

Mise au point et validation d'un système de marqueurs génétiques pour les perdrix rouges hybrides

Michel Vallance, Guillaume Queney*, Dominique Soyez & Jean-Claude Ricci**

* Antagène, 69760 Limonest

** Institut méditerranéen du patrimoine cynégétique et faunistique,
Villa « Les Bouillens », 30310 Vergèze

Contexte de l'étude

La perdrix rouge (*Alectoris rufa*) est une espèce gibier très prisée par les chasseurs. Son aire de distribution naturelle est restreinte à la péninsule ibérique, les deux-tiers au Sud de la France continentale, la Corse et le Nord de l'Italie. Elle appartient au genre *Alectoris*, représenté par sept espèces ayant des aires de répartition disjointes (se chevauchant toutefois sur leurs marges). La spéciation est assez ancienne – deux à six millions d'années (Randi *et al.*, 1992 ; Randi, 1996) – et résulte non seulement de l'isolement géographique mais de processus adaptatifs liés à des conditions écologiques assez nettement différenciées.

Ainsi, par exemple Randi & Bernard-Laurent (1999) ont montré que les foyers d'hybridation entre perdrix rouge (*A. rufa*) et perdrix bartavelle (*A. graeca*) sur le pourtour du massif alpin s'éteignent très rapidement (à moins de 150 km de la zone de contact), les individus hybridés étant éliminés par les processus de sélection naturelle.

Dans le cas de la perdrix rouge et de la perdrix choukar (*A. chukar*), la formation d'hybrides résulte de l'intervention humaine. En effet, des croisements interspécifiques ont été largement employés dans les années 1950 à 1970 en France et en Espagne pour augmenter la productivité des élevages de gibier. Les oiseaux lâchés en très grande quantité dans le milieu naturel ont introduit les génotypes hybridés au sein des populations naturelles de perdrix rouge, comme l'a mis en évidence un travail d'inventaire génétique effectué sur seize populations de l'aire naturelle française réalisé avec le soutien du Conseil régional Provence-Alpes-Côte d'Azur (figure 1 ; IMPCF, 2004).

Longtemps après l'interdiction du lâcher des perdrix choukar, à la fin des années 1980, les lignées d'élevage (reproducteurs) ont conservé une part de génome d'*Alectoris chukar* devenue indiscernable sur le plan phénotypique mais parfaitement décelable par analyse génétique (taux d'hybridation moyen de 15 à 25 %).

Un programme de recherche sur ce thème a été mené de 2004 à 2006 par l'ONCFS, en association avec la Fédération nationale des chasseurs, l'Institut méditerranéen du patrimoine cynégétique et faunistique, le Syndicat national du petit gibier de chasse, le Syndicat national des acouveurs, le Syndicat des sélectionneurs avicoles et aquacoles français et le laboratoire Antagène. L'objectif était de mettre au point un test génétique individuel permettant :

- aux éleveurs, d'identifier les niveaux d'hybridation au sein de leurs lignées reproductrices et donc d'éliminer les hybrides tout en conservant les génotypes satisfaisants (hybridation non décelable, nulle ou très faible),
- aux sociétés de chasse, de pratiquer des tests sur les lots de lâcher afin de s'assurer de ne pas introduire de génotypes hybrides au sein des populations naturelles de perdrix rouge.

Les étapes du programme de recherche

Les marqueurs mitochondriaux

Randi & Lucchini (1998) ont développé un test génétique portant sur

l'ADN mitochondrial. Ce brin circulaire d'ADN extra-nucléaire, non codant, évolue très lentement au sein d'une espèce. Cette caractéristique permet de retracer l'histoire probable des mutations et de construire des arbres phylogénétiques remontant, pour deux

espèces voisines, jusqu'à leur ancêtre commun à l'ère tertiaire. Dans nos échelles de temps (jusqu'à 1 000 générations) les différences génétiques sur l'ADN mitochondrial apparaissent fixées et distinguent très précisément perdrix rouge, perdrix choukar

