

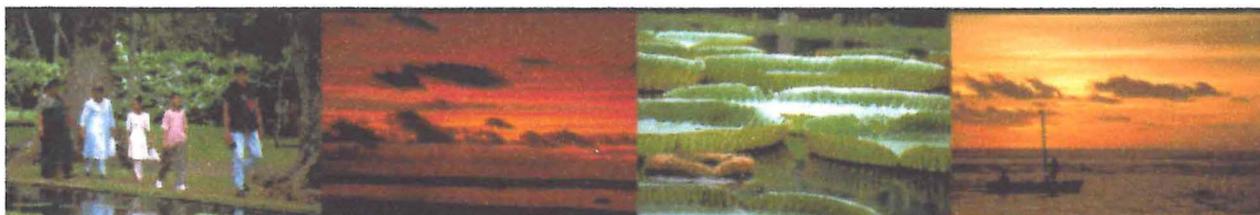
ENSAR
U.E.R. de Zootechnie
65, Rue de St Briec
35042 RENNES Cedex

Université de Rennes I
U.E.R. de Sciences Biologiques
Campus de Beaulieu
Avenue du Général Leclerc
35042 RENNES Cedex

**CARACTERISATION GENETIQUE DES POPULATIONS DE
CERFS RUSA (*Cervus timorensis rusa*)
EN ELEVAGE A L'ILE MAURICE**



Mémoire présenté par Frédéric Maudet en vue de l'obtention du diplôme de
DEA de Biologie et Productions Animales



Année 1998



Devait-il y avoir une fin à l'amélioration graduelle des techniques et artifices utilisés par les répliqueurs pour assurer leur propre continuité dans le monde ? Cette amélioration a disposé de beaucoup de temps pour progresser. Quels étranges engins d'autoprotection les millénaires apportèrent-ils ? Après quatre milliards d'années, que sont devenus les anciens répliqueurs ? Ils ne sont pas morts puisqu'ils étaient passés maîtres dans l'art de la survie. Mais ne cherchez pas à les voir flotter librement dans la mer. Il y a longtemps qu'ils ont abandonné cette liberté désinvolte. Ils fourmillent aujourd'hui en grandes colonies, à l'abri de gigantesques et pesants robots, isolés du monde extérieur, communiquant avec lui par des voies tortueuses et indirectes, et le manipulant par commande à distance. Ils sont en vous et en moi. Ils nous ont créés, corps et âme, et leur préservation est l'ultime raison de notre existence. Ils ont parcouru un long chemin, ces répliqueurs. On les appelle maintenant « gènes », et nous sommes leurs machines à survie.

Richard Dawkins
Le gène égoïste

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet



CIRAD
0000115818

Remerciements

Je souhaiterais avant tout remercier deux personnes qui me sont chères et sans lesquelles je n'aurais pas pu poursuivre mes études de DEA.

Le montage de ce travail de DEA résulte d'une collaboration entre différents partenaires :

- la «Mauritius Deer Farming Co-operative Society Ltd» qui fédère les éleveurs,
- le sous-comité cerfs de la «Mauritius Meat Producers Association» qui regroupe les producteurs de viande des chassés,
- le programme ECONAP du CIRAD-EMVT,
- la fondation internationale pour la sauvegarde de la faune.

Que tous soient vivement remerciés pour leur aide.

J'adresse des remerciements particuliers aux membres de la « Mauritius Deer Farming Co-operative Society Ltd » pour leur collaboration et leur accueil chaleureux à l'Ile Maurice.

Je remercie également Philippe Chardonnet et François Monicat pour leur aide dans la mise au point de l'étude ainsi que Jean-Charles Maillard qui m'a accueilli au sein du laboratoire PATHOTROP du CIRAD-EMVT et conseillé tout au long du stage.

Merci également à M. Jacques Mallard dont l'ouverture d'esprit et le goût pour des projets quelque peu originaux ont permis d'initier réellement le stage de DEA, et à Philippe Solano pour son aide lors de l'analyse statistique.

Enfin, je remercie mes collègues de « paillasse », avec une mention particulière pour Mélanie de Reynal et David Berthier.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	3
1. L'ILE MAURICE	4
1.1. GÉNÉRALITÉS	4
1.2. GÉOGRAPHIE.....	4
1.3. HISTOIRE	7
2. LE CERF RUSA (<i>CERVUS TIMORENSIS RUSSA</i>).....	7
2.1. SYSTÉMATIQUE.....	7
2.2. RAPPELS ZOOLOGIQUES	8
2.1. PLACE DU RUSA DANS L'ÉLEVAGE MONDIAL DE <i>CERVIDAE</i>	9
3. LA FILIERE CERF A L'ILE MAURICE	10
3.1. RAPPEL HISTORIQUE	10
3.2. CYCLES BIOLOGIQUES DU CERF RUSA À L'ILE MAURICE.....	11
3.3. IMPORTANCE CULTURELLE ET SOCIALE	11
3.4. IMPORTANCE ÉCONOMIQUE	11
4. PROBLÉMATIQUE GÉNÉTIQUE	13
5. STRUCTURE ET PROPRIÉTÉS DES MICROSATELLITES	16
5.1. DÉFINITION.....	16
5.2. ORIGINE, ÉVOLUTION ET RÔLE DES MICROSATELLITES	16
5.3. PROPRIÉTÉS DES MARQUEURS MICROSATELLITES	16
5.4. POLYMORPHISME.....	17
5.5. APPLICATIONS	17
6. MATÉRIELS ET MÉTHODES	18
6.1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE	18
6.1.1. <i>Echantillonnage des « feed-lots »</i>	18
6.1.2. <i>Echantillonnage des chassés</i>	19
6.1.3. <i>Traitement des échantillons au laboratoire</i>	19
6.1.4. <i>Extraction / purification de l'ADN génomique</i>	21
6.1.5. <i>Quantification de l'ADN</i>	21
6.1.6. <i>Choix des microsatellites dérivés bovins / cerfs</i>	21
6.1.7. <i>Amplification des microsatellites</i>	23
6.1.8. <i>Polymorphisme électrophorétique</i>	23
6.2. ANALYSE GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS	24
6.2.1. <i>Statistiques F de Wright</i>	24
6.2.2. <i>Estimateurs de Weir et Cockerham</i>	24
6.2.3. <i>Outils informatiques</i>	25
6.2.3.1. <i>Utilisation du logiciel FSTAT</i>	25
6.2.3.2. <i>Utilisation du logiciel GENEPOP</i>	26
7. RESULTATS.....	27
7.1. MICROSATELLITES.....	27
7.2. ANALYSE GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS	27
7.2.1. <i>Fréquences alléliques</i>	27
7.2.2. <i>Equilibre de Hardy-Weinberg</i>	29
7.2.3. <i>Déséquilibre de liaison</i>	29
7.2.4. <i>Structuration des « feed-lots » entre la côte ouest et la côte est</i>	30

8. DISCUSSION	31
8.1. LES MICROSATELLITES DÉRIVÉS	31
8.2. L'ÉCHANTILLONNAGE	33
8.3. L'ANALYSE GÉNÉTIQUE	33
8.3.1. <i>Structuration des populations</i>	33
8.3.2. <i>Origine du cerf rusa mauricien</i>	34
8.3.3 <i>L'effet fondateur</i>	35
CONCLUSION.....	36
BIBLIOGRAPHIE.....	37
ANNEXE 1 : PROTOCOLES.....	42
ANNEXE 2 : PRELEVEMENTS DANS LES CHASSES.....	46
ANNEXE 3 : AGENDA DE MISSION	47
ANNEXE 4 : PUBLICATION SCIENTIFIQUE	50
RESUME.....	53
ABSTRACT	53
MOTS CLES	53

INTRODUCTION

Suite à une mission d'appui technique et scientifique au développement de l'élevage de *Cervidae* à l'Ile Maurice réalisée en juin 1997 par le CIRAD-EMVT, un certain nombre d'objectifs ont été définis. Parmi ceux-ci, la nécessité d'une étude de la diversité génétique des populations de cerfs rusa en élevage à Maurice avait été identifiée.

Le cerf rusa (*cervus timorensis russa*) a été introduit à l'Ile Maurice au mois de novembre 1639, comme l'attestent les registres maritimes. Un bateau hollandais, en route pour les Indes, a relâché quelques cerfs fondateurs de la population actuelle. Aucune introduction ultérieure n'a été rapportée.

Aujourd'hui, le cheptel mauricien compte environ 65 000 têtes. Objet d'élevage semi-intensif et extensif, le cerf rusa revêt une importance considérable pour la société mauricienne.

Grâce au travail conjoint de différents partenaires, la fondation internationale pour la sauvegarde de la faune, la « Mauritius Deer Farming Co-operative Society Ltd » et le programme ECONAP du CIRAD-EMVT, le financement et la mise au point d'une étude préliminaire ont pu être définis dans le cadre d'un stage de DEA.

Ce mémoire de DEA "biologie et productions animales" décrit la réalisation et présente les résultats de cette étude de la variabilité génétique du cerf rusa à l'Ile Maurice.

1. L'ILE MAURICE

1.1. Généralités

L'île Maurice (figure 1) est une île de l'Océan Indien, située au sud-est de la côte africaine, et à l'est de Madagascar (20°S et 57,5°E). La superficie totale de l'île Maurice est d'environ 186 500 hectares dont 90 100 ha cultivés (à l'exclusion des plantations forestières), ce qui représente plus de 48 % de la superficie totale de l'île.

La population s'élève à 1 127 000 habitants (estimation de juillet 95). La capitale, Port Louis, compte environ 150 000 habitants. La population est majoritairement d'origine indienne (68 %), complétée par 27 % d'origine créole, 3 % chinoise et 2 % française.

L'anglais est la langue officielle, mais le français est parlé couramment dans toute l'île, de même que le créole. A l'image de la population, les religions sont diverses : 52 % d'hindous, 28 % de chrétiens (26 % catholiques, 2 % protestants), 17 % de musulmans et 3 % de confessions diverses.

Le PNB par habitant est de 3 000 \$US. L'économie mauricienne a connu une croissance continue, avec une élévation du PIB de 5,5 % en moyenne sur la période 1970-1993. La zone franche y a largement contribué. Créée en 1970, elle est entièrement consacrée aux produits destinés à l'exportation (industries manufacturières). Les principales ressources sont :

- la confection et les articles textiles (44 % des recettes d'exportation),
- la canne à sucre (40 % des recettes) qui représente 93 % des surfaces cultivées du pays,
- le tourisme, avec une capacité de 11 000 chambres d'hôtels.

Les principaux partenaires commerciaux sont la Grande Bretagne, la France, les USA et l'Afrique du Sud.

La monnaie est la roupie mauricienne (rupee) dont le taux de change est : 1 franc français = 3,95 roupies (en août 98).

