

# le naturaliste canadien

LA SOCIÉTÉ PROVANCHER  
D'HISTOIRE NATURELLE  
DU CANADA

Tiré à part

## **L'analyse de l'ADN sans manipulation des animaux : un outil incontournable pour la gestion et la conservation des espèces rares ou élusives**

*Julien Mainguy et Louis Bernatchez*

Volume 131, numéro 1 – Hiver 2007

Pages 51-58



# L'analyse de l'ADN sans manipulation des animaux: un outil incontournable pour la gestion et la conservation des espèces rares ou élusives

Julien Mainguy et Louis Bernatchez

## Résumé

Nos connaissances sur certaines espèces animales rares ou difficilement observables demeurent limitées par la difficulté de les étudier en milieu naturel. Or, un nombre croissant d'études ont récemment fait appel à l'écologie moléculaire pour contourner cette difficulté en examinant l'ADN laissé dans les poils et les fèces, permettant d'obtenir des informations utiles sur la biologie de l'espèce cible. Cette approche, dite non invasive puisqu'elle ne nécessite pas la capture d'animaux, permet, entre autres, d'estimer la taille de la population étudiée, de déterminer le rapport des sexes et le degré de parenté des individus qui la composent, en plus de comporter des applications légales. Malgré certaines limitations, notamment sur le plan des analyses au laboratoire, l'approche génétique non invasive constitue un outil de recherche fort intéressant en écologie. Ici, nous décrivons les étapes menant à la réalisation d'un projet basé sur cette approche et discutons de ses avantages et de ses inconvénients, le tout appuyé par des exemples d'études récentes. Somme toute, l'approche génétique non invasive est appelée à jouer un rôle grandissant dans la gestion et la conservation de la faune, notamment en raison des nombreux développements techniques et analytiques qui en augmentent constamment la puissance tout en simplifiant l'utilisation.

## Introduction

Bien qu'il s'agisse d'un objectif crucial en gestion et conservation de la faune, déterminer l'abondance d'une espèce sur un territoire donné n'en demeure pas moins un défi de taille pour les biologistes. Pour y parvenir, les chercheurs ont souvent recours à des techniques bien établies telles que les inventaires aériens (p. ex. Courtois *et al.*, 2003) ou, moins fréquemment, au marquage et suivi à long terme d'individus (p. ex. Côté et Festa-Bianchet, 2005). Cette dernière méthode permet d'ailleurs d'obtenir des renseignements plus détaillés, par exemple le rapport des sexes dans la population. Néanmoins, ce type d'approche peut parfois avoir des effets négatifs en causant un stress lors de la capture (DeNicola et Swihart, 1997). Ainsi, pour certaines espèces, les techniques d'inventaire peuvent ne pas convenir de sorte que nos connaissances s'en trouvent limitées. C'est le cas, notamment, d'espèces difficilement observables (élusives), rares ou encore dangereuses à manipuler. D'autres techniques permettent d'estimer la taille d'une population chez ces espèces,

par exemple le décompte d'empreintes de pattes (Smallwood et Fitzhugh, 1995). Cependant, la faible capacité à distinguer les différents individus trouvés dans la population par ce type de méthode fournit des estimations d'abondance souvent très approximatives.

En revanche, particulièrement chez les mammifères, les poils et les fèces laissés par les individus constituent des indices qui peuvent servir à estimer la taille d'une population sur un territoire donné. En effet, ces « sources d'information » contiennent une signature génétique (ADN) pouvant maintenant être décodée par des techniques moléculaires modernes, ce qui permet l'assignation d'un échantillon de poils ou de fèces à un individu. Ainsi, une estimation d'abondance précise peut être obtenue par un décompte d'empreintes génétiques individuelles (p. ex. Ernest *et al.*, 2000). Cette approche possède l'avantage que de telles empreintes sont obtenues sans avoir recours à la capture d'animaux (technique non invasive). De plus, elles peuvent fournir des renseignements allant bien au-delà de la simple estimation de la taille d'une population (Kohn et Wayne, 1997; Piggott et Taylor, 2003; Waits et Paetkau, 2005). Ces empreintes permettent de déterminer notamment le sexe de chaque individu, son utilisation de l'espace, de même que les liens de parenté entre les individus.

Nous désirons ici faire une synthèse des aspects à considérer pour la réalisation réussie d'un projet basé sur l'approche génétique non invasive, en plus de fournir de l'information sur les applications qu'offre cette technique pour la gestion et la conservation de la faune. Pour ce faire, nous décrivons les étapes de cette méthode ainsi que les développements techniques permettant d'en améliorer le succès, en appuyant le tout par des exemples d'études récentes. Une définition simple des termes propres à l'écologie moléculaire est fournie au lexique de l'encadré 1.

Julien Mainguy est étudiant au doctorat au Département de biologie et au Centre d'études nordiques de l'Université Laval.

julien.mainguy.1@ulaval.ca

Louis Bernatchez est professeur de biologie à l'Université Laval et titulaire de la chaire de recherche du Canada en génomique et conservation des ressources aquatiques.

### Encadré 1. Lexique

**ADN microsatellite :** Séquences de deux à cinq nucléotides répétés en tandem (par exemple  $[GT]_n$ ) et trouvés dans l'ensemble du génome. Les allèles à un locus microsatellite diffèrent en longueur selon le nombre de répétitions. Par exemple, l'allèle « 100 » peut être composé de 50 répétitions du dinucléotide  $[GT]$  et l'allèle « 102 » d'une répétition supplémentaire.

**ADN mitochondrial :** ADN trouvé dans les mitochondries (organites cellulaires), présent en plusieurs centaines ou plusieurs milliers de copies identiques dans chaque cellule et transmis uniquement par la mère (haploïde, un seul type par individu).