et perdrix bartavelle. En revanche, l'ADN mitochondrial ne présente pas une hérédité mendélienne, c'est-à-dire qu'il se comporte comme un génome haploïde* transmis uniquement par la lignée maternelle. En présence d'hybrides *A. rufa* x *A. chukar*, les individus porteront le type mitochondrial caractérisant *A. chukar* si, et seulement si, tous leurs ancêtres maternels portaient ce « mitotype ». Ainsi, même s'il y a dilution du génome nucléaire hybridé au fil des générations, au sein d'une population naturelle de perdrix rouge la trace de l'hybridation reste indélébile au sein des lignées maternelles descendant de ces individus lâchés. La trace des lâchers successifs va se cumuler automatiquement (pour autant que quelques individus lâchés réussissent à avoir une descendance).

C'est donc un moyen de contrôle très sûr. Par contre ce marqueur ne permet pas de repérer avec certitude tous les individus hybrides au sein des élevages (seuls les hybrides par voie strictement maternelle sont détectés). Ceci s'avère pourtant indispensable si on veut reconstruire des lignées pures, alors que l'hybridation est largement répandue.

Les marqueurs SNP

Pour atteindre nos objectifs, il est apparu nécessaire de faire appel à des marqueurs nucléaires, positionnés sur le génome à hérédité mendélienne (des deux parents) et soumis à la sélection naturelle.

Les séquences codantes de l'ADN nucléaire fournissent a priori d'excellents supports pour l'identification des hybrides. C'est d'ailleurs cette caractéristique que l'on utilise, indirectement, lorsqu'on effectue un tri « phénotypique » sur des caractères morphologiques tels que le plumage ou le poids, par exemple. Malheureusement, seules les descendance F1 et F2 sont aisément reconnaissables en tant qu'hybrides. Les hasards des recombinaisons

* Se dit d'un génome où chaque gène n'est présent qu'une seule fois. Chez les organismes supérieurs, animaux ou plantes le génome est diploïde c'est-à-dire que chaque gène est présent en deux copies, l'une reçue du parent maternel, l'autre du parent paternel.