1.2. Géographie

D'origine volcanique, l'île est bordée de récifs coralliens, à une distance allant de quelques centaines de mètres à 5 kilomètres. Le terrain s'élève graduellement des plaines côtières au plateau central, où l'altitude varie entre 275 et 730 mètres.



Figure 1 : L'Ile Maurice

De petites chaînes de montagnes découpées bornent le plateau central, au nord, à l'ouest et au sud. Trois chaînes parallèles, courant vers l'est et l'ouest, s'achèvent par de nombreux contreforts proches de la côte est.

Le climat général mauricien peut être défini comme un plaisant climat semi-océanique avec des températures annuelles moyennes de 22°C, des précipitations annuelles d'environ 2 100 mm et un éclairage journalier variant entre 7 et 8 heures. Deux saisons sont observées, l'été de novembre à avril (chaud et humide) et l'hiver de mai à octobre (frais et sec).

Malgré sa petite taille, Maurice présente des variations substantielles des caractéristiques climatiques dues à des différences d'altitude, à la proximité des côtes ou à l'exposition au vent. C'est pourquoi les services météorologiques de Maurice ont classé le climat en 9 zones, chacune divisée en 3 sous-zones (côtière, de plaine et d'altitude), ce qui donne un total de 27 microclimats reflétant la remarquable diversité des conditions climatiques. La pluviométrie annuelle peut varier de 750 mm (Albion, côte ouest) à plus de 4 000 mm (Arnaud, plateau central). Les chaînes montagneuses ont une influence considérable sur la pluviosité, l'élévation rapide des vents humides du sud-est étant une cause de condensation. La pluviosité peut varier considérablement d'une année à l'autre, au-dessus ou en-dessous de la moyenne, et des écarts de 50 % par rapport à la moyenne ne sont pas rares.

Il y a également plus de 6,5°C de différence dans les températures moyennes annuelles. L'humidité varie d'un taux confortable de 60-70 % dans le nord et l'ouest jusqu'à des conditions très humides dans le centre. De la même façon les caractéristiques spatiales des autres paramètres climatiques présentent d'importantes variations à travers l'île.

L'île subit, pendant la plus grande partie de l'année, l'influence des vents du sud-est qui sont plus soutenus de mai à octobre. Il y a cependant, en été, des périodes d'accalmie ou de vents légers et variables couramment interrompus par des perturbations cycloniques.

Maurice subit fréquemment l'influence de cyclones tropicaux qui causent parfois des dommages très importants. Des rafales de près de 160 km/h accompagnées de chutes d'eau de 200 millimètres furent relevées une vingtaine de fois au cours des 100 dernières années. De plus, au cours de la même période, l'île essuya 5 cyclones dont les vents atteignirent des vitesses de l'ordre de 200 km/h.

La structure géologique de l'île est principalement constituée de basalte. Les plus vieilles

éruptions volcaniques sont à l'origine des élévations à l'aspect tourmenté, alors que les terres agricoles ont été formées à partir de coulées de lave plus récentes, issues d'une série de cratères situés sur un axe nord-est/sud-ouest.

Les sols furent formés par la décomposition des laves les moins anciennes et leur distribution est étroitement liée à la pluviosité et à l'âge de la roche mère. La fertilité des sols des régions humides dépend de leur disponibilité en eau. Cependant, du fait de leur nature et de leur faible profondeur, les sols graveleux possèdent une capacité de rétention d'eau plus faible et le lessivage des éléments nutritifs y est plus important que dans les terres franches.

1.3. Histoire

Inhabitée jusqu'en 1598, l'île fut d'abord occupée par les hollandais, qui ne la quittèrent qu'en 1710. C'est pendant cette période que furent exterminés les derniers dodos (*Raphus cucullatus*) encore survivants. Après le départ des hollandais, la France en prit possession en 1715, et elle fût nommée Isle de France. Les français y restèrent jusqu'en 1810, date à laquelle les anglais s'en emparèrent. L'île fût alors rebaptisée Mauritius. Après l'abolition de l'esclavage en 1835, ce furent des Indiens qui vinrent travailler dans les plantations de canne à sucre. Tout au long du XIX^{ème} siècle, Mauritius affirma de plus en plus son autonomie vis à vis de la couronne britannique. En 1965, l'Angleterre accepta le principe de l'indépendance, qui fut accordée finalement le 12 mars 1968.

2. LE CERF RUSA (*Cervus timorensis russa*)

2.1. Systématique

La systématique des *Cervidae* a suscité de nombreux débats (Harrington, 1985 ; Groves and Grubb, 1987). Les cerfs sont actuellement séparés en 2 familles : *Moschidae* et *Cervidae*. La famille *Moschidae* est monogénérique (*Moschus*) avec 4 espèces. Les *Cervidae* comprennent 16 genres et 42 espèces divisés en 4 sous-familles : *Hydropotinae*, *Cervinae*, *Odocoileinae*, et *Muntiacinae* (Grubb, 1993). Les *Hydropotinae* sont monogénériques (*Hydropotes*) avec une seule espèce. Les autres groupes présentent une diversité plus grande puisque l'on trouve 16 espèces chez les *Cervinae* (*Axis*, *Cervus*, *Dama*, *Elaphurus*), 8 espèces chez les *Muntiacinae* (*Elaphodus*, *Muntiacus*) et 18 espèces chez les *Odocoileinae* (*Alces*, *Blastocerus*, *Capreolus*,

Hippocamelus, Mazama, Odocoileus, Ozotoceros, Pudu, Rangifer).

Le cerf rusa se classe comme suit :

Cervidae/Cervinae/Cervus timorensis/russa

D'autres taxons sont étroitement liés aux cerfs. En fait, les *Antilocapridae* (« pronghorns » encore appelés antilocapres) semblent plus proches des *Cervidae* que ne le sont les *Moschidae* (Janis et Scott, 1987). Les trois familles ensemble forment une superfamille, les *Cervoidae*. *Bovidae, Cervoidae* et *Giraffidae* (Girafe et Okapi) forment le groupe supérieur des *Pecora*.

La classification du cerf est basée sur des caractères morphologiques. Les données issues d'études caryotypiques et mitochondriales montrent que le genre *Cervus* est diphylétique, avec un groupe comprenant le sambar (*Cervus unicolor*) et le rusa (*Cervus timorensis*) distinct d'un groupe formé par le cerf rouge, le sika et le cerf du père David. Cet aspect diphylétique est confirmé par l'étude très détaillée d'Emerson et Tate basée sur le polymorphisme des protéines sanguines (Emerson et Tate, 1993).

2.2. Rappels zoologiques

Le cerf rusa (*Cervus timorensis*) est originaire des îles d'Indonésie, les espèces variant selon leur île d'origine. Il y a 6 sous-espèces de *Cervus timorensis*, celles issues de Timor, Molucca, Java, Celebes, Lombok et Muna.

Bien que le cerf rusa provienne d'Indonésie, on rencontre aujourd'hui des troupeaux en Australie, à Bornéo, dans les Comores, les îles Hermit, Madagascar, Maurice, La Nouvelle Angleterre, la Nouvelle-Calédonie, la Nouvelle-Guinée, les îles Niningo et la Nouvelle Zélande (Whitehead, 1993).

Originaire de Java, le cerf rusa de Maurice (*Cervus timorensis russa*) est un cervidé tropical se caractérisant par une période de reproduction (rut) désaisonnée, étalée sur plusieurs mois. Son format est intermédiaire entre celui du daim (*Dama dama*) et celui du cerf rouge (*Cervus elaphus*). Son comportement de paisseur mixte lui permet de valoriser aussi bien les zones de parcours embuissonnés que les pâturages améliorés. Les principaux paramètres zootechniques attachés au cerf rusa (Whitehead, 1993) sont regroupés dans le tableau I.

Tableau I : principaux paramètres zootechniques du cerf rusa

taux de fertilité	> 90 %
gestation	260 jours
période des naissances à Maurice	avril-juin
poids moyen du faon à la naissance	3,5-4 kg
taux de sevrage	80-85 %
poids moyen au sevrage	20 kg
âge moyen au sevrage	4 mois
poids moyen des femelles matures	90 kg
poids moyen des mâles matures	120 kg

En système pâturé sans supplémentation, l'abattage du jeune mâle de 14 à 18 mois fournit une carcasse d'une trentaine de kilos avec un rendement carcasse moyen de 58 % et un rendement de découpe moyen de 72 %. La production de velours est limitée à 1,2 kg par animal, le produit étant néanmoins pauvre en lipides.

2.3. Place du Rusa dans l'élevage mondial de *Cervidae*

Il est difficile de chiffrer avec précision l'importance de l'élevage du cerf rusa dans le monde. Le tableau II est une estimation de la situation de l'élevage mondial de cerfs en 1997. Il résulte de la compilation de diverses sources (Brelurut *et al.*, 1997 ; Hudson, 1997 ; Mauritius Chamber of Agriculture, 1996).

A la lecture du tableau II, le cerf rusa représente moins de 1 % des cerfs en élevage dans le monde. Mais ces données n'ont qu'une signification économique, statistique. Si l'on s'attache à l'écologie et à la géographie de l'espèce, le rusa devient le cerf dominant voire exclusif dans tout l'archipel Indo-Pacifique.

Tableau II : données sur l'élevage mondial de *Cervidae*

Pays	Effectif	espèce et utilisation
Nouvelle-Zélande	1 400 000	principalement cerf elaphe pour la venaison et les bois
Chine	1 000 000	elaphe, wapiti et sika pour les bois
Russie	400 000	wapiti, elaphe et sika pour la venaison et les bois
Australie*	250 000	elaphe, rusa et daim pour la venaison et les bois
USA	250 000	wapiti, elaphe et daim pour la venaison et les bois
Corée	230 000	elaphe, wapiti et sika pour les bois
Allemagne	150 000	daim pour la venaison
Taiwan	128 000	elaphe, rusa et sika pour les bois
Canada	98 000	wapiti, daim et wihetail pour les bois et la venaison
Ile Maurice**	65 000	rusa pour la venaison
Eire (Irlande)	58 000	elaphe pour la venaison
Angleterre	50 000	elaphe et daim pour la venaison
Taiwan	36 000	sika, sambar et elaphe pour le velours
Suède	35 000	elaphe et daim pour la venaison
Danemark	30 000	elaphe et daim pour la venaison
France	30 000	elaphe et daim pour la venaison
Nouvelle-Calédonie**	20 000	rusa pour la venaison et le velours
Vietnam	15 000	sika pour les bois
Malaisie	15 000	elaphe, daim et rusa pour la venaison et les bois
Thaïlande	5 000	sambar, elaphe
Reunion**	3700	rusa pour la venaison
Norvège	1 000	elaphe pour la venaison

* le cheptel de rusa en Australie est principalement localisé dans le Queensland

** uniquement *Cervus timorensis rusa*

3. LA FILIERE CERF A L'ILE MAURICE

3.1. Rappel historique

Le cerf rusa (*Cervus timorensis rusa*) fut introduit à l'Ile Maurice le 8 novembre 1639 en provenance de Batavia (Java). Adriaan Van der Stel, second gouverneur hollandais de la colonie mauricienne, ayant appris que sous l'administration de son prédécesseur, Cornelius Simonsz Gooyer, les colons avaient failli mourir de faim, fit embarquer avec lui sur son bateau le *Capelle* quelques couples de cerfs. Mis en liberté au pied de la Montagne du Lion, dans la Baie du Grand Port, les animaux proliférèrent et colonisèrent rapidement l'ensemble du territoire.

