x g, 1 min</p>
<p>2nd wash</p> <p>Add 600 µL Buffer B5 to the column and centrifuge for 1 min at 11,000 x g. Discard flowthrough and place the column back into the Collection Tube.</p>		<p>+ 600 µL B5</p> <p>11,000 x g, 1 min</p>
<p>7 Dry silica membrane</p> <p>Centrifuge the column for 1 min at 11,000 x g. Residual ethanol is removed during this step.</p>		<p>11,000 x g, 1 min</p>
		
<p>8 Elute highly pure DNA</p> <p>Place the NucleoSpin® Tissue Column into a 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided) and add 100 µL Buffer BE. Incubate at room temperature for 1 min. Centrifuge 1 min at 11,000 x g.</p> <p><i>For alternative elution procedures see section 2.3.</i></p>		<p>+ 100 µL BE</p> <p>RT, 1 min</p>
		<p>11,000 x g, 1 min</p>

Pour cette dernière étape :

- 50 µL de BE sont utilisés.
- Incubation à température ambiante pendant 10 min.
- Centrifugation 2 min à 11,000 x g.
- Récupération de l'éluat présent dans le tube de collecte et dépôt dans la colonne, sur la membrane.
- Centrifugation 2 x 1min à 11,000 x g.

Conservation de l'ADN extrait à 4°C.

Annexe 3A: Protocole de quantification d'ADN par utilisation d'un Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen _ ThermoFisher Scientific).

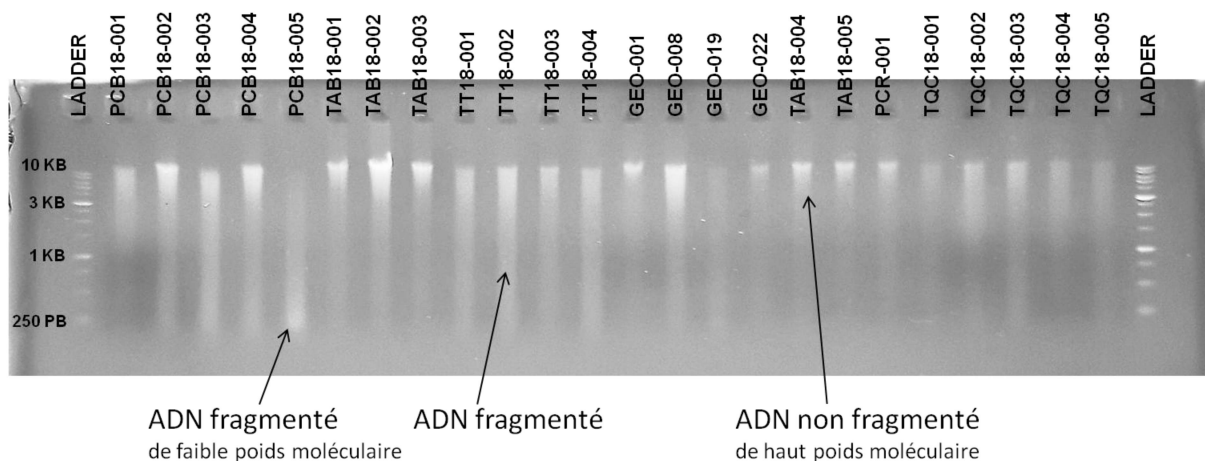


Annexe 3B: Concentration en ADN, après dilution au dixième, des échantillons d'extraction d'ADN de doigts.

Espèce	N° individu	Concentration en ADN (ng/ μL)	Espèce	N° individu	Concentration en ADN (ng/ μL)
<i>Geotrygon montana</i>	GEO18-008	22.9	<i>Patagioenas leucocephala</i>	PCB18-060	12.8
<i>Patagioenas squamosa</i>	PCR18-001	14.7		PCB18-061	15.8
<i>Streptopelia decaocto</i>	TT18-001	16.1		PCB16-15	28.0
	TT18-003	14.0		PCB16-21	29.6
<i>Zenaida aurita</i>	TQC18-002	14.4		PCB16-40	14.0
<i>Zenaida asiatica</i>	TAB18-001	17.0		PCB16-42	28.2

Annexe 3C: Photographie de gel d'électrophorèse, pour quantification et vérification de la qualité de l'ADN extrait.