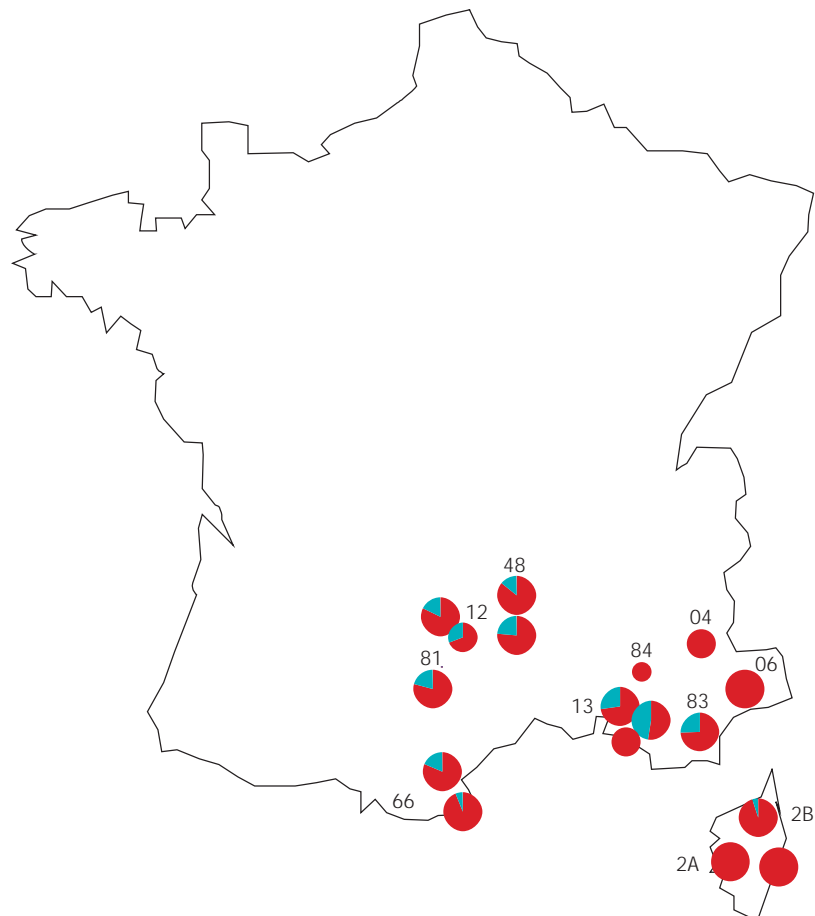


Figure 1 : Évaluation de l'hybridation *Alectoris rufa* (en rouge) x *Alectoris chukar* (en bleu) pour des populations du Sud-Est de la France (16 populations représentatives, 359 perdrix), réalisée à partir de l'ADN mitochondrial. Cinq populations se sont révélées pures, deux quasi-pures, huit avec 20 à 30 % d'oiseaux hybridés et une avec 50 % d'oiseaux hybridés. La taille des cercles est proportionnelle à la taille de l'échantillon analysé. (chiffres = département ; l'échantillon du Vaucluse a été considéré comme non représentatif).

génétiques interviennent à chaque génération pour brouiller les cartes. Il faut donc faire appel à un « jeu » de plusieurs marqueurs (idéalement plus de dix) disposés sur des chromosomes différents (la perdrix rouge a trente-huit paires de chromosomes plus les deux chromosomes sexuels, mais trente paires sont des micro-chromosomes) pour pouvoir suivre l'hybridation après plusieurs générations et pour pouvoir quantifier « l'introgession » (part de génome *chukar* présente chez un individu hybride). Les marqueurs SNP (*single nucleotide polymorphism*) sont des mutations ponctuelles apparues au sein des séquences « codantes » de l'ADN nucléaire. Elles sont pour cette raison peu nombreuses (beaucoup moins que les microsatellites) mais lorsqu'elles sont apparues après la spéciation, c'est-à-dire la séparation entre

espèces *A. chukar* et *A. rufa*, et avant les glaciations du quaternaire qui ont confiné les populations relictuelles et homogénéisé certains caractères du génome (effet « bottleneck »), elles distinguent de manière absolue les chromosomes « *chukar* » des chromosomes « *rufa* ».

À partir de 50 gènes du poulet (*Gallus gallus*) dont le génome a été entièrement séquencé par la recherche agromique, nous avons obtenu dix-neuf séquences d'ADN, réparties sur des chromosomes différents, présentant un polymorphisme ponctuel (mutation d'une paire de base) entre *A. chukar* et *A. rufa* (figure 2).

Pour sélectionner les marqueurs SNP qui différencient de manière absolue les perdrix choukar des perdrix rouges

(et non pas seulement certaines perdrix choukar de certaines perdrix rouges), il était essentiel de pouvoir s'appuyer sur un large échantillon de spécimens prélevés dans l'ensemble des aires naturelles des deux espèces, tout au moins une part largement représentative de celles-ci.

Ainsi, soixante-huit spécimens réputés purs de *A. rufa* originaires de Corse, d'Espagne, du Portugal, et des Alpes du Sud, et cent un spécimens de *A. chukar* originaires du Moyen Orient (Liban, Chypre, Syrie), berceau probable des oiseaux introduits dans les élevages français dans les années 1950, mais aussi d'Asie centrale (Kazakhstan) et d'Extrême Orient (Chine), ont été analysés.

Pour être sûr qu'il s'agissait bien d'oiseaux exempts de toute hybridation, les échantillons ont été récoltés au sein de populations ne présentant aucune trace d'hybridation décelable par l'ADN mitochondrial. Ces résultats ont été confirmés par les informations historiques, cynégétiques et géographiques dont nous disposions.

Résultats

Le tableau 1 illustre la démarche d'analyse et de construction d'un jeu de marqueurs de l'hybridation chez la perdrix rouge (Vallance & Queney, 2006). Deux conditions doivent être réunies.

D'une part, il faut que les marqueurs retenus soient absents chez la perdrix rouge, de manière à ne pas surestimer l'hybridation et à ne pas éliminer de « vraies » perdrix rouges. Parmi les dix meilleurs marqueurs sélectionnés, cinq sont totalement spécifiques (fréquence d'occurrence = 0%) et trois autres demeurent au-dessous d'une fréquence d'occurrence de 5 %.

D'autre part, il faut que les marqueurs retenus soient systématiquement présents dans le génome *chukar* afin de ne pas délaissier un certain nombre d'hybrides. Pour six marqueurs, la probabilité moyenne de non-détection d'un hybride est de 6 %. En prenant en compte un septième marqueur (P07) cette probabilité reste au même niveau mais les hybrides ayant un taux

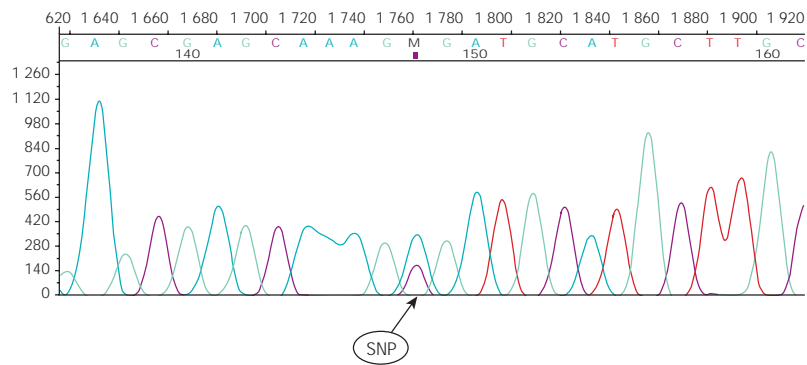


Figure 2 : Identification par SNP d'un hybride sur une séquence d'ADN. La séquence d'ADN montre le nucléotide présent pour chaque paire de base. Pour le site de mutation (SNP), deux nucléotides sont présents simultanément (individu hétérozygote).

Tableau 1 : Fréquence d'occurrence des marqueurs SNP chez *Alectoris chukar*, *Alectoris rufa* et les hybrides.

Marqueur SNP	Poly-morphisme	Nucléotide	Fréquence (%) chez <i>A. chukar</i>	Fréquence (%) chez <i>A. rufa</i>	Fréquence (%) chez les hybrides
P03	A/G	G	100	0	9,1
P05	T/C	T	100	0	4,4
P06	T/G	G	86,3	0	0
P09	G/C	C	82,1	0	2,3
P10	T/C	T	94,9	0	0
P19	A/G	G	100	3,6	8,7
P22	A/G	A	63,8	3,5	2,2
P25	A/G	G	32,9	0,9	13
P07	T/G	T	90,5	11,2	2,2
P08	T/C	C	50	8,6	0

d'hybridation plus faible, de l'ordre de 7 % (1/14 puisqu'il y a 2x7 chromosomes potentiellement « marqués »), peuvent être mieux détectés (figure 3).

Cependant on prend le risque d'éliminer à tort une vraie perdrix rouge, puisque le marqueur P07 n'est spécifique qu'à 88,8 %. Par contre, si on ajoute les marqueurs P22 et P25, on évite cet inconvénient et on augmente encore la puissance du jeu de marqueurs parce qu'on marque davantage de sites chromosomiques. De ce fait, par exemple, la proportion d'hybrides non décelés chez des perdrix rouges « introgressées » à 10 % par les gènes *chukar* est abaissée de 25 %. Le sélectionneur est donc pris en tenaille entre ces deux contraintes qui limitent inexorablement le nombre de marqueurs éligibles. Il faut

y rajouter aussi le coût des analyses qui augmente linéairement avec le nombre de marqueurs employés.

Vers un test opérationnel fin 2007

Le test génétique mis au point sur la base des marqueurs SNP sélectionnés devait tout d'abord être expérimenté sur de nouveaux spécimens de perdrix, distincts de ceux qui ont servi à sa construction, afin de s'assurer qu'il conserve sa fiabilité et sa pertinence.

Cette expérimentation a été réalisée sur des tissus (foies congelés) conservés à l'issue d'une expérimentation de croisements contrôlés (*A. chukar* x *A. rufa*)

conduits jusqu'à la 5^e génération. Le taux théorique (moyen) d'hybridation est connu (figure 4) et peut être comparé aux résultats obtenus par application du jeu de marqueurs (figure 5). Une bonne correspondance apparaît entre le taux théorique et les résultats obtenus par le test. Une forte déperdition d'acuité du test a également été mise en évidence dès lors qu'on s'adresse à des hybrides contenant moins de 6 % de gène *chukar*. Dans ce cas, les marqueurs ne sont plus en nombre suffisant pour repérer la trace de l'hybridation sur tous les individus.

Le test a également été pratiqué au sein de populations d'élevage sur un lot de six-cent individus appartenant à dix élevages différents. Les résultats confirment le bien fondé de la démarche engagée par ce programme de recherche et mettent en évidence qu'il n'est pas trop tard pour réagir et recréer des génotypes proches du génotype sauvage. Ils révèlent en effet que 50 % du stock de reproducteurs est détecté hybride, c'est-à-dire avec au moins 6,5 % de génome *chukar*. En d'autres termes, moins de la moitié des reproducteurs serait quasi indemne d'hybridation. Le taux individuel d'hybridation varie de 0 à 30 %, avec une moyenne de 8 % (16 % si on calcule la moyenne seulement sur les hybrides détectés). Le test actuel apparaît donc capable de permettre l'élimination du stock hybride présent dans les lignées d'élevage depuis l'abandon de l'élevage de la perdrix choukar.

Ce test génétique devrait être disponible pour un prix raisonnable dès la fin 2007, donnant ainsi aux éleveurs français l'opportunité de prendre une longueur d'avance dans la course à la qualité environnementale de leur production et de s'entourer des meilleures garanties pour préparer l'avenir.

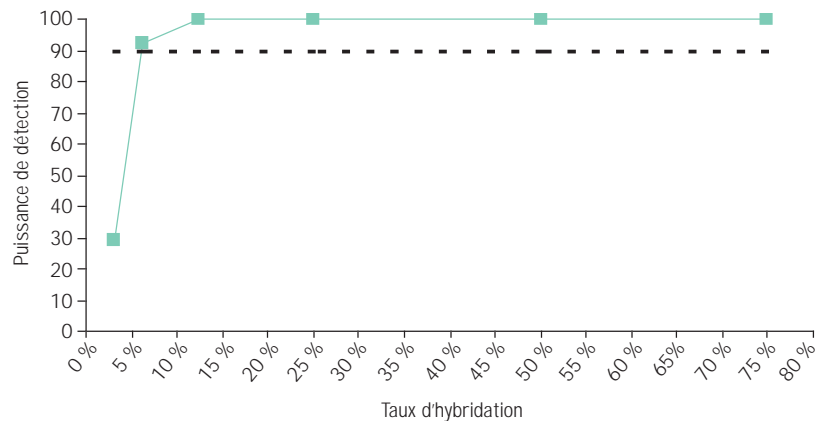


Figure 3 : Puissance de détection des hybrides en fonction du niveau d'introgression.

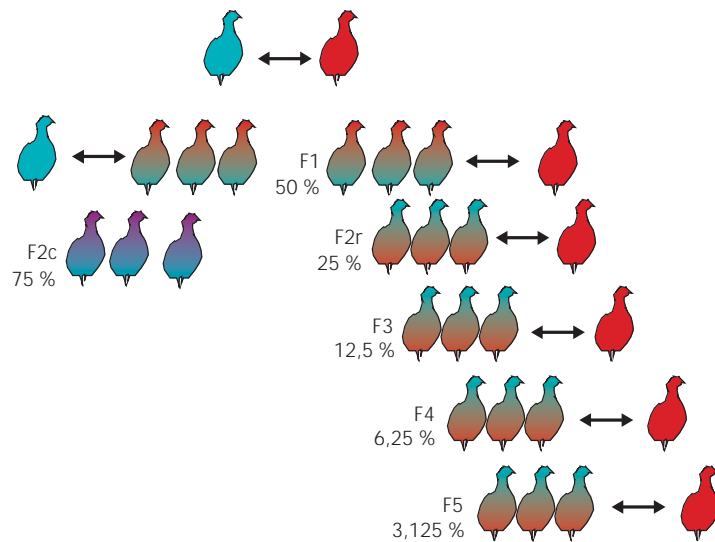


Figure 4 : Taux d'hybridation théorique entre *Alectoris rufa* (en rouge) et *Alectoris chukar* (en bleu) dans le cadre d'un croisement expérimental utilisé pour valider le test génétique. ($r = A. rufa$; $c = A. chukar$). À chaque génération, des hybrides *A. rufa* x *A. chukar* ont été croisés de manière répétitive avec des *A. rufa* pures, de façon à obtenir des générations successives de plus en plus « diluées » en contenu *chukar*.

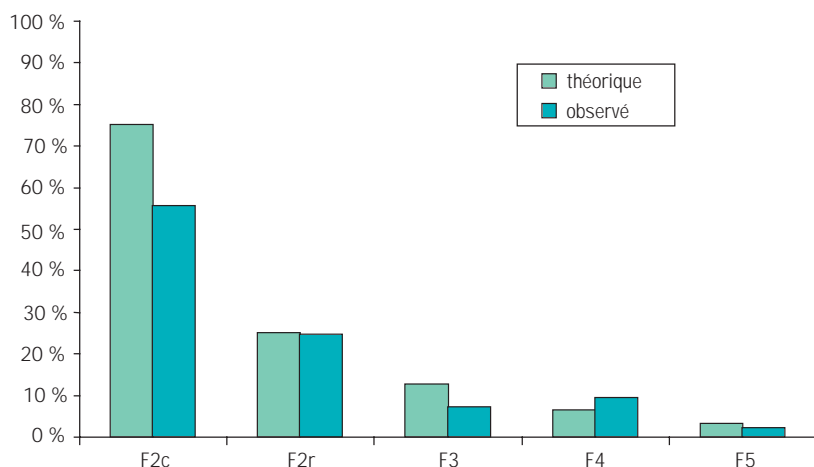


Figure 5 : Estimation du niveau individuel d'hybridation sur un croisement expérimental par un test construit avec les huit meilleurs marqueurs SNP (F2c, F2r : cf. figure 4).

Un label génétique pour les perdrix rouges

En tant que gibier de repeuplement, la perdrix rouge représente un marché très important. Environ 15 millions d'oiseaux sont produits en France chaque année. Plus des deux tiers sont destinés à l'exportation : Angleterre, Espagne, Portugal, Italie. Le renforcement des contrôles administratifs (qualité sanitaire et pureté génétique) par certains pays – en Espagne, ces contrôles sont à l'initiative des provinces autonomes à qui est déléguée l'administration de la chasse – et le durcissement de la concurrence conduisent les éleveurs à se tourner vers un système de « label ». Le test génétique mis au point dans le cadre de ce programme de recherche devrait être validé au plan international dans le cadre d'une expertise « devant notaire » mise en place par la Fédération royale espagnole des chasseurs. Quatre laboratoires (Antagène, IREC, Faculté vétérinaire de Sarragosse, Université de Porto) se sont engagés dans cette épreuve de vérité consistant à comparer les diagnostics des différents tests existants sur un échantillon connu de perdrix rouges pures, perdrix choukar et perdrix hybrides issues de croisements contrôlés. Deux lots sauvages (à faible taux d'hybridation supposé) et deux lots d'élevage standards seront également analysés. Le résultat de cette épreuve sera disponible début 2008 et permettra aux Fédérations nationales espagnole, française et portugaise de chasseurs de reconnaître la fiabilité et l'applicabilité de ce test en routine dans les élevages.

Ainsi, à terme, un « label » génétique européen pourra être reconnu aux élevages mettant en œuvre des mesures de contrôle d'hybridation fondé sur ce test et permettra aux organisations cynégétiques de revendiquer la qualité environnementale et la durabilité de cette pratique indispensable à la poursuite de leur activité sur bon nombre de territoires de chasse.

BIBLIOGRAPHIE

- IMPCF (2004) – Échantillonnage et résultats des tests d'hybridation (*A. rufa* x *A. chukar*) par ADN mitochondrial (Antagène) de 16 « populations » de perdrix rouges du sud de la France prélevées à la chasse en 2003 et 2004. Rapport Interne IMPCF. 5 pp.
- Randi E., Alkon P. U. & A. Meriggi (1992) – A new model of *Alectoris* evolution based on biochemical analysis. *Gibier Faune Sauvage*, vol 9 : 661-666.
- Randi E. & V. Lucchini (1998) – organization and evolution of the mitochondrial DNA control region in the avian genus *Alectoris*. *Journal of Molecular Evolution* 47 (4) : 449-462.
- Randi E. (1996) – A mitochondrial cytochrome B phylogeny of the *Alectoris* partridges. *Molecular Phylogenetic Evolution* 6 (2) : 214-227.
- Randi E. & A. Bernard-Laurent (1999) – Population genetics of a hybrid zone between the Red-legged partridge and Rock partridge. *Auk*, 116, 2 : 324-337.
- Vallance M. & G. Queney (2006) – Communication, Colloque Gamebird 2006 – Perdix XII, Athens, Géorgie (USA), 29 mai – 4 juin 2006.

ABSTRACT

Development of a system of genetic markers for hybridized red-legged partridges.

Michel Vallance, Guillaume Queney, Dominique Soyez & Jean-Claude Ricci

- Due to historical and current breeding practices, red-legged partridges (*Alectoris rufa*) released for harvest on estates in southern Europe are not commonly « pure-strain » individuals but hybrids of Red-legged partridge and Chukar (*Alectoris chukar*). This hybridisation potentially threatens natural populations of red-legged partridges in these regions as a result of large, yearly releases on hunting estates. We have started a research program to develop a DNA test, based on SNP (single nucleotide polymorphism) genetic markers, to evaluate the level of hybridisation occurring between red-legged partridges (wild or reared) and chukar. A set of partridges was collected in their natural distribution area to select SNP markers able to surely differentiate chukar and red-legged partridges.
- A set of 10 reproducible SNP markers was selected, each possessing different alleles in at least 90 % of pure strain individuals tested. Five of these markers are completely specific. The use of the 6 best markers leads to a probability of non-detection of 6 %.
- We conducted an assessment of Red-legged partridge and Chukar populations which have not been used to develop the genetic markers : each marker correctly assigned an average of 96 % of individuals tested. Finally, we conducted an assessment of reared Red-legged partridge populations distributed throughout France by profiling 600 individuals sampled in collaboration with breeders syndicates : 50 % of genitors were revealed as hybrids.
- The system of genetic marker sets in this study appears to be able to eliminate hybrid genitors in Red-legged partridge breeding farms. A routine DNA test should be available to breeders at the end of 2007.