Avec l'extension de la canne à sucre, les hardes de cerfs furent repoussées dans les terres marginales, impropres à toutes cultures, notamment dans la partie sud-ouest de l'île.

A partir de 1950, les populations sauvages furent graduellement clôturées et isolées formant de

vastes parcs appelés “chassés” s’étendant sur 25 000 hectares. La bonne gestion des chassés permet d’augmenter l’effectif de *Cervidae*, estimés à 65 000 têtes en 1995 (données de la chambre d’agriculture). L’exploitation traditionnelle du cerf par la chasse fournit annuellement 400 tonnes de venaison de juin à septembre.

Les premières tentatives d’élevage datent de 1976. Avec l’appui de la chambre d’agriculture mauricienne, les éleveurs se regroupèrent en 1992 en coopérative, la “Mauritius Deer Farming Co-operative Society Ltd”. Cette structure commerciale compte actuellement 10 membres et exploite un cheptel d’environ 10 000 têtes.

3.2. Cycles biologiques du cerf rusa à l’Ile Maurice

Les cycles biologiques du cerf rusa à l’Ile Maurice sont présentés sur la figure 2 (modifiée d’après Owadally and Butzler, 1972).

3.3. Importance culturelle et sociale

L’importance culturelle du cerf rusa à Maurice est forte. Il figure sur le blason du pays au même titre que le célèbre Dodo aujourd’hui disparu. Traditionnellement produite par les chassés, la viande de cerf est devenue au fil des ans un produit populaire apprécié par tous les mauriciens, quelque soit leur appartenance ethnique ou religieuse (chrétiens, musulmans ou bouddhistes). A l’époque de la chasse, l’étalage des bouchers offre ainsi aux chalands un large choix de pièces de découpe vendues en peau. La participation aux chasses est encore de nos jours un passe temps très prisé où se tissent les relations professionnelles et sociales.

3.4. Importance économique

Le secteur agricole a dégagé 6 757 millions de roupies en 1996 (Mauritius Chamber of Agriculture, 1996). L’industrie sucrière en est le principal moteur avec 69 % du PIB agricole et 42 000 emplois directs. Les productions animales ne représentent que 9 % du PIB agricole, mais font l’objet d’efforts du gouvernement pour les diversifier et en augmenter l’importance.

La filière cerf, chassés et élevages, a produit en 1996, 470 tonnes de venaison commercialisées localement pour une valeur d’environ 30 millions de roupies.

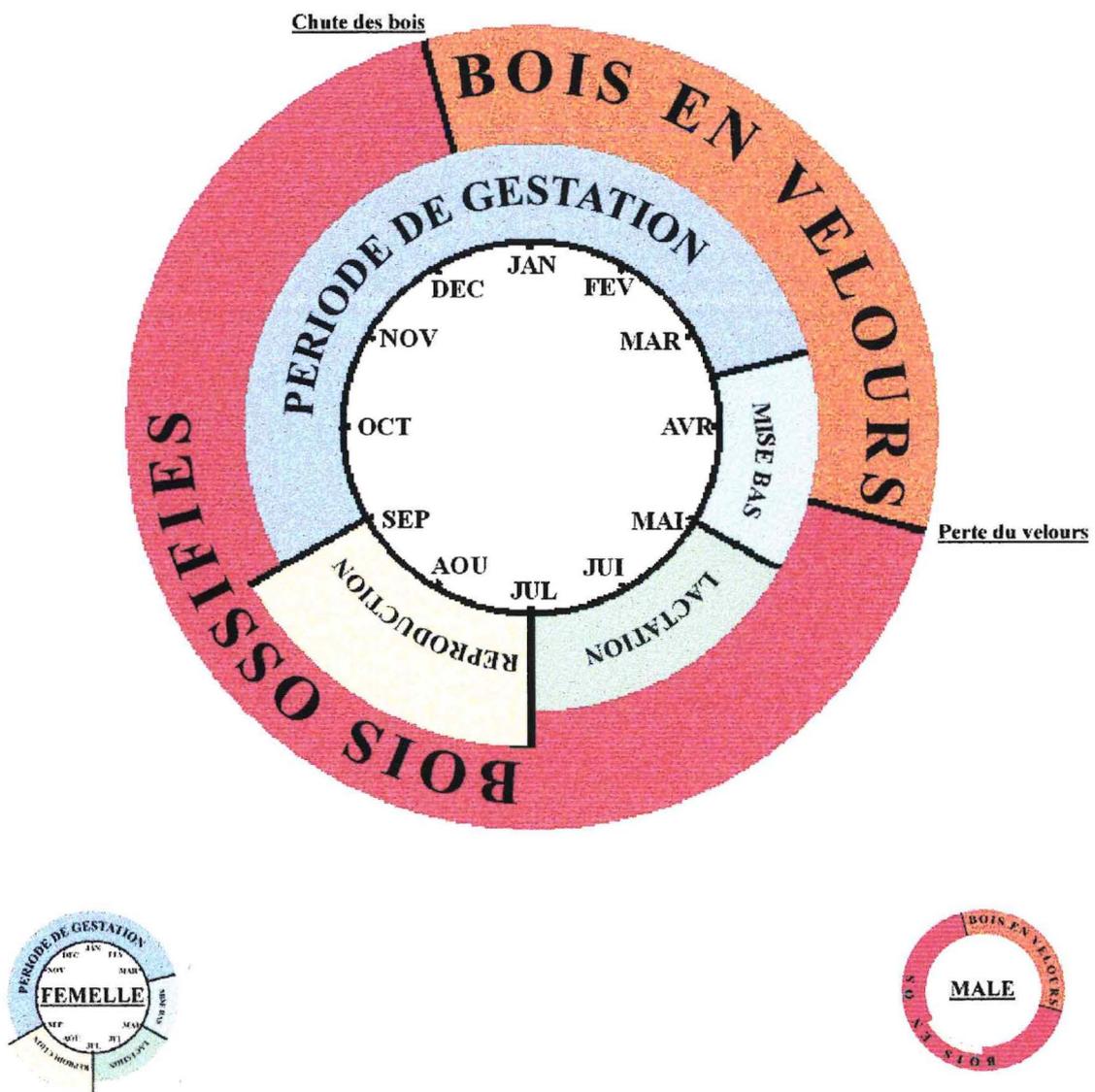


Figure 2 : cycles biologiques du cerf rusa à l'Ile Maurice

Par rapport aux autres élevages, la filière cerfs exploite le cheptel d'herbivores le plus important sur le plan numérique (tableau III) et fournit 15 % de la viande rouge consommée, importée ou produite localement. Ce ratio s'élève à 34 % si l'on ne considère que la production locale (Mauritius Chamber of Agriculture, 1996).

Tableau III : comparaison bovins/cerfs à l'île Maurice

	bovins	cerfs
effectif (têtes) ¹	7 621	65 000
production (tonnes) ²	755	450
Importations (tonnes) ²	1 672	0

¹ membres de la « Mauritius Meat producers Association (MMPA)»

² carcasses fraîches

4. Problématique génétique

Plusieurs motivations sont à l'origine d'une investigation génétique du cheptel de cerfs rusa en élevage à l'île Maurice.

C'est d'abord l'histoire particulière et fragmentaire de l'introduction du cerf en novembre 1639. Combien d'animaux fondateurs ont été introduits ? Quelle était la composition de ce petit groupe d'animaux débarqués (mâles, femelles, juvéniles) ? De quelle île de l'archipel indonésien étaient-ils issus ? Le livre de bord parle de l'île de Batavia (actuelle Java) mais celle-ci constituait à l'époque le cœur marchand et économique de l'archipel, il est donc impossible de garantir Java comme terre d'origine des cerfs rusa de Maurice. Ces questions donnent naissance à la première problématique qui vise à la caractérisation génétique du cerf rusa Mauricien. Il est évident que pour répondre à une telle question, il faut pouvoir comparer le rusa mauricien avec différentes populations de l'archipel Indo-Pacifique et pour cela disposer d'outils de comparaison. C'est dans cette perspective que se place le travail de DEA avec une approche de mise au point de conditions PCR pour des séquences microsatellites dérivées de bovins.

C'est ensuite la volonté des éleveurs mauriciens de mieux connaître le niveau de variabilité génétique de leur cheptel en vue de mettre en place une politique d'amélioration génétique de leurs animaux par l'application de schémas de sélection ou l'importation de cerfs. Deux éléments particuliers ont motivé cette deuxième problématique :

- le constat par les éleveurs d'une différence de morphologie entre les cerfs élevés sur la côte ouest et ceux de la côte est, ces derniers semblant plus lourds et plus grands.

- l'existence de cerfs possédant des tâches blanches sur la tête, voire occasionnellement la naissance d'animaux albinos (société de la Palmyre, Constance et la Gaieté SE Co Ltd). Un tel phénotype est normalement complètement absent chez le rusa. Le traitement réservé à ces animaux varie selon les éleveurs. Certains les éliminent systématiquement considérant qu'il s'agit de tares alors que d'autres les conservent pour diverses raisons : l'animal à tâche blanche permettant un repérage facilité du troupeau est l'argument le plus souvent invoqué.

Afin de répondre à ces interrogations, 3 objectifs préliminaires ont été définis dans le cadre du DEA :

- recherche de microsatellites polymorphes chez le cerf rusa à partir de microsatellites conservés entre *Bovidae* et *Cervidae*,
- estimation de la variabilité génétique dans les élevages membres de la «Deer Farming Co-operative Society Ltd» situés sur la côte ouest et dans leurs homologues de la côte est.

L'étude de la variabilité génétique des populations de cerfs rusa de l'Ile Maurice pouvait être envisagée avec différentes techniques faisant appel à des marqueurs spécifiquement différents (tableau IV). Dans ces conditions, pourquoi utiliser les microsatellites préférentiellement à des techniques moins coûteuses telles que le polymorphisme des isoenzymes ou des RAPD ?