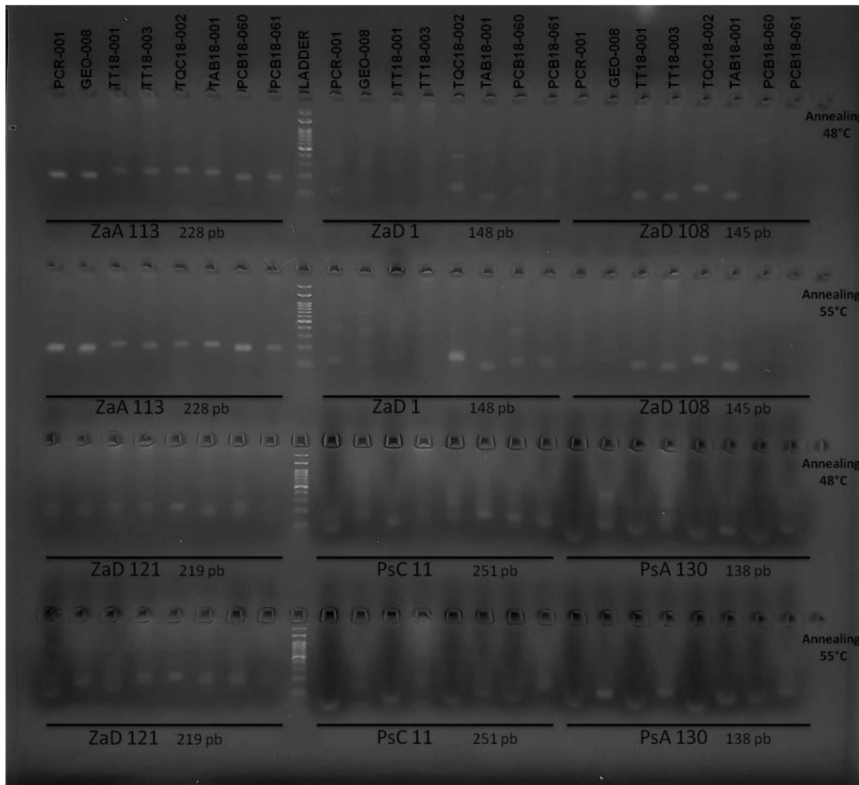
17/01/19 – Electrophoresis gel to assess the quality of DNA extractions realized the 14th and 15th January, 2019



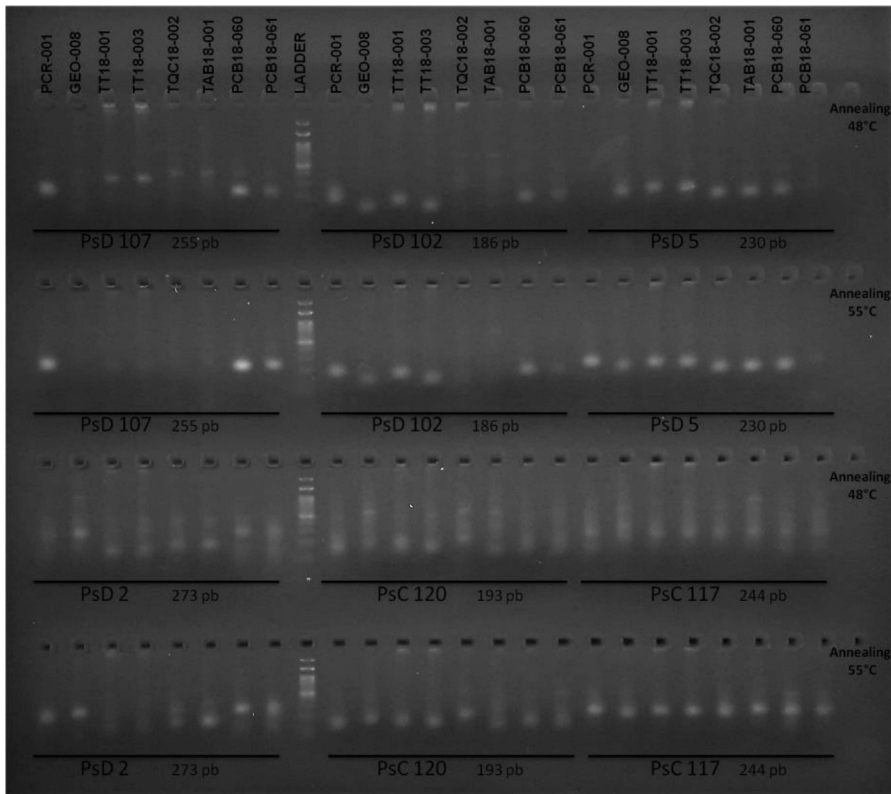
Annexe 5 : Photographies des gels d'électrophorèse.