**Allèle :** Une des formes possibles d'un segment d'ADN à un locus donné. Chez les organismes diploïdes tels que les mammifères, deux allèles sont présents à un locus donné, soit un allèle par chromosome homologues.

**Génome :** Ensemble du matériel génétique d'un individu.

**Génotypage :** Caractérisation génétique des allèles trouvés à un ou plusieurs loci (multilocus) chez un individu, décrivant ainsi son génotype (empreinte génétique).

**Locus (pluriel : loci) :** Emplacement d'un segment d'ADN sur un chromosome.

**Marqueur génétique :** Type d'ADN (p. ex. microsatellite, mitochondrial) utilisé pour la caractérisation génétique individuelle.

**Nucléotide :** Unité structurale de base de l'ADN. Un segment d'ADN est constitué d'une séquence de nucléotides. Il existe quatre nucléotides (ou bases azotées) dans la constitution de l'ADN : adénine (A), cytosine (C), guanine (G) et thymine (T).

**Taq polymérase :** Enzyme provenant d'une bactérie thermophile (*Thermus aquaticus*) et servant à dupliquer l'ADN lors de la réaction en chaîne par polymérase (PCR).

### D'où provient l'ADN des fèces et des poils ?

Lors du passage de la nourriture dans l'intestin, des cellules épithéliales se détachent de la paroi intestinale et s'agglutinent à la surface des résidus avant qu'ils ne soient éjectés. C'est donc l'ADN provenant de ces cellules qui sert à déterminer l'empreinte génétique d'un individu à partir des fèces. Dans le cas des poils, l'ADN provient des cellules logées dans leur racine (follicule). Un poil coupé ou tombé de lui-même, c'est-à-dire sans que le follicule pileux ait été arraché, contiendra par conséquent peu ou pas d'ADN (Morin *et al.*, 2001). Même récoltés dans des conditions idéales, les échantillons de poils fournissent généralement une très petite quantité d'ADN, quelques picogrammes (Taberlet *et al.*, 1996; Morin *et al.*, 2001). La faible quantité d'ADN représente une contrainte importante dont nous discuterons dans les sections portant sur les analyses génétiques.

### La récolte des échantillons

La collecte d'échantillons diffère quelque peu entre les deux types (poils et fèces) de source d'ADN. Pour les fèces, une équipe patrouille généralement dans un secteur défini à intervalles réguliers et prélève un échantillon sur les défécations trouvées, en évitant la contamination entre les échantillons. Si possible, le lieu de récolte peut être enregistré à l'aide d'un appareil GPS (*Global Positioning System*) pour des analyses spatiales ultérieures. Selon l'étendue du terri-

toire à couvrir, il peut être difficile de rassembler un nombre d'échantillons suffisant pour une estimation fiable de la population étudiée. Un projet de recherche récent sur l'ours brun (*Ursus arctos*) en Suède a cependant démontré l'utilité de faire appel à des associations de chasseurs locaux pour pallier ce problème (Bellemain *et al.*, 2005). Il est par contre bon de rappeler que la manipulation de fèces peut parfois comporter des risques pour la santé humaine. À titre d'exemple, les fèces de loup (*Canis lupus*) sont souvent infectées par des vers cestodes (*Echinococcus* spp.; Craig et Craig, 2005), des parasites pouvant être transmis à l'humain. Ainsi, des précautions supplémentaires peuvent être requises en fonction de l'espèce étudiée.

La récolte de poils requiert l'installation d'un dispositif permettant d'arracher quelques poils à l'animal. Pour ce faire, les chercheurs utilisent généralement des « pièges à poils », lesquels sont constitués de fils barbelés entourant des leurres olfactifs qui attirent les animaux près du dispositif (encadré 2). Chez les plus petits mammifères, il est possible d'obtenir des échantillons de poils en procédant de manière similaire, soit en utilisant du matériel adhésif près du leurre (Mowat et Paetkau, 2002) ou autour de l'entrée d'une tanière (Sloane *et al.*, 2000).

La saison où se déroule la collecte influence également la qualité des échantillons, particulièrement dans le cas des fèces. Ainsi, l'hiver représente décidément la période privilégiée pour faciliter leur récolte. D'abord, les empreintes de pattes laissées par les animaux peuvent être suivies, ce qui augmente les chances de trouver des échantillons. Ensuite, la morphologie des traces permet d'éviter de récolter un échantillon provenant d'une autre espèce. Flagstad *et al.* (2004), qui ont réalisé un suivi non invasif d'une population de carcajous (*Gulo gulo*) en Norvège (encadré 3), ont récolté 89 % de leurs échantillons en suivant les traces laissées dans la neige, alors que le reste des échantillons a été récolté sur le sol nu à l'été. Lors des analyses génétiques, le succès d'amplification de l'ADN (voir les sections suivantes) a été de 75 % pour les fèces récoltées en hiver comparativement à seulement 26 % pour celles récoltées en été. Les fèces semblent donc mieux préservées durant l'hiver, probablement en raison du froid qui réduit l'activité bactériologique pouvant dégrader l'ADN. De plus, Maudet *et al.* (2004) ont démontré que, chez deux herbivores, soit le bouquetin des Alpes (*Capra ibex*) et le mouflon de Corse (*Ovis musimon*), les fèces récoltées en hiver généraient beaucoup moins d'erreurs analytiques lors de l'amplification de l'ADN.

### La préservation des échantillons

L'ADN étant sujet à la dégradation par les rayons ultraviolets et l'humidité (Lindahl, 1993), il est essentiel de préserver les échantillons récoltés de manière appropriée dans

**Encadré 2. Dispositif expérimental pour la collecte de poils chez l'ours noir**

Dans un projet réalisé en étroite collaboration avec le ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec (MRNF), Justin Roy, étudiant à la maîtrise à l'Université Laval sous la supervision de Louis Bernatchez, utilise le dispositif illustré ci-haut afin de récolter des poils d'ours noirs (*Ursus americanus*), trouvés dans les milieux agricoles et forestiers de la région de l'Outaouais, Québec. Ce type d'installation muni d'un appât olfactif et de fils barbelés a été utilisé avec succès dans l'étude d'autres populations d'ours (Boulanger *et al.*, 2004; Mowat *et al.*, 2005). L'information obtenue par génotypage individuel à partir de l'ADN, trouvé dans les poils, permettra d'estimer la taille de la population d'ours noirs fréquentant cette région, où un nombre croissant d'interactions problématiques ours importun-homme ont été rapportées au MRNF. Le degré de parenté et l'identification du genre (sexe) des ours trouvés sur ce territoire seront également étudiés, toujours à partir de l'ADN contenu dans les poils, afin de mieux comprendre le rôle de ces facteurs sur la dispersion et l'utilisation du territoire.

l'attente des analyses génétiques. La conservation des fèces dans le « DETs » (DMSO/EDTA/Tris/solution saline; Seutin *et al.*, 1991) semble la méthode la plus efficace pour préserver l'ADN (Frantzen *et al.*, 1998). Prugh *et al.* (2005), qui ont fait un suivi démographique non invasif d'une population de coyotes (*Canis latrans*) en Alaska à partir de ce type d'échantillon, ont obtenu un succès d'amplification élevé (80-90 %) de l'ADN en les conservant dans le DETs pendant trois à quatre ans au congélateur, soit 18 % de plus en moyenne que pour les échantillons ayant été uniquement congelés. Cependant, la conservation des fèces dans l'éthanol (concentration 70-95 %), un produit commun et plus économique, suivie d'une congélation à -20 °C, permet également de conserver l'ADN à long terme de façon satisfaisante, d'autant plus que l'éthanol agit comme bactéricide et prévient ainsi la dégradation de l'ADN (Frantzen *et al.*, 1998). Dans le cas des poils, Roon *et al.* (2003) recommandent de les conserver à -20 °C dans des enveloppes individuelles, elles-mêmes rangées dans des sacs étanches en plastique (type *Ziplock*), en évitant de décongeler et de recongeler les échantillons pour prévenir la création d'humidité. Les poils peuvent aussi être conservés de la même manière à la température de la pièce en ajoutant un gel dessiccatif dans le sac. Roon *et al.* (2003) soulignent cependant l'importance d'analyser les échantillons à l'intérieur d'une période de six mois afin de maximiser le succès d'amplification de l'ADN au laboratoire.

### Les analyses génétiques : les marqueurs à privilégier

L'ADN microsatellite (encadré 1) représente une catégorie de marqueurs (encadré 1) tout à fait désignée pour

les études non invasives. En effet, les marqueurs microsatellites sont très variables et ainsi, en combinant l'information génétique provenant de plusieurs loci (encadré 1), il est possible de déterminer un génotype multilocus (empreinte génétique par génotypage, encadré 1) unique à un individu (Sunnucks, 2000). De plus, un nombre sans cesse croissant de ces marqueurs est développé et rendu disponible pour une multitude d'espèces (p. ex. Faircloth *et al.*, 2005). Notamment, le journal *Molecular Ecology Notes* maintient à jour une liste exhaustive de tous les marqueurs microsatellites publiés dans ses pages (<http://tomato.bio.trinity.edu/home.html>). Parfois, ces marqueurs peuvent même être utilisés chez des espèces apparentées pour lesquelles des marqueurs n'ont pas encore été développés (p. ex. Mainguy *et al.*, 2005).

### L'extraction de l'ADN

Il existe plusieurs trousse commerciales permettant d'extraire l'ADN de façon efficace à partir de poils ou de fèces (Eggert *et al.*, 2005). Par exemple, QIAGEN est une compagnie spécialisée dans ce domaine et offre une trousse pour l'extraction d'ADN d'origine fécale (*QIAamp DNA Stool Mini Kit*), outil qui a été utilisé dans la majorité des études récentes (Flagstad *et al.*, 2004; Bellemain *et al.*, 2005; Prugh *et al.*, 2005). L'avantage principal de cette trousse tient à ce qu'elle contient un produit qui se lie aux agents pouvant inhiber l'amplification de l'ADN, donnant ainsi de meilleurs résultats lors du génotypage (Flagstad *et al.*, 2004). Un élément important à considérer, lors de l'étape de l'extraction à partir de fèces, est que l'ADN est souvent concentré sur leur surface. L'échantillon servant à l'extraction devrait donc provenir de la couche superficielle des fèces où les cellules épi-

théliales de l'intestin se trouvent en plus grandes concentrations, en particulier chez les herbivores (Wehausen *et al.*, 2004). Cependant, les excréments des carnivores contiennent également de l'ADN provenant des proies qu'ils ont consommées et ainsi, l'ADN amplifié peut parfois être contaminé par la nourriture ingérée (Piggott et Taylor, 2003). Par exemple, l'identification du sexe de l'individu (voir les sections suivantes) peut être erronée par la présence d'une proie de sexe opposé dans les fèces (Ernest *et al.*, 2000). L'utilisation de marqueurs propres à l'espèce étudiée peut cependant permettre, dans certains cas, de bien distinguer l'animal ayant produit les fèces, évitant ainsi les erreurs d'identification (p. ex. Lucchini *et al.*, 2002; voir la section suivante). Lorsque l'extraction est faite à partir de poils, il est bon de souligner que le nombre de poils utilisés aura un effet significatif sur le nombre d'erreurs associées à l'amplification de l'ADN. À titre d'exemple, Goosens *et al.* (1998) ont démontré que l'extraction de l'ADN à partir d'un, trois ou dix poils chez la marmotte des Alpes (*Marmota marmota*) pouvait générer un taux d'erreur de génotypage de 14,0 %, 4,9 % et 0,3 % respectivement. Il s'agit donc d'un aspect important à considérer pour la détermination individuelle correcte des échantillons récoltés.

### L'échantillon prélevé provient-il bien de l'espèce étudiée ?

Une fois l'ADN extrait, il est souhaitable, selon le contexte de l'étude, de s'assurer que les échantillons analysés proviennent bel et bien de l'espèce cible et non d'une autre espèce aux fèces ou poils similaires morphologiquement. Cette assurance s'obtient grâce à l'utilisation de l'ADN mitochondrial (encadré 1) qui, par sa nature et son mode de transmission, possède une séquence d'ADN propre à une espèce, offrant ainsi un pouvoir de résolution fiable entre espèces différentes, même celles étroitement apparentées. La digestion enzymatique du segment d'ADN mitochondrial, qui génère des fragments d'ADN d'une longueur propre à chaque espèce, constitue généralement l'étape permettant de déterminer avec certitude l'appartenance d'un échantillon à une espèce. À titre d'exemple, Prugh *et al.* (2005) ont été en mesure de différencier les fèces provenant de loups de celles de coyotes, ces derniers étant l'espèce cible de leur étude, en utilisant cette méthode. Par ailleurs, un nombre croissant de marqueurs d'ADN mitochondrial ont également été déve-

### Encadré 3. Suivi non invasif de la recolonisation du carcajou en Norvège

La population de carcajous (*Gulo gulo*) trouvée au sud de la Norvège était considérée comme éteinte dans les années 1960, mais s'est rétablie peu à peu depuis ce temps. Afin de mieux comprendre l'état actuel de cette population, Fløystad *et al.* (2004) ont utilisé une approche génétique non invasive en récoltant et génotypant les fèces de carcajous. Cette étude a permis d'établir, à l'aide d'analyses de capture-marquage-recapture (CMR), que : 1) la taille de la population était plus élevée que celle estimée à partir du nombre de tanières actives répertoriées; 2) la population du nord de la Norvège contribuait à la recolonisation de celle du sud par quelques immigrants, dont certains se reproduisaient avec les individus trouvés au sud, et 3) les mâles pouvaient parcourir des distances allant jusqu'à 500 km, une distance de dispersion bien supérieure à celles rapportées dans la littérature scientifique pour cette espèce. Ces connaissances obtenues sans la capture d'un seul individu vont permettre de faire un suivi plus exhaustif de la recolonisation de cette population autrefois éteinte.



*Gulo gulo*

CENTRE CONSERV. BIODIVERSITÉ BOREALE

loppés au cours des dernières années et ont été utilisés avec succès pour différencier l'origine d'échantillons entre espèces (p. ex. Palomares *et al.*, 2002). Il est cependant important de mentionner qu'une étude pilote doit toujours être menée afin de s'assurer que les marqueurs utilisés permettent des assignations correctes quant à l'espèce (Taberlet *et al.*, 1999). Dans le cas contraire, cela peut compromettre le succès, et surtout la validité, d'une étude réalisée à partir d'échantillons de poils ou de fèces.

### L'amplification de l'ADN

La réaction en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction*, PCR), constitue le processus par lequel une petite quantité d'ADN est reproduite *in vitro* en milliers de copies identiques (amplification). Cette étape est indispensable afin d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour le génotypage d'échantillons d'origine fécale ou pileaire. Lors de cette étape, l'utilisation de sérum albumine bovine (*bovin serum albumen*, BSA), pouvant neutraliser une partie des agents inhibiteurs de la PCR, permettra d'améliorer l'amplification de l'ADN microsatellite (Fløystad *et al.*, 2004). L'usage d'une enzyme (*Taq* polymérase; encadré 1) propre aux types d'échantillons à faible nombre de copies d'ADN, tels que ceux utilisés dans les études non invasives, améliorera également le succès de cette étape (Taberlet *et al.*, 1999).

### Les erreurs de génotypage : problèmes et solutions

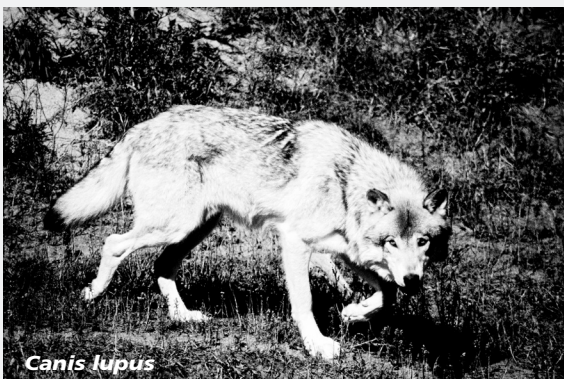
Malgré les améliorations techniques de préservation, d'extraction et d'amplification, le peu d'ADN contenu dans les échantillons obtenus de façon non invasive demeure une contrainte sérieuse pouvant entraîner deux problèmes majeurs (Taberlet *et al.*, 1996). D'abord, certains

allèles (encadré 1) ne seront pas amplifiés lors de la réaction en chaîne (non-amplification d'allèle, *allelic dropout*). Ensuite, de « faux » allèles (*false alleles*) pourront également apparaître lors du génotypage à cause des erreurs d'amplification. Ces deux problèmes ont pour effet de créer un faux génotype. Afin de diminuer le nombre de ces erreurs, Taberlet *et al.* (1996, 1999) ont proposé une approche multitubes qui consiste à génotyper à sept reprises un échantillon pour déterminer la présence d'un allèle à un locus spécifique. Cependant, cette approche demande beaucoup plus de temps et d'argent en raison du nombre élevé d'analyses au laboratoire. Une étude pilote est donc recommandée afin de tester le nombre de réplicats qui permet d'obtenir des génotypes fiables selon l'espèce étudiée (trois à quatre réplicats suffisent parfois : Flagstad *et al.*, 2004; Bellemain *et al.*, 2005). Cette étape est donc importante avant de passer à une étude à plus grande échelle (Taberlet *et al.*, 1999), tant pour des raisons pratiques qu'économiques. Des techniques analytiques ont également été proposées afin de déceler les erreurs de génotypage (Paetkau, 2003), permettant ainsi d'exercer un meilleur contrôle de qualité et de fiabilité des données obtenues au cours de l'étude. Paetkau (2003) souligne d'ailleurs l'importance de la formation du personnel comme mesure d'atténuation des erreurs causées par la contamination croisée des échantillons, l'assignation incorrecte des allèles lors du génotypage, ou encore par des erreurs de compilation lors du transfert des données génétiques entre logiciels.

### Combien de marqueurs microsatellites utiliser ?

Le nombre de marqueurs à utiliser pour génotyper un individu – et le distinguer d'un autre avec un niveau élevé de confiance – doit être pris en compte lors de la planification d'une étude non invasive. La combinaison des marqueurs utilisés doit permettre d'éviter de confondre des individus, particulièrement ceux qui sont apparentés et qui ont donc plus de chances de partager un génotype similaire (Waits *et al.*, 2001). Cependant, comme il y a généralement plus d'erreurs de génotypage par locus avec des échantillons obtenus de façon non invasive, l'augmentation du nombre de marqueurs étudiés peut également conduire à créer de « faux » individus (Mills *et al.*, 2000). Cela se produit lorsque deux échantillons provenant d'un même individu sont assignés à des individus différents, ce qui surestime la taille de la population à l'étude (Waits et Leberg, 2000; encadré 4). Le degré de variabilité des marqueurs utilisés (hétérozygotie) doit donc être pris en compte, car plus les marqueurs sont variables (nombre élevé d'allèles par locus), moins il est nécessaire d'en utiliser un grand nombre. En général, cinq à sept marqueurs microsatellites très variables, comportant au moins dix allèles différents chacun, suffisent pour distinguer les génotypes provenant de deux individus (Paetkau, 2003). En fait, il existe des tests statistiques qui permettent de déterminer si deux échantillons aux génotypes similaires proviennent d'un même individu ou non, à partir de la probabilité d'identité (p. ex. le test  $P_{(ID)}$ ; Waits *et al.*, 2001) et du nombre de marqueurs utilisés.

#### Encadré 4. Effets potentiels des erreurs de génotypage sur l'estimation d'abondance d'une population de loup gris



Une étude récente sur le loup gris (*Canis lupus*) par Creel *et al.* (2003) dans le parc national de Yellowstone, aux États-Unis, a bien démontré l'importance de tenir compte de l'impact des erreurs de génotypage de l'ADN sur l'estimation de la taille d'une population. L'intérêt de cette étude réside dans le fait que l'effectif de cette population était connu (40 individus), ce qui permettait de tester la validité de l'estimation obtenue à partir des échantillons fécaux. Pour ce faire, les auteurs ont utilisé 13 marqueurs génétiques afin de déterminer le nombre d'individus à l'origine de 227

échantillons récoltés dans le parc. L'utilisation de la totalité des marqueurs a causé l'identification d'un nombre élevé de « faux » individus (voir le texte pour des explications), créant une estimation d'abondance 5,5 fois supérieure à la taille réelle de la population. Ces chercheurs ont par la suite démontré que la réduction du nombre de marqueurs utilisés diminuait grandement l'erreur sur l'estimation de la taille de la population en abaissant le risque d'erreur de génotypage, supportant l'idée qu'un nombre minimal de marqueurs doit être utilisé (Waits et Leberg, 2000; Waits *et al.*, 2001). De plus, les chercheurs ont proposé une approche « par appariement » afin d'obtenir de meilleures estimations. Cette méthode consiste à établir un niveau de confiance d'assignation d'un génotype à un individu à partir d'un sous-échantillon de fèces pour lesquelles l'assignation individuelle était connue, tout en tenant compte de la possibilité d'erreurs de génotypage. Cette approche a permis d'estimer la population à 39 individus, soit à un individu près de la taille réelle, démontrant que l'approche non invasive peut fournir une estimation fiable.

probabilité d'identité (p. ex. le test  $P_{(ID)}$ ; Waits *et al.*, 2001) et du nombre de marqueurs utilisés. Ce test statistique doit être utilisé de façon plus conservatrice lorsque les individus ont plus de chances d'être apparentés (Waits *et al.*, 2001). Ces comparaisons statistiques, qu'il pourrait être laborieux de calculer une à une, peuvent être compilées par un logiciel disponible gratuitement (programme GIMLET; Valière, 2002). D'autres solutions pour résoudre le problème des « faux » individus ont également vu le jour ces dernières années, tel le recours à des simulations informatisées permettant d'évaluer la présence d'erreurs dans les données (McKelvey et Schwarz, 2004).

### L'estimation de la taille de la population

À partir des échantillons recueillis, un nombre minimal d'individus présents sur un territoire peut être estimé à l'aide d'une analyse de raréfaction, où le génotype multilocus de chaque échantillon est comparé à tous ceux qui ont été récoltés auparavant (Kohn *et al.*, 1999). L'asymptote de la relation décrivant une courbe entre le nombre de génotypes uniques cumulés et le nombre d'échantillons génotypés sert à définir la taille de cette population. Il est également possible de faire un suivi démographique pour une espèce donnée sur une base temporelle à l'aide d'analyses de capture-marquage-recapture (CMR; Otis *et al.*, 1978), où chaque échantillon est considéré comme un événement de « capture » (Mills *et al.*, 2000). Par ailleurs, contrairement à des marqueurs traditionnels (p. ex. bague, étiquette d'oreille), l'empreinte génétique est conservée tout au long de la vie de l'individu et donc le risque de perte de marques est évidemment nul. Le programme MARK (White et Burnham, 1999), également disponible gratuitement, permet de tester différents modèles d'analyses CMR (p. ex. Cormack-Jolly Seber), de vérifier l'effet de variables diverses, telles que la disponibilité d'une proie sur le comportement démographique d'une population (Boulanger *et al.*, 2004), en plus de fournir des estimations de survie. Cependant, les probabilités de survie obtenues par ce logiciel possèdent souvent une incertitude élevée, ce qui justifie le développement de modèles d'analyse plus sophistiqués (Prugh *et al.*, 2005). Par ailleurs, lorsque quelques individus d'une population à l'étude ont été marqués à l'aide de radioémetteurs, l'information provenant du suivi télémétrique peut être incorporée dans les analyses CMR afin d'améliorer la précision des estimations de la taille de population (p. ex. estimateur Lincoln-Peterson; Seber, 1982). Si possible, le mieux consiste à combiner différents types d'analyses, incluant celles plus « conventionnelles » (p. ex. inventaire de tanières actives), afin de comparer leurs résultats, ce qui augmente la confiance envers les estimations obtenues (Bellemain *et al.*, 2005).

### L'identification du genre et le rapport des sexes

L'identification du genre grâce à l'amplification simultanée de marqueurs génétiques propres aux chromosomes sexuels X et Y permet également de connaître la proportion de mâles et de femelles à l'origine des échantillons récoltés (Kohn et Wayne, 1997), un atout propre à l'approche non invasive. De plus, la détermination du sexe de l'individu ayant produit l'échantillon peut parfois faciliter son identification (Sloane *et al.*, 2000). L'amplification des deux marqueurs sexuels indiquera le sexe mâle alors que la présence du seul marqueur X indiquera qu'il s'agit d'une femelle. De même, la seule amplification du marqueur Y peut également être utilisée comme critère d'identification. Par exemple, Prugh *et al.* (2005) ont été en mesure de déterminer

le sexe de coyotes captifs avec une efficacité de 100 % suivant cette méthode, ce qui leur a permis d'identifier avec certitude le sexe des individus provenant de la population naturelle.

### D'autres applications intéressantes

L'approche non invasive permet de répondre à une multitude de questions en écologie, ce qui en fait un outil de recherche fort intéressant. Par exemple, la présence d'une espèce sur un territoire donné peut être vérifiée par l'analyse de quelques poils ou de fèces. Un cas d'étude inusité a trait à la réfutation par technique moléculaire de l'observation d'un *Sasquatch* (ou « Bigfoot ») au Yukon à l'été 2005, événement qui a fait la une des journaux dans l'Ouest canadien. L'analyse génétique des poils supposément laissés par la bête légendaire a permis de déterminer qu'ils provenaient en fait d'un bison (*Bison bison*), rejetant avec certitude l'observation rapportée (Coltman et Davis, 2006), au grand dam des journalistes à la recherche de sensations fortes ! La présence du cougar de l'Est (*Puma concolor*) au Québec a également été déterminée de la même manière (Gauthier *et al.*, 2005). À la simple détection de la présence d'une espèce, s'ajoute la possibilité d'établir les relations de parenté entre individus qui pourraient être difficilement obtenues autrement. À titre d'exemple, Garnier *et al.* (2001) ont été en mesure d'étudier le système de reproduction méconnu du rhinocéros noir (*Diceros bicornis*) à l'état sauvage au Zimbabwe à partir de l'ADN contenu dans les fèces de rejets, mères et pères potentiels. À l'aide de logiciels d'assignations parentales, ces chercheurs ont déterminé quels mâles s'étaient reproduits et avec quelles femelles, fournissant ainsi des renseignements utiles pour la sauvegarde de cette espèce menacée.

De la même manière, il est possible d'assigner un individu à une population parmi un ensemble de populations, ce qui permet, par exemple, de connaître le nombre d'immigrants (encadré 3). Il est même possible de déterminer l'utilisation du territoire par les individus et leur distance de dispersion à partir de l'information génétique et spatiale recueillie, c'est-à-dire en localisant sur une carte le lieu de récolte de plusieurs échantillons provenant d'un même individu (Taberlet *et al.*, 1997; encadré 3). Parmi les autres applications, notons que le génotypage des poils ou des fèces peut permettre de déceler le niveau de variabilité génétique d'une population (p. ex. Triant *et al.*, 2004). L'approche non invasive peut aussi avoir des applications légales. Ainsi, la vente illégale d'un tigre (*Panthera tigris*), qui jouit pourtant d'un statut d'espèce protégée en Chine, a pu être démontrée par l'analyse génétique d'indices (fèces, poils et sang), laissés derrière par le tigre que les braconniers transportaient (Wan et Fang, 2003). Ces nombreuses applications démontrent clairement l'intérêt et les possibilités qu'offre l'approche non invasive.



## Conclusion

Il n'y a aucun doute que l'utilisation de techniques génétiques non invasives pour l'étude des populations élusives est appelée à jouer un rôle de plus en plus important pour la gestion et la conservation de la faune (Kohn et Wayne, 1997; Piggott et Taylor, 2003; Waits et Paekau, 2005). Cependant, la réussite d'un projet utilisant ces techniques passe obligatoirement par une étude de faisabilité préalable (Taberlet *et al.*, 1999). Cet aspect représente l'élément le plus important à considérer. Au Québec, nos connaissances relativement limitées sur l'abondance et les mouvements de certaines espèces telles que le pékan (*Martes pennanti*) et le lynx roux (*Lynx rufus*) pourraient certainement bénéficier de l'application de l'approche génétique non invasive. La présence d'individus captifs dans des centres de conservation comme celui du Jardin zoologique de Saint-Félicien faciliterait la réalisation d'étude de faisabilité afin de tester des marqueurs génétiques permettant de déterminer le génotype, le sexe et le niveau de parenté entre individus avant de procéder à l'étude non invasive de populations naturelles. De même, l'application de ces méthodes au Québec, dans le contexte légal, pourrait contribuer à réduire le braconnage en fournissant des preuves incriminantes additionnelles, comme le font déjà l'Ontario et l'Alberta.

## Remerciements

Nous tenons à remercier Michel Crête, Antoine St-Louis, Justin Roy et un membre anonyme du comité de rédaction du *Naturaliste canadien* pour des commentaires constructifs sur cet article ainsi que le Centre de conservation de la biodiversité boréale et Justin Roy pour les photographies accompagnant cet article.

## Références

- BELLEMAIN, E., J.E. SWENSON, D. TALLMON, S. BRUNBERG and P. TABERLET, 2005. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: four methods for brown bears. *Conservation Biology*, 19: 150-161.
- BOULANGER, J., S. HIMMER and C. SWAN, 2004. Monitoring of grizzly bear population trends and demography using DNA mark-recapture methods in the Owikeno Lake area of British Columbia. *Canadian Journal of Zoology*, 82: 1267-1277.
- COLTMAN, D.W. and C. DAVIS, 2006. Molecular cryptozoology meets the Sasquatch. *Trends in Ecology and Evolution*, 21: 60-61.
- CÔTÉ, S.D. et M. Festa-Bianchet, 2005. Les stratégies de reproduction chez les femelles de la chèvre de montagne (*Oreamnos americanus*). *Le Naturaliste canadien*, 129 (1), 70-77.
- COURTOIS, C., A. GINGRAS, C. DUSSAULT, L. BRETON and J.-P. OUELLET, 2003. An aerial survey technique for the forest-dwelling ecotype of Woodland Caribou, *Rangifer tarandus* caribou. *Canadian Field-Naturalist*, 117: 546-554.
- CRAIG, H.L. and P.S. CRAIG, 2005. Helminth parasites of wolves (*Canis lupus*): A species list and an analysis of published prevalence studies in Nearctic and Palaearctic populations. *Journal of Helminthology*, 79: 95-103.
- CREEL, S., G. SPONG, J. L. SANDS, J. ROTELLA, J. ZEIGLE, L. JOE, K.M. MURPHY and D. SMITH, 2003. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. *Molecular Ecology*, 12: 2003-2009.
- DENICOLA, A.J. and R.K. SWIHART, 1997. Capture-induced stress in white-tailed deer. *Wildlife Society Bulletin*, 25: 500-503.
- EGGERT, L.S., J.E. MALDONADO and R.C. FLEISCHER, 2005. Nucleic acid isolation from ecological samples – animal scat and other associated materials. *Methods in Enzymology*, 395: 73-82.
- ERNEST, H.B., M.C.T. PENEDO, B.P. MAY, M. SYVANEN and W.M. BOYCE, 2000. Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. *Molecular Ecology*, 9: 433-441.
- FAIRCLOTH, B.C., A. REID, T. VALENTINE, S.H. EO, T.M. TERHUNE, T.C. GLENN, W.E. PALMER, C.J. NAIRN and J.P. CARROLL, 2005. Tetranucleotide, trinucleotide, and dinucleotide loci from the bobcat (*Lynx rufus*). *Molecular Ecology Notes*, 5: 387-389.
- FLAGSTAD, Ø., E. HEDMARK, A. LANDA, H. BRØSETH, J. PERSSON, R. ANDERSEN, P. SEGERSTRÖM and H. ELLEGREN, 2004. Colonization history and non-invasive monitoring of a re-established wolverine population. *Conservation Biology*, 18: 676-688.
- FRANTZEN, M.A.J., J.B. SILK, J.W.H. FERGUSON, R.K. WAYNE and M.H. KOHN, 1998. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology*, 7: 1423-1428.
- GARNIER, J.N., M.W. BRUFORD, and B. GOOSENS, 2001. Mating system and reproductive skew in the black rhinoceros. *Molecular Ecology*, 10: 2031-2041.
- GAUTHIER, M., C. LANTHIER, F.-J. LAPOINTE, L.D. LANG, N. TESSIER and V. STROEHER, 2005. Cougar tracking in the Northeast: years of research finally rewarded. In Beausoleil R.A. and D.A. Martorello (Eds.), *Proceeding of the 8th Mountain Lion Workshop*, Olympia, WA: 86-88.
- GOOSENS, B., L.P. WAITS and P. TABERLET, 1998. Plucked hair samples as a source of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping. *Molecular Ecology*, 7: 1237-1241.
- KOHN, M.H. and R.K. WAYNE, 1997. Facts from feces revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, 12: 223-227.
- KOHN, M.H., E.C. YORK, D.A. KAMRADT, G. HAUGHT, R.M. SAUVAJOT and R.K. WAYNE, 1999. Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society of London: Biological Sciences*, 266: 657-663.
- LINDAHL, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362: 709-715.
- LUCCHINI, V., E. FABBRI, F. MARUCCO, S. RICCI, L. BOITANI and E. RANDI, 2002. Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. *Molecular Ecology*, 11: 857-868.
- MAINGUY, J., A.S. LLEWELLYN, K. WORLEY, S.D. CÔTÉ and D.W. COLTMAN, 2005. Characterization of 29 polymorphic microsatellite markers for the mountain goat (*Oreamnos americanus*). *Molecular Ecology Notes*, 5: 809-811.
- MAUDET, C., G. LUIKART, D. DUBRAY, A. VON HARDENBERG and P. TABERLET, 2004. Low genotyping error rates in wild ungulate faeces sampled in winter. *Molecular Ecology Notes*, 4: 772-775.
- MCKELVEY, K.S. and M.K. SCHWARTZ, 2004. Genetic errors associated with population estimation using non-invasive molecular tagging: problems and new solutions. *Journal of Wildlife Management*, 68: 439-448.
- MILLS, L.S., J.J. CITTA, K.P. LAIR, M.K. SCHWARTZ and D.A. TALLMON, 2000. Estimating animal abundance using noninvasive DNA sampling: promise and pitfalls. *Ecological Applications*, 10: 283-294.
- MORIN, P.A., K.E. CHAMBERS, C. BOESCH and L. VIGILANT, 2001. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from non-invasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology*, 10: 1835-1844.
- MOWAT, G. and D. PAETKAU, 2002. Estimating marten *Martes americana* population size using hair capture and genetic tagging. *Wildlife Biology*, 8: 201-209.

- MOWAT, G., D.C. HEARD, D.R. SEIP, K.G. POOLE, G. STENHOUSE and D.W. PAETKAU, 2005. Grizzly *Ursus arctos* and black bear *U. americanus* densities in the interior mountains of North America. *Wildlife Biology*, 11 : 31-48.
- OTIS, D.L., K.P. BURNHAM, G.C. WHITE and D.R. ANDERSON, 1978. Statistical inference from capture data on closed animal populations. *Wildlife Monographs*, 62, 135 p.
- PAETKAU, D., 2003. An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories. *Molecular Ecology*, 12 : 1375-1387.
- PALOMARES, F., J.A. GOODY, A. PIRIZ, S.J. O'BRIEN and W.E. JOHNSON, 2002. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology*, 11 : 2171-2182.
- PIGGOTT, M.P. and A.C. TAYLOR, 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.
- PRUGH, L.R., C.E. RITLAND, S.M. ARTHUR and C.J. KREBS, 2005. Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. *Molecular Ecology*, 14 : 1585-1596.
- ROON, D.A., L.P. WAITS and K.C. KENDALL, 2003. A quantitative evaluation of two methods for preserving hair samples. *Molecular Ecology Notes*, 3 : 163-166.
- SEBER, G.A.F., 1982. The estimation of animal abundance and related parameters. Macmillan, New York, 654 p.
- SEUTIN, G., B.N. WHITE and P.T. BOAG, 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analysis. *Canadian Journal of Zoology*, 69 : 82-90.
- SLOANE, M.A., P. SUNNUCKS, D. ALPERS, L.B. BEHEREGARAY and A.C. TAYLOR, 2000. Highly reliable genetic identification of individual northern hairy-nosed wombats from remotely collected hairs: a feasible censusing method. *Molecular Ecology*, 9 : 1233-1240.
- SMALLWOOD, K.S. and E.L. FITZHUGH, 1995. A track count for estimating mountain lion *Felis concolor californica* population trend. *Biological Conservation*, 71 : 251-259.
- SUNNUCKS, P., 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15 : 199-203.
- TABERLET, P., S. GRIFFIN, B. GOOSSENS, S. QUESTIAU, V. MANCEAU, N. ESCARAVAGE, L.P. WAITS and J. BOUVET, 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*, 24 : 3189-3194.
- TABERLET, P., J.-J. CAMARRA, S. GRIFFIN, E. UHRÈS, O. HANOTTE, L.P. WAITS, C. DUBOIS-PAGANON, T. BURKE and J. BOUVET, 1997. Noninvasive genetic tracking of the endangered brown bear population. *Molecular Ecology*, 6 : 869-876.
- TABERLET, P., L.P. WAITS and G. LUIKART, 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*, 14 : 323-327.
- TRIAUT, D.A., R.M. PACE III and M. STINE, 2004. Abundance, genetic diversity and conservation of Louisiana black bears (*Ursus americanus luteolus*) as detected through non-invasive sampling. *Conservation Genetics*, 5 : 647-659.
- VALÈRE, N., 2002. GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*, 2 : 377-379.
- WAITS, L.P. and P.L. LEBERG, 2000. Biases associated with population estimation using molecular tagging. *Animal Conservation*, 3 : 191-199.
- WAITS, L.P., G. LUIKART and P. TABERLET, 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10 : 249-256.
- WAITS, L.P. and D. PAETKAU, 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management*, 69 : 1419-1433.
- WAN, Q.-H. and S.-G. FANG, 2003. Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species. *Forensic Science International*, 131 : 75-78.
- WEHAUSEN, J.D., R.R. RAMEY II and C.W. EPPS, 2004. Experiments in DNA extraction and PCR amplification from bighorn sheep feces: the importance of DNA extraction method. *Journal of Heredity*, 95 : 503-509.
- WHITE, G.C. and K.P. BURNHAM, 1999. Program MARK: survival estimation from population of marked animals. *Bird Study*, Supplement 46 : 120-138.

## Sélection Laminard inc.

Diane Lemay et Pierre Savard, prop.

- Encadrement
- Laminage
- Matériel d'artiste
- Cours de peinture
- Galerie d'art

254, rue Racine  
Loretteville (Québec)  
G2B 1E6

Tél. : (418) 843-6308  
Fax. : (418) 843-8191

Courriel : selection.laminard@videotron.ca  
www.selectionart.com



420, rue Jean-Rioux  
Trois-Pistoles QC  
G0L 4K0

Téléphone : 418.851.1265  
Télécopie : 418.851.1277