La population de cerfs rusa mauriciens dérive d'un faible effectif d'animaux fondateurs. L'hypothèse de départ est donc une population très consanguine, peu polymorphe avec des distances faibles entre les isolats. Le caractère hyperpolymorphe des marqueurs microsatellitaires est donc indiqué dans ce cas. Dans une étude comparative des marqueurs moléculaires employés en biologie des populations, Jarne et Lagoda (1996) retiennent un polymorphisme des microsatellites 10 à 20 fois plus élevé que pour les isoenzymes ou les RAPD. Les microsatellites autorisent également la mise au point d'un système de contrôle de filiation très intéressant dans une optique d'amélioration génétique du cheptel mauricien.

Tableau IV : comparaison des outils moléculaires

RAPD : random amplified polymorphic DNA, RFLP : restriction fragment length polymorphism, SSCP : single strand conformation polymorphism, indel : insertions-délétions. -, +, ++, +++ correspondent à inapproprié, correct, efficace, très efficace.

	Allozymes	RAPDs	Site de restriction (RFLP)	SSCPs	Micro- et mini-satellites multilocus	Microsatellites
Principe	révélation d'enzymes par migration	amplification avec des amorces aléatoires	amplification si PCR - RFLP, enzyme de restriction et hybridation	changement de conformation visible sur gel	digestion et hybridation avec des sondes micro- ou mini-satellites	amplification avec des amorces spécifiques
Type de polymorphisme	variation de charge électrique	indel & mutations ponctuelles	indel & mutations ponctuelles	mutation ponctuelle	nombre de copies ou indels	nombre de répétitions
Conditions d'électrophorèse	amidon	agarose	agarose ou polyacrylamide	polyacrylamide	agarose	agarose ou polyacrylamide dénaturant
Polymorphisme	+	++	++	+	+++	+++
Dominance	codominant	dominant	codominant	codominant	dominant	codominant
Séquence d'ADN connue	/	non	non/oui	oui	non	oui
Radioactivité	non	non	oui/non	non	oui	oui/non
Coût d'utilisation	faible	faible/moyen	moyen	faible	moyen	fort
Coût de développement	faible	faible	moyen	moyen	moyen	fort
<u>Applications :</u>						
Système de reproduction	++	-/++	+	++	+++	+++
Diversité / populations subdivisées	++	+	+++	++	+	+++
Paternité	+	+/-	+	++	+++	+++
Apparentement / Socialité	+	+/-	+	++	+ / ++	+++
Variation géographique	++	+	++	++	++	++
Zones hybrides	++	+++	+++	++	-	+
Phylogénie	-	-	+++	-	-	-

D'après Rafalsky Tingey (1993) et Hillis *et al.* (1996)

5. Structure et propriétés des microsatellites

5.1. Définition

Les microsatellites sont des séquences d'ADN génomique de 1 à 5 paires de bases répétées en tandem (10 à 50 copies). Ils peuvent être parfaits (pas d'interruption dans les séquences), interrompus (une ou plusieurs répétitions séparées par quelques bases) ou composés (une séquence répétée suivie d'une autre séquence répétée) (Weber, 1990), comme illustré dans la séquence de dinucléotides ci-dessous :

parfait	CACACACACACACACACA
composé	CACACACACAGAGAGAGA
interrompu	CACATTCACACATTCATCA

Toute combinaison est possible parmi ces 3 groupes. Les répétitions de di- tri-, tétranucléotides sont les plus couramment employées. Les microsatellites sont dispersés dans tout le génome des eucaryotes (Tautz and Renz, 1984).

5.2. Origine, évolution et rôle des microsatellites

Les mécanismes à l'origine des séquences microsatellites sont, soit un phénomène de glissement lors de la réplication, soit un crossing-over inégal. Le principal mécanisme impliqué serait le glissement lors de la réplication ou lors de la réparation de l'ADN (Tautz *et al.*, 1986). Le rôle des séquences répétées, s'il existe, n'est pas établi.

5.3. Propriétés des marqueurs microsatellites

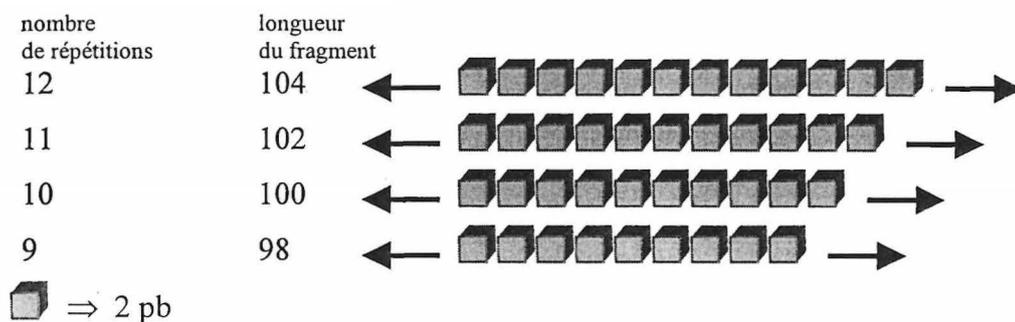
Les microsatellites ont des propriétés intéressantes pour la génétique des populations :

- ils sont supposés neutres,
- ils sont codominants,
- leur taux de mutation est estimé entre 10^{-4} et 5.10^{-6} (Edwards *et al.*, 1992 ; Dallas, 1992),

- ils suivent un schéma de transmission mendélien,
- ils sont très polymorphes (polymorphisme de longueur),
- leur localisation chromosomique peut être détectée,
- leur analyse par PCR ("Polymerase Chain Reaction") permet de travailler sur de petites quantités de matériel biologique,
- les amorces développées pour une espèce peuvent parfois être transférées à des espèces apparentées (Moore *et al.*, 1991).

5.4. Polymorphisme

Les microsatellites présentent un polymorphisme de longueur dû aux variations du nombre d'unités répétées. Un allèle correspond à un nombre de répétitions (en théorie) et à une taille d'amplification (en pratique). Sur l'exemple ci-dessous, les amorces et les séquences flanquantes font 80 paires de bases.



Le nombre d'allèles à un locus donné est variable (1 à 50) mais généralement important. Les allèles sont identifiés par migration sur un gel d'électrophorèse après amplification spécifique par PCR.

Il est important de noter que le polymorphisme observé peut ne pas correspondre au véritable génotype de l'individu étudié. En effet des allèles nuls, c'est à dire des allèles pour lesquels la zone d'insertion de l'amorce a subi une mutation, une délétion ou une insertion (Callen *et al.*, 1993 ; Koorey *et al.*, 1993) empêchent l'amorce correspondante de se fixer. Le brin n'est donc pas amplifié et l'individu paraît faussement homozygote.

5.5. Applications

Au delà de la biologie des populations, les microsatellites sont employés dans de nombreux domaines :

- cartographie du génome (Hearne *et al.*, 1991 ; Hearne *et al.*, 1992 ; Weissenbach, 1993 ; Bowcock *et al.*, 1994 ; Hughes, 1993 ; Bell and Ecker, 1994 ; Dib and al., 1996)
- génétique humaine : en tant que marqueurs de maladies génétiques (syndrome du chromosome X fragile par exemple (Wrogemann *et al.*, 1993 ; Sutherlands and Richards R. I., 1995 ; Nawrotzki *et al.*, 1996) ou en médecine légale (autopsie, identification de paternité Holland *et al.*, 1993 ; Jin *et al.*, 1995).

Leur utilisation en biologie et génétique des populations est allée grandissante depuis 1992, comme en témoigne le nombre croissant de synthèses consacrées à ce sujet (Bruford and Wayne, 1993 ; Ashley and Dow, 1994 ; Schlötterer and Pemberton, 1994 ; Jarne and Lagoda, 1996). Ces marqueurs ont été développés chez des organismes très divers (végétaux : Kijas *et al.*, 1995 ; Powell *et al.*, 1995 ; levures, protistes, virus : Field and Wills, 1996 ; insectes : Hughes and Queller, 1993 ; Estoup *et al.*, 1993 ; Gertsch *et al.*, 1995) ; mammifères : Paetkau *et al.*, 1995 ; Amos *et al.*, 1993 ; Ellegren *et al.*, 1996 ; oiseaux : Ellegren *et al.*, 1995 ; Primmer *et al.*, 1996). Les microsatellites sont utilisés en particulier pour l'analyse des structures sociales et d'apparentement entre les individus (Queller *et al.*, 1993 ; Blouin *et al.*, 1996), mais aussi pour l'analyse de la structure génétique des populations d'espèces menacées ou ayant subi des goulets d'étranglement, c'est à dire de populations caractérisées par un faible polymorphisme.

6. MATERIELS ET METHODES

6.1. Matériel biologique

6.1.1. Echantillonnage des « feed-lots »

Le prélèvement des échantillons de sang dans les élevages a été réalisé au cours d'un mois de mission en début de stage (07 avril-07 mai). Le détail du déroulement de la mission est indiqué en annexe 3. Les échantillons sanguins ont été ramenés au laboratoire PATHOTROP du CIRAD-EMVT. C'est dans ce laboratoire qu'a été menée l'ensemble de l'analyse génétique.

De façon à répondre à la seconde problématique définie plus haut (structuration des populations de cerfs entre les élevages de la côte ouest et ceux de la côte est), il a été décidé de prélever le même nombre d'échantillons sur la côte ouest (60 prélèvements) et sur la côte est (60 prélèvements). Huit « feed-lots » ont été échantillonnés sur les 10 que compte la « Mauritius Deer

Farming Co-operative Society Ltd ». Les 4 « feed-lots » écartés l'ont été pour au moins une des raisons suivantes :

- absence d'une structure de contention («deer yard») au sein de la ferme, permettant de manipuler les animaux,
- pas de séparation nette des cerfs d'élevage de ceux des chassés. Certains élevages relâchent tous leurs animaux dans le chassé avant la saison de chasse.

Au sein de chaque « feed-lot », l'échantillonnage a été réalisé de façon aléatoire parmi le cheptel à l'exception des femelles gestantes afin de ne pas risquer de perdre le faon. La mission coïncidant avec la période de mise bas, il a été tenu compte de l'état d'avancement de la gestation des femelles, celui-ci étant légèrement différent selon les élevages.

Deux campagnes de prélèvement ont été planifiées : une sur la côte ouest et une sur la côte est. Les animaux sélectionnés sont rassemblés dans le «deer yard» avant l'arrivée du vétérinaire. Trois échantillons sanguins sont prélevés sur chaque animal et conservés dans des vacutainers (3 ml dans un vacutainer avec EDTA, 5 ml dans un vacutainer hépariné et 5 ml dans un vacutainer sans additif). Les vacutainers sont conservés à +4°C sur le terrain et lors du transport depuis l'île Maurice jusqu'au laboratoire de destination à Montpellier. Chaque animal est identifié par une fiche de données morphologiques.

6.1.2. Echantillonnage des chassés

Les prélèvements dans les chassés ont été effectués au cours de la saison de chasse débutant le premier week-end de juin et envoyés à Montpellier, au laboratoire PATHOTROP du CIRAD-EMVT. Le sous-comité cerfs de la « Mauritius Meat Producers Association » qui regroupe les producteurs de viande des chassés, a identifié les exploitants désireux de participer à l'opération. Parmi ces derniers, 10 chassés ont été choisis de façon à obtenir une bonne couverture géographique de l'île Maurice (figure 3). Quarante prélèvements ont été réalisés dans ces 10 chassés. Le déroulement de la campagne de prélèvement de sang est présenté en annexe 2.

6.1.3. Traitement des échantillons au laboratoire

Les vacutainers héparinés sont stockés à +4°C en vue d'une utilisation ultérieure pour une étude de polymorphisme des protéines sériques.

Les vacutainers sans additif sont également stockés à + 4°C.

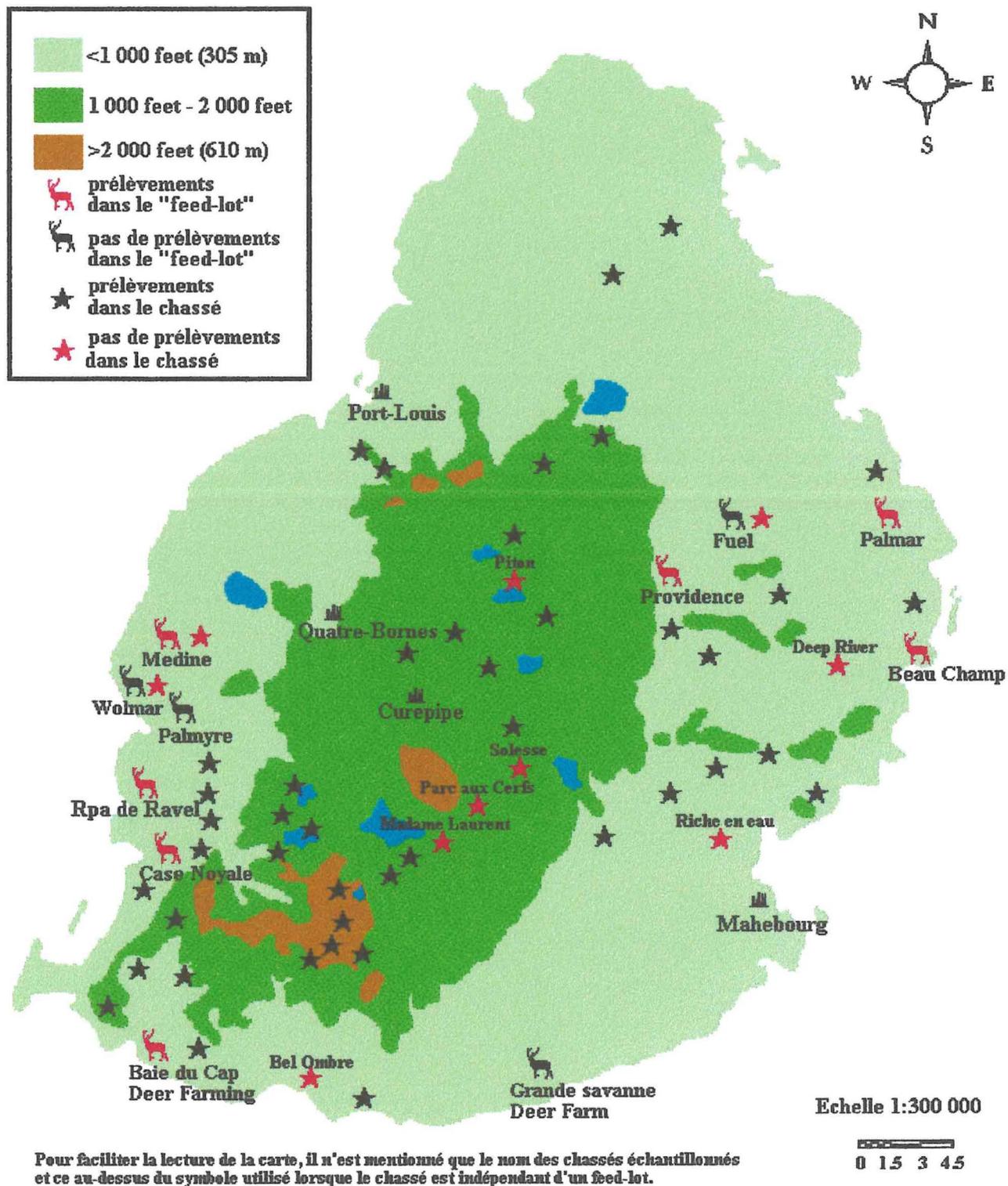


Figure 3 : carte des prélèvements

Les vacutainers avec EDTA issus des prélèvements en «feed-lots» sont utilisés pour l'extraction de l'ADN.

Les vacutainers avec EDTA issus des chassés sont traités de façon à conserver les leucocytes . Ils sont centrifugés à 1 500 rpm pendant 15 min afin de séparer les différentes phases sanguines. Le plasma est aliquoté dans un tube eppendorf et conservé à -20°C. Les erythrocytes sont aliquotés dans un second eppendorf et conservés à -80°C. Un troisième tube eppendorf est préparé avec 300 µl de la phase intermédiaire contenant les leucocytes («buffy coat») et 700 µl d'eau stérile. Le tube est centrifugé à 2 500 rpm pendant 10 min. Le surnageant est éliminé. Si le culot de leucocytes est bien propre, il est conservé à -20 °C. Dans le cas contraire, il est repris avec 300 µl d'eau stérile et de nouveau centrifugé.

6.1.4. Extraction / purification de l'ADN génomique

L'ADN est extrait à partir de 300 µl de sang total des vacutainers avec EDTA. L'extraction est réalisée avec un kit de purification Promega («Wizard® Genomic DNA Purification Kit»). Plusieurs étapes sont nécessaires à l'extraction (lyse des erythrocytes, précipitation des protéines, lyse des leucocytes, rinçage et réhydratation de l'ADN). Le protocole d'extraction est détaillé en annexe 1.

6.1.5. Quantification de l'ADN

Une estimation de la quantité d'ADN extrait est obtenue par migration sur gel d'agarose 1 %. Un µl de la solution d'ADN réhydraté est déposé avec une gamme étalon de solutions d'ADN de concentrations connues (10, 25, 50 µg/µl). L'intensité des bandes obtenues est comparée en électroluminescence. Le résultat, constant pour tous les échantillons, a été une concentration d'ADN de 25 µg/µl.

6.1.6. Choix des microsatellites dérivés bovins / cerfs

Moore et ses collaborateurs ont montré en 1991 qu'il existait une conservation importante des microsatellites dinucléotidiques au sein du génome des mammifères (Moore *et al.*, 1991). De nombreux travaux se sont attachés à caractériser le degré de conservation des microsatellites au

sein de groupes à fort intérêt zootechnique, notamment chez les *Pecora*. Si une grande quantité d'informations est disponible pour les bovins, ovins, caprins, un certain nombre d'études ont également été entreprises chez les *Cervidae*. Ainsi, Kuhn a testé le transfert de 27 microsatellites bovins sur le cerf elaphe. Quatorze produits d'amplification ont été obtenus, tous polymorphes (Kuhn *et al.*, 1996). Engel a testé 12 microsatellites sur un panel de 6 *Cervidae* dont 40 % des essais ont donné des produits d'amplification (Engel *et al.*, 1996).

Les recherches de Slate ont également montré que les microsatellites bovins étaient hautement conservés chez le cerf elaphe (*Cervus elaphus*), le cerf sika (*Cervus nippon*) et le mouton soay (*Ovis aries*) (Slate *et al.*, 1998). Sur 174 microsatellites testés, 129 (74,1 %) ont donné une amplification chez le cerf elaphe. Parmi ceux-ci, 72 (55,8 %) se sont avérés polymorphes. Chez le cerf sika, c'est 126 sur 171 (73,3 %) produits d'amplification PCR dont 47 (37,3 %) polymorphes. Les résultats apparaissent supérieurs à ceux obtenus précédemment. Ceci est lié en partie à la sélection opérée par les auteurs (microsatellites choisis d'après leur simplicité d'utilisation et leur haut degré de polymorphisme chez les bovins) mais aussi certainement à l'effort réalisé par les auteurs en termes d'optimisation des réactions de PCR. Une grande variété de conditions expérimentales ont été essayées incluant l'ajustement des concentrations de chlorure de magnésium et le test des effets du diméthyl sulphoxide (DMSO) et du tétraméthylammonium chloride et formamide (TMACIDE). (Parmi les études citées plus avant, seul Kuhn a optimisé les conditions de PCR pour toutes les amorces testées ; Kuhn *et al.*, 1996). Aucun travail de ce type n'a jamais été entrepris chez le cerf rusa mais les résultats exposés ci-dessus permettaient de supposer une situation similaire chez le rusa ; les distances évolutives entre les bovins et le cerf elaphe d'une part et entre les bovins et le cerf rusa d'autre part, étant du même ordre (Modi *et al.*, 1996).

Les travaux de Slate étant les plus complets (Slate *et al.*, 1998), nous avons utilisé ces résultats pour choisir les microsatellites à tester. Nous avons sélectionné 9 microsatellites en fonction de leur haut degré de polymorphisme rencontré chez le cerf elaphe et le cerf sika (tableau IV).

Tableau IV : microsattellites choisis pour l'étude

microsattellites bovins	localisation chromosomique chez le bovin	taille des allèles (bp) chez le bovin	allèles Chez le cerf elaphe	allèles chez le cerf sika	références
ABS12	26	133-147	9	4	(Pfister-Genskow <i>et al.</i> , 1995)
BM2934	14	81-103	6	4	(Bishop <i>et al.</i> , 1994)
CSSM041	22	130-140	6	4	(Moore <i>et al.</i> , 1994)
IDVGA55	18	195	7	4	(Mezzelani <i>et al.</i> , 1995)
ILSTS6	7	283-295	9	2	(Brezinsky <i>et al.</i> , 1993)
INRA40	2	205-230	8	5	(Vaiman <i>et al.</i> , 1994)
TGLA57	1	80-104	1	1	(Georges and Massey, 1992)
TGLA122	21	135-181			(Georges and Massey, 1992)
TGLA 126	20	109-127	1	2	(Georges and Massey, 1992)

 transfert jamais essayé auparavant

A ce premier choix nous avons associé des microsattellites d'un kit commercial bovin dont nous disposions (kit Stockmarks™), TGLA 57, TGLA 122 et TGLA 126. Seul TGLA122 n'avait pas été testé par Slate et ses collaborateurs.

6.1.7. Amplification des microsattellites

L'amplification de l'ADN microsattellitaire est obtenue par la technique de la PCR non radioactive. Le protocole général de la réaction est présenté en annexe 1.

6.1.8. Polymorphisme électrophorétique

Afin de vérifier le bon déroulement de la réaction de PCR, les produits d'amplification sont déposés sur un gel de contrôle. Six microlitres de volume réactionnel sont ainsi déposés avec 2 µl de tampon de charge (bleu de bromophénol) sur un gel d'agarose 2 % contenant 0,5 µg/ml de bromure d'ethidium. Après migration à 2 volts/cm pendant une heure, les produits d'amplification sont révélés et photographiés sous illumination UV (254 nm).

Pour une discrimination complète des allèles, les produits d'amplification sont migrés sur un gel de polyacrylamide 10 % dont le protocole est donné en annexe 1. Cette concentration en acrylamide permet l'analyse de fragments de 10 à 200 pb. L'intensité des bandes obtenues sur gel d'agarose a permis d'estimer la quantité de produit à déposer sur gel de polyacrylamide. En général, 15 µl du volume réactionnel sont déposés avec 3 µl de tampon de charge. Les conditions d'électrophorèse (voltage et durée de migration) varient avec la taille des allèles.

Après électrophorèse, les gels sont colorés dans une solution de TBE 1X et photographiés sous UV.

6.2. Analyse génétique des populations

6.2.1. Statistiques F de Wright

La méthode la plus largement utilisée pour l'analyse de la structuration génétique des populations est celle développée par Wright afin d'estimer la variance standardisée des fréquences alléliques entre les sous-populations (Wright, 1951 ; Wright, 1965). Wright a développé un ensemble d'outils mathématiques, les statistiques F , permettant de décrire la répartition de la variabilité génétique entre et au sein des populations. Trois coefficients sont utilisés pour distribuer la variabilité génétique au niveau d'un ensemble de populations :

- F_{is} mesure la valeur de la déviation relative de la sous-population s par rapport à une hétérozygotie attendue sous panmixie.
- F_{st} mesure la différenciation génétique entre les populations. Il donne le déficit en hétérozygotes issu de la structuration en sous-populations et exprime ainsi les différences de fréquences alléliques entre les sous-populations.
- F_{it} mesure le déficit en hétérozygotes global pour l'ensemble de la population.

Une différence entre F_{is} et F_{st} est due à une différence de fréquences alléliques entre les différentes populations (effet Wahlund).

6.2.2. Estimateurs de Weir et Cockerham

Différentes méthodes d'estimation ont été développées pour estimer les paramètres F_{is} , F_{st} et F_{it} : le paramètre G_{st} , estimateur de F_{st} de Nei (1973), les paramètres f , F et θ de Weir et Cockerham (Cockerham, 1969 ; Weir and Cockerham, 1984). Ces auteurs ont montré la correspondance entre les paramètres F de Wright et les composantes de la variance des fréquences alléliques dans des populations structurées.

Trois nouveaux paramètres, égaux respectivement à F_{st} , F_{is} et F_{it} peuvent être estimés par le biais d'une analyse de variance :

- θ la corrélation des allèles de différents individus dans une même sous-population,
- f la corrélation des allèles d'un même individu dans une sous-population donnée,

- F la corrélation des allèles au sein des individus sur l'ensemble des sous-populations.

On considère un modèle à r sous-populations de même taille dérivées d'une population ancêtre à l'équilibre de Hardy-Weinberg et en équilibre de liaison, les sous-populations sont supposées n'avoir différées les unes des autres que sous l'effet de la dérive génique et de la dérive d'échantillonnage.

Pour le cas d'un locus à 2 allèles, les composantes de la variance sont :

- σ_w^2 la composante de la variance au sein des individus,
- σ_b^2 la composante de la variance au sein des populations,
- σ_a^2 la composante de la variance entre les sous populations.

Les estimateurs des paramètres f , F et θ sont :

$$F = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma_a^2 + \sigma_b^2 + \sigma_w^2} \quad \theta = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_b^2 + \sigma_w^2} \quad f = \frac{\sigma_w^2}{\sigma_b^2 + \sigma_w^2}$$

Le cas simple d'un locus à 2 allèles a été présenté jusqu'ici. Lorsque l'on a plus de 2 allèles, une analyse de variance hiérarchique est réalisée pour chaque allèle, ce qui donne pour chacun un estimateur F_i , f_i ou θ_i . Pour calculer l'estimateur sur l'ensemble du locus, Weir et Cockerham proposent la moyenne des F_i , f_i ou θ_i pondérés par $p_i(1-p_i)$ où p_i est la fréquence allélique de l'allèle i (Weir and Cockerham, 1984). On notera ici ces estimateurs F_{wc} , f_{wc} et θ_{wc} .

6.2.3. Outils informatiques

Deux logiciels ont été utilisés :

- FSTAT (version 1.2) (Goudet, 1995)
- GENEPOP (version 3.2) (Raymond and Rousset, 1995)

6.2.3.1. Utilisation du logiciel FSTAT

FSTAT calcule les estimateurs de Weir et Cockerham (F_{wc} , f_{wc} et θ_{wc}). Il génère ensuite une distribution théorique de ces estimateurs sous l'hypothèse nulle ($H_0 : F_{wc}, f_{wc}$ ou $\theta_{wc} = 0$), par un système de permutations (de 200 à 15 000) :

- des allèles à l'intérieur des échantillons pour f_{wc} ,

- des allèles entre les échantillons pour F_{wc} ,
- des allèles ou des génotypes entre les échantillons pour θ_{wc} .

FSTAT effectue des tests unilatéraux dans le sens où :

- H_0 est « l'estimateur est égal à 0 »,
- H_1 est « l'estimateur est supérieur à 0 ».

La probabilité d'obtenir par chance une valeur égale ou supérieure à celle observée est donnée, c'est à dire la probabilité de se tromper en rejetant l'hypothèse nulle si elle est vraie (risque de première espèce). Plus exactement, c'est un intervalle de probabilités qui est donné entre la probabilité d'obtenir strictement des valeurs supérieures à l'estimateur observé et la probabilité d'obtenir des valeurs supérieures ou égales à l'estimateur observé. L'écart entre ces probabilités renseigne sur la qualité de l'information analysée.

6.2.3.2. Utilisation du logiciel GENEPOP

Nous avons utilisé plusieurs options de la version 3.2 du logiciel GENEPOP :

- le test du déséquilibre de liaison (option 2.1). Il est basé sur la formation de tableaux de contingence avec les génotypes d'un locus en ligne et d'un autre locus en colonne. Tous ces tableaux sont créés par GENEPOP pour toutes les paires de loci dans chaque population et sont analysés avec la méthode des chaînes de Markov (Guo and Thompson, 1992) pour estimer sans biais la probabilité exacte de se tromper en rejetant l'indépendance statistique des 2 loci testés.
- Le test du déficit en hétérozygotes (option 1.1 pour chaque locus dans chaque population et option 1.4 pour le test global). C'est le même principe que celui de FSTAT. L'estimateur est calculé et une distribution théorique est générée. Mais dans ce cas, l'estimateur utilisé est celui de Roberston et Hill : f_{rh} et cette distribution est obtenue grâce à la méthode des chaînes de Markov (au lieu des permutations). En répétant l'opération plusieurs fois, on obtient plusieurs valeurs pour l'estimation de la probabilité exacte ce qui permet d'en calculer une moyenne et un écart-type.
- Le test de différenciation allélique (option 3.1). Des tableaux de contingence sont créés avec en ligne les allèles et en colonne les sous-populations. Comme précédemment, la probabilité exacte du test de Fisher est estimée grâce à la méthode des chaînes de Markov.

7. RESULTATS

7.1. Microsatellites

Sur les 9 microsatellites testés, 7 ont amplifié l'ADN du cerf rusa parmi lesquels 3 se sont avérés polymorphes. Les résultats détaillés pour chaque microsatellite testé sont rassemblés dans le tableau V. Deux loci polymorphes (ABS12 et TGLA57) ont été utilisés pour l'étude de génétique des populations. INRA40 a été écarté car une optimisation insuffisante des conditions PCR n'a pas permis une discrimination suffisante des allèles après électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Six allèles ont été détectés pour le locus ABS12, avec des tailles comprises entre 139 et 163 pb. TGLA57 a donné 3 allèles (88-90 pb).

Tableau V : résultats obtenus pour les microsatellites testés

microsatellites bovins	amplification PCR	température d'hybridation	polymorphisme	nombre d'allèles détectés
ABS12	oui	55°C	polymorphe	6
BM2934	oui	55°C	monomorphe	1
CSSM041	non	55-60°C		
IDVGA55	oui	55°C	monomorphe	1
ILSTS006	non	55-60°C		
INRA40	oui	65°C	polymorphe	au moins 4
TGLA 57	oui	55°C	polymorphe	3
TGLA122	oui	55°C	monomorphe	2
TGLA 126	oui	55°C	monomorphe	1

7.2. Analyse génétique des populations

Les résultats présentés dans ce rapport sont ceux obtenus pour les « feed-lots », les analyses effectuées sur les prélèvements issus des chassés n'étant pas encore disponibles.

7.2.1. Fréquences alléliques

Les fréquences alléliques calculées pour les 2 loci et pour chacun des « feed-lots » échantillonnés sont présentés sur les figures 4 et 5.

Les allèles y sont désignés par leur taille respective en pb.

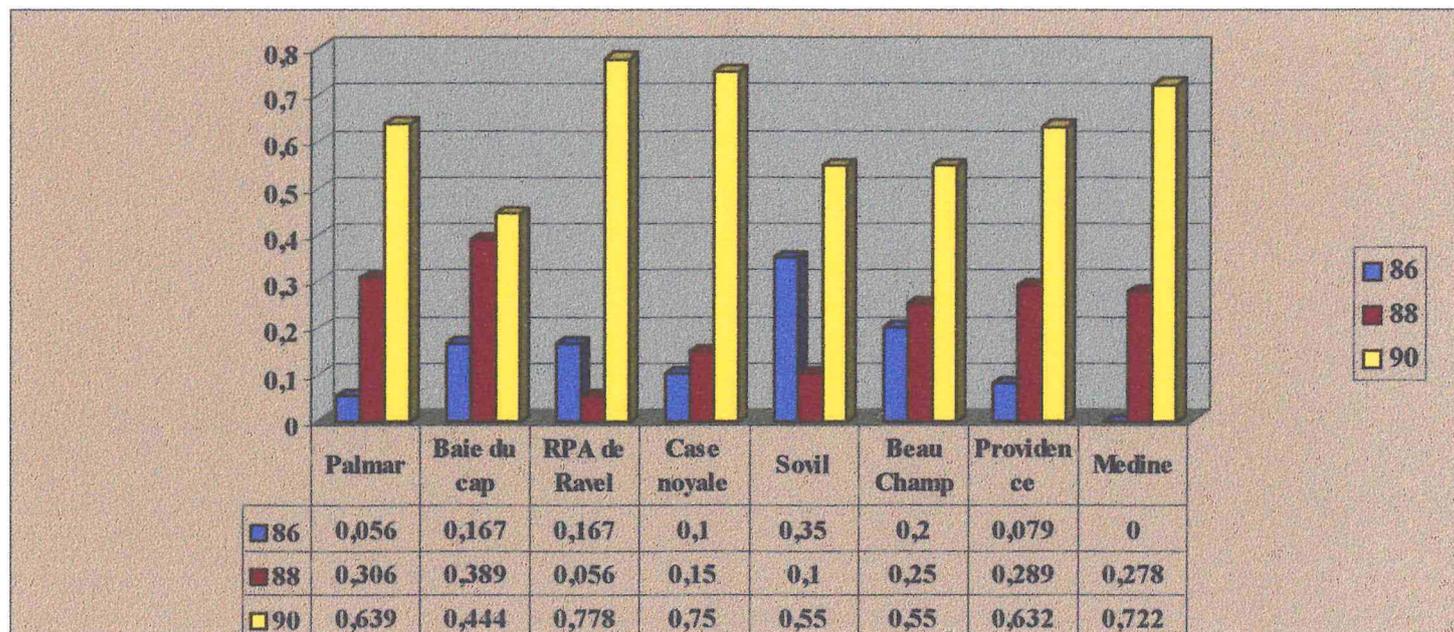


Figure 4 : fréquences alléliques pour le locus TGLA57 dans chacun des « feed-lots »

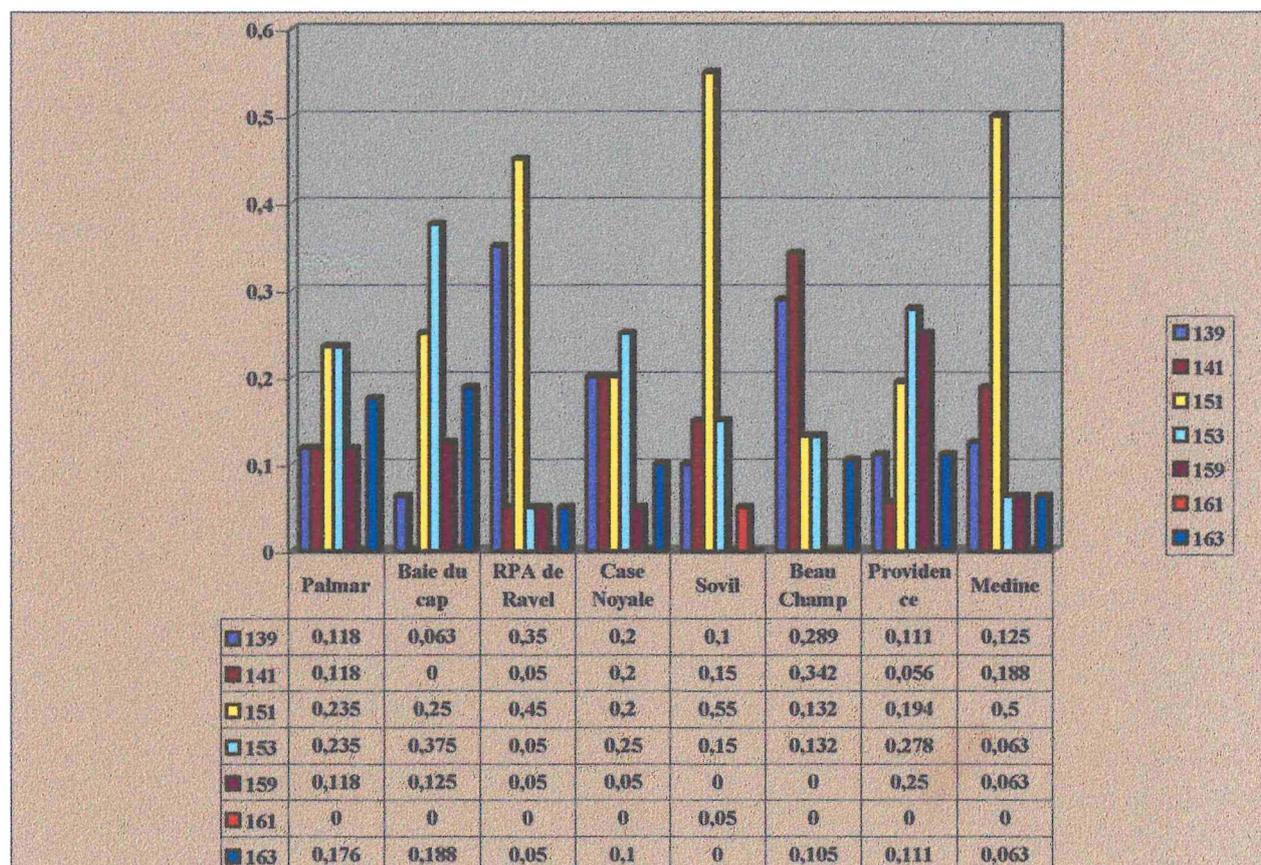


Figure 5 : fréquences alléliques pour le locus ABS12 dans chacun des « feed-lots »

7.2.2. Equilibre de Hardy-Weinberg

Le test de déviation par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg (Hardy, 1908 ; Weinberg, 1908) a été réalisé à partir des options 1.1 et 1.4 du logiciel GENEPOP. Ces 2 options permettent de tester la significativité de l'estimateur du F_{is} pour chaque locus dans chacun « des feed-lots » puis pour l'ensemble des loci dans chacun des « feed-lots ». Les résultats sont rapportés dans le tableau VI.

Tableau VI : test de l'estimateur du F_{is}

Feed-lot	Locus	f_{wc}	Probabilité	S.E.
Palmar	TGLA57	-.093	.7548	/
	ABS12	-.123	.8012	.0044
	Les deux		.7753	.0088
Baie du cap	TGLA57	-.191	.8771	/
	ABS12	+.056	.4564	.0058
	Les deux		.6516	.0054
RPA de Ravel	TGLA57	+.143	.3412	/
	ABS12	-.306	.9853	.0026
	Les deux		.9182	.0083
Case Noyale	TGLA57	-.184	1	/
	ABS12	-.192	1	.0000
	Les deux		1	.0000
Sovil	TGLA57	-.189	.0826	/
	ABS12	+.115	.2782	.0060
	Les deux		.0903	.0049
BeauChamp	TGLA57	-.152	.8505	/
	ABS12	+.049	.5570	.0061
	Les deux		.7505	.0057
Providence	TGLA57	-.003	.6157	/
	ABS12	-.231	1	.0000
	Les deux		.9787	.0018
Medine	TGLA57	+.226	.5294	/
	ABS12	-.024	.7431	.0082
	Les deux		.5290	.0105

L'hypothèse nulle de panmixie n'est jamais rejetée pour aucun « feed-lot » que l'on s'intéresse aux loci séparément ou bien ensemble.

7.2.3. Déséquilibre de liaison

Les résultats du test d'un déséquilibre de liaison entre les 2 loci pour chaque « feed-lot » sont présentés dans le tableau VII. Le test a été réalisé avec l'option 3.1 du logiciel GENEPOP. L'hypothèse nulle est l'indépendance statistique des loci testés.

Tableau VII : résultats du test du déséquilibre de liaison

Feed-lot	Probabilité (P)	S.E.
Palmar	0.81754	0.00750
Baie du cap	0.88841	0.00287
RPA de Ravel	0.87513	0.00427
Case Noyale	0.68144	0.00543
Sovil	0.83212	0.00335
Beau Champ	0.70408	0.00747
Providence	0.83622	0.00659
Medine	0.57480	0.00521

La probabilité de se tromper en rejetant l'hypothèse nulle est très forte quelle que soit le « feed-lot » ainsi que sur l'ensemble des individus de tous les « feed-lots » ($P=0,99850$). Il n'y a pas de déséquilibre de liaison détecté pour les loci ABS12 et TGLA57.

7.2.4. Structuration des « feed-lots » entre la côte ouest et la côte est

L'analyse s'est faite à partir de 2 regroupements :

- regroupement des « feed-lots » de la côte ouest (Baie du cap Deer farming, Société Rpa de Ravel, Case Noyale (Bel Ombre SE), Medine et Sovil,
- regroupement des « feed-lots » de la côte est (Palmar, Providence, Beau Champ).

Le test est réalisé avec l'option 3.1 du logiciel GENEPOP pour chacun des loci et avec le logiciel FSTAT pour l'ensemble des loci. Les résultats de significativité du F_{st} sont donnés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : test de structuration des « feed-lots »

Locus	P (GENEPOP)	S.E.	P(FSTAT)
TGLA57	0.59766	0.00384	[0.42920 ; 0.42840]
ABS12	0.19135	0.00509	[0.08600 ; 0.08600]
Les deux			[0.17140 ; 0.17120]

Les hypothèses nulles (H_0 : pas de différenciation génique pour GENEPOP et $H_0 : F_{st} = 0$ pour FSTAT) ne sont rejetées par aucun des tests. Aucune structuration des « feed-lots » n'est détectée entre la côte ouest et la côte est.

8. DISCUSSION

8.1. Les microsatellites dérivés

Des amorces réalisées avec des séquences obtenues par balayage d'une banque génomique d'une espèce peuvent-elles être utilisées avec succès sur d'autres taxons ? La réponse est conditionnée par 2 éléments : la stabilité des loci répétés au travers de l'évolution et les taux d'évolution des séquences flanquant la répétition. L'inconvénient majeur des études par microsatellites réside dans la nécessité de créer et cribler des banques à la recherche de régions répétées appropriées. L'utilisation d'amorces hétérologues s'avère donc très utile. Des résultats probants d'utilisation de telles amorces commencent à être publiés. Des travaux sur les primates suggèrent que les microsatellites peuvent être utilisés entre différentes familles mais pas au-delà (Takasaki et Takenaka, 1991 ; Morin et Woodruff, 1992 ; Washio, 1992 ; Inoue et Takenaka, 1993). D'autres études montrent qu'une certaine proportion d'amorces est utilisable pour des membres plus distants entre eux, par exemple issus d'un ordre de mammifères donné (Moore *et al.*, 1991, Schlötterer *et al.*, 1991). Des succès limités d'utilisation d'amorces hétérologues ont été mentionnés chez les oiseaux (Ellegren, 1992) et les plantes supérieures (Zhao et Kochert, 1993 ; Lagercrantz *et al.*, 1993). Avec le recul, il semble peu probable que l'on puisse découvrir des amorces universelles comparables à celles que l'on utilise pour l'analyse de l'ADN mitochondrial (Kocher *et al.*, 1989).

Les résultats présentés dans ce rapport sont à rapprocher des études antérieures portant sur les microsatellites de cerfs. Sur les 9 microsatellites testés, 7 (77,8 %) donnent un produit d'amplification. Parmi ceux-ci, 3 (48 %) sont polymorphes. Ces chiffres sont comparables à ceux de Slate (1998) qui obtenait 129 produits d'amplification sur 174 microsatellites testés (74,1 %) chez le cerf elaphe (dont 55,8 % polymorphes) et 126 produits d'amplification sur 171 microsatellites testés (73,7 %) chez le cerf sika (dont 37,3 % polymorphes). Nos résultats et ceux de Slate sont supérieurs à ceux d'études similaires. De Gortari *et al.* (1997) ont testé 1 036 microsatellites bovins chez le mouton Soay et obtenu 605 (58 %) loci amplifiés. Kuhn *et al.* (1996) ont eux testé 27 microsatellites bovins sur le cerf elaphe. Quatorze (52 %) ont donné des produits d'amplification, tous polymorphes. Engel *et al.* (1996) ont testé 12 microsatellites bovins sur 6 espèces de *Cervidae*. Seulement 40 % des tests ont abouti à une amplification positive chez les cerfs. Un résultat supérieur a été obtenu avec les ovins et les caprins étudiés. Nos résultats s'expliquent par le choix des microsatellites testés. Nous avons en effet retenu les

microsatellites bovins qui s'étaient avérés les plus polymorphes chez les cerf elaphe et sika lors de l'étude réalisée par Slate (1998). Le travail de Slate avait lui-même été le plus poussé en matière d'optimisation des conditions PCR, ce qui explique la plus grande proportion de produits d'amplification obtenue par cet auteur.

Aucune étude de biologie moléculaire n'avait été réalisée sur le cerf rusa avant ce travail de DEA. Les 3 loci polymorphes obtenus sont donc les premiers microsatellites dérivés pour *Cervus timorensis rusa*. Un travail d'optimisation reste nécessaire pour déterminer les conditions les plus appropriées pour l'amplification PCR du troisième locus. Toutefois un tel travail est long et ne peut être envisagé pendant le cours laps de temps que représente un stage de DEA. De nombreux paramètres interviennent qu'il convient de modifier un par un pour faire avancer l'optimisation (température d'hybridation, concentration en MgCl₂, ...). Puis, il convient d'ajuster ces différents paramètres les uns par rapport aux autres. Nous avons essayé différentes conditions PCR et notamment l'ajout de dimethyl sulfoxide (DMSO), de tetramethyl ammonium chloride (TMAC) ou de tetramethyl ammonium chloride et formamide (TMACIDE) connus pour augmenter la spécificité de l'appariement des séquences d'ADN (Gemmell, 1997). Nous avons également testé de façon succincte différents supports pour l'électrophorèse dont certains (Spreadex® et Polynat®) pourraient constituer une alternative à l'utilisation du polyacrylamide (séparation comparable voire supérieure, gain de temps et facilité d'emploi accrue). De la même manière, des essais plus poussés sont à effectuer avant d'envisager une utilisation en routine.

Pour garantir une discrimination parfaite des allèles révélés sur gel de polyacrylamide, il aurait fallu multiplier les électrophorèses afin de changer l'ordre de migration des échantillons et ainsi permettre des comparaisons fines des tailles alléliques. Une autre solution aurait consisté à utiliser un gel de polyacrylamide dénaturant marqué au S₃₅. Nos résultats sont donc à relativiser en attendant qu'il soit procédé à quelques migrations complémentaires sur gel.

Toutefois les résultats obtenus ouvrent la voie d'une approche moléculaire de l'étude de la génétique du cerf rusa. Les microsatellites testés par Slate (1998), Kuhn (1996) et Engel (1996) qui ont servi de base à l'étude pourraient être utilisés à plus grande échelle afin de développer un nombre de microsatellites polymorphes chez le rusa suffisant pour entreprendre des études performantes de génétique des populations. Les allèles obtenus pourraient être étudiés avec précision par séquençage automatique au laboratoire PATHOTROP. La constitution de pedigrees est également souhaitable afin de vérifier l'héritabilité des microsatellites et donc la transmission mendélienne des allèles.

Les développements du travail de DEA ont pour mérite de montrer la faisabilité d'une analyse génétique des populations de cerfs rusa en élevage à Maurice, analyse qui doit maintenant être

réalisée à plus grande échelle.

8.2. L'échantillonnage

Le plan d'échantillonnage réalisé sur place à Maurice devra être amélioré dans une étude ultérieure en tenant compte des paramètres suivants :

- réaliser l'étude en dehors des périodes de rut, de gestation et de mise-bas afin de pouvoir avoir accès à tous les animaux,
- déterminer avec plus de précision l'historique des mouvements de cerfs entre les « feed-lots » ou les chassés afin de garantir l'origine des animaux échantillonnés,
- prendre en considération la taille des exploitations (nombre de cerfs) dans l'échantillonnage.

8.3. L'analyse génétique

8.3.1. Structuration des populations

L'analyse génétique ne montre pas de différences significatives entre les animaux de la côte est et ceux de la côte ouest. Les différences observées par les éleveurs, si elles sont confirmées par une étude morphométrique, pourraient être imputées aux grandes différences de conditions environnementales (tant au niveau du climat que des ressources fourragères) qui règnent entre les deux façades de l'île Maurice. Elle ne révèle pas non plus une consanguinité du cheptel de rusa en élevage. L'élevage de *Cervidae* est récent à l'île Maurice puisque les premières tentatives datent du milieu des années 1970. La séparation des animaux en unités finies sans échange reproducteur entre elles (« feed-lots » ou chassés) est également récente puisque la clôture des terres liée au développement de la culture de la canne à sucre date des années 1950. L'absence de consanguinité et de déséquilibre de Hardy-Weinberg montrée par notre étude semble tout à fait en accord avec cet historique.

Maurice constitue un modèle tout à fait exceptionnel car si de nombreuses études se sont attachées à décrire des phénomènes de structuration génétique des populations chez les insectes (Estoup *et al.*, 1995 ; Rand, 1994) ou chez les mollusques (Viard *et al.*, 1996), très peu de travaux s'intéressent aux mammifères (Dallas, 1995 ; Simonsen *et al.*, 1998). Ces derniers concernent la plupart du temps des petits mammifères à temps de génération court. L'île Maurice est l'un des rares endroits au monde où ce type de recherches pourrait être mené sur une

population de grands mammifères.

8.3.2. Origine du cerf *rusa mauricien*

La mise en évidence d'un plus grand nombre de microsatellites amplifiant l'ADN du cerf *rusa* pourrait permettre de caractériser de façon précise l'origine du cerf *rusa mauricien* et la perte éventuelle de variabilité génétique attachée au débarquement d'un petit nombre d'individus fondateurs.

Le fondement biologique de la notion d'espèce a donné naissance à plusieurs concepts dont 2 sont unanimement reconnus : le concept mixiologique basé sur l'isolement reproductif (Mayr, 1974) et le concept évolutif qui repose sur des critères de différenciation génétique (Dobzhansky, 1970). Whitehead (1972) a proposé une classification complète des *Cervinae* basée sur des différences morphologiques étayées, quand les données sont disponibles, par l'information mixiologique. L'apport des techniques de biologie moléculaire permet, au fur et à mesure des développements, de préciser cette classification. Toutefois, elle reste très incertaine et ce principalement pour 2 raisons :

- tout d'abord, peu d'études comparent les 4 genres (Groves and Grubb, 1987 ; Harrington, 1985)
- ensuite, la plupart des critères utilisés pour établir les relations phylogénétiques (morphologie des bois et couleur de la robe) sont sujets à des évolutions convergentes ou parallèles (Groves and Grubb, 1987 ; Harrington, 1985) et certains des indicateurs utilisés ne constituent simplement pas de bons indicateurs des changements évolutifs (hybridation et distance géographique) (Harrington, 1985).

Ces études ont ainsi mis en évidence que les cerfs *rusa* de Java (*Cervus timorensis rusa*) et de Molluque (*Cervus timorensis moluccensis*) sont proches du cerf Sambar (*Cervus unicolor unicolor*). Le groupe ainsi constitué est lui-même plus proche d'un groupe formé par les daims d'Europe, de Mésopotamie et le cerf Chital que d'un second groupe comprenant les cerfs Elaphe, Wapiti, Sika et Père David. Aucune étude n'a toutefois été menée plus avant au sein du groupe *timorensis*. Une étude basée sur le polymorphisme des microsatellites du cerf *rusa* pourrait être entreprise afin de calculer les distances génétiques entre le cerf *rusa* de l'Ile Maurice et les cerfs *rusa* présents dans d'autres régions du globe. Les techniques moléculaires devraient également permettre de clarifier la position systématique des différentes sous-espèces du groupe *timorensis*.

8.3.3 L'effet fondateur

Le nombre d'animaux initialement débarqué à Maurice n'est pas connu avec précision. Il est donc difficile d'avoir une idée juste de la variabilité génétique initiale et de la réduction éventuelle de cette dernière. Les résultats semblent juste confirmer la forte capacité des populations naturelles à créer de la variabilité. Toutefois ces résultats ne peuvent être considérés que comme des résultats partiels qui doivent être confirmés ou infirmés. Deux loci sont en effet insuffisants pour mener à bien une véritable analyse génétique.

Comprendre l'influence d'un épisode de fondation sur la variabilité génétique des populations est devenu un enjeu important en génétique des populations et biologie de la conservation. Plusieurs auteurs ont montré que les conséquences d'une population fondatrice réduite sont une augmentation de la consanguinité, une perte de variabilité génétique ou la fixation d'allèles délétères, avec à terme, une réduction du potentiel adaptatif et une augmentation de la probabilité d'extinction (Frankel and Soulé, 1981 ; Ralls *et al.*, 1988 ; Jiminez *et al.*, 1994). Si l'on considère les loci sélectivement neutres, le nombre d'allèles et la distribution des fréquences alléliques dans les populations naturelles résulte d'un équilibre entre mutation et dérive génique. Les paramètres de cet équilibre mutation-dérive sont le taux de mutation et la taille de la population effective. Lorsqu'un épisode de fondation se produit et que la taille de la population effective est petite, une réduction progressive du nombre d'allèles et du taux d'hétérozygotie est observée. La diversité allélique est réduite plus rapidement que le taux d'hétérozygotie (Nei *et al.*, 1975).

Nos résultats ne montrent pas de déviation du taux d'hétérozygotie observé par rapport au taux attendu sous l'équilibre mutation-dérive. Toutefois, pour estimer la réduction allélique, il faudrait mener une comparaison avec les cerfs rusa de l'archipel indonésien afin de déterminer la perte de variabilité génétique liée à l'isolement de la population mauricienne.

CONCLUSION

Ce travail de DEA constitue la première étude de génétique moléculaire entreprise chez le cerf rusa. Trois loci polymorphes, ABS12, INRA40, TGLA57 sont désormais disponibles pour *Cervus timorensis rusