

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE NANTES

ANNEE 2005

**TEST DE FAISABILITE DE L'ETUDE DES LIENS
DE PARENTE DANS UN GROUPE DE LYCAONS
(*Lycaon pictus*) A PARTIR DE DEUX SOURCES DE
MATERIEL GENETIQUE : FECES ET PEAU**

THESE

pour le

diplôme d'Etat

de

DOCTEUR VETERINAIRE

présentée et soutenue publiquement

le 20 Janvier 2006

devant

la faculté de Médecine de Nantes

par

Charlotte, Henriette, Marie MOUEIX

Née le 15 décembre 1978 à Libourne (33)

JURY

Président : Monsieur ARMSTRONG
Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes

Membres : Madame L'HOSTIS
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

Monsieur GOGNY
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

Introduction

Le Lycaon (*Lycaon pictus*) est l'espèce de carnivores la plus menacée d'Afrique après le Loup d'Ethiopie (*Canis simensis*). Sa population actuelle est estimée à environ 3500 animaux dans moins de 15 pays d'Afrique (Woodroffe *et al.*, 1997). Ce déclin s'explique par l'impact de l'Homme et de la colonisation des larges territoires nécessaires aux lycaons (persécutions volontaires, maladies transmises par les animaux domestiques, accidents de la route) mais aussi par la compétition (directe ou indirecte) avec les autres prédateurs peuplant les mêmes milieux. Cet animal vit en groupes d'une quinzaine d'animaux dont l'organisation sociale (mâle et femelle dominants) très hiérarchisée leur permet une chasse efficace et un taux de survie des chiots relativement important.

La population de Lycaon en Afrique du Sud s'élève à environ 550 dont 200 représentent la population dans le Parc National Kruger et dont 200 autres ont été introduits dans des réserves clôturées et protégées. Notre étude a été effectuée dans l'une d'entre elles, pendant environ 5 mois, la Réserve de Madikwe au Nord Ouest du pays, dans laquelle ont été introduits 6 lycaons il y a maintenant 11 ans et qui en compte 46 à ce jour. La question de diversité génétique dans une telle population se pose et de nombreux outils de la génétique moléculaire peuvent permettre de nous aider à y répondre.

Nos objectifs sont de mettre en évidence la possibilité de pères multiples dans une même portée de lycaons à l'aide de matériel génétique obtenu de la façon la moins invasive possible. La première étape est l'obtention d'échantillons comportant suffisamment de matériel génétique (ADN, acide désoxyribonucléique) pour pouvoir étudier les liens de parenté au sein d'un groupe à l'aide de microsatellites. L'utilisation d'échantillons non invasifs (fèces ou poil) comme source de matériel génétique fut une révolution pour l'étude des animaux en voie de disparition mais connaît aussi ses limites : une qualité médiocre et une quantité faible d'ADN obtenue.

Au cours de ce projet, après une étude bibliographique mettant en évidence le problème du Lycaon, nous avons tout d'abord tenté d'utiliser les fèces de Lycaon comme source de matériel génétique, en testant différentes méthodes d'extraction sur cet échantillon non invasif. En comparaison, nous avons testé une méthode de prélèvement de peau semi invasive par l'utilisation de flèches à biopsie. A l'aide de microsatellites obtenus chez le Chien domestique, nous pourrons ensuite étudier les liens de parenté dans un groupe de Lycaon.

Table des matières

SOMMAIRE	1
INTRODUCTION	3
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
1 LE LYCAON : LE CARNIVORE LE PLUS MENACE DANS LE SUD DE L'AFRIQUE	4
1.1 Le Lycaon (<i>Lycaon pictus</i>) : étude générale	4
1.1.1 La taxonomie et la phylogénie	4
1.1.2 La morphologie	5
1.1.3 L'organisation sociale	7
1.1.4 La reproduction	7
1.1.5 La chasse en meute et les habitudes alimentaires	10
1.1.6 La territorialité	12
1.2 Le statut et la répartition des populations restantes de Lycaon :	12
1.2.1 La répartition des Lycaons en Afrique	12
1.2.2 La répartition des Lycaons en Afrique du Sud	13
1.3 Les causes passées et futures du déclin de la population de Lycaon :	16
1.3.1 Les facteurs « naturels » responsables du déclin de la population de Lycaon	16
1.3.1.1 La compétition indirecte avec d'autres grands carnivores	16
1.3.1.2 La compétition directe avec d'autres grands carnivores	16
1.3.1.3 La prédation par d'autres grands carnivores	17
1.3.2 Les facteurs humains responsables du déclin de la population de Lycaon	18
1.3.2.1 Les accidents de la route	18
1.3.2.2 La persécution directe : tir, empoisonnement et piégeage	18
1.3.3 Les maladies affectant les lycaons	19
1.3.3.1 Les infections virales	19
1.3.3.2 Les infections bactériennes	20
1.3.3.3 Les infections parasitaires	21
2 LE MATERIEL GENETIQUE : PRELEVEMENT SUR LE TERRAIN, METHODE DE CONSERVATION ET ANALYSE AU LABORATOIRE	22
2.1 Prélèvement de matériel génétique de façon non invasive	22
- LES FECES :	22
- LA PEAU:	22
2.2 Conservation des échantillons entre le lieu de prélèvement et le laboratoire	24
2.3 Analyse du matériel génétique au laboratoire	26
2.3.1 Extraction d'ADN et amplification par PCR	26
2.3.1.1 L'extraction d'ADN	26
2.3.1.2 La purification d'ADN	28
2.3.1.3 Quantification et qualification de l'ADN	30
2.3.1.4 L'amplification par PCR	30
2.3.2 Les marqueurs microsatellites pour l'étude des liens de parenté	33
2.3.2.1 Généralités	33
2.3.2.2 Programme informatique d'analyse des résultats	36

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

1	ETUDE SUR LES FECES	38
1.1	Cadre de l'étude	38
1.1.1	Le lieu de l'étude : « de Wildt Cheetah and Wildlife Centre »	38
1.1.2	La structure d'accueil et le laboratoire	39
1.2	Objectifs de l'étude :	39
1.3	Matériels et méthodes	40
1.3.1	Les animaux prélevés et le mode de prélèvement	40
1.3.1.1	Les animaux prélevés	40
1.3.1.2	Les prélèvements	40
1.3.2	L'analyse génétique au laboratoire	41
1.3.2.1	Le kit Dynabeads DNA DIRECT Universal et le QIAamp DNA Stool Kit: deux kits commerciaux d'extraction d'ADN	41
1.3.2.1.1	Le kit Dynabeads DNA DIRECT Universal	41
1.3.2.1.2	Le QIAamp DNA Stool Kit	42
1.4	Résultats	43
1.5	Discussion	44
1.5.1	Le prélèvement	44
1.5.2	L'extraction d'ADN	45
1.6	Conclusion	46
2	ETUDE SUR LA PEAU	47
2.1	Cadre de l'étude	47
2.1.1	Le lieu de l'étude : La Réserve Naturelle de Madikwe	47
2.1.2	La structure d'accueil et le laboratoire	48
2.2	Objectifs de l'étude	49
2.3	Matériels et méthodes	49
2.3.1	Les animaux prélevés et le mode de prélèvement	49
2.3.1.1	Les animaux prélevés	49
2.3.1.1.1	Les différents groupes de Lycaon	49
2.3.1.1.2	La période d'observation et l'identification photographique	50
2.3.1.2	Les prélèvements	51
2.3.2	Les différentes méthodes de conservation de la peau	53
2.3.3	L'analyse génétique au laboratoire	54
2.3.3.1	L'extraction d'ADN	54
2.3.3.2	La PCR et les microsatellites	57
2.3.3.2.1	La PCR: condition et réglages	57
2.3.3.2.2	Profil des températures utilisées pendant la PCR	58
2.3.3.2.3	Le génotypage et la visualisation des allèles	58
2.4	Résultats	59
2.4.1	Prélèvement	59
2.4.2	Extraction d'ADN	59
2.4.3	Amplification par PCR, utilisation des microsatellites du Chien domestique	61
2.4.4	Les liens de parenté et la théorie des pères multiples	62

2.5	Discussion	65
2.5.1	Le prélèvement	65
2.5.2	La méthode de conservation	65
2.5.3	L'analyse au laboratoire	65
3	DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVE	66
3.1	Importance de l'échantillonnage non invasif pour la conservation d'espèces sauvages	66
3.2	Importance des outils de la génétique moléculaire et de la diversité génétique pour la conservation d'espèces sauvages	67
	CONCLUSION	69
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	70
	TABLE DES MATIERES	77
	LISTE DES ILLUSTRATIONS	80
	LISTE DES PHOTOGRAPHIES ET CREDIT PHOTOGRAPHIQUE	81
	LISTE DES ABREVIATIONS	82
	ANNEXES	83

Liste des illustrations

- Tableau I: Classification systématique du Lycaon
- Tableau II: Principales distributions des lycaons en Afrique du Sud en dehors du Parc National Kruger (2005)
- Tableau III: Quantification de l'ADN extrait des fèces selon les différents modes de conservation à l'aide du kit Dynabeads DNA DIRECT Universal
- Tableau IV: Quantification de l'ADN extrait des fèces selon les différents modes de conservation et d'extraction à l'aide du QIAamp DNA Stool Kit
- Tableau V: DMSO ou éthanol, argumentation
- Table VI: Les microsatellites qui ont amplifié et les différentes fluorescences par multiplex
- Tableau VII: Quantification de tous les échantillons prélevés à Madikwe
- Tableau VIII: Liens de parenté de tous les lycaons présents à Madikwe
-
- Figure 1: Arbre généalogique des canidés
- Figure 2: Différentes étapes de l'extraction
- Figure 3: Contrôle de la qualité de l'ADN natif sur gel d'agarose
- Figure 4: Différentes méthodes de purification de l'ADN
- Figure 5: Les différentes étapes de la PCR
- Figure 6: L'amplification exponentielle d'ADN par PCR
- Figure 7: Vérification du produit de la PCR sur gel
- Figure 8: Principe des marqueurs microsatellites
- Figure 9: Vue générale du programme *STRand*
- Figure 10: Exemple de visualisation de 4 microsatellites par *STRand* (pics colorés)
- Figure 11: Exemple d'une exclusion microsatellite dans l'analyse de la paternité dans le groupe de Tswasa avec le programme *STRand*

Liste des photographies et crédit photographique

- Photo 1 : Lycaon femelle (C. Moueix, 2004)
- Photo 2 : Lycaon mâle (C. Moueix, 2004)
- Photo 3 : Chiots de 3 mois (C. Moueix, 2004)
- Photo 4 : Chiots de quelques jours dans le trou (De Wildt, 1997)
- Photo 5 : Groupe de Lycaon venant de tuer un gnou (C. Moueix, 2005)
- Photo 6 : « Rallye social » (C. Moueix, 2005)
- Photo 7 : Lion et lionne (*Panthera leo*) (C. Moueix, 2004)
- Photo 8 : Hyène tachetée (*Crocuta crocuta*) (C. Moueix, 2004)
- Photo 9 : Flèches à biopsie (C. Moueix, 2004)
- Photo 10 : Dan Inject (C. Moueix, 2004)
- Photo 11 : Guépard de 3 jours (C. Moueix, 2004)
- Photo 12 : Guépard adulte (C. Moueix, 2004)
- Photo 13 : Cinq lycaons dans un enclos (C. Moueix, 2004)
- Photo 14 : Recherche du groupe de Lycaon à l'aide du télémètre (C. Moueix, 2004)
-
- Carte 1 : Carte représentant les réserves naturelles du sud de l'Afrique (Vanschalkwyk, 2005)
- Carte 2 : Situation géographique de la réserve de Madikwe (Vanschalkwyk, 2005)

Liste des abréviations

ADN	Acide Desoxyribonucléique
DMSO	Dimethyl Sulfoxyde
PCR	Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
BET	Bromure d'Ethidium
UV	Ultra Violet
ARN	Acide Ribonucléique
A ₂₆₀ et A ₂₈₀	Absorbance
NTP	Nucléotide Tri Phosphate
STR	Short Tandem Repeats
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
ISAG	International Society of Animal Genetics
EDTA	Ethylène diamine tétra acétique

Première partie : étude bibliographique

1 Le Lycaon : le carnivore le plus menacé dans le sud de l'Afrique

1.1 Le Lycaon (*Lycaon pictus*) : étude générale

1.1.1 La taxonomie et la phylogénie

La première description taxonomique du Chien sauvage d'Afrique fut réalisée par Temminck (1820), qui le considérait comme une sorte de hyène (et l'a donc nommé *Hyena picta*). Ce sont les seuls membres du genre *Lycaon*, et Matthew (1930) les a placés dans une sous-famille, les *Simocyaninae*, distincte de tous les autres canidés (Wozencraft, 1989), basant cette distinction sur la forme de la plus basse des molaires carnassières, celle-ci ayant une courte lame et une cuspide non creusée (Van Valkenburgh, 1989). Cette division en sous-famille n'est plus reconnue actuellement (Wozencraft, 1989) car de récentes analyses phylogénétiques, utilisant la génétique moléculaire, ont confirmé la place du Chien sauvage d'Afrique comme unique représentant du genre *Lycaon* (tableau I, figure 1) (Girman *et al.*, 1993).

Tableau I : Classification systématique du Lycaon

Classe	Mammifères
Ordre	Carnivores
Famille	Canidés
Genre	<i>Lycaon</i>
Espèce	<i>Lycaon pictus</i>

Le Lycaon a le même nombre de chromosomes ($2n = 78$) que le Chien domestique (*Canis familiaris*) et la même neuro-anatomie (Radinsky, 1973). Les myoglobines du Lycaon et du Chien domestique diffèrent par un acide aminé, explicable par une unique mutation (Romero-Herrera *et al.*, 1976).

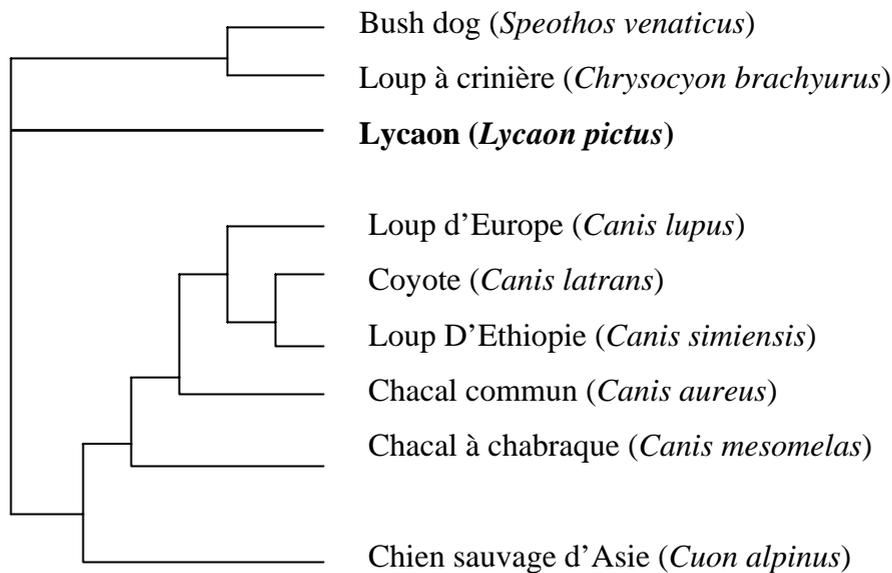


Fig 1: Arbre généalogique des canidés (Girman *et al.*, 1993)

Cette distinction phylogénétique augmente considérablement l'importance de la conservation de cette espèce : l'extinction du *Lycaon* signifierait la disparition d'une lignée unique de canidés ancienne de plusieurs millions d'années.

1.1.2 La morphologie

Le nom scientifique du Chien sauvage d'Afrique (*Lycaon pictus*) signifie « loup peint », en raison de son pelage associant les couleurs marron, noire et blanche. Leur forme suit le plan général de tous les canidés avec quelques modifications accumulées au cours des 3 millions d'années de divergence avec le reste de la famille des canidés. Par exemple, le *Lycaon* ne possède que quatre doigts, ayant perdu le cinquième qui persiste de façon vestigiale (l'ergot) chez la plupart des canidés. Les lycaons sont plus élancés et plus grands que les loups ou les coyotes avec des oreilles rondes démesurément grandes. Cela étant, le *Lycaon* est un animal unique et que l'on apprend à trouver beau en l'étudiant.

Les lycaons mesurent entre 65 et 75 centimètres au garrot et pèsent de 18 à 28 kilogrammes (Smithers, 1976). Même s'ils ont été décrits comme sexuellement monomorphiques (Malcolm, 1979 ; Girman *et al.*, 1993), les mâles sont de 3 à 7 % plus larges que les femelles en mesure linéaire de la taille du corps (photos 1 et 2).



Photo 1 : Lycaon femelle (C. Moueix, 2004)



Photo 2 : Lycaon mâle (C. Moueix, 2004)

Ils ont un pelage clairsemé bien que cela varie entre individus. Cette variation est due à l'âge, les jeunes ayant un pelage plus fourni. La perte de poil se situe surtout sur la tête, qui apparaît grise lorsque la peau devient visible. Les lycaons en captivité dans des zones géographiques à basse température ont tendance à avoir plus de poils. Les couleurs de leur pelage varient considérablement, leur permettant de se reconnaître entre eux à plus de 50 mètres de distance.

Par exemple, lorsque deux groupes de lycaons se rencontrent, chaque chien sauvage pourchasse les membres de l'autre groupe. La scène tourne rapidement au désordre mais on ne verra jamais une poursuite entre deux membres du même groupe, l'odeur n'étant étonnamment pas un critère de reconnaissance des groupes.

La variation de couleur du pelage est surtout visible sur les pattes et le tronc. Tous les individus ont une tête très similaire, un museau noir, une gueule marron et l'arrière des oreilles marron noir. Il n'y a jamais de blanc ni sur la tête ni sur le cou. Pour le reste du corps, les couleurs sont imprévisibles et asymétriques. La queue est pratiquement toujours tricolore, avec du marron à la base suivi d'une bande noire et le reste est blanc. La taille de la bande noire peut varier.

Les lycaons n'ont que 4 doigts aux pattes postérieures, tandis que les représentants du genre *Canis* possèdent un ergot. Les phalanges 2 et 3 sont souvent soudées à la base.

Leur formule dentaire est la même que celle du Chien domestique: 3 1 3 3 (mâchoire supérieure) et 3 1 4 3 (mâchoire inférieure). La dernière molaire est vestigiale. Les

canines sont étroites pour leur longueur, en comparaison avec les autres carnivores (Van Valkenburgh, 1989).

Les fèces sont souvent blanches et poilues, ceci est dû à la grande consommation d'os et de poils.

1.1.3 L'organisation sociale

Les lycaons vivent en permanence en groupes de 2 à 27 adultes et jeunes, plus fréquemment les groupes comportent 5 à 15 individus. Il existe une hiérarchie exceptionnelle dans chaque groupe. La constitution de base d'un groupe est : un couple reproducteur dominant (dit animaux alpha), des individus subordonnés des 2 sexes et les chiots.

Toutes les femelles qui atteignent l'âge de 8 ans ou plus, sont socialement dominantes (Creel & Creel, 2002). Comme les femelles, les mâles deviennent plus facilement dominants lorsqu'ils vieillissent mais uniquement jusqu'à l'âge de 5 ans. La plupart des modifications dans la hiérarchie se produisent pendant la période d'accouplement, car les mâles sont alors impliqués dans deux fois plus de combats (Creel & Creel, 2002). Souvent le groupe d'adultes est constitué d'un plus grand nombre de mâles que de femelles puis, lorsque les juvéniles atteignent l'âge de 2 ans, ils se séparent des adultes pour former un nouveau groupe avec des animaux d'autres origines.

Les mouvements d'animaux et les changements de dominance sont des moyens naturels qui leur permettent d'éviter la consanguinité (Girman *et al.*, 1997).

1.1.4 La reproduction

La reproduction du Lycaon est très saisonnière, entre mars et avril en Afrique du Sud. Cette période est étroitement liée à la saison des pluies, de telle façon que les chiots naissent au moment le plus sec de l'année. Le pic des naissances est en juillet (mois le plus sec), et les pluies restent faibles pendant les trois mois durant lesquels les chiots et la mère restent dans un trou (période de « nichée ») jusqu'à ce que les jeunes deviennent mobiles (photo 3).

Lorsque le groupe entre dans la période de reproduction, les individus dominants, des deux sexes se reproduisent à un taux beaucoup plus élevé que les subordonnés, mais

certains d'entre eux (surtout les bêtas) s'accouplent occasionnellement. La gestion naturelle des accouplements dans le groupe a d'importantes implications sur la dynamique et la diversité génétique des populations. Si la hiérarchie n'était pas respectée, la majorité des accouplements se feraient entre subordonnés car ils sont beaucoup plus nombreux que les animaux dominants.

Des accouplements entre la femelle dominante et certains mâles subordonnés ont déjà été observés; cependant, la paternité de ces mâles n'a jamais été scientifiquement affirmée.



Photo 3 : Chiots de 3 mois (C. Moueix, 2004)

Les femelles alpha produisent 81 % des 85 portées dans le Parc National Kruger (Reich, 1978) et si une femelle subordonnée donne naissance, ses chiots naîtront plusieurs jours après ceux de la dominante. Les chiots issus de cette femelle subordonnée sont soit tués, soit adoptés et élevés par la femelle dominante (Fuller *et al.*, 1992a).

La fécondité de la femelle est fortement influencée par son âge. Seule la femelle dominante de chaque groupe est assurée de reproduire, et très peu de femelles atteignent ce rang lorsqu'elles sont jeunes.

Plus la taille d'un groupe est grande, plus le nombre de chiots nés et élevés est important. Les adultes non reproducteurs contribuent très activement au succès de la survie de la nouvelle génération. Tout d'abord car les lycaons faisant partie d'un large groupe obtiennent plus de viande pour un moindre effort (Creel & Creel, 2002), de plus, lorsque les chiots sont jeunes, les non reproducteurs les nourrissent par régurgitation de viande et jouent aussi le rôle de gardien de la « niche » (Malcom & Marten, 1982). Quand les chiots sont plus grands et qu'ils deviennent mobiles avec le groupe, ils sont autorisés à se

nourrir en premier sur la carcasse, les autres animaux faisant le guet. Le succès de la reproduction des lycaons est donc lié à leur coopération exceptionnelle.

L'accouplement proprement dit s'étale sur 3 à 7 jours, mais le comportement des lycaons change graduellement sur plusieurs semaines avant le premier acte sexuel. Le rapprochement relationnel entre le mâle dominant et la femelle dominante est le premier signe mettant en évidence le début de la période de reproduction. Lors du pro-œstrus, la vulve de la femelle devient gonflée accompagnée de quelques pertes sanguines. La femelle refuse encore les tentatives de monte du mâle pendant quelques jours, en se déplaçant, se couchant sur le côté ou encore en mordant le mâle. La femelle arrête progressivement ce comportement et finalement se positionne bien droite, avec la queue relevée sur le côté laissant alors le mâle la monter. Plusieurs tentatives de montes sont nécessaires pour obtenir une copulation complète. Les 2 animaux sont alors immobilisés et liés pour quelques secondes, parfois même quelques minutes (Creel & Creel, 2002). Lors de la séparation, le couple va souvent se coucher ensemble, à l'écart du groupe.

Dans la majorité des groupes de lycaons, la femelle dominante donne naissance à une seule portée par an. Chaque portée comporte de 8 à 11 chiots mais peut parfois atteindre le chiffre de 16 (Fuller *et al.*, 1992a). La gestation est de 60 jours, la femelle met bas dans un trou dans le sol. Ce trou est souvent un ancien trou creusé par des phacochères, la femelle l'aménage en grattant avec ses pattes avant. La plupart des trous sont effectués dans des sols sableux et ils possèdent plusieurs sorties (photo 4). Un seul trou est occupé au même moment mais les chiots peuvent être déplacés si des lions s'approchent trop de la région. Plusieurs adultes peuvent participer à ce déplacement en portant les chiots dans leur gueule, mais généralement la femelle s'en occupe seule. Les causes de ce changement de trou ne sont pas toujours évidentes. L'accumulation de fèces, d'os issus de la viande régurgitée et l'odeur nauséabonde pourraient attirer d'autres carnivores. La mort d'un chiot dans le trou ou l'augmentation du nombre de parasites peuvent aussi être à l'origine de ce déplacement. Cette période de « nichée » est la seule période pendant laquelle les lycaons reviennent tous les jours au même endroit ; le reste de l'année, il est très rare que le groupe dorme 2 jours consécutifs au même endroit. Le trou est situé près d'une source permanente d'eau, ce qui attire une grande concentration d'ongulés

sauvages. Cette proximité permet aux lycaons une grande économie d'énergie dépensée normalement à la poursuite de leur proie (Creel & Creel, 2002).



Photo 4 : Chiots de quelques jours dans le trou (de Wildt, 1997)

1.1.5 La chasse en meute et les habitudes alimentaires

Tous les membres d'un groupe de lycaons chassent ensemble. En chassant en meute, ils peuvent attraper des proies beaucoup plus grandes, qu'individuellement ils n'auraient aucune chance de tuer. Leurs proies peuvent atteindre 200 kg (photo 5) (Gnou, Bubale, Cobe, Kudu ...) même si en moyenne ils attrapent plus souvent des antilopes d'environ 50 kg (Impala, Springbok ...) (Malcolm & van Lawick, 1975 ; Creel & Creel, 1995).

La chasse des lycaons est presque toujours précédée d'un « rallye social » (photo 6) que l'on interprète comme une coordination du groupe avant la course (Creel & Creel, 2002).



Photo 5 : Groupe de Lycaon venant de tuer un gnou (C. Moueix, 2005)

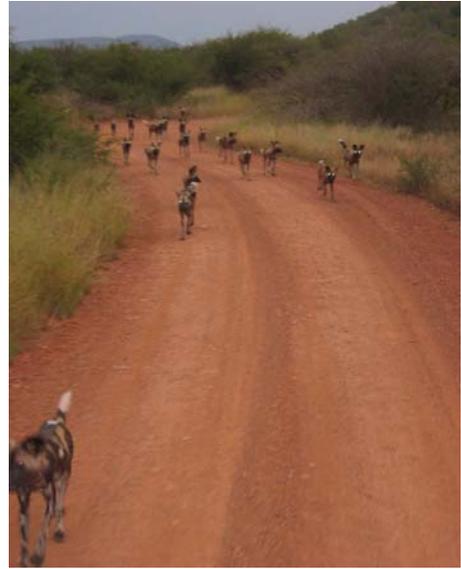


Photo 6 : «Rallye social» (C. Moueix, 2005)

Lorsque la proie voit les lycaons, elle peut soit s'enfuir dans la direction opposée soit faire face et se défendre en donnant des coups de tête et de pattes (Creel & Creel, 1995). Pendant la course, les chiens sauvages peuvent atteindre une vitesse de 60 Km/h, ils sont spécialement adaptés pour gérer cette forte augmentation de leur température corporelle (Taylor *et al.*, 1971). Les lycaons se dispersent dans de nombreuses directions, lorsque le premier animal réussit à attraper sa proie (souvent par la queue ou les pattes), il ne lâchera pas sa prise tant que les autres membres du groupe ne sont pas venus l'aider (Creel & Creel, 2002). Un des lycaons va faire face à l'animal encerclé, pour occuper son attention pendant que les autres commencent à l'éviscérer (Kuhme, 1965). Si la proie est un jeune, certains membres du groupe de lycaons vont maintenir la mère à l'écart sans forcément avoir l'intention de la tuer (Creel & Creel, 1995).

Grâce à cette coopération, le Lycaon a un très fort taux de réussite à la chasse (mesuré en kg tué/ kg chassé) comparé à celui qu'il aurait s'il chassait seul (Creel & Creel, 1995). Des groupes importants peuvent également protéger leur proie contre des charognards (Fanshawe & FitzGibbon, 1993).

1.1.6 La territorialité

Les lycaons ont besoin de territoires beaucoup plus grands que leur taille corporelle ne pourrait le laisser supposer (Gittleman & Harvey, 1982). Ils sont purement nomades en dehors de la période de « nichée », pouvant se déplacer sur des milliers de km² (Burrows, 1995). Les territoires de différents groupes de lycaons peuvent se recouper mais les animaux ne se rencontrent que très rarement. La nécessité de si grands territoires pour les lycaons n'a pas encore été bien comprise, car le rapport avec la concentration de proies n'a pas été prouvé (Creel & Creel, 1996).

1.2 Le statut et la répartition des populations restantes de Lycaon :

1.2.1 La répartition des Lycaons en Afrique

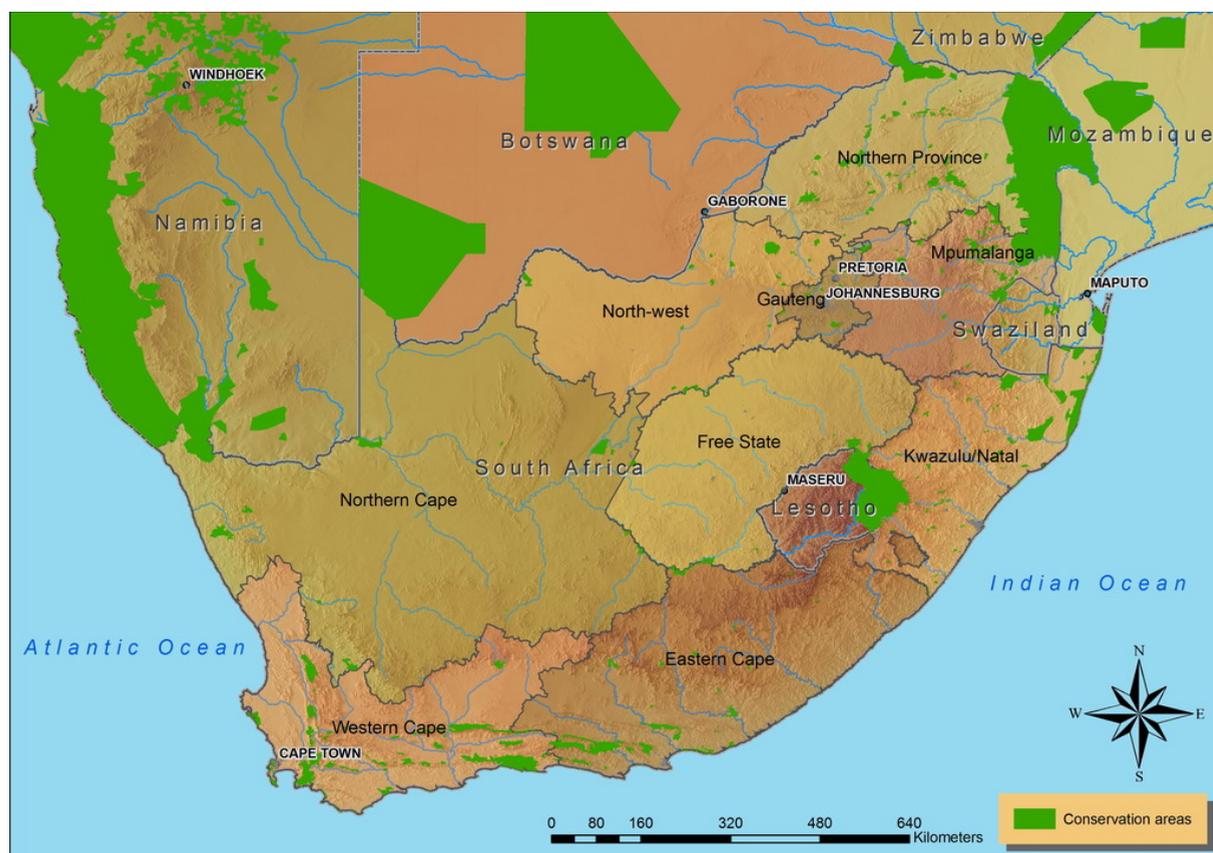
Le Lycaon est l'espèce de carnivores la plus menacée après le Loup d'Ethiopie (*Canis simensis*). On craint que le Lycaon disparaisse complètement dans une période de 10 à 40 ans. Au cours des 30 dernières années, sa présence en Afrique est passée de 33 à 15 pays (Woodroffe *et al.*, 1997).

Historiquement, les chiens sauvages étaient présents dans toute l'Afrique au sud du Sahara, à l'exception des forêts tropicales et du désert (Creel & Creel, 2002). Il y a eu une réduction dramatique en nombre et en occupation de territoire au cours des 30 dernières années. La dernière estimation fait état de 3500 à 5000 animaux (Fanshawe *et al.*, 1997). Les lycaons ont disparu du Nord et de l'Ouest de l'Afrique (Fanshawe *et al.*, 1997), les populations viables sont maintenant restreintes au Sud (Botswana, Namibie, Afrique du Sud et Zimbabwe), au centre (Zambie) et à l'Est de l'Afrique (Tanzanie).

Les besoins écologiques des lycaons les prédisposent à des difficultés dans la gestion de leur conservation. Large territoire et faible densité sont les deux exigences de base pour leur conservation (Creel & Creel, 2002). Géographiquement, le déclin de la population de lycaons reflète les mouvements de populations humaines ; d'ailleurs, de nos jours, ils ne subsistent que dans les pays à faible densité humaine (Woodroffe & Ginsberg, 1998).

1.2.2 La répartition des Lycaons en Afrique du Sud

Une métapopulation de Lycaon existe en Afrique du Sud. Celle-ci se situe dans le Parc National Kruger (2 millions d'hectares au Nord-Est de l'Afrique du Sud, à la frontière du Mozambique), comptant environ **200** chiens sauvages (estimation au dernier comptage réalisé en Juin 2005). L'objectif de conservation est d'établir une deuxième métapopulation, constituée de plusieurs populations isolées dans de plus petites réserves (carte 1).



Carte 1 : Carte représentant les réserves naturelles du sud de l'Afrique (Vanschalkwyk, 2005)

Cette stratégie connaît actuellement un certain succès, avec à ce jour **200** lycaons répartis en quelques sous-populations établies sur un territoire total d'environ 5000 km². Etant donné le nombre limité de parcs nationaux ou provinciaux (l'Afrique du Sud est divisée en 9 provinces), ses sous-populations se sont développées dans des réserves privées. Le tableau II permet de récapituler les sous-populations de lycaons d'Afrique du Sud.

Selon la dernière estimation de Lindsey (2003), la population de lycaons hors des zones protégées est d'environ **150** animaux.

Tableau II : Principales distributions des lycaons en Afrique du Sud en dehors du Parc National Kruger (2005) (Lindsey, 2003)

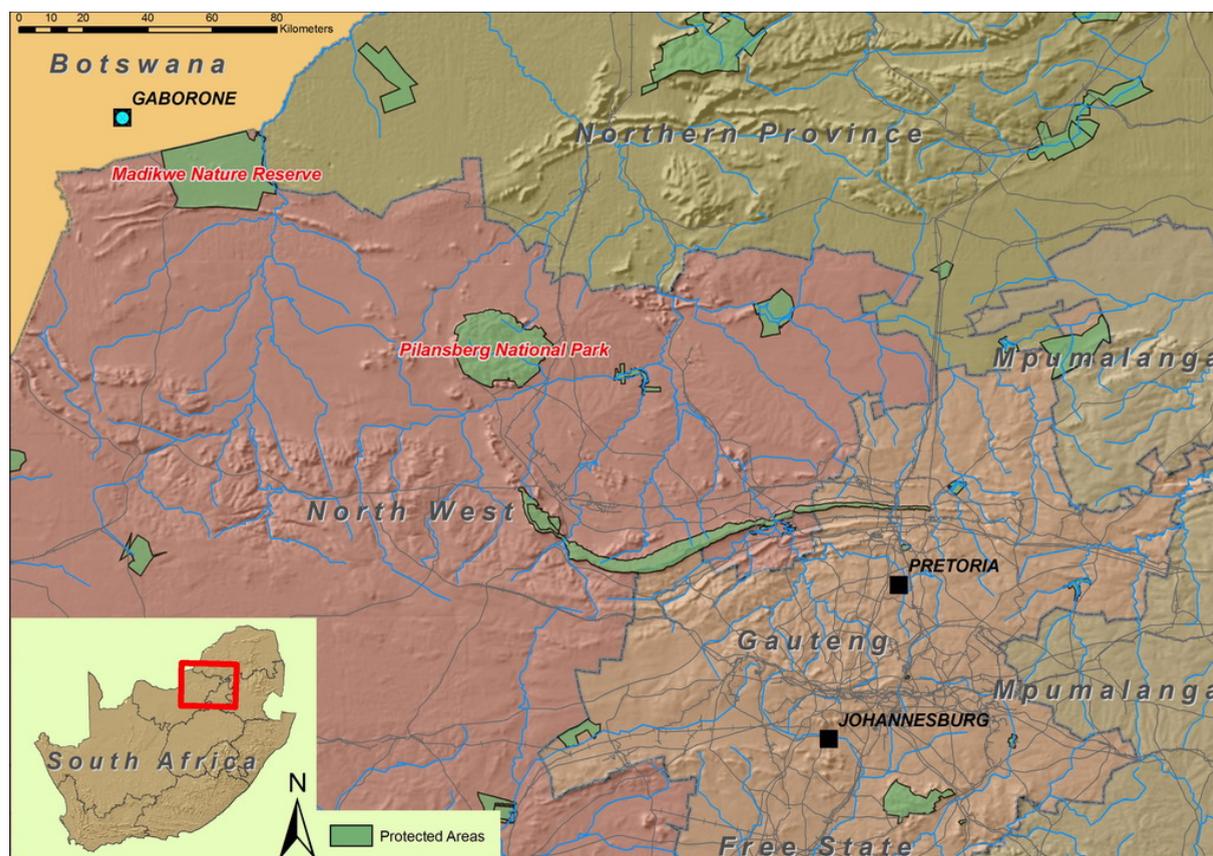
Nom de la réserve	Taille de la réserve (km²)	Nombre de Lycaon (par groupe)
Hluhluwe-Umfolozi Park et alentours	970	31
Madikwe Game Reserve	765	12 + 26
Pilanesberg National Park	468	12 + 18
Venetia Limpopo Nature Reserve	3000	20

La population de lycaons en liberté en Afrique du Sud s'élève à environ 550. Les chiffres exacts des animaux élevés en captivité ne sont pas connus, mais dans une optique de conservation, ces données sont moins importantes.

L'utilisation de très larges territoires de chasse et la très grande consommation de proies sont 2 facteurs très limitants à l'introduction de lycaons dans de nombreuses réserves. Beaucoup de tentatives ont échoué à cause d'un manque de suivi du groupe après leur libération. Plusieurs facteurs doivent être surveillés : la qualité des clôtures du parc, la suffisance des proies, la densité des autres carnivores (Mills & Gorman, 1997).

L'exemple de la réserve de Madikwe (carte 2) en 1994-1995 (lieu dans lequel notre projet personnel a été réalisé) permet d'illustrer une introduction à succès. Trois adultes mâles provenant d'un groupe sauvage de lycaons à l'ouest du Parc National Kruger ont été transportés par hélicoptère jusqu'à Madikwe, où ils ont été relâchés dans un enclos d'environ 1 hectare. Deux mois plus tard, 3 femelles de la même portée, élevées en captivité au « de Wildt Cheetah and Wildlife Centre » ont été emmenées par la route à Madikwe et relâchées dans ce même enclos. Ces 6 lycaons ont été équipés de colliers émetteurs et ont été lâchés dans la réserve 4 mois plus tard. Lors des premières chaleurs de la femelle dominante, de nombreux combats entre les mâles ont été observés, la

dominance changeant alors pratiquement tous les jours. Les 3 mâles se sont accouplés avec la femelle alpha, qui a donné naissance à des chiots mort nés. Les autres femelles sont aussi venues en chaleur mais plus tard, et ont été montées par le mâle dominant du moment. Les 2 femelles subordonnées ont mis bas des chiots vivants à un mois et demi d'intervalle et ont utilisé le même trou que la femelle dominante. Sept semaines plus tard, 7 chiots sont sortis du trou. C'est donc en 1997 que cette opération d'introduction a été définitivement considérée comme une réussite. D'autres animaux ont été introduits plus tard, lorsque la rage a touché les lycaons de Madikwe. Il y a actuellement 2 groupes constitués de 15 et 9 adultes. Aucun lycaon ne s'est échappé de Madikwe, les ressources en proies sont suffisantes et ils se reproduisent chaque année avec grand succès, les portées de 2004 étant respectivement de 15 et 10 chiots.



Carte 2 : Situation géographique de la réserve de Madikwe (Vanschalkwyk, 2005)

Après avoir constaté le déclin de la population en Afrique, nous allons en étudier les causes.

1.3 Les causes passées et futures du déclin de la population de Lycaon :

1.3.1 Les facteurs « naturels » responsables du déclin de la population de Lycaon

1.3.1.1 La compétition indirecte avec d'autres grands carnivores

La survie et le succès de la reproduction des lycaons dépendent de leur habilité à sécuriser leur proie. Les lycaons cohabitent toujours avec d'autres carnivores tels que des lions, des hyènes, des léopards et des guépards. Partout où ils ont été étudiés, le spectre des proies chassées par les lycaons est très similaire à celui des autres prédateurs du même habitat (Creel & Creel, 1996), ce qui soulève la question de la compétition entre carnivores. Particulièrement si les autres carnivores rendent la densité de proies si faible que les lycaons ne peuvent plus en localiser ou en attraper.

Là où les ongulés sauvages sont abondants, cette compétition n'est pas vraiment envisageable. Certaines études montrent que le nombre de Lycaon n'est pas limité par la disponibilité de la nourriture (Mills & Biggs, 1993 ; Ginsberg *et al.*, 1995b). Les lycaons sont des prédateurs efficaces, ils ont rarement de problèmes pour trouver ou attraper leur proie (Fanshawe & FitzGibbon, 1993 ; Creel & Creel, 1995). Par ailleurs, les lycaons sont crépusculaires tandis que leurs concurrents sont soit des chasseurs nocturnes (lions, hyènes, léopards) soit des chasseurs diurnes (guépards).

La compétition indirecte avec d'autres grands carnivores ne semble pas avoir d'impact sur la population de Lycaon.

1.3.1.2 La compétition directe avec d'autres grands carnivores

Même si les lycaons sont des chasseurs très efficaces, ils peuvent parfois se faire voler leur proie par des charognards. Les hyènes sont les clepto-parasites les plus redoutés des lycaons (Creel & Creel, 1996). La compétition directe avec les hyènes peut réduire le nombre de lycaons, en réduisant le temps passé sur une carcasse, cela pouvant entraîner une augmentation du taux de mortalité et une baisse de la reproduction. Fuller & Kat (1990) ont prouvé qu'un groupe de lycaons nécessite un taux élevé d'aliments ingérés

lorsque qu'il doit nourrir les chiots (environ 4,1 kg/lycaon/jour avec chiot, alors que le reste du temps : 1,6 kg/lycaon/jour). Ils ont observé qu'un groupe ne pouvant atteindre un tel taux pendant la période de « nichée » peut abandonner la portée. Donc, lorsque les hyènes sont menaçantes autour de la carcasse, les lycaons peuvent être obligés d'abandonner leur portée. Creel & Creel (1996) ont trouvé une corrélation négative entre les densités de population de lycaons et celle de hyènes sur 5 sites d'études en Afrique de l'Est et du Sud.

1.3.1.3 La prédation par d'autres grands carnivores

Les lycaons sont des prédateurs mais ils subissent aussi la prédation. Woodroffe (1997) a observé sur différents sites d'étude des taux de mortalité élevés dus à la prédation par d'autres carnivores : 22 % des adultes (16 morts sur 74 individus) et 42 % des jeunes (19 morts sur 45 individus). Sur ces animaux morts : 75 % des adultes et 89 % des chiots furent tués par des lions (photo 7). La prédation par les hyènes (photo 8) est moins importante, seulement responsable de la mort de 2 % des adultes (sur une population de 74 animaux) et de 8 % des jeunes (sur 45 chiots).



Photo 7 : Lion et lionne
(*Panthera leo*) (C. Moueix, 2004)



Photo 8 : Hyène tachetée
(*Crocuta crocuta*) (C. Moueix, 2004)

Le Lycaon ne constitue pas une part importante du régime alimentaire du Lion ; on retrouve souvent les corps morts des chiens sauvages d'Afrique, simplement tués et non mangés par les lions. Si la densité d'ongulés sauvages diminue, les lions vont s'attaquer aux autres prédateurs pour s'assurer d'avoir le maximum de leur proie préférée.

Creel & Creel (1996) affirment une corrélation évidente entre le nombre de lycaons et la persécution par les lions.

Un des grands prédateurs pour le Lycaon est le Lycaon lui même. Si 2 groupes se rencontrent, les pertes peuvent être rapidement très élevées, jusqu'à ce qu'un des groupes s'avoue vaincu et quitte le territoire.

1.3.2 Les facteurs humains responsables du déclin de la population de Lycaon

1.3.2.1 Les accidents de la route

- Dans des parcs nationaux :

Le taux de mortalité dépend de la limitation de vitesse et de la qualité des routes.

Dans le Parc National Kruger (Afrique du Sud) et dans le Parc National Selous (Tanzanie), seulement 1 lycaon sur un total de 23 morts fut tué par une voiture en 2001 (Creel & Creel, 2002).

En revanche, dans le Parc National de Hwange (Zimbabwe), les accidents de la route sont responsables de plus de la moitié de la mortalité des adultes. Ce parc est traversé par la route principale allant de Bulawayo aux chutes Victoria, route très fréquentée et dont la limitation de vitesse est de 120 Km/h.

- En dehors des zones protégées :

Les lycaons se servent des routes pour se déplacer donc dans des zones non protégées, le taux de mortalité par accident est proportionnellement plus élevé que dans les parcs. En revanche, ces accidents sont une source importante de renseignements sur les déplacements des lycaons.

1.3.2.2 La persécution directe : tir, empoisonnement et piégeage

La persécution directe par l'Homme est sans aucun doute la cause la plus importante du déclin des lycaons depuis un siècle. Les chiens sauvages d'Afrique furent abattus comme de la vermine, même dans certains parcs nationaux. Même si cela n'arrive plus de nos jours dans les parcs nationaux, c'est encore une pratique courante même dans des zones protégées. Selon Fitzjohn (1995), tirs et empoisonnements ont été responsables de 27 %

de la mortalité de lycaons dans 5 lieux d'études dont 3 étaient des endroits partiellement protégés.

Les lycaons sont persécutés là où ils sont considérés comme la peste qui tue le bétail ou encore les ongulés sauvages « réservés » pour la chasse. Le prélèvement de bétail effectué par les lycaons reste très faible, ils ne s'attaquent qu'aux animaux jeunes ou faibles et cela uniquement si ils ne peuvent pas chasser d'animaux sauvages (Fuller & Kat, 1990).

Le piégeage entraîne un plus grand taux de mortalité chez les adultes (10 %) que chez les jeunes (4 %) même dans des zones protégées (Ginsberg *et al.*, 1995).

1.3.3 Les maladies affectant les lycaons

1.3.3.1 Les infections virales

- La rage

Le virus de la rage est un rhabdovirus qui peut infecter tous les mammifères. En Afrique, la faible surveillance du Chien domestique en fait l'hôte principal (Baer & Wandeler, 1987). La rage est la principale menace des canidés en voie de disparition : une épizootie a réduit de moitié la population de Loup d'Ethiopie dans le Parc National de Bale Mountains (Ethiopie. Sillero-Zubiri *et al.*, 1996).

La rage est connue pour être une cause de mortalité importante chez le Lycaon. La maladie se propage très rapidement et peut décimer un groupe entier avant même de pouvoir être transmise par morsure à d'autres groupes (Kat *et al.*, 1995). D'autres espèces (renards, chacals) sont probablement le réservoir du virus et les lycaons ne sont atteints qu'occasionnellement (Nel, 1993). De nombreuses tentatives d'introduction de lycaons en Afrique du Sud ont échoué à cause de la rage; des vaccinations systématiques ont été mises en place.

- La maladie de Carré

Le virus de la maladie de Carré est un morbillivirus qui se transmet par inhalation de particules virales (Appel, 1987c). Le virus touche la plupart des carnivores terrestres et a, par le passé, décimé des populations entières de lions (Roelke-Parker *et al.*, 1996). Dans de nombreux cas, les symptômes gastro-intestinaux de la maladie ont été observés chez

les lycaons mais la sérologie n'a mis en évidence ni anticorps ni virus. Plus de recherches sont nécessaires pour affirmer l'impact de la maladie de Carré chez les lycaons.

- La parvovirose canine

Le parvovirus canin est un virus qui ne se réplique que chez les canidés. Son impact sur les populations de Lycaon est encore mal connu. On ne sait pas si la maladie persiste chez le Lycaon ou si elle vient du Chien domestique. Des études à long terme sur le Loup gris ont montré que la parvovirose est une importante cause de mortalité juvénile mais que son effet sur le renouvellement des populations est trop faible pour être responsable de leur déclin (Mech & Goyal, 1995).

1.3.3.2 Les infections bactériennes

- L'anthrax

L'anthrax est une maladie bactérienne très importante qui affecte tous les mammifères. Bien que l'enquête sérologique effectuée dans le Kruger sur un petit échantillon de lycaons n'ait pas mis en évidence leur exposition au bacille (van Heerden *et al.*, 1995), l'anthrax est connu pour avoir tué des lycaons dans le Kruger mais aussi à Selous (Creel *et al.*, 1995). Les spores de *Bacillus anthracis* peuvent survivre plusieurs années dans le sol, donc l'agent pathogène peut rester dans l'environnement même en l'absence d'hôte réservoir (Turnbull, 1990). Les animaux en phase finale d'infection montrent des hémorragies nasales, buccales et anales, riches en bactéries qui sporulent au contact de l'air. Par conséquent, les ongulés s'infectent par l'eau ou l'alimentation (Turnbull, 1990). Les carnivores s'infectent en mangeant la chair d'un animal contaminé. La résistance des lycaons à l'anthrax semble variable.

- L'ehrlichiose

L'ehrlichiose est une maladie des chiens domestiques, causée par une bactérie rickettsiale *Ehrlichia canis* et est transmise par la tique *Rhipicephalus sanguineus*. Cette maladie est considérée comme la cause du déclin des lycaons dans le Kruger dans les années 20 et 30 (Stevenson-Hamilton, 1939) mais encore une fois, la sérologie n'a rien prouvé. L'impact de cette maladie sur les populations de lycaons est encore obscur.

1.3.3.3 Les infections parasitaires

- La toxoplasmose

Toxoplasma gondii est un sporozoaire qui affecte tous les mammifères. Tous les lycaons échantillonnés dans le Kruger étaient séropositifs pour *Toxoplasma gondii* (van Heerden *et al.*, 1995). La toxoplasmose peut entraîner une mortalité juvénile mais semble être sans effet sur les adultes.

- La piroplasmose

Babesia canis, protozoaire transmis par les tiques, peut affecter de nombreuses espèces sauvages ou domestiques (Losos, 1986). Les lycaons en captivité sont souvent porteurs du parasite mais ne montrent pas de signes de la maladie. Dans le milieu sauvage, la babésiose ne semble pas avoir d'effet sur les populations de lycaons.

Dans le paragraphe précédent, nous avons présenté le Lycaon, sa biologie, son statut et les principales menaces qui expliquent le fort déclin de la population dans les 30 dernières années. Nous pouvons donc expliquer maintenant la méthodologie d'échantillonnage de prélèvement sur une telle espèce en vue d'améliorer nos connaissances sur les populations et ceci dans le but d'assurer une meilleure conservation.

2 Le matériel génétique : prélèvement sur le terrain, méthode de conservation et analyse au laboratoire

2.1 Prélèvement de matériel génétique de façon non invasive

➤ Les fèces :

La source d'ADN (Acide Désoxyribonucléique) vient des cellules épithéliales du tube digestif qui se déposent dans, ou à la surface des fèces lors de leur transit (Hoss *et al.*, 1992). Les fèces ont un intérêt particulier dans le sens où tous les animaux défèquent régulièrement et que pour certaines espèces, trouver et prélever ces fèces n'est pas très difficile. Cette source génétique a déjà connu un certain succès pour différentes espèces comme les primates (Utami *et al.*, 2002), les lions (Ernest *et al.*, 2000), les ours (Taberlet *et al.*, 1997), les ongulés (Flagstad *et al.*, 1999) et des rhinocéros noirs (Garnier *et al.*, 2001). La source d'erreur est que l'ADN des aliments digérés sera extraite en même temps que celle de l'animal étudié. Comme règle, on considère que les fèces doivent être prélevées dans les 24 heures après la défécation en favorisant celles qui ont eu la possibilité de sécher rapidement. Prélever l'ensemble de la défécation est possible lorsqu'elle est de petite taille, racler la surface de celle ci peut être recommandé si elle est volumineuse (Fernando, 2000).

Lors d'une étude individuelle, il faudra que l'observateur puisse suivre l'animal en permanence pour pouvoir identifier avec certitude l'origine des fèces collectées.

➤ La peau :

Auparavant, l'utilisation de tissus comme source d'ADN était une méthode invasive, qui consistait en la capture de l'animal sauvage, le prélèvement d'un bout de peau (souvent un clip à l'oreille) puis le réveil et le relâcher de celui ci. Cette opération nécessite une logistique très élaborée, coûteuse, et dangereuse, exposant l'animal à de nombreux risques.

L'invention récente de flèches à biopsie a permis de rendre le prélèvement de peau semi-invasif. Tout d'abord mis en place chez les mammifères marins puis chez l'hippopotame

(*Hippopotamus amphibius*), ces flèches étaient associées à un flotteur qui permettait de les retrouver facilement (Gemmell *et al.*, 1997 ; Beckwitt *et al.*, 2002).

L'échantillon de peau est prélevé par une flèche dont la tête a été modifiée, constituée d'une aiguille munie de crochets entourés d'un cylindre coupant d'une longueur d'environ 1 centimètre (photo 9). La forme de l'embout permet, lors de l'impact sur l'animal, de rebondir en ayant prélevé un bout de peau. L'arme utilisée pour tirer ce projectile est un fusil à air comprimé, (photo 10) dont la taille du canon est adaptable à la taille de la flèche. La pression va être réglée manuellement par le tireur selon la distance qui le sépare de l'animal visé.

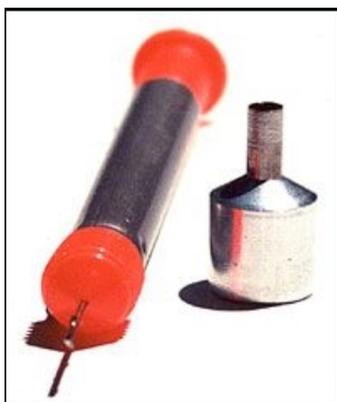


Photo 9 : Flèches à biopsie (C. Moueix, 2004)



Photo 10 : Dan Inject (C. Moueix, 2004)

La distance recommandée entre le tireur et l'animal ne doit pas excéder 20 mètres car la trajectoire de la flèche peut être modifiée dans cet intervalle.

Chez les carnivores, les zones à viser sont : l'épaule et la cuisse. Ainsi, l'impact se fait sur une zone musculaire. L'atteinte des autres zones du corps (tête, thorax, abdomen) peut être mortelle pour l'animal.

Il est donc préférable d'être un tireur expérimenté pour entreprendre une étude semblable. Lorsque le tir est effectué avec la bonne pression et au bon endroit, l'animal ne réagit pratiquement pas, celui ci sera plus intrigué par le bruit de la détonation que par l'impact. La flèche tombant au sol, il est important de la numéroter pour pouvoir associer avec certitude l'échantillon à un animal.

2.2 Conservation des échantillons entre le lieu de prélèvement et le laboratoire

Le but de toutes les méthodes de conservation est de limiter les dégradations de l'ADN par des enzymes présentes naturellement dans l'échantillon ou qui sont produites par le développement de microorganismes. Etant donné que ces enzymes agissent normalement en milieu aqueux, les trois stratégies de conservation vont être : la dessiccation, la congélation ou l'immersion dans un liquide inhibant cette activité enzymatique.

➤ La dessiccation :

La dessiccation est la méthode la plus employée. C'est particulièrement pratique pour de très petites quantités de tissus, comme un follicule pileux. On peut aussi appliquer cette technique à des échantillons plus volumineux comme les fèces mais on doit faire particulièrement attention à ce qu'aucune dégradation n'ait lieu lors de ce processus. Une nuit dans une pièce isolée de l'humidité, à température ambiante peut suffire. Le plus facile est de stocker les échantillons de fèces dans une enveloppe de papier. Pour éviter que les moisissures de l'environnement n'affectent les échantillons, on place dans une autre enveloppe plusieurs cuillères à café de billes de silice (Piggott & Taylor, 2003) et l'on met toutes ces enveloppes dans un sac plastique hermétique. Le changement de couleur (témoin de dessiccation), indiquant le niveau de saturation d'eau, doit être vérifié tous les mois et changé si nécessaire.

Cette méthode est donc bien adaptée pour les fèces (Frantzen *et al.*, 1998). L'échantillon peut aussi être conservé directement dans des tubes contenant des billes de silice, ce qui facilite le travail sur le terrain, les tubes pouvant être préparés à l'avance. Il faut environ 7 volumes de billes de silice pour un volume de crotte. Lorsque les billes de couleur bleue deviennent roses ou transparentes, cela signifie que l'échantillon est bien desséché (Valière, communication personnelle).

➤ La congélation :

Congeler les échantillons à -20°C est une méthode efficace pour un certain nombre d'échantillons (Ernest *et al.*, 2000 ; Piggott & Taylor, 2003). Le principal problème est la

décongélation. Celle ci peut endommager et dégrader l'ADN rapidement. Sur le terrain et lors du transport, il est difficile de maintenir ces températures donc le risque est grand.

➤ L'immersion dans un liquide inhibant l'activité enzymatique :

- L'éthanol :

Un échantillon conservé dans de l'éthanol ne doit pas être épais de plus de quelques millimètres et doit être placé dans un tube bien hermétique car si l'éthanol s'évapore, l'échantillon est perdu. L'utilisation d'éthanol absolu (99 %) est nécessaire. Le transport est facilité car les changements de température n'influent pas sur la qualité de la conservation, en revanche, une fois au laboratoire, on considère que l'ADN pourra être endommagée si les extractions ne sont pas réalisées dans les 6 semaines (Frantzen *et al.*, 1998).

- Le DMSO : solution tampon saline

Cette solution tampon est composée de : 20 % de Diméthyl Sulfoxyde (DMSO), 100mM de Tris, 25mM de Sodium EDTA, le pH doit être de 7,5, et on ajoute du Chlorure de Sodium (NaCl) à saturation (Seutin *et al.*, 1991). Dans un tube en verre d'environ 15 mL, on place notre échantillon de 2 mL dans 4 mL de solution tampon. Ces tubes peuvent être conservés à température ambiante plusieurs années. L'interaction entre le plastique et le DMSO nécessite l'utilisation de tubes en verre, qui peuvent, sur le terrain et lors du transport, entraîner un risque de casse (Frantzen *et al.*, 1998 ; Fernando *et al.*, 2003).

On retiendra donc pour la conservation des biopsies l'utilisation de liquide comme l'éthanol (si les analyses de laboratoire sont effectuées rapidement après le prélèvement) ou comme le DMSO (si les manipulations permettent l'utilisation de tubes en verre).

Pour les fèces, une méthode est mise en avant par la littérature: immersion dans de l'éthanol absolu pendant 24 heures puis séchage dans des billes de silice.

Une fois prélevés, les échantillons sont analysés au laboratoire en suivant des étapes très précises : l'extraction de l'ADN de l'échantillon, son amplification par PCR et l'utilisation de marqueurs de cet ADN.

2.3 Analyse du matériel génétique au laboratoire

2.3.1 Extraction d'ADN et amplification par PCR

2.3.1.1 L'extraction d'ADN

Le protocole d'extraction est sensiblement le même quelle que soit la nature de l'échantillon (figure 1). L'échantillon, qui, comme pour les extractions protéiques, peut être un individu entier de petite taille ou une partie d'individu (pattes d'un insecte), ou des fragments de tissu animal ou végétal, est broyé dans du tampon qui contient un détergent (Sodium Dodecyl Sulfate). De la protéinase est ajoutée pour dégrader les histones associées à l'ADN.

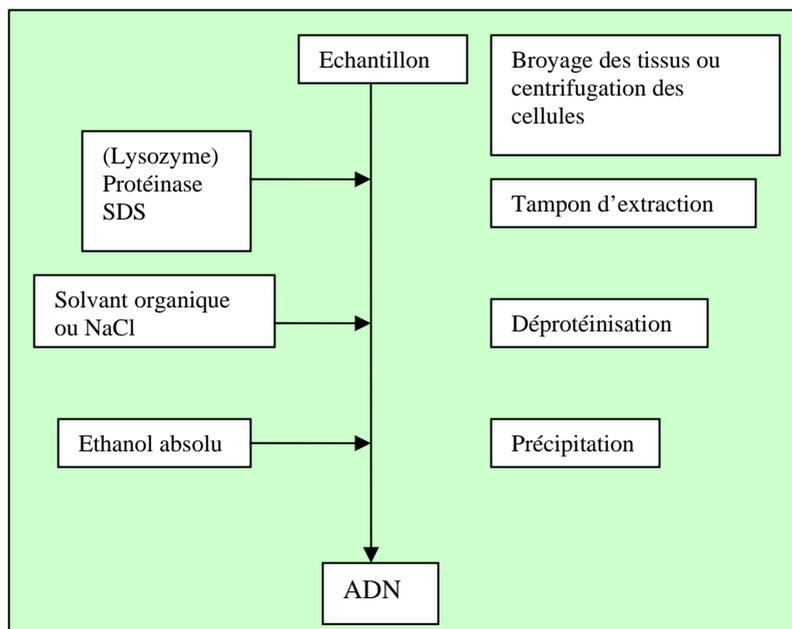


Figure 2 : Différentes étapes de l'extraction (Harry, 2001)

Après une incubation nécessaire à la dégradation des protéines, il faut isoler l'ADN des débris cellulaires et des résidus protéiques. Deux méthodes peuvent être utilisées pour la déprotéinisation. La première méthode repose sur l'emploi de solvants organiques (phénol, chloroforme) du fait de leur affinité pour les protéines. Les protéines sont alors « piégées » dans la phase organique alors que l'ADN est solubilisé dans la phase aqueuse.

Après centrifugation, l'ADN est récupéré dans la phase aqueuse constituant le surnageant.

La deuxième méthode consiste à réaliser une déprotéinisation à haute force ionique ou « salting out ». Des sels (par exemple du NaCl) sont ajoutés à haute concentration. Ceci entraîne la précipitation des protéines, alors que l'ADN lorsqu'il est soumis à une haute force ionique reste soluble. Après une faible centrifugation, le surnageant contenant l'ADN est prélevé.

Après une centrifugation, l'ADN est séché et le culot est repris dans de l'eau ou du tampon avant analyse (Griffiths *et al.*, 2001).

Notons que des kits commercialisés permettent d'extraire l'ADN de bactéries, de cellules sanguines ou de certains tissus, en utilisant des mini-colonnes constituées de gel ou de résine présentant une affinité pour l'ADN.

La qualité de l'ADN extrait est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 2). L'ADN, auquel on a ajouté du bleu de bromo-phénol pour l'alourdir et servant également de front de migration, est déposé dans des puits. Comme les protéines, soumis à un champ électrique que conduit un tampon, l'ADN migre en fonction de sa charge. L'ADN chargé négativement migre vers la cathode (+) à une vitesse qui dépend de sa taille et de sa forme. Les petits fragments migrent les plus rapidement alors que les plus gros sont freinés par le maillage des constituants du gel. Un marqueur de taille est également déposé. L'ADN dit natif, est ensuite révélé en utilisant les propriétés d'agent intercalant et de fluorescence aux UV du bromure d'éthidium (BET) (Harry, 2001).

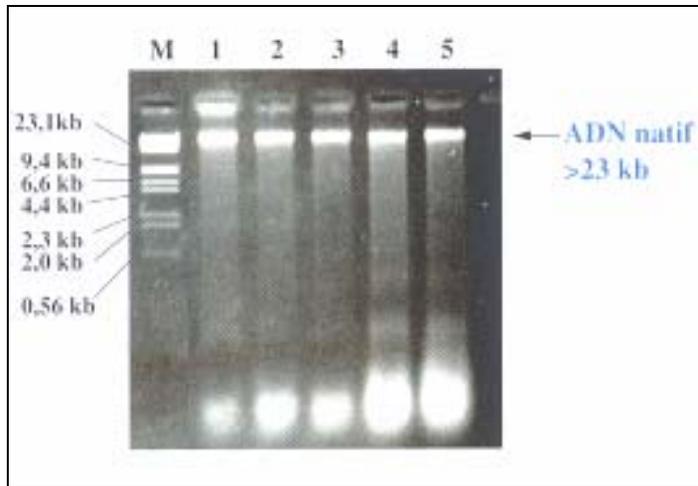


Figure 3 : Contrôle de la qualité de l'ADN natif sur gel d'agarose (Harry, 2001)

Nous disposons pour les fèces de 2 kits d'extraction, le Dynabeads extraction kit et le QIAmp DNA stool kit. Les protocoles de chacun d'eux, ainsi que celui utilisé pour la peau, seront détaillés dans la partie expérimentale.

2.3.1.2 La purification d'ADN

Pour certains échantillons comportant de nombreuses impuretés, une étape supplémentaire de purification de l'ADN est nécessaire car ces contaminants peuvent gêner ou empêcher les analyses moléculaires ultérieures.

Deux catégories de méthodes de purification peuvent être employées : des méthodes électrophorétiques ou chromatographiques (figure 3).

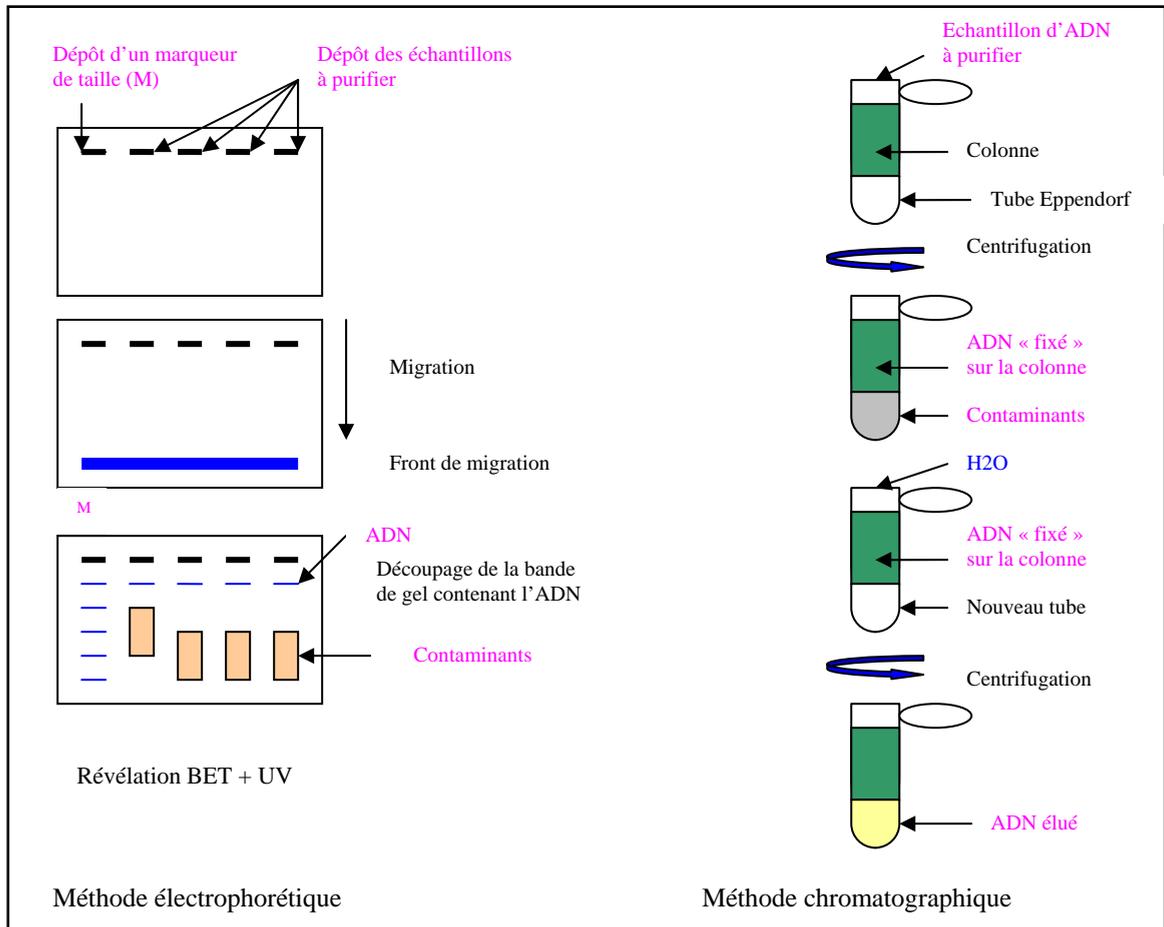


Figure 4 : Différentes méthodes de purification de l'ADN (Harry, 2001)

L'électrophorèse permet de séparer selon leur vitesse de migration les contaminants de l'ADN natif. Les premiers de plus faible poids moléculaire migrent plus vite. L'utilisation d'agarose LMP (pour « Low Melting Point » c'est à dire faible point de fusion) permet d'extraire facilement l'ADN du gel d'agarose après migration. La bande de gel contenant l'ADN peut être fondue à une température relativement basse de l'ordre de 30 à 40 °C ; l'ADN peut alors être purifié de l'agarose ou être directement utilisé pour des études moléculaires. Des mini-colonnes s'adaptant sur des microtubes de centrifugation, sont utilisées pour les méthodes chromatographiques. Ces colonnes peuvent contenir comme matrice différents types de gel et de résine (Harry, 2001).

L'ADN est retenu lors d'une mini-centrifugation sur la matrice en fonction du pH et la force ionique appliquée. Différents lavages de la matrice permettent d'éliminer les contaminants. L'ADN est ensuite élué avec de l'eau ou du tampon.

2.3.1.3 Quantification et qualification de l'ADN

Le spectrophotomètre à ultraviolet est utilisé pour quantifier l'ADN. Pour évaluer la qualité de l'extrait, on calcule la contamination par les protéines et la teneur en ARN.

L'acide nucléique purifié et la plupart des macromolécules biologiques sont incolores. Ces molécules ne manifestent aucune absorption dans la gamme visible du spectre. En revanche, l'ADN montre une absorbance aux ultraviolets (UV) spécifique, avec un maximum à 260 nm et un minima à 230 nm. Des substances tampons et surtout les protéines peuvent créer des interférences dans la gamme d'UV.

La quantité de radiation ultraviolette absorbée par une solution d'ADN est directement proportionnelle à la quantité d'ADN contenue dans l'échantillon. L'absorbance est souvent mesurée à 260 nm ; pour une longueur d'onde d'absorbance (A_{260}) de 1,0 correspond à 50 µg d'ADN double brin par millilitre. L'absorbance aux UV peut aussi être utilisée pour vérifier la pureté de la préparation d'ADN. Pour un échantillon pur d'ADN, le ratio de l'absorbance à 260 nm et à 280 nm ($A_{260/280}$) est de 1,8. Un ratio inférieur à 1,8 indique que la solution est contaminée soit par des protéines, soit par du phénol. Un ratio supérieur indique une forte teneur en ADN (Harry, 2001).

Un bon échantillon doit donc avoir :

- **une quantité d'ADN supérieure ou égale à 100 ng/µl, surtout dans le cas des fèces étant donné que l'ADN n'est pas seulement celui de l'individu mais peut être d'origine bactérienne, parasitaire ou provenant des aliments digérés.**
- **un ratio A_{260}/A_{280} compris entre 1,7 et 2.**

2.3.1.4 L'amplification par PCR

La PCR (« Polymérase Chain Reaction » ou Réaction de Polymérisation en Chaîne) permet l'obtention d'un très grand nombre de copies d'un segment particulier d'ADN, nommé ADN cible. Le principe de cette technique consiste à utiliser deux amorces, courtes séquences d'ADN (18-24 nucléotides), qui s'hybrident à des sites complémentaires situés en orientation inversée sur les deux brins de l'ADN et qui encadrent la région que l'on veut amplifier. L'élongation des brins complémentaires à partir des amorces est assurée par une enzyme polymérase. Alors que le principe de la

PCR a été décrit en 1985, en 1988 la PCR devient encore plus performante avec l'emploi de la *Taq* polymérase dérivée d'une bactérie thermophile, *Thermus aquaticus*, isolée des sources chaudes du parc de Yellowstone et qui présente la propriété d'être stable à la chaleur (Rose, 1991).

La réaction de PCR repose en 3 étapes (figure 4) :

- la dénaturation de l'ADN réalisée à haute température (1 minute à 94°C) conduit à la séparation des deux brins d'ADN par rupture des liaisons hydrogènes.
- l'hybridation des amorces spécifiques se réalise à une température notée T_m déterminée en fonction de la composition nucléotidique des amorces et de leur longueur (0,5 à 2 minutes à 50-60 °C).
- l'élongation des brins d'ADN est effectuée à 72 °C (2 minutes).

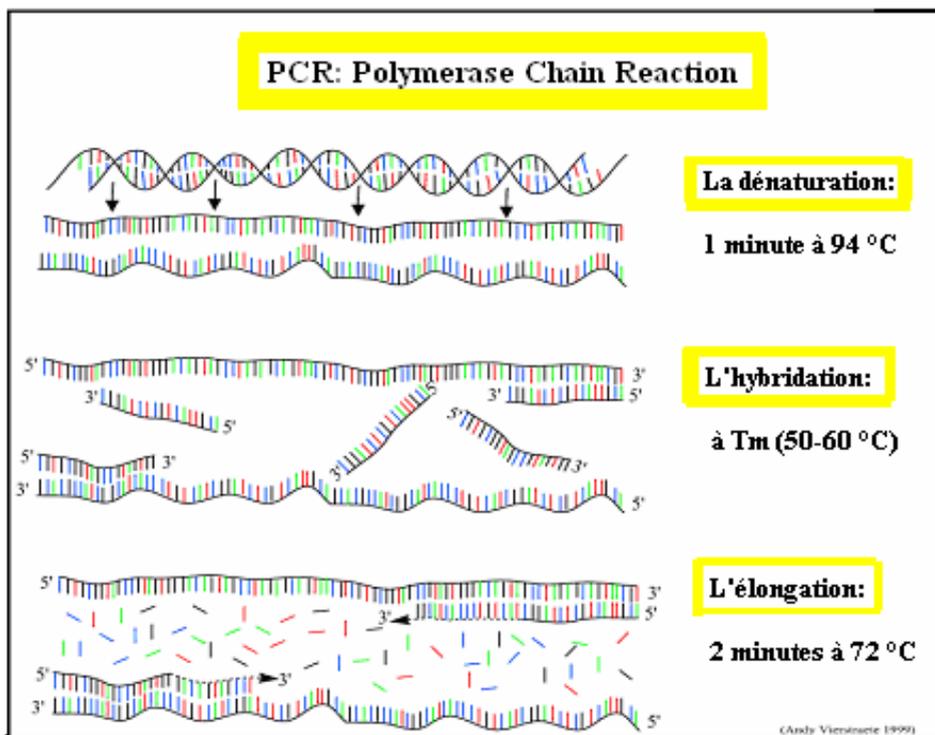


Figure 5 : Les différentes étapes de la PCR (Vierstraete, 1999)

La durée de ces étapes dépend de plusieurs facteurs, comme la performance de l'appareil utilisé et la longueur des fragments à amplifier.

Pour effectuer une PCR, on utilise un thermocycleur qui peut contenir plusieurs blocs. Chaque bloc peut contenir de 48 à 96 microtubes selon les modèles.

Chaque microtube contient outre du tampon :

- l'ADN de l'organisme à partir duquel on veut amplifier une région cible, cet ADN servant de matrice.
- les 2 amorces encadrant la région à amplifier
- des dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) à partir desquels les brins complémentaires seront synthétisés.
- du $MgCl_2$ qui catalyse la réaction.
- de la *Taq* polymérase qui polymérise la réaction.

A chaque PCR, on établit pour un bloc un programme de cycle de température. Ce cycle de 3 températures est répété 20 à 40 fois. A chaque cycle, la quantité d'ADN est multipliée par 2, puisque chacun des 2 brins d'ADN nouvellement synthétisés sert de matrice à la fabrication d'un nouveau brin complémentaire. Une séquence peut être amplifiée par un facteur de 10 millions avec une haute spécificité. La figure 5 met bien en évidence l'amplification exponentielle de l'ADN (Nelson, 1991)

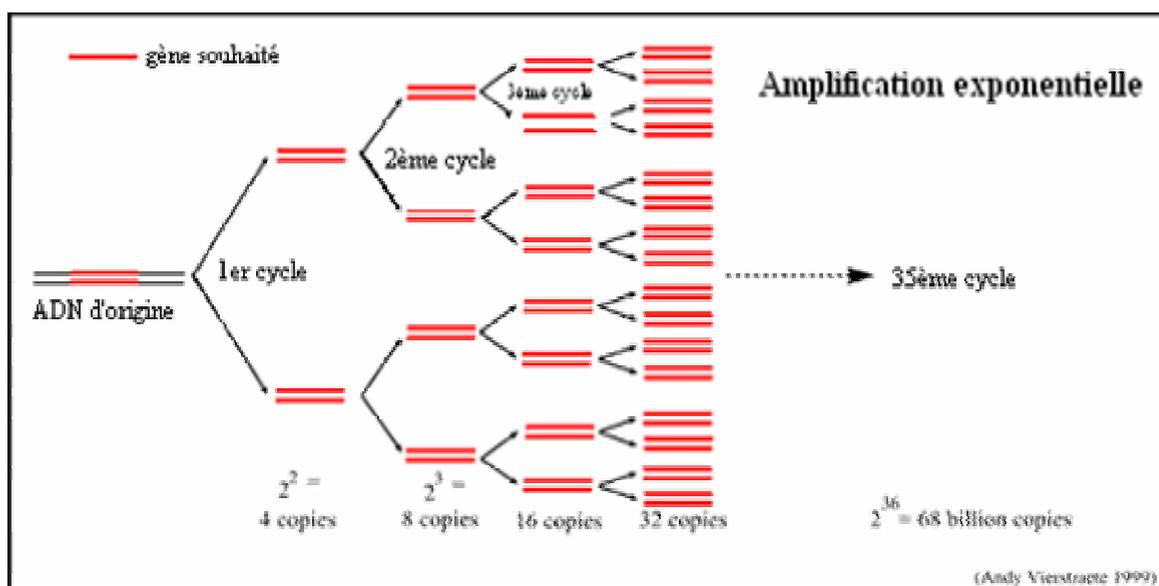


Figure 6 : L'amplification exponentielle d'ADN par PCR (Vierstraete, 1999)

Comme le montre la figure 6, les amplifiats obtenus après PCR sont vérifiés sur gel d'agarose. Leur taille doit correspondre à la taille attendue pour la région ciblée (kb = kilobase).

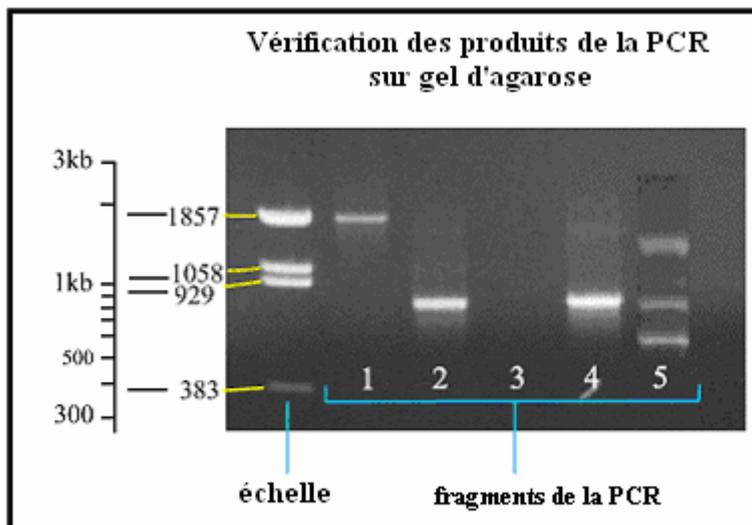


Figure 7 : Vérification du produit de la PCR sur gel (Vierstraete, 1999)

L'échelle est un mélange de fragments de taille connue pour pouvoir comparer avec les fragments de PCR. La distance entre les différents fragments de l'échelle est logarithmique. Ligne 1 : Les fragments de PCR sont longs d'environ 1850 bases. Ligne 2 et 4 : fragments de PCR sont longs d'environ 800 bases. Ligne 3 : aucun produit n'a été formé, donc la PCR n'a pas fonctionné. Ligne 5 : différentes bandes apparaissent car l'amorce n'a pas été spécifique, celle-ci s'est fixée à différents endroits (Budowle *et al.*, 2000).

2.3.2 Les marqueurs microsatellites pour l'étude des liens de parenté

2.3.2.1 Généralités

Les microsatellites sont de courtes régions d'ADN présentant un motif répété qui peut porter sur 2 à 5 nucléotides. Par exemple, le motif répété peut être dinucléotidique, comme $(CA)_n$, trinuécléotidique comme $(CAT)_n$ ou quadrinuécléotidique comme $(CATG)_n$. Le nombre de répétitions est en moyenne de 10 à 30. Ces marqueurs aussi nommés STR pour « Short Tandem Repeats » appartiennent à la catégorie plus large des marqueurs

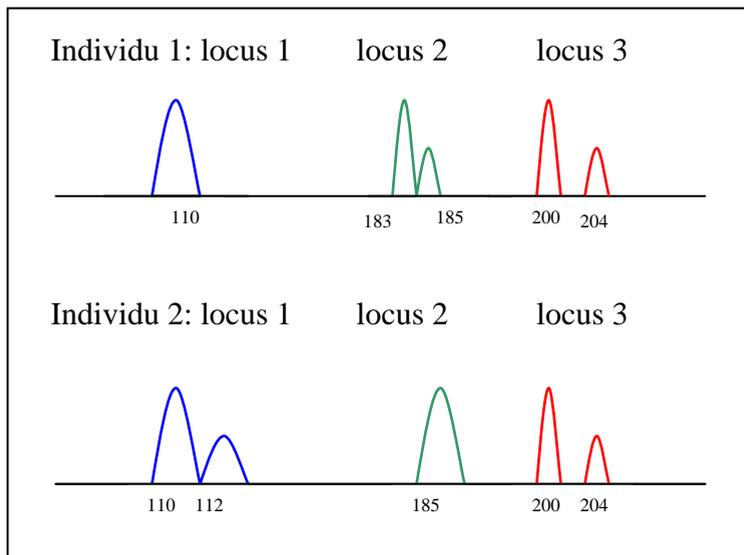
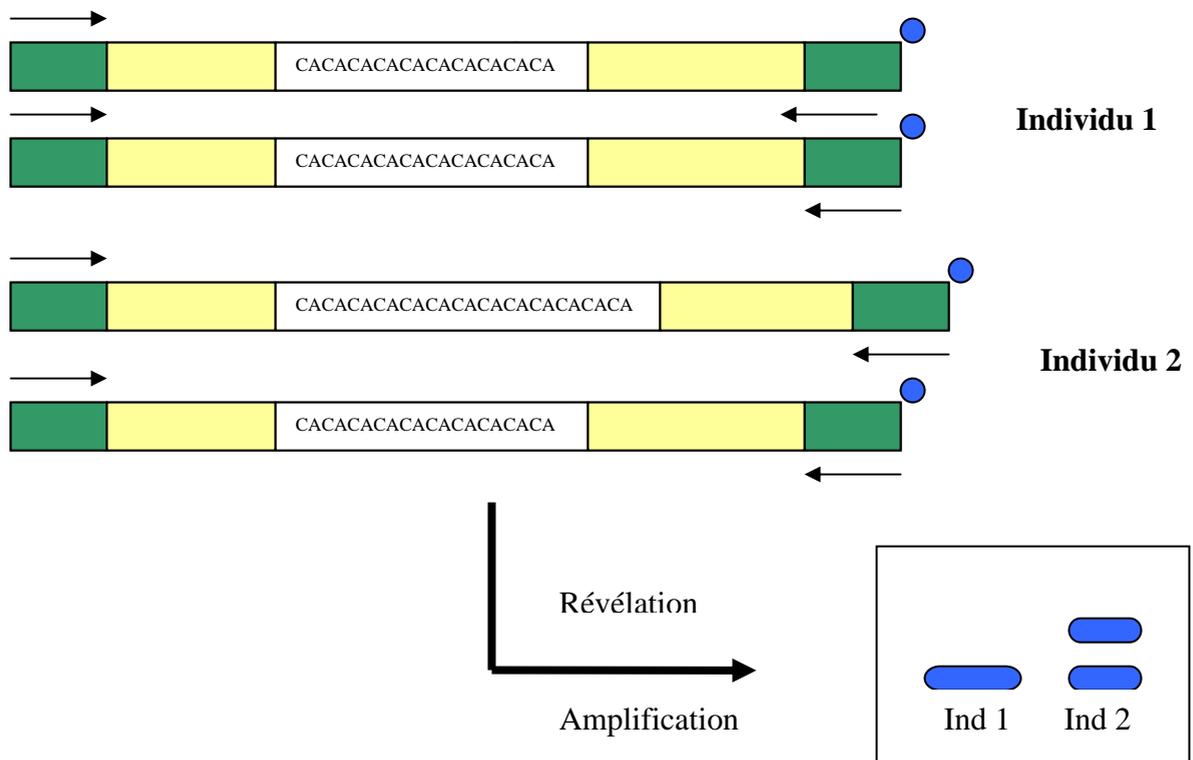
présentant un nombre variable de répétitions de base dites en tandem ou VNTR pour « Variable Number of Tandem Repeats ». Les microsatellites sont présents dans le génome nucléaire de la plupart des Eucaryotes mais également dans le génome de certains chloroplastes et de quelques mitochondries.

Ces microsatellites ont été utilisés comme marqueurs à partir de 1989 du fait qu'ils sont hautement polymorphes. Les taux de mutation mesurés expérimentalement sont de l'ordre de 10^{-2} à 10^{-6} par kb. Ces taux de mutation élevés sont expliqués par le fait que lors de la réplication, la polymérase glisse sur ces motifs répétés et dérape en introduisant des erreurs de réplication (Ellengren, 1999). De plus, ces régions n'étant pas codantes, les mécanismes de réparation sont plus souples et aucune contrainte sélective n'élimine le nouveau variant. Le polymorphisme porte sur la taille du microsatellite. Le modèle théorique le plus simple pour expliquer le polymorphisme des microsatellites est d'envisager une variation de longueur par addition ou délétion d'une ou de plusieurs unités de répétition (« stepwise model »).

La méthodologie consiste à caractériser des locus microsatellites chez l'un des individus d'une population puis d'étudier leur éventuel polymorphisme chez les différents individus constituant les populations à étudier (figure 7). Ce polymorphisme est détecté en soumettant à une électrophorèse en gel de polyacrylamide les produits obtenus après une amplification réalisée à l'aide d'amorces spécifiques de chacun des locus (Goldstein *et al.*, 1995).

L'isolement de locus microsatellites nécessite la constitution d'une banque génomique pour sélectionner les régions d'ADN présentant des répétitions suivies du test des loci repérés. L'amplification par PCR nécessite des oligonucléotides afin d'amorcer la réaction, ces amorces sont souvent spécifiques à chaque espèce ou groupe d'espèces. Pour le Lycaon, les amorces utilisées sont celles étudiées chez le Chien domestique (*Canis familiaris*) (Beaumont, 2000).

Les marqueurs microsatellites présentent des avantages non négligeables pour la détermination des liens de parenté et de la structure de populations : les locus peuvent être analysés séparément, ils présentent un polymorphisme suffisant en fournissant des génotypes facilement interprétés et enfin les hétérozygotes peuvent être détectés (Kim, 2003).



Ind/locus	locus 1	locus 2	locus 3
Ind 1	110/110	183/185	200/204
Ind 2	110/112	185/185	200/204

-  Zones d'hybridation des amorces de PCR
-  Répétition du motif CA
-  ADN double brin
-  Marqueur fluorescent
-  Amorces de PCR

Figure 8 : Principe des marqueurs microsatellites (Valière, 2002)

2.3.2.2 Programme informatique d'analyse des résultats

La visualisation des allèles se fait par le programme informatique *STRand* (figure 8) (Board of Regents, University of California).

La fréquence allélique, l'hétérozygotie et les coefficients de consanguinité sont ensuite déterminés à l'aide de programmes informatiques appropriés.

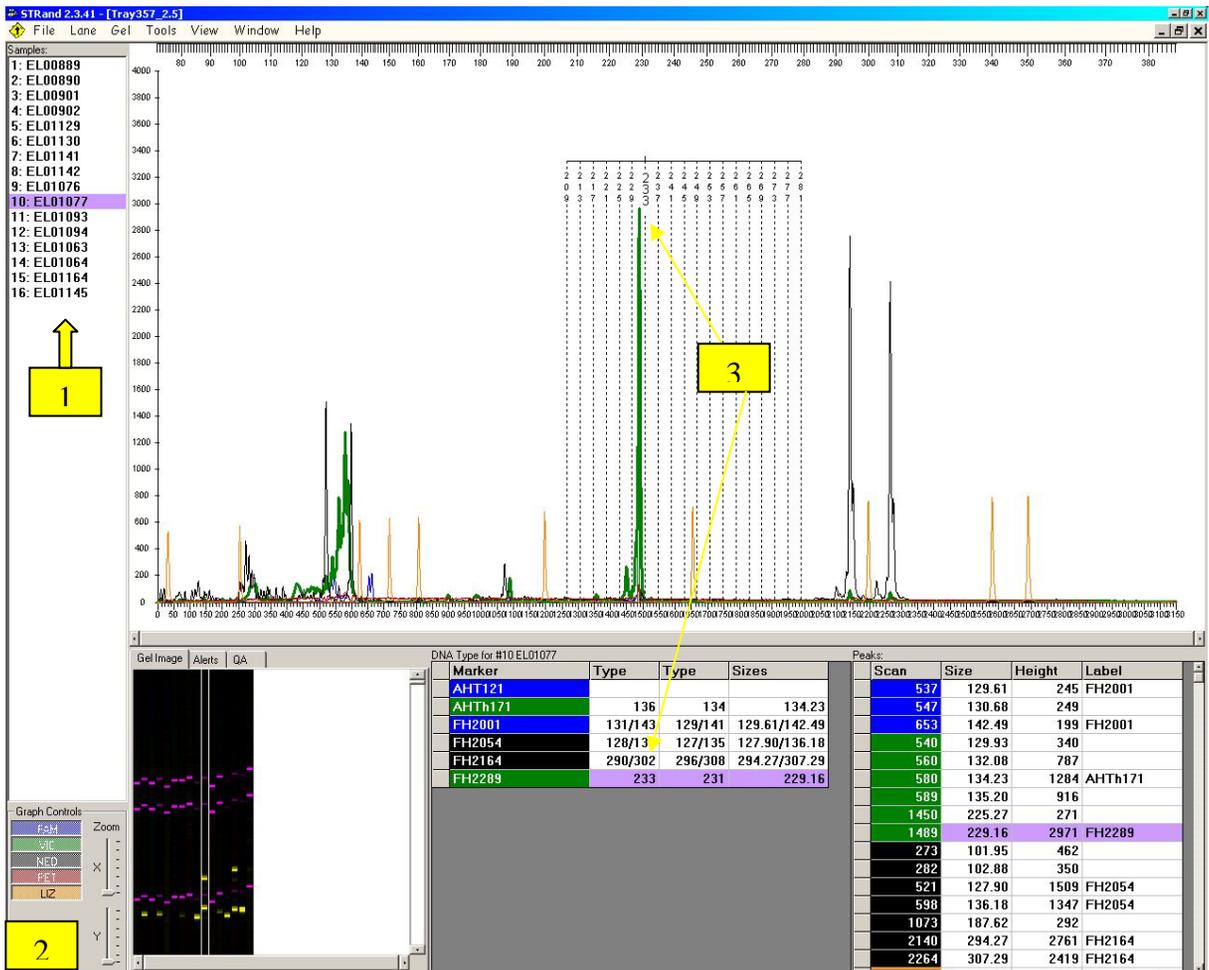


Figure 9 : Vue générale du programme *STRand*

1. Listes des échantillons, il faut sélectionner celui que l'on désire voir s'afficher à l'écran.
2. Permet de sélectionner la couleur de marqueur que l'on veut mettre en évidence.

3. Le programme va automatiquement estimer la taille du pic correspondant à 1 microsatellite. Par exemple ici, le microsatellite FH2289, le pic vert est homozygote avec un pic à 233 paires de base.

- On obtient donc pour chaque microsatellite des pics homozygotes ou hétérozygotes correspondant à un certain nombre de paires de base. Ces longueurs obtenues vont permettre de travailler sur les liens de parenté.
- Pour trouver qui est le père des chiots dans une portée, il suffit de trouver le mâle qui a donné un allèle au chiot, sachant que l'autre allèle vient de la femelle.

Cette première partie bibliographique nous a permis de présenter le Lycaon, espèce en voie de disparition, d'expliquer les causes de ce déclin et de mettre en évidence l'importance d'études génétiques sur les populations isolées d'Afrique du Sud. En exposant aussi les outils de la génétique moléculaire que nous allons utiliser, nous sommes prêts à expliquer les différentes étapes de notre étude expérimentale.

Deuxième partie : étude expérimentale

1 Etude sur les fèces

1.1 Cadre de l'étude

1.1.1 Le lieu de l'étude : « de Wildt Cheetah and Wildlife Centre »

Le « de Wildt Cheetah and Wildlife Centre » fut créé en 1971 avec pour but de faire se reproduire des espèces en voie de disparition. Au cours des 20 dernières années, près de 600 guépards (*Acinonyx jubatus*, photos 11 et 12) sont nés dans ce centre, résultat incroyable sachant que la population totale de guépards en Afrique du Sud n'était pas supérieure à 700.



Photo 11 : Guépard de 3 jours (C. Moueix, 2004)



Photo 12 : Guépard adulte (C. Moueix, 2004)

Les responsables du projet ont décidé alors de commencer à travailler sur d'autres espèces rares ou en voie de disparition comme le Lycaon, la Hyène brune ou le Vautour d'Egypte en ayant pour but de les réintroduire dans le milieu sauvage.

Les lycaons du « de Wildt Cheetah and Wildlife Centre » sont originaires de Namibie (Parc National d'Etosha) et du Parc National Kruger, ils ont donc été les 2 grands « fournisseurs » de lycaons pour les sous-populations établies en Afrique du Sud.

Ce centre possède actuellement environ 120 lycaons, dans différents enclos (photo 13). Les regroupements et la gestion des accouplements sont très surveillés afin d'éviter les problèmes de consanguinité.



Photo 13 : Cinq lycaons dans un enclos (C. Moueix, 2004)

1.1.2 La structure d'accueil et le laboratoire

Le « de Wildt Cheetah and Wildlife Centre » se situe au pied de la montagne Magaliesberg, à 40 km au nord-ouest de Pretoria. Le centre est donc le lieu possédant des lycaons le plus proche de l'Université de Pretoria.

Par ailleurs, le vétérinaire du Centre de reproduction est mon tuteur à l'Université de Pretoria. Après un rendez-vous avec les dirigeants du Centre, nous étions convenus de mettre en place ce projet et d'effectuer mes premiers prélèvements.

Le laboratoire d'analyse de mes échantillons se situe à Onderstepoort (Ecole Vétérinaire de Pretoria), contrôlé par le ERC (Equine Research Center). Une technicienne spécialisée dans les analyses génétiques de nombreuses espèces va m'assister pour mes analyses. Elle a l'habitude d'extraire de l'ADN de différents types d'échantillons et d'utiliser les différents microsatellites chez le Chien domestique.

1.2 Objectifs de l'étude :

➤ Principaux objectifs :

- Etablir les liens de parenté dans un groupe de Lycaon.

Peut-il y avoir plusieurs pères pour une même portée ?

- Extraire l'ADN de Lycaon à partir de fèces.

Différents kits d'extraction sont actuellement commercialisés ; nous allons en tester 2 : le Dynabeads Stool Kit et le QIAamp DNA Stool Kit.

Les 2 grandes questions sont alors :

- allons nous réussir à extraire une quantité suffisante d'ADN à partir des fèces?
- allons nous réussir à extraire l'ADN du Lycaon et non celui des aliments digérés contenus dans les fèces ?

S'il s'avère impossible d'utiliser les fèces comme source de matériel génétique, nous avons la possibilité de prélever des échantillons de peau de façon peu invasive. Selon les résultats obtenus et le coût de l'étude, nous déciderons si cela vaut la peine de continuer à tenter d'utiliser les fèces comme source de matériel génétique.

➤ Objectifs opérationnels :

- Effectuer les prélèvements sur le terrain.
- Si l'extraction est un succès, analyser l'extrait d'ADN en utilisant 2 panneaux de microsatellites de Chien domestique provenant de l'ISAG (International Society of Animal Genetics).
- Appliquer cette méthode sur les groupes de Lycaon dans la Réserve de Madikwe, animaux en liberté.

1.3 Matériels et méthodes

1.3.1 Les animaux prélevés et le mode de prélèvement

1.3.1.1 Les animaux prélevés

La captivité rend plus facile le prélèvement et surtout l'identification de chacun des animaux. Il est important que chaque échantillon corresponde à un animal bien identifié. J'ai donc sélectionné des enclos contenant 2 lycaons, en couple. Par habitude, les lycaons défèquent dans un endroit spécifique de l'enclos, il est donc facile d'identifier chaque échantillon . Cinq enclos, dispersés dans le centre, (soit 10 individus) ont été choisis au hasard.

1.3.1.2 Les prélèvements

Chaque matin, tous les animaux du centre sont nourris soit de morceaux entiers de viande de cheval, soit de volailles entières, ou encore d'aliments industriels adaptés. Lors de ce tour d'environ 3 heures, l'état des animaux et des enclos est contrôlé.

Toutes les cages sont nettoyées les lundis et vendredis matin par des animaliers.

Afin d'avoir des échantillons datant d'un minimum de 24 heures, j'ai effectué mes prélèvements les mardis et samedis matin lors de la tournée de nourrissage. Une fois les morceaux de viande lancés par-dessus les grillages, les lycéons s'isolent le plus possible, il est donc possible de rentrer dans l'enclos sans qu'ils soient trop agressifs. L'animalier m'accompagnant était tout de même toujours muni d'un bâton.

Généralement, toutes les fèces étaient dans un coin de l'enclos dont le sol était gratté, mais les fèces n'étaient pas recouvertes.

Afin de rester le moins longtemps possible dans l'enclos pour ne pas stresser les animaux, toutes les fèces ont été récoltées dans des petits sacs en papier, à l'aide de gants, changés entre chaque prélèvement. L'intégralité de la défécation a été ramassée avec précaution sans qu'il n'y ait aucun contact entre les différentes fèces.

Tous les échantillons ont été placés dans des tubes contenant de l'éthanol absolu (99 %) pendant 24 heures. Au laboratoire, le lendemain, chaque échantillon a été transféré dans un tube contenant des billes de silice.

Le début de l'analyse au laboratoire s'effectuera sur 2 échantillons, les 8 autres seront conservés à 4 °C et utilisés si les premières tentatives donnent des résultats.

1.3.2 L'analyse génétique au laboratoire

1.3.2.1 Le kit Dynabeads DNA DIRECT Universal et le QIAamp DNA Stool Kit: deux kits commerciaux d'extraction d'ADN

1.3.2.1.1 Le kit Dynabeads DNA DIRECT Universal

Ce kit d'extraction est basé sur une technique de séparation biomagnétique de l'ADN. Les « Dynabeads » sont des particules de polymères superparamagnétiques uniformes. Le procédé d'isolation de l'ADN comprend la lyse des cellules puis l'adsorption de l'ADN libéré à la surface des « Dynabeads ». En utilisant les propriétés paramagnétiques des « Dynabeads », le complexe ADN-Dynabeads est attiré sur le côté du tube lorsque celui-ci est placé contre un aimant (le Dynal MPC). Le surnageant est alors soigneusement pipeté pour ne laisser dans le tube que l'ADN complexé. Plusieurs lavages peuvent être effectués en répétant cette manipulation à plusieurs reprises.

Les différentes étapes sont :

1. Placer l'échantillon dans un tube Eppendorf de 1,5 mL puis y ajouter 200 μ L (soit 1 unité) de la solution tampon aimantée « Dynabeads » fournie par le kit.
2. Laisser reposer le tube pendant 5 minutes à température ambiante.
3. Placer le tube contre l'aimant « Dynal MPC » pour permettre au complexe ADN-Dynabeads de migrer vers la paroi du tube.
4. Après 1-2 minutes, prélever le surnageant à l'aide d'une pipette. Le complexe a alors une apparence gélatineuse brune. Faire bien attention à ne pas briser ce complexe.
5. Séparer le tube de l'aimant et y ajouter rapidement 200 μ L de solution tampon, le complexe est alors dilué au fond du tube.
6. Replacer le tube contre l'aimant pendant 30 secondes. Prélever le surnageant.
7. Les étapes 5 et 6 sont répétées 2 fois de suite.
8. Le complexe est remis en suspension en ajoutant 30 μ L d'eau distillée. Pipeter le mélange 30 fois afin d'obtenir une suspension homogène.
9. Incuber la solution à 65°C pendant 5 minutes pour dissocier le complexe ADN-Dynabeads.

1.3.2.1.2 Le QIAamp DNA Stool Kit

Pour ce protocole, on utilise la partie solide des fèces.

Après avoir prélevé 220 mg de fèces et les avoir placé dans un tube de 15 mL, les différentes étapes sont :

1. Centrifuger à 14000 tpm pendant 2 minutes
2. Prélever 1400 μ L de surnageant dans un tube Eppendorf 2 mL
3. Ajouter une pastille InhibitEx. Passer au vortex pour homogénéiser
4. Incuber pendant 1 minute à température ambiante
5. Centrifuger à 14000 tpm pendant 3 minutes
6. Mettre 25 μ L de protéinase K dans un tube Eppendorf 2 mL.
7. Ajouter 600 μ L de l'étape 7
8. Ajouter 600 μ L de tampon AL
9. Passer au vortex 15 secondes
10. Incuber 10 minutes à 56 °C
11. Préparer les colonnes fournies par le kit
12. Ajouter 600 μ L d'éthanol absolu. Passer au vortex

13. Déposer sur la colonne de lysat. Centrifuger 1 minute à 14000 tpm
14. Déposer la colonne sur un nouveau tube de collection
15. Changer de tube de collection
16. Déposer 500 µL de tampon AW1. Centrifuger 1 minute à 14000 tpm
17. Transférer sur un nouveau tube de collection
18. Déposer 500 µL de tampon AW2. centrifuger 3 minutes à 14000 tpm
19. Vider le filtrat et re-centrifuger la colonne 1 minute à 14000 tpm
20. Transférer la colonne sur un tube Eppendorf (1,5 mL)
21. Déposer 200 µL de tampon AE et laisser incuber 1 minute à température ambiante
22. Centrifuger pendant 2 minutes à 8000 tpm
23. Jeter les colonnes
24. Référencer soigneusement les tubes Eppendorf contenant les extraits

1.4 Résultats

Rappelons que des quantités normalement exploitables seraient au moins :

- une quantité d'ADN supérieure ou égale à 100 ng/µl
- un ratio A_{260}/A_{280} compris entre 1,7 et 2

- Extraction d'ADN avec le kit Dynabeads DNA DIRECT Universal:

Après l'extraction à l'aide du kit Dynabeads DNA DIRECT Universal, nous avons mesuré la quantité et la qualité de l'ADN à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats sont indiqués dans le tableau III.

Tableau III : Quantification de l'ADN extrait des fèces selon les différents modes de conservation à l'aide du kit Dynabeads DNA DIRECT Universal

Echantillons	Quantité d'ADN (ng/µL)	A_{260}/A_{280}
Ethanol + Silice 1 (=ES1)	17,12	1,96
Ethanol + Silice 2 (=ES2)	18,28	1,87

Les quantités d'ADN obtenues après extraction avec ce kit sont extrêmement faibles.

- Extraction d'ADN avec le QIAamp DNA Stool Kit :

Après l'extraction à l'aide du QIAamp DNA Stool Kit, nous avons mesuré la quantité et la qualité de l'ADN à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats sont indiqués dans le tableau IV.

Tableau IV : Quantification de l'ADN extrait des fèces selon les différents modes de conservation et d'extraction à l'aide du QIAamp DNA Stool Kit.

Echantillons	Quantité d'ADN (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
Ethanol + Silice 1 (=ES1)	16,9	2,94
Ethanol + Silice 2 (=ES2)	39,96	1,9

La quantité d'ADN obtenue est légèrement supérieure avec ce kit d'extraction mais reste toujours faible.

1.5 Discussion

1.5.1 Le prélèvement

Lors de l'étude préliminaire au « de Wildt Cheetah and Wildlife Centre », tous les lycas étaient dans des enclos, donc le prélèvement n'a posé aucun problème. Les animaux étaient identifiés et le lien entre les fèces et l'animal était facile à faire étant donné que les enclos choisis pour l'étude ne contenaient que des couples.

En revanche, pour appliquer cette méthode de prélèvement de matériel génétique sur le terrain, c'est-à-dire sur des animaux en liberté, vivant en groupe d'une quinzaine de lycas, cela aurait été un autre problème. Pour que cette étude soit un succès, il faut que chaque fèces soit identifiées, cela signifie, qu'il faut voir l'animal déféquer et effectuer le prélèvement immédiatement.

Lors de mon séjour à Madikwe, environ 3 mois, je n'ai pu réellement observer que 6 lycas déféquer devant moi et pour lesquels j'aurais pu effectuer le prélèvement. Sur un total de 46 lycas, ce chiffre est très faible.

D'un point de vue pratique, l'utilisation de fèces comme matériel génétique pour l'étude des liens de parenté dans un groupe de lycas en liberté s'avère difficile, voire impossible.

1.5.2 L'extraction d'ADN

L'utilisation du kit Dynabeads DNA DIRECT Universal n'a donné aucun résultat concluant, les quantités d'ADN extraites étant extrêmement faibles.

En revanche, le QIAamp DNA Stool kit a montré des résultats plus probants mais les quantités d'ADN étaient toujours insuffisantes pour poursuivre l'étude.

Afin d'exclure un problème de manipulation pouvant expliquer les faibles quantités obtenues après extraction, nous avons utilisé ce kit sur des fèces de Chien domestique et sur des crottins de chevaux, en respectant exactement les mêmes étapes. Les résultats furent assez surprenants mais aussi rassurants dans un sens. Les fèces de Chien domestique ont donné les mêmes résultats que pour les lycaons, c'est-à-dire, des quantités faibles d'ADN. En revanche, l'extraction à partir des crottins a donné des quantités d'ADN comparables à celles obtenues lors d'utilisation d'échantillons de sang ou de peau, environ 215 ng/ μ L.

Cette étude parallèle permet de confirmer qu'il n'y a pas eu de problème de manipulation lors de l'utilisation du QIAamp Stool Kit, et qu'il donne de bons résultats sur certaines espèces.

Les faibles quantités d'ADN obtenues lors de l'extraction d'ADN à partir des fèces de Lycaon ne sont pas dues à un problème de prélèvement ou de mode de conservation.

Les faibles quantités d'ADN obtenues lors de l'extraction d'ADN à partir des fèces de Lycaon ne sont sans doute pas dues à un problème de prélèvement ou de mode de conservation,

Les problèmes de l'utilisation des fèces comme source de matériel génétique chez les carnivores sont (Piggott & Taylor, 2003) :

- **les enzymes présentes dans le tractus intestinal détruisent ou fragmentent l'ADN de l'animal qui se dépose sur les fèces.**
- **l'ADN des aliments ingérés et celui du Lycaon sont extraits en même temps, et non différenciables avec le spectrophotomètre ; seule la PCR et les microsatellites pourront permettre l'identification de l'ADN extrait.**

1.6 Conclusion

Cette première étude sur les fèces a été abandonnée rapidement lorsque nous nous sommes rendu compte de la difficulté de cette étape. En effet, le travail de laboratoire deviendrait trop long et trop coûteux sachant que notre objectif principal est tout de même d'établir les liens de parenté dans un groupe de Lycaon, et éventuellement de prouver la théorie des pères multiples.

C'est pour cela que la suite de notre étude personnelle portera sur les échantillons de peau, leur obtention de façon semi invasive, la méthode d'extraction d'ADN, l'amplification par PCR en utilisant des microsatellites du Chien domestique et l'étude des parentés.

2 Etude sur la peau

2.1 Cadre de l'étude

2.1.1 Le lieu de l'étude : La Réserve Naturelle de Madikwe

Au Nord Est de l'Afrique du Sud, contre la frontière du Botswana, la réserve de Madikwe est la 4^{ème} réserve la plus vaste du pays. Fondée en 1991, Madikwe a commencé la plus grande mission de réintroduction d'animaux sauvages au monde, l'opération Phoenix, qui débuta 2 ans plus tard. Cette opération a introduit plus de 8000 antilopes de 28 espèces différentes, les prédateurs n'ayant été introduits qu'en 1996 (tout d'abord : guépards, lycaons et hyènes puis des lions venant du Parc National d'Etosha en Namibie). La réserve a une superficie de 62000 hectares (voir en annexe 1 le plan de la réserve). La végétation est majoritairement composée de grandes plaines et de zones broussailleuses (bush) avec quelques collines rocheuses. Actuellement, 12000 animaux sauvages vivent à Madikwe, tous les prédateurs sont représentés ainsi que des rhinocéros noirs et blancs, des éléphants, des buffles, des girafes, des zèbres et une très grande variété d'antilopes. Sa situation permet à Madikwe d'être une réserve indemne de malaria, ce qui est un atout énorme sur le plan touristique.

Cette réserve est particulièrement intéressante pour notre étude pour les raisons suivantes :

- Des lycaons introduits :

La création quasi artificielle de cette réserve il y a maintenant 14 ans donne l'avantage de connaître très précisément ces animaux, leur origine, leur âge, leur lien de parenté...

Certains ont été munis de colliers émetteurs permettant de les localiser et de les étudier (Photo 14)

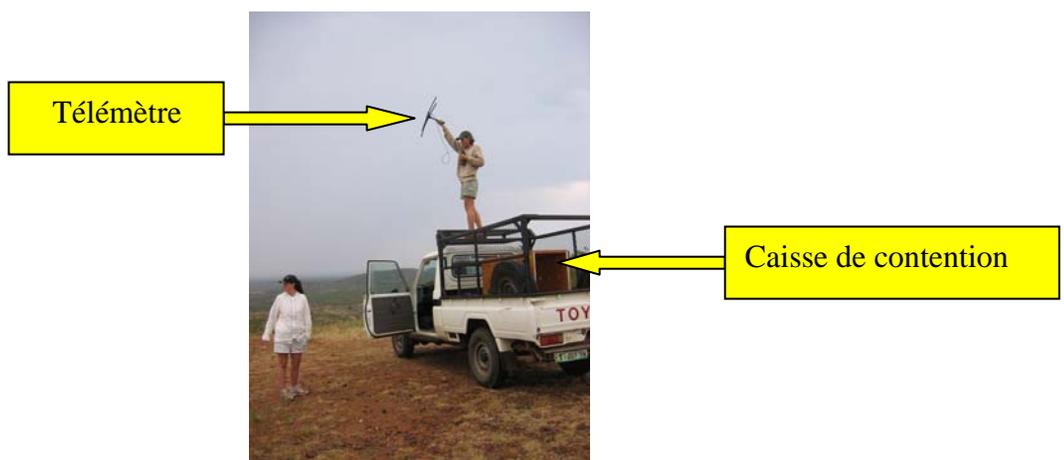


Photo 14 : Recherche du groupe de Lycaon à l'aide du télémètre (C. Moueix, 2004)

➤ Une barrière hermétique :

La condition fondamentale pour gérer une population de Lycaon est d'avoir une clôture « étanche ». Les lycaons se déplacent en groupe et chassent en meute. Cela n'a jamais été scientifiquement étudié mais par observation, il a été constaté que les lycaons peuvent utiliser les barrières pour chasser, en bloquant dans leurs courses les antilopes. Leur déplacement à proximité des clôtures et leur aptitude à creuser des trous nécessite une attention très particulière sur l'étanchéité des barrières. Les 150 kilomètres de périmètre de Madikwe sont fermés par une clôture électrifiée.

➤ Un terrain adapté à l'observation :

Toute la réserve de Madikwe est desservie par de nombreux chemins de terre permettant une bonne observation des animaux. La végétation peu dense permet aussi aux véhicules de sortir des chemins pour se rapprocher des animaux. Chaque année, en hiver (juillet et août) des parcelles sont sélectionnées pour être brûlées. Cette technique permet de préparer la terre pour la saison des pluies (l'été) en brûlant les herbes hautes et les buissons épineux. Le feu est mis volontairement sur 2 cotés adjacents du carré choisi et il se propage en fonction du vent. Sa vitesse de déplacement étant très rapide, les arbres ne brûlent pas. L'observation d'animaux dans ces parcelles est donc plus facile.

2.1.2 La structure d'accueil et le laboratoire

Après un rendez vous avec la Direction de Madikwe au cours duquel j'ai présenté mon projet, l'écologiste de la réserve, Steve Dell, a accepté de m'accueillir et de m'aider à réaliser tous mes prélèvements. En contre-partie, j'ai réactualisé l'inventaire de tous leurs lycaons, en créant un dossier sur chaque animal, avec photographie. De plus, mon analyse va leur permettre de connaître le coefficient de consanguinité des différents groupes de Lycaon.

Le laboratoire d'analyse de mes échantillons se situe à Onderstepoort (Ecole Vétérinaire de Pretoria), contrôlé par le ERC (Equine Research Centre). Une technicienne spécialisée dans les analyses génétiques de nombreuses espèces va m'assister pour mes analyses. Elle a l'habitude d'extraire de l'ADN de différents types d'échantillons et d'utiliser les différents microsattellites chez le Chien domestique.

2.2 Objectifs de l'étude

➤ Objectif principal :

Proposer une méthode fiable mettant en évidence les liens de parenté dans un groupe de lycaons par la biologie moléculaire à base d'échantillons de peau.

➤ Objectifs opérationnels :

- Trouver un moyen de prélever une source fiable d'ADN de manière non invasive (pas d'anesthésie). Utilisation de flèches à biopsie.
- Trouver un mode de conservation de la peau entre le lieu de prélèvement et le laboratoire.
- Extraire l'ADN à partir de ces échantillons de peau.
- Analyser l'extrait d'ADN en utilisant 2 panneaux de microsatellites de Chien domestique provenant de l'ISAG (International Society of Animal Genetics).

2.3 Matériels et méthodes

2.3.1 Les animaux prélevés et le mode de prélèvement

2.3.1.1 Les animaux prélevés

2.3.1.1.1 Les différents groupes de Lycaon

Chaque groupe de lycaons est bien connu des gens qui travaillent dans la réserve. Un nom a été donné à chacun d'eux pour permettre aux véhicules de touristes de se communiquer les informations par radio et à l'écologiste du parc de savoir quels animaux ont été observés. Madikwe possède 2 groupes de Lycaon dont le nombre d'individus peut varier sensiblement.

➤ Le groupe Tswasa :

Nommé ainsi car il est souvent observé à l'Est de la réserve, à coté du lieu dit Tswasa (habitation de certains travailleurs du parc), ce groupe était composé, en Août 2004 de :

- **9** adultes : 3 femelles (MadF16, MadF15, MadF51) et de 6 mâles dont 3 avec collier émetteur (DWM01, DWM07, MadM20, MadM52, MadM53, MadM54)
- **10** chiots nés en juin 2004, observés mobiles à partir de septembre 2004.

➤ Le groupe de Madikwe :

Premier groupe formé à Madikwe lors de leur introduction, il compte en Août 2004 :

- 22 adultes
 - 6 âgés de plus de 5 ans (DWF03, BotM2, MadM6, MadM11, MadM8, MadM9)
 - 9 lycavons nés en 2002 (MadM22, MadM23, MadM24, MadM25, MadM26, MadM27, MadM29, MadM31, MadF40)
 - 7 lycavons nés en 2003 (MadF34, MadF35, MadM36, MadF37, MadF38, MadF39, MadF41)

- 15 chiots nés en juin 2004, observés mobiles à partir de septembre 2004.

2.3.1.1.2 La période d'observation et l'identification photographique

Etant donné que pour mon étude, chaque échantillon doit être identifié, mon travail a donc débuté par un apprentissage de reconnaissance des animaux de chaque groupe, par identification photographique et de longues observations comportementales.

En annexe 2 sont présentées les planches photographiques des profils gauches de chacun des lycavons.

La femelle dominante a été facilement identifiable car ses mamelles étaient très volumineuses. En revanche, le mâle dominant a été moins facile à identifier, bien que, souvent, ce soit le plus âgé et le plus grand.

De nombreux mouvements d'animaux se sont effectués depuis mon arrivée :

En septembre 2004 :

- MadM23 et Mad M25 ont été capturés puis transférés dans la réserve de Tswalu (Kalahari).
- Cinq des 6 mâles restant (MadM22, MadM24, MadM26, MadM27, MadM29) ont décidé de quitter le groupe d'origine et de former leur propre groupe.
- Ce nouveau groupe appelé « break away pack » a réussi à attirer avec eux une femelle du groupe de Tswasa (MadF15).
- Ces 6 lycavons ont été capturés et placés dans un enclos le temps de leur trouver une nouvelle destination. Les 5 mâles ont rapidement été déplacés contrairement à la femelle. Pour tenir compagnie à celle-ci dans l'enclos, on a

capturé une jeune femelle du groupe de Madikwe (MadF38). Elles ont ensuite été transférées 2 semaines plus tard.

En février 2005 :

- Sur les 10 chiots du groupe de Tswasa, seuls 5 ont atteint l'âge de 9 mois.
- Sur les 15 chiots du groupe de Madikwe, seuls 13 ont atteint l'âge de 9 mois.
- Les 6 femelles restantes nées en 2003 se sont séparées du groupe d'origine, 1 d'entre elles a disparu, les 5 autres (MadF34, MadF35, MadM36, MadF37, MadF39) ont attiré 1 des mâles du groupe de Tswasa (DWM07) pour former le groupe de Massimo. Ce groupe va probablement être capturé puis placé dans un enclos le temps de leur trouver une nouvelle réserve.
- La femelle dominante du groupe de Madikwe a disparu, il ne reste donc que 7 mâles et 13 chiots dans le groupe de Madikwe.

La population totale dans la réserve de Madikwe est donc maintenant de 38 lycaons.

2.3.1.2 Les prélèvements

Selon la théorie, la période de « nichée » est la plus adaptée pour l'observation des lycaons car c'est la seule période pendant laquelle les lycaons dorment au même endroit pendant 2 mois. Les adultes ne s'éloignent des chiots que pour chasser, et souvent, l'un d'entre eux reste garder le trou.

En pratique, lorsque je suis arrivée à Madikwe mi-août, je n'ai pas vu un seul lycaon pendant les 12 premiers jours. Grâce aux colliers émetteurs et au télémètre, nous savions où ils étaient mais il était impossible de s'en approcher. Leurs trous (pour les 2 groupes) se trouvaient au sommet de collines inaccessibles pour l'Homme. S'ils sortaient chasser de jour, c'était très tôt le matin et rarement pour plus d'une heure. Mais cette période coïncidait aussi avec la période de pleine lune donc ils sortaient beaucoup la nuit. Ce n'est que mi-septembre que j'ai réussi à collecter mes premiers échantillons.

Toutes les photos ont été prises assez rapidement, surtout grâce à l'aide des guides du parc, qui lors de leur « game drive » (tour de la réserve pour tenter de montrer les animaux aux touristes) ont pu prendre des photos pour moi.

Ensuite, le seul moyen de pouvoir commencer les prélèvements était de trouver le groupe de lycaons sur une proie.

Nous avons donc repéré par où les lycaons descendaient de la colline, et nous les attendions là, pour ensuite les suivre pendant leur chasse ; ces quelques tentatives ont été toutes des échecs car nous les perdions rapidement de vue ou alors ils ne tuaient pas avant la nuit.

Tuer un appât fut notre solution de secours.

Deux possibilités se sont offertes à nous : soit un impala, mais cette antilope ne pèsent que 50 kg donc le groupe de Lycaon a tendance à la traîner vers des endroits couverts, rendant les prélèvements impossibles, soit 1 gnou, pesant environ 200 kg, utilisable plusieurs fois si on veut rationner les lycaons.

Les préparatifs sont :

- Tuer un jeune gnou mâle.
- Trouver les lycaons à l'aide du télémètre, les attirer vers la voiture en faisant du bruit (ils ont été habitués par l'écologiste du parc à répondre au claquement de la porte arrière de la voiture, efficace même si cela ne marche vraiment pas à tous les coups !)
- Faire courir les lycaons derrière la voiture si cela est nécessaire, afin de les emmener dans un endroit ouvert, c'est-à-dire où la voiture peut circuler autour de l'appât posé à terre.
- Déposer le gnou (l'appât) à terre.
- Grâce aux photos imprimées, je pouvais reconnaître les lycaons autour de moi.
- Numéroter chaque flèche à biopsie.

Une fois l'animal identifié avec certitude, je pouvais me préparer à tirer :

- Tenter de ne pas être à plus de 10 mètres de la cible.
- Régler manuellement la pression nécessaire (dépendante de la distance me séparant du lycaon, variant entre 2,5 et 3,5 bars).
- Epauler et viser la cuisse ou l'épaule à l'aide de la lunette munie d'un point rouge.
- Ne tirer que lorsque la cible est immobile. Les lycaons sont souvent les uns sur les autres lorsqu'ils sont sur une proie, il est très facile de toucher un autre que celui désiré.
- Le numéro inscrit sur la flèche est alors écrit à côté de la photo de l'animal visé pour éviter les confusions.

Si tout se déroule bien, la flèche rebondit sur l'animal et tombe au sol avec un bout de peau à l'intérieur.

2.3.2 Les différentes méthodes de conservation de la peau

Le petit morceau de peau d'environ 3 millimètres de diamètre, est accroché à l'aiguille par deux crochets et se trouve protégé par le cylindre coupant entourant l'aiguille.

Pour des raisons pratiques, je n'ai pas transporté mes tubes sur le terrain, la peau est donc restée sur la flèche jusqu'à mon retour à la maison du parc, ce temps n'excédait jamais 3 heures. Sur une table de travail propre, tout le matériel (gants, tubes en verre, lame de scalpel, éthanol absolu et feutre indélébile) était disposé. Chaque échantillon de peau a été transféré dans un tube préalablement libellé. Les gants permettent d'éviter toute contamination de l'échantillon par dépôt de l'ADN du manipulateur sur la peau. La peau sèche très vite autour de l'aiguille et l'emploi d'une lame de scalpel est très souvent utile.

L'immersion dans un liquide est la meilleure méthode de conservation de la peau. Deux liquides peuvent être utilisés : le DMSO (Diméthyl Sulfoxyde) ou l'éthanol absolu (99 %).

Le tableau V permet de comparer et de justifier l'emploi de l'éthanol lors de mon travail sur le terrain :

Tableau V : DMSO ou éthanol, argumentation.

Arguments	DMSO	Ethanol 99 %
Disponibilité	Nécessité d'un laboratoire et de nombreux composants très onéreux pour sa fabrication	Disponible sur le marché, aucun préparatif nécessaire
Stockage	Dans une fiole en verre, odeur très désagréable	Dans une bouteille plastique
Transport	Risqué	Sans risque
Tube pour échantillonnage	Verre uniquement	Plastique ou verre
Temps de conservation au laboratoire	Illimité	Limité à 6 semaines

Sachant que le délai entre le prélèvement des échantillons et l'extraction d'ADN au laboratoire n'excéderait jamais 6 semaines, j'ai donc décidé d'utiliser l'éthanol à 99 %.

2.3.3 L'analyse génétique au laboratoire

2.3.3.1 L'extraction d'ADN

Le protocole (Bruford *et al.*, 1992) a déjà été utilisé dans le laboratoire, c'est pourquoi, certaines étapes sont optimisées.

Il faut tout d'abord préparer toutes les solutions nécessaires :

- **La solution entraînant la lyse des cellules :**

Preliminaires :

- 1 M Tris – HCl:

Prélever 12,1 g de Tris, mélanger avec environ 80 mL d'eau distillée. Ajouter du HCl concentré pour atteindre un pH de 8. Rajouter de l'eau filtrée et purifiée pour atteindre 100 mL de solution. Autoclave puis conserver à 4°C.

- 10 mM EDTA

Prélever 1,86 g d'EDTA et ajouter de l'eau filtrée et purifiée pour atteindre 500 mL de solution. Passer à l'autoclave puis conserver à 4°C.

- 20 % Sodium Dodocyl Sulphate

Prélever 20 g de Sodium Dodocyl Sulphate (SDS) et ajouter de l'eau filtrée et purifiée pour atteindre 100 mL de solution. Conserver à 4°C.

Solution de lyse des cellules :

(10 mM Tris – HCL pH 8,0 + 50 mM NaCl + 10 mM EDTA)

Mélanger 1 mL de 1M Tris-HCL – pH 8,0 avec 0,29 g de NaCl et avec 1 mL de 10 mM EDTA

Ajouter de l'eau pour atteindre une solution de 75 mL.

Ajuster le pH à 8,0 avec 1M HCL.

Rajouter de l'eau filtrée et purifiée pour atteindre 100 mL de solution.

Passer à l'autoclave puis conserver à 4°C.

- **La solution tampon TE (10 mM Tris-HCL – 0,5 mM EDTA)**

Préliminaires :

- 1M Tris – HCL, pH 8,0 :

Dissoudre 12,1 g de Tris dans 80 mL d'eau filtrée et purifiée.

Ajuster le pH à 8,0 avec de l'HCl concentré.

Ajuster le volume final à 100 mL avec de l'eau filtrée et purifiée.

Passer à l'autoclave et conserver à 4°C.

- 0.5M EDTA:

Ajouter doucement 18,6 g de sel d'éthylènediaminetétraacétique disodium déshydraté (EDTA) à 80 mL d'eau filtrée et purifiée.

Mélanger vigoureusement à l'aide d'un mélangeur magnétique.

Ajuster le pH à 8,0 en ajoutant 10 N de NaOH.

Ajuster le volume final à 100 mL avec de l'eau filtrée et purifiée.

Passer à l'autoclave et conserver à 4°C.

La solution tampon TE :

(10 mM Tris-HCL – 0,5mM EDTA)

Pour préparer une solution de 500 mL, ajouter 5 mL de 1.0M Tris-HCL, pH 8,0 et 100 µL de la solution à 0,5 M EDTA à 494,9 mL d'eau filtrée et purifiée.

Passer à l'autoclave et conserver à 4°C.

L'extraction proprement dite peut maintenant commencer :

1. Couper l'échantillon de peau en minuscules morceaux à l'aide d'une lame de scalpel (celle-ci est nettoyée entre chaque échantillon).
2. Placer ces morceaux dans un tube Eppendorf de 1,5 mL.
3. Y ajouter : 190 µL de la solution de lyse des cellules + 10 µL de 20 % SDS + 1µL de Protéinase K. Passer rapidement au vortex.
4. Incuber à 56°C une nuit, ou jusqu'à ce que les morceaux de peau soient complètement dissous.
5. Incuber à 94°C pendant 10 minutes.

6. Ajouter 200 μL de PCIA (Phenol-Chloroform-Isoamylalcohol).
7. Passer au vortex jusqu'à obtention d'une émulsion laiteuse.
8. Centrifuger à 10 000 rpm pendant 2 minutes.
9. Pipeter la phase aqueuse superficielle dans un nouveau tube Eppendorf, en faisant bien attention de ne pas toucher l'interface protéique.
10. Ajouter 500 μL d'éthanol absolu froid.
11. Agiter le tube doucement.
12. Placer au congélateur à -20°C pendant 2 heures.
13. Centrifuger à 10 000 rpm pendant 15 minutes.
14. Décantier l'éthanol.
15. Nettoyer le dépôt d'ADN en ajoutant 500 μL d'éthanol à 70 % et en renversant le tube plusieurs fois.
16. Centrifuger à 10 000 rpm pendant 5 minutes.
17. Décantier l'éthanol.
18. Laisser sécher quelques minutes à température ambiante.
19. Ajouter 100 μL de solution tampon TE à pH 8,0.
20. Réhydrater pendant 2 heures à 56°C puis à température ambiante pendant une nuit.

Après avoir suivi consciencieusement toutes les étapes de ce protocole d'extraction, nous pouvons quantifier et qualifier notre extrait à l'aide du spectrophotomètre.

2.3.3.2 La PCR et les microsatellites

L'utilisation des microsatellites de Chien domestique chez le Lycaon a été testée pour les amplifications par Kim (2003).

2.3.3.2.1 La PCR: condition et réglages

Les marqueurs microsatellites de Lycaon ont été commandés chez « Applied Biosystems SA (Pty) commercial oligonucleotide synthesiser ». La partie avant des marqueurs a été marquée avec des marqueurs fluorescents (FAM[®], NED[®], VIC[®] et PET[®]).

La combinaison des amorces a été choisie sur la capacité de chaque marqueur à co-amplifier lors d'une PCR avec une température d'hybridation similaire. La superposition des longueurs des allèles a aussi été vérifiée. En utilisant 2 panneaux de marqueurs ISAG de Chien domestique, chaque panneau a été amplifié dans un unique multiplex de 8 loci (Tableau VI). Une quantité de 1 µL de produit de PCR a été placé dans la 3130 XL Genetic Analyser (Applied Biosystems) avec Genescan Liz500TM taille standard (Applied Biosystems).

Table VI: Les microsatellites qui ont amplifié et les différentes fluorescences par multiplex

Locus	Fluorescence	Locus	Fluorescence
Panneau 1		Panneau 2	
INRA21	PET-red	REN105L03	FAM-blue
AHTh171	PET-red	INU030	FAM-blue
AHTk253	FAM-blue	INU055	FAM-blue
CXX279	NED-black	LEI004	NED-black
FH2054	NED-black	AHTh260	PET-red
AHTk211	VIC-green	REN247M23	VIC-green
FH2328	VIC-green	FH2848	VIC-green
REN54P11	FAM-blue	AHT137	VIC-green

2.3.3.2.2 Profil des températures utilisées pendant la PCR

Toutes les cycles de PCR sont précédés par une étape d'activation de 10 minutes à 95 °C par la *AmpliTaq Gold*[®] DNA polymerase (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Les réactions de PCR ont été réglées pour 30 cycles à 95 °C pendant 60 secondes pour la dénaturation, suivi de l'hybridation à 60 °C pour aussi 30 secondes et enfin une étape finale d'élongation à 72 °C pendant 1 minute.

Les cycles se terminent par une incubation à 72 °C pendant 60 minutes et un refroidissement automatique de la machine jusqu'à 4 °C. Les produits de l'amplification restent dans la machine jusqu'à ce qu'ils soient prêts pour leur chargement.

Le chargement des échantillons dans le séquenceur génétique a été réalisé en mélangeant 1 µL du produit de la PCR avec une solution faite de 25 µL de Genescan Liz500[™] et de 1 mL de Hi Di formamide déionisé.

2.3.3.2.3 Le génotypage et la visualisation des allèles

L'électrophorèse a été faite dans un analyseur ABI 3130 *XL Genetic* (Applied Biosystem, Foster City, CA).

La visualisation des allèles et l'analyse des données enregistrées dans l'analyseur vont se faire par le programme informatique *STRand* (Version 2.3.48) (Board of Regents, University of California, Davis). Les longueurs alléliques sont arrondies. Un fichier EXCEL est ensuite créé pour regrouper toutes les données sur chaque microsatellite et chaque individu étudié.

2.4 Résultats

2.4.1 Prélèvement

L'échec du prélèvement peut avoir différentes causes:

- Je manque mon objectif, cela n'est pas arrivé très souvent heureusement !!
- L'impact est un peu trop haut, proche de la colonne vertébrale,
- La flèche rebondit, tombe au sol mais elle est vide,
- La flèche reste dans l'animal et celui-ci part avec sa flèche pendant de sa cuisse. Pour moi, ce n'est pas très grave, c'est une flèche perdue mais elle tombera plus tard, lorsqu'il marchera ou il réussira à se l'enlever. En revanche, pour les touristes qui prennent des photos, cela ne fait pas très « faune sauvage » si le lycaon a une flèche jaune fluorescente dans la cuisse.

Au total, le taux de réussite de prélèvement à la première flèche a été d'environ 80 %, mais j'ai réussi à obtenir un échantillon de chaque lycaon présent à Madikwe.

2.4.2 Extraction d'ADN

Après l'extraction, nous avons mesuré la quantité et la qualité de l'ADN à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats sont récapitulés dans le tableau VII.

Tableau VII : Quantification de tous les échantillons prélevés à Madikwe

Groupe de Madikwe	[ADN] (ng/ μ L)	A260/A280	Groupe de Tswasa	[ADN] (ng/ μ L)	A260/A280
DW F03	387,44	1,92	MadF16	369	1,95
Bot M2	110,2	1,68	DWM01	422,77	1,84
MadM36	371,99	1,9	DWM07	276,33	1,89
MadM8	281,25	1,91	MadM53	439,96	2,08
MadM6	222,76	1,9	MadM54	290,83	1,84
MadM9	561,79	1,68	MadM20	230,41	1,9
MadM11	278,82	1,88	MadM52	389,94	1,7
MadM22	908,9	1,96	MadF51	494,11	1,96
MadM24	719,4	1,93	MadM60	397	1,97
MadM26	643,8	1,95	MadM62	354,5	1,95
MadM27	711,4	1,94	MadF63	339,7	1,91
MadM29	532,7	1,96	MadF64	323	1,93
MadF30 = F15	574,5	1,89	MadF66	519,6	1,94
MadF39	407,22	1,86	MadM67	474,6	1,91
MadF40	245,78	1,89			
MadF34	260,76	1,91			
MadF38	367,02	1,89			
MadF41	249,95	1,9			
MadF35	413,85	1,92			
MadF37	197,17	1,91			
MadM80	444,4	1,95			
MadM81	525,8	1,96			
MadF82	570,1	1,92			
MadM83	407	1,93			
MadM84	529,2	1,96			
MadM85	337,5	1,95			
MadF86	431,9	1,97			
MadF87	319,3	1,98			
MadF88	416	1,96			
MadF89	559,4	1,92			
MadM90	500,7	1,96			
MadM91	475,7	1,96			

Les valeurs sont très élevées comparées à celles obtenues pour les fèces. Lorsque la quantité d'ADN dépasse 600 ng/ μ L, des dilutions sont effectuées afin que tous les échantillons aient environ la même concentration (300 ng/ μ L).

2.4.4 Les liens de parenté et la théorie des pères multiples

Pour trouver qui est le père des chiots dans une portée, il suffit de trouver le mâle qui a donné un allèle au chiot, sachant que l'autre allèle vient de la femelle (Tableau VIII).

Tableau VIII : Vérification manuelle des liens de parenté dans un groupe de Lycaon

Relation	Nom	AHTh171	AHTh260	AHTk253	FH2054	FH2848	INRA21	INU030	INU055	LEI004	REN54P11
Femelle	MadF16	225/225	253/257	296/304	136/140	239/243	101/103	144/152	216/218	97/99	248/248
Mâle	DWM07	219/225	251/251	304/304	128/132	237/239	103/103	150/152	214/216	101/103	242/246
Chiot 1	MadM60	225/225	251/253	304/304	128/136	237/243	103/103	152/152	216/218	97/103	246/248

Relation	Nom	AHTh171	AHTh260	AHTk253	FH2054	FH2848	INRA21	INU030	INU055	LEI004	REN54P11
Femelle	MadF16	225/225	253/257	296/304	136/140	239/243	101/103	144/152	216/218	97/99	248/248
Mâle	MadM20	219/225	253/255	302/304	128/128	239/241	101/103	146/152	214/216	97/101	242/248
Chiot 1	MadM60	225/225	251/253	304/304	128/136	237/243	103/103	152/152	216/218	97/103	246/248

Relation	Nom	AHTh171	AHTh260	AHTk253	FH2054	FH2848	INRA21	INU030	INU055	LEI004	REN54P11
Femelle	MadF16	225/225	253/257	296/304	136/140	239/243	101/103	144/152	216/218	97/99	248/248
Mâle	DWM07	225/226	251/251	304/304	128/132	237/239	103/103	150/152	214/216	101/103	242/246
Chiot 2	MadM62	225/227	255/257	296/304	128/140	239/241	101/103	144/146	216/218	97/99	248/248

Relation	Nom	AHTh171	AHTh260	AHTk253	FH2054	FH2848	INRA21	INU030	INU055	LEI004	REN54P11
Femelle	MadF16	225/225	253/257	296/304	136/140	239/243	101/103	144/152	216/218	97/99	248/248
Mâle	MadM20	219/225	253/255	302/304	128/128	239/241	101/103	146/152	214/216	97/101	242/248
Chiot 2	MadM62	219/225	255/257	296/304	128/140	239/241	101/103	144/146	216/218	97/99	248/248

Cet exemple montre que pour 2 chiots de la même portée (MadM60 et MadM62) nous obtenons 2 pères différents. Les cases en jaunes représentent les exclusions de parentés, c'est-à-dire les microsatellites pour lesquels le mâle ne possède pas au moins un allèle commun avec le chiot.

Au-delà de 2 exclusions, le mâle est totalement exclu de la liste des pères potentiels. Avec 1 exclusion, l'analyse est révérifiée et l'interrogation demeure.

La figure 11 illustre, par un arbre généalogique, les liens de parenté dans un groupe et montre que pour les chiots d'une même portée, on peut avoir plusieurs pères.

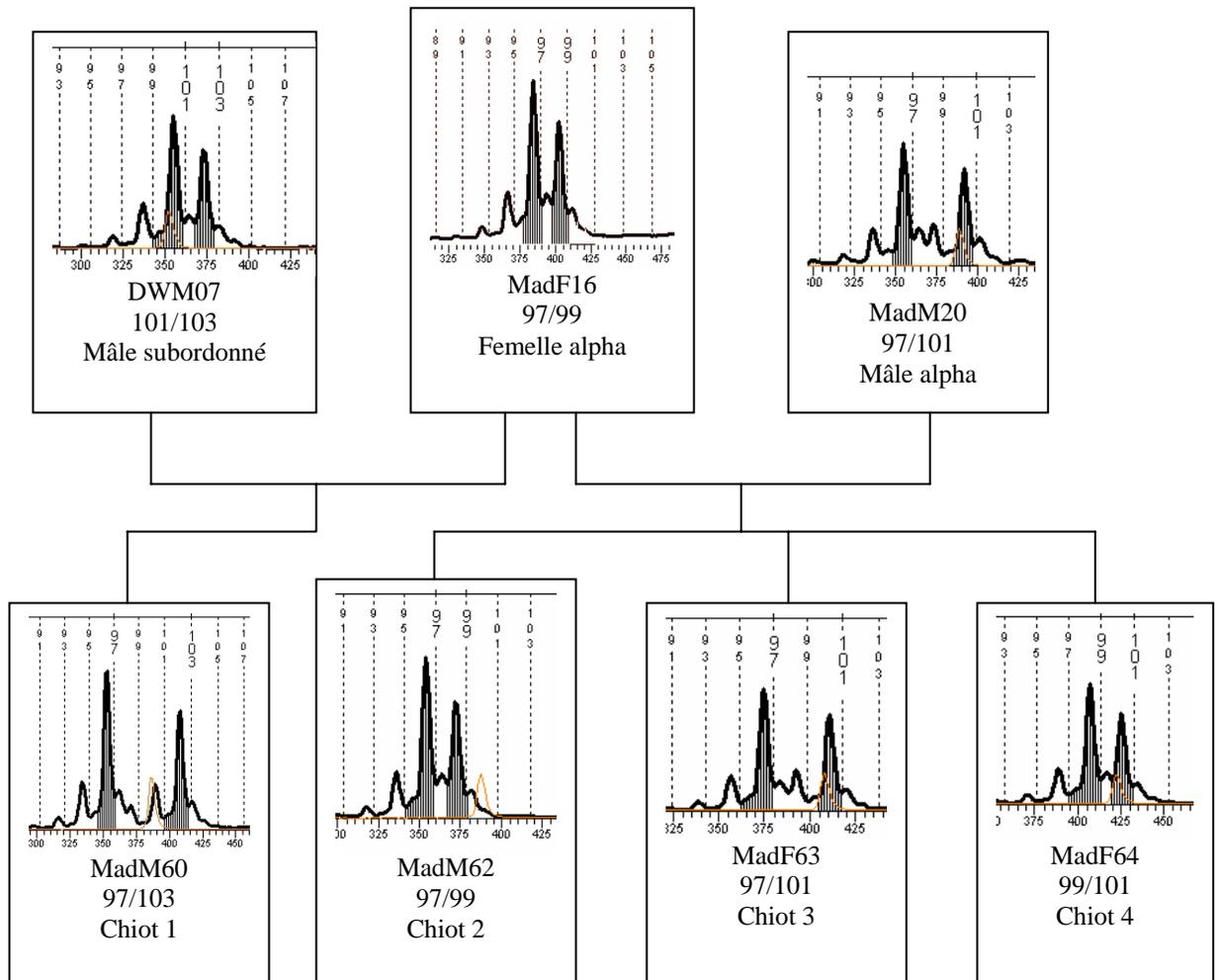


Figure 11: Exemple d'une exclusion microsatellite dans l'analyse de la paternité dans le groupe de Tswasa avec le programme *STRand*

Le tableau IX représente un résumé de tous les liens de parenté établis pour les lycas prélevés à Madikwe. Ce tableau n'est pas définitif car d'autres analyses sont en cours.

Tableau IX : Liens de parenté de tous les lycavons présents à Madikwe.

Nom	Age	Groupe	Père ?	Mère ?	Maintenant
MadF16	2000	Tswasa	BotM2	MadF1 ?	Femelle dominante du groupe de Tswasa
MadF15	2000	Tswasa	BotM2	MadF1 ?	A joint le break away pack en nov 2004
MadF51	?	Tswasa	?	MadF16	Groupe de Tswasa
DWM01	1998	Tswasa	DWM138 ?	DWF76 ?	Groupe de Tswasa
DWM07	1999	Tswasa	KNPM01 ?	DWF78 ?	Groupe de Massimo depuis fev 2005
MadM20	?	Tswasa	?	?	Mâle dominant du groupe de Tswasa
MadM52	?	Tswasa	?	MadF16	Groupe de Tswasa
MadM53	?	Tswasa	?	MadF16	Groupe de Tswasa
MadM54	?	Tswasa	?	MadF16	Groupe de Tswasa
MadM60	2004	Tswasa	DWM07	MadF16	Groupe de Tswasa
MadM62	2004	Tswasa	MadM20	MadF16	Groupe de Tswasa
MadF63	2004	Tswasa	MadM20	MadF16	Groupe de Tswasa
MadF64	2004	Tswasa	MadM20	MadF16	Groupe de Tswasa
MadF66	2004	Tswasa	MadM20	MadF16	Groupe de Tswasa
MadM67	2004	Tswasa	MadM20	MadF16	Groupe de Tswasa: mort

DWF03	1999	Madikwe	KNPM01 ?	DWF78 ?	Femelle dominante du groupe de Madikwe
BotM2	1997	Madikwe	?	?	Groupe de Madikwe
MadM6	2000	Madikwe	BotM2	MadF1	Groupe de Madikwe
MadM8	2000	Madikwe	BotM2	MadF1	Groupe de Madikwe
MadM9	2000	Madikwe	BotM2	MadF1	Mâle dominant du groupe de Madikwe
MadM11	2000	Madikwe	?	MadF1	Groupe de Madikwe
MadM22	2002	Madikwe	BotM2	DWF03	Break away pack, déplacé en nov 2004
MadM24	2002	Madikwe	?	DWF03	Break away pack, déplacé en nov 2004
MadM26	2002	Madikwe	BotM2	DWF03	Break away pack, déplacé en nov 2004
MadM27	2002	Madikwe	?	DWF03	Break away pack, déplacé en nov 2004
MadM29	2002	Madikwe	?	DWF03	Break away pack, déplacé en nov 2004
MadM31	2003	Madikwe	?	DWF03	Groupe de Madikwe : pas d'échantillons
MadF34	2003	Madikwe	MadM9	DWF03	Groupe de Massimo depuis fev 2005
MadF35	2003	Madikwe	MadM6	DWF03	Groupe de Massimo depuis fev 2005
MadF37	2003	Madikwe	?	DWF03	Groupe de Massimo depuis fev 2005
MadF38	2003	Madikwe	MadM8	DWF03	Déplacé à Marakele en nov 2004
MadF39	2003	Madikwe	MadM9	DWF03	Groupe de Massimo depuis fev 2005
MadF40	2003	Madikwe	MadM9	DWF03	Disparue en fev 2005
MadF41	2003	Madikwe	MadM8	DWF03	Groupe de Massimo depuis fev 2005
MadM80	2004	Madikwe	BotM2	DWF03	Groupe de Madikwe
MadM81	2004	Madikwe	MadM9	DWF03	Groupe de Madikwe
MadF82	2004	Madikwe	MadM9	DWF03	Groupe de Madikwe
MadM83	2004	Madikwe	MadM9	DWF03	Groupe de Madikwe
MadM84	2004	Madikwe	MadM9	DWF03	Groupe de Madikwe
MadM85	2004	Madikwe	MadM9	DWF03	Groupe de Madikwe
MadF86	2004	Madikwe	MadM9	DWF03	Groupe de Madikwe
MadF87	2004	Madikwe	MadM9	DWF03	Groupe de Madikwe
MadF88	2004	Madikwe	MadM9	DWF03	Groupe de Madikwe
MadF89	2004	Madikwe	MadM9	DWF03	Groupe de Madikwe
MadM90	2004	Madikwe	MadM9	DWF03	Groupe de Madikwe
MadM91	2004	Madikwe	MadM9	DWF03	Groupe de Madikwe

Nous pouvons observer par exemple que, dans la portée 2004, 2 mâles sont des pères potentiels pour les chiots. En 2003, 3 mâles sont mis en évidence.

Ce début d'étude montre donc l'existence de pères multiples pour une même portée de lycavons.

2.5 Discussion

2.5.1 Le prélèvement

Avec environ 80 % de réussite dans le prélèvement d'échantillons de peau chez les lycaons adultes avec les flèches à biopsie, on peut considérer que cette technique a été un succès. En effet, son caractère non invasif permet de garder espoir quant à son développement en tant que source de matériel génétique chez les carnivores sauvages.

Le prélèvement de peau de manière non invasive par les flèches à biopsie s'avère être très efficace chez les lycaons adultes mais ne peut être utilisable chez des jeunes.

2.5.2 La méthode de conservation

L'utilisation d'éthanol avec des tubes en plastique est une méthode de conservation peu coûteuse, très simple, ne nécessitant aucune précaution particulière lors du transport jusqu'au laboratoire.

On trouve dans la littérature qu'après environ 6 semaines dans l'éthanol, l'ADN contenu dans l'échantillon de peau peut être détruit. Je n'ai pas fait l'expérience, tous mes échantillons ayant été extraits dans les 2 semaines après le prélèvement.

2.5.3 L'analyse au laboratoire

La méthode d'extraction d'ADN à partir d'échantillons de peau est bien connue, simple et peu coûteuse. Donc il n'y a aucun problème de ce point de vue là.

En revanche, l'utilisation de microsatellites de Chien domestique pour étudier les liens de parenté chez le Lycaon a été testée par des étudiants à l'université de Pretoria lors d'une étude précédente. Cette technique n'est pas très connue mais les microsatellites utilisés sont disponibles internationalement donc si mon étude donne des résultats concluants, la technique d'analyse pourra être standardisée.

Lors des premiers résultats au laboratoire, j'ai pu mettre en évidence 3 différents pères pour la portée 2003 et 2 pour la portée 2004. D'autres analyses plus approfondies sont en cours afin de confirmer ou d'infirmer ces résultats, qui remet en cause la théorie du mâle dominant.

3 Discussion générale et perspective

3.1 *Importance de l'échantillonnage non invasif pour la conservation d'espèces sauvages*

Les méthodes d'étude de la faune sauvage dans leur milieu sont multiples et variées, mais leur utilité devient limitée lorsqu'il s'agit d'espèces rares ou en voie de disparition. Déterminer de façon précise l'abondance de telles espèces peut être très difficile bien que ces informations soient vitales pour développer des stratégies de conservation. De plus, pour des études plus approfondies concernant la biologie de ces espèces, l'emploi des méthodes d'analyse génétique s'avère impossible surtout si l'échantillonnage est partiel et peu régulier. Pour des espèces rares ou sensibles, les méthodes invasives comme la capture (prélèvement de sang) ou l'utilisation de radio émetteur peuvent être non réalisables voire inappropriées. Ceci est particulièrement vrai si l'espèce concernée est difficile à capturer ou si le risque de blessure ou de mort est trop élevé pour des animaux déjà sous la pression d'autres prédateurs, des maladies, de la diminution de leur espace vital ...

Dans certain cas, les méthodes invasives pour se procurer du matériel génétique peuvent aussi altérer la dynamique de la population car elles peuvent entraîner des changements de comportement surtout chez des animaux vivant en groupe.

Toutes ces contre-indications de l'utilisation de méthodes invasives sont applicables au lycaon.

Il est important de faire la distinction entre différents types de situations pour lesquelles la collecte d'échantillons non invasifs pour des études génétiques est préférable.

Premièrement, lorsque la capture ou l'observation des animaux est impossible, les échantillons comme les fèces permettent de connaître leur nombre, le régime alimentaire ...

La seconde grande utilisation de matériel d'origine non invasive, comme alternative à l'emploi de sang ou de peau prélevés lors de captures, vient de l'étude de l'ADN pour les liens de parenté entre animaux, la génétique des populations et les études phylogéniques.

Bien qu'il y ait un immense intérêt dans l'emploi d'échantillonnage non invasif, très peu d'études sur des populations sauvages ont abouti à des résultats concluants, même si ce nombre est en augmentation permanente (Duchamp & Quenette, 2005).

Les principales limitations de l'échantillonnage non invasif sont en relation avec la faible quantité et qualité de l'ADN extraite de ces échantillons, surtout des fèces (Piggott & Taylor, 2003).

Cette étude sur les lycaons a bien mis en évidence le problème de l'utilisation de fèces comme source de matériel génétique. Si mon projet avait pour unique objectif d'extraire de l'ADN à partir des fèces, cela aurait peut être été possible, en approfondissant les techniques de laboratoire et surtout en augmentant considérablement les coûts cette étude. Ces techniques d'extraction sont en cours de développement et d'optimisation, ce qui va faire énormément progresser l'utilisation de la génétique moléculaire pour les espèces sauvages.

En revanche, je pense que l'invention des flèches à biopsie, et donc la possibilité de prélever de la peau de façon semi invasive est une étape intermédiaire à ne pas négliger. Cette technique est très utilisée chez les mammifères marins mais elle est étrangement ignorée pour les mammifères terrestres.

Je ne sais vraiment pas pourquoi l'utilisation des flèches à biopsie n'est pas plus standardisée car l'ADN extrait est de très bonne qualité, en quantité largement suffisante et toutes les méthodes d'analyse sont parfaitement connues et efficaces.

Le terme de semi invasif est peu clair, mais en ayant utilisé cette méthode à de nombreuses reprises, j'ai pu voir que les animaux n'étaient pas effrayés par les flèches et surtout que cela n'était pas douloureux. En ayant pu observer les animaux plusieurs jours après le fléchage, je n'ai jamais observé de saignement ou d'infection au lieu de l'impact de la flèche.

Lorsque la méthode de prélèvement n'est qu'une étape dans une étude plus importante, qu'il s'agit d'un carnivore en voie de disparition et que le budget de l'analyse de laboratoire ne permet pas de faire beaucoup d'essais sur les méthodes d'extraction, je pense que l'emploi des flèches à biopsie est un très bon compromis pour obtenir tous les renseignements nécessaires sur l'espèce étudiée.

3.2 Importance des outils de la génétique moléculaire et de la diversité génétique pour la conservation d'espèces sauvages

Au cours du 20^{ième} siècle, le déclin de nombreux mammifères sauvages dans le monde entier (Loup d'Europe, Ours brun, Bison, Koala, Lycaon ...) a mené à des plans de réintroduction à grande échelle. Lors de ces translocations massives, les problèmes génétiques ont été négligés. Récemment, un nombre important d'études a montré l'importance de la diversité génétique pour la persistance des populations sauvages, spécialement pour les espèces dont les populations ont été fragmentées. Des populations de petite taille mènent à la consanguinité et à la perte de diversité génétique. Le nombre, la taille et la diversité génétique sont donc 3

facteurs fondamentaux à prendre en compte lors de translocations massives d'animaux en voie de disparition (Piggott & Taylor, 2003).

L'exemple du lycaon illustre bien ce problème. Les plans de réintroduction dans différentes réserves d'Afrique du Sud ont souvent oublié de prendre en compte l'aspect génétique. Généralement, seuls quelques animaux d'origine souvent inconnue sont introduits dans un espace clos (même si celui-ci est de très grande taille). Le comportement hiérarchique de cette espèce conduit à des reproductions entre le même mâle et la même femelle pendant leurs années de dominance, ce qui peut conduire rapidement à un étranglement génétique, par déficit en hétérozygotes.

Cette prise de conscience récente a permis de développer considérablement l'importance de la génétique moléculaire pour la conservation des espèces sauvages (Caizergues, 2005). Les microsatellites sont devenus les marqueurs de choix pour diverses raisons : ils sont applicables universellement, à tout individu d'une population, ils ne sont pas perdus au cours de la vie et restent inchangés durant cette période. Pour l'étude des liens de parenté ou de la diversité génétique d'une population, les microsatellites présentent des avantages non négligeables : les locus peuvent être étudiés séparément, ils présentent un polymorphisme suffisant en fournissant des génotypes facilement interprétés et enfin les hétérozygotes peuvent être détectés. De plus, les connaissances du génome des espèces domestiques et la création de ces cartes de microsatellites permettent à cet outil de la génétique moléculaire d'être utilisé chez les espèces sauvages de même famille (le Chien domestique comme référence pour le Loup d'Europe ou le Lycaon).

La recherche que j'ai effectuée va donc permettre :

- De déterminer le père des chiots dans une même portée. En trouvant plusieurs pères, on pourrait penser que ce brassage génétique lors de la reproduction serait un moyen naturel que les lycaons utilisent pour éviter la consanguinité.
- Si cette théorie des pères multiples s'avère exacte dans une réserve comme Madikwe, il faudra tout de même s'interroger sur l'influence des clôtures dans le déroulement de la reproduction et réaliser une étude similaire dans un parc considéré comme représentant du milieu sauvage (ex : Parc National du Kruger).

Conclusion

L'utilisation d'échantillons prélevés de manière non invasive comme source de matériel génétique est une technique récente et très prometteuse, surtout pour l'étude des espèces en voie de disparition. La génétique moléculaire permet de renseigner sur une espèce (habitat, habitudes alimentaires, diversité génétique ...) mais aussi à l'échelle de l'individu (parenté ...). Pour des animaux dont la capture est impossible ou très risquée, l'échantillonnage non invasif est la seule méthode permettant d'obtenir des informations. Mais ces techniques sont encore peu fiables et restent trop coûteuses pour remplacer totalement les techniques invasives quand elles sont possibles. Il est donc fondamental de considérer la nécessité de l'échantillonnage non invasif avant de commencer. Cette étude comparative entre l'utilisation de fèces et celle de peau m'a permis de comprendre que les résultats de l'analyse génétique étaient plus importants que le mode d'échantillonnage lui-même. Mon budget ne me permettait pas de pousser ces recherches plus avant sachant que le prélèvement de peau était efficace, peu coûteux et très peu invasif grâce aux flèches à biopsie. L'objectif principal, établir les liens de parenté dans un groupe, a donc été atteint avec succès.

L'utilisation de marqueurs microsatellites en association avec des récentes méthodes statistiques représente un outil de génétique moléculaire très utile pour la conservation et la gestion des espèces sauvages. Grâce à la banque de données établies chez le Chien domestique, ces marqueurs permettent l'étude des liens de parenté dans les groupes de Lycaon et l'estimation de la diversité génétique de ces populations.

Il est donc important de combiner les facteurs écologiques, la biologie de ces espèces et les facteurs génétiques pour la gestion d'espèces menacées dans des espaces protégés.

Dans ces réserves, les lycaons ont des taux élevés de réussite à la chasse et de renouvellement des générations, à un point tel que peu de réserves peuvent assumer financièrement la présence de ce prédateur sur leur sol.

Ce dernier élément souligne la complexité de la protection d'une espèce très menacée.

Références bibliographiques

- Appel, M.J. (1987c). Canine distemper virus. *In: Virus infections of carnivores* (Ed. M.J. Appel). Amsterdam: Elsevier, pp. 8-15.
- Baer, G.M. & Wandeler, A.I. (1987). Rabies virus. *In: Virus infections of carnivores* (Ed. M.J. Appel). Amsterdam: Elsevier, pp. 21-39.
- Beaumont, M.A. & Bruford, A.M. (2000). Microsatellites in conservation genetics. *In* Goldstein D B, Schlotterer C (eds.) *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University Press, Suffolk: 165-182.
- Beckwitt, R., Shea, J., Osborne, D., Krueger, S. & Barklow, W. (2002), A PCR-based method for sex identification in *Hippopotamus amphibius*. *African Zoology*, **37**(2): 127-130.
- Budowle, B., Smith, J., Moretti, T. & DiZinno, J. (2000) DNA Typing Protocols: Molecular Biology and Forensic Analysis. Eaton Publishing, Natick, MA. pp 5-9.
- Burrows, R., Hofer, H. & East, M.L. (1995). Demography, extinction and intervention in African wild dogs (*Lycaon pictus*). *Proceedings of the Royal Society of London*, B 262: 235-245.
- Caizergues, A. (2005). Les apports de l’outil moléculaire dans les problématiques de gestion de la faune sauvage. *Faune sauvage*, **265** : 6-21.
- Creel, S.R. & Creel, N.M. (1995). Communal hunting and pack size in African wild dogs, *Lycaon pictus*. *Animal Behaviour*, **50**: 1325-1339.
- Creel, S.R., Creel, N.M., Matovelo, J.A., Mtambo, M.M.A., Batamuzi, E.K. & Cooper, J.E. (1995). The effects of anthrax on endangered African wild dogs (*Lycaon pictus*). *Journal of Zoology*, **236**:199-209.
- Creel, S.R. & Creel, N.M. (1996). Limitation of African wild dogs by competition with larger carnivores. *Conservation Biology*, **10**: 1-15.
- Creel, S.R. & Creel, N.M. (2002). *The African Wild Dog: Behavior, Ecology and Conservation*. Princeton University Press.

- Duchamp, C. & Quenette, P.Y. (2005). La génétique non-invasive au service de l'étude des espèces protégées : le cas du Loup de l'Ours brun. *Faune sauvage*, **265** : 47-54.
- Ellengren, H. (1999). Inbreeding and relatedness in Scandinavian grey wolves *Canis lupus*. *Hereditas*, **130** : 239-244.
- Ernest, H., Penedo, M., May, B., Syvanen, M. & Boyce, W.M. (2000). Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite valley in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. *Molecular Ecology*, **9**: 433-441.
- Fanshawe, J.H. & FitzGibbon, C.D. (1993). Factors influencing the hunting success of African wild dog pack. *Animal Behaviour*, **45**: 479-490.
- Fanshawe, J.H., Ginsberg, J.R., Sillero-Zubiri, C. & Woodroffe, R. (1997). The status and distribution of remaining wild dog populations. In: *The African Wild Dog: Status Survey and Conservation Action plan*. Woodroffe, R., Ginsberg, J.R. & Macdonald, D.W., eds., pp.11-57. Gland, Switzerland: World Conservation Union.
- Fernando, P., Vidya, T.N.C., Rajapakse, C., Dangolla, A. & Melnick, D.J. (2003). Reliable Noninvasive Genotyping: Fantasy or reality? *Journal of Heredity*, **94**(2): 115-123.
- Fitzjohn, T. (1995). African hunting dog (*Lycaon pictus*) capture and translocation. Unpublished report: Ministry of Tourism, Natural Resources & Environment, Tanzania.
- Flagstad, O., Roed, K., Stacy, J.E. & Jakobsen, K.S. (1999). Reliable non-invasive genotyping based on excremental PCR of nuclear DNA purified with a magnetic bead protocol. *Molecular Ecology*, **8**: 879-883.
- Frantzen, M., Silk, J., Ferguson, J., Wayne, R. & Khon, M. (1998). Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology*, **7**: 1423-1428.
- Fuller, T.K. & Kat, P.W. (1990). Movements, activity and prey relationships of African wild dogs (*Lycaon pictus*) near Aitong, south-western Kenya. *African Journal of Ecology*, **28**: 330-350.
- Fuller, T.K., Kat, P.W., Bulger, J.B., Maddock, A.H., Ginsberg, J.R., Burrows, R., McNutts, J.W. & Mills, M.G.L. (1992a). Population dynamics of African wild dogs. *Wildlife 2001*:

- Populations*. D.R. McCullough & R.H. Barret, eds., pp. 1125-1139. London: Elsevier Applied Science.
- Garnier, J.N., Bruford, M.W. & Goossens, B. (2001). Mating system and reproductive skew in the black rhinoceros. *Molecular Ecology*, **10**: 2031-2041.
- Gemmel, N. & Akiyama, S. (1997). Projectile biopsy sampling of fur seals. *Marine Mammal Science*, **13**(3): 512-516.
- Ginsberg, J.R., Mace, G.M. & Albon, S.D. (1995b). Local extinction in a small and declining population: wild dogs in the Serengeti. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **262**: 221-228.
- Girman, D., Mills, M.G.L, Geffen, E. & Wayne, R.K. (1997). A molecular genetic analysis of social structure, dispersal and pack interactions in the African wild dog (*Lycaon pictus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **40**: 187-198.
- Girman, D., Wayne, R.K., Kat, P.W., Mills, M.G.L, Ginsberg, J.R., Borner, M., Wilson, V., Fanshawe, J.H., FitzGibbon, C.D. & Lau, L.M. (1993). Molecular genetic and morphological analyses of the African wild dog (*Lycaon pictus*). *Journal of Heredity*, **84**: 450-459.
- Gittleman, J.L. & Harvey, P.H. (1982). Carnivore home range size, metabolic needs and ecology. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **10**: 57-63.
- Goldstein, D.B., Linares, A.R., Cavalli-Sforza, L.L. & Feldman, M.W. (1995). An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, **139** : 463-471.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. & Gelbart, W.M. (2001). Introduction to Genetic Analysis. 7th edn, W.H. Freeman & Co, New York, pp. 5-27.
- Harry, M. (2001). Génétique moléculaire et évolutive. Collection « Science fondamentale ». *Maloine*, pp.173-199.
- Hoss, M., Khon, M., Paabo, S., Knauer, F. & Schroder, W. (1992). Excrement analysis by PCR. *Nature*, **359**, no. 6392:199.

- Kat, P.W., Alexander, K.A., Smith, J.S. & Munson, L. (1995). Rabies and African wild dogs in Kenya. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **262**: 229-233.
- Kim, J., Guthrie, A.J., Harper, C. (2003). Domestic dog microsatellite markers used for parentage verification in the African wild dog (*Lycaon pictus*). *Proceedings of Faculty Day, Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria, Onderstepoort*, 25 September: 41.
- Kuhme, W.D. (1965). Communal food distribution and division of labour in African hunting dogs. *Nature*, **205**: 442-444.
- Lindsey, P.A. (2003). Conserving wild dogs (*Lycaon pictus*) outside state protected areas in South Africa: ecological, sociological and economic determinants of success. *PhD thesis*, University of Pretoria, Pretoria.
- Losos, G.J. (1986). Infectious tropical diseases of domestic animals. *International Development Research Centre*, Canada.
- Malcom, J.R. & Marten, K. (1982). Natural selection and the communal rearing of pups in African wild dogs (*Lycaon pictus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **10**: 1-13.
- Malcom, J.R. & van Lawick, H. (1975). Notes on wild dogs (*Lycaon pictus*) hunting zebras. *Mammalia*, **39**: 231-240.
- Mech, L.D. & Goyal, S.M. (1995). Effects of canine parvovirus on gray wolves in Minnesota. *Journal of Wildlife Management*, **59**: 565-570.
- Mills, M.G.L. & Biggs, H.C. (1993). Prey apportionment and related ecological relationships between large carnivores in Kruger National Park. *Symposia of the Zoological Society of London*, **65**: 253-268.
- Mills, M.G.L. & Gorman, M.L. (1997). Factors affecting the density and distribution of African wild dogs in the Kruger National Park. *Conservation biology*, **11**: 1397-1406.
- Nel, J.A.L. (1993). The bat-eared fox, a prime candidate for rabies vector. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **60**: 385-397.

- Nelson, D.L. (1991). Application of the polymerase chain reaction methods in genome mapping. *Current Opinion in Genetics & Development*, **1**(1): 62-68.
- Piggott, M.P. & Taylor, A.C. (2003). Remote collection of animal DNA and its applications in conservation management and understanding the population biology of rare and cryptic species. *Wildlife Research*, **30**: 1-13.
- Radinsky, L. (1973). Evolution of the canid brain. *Brain Behavior Evolution*, **7**(3) : 169-202.
- Reich, A. (1978). A case of inbreeding in the African wild dog, *Lycaon pictus*, in the Kruger National Park. *Koedoe*, **21**: 119-123.
- Roelke-Parker, M.E., Munson, L., Packer, C., Kock, R., Cleaveland, S., Carpenter, M., O'Brien, S.J., Poipischil, A., Hofmann-Lehrmann, R., Lutz, H., Mwamengele, G.L.M., Mgasa, M.N., Machange, G.A., Summers, B.A. & Appel, M.J.G. (1996). A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature*, **379**: 441-445.
- Romero-Herrera, A.E., Darbre, P.D. & Lehmann, H. (1976). The myoglobin of the Cape hunting dog (*Lycaon pictus*). *Bioch Biophys Acta*, **420**(2): 350-357.
- Rose, E.A. (1991). Application of the polymerase chain reaction to genome analysis. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **5**(1): 46-54.
- Seutin, G., White, B.N., Boag, P.T. (1991). Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analysis. *Canadian Journal of Zoology*, **7**: 82-90.
- Sillero-Zubiri, C., King, A.A. & Macdonald, D.W. (1996). Rabies and mortality in Ethiopian wolves (*Canis simensis*). *Journal of Wildlife Diseases*, **32**: 80-86.
- Smithers, R.H.N. & Lobao Tello, J.L.P. (1976). Check list and atlas of the mammals of Mozambique. *Museum Memoir Number 8*: Salisbury, Rhodesia.
- Stevenson-Hamilton, J. (1939). The health of wild animals. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, **10**:56-64.

Taberlet, P., Camarra, J.J., Griffin, S., Uhres, E., Hanotte, O., Waits, L.P., Dubois-Paganon, C., Burke, T. & Bouvet, J. (1997). Non invasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology*, **6**: 869-876.

Taylor, C.R., Schmidt-Nielsen, K., Dmi'el, R. & Fedak, M. (1971). Effect of hypothermia on heat balance during running in the African hunting dog. *American Journal of Physiology*, **220**: 823-827.

Turnbull, P.C.B. (1990). Anthrax. In: *Topley & Wilson's Principles of bacteriology, virology and immunity – Volume 3 – Bacterial diseases* (Ed. G.R. Smith & C.S.F. Easmon), London: Edward Arnold, pp. 145-176.

Utami, S.S., Goossens, B., Bruford, M.W., de Ruiter, J. & van Hoof, J.A.R.A.M. (2002). Male bimaturism and reproductive success in Sumatran orangutans. *Behavioral Ecology*, **13**: 643-652.

Valière, N. (2002). Amélioration et optimisation des méthodes non invasives et des marqueurs microsatellites en Biologie des Populations et de la Conservation. *Thèse de Doctorat*, Université Claude Bernard, Lyon I.

Van Heerden, J., Mills, M.G.L., Van Vuuren, M.J., Kelly, P.J. & Dreyer, M.J. (1995). An investigation into the health status and diseases of wild dogs (*Lycaon pictus*) in the Kruger National Park. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, **66**: 18-27.

Van Valkenburgh, B., Wayne, R.K., Kat, P.W., Fuller, T.K., Johnson, W.E. & O'Brien, S.J. (1989). Genetic and morphological divergence among sympatric canids. *Journal of Heredity*, **80**(6) : 447-454.

Woodroffe, R. & Ginsberg, J.R. (1998).. Edge effects and the extinction of populations inside protected areas. *Science*, **280**: 2126-2128.

Woodroffe, R., Ginsberg, J.R. & Macdonald, D.W. (1997). The African Wild Dog: Status Survey and Conservation Action plan. Gland, Switzerland: World Conservation Union, pp. 58-73.

Wozencraft, W.C. (1989). Classification of the recent carnivora. In: *Carnivore Behaviour, Ecology and Evolution* (Ed. J.L. Gittleman), London: Chapman & Hall, pp. 12-36.

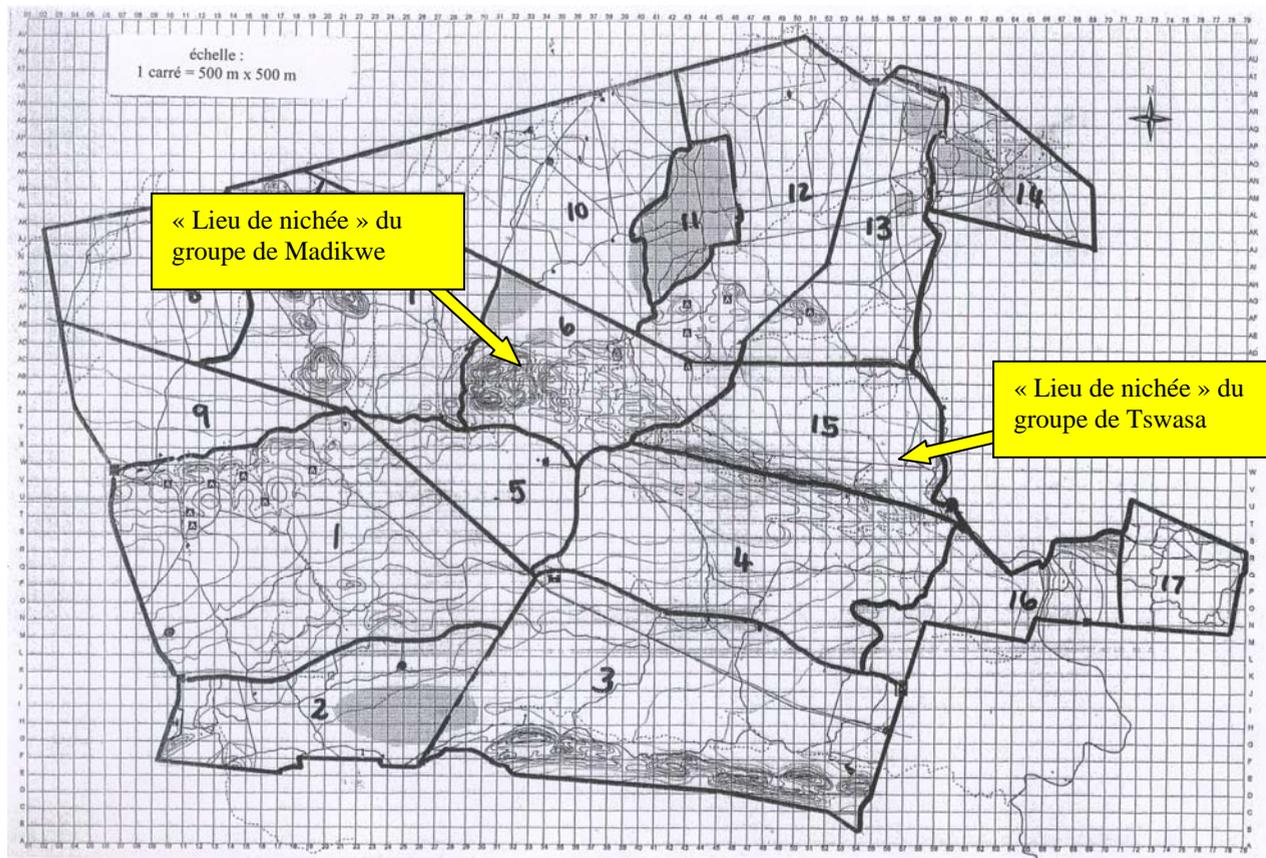
Autres sources d'informations :

Vierstraete, 1999 - site internet consulté en 2005 :

<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.htm>

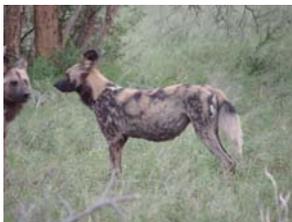
Annexes

Annexe 1 : Plan de la réserve de Madikwe



Annexe 2 : Planches photographiques de chaque lycaon de Madikwe

Photos des 14 adultes du groupe de Madikwe :



DW F03



Bot M2



Mad M6



Mad M8



Mad M9



Mad M11



Mad M31



Mad F39



Mad F34



Mad F41



Mad F35



Mad F37



Mad M36



Mad F40

Photos des 13 chiots du groupe de Madikwe :



Mad M87



Mad F89



Mad M90



Mad M80



Mad M81



Mad F82



Mad M85



Mad F86



Mad M83



Mad M91



Mad M84



Mad F88



Mad M92

Photos des 9 adultes du groupe de Tswasa :



DW M01



DW M07



Mad M20



Mad M52



Mad M53



Mad F16



Mad M54



Mad F51



Mad F15

Photos des 6 chiots du groupe de Tswasa :



Mad F63



Mad M60



Mad F64



Mad M61



Mad M62



Mad F66

VERIFICATION OF PARENTAGE IN AFRICAN WILD DOG (*Lycaon pictus*) PACKS USING TWO SOURCES OF GENETIC MATERIAL: FAECES AND SKIN

SUMMARY

The African wild dog (*Lycaon pictus*) is one of the most endangered carnivores and it's unlikely that there are more than 5000 individuals remaining in the wild. Large area requirements and naturally low densities are the basis for their conservation predicament. Wild dogs are highly social, pack-living predators of the African woodland and savannah. The archetypal wild dog pack consists of a single dominant breeding pair, their offspring, and non-breeding adults.

Because wild dogs are highly susceptible to the deleterious effects of captive manipulation and invasive sampling, we've been trying to find a reliable source of DNA using the less invasive sampling method to study the parentage in a pack.

We show that the low quantities and qualities of the DNA extracted from faeces didn't allow us to use domestic dog microsatellites for the parentage study. Although, the use of biopsy darts as a semi invasive sampling method has given us good results, allowing us to show multiple paternity in a litter.

KEY WORDS

- *Lycaon pictus*
- hierarchy
- dominance
- non invasive sampling
- DNA extraction
- microsatellites
- parentage

JURY

- President : Prof. ARMSTRONG
Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes
- Members : Prof. L'HOSTIS
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes
Prof. GOGNY
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

AUTHOR'S ADDRESS

18 Quai d'Orléans
75004 Paris

TEST DE FAISABILITE DE L'ETUDE DES LIENS DE PARENTE DANS UN GROUPE DE LYCAONS (*Lycaon pictus*) A PARTIR DE DEUX SOURCES DE MATERIEL GENETIQUE : FECES ET PEAU

RESUME

Le Lycaon (*Lycaon pictus*) est un des carnivores les plus menacé, il ne reste qu'environ 3500 individus dans le milieu sauvage. Large territoire et faible densité sont les deux exigences de base pour leur conservation. Les lycaons sont des prédateurs extrêmement sociables, vivant en groupe dans la savane africaine. La structure type d'un groupe de lycaons consiste en un couple dominant reproducteur, leurs descendants et des adultes non reproducteurs.

Car les lycaons sont susceptibles à la captivité et aux manipulations, nous avons tenté de trouver une source fiable d'ADN en utilisant la méthode d'échantillonnage la moins invasive possible afin d'étudier les liens de parenté dans un groupe.

L'étude montre que les faibles quantités et qualités d'ADN extraites à partir des fèces ne permettent pas d'utiliser des microsatellites du Chien domestique pour l'étude des parentés. En revanche, l'utilisation des flèches à biopsie comme méthode de prélèvement semi invasive a donné de bons résultats et a permis de mettre en évidence des pères multiples dans une même portée.

MOTS CLES

- *Lycaon pictus*
- hiérarchie
- dominance
- échantillonnage non invasif
- extraction d'ADN
- marqueurs microsatellites
- lien de parenté

JURY

- Président : Monsieur ARMSTRONG
Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes
- Membres : Madame L'HOSTIS
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes
Monsieur GOGNY
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

ADRESSE DE L'AUTEUR

18 Quai d'Orléans
75004 Paris