A : Tests réalisés pour une température d'hybridation de 48°C (en haut) et 55°C (en bas).

08/02/19 – Electrophoresis gel to assess the result of PCR amplification realized the 7th February, 2019

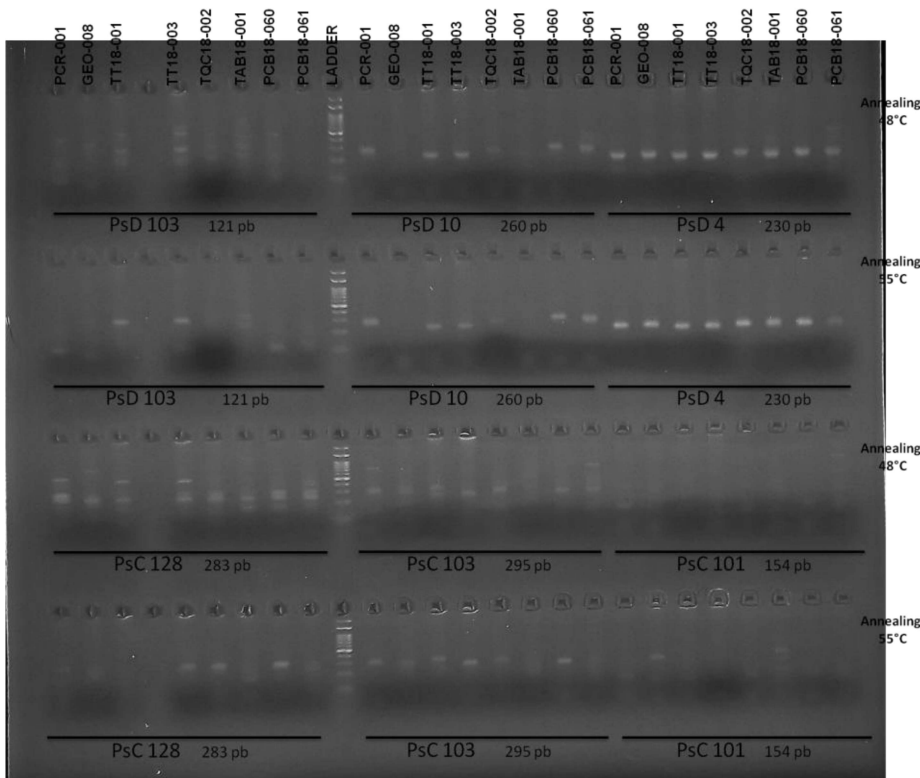


08/02/19 – Electrophoresis gel to assess the result of PCR amplification realized the 7th February, 2019

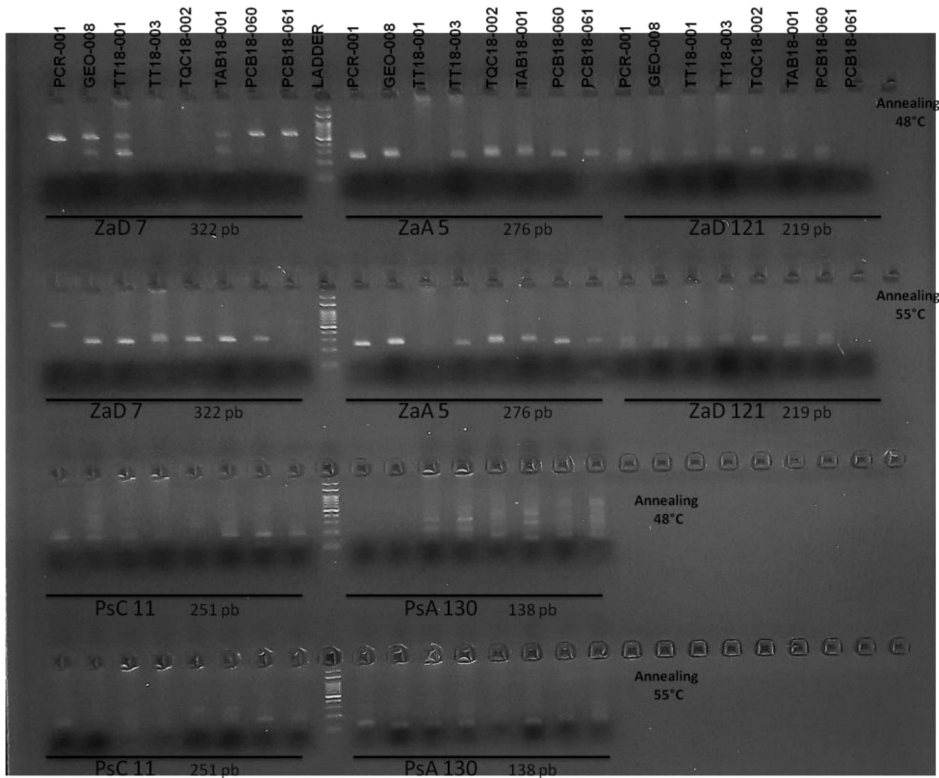


Caractérisation de marqueurs microsatellites et amplification croisée pour l'étude des colombidés antillais

11/02/19 – Electrophoresis gel to assess the result of PCR amplification realized the 8th February, 2019

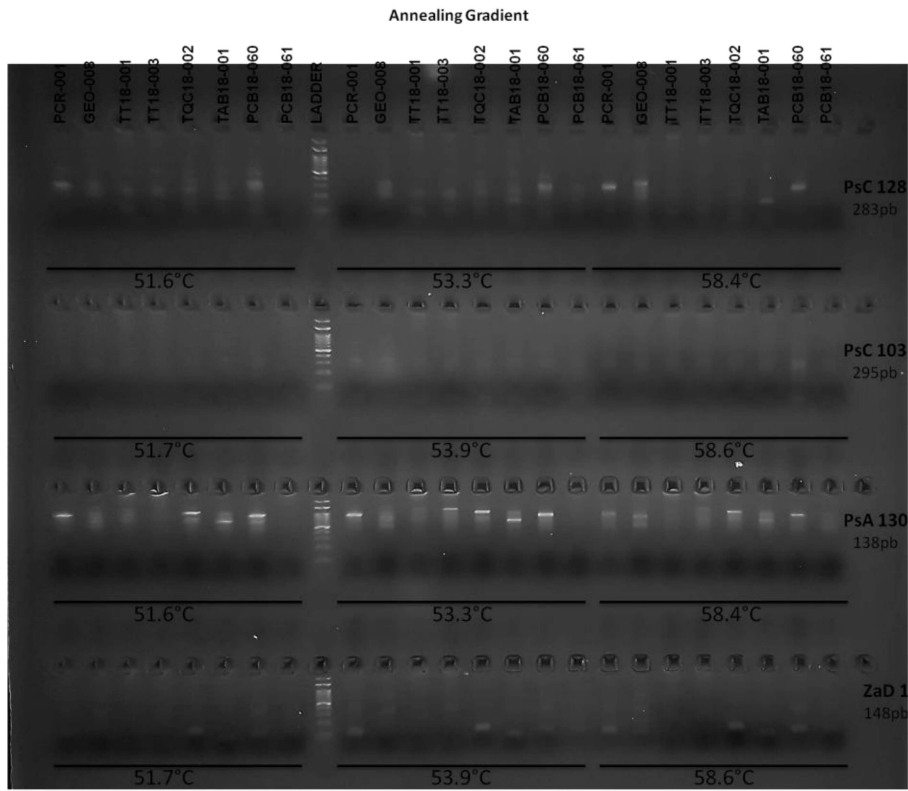


11/02/19 – Electrophoresis gel to assess the result of PCR amplification realized the 7&8th February, 2019



B: Tests réalisés en gradient thermique.

14/02/19 – Electrophoresis gel to assess the result of PCR amplification realized the 13th February, 2019



Caractérisation de marqueurs microsatellites et amplification croisée pour l'étude des colombidés antillais

Annexe 6: Tableau récapitulatif des résultats d'amplification hétéroséquentielle. « o » : oui et « n » : non ; répondent à la présence d'une amplification et à la présence d'aspécificité. L'intensité des amplifications est évaluée, du plus faible (--), au plus intense (++).

A: Tableau récapitulatif pour des tests d'amplification hétéroséquentielle réalisés avec une température d'hybridation de 48 et 55°C.

Marqueurs Taille (en pb)	48 °C				55 °C				Remarques		
	Individus testés	Présence d'amplification	Aspécificité	Intensité des bandes	Remarques	Présence d'amplification	Aspécificité	Intensité des bandes		Remarques	Hauteur de migration (en pb)
ZaA5 276 pb	PCR 01	o	n	++		o	n	++			
	GEO 08	o	n	++		o	n	++			
	TT 01	n				o	n	-			
	TT 03	o	n	++		o	n	++		Environ 300 pb	Utiliser à 55°C
	TQC 02	o	n	++		o	n	++			
	TAB 01	o	n	++		o	n	++			
	PCB 60 PCB 61	o o	n n	++ ++		o o	n n	++ ++			
ZaD121 219 pb	PCR 01	o	n	+		o	n	+			
	GEO 08	o	n	+		o	n	+			
	TT 01	o	n	+		o	n	+			
	TT 03	o	n	+		o	n	+			
	TQC 02	o	n	+		o	n	+		Environ 200 pb	Utiliser à 55°C
	TAB 01	o	n	+		o	n	+			
	PCB 60 PCB 61	o n	n n	++ --		o o	n n	++ --			
ZaD108 145 pb	PCR 01	o	n	--	non exploitable	o	n	--	non exploitable		
	GEO 08	o	o	--		o	o	-			
	TT 01	o	n	++		o	n	++			
	TT 03	o	n	++		o	n	++		Différentes hauteurs de migration	A éliminer
	TQC 02	o	n	++		o	n	++			
	TAB 01	o	n	++		o	n	++			
	PCB 60 PCB 61	o o	n n	-- --	non exploitable non exploitable	n n	n n	++ ++			Amplification d'un locus différent d'un individu à l'autre. Il est possible qu'une mutation se soit fixée dans certains groupes.

Caractérisation de marqueurs microsatellites et amplification croisée pour l'étude des colombidés antillais

	PCB 61	0	n	+	0	n	++	+	n	++
PsD103 121 pb	PCR 01	0	0	-	0	n	+-			
	GEO 08	0	0	-	0	n	-			
	TT 01	0	0	-	0	0	+			
	TT 03	0	0	-	0	0	+			
	TQC 02	0	0	--	0	0	+			
	TAB 01	0	0	-	0	0	+-			
	PCB 60	0	0	-	0	n	+-			
	PCB 61	n			0	n	+-			
	PCR 01	0	n	++	0	n	++			
	GEO 08	0	n	++	0	n	++			
PsD102 186 pb	TT 01	0	n	++	0	n	++			
	TT 03	0	n	++	0	n	++			
	TQC 02	0	0	-	0	n	--	non exploitable		
	TAB 01	0	0	-	0	n	--	non exploitable		
	PCB 60	0	n	++	0	n	++			
	PCB 61	0	n	+	0	n	+			
	PCR 01	0	n	++	0	n	++			
	GEO 08	n			n		++			
	TT 01	0	n	++	0	n	++			
	TT 03	0	n	++	0	n	++			
PsD10 260 pb	PCR 01	0	n	++	0	n	++			
	GEO 08	n			n		++			
	TT 01	0	n	++	0	n	++			
	TT 03	0	n	++	0	n	++			
	TQC 02	0	n	-	0	n	-			
	TAB 01	n			n		-			
	PCB 60	0	n	++	0	n	++			
	PCB 61	0	n	+	0	n	++			
	PCR 01	n			erreur de manipulation	0	n	++		
	GEO 08	0	n	++	0	n	++			
PsD5 230 pb	TT 01	0	n	++	0	n	++			
	TT 03	0	n	++	0	n	++			
	TQC 02	0	n	++	0	n	++			
	TAB 01	0	n	++	0	n	++			
	PCR 01	0	n	++	0	n	++			
	GEO 08	0	n	++	0	n	++			
	TT 01	0	n	++	0	n	++			
	TT 03	0	n	++	0	n	++			
	TQC 02	0	n	++	0	n	++			
	TAB 01	0	n	++	0	n	++			

Ce marqueur est non utilisable car différents loci sont amplifiés.

A éliminer

Différentes hauteurs de migration

Utiliser à 55°C

Environ 200 pb

Spécifique aux genres *Patagioenas* et *Sireptopelia*.

Utiliser à 55°C

Entre 250 et 300 pb

Utiliser à 55°C

Environ 250 pb

Caractérisation de marqueurs microsatellites et amplification croisée pour l'étude des colombidés antillais

	TAB 01	0	0	+	0	0	n	++	
	PCB 60	0	0	+	0	0	n	++	
	PCB 61	0	0	+	0	0	n	++	
PsC117 244 pb	PCR 01	0	0	+	0	0	n	++	
	GEO 08	0	0	+	0	0	n	++	
	TT 01	0	0	+	0	0	n	++	
	TT 03	0	0	+	0	0	n	++	Utiliser à 55°C
	TQC 02	0	0	+	0	0	n	++	Environ 250 pb
	TAB 01	0	0	+	0	0	n	++	
	PCB 60	0	0	+	0	0	n	++	
PCB 61	0	0	+	0	0	n	++		
PsC103 295 pb	PCR 01	0	0	+/-	0	0	n	+	
	GEO 08	0	0	+/-	0	0	n	+/-	
	TT 01	0	0	+/-	0	0	n	+	
	TT 03	0	n	+/-	0	0	n	+	Faire un gradient
	TQC 02	0	0	+/-	0	0	n	+/-	Environ 300 pb
	TAB 01	0	n	--	non exploitable	0	n	--	non exploitable
	PCB 60	0	n	+/-	0	0	n	++	
PCB 61	0	0	+/-	0	0	n	-		
PsC101 154 pb	PCR 01	0	n	--	non exploitable	0	n	--	non exploitable
	GEO 08	n	0		0	0	0	--	non exploitable
	TT 01	n			n				Différentes hauteurs de migration
	TT 03	n			n				A éliminer
	TQC 02	n	0		0	0	n	-	non exploitable
	TAB 01	n	0		0	0	0	-	non exploitable
	PCB 60	n	0		0	0	n	--	non exploitable
PCB 61	0	0	--	0	0	n	--	non exploitable	
PsC11 251 pb	PCR 01	0	n	+	0	0	n	+/-	
	GEO 08	0	0	+/-	n		n		Le locus amplifié n'est pas le locus ciblé.
	TT 01	0	0	+/-	0	0	n	--	non exploitable
	TT 03	0	0	-	0	0	n	--	non exploitable

Caractérisation de marqueurs microsatellites et amplification croisée pour l'étude des colombidés antillais

TQC 02	0	0	-	0	0	0	-
TAB 01	0	0	+	0	0	0	+/-
PCB 60	0	0	+	0	0	n	+/-
PCB 61	0	0	+	0	0	n	+/-
PCR 01	n	erreur de manipulation		0	0	n	+
GEO 08	n	erreur de manipulation		0	0	n	+
TT 01	0	0	+/-	0	0	n	+
TT 03	0	0	+/-	0	0	n	+
TQC 02	0	0	+/-	0	0	n	-
TAB 01	0	0	+/-	0	0	n	+
PCB 60	0	0	+/-	0	0	n	+
PCB 61	0	0	+/-	0	0	n	+/-
PsA130							
138 pb							
							Environ 150 pb
							Faire un gradient

Caractérisation de marqueurs microsatellites et amplification croisée pour l'étude des colombidés antillais

Marqueurs Taille (en pb)	Individus testés	Hauteur de migration (en pb)	Décision	Remarques	Marqueurs Taille (en pb)	Individus testés	Hauteur de migration (en pb)	Décision	Remarques
	TT 01			n'est pas le locus ciblé.		PCR 01			
	TT 03					GEO 08			locus amplifié n'est pas le locus ciblé.
	TQC 02					TT 01			locus amplifié n'est pas le locus ciblé.
	TAB 01					TT 03			
	PCB 60					TQC 02			
	PCB 61					TAB 01			
						PCB 60			
						PCB 61			

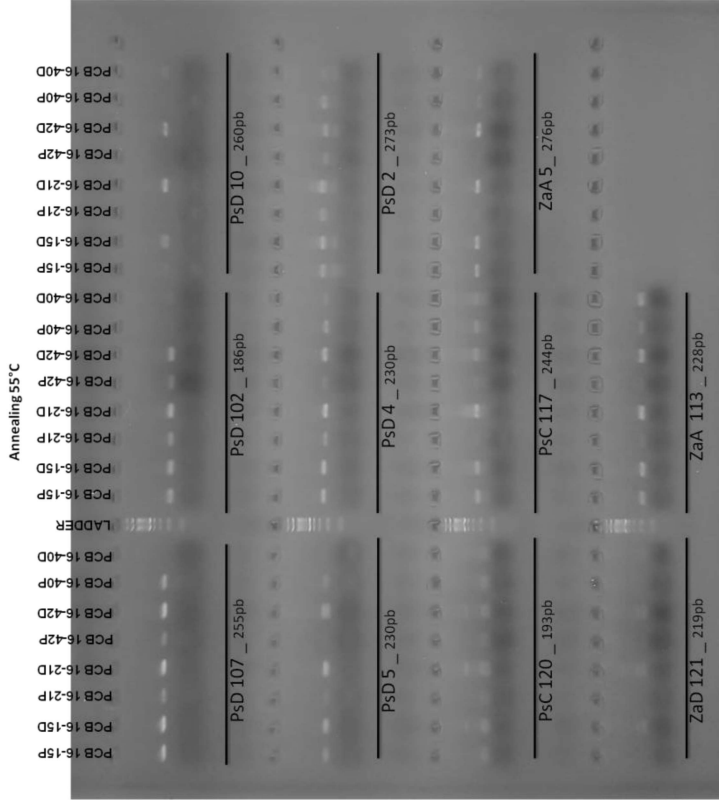
Marqueurs Taille (en pb)	Individus testés	Hauteur de migration (en pb)	Décision	Remarques	Marqueurs Taille (en pb)	Individus testés	Hauteur de migration (en pb)	Décision	Remarques
ZaD1 148 pb	PCR 01 GEO 08 TT 01 TT 03 TQC 02 TAB 01 PCB 60 PCB 61				PsC103 295 pb	PCR 01 GEO 08 TT 01 TT 03 TQC 02 TAB 01 PCB 60 PCB 61			
		Différentes hauteurs de migration	A éliminer	Maintien de l'aspécificité à toute température.			Environ 300pb	Utiliser à 55°C	Faible intensité d'amplification
PsC128 283 pb	PCR 01 GEO 08 TT 01 TT 03 TQC 02 TAB 01 PCB 60 PCB 61				PsA 130 138 pb	PCR 01 GEO 08 TT 01 TT 03 TQC 02 TAB 01 PCB 60 PCB 61			
		Environ 300 pb	Utiliser à 55°C	55°C est un juste milieu entre perte de l'aspécificité et perte d'amplification pour certaines espèces.			Environ 150 pb	Utiliser à 55°C	Nous souhaitons vérifier le comportement du marqueur entre 48 et 55°C. Le problème rencontré, dont nous ne connaissons la cause, ne nous permet pas d'y répondre.

Caractérisation de marqueurs microsatellites et amplification croisée pour l'étude des colombidés antillais

Annexe 7: Comparaison d'amplification, plumes *versus* doigts.

A: Photographie de gel d'électrophorèse. Test réalisé sur des extraits d'ADN de plumes (individu P) et d'ADN de doigts (individu D). Température d'hybridation de 55°C.

15.02.19 – Electrophoresis gel to assess the result of PCR amplification realized the 14th February, 2019



Caractérisation de marqueurs microsatellites et amplification croisée pour l'étude des colombidés antillais

B: Tableau récapitulatif des tests d'amplification hétéroséquentielle, réalisés sur des extraits d'ADN de plumes *versus* des extraits d'ADN de doigts, à une température d'hybridation de 55°C. « o » : oui et « n » : non ; répondent à la présence d'une amplification et à la présence d'aspécificité. L'intensité des amplifications est évaluée, du plus faible (--), au plus intense (++).

T°C		55°C					
Marqueurs Taille (en pb)	Individus testés	Présence d'amplification	Aspécificité	Intensité des bandes	Remarques	Hauteur de migration (en pb)	Remarques
ZaA5 276 pb	PCB 16-15P	o	n	++			
	PCB 16-15D	o	n	++			
	PCB 16-21P	n				Entre 200 et 300 pb	
	PCB 16-21D	o	n	++			
	PCB 16-42P	o	n	++			
	PCB 16-42D	o	n	++			
	PCB 16-40P	o	n	+			
ZaD121 219 pb	PCB 16-40D	o	n	+			
	PCB 16-15P	n					
	PCB 16-15D	o	o	-			
	PCB 16-21P	n					
	PCB 16-21D	o	o	-			
	PCB 16-42P	n				Environ 200 pb	Légère aspécificité lorsqu'il y a amplification
	PCB 16-42D	o	o	-			
ZaA113 228 pb	PCB 16-40P	n					
	PCB 16-40D	o	o	--			non exploitable
	PCB 16-15P	o	n	++			
	PCB 16-15D	o	n	++			
	PCB 16-21P	o	n	+-			
	PCB 16-21D	o	n	++			
	PCB 16-42P	o	n	+-			Environ 200 pb
PsD107 255 pb	PCB 16-42D	o	n	++			
	PCB 16-40P	o	n	+			
	PCB 16-40D	o	n	++			
	PCB 16-15P	o	n	++			
	PCB 16-15D	o	n	++			
	PCB 16-21P	o	n	+			
	PCB 16-21D	o	n	++			Entre 200 et 300 pb
PsD102 186 pb	PCB 16-42P	o	n	+			
	PCB 16-42D	o	n	++			
	PCB 16-40P	o	n	++			
	PCB 16-40D	o	n	++			
	PCB 16-15P	n					erreur de manipulation
	PCB 16-15D	o	n	++			
	PCB 16-21P	o	n	++			
PsD10 260 pb	PCB 16-21D	o	n	++			
	PCB 16-42P	o	n	+			
	PCB 16-42D	o	n	++			Environ 200 pb
	PCB 16-40P	n					
	PCB 16-40D	n					
	PCB 16-15P	o	n	+-			
	PCB 16-15D	o	n	+			Environ 2300 pb

Caractérisation de marqueurs microsatellites et amplification croisée pour l'étude des colombidés antillais

PCB 16-21P	n				
PCB 16-21D	o	n	++		
PCB 16-42P	n				
PCB 16-42D	o	n	++		
PCB 16-40P	n				
PCB 16-40D	o	n	+-		
PsD5					
230 pb					Entre 200 et 300 pb
PCB 16-15P	o	n	+		
PCB 16-15D	o	n	++		
PCB 16-21P	o	n	+-		
PCB 16-21D	o	n	++		
PCB 16-42P	n				
PCB 16-42D	o	n	+		
PCB 16-40P	o	n	+		
PCB 16-40D	o	n	-		
PsD4					
230 pb		mn	++		
PCB 16-15P	o	n	++		
PCB 16-15D	o	n	+		
PCB 16-21P	o	n	++		
PCB 16-21D	o	n	+		
PCB 16-42P	o	n	++		
PCB 16-42D	o	n	+		
PCB 16-40P	o	n	++		
PCB 16-40D	o	n	+-		
PsD2					
273 pb					Entre 200 et 300 pb
PCB 16-15P	o	n	+		
PCB 16-15D	o	n	++		
PCB 16-21P	o	n	+		
PCB 16-21D	o	n	++		
PCB 16-42P	o	n	+-		
PCB 16-42D	o	n	+		
PCB 16-40P	o	n	+		
PCB 16-40D	o	n	+-		
PsC120					
193 pb					Environ 200 pb
PCB 16-15P	o	n	+-		
PCB 16-15D	o	n	+		
PCB 16-21P	o	n	+-		
PCB 16-21D	o	n	+		
PCB 16-42P	o	n	+-		
PCB 16-42D	o	n	+		
PCB 16-40P	o	n	+		
PCB 16-40D	o	n	+-		
PsC117					
244 pb					Entre 200 et 300 pb
PCB 16-15P	o	l	++		
PCB 16-15D	o	l	++		
PCB 16-21P	n				
PCB 16-21D	o	l	++		
PCB 16-42P	o	l	-		
PCB 16-42D	o	l	+		
PCB 16-40P	o	l	+		
PCB 16-40D	o	l	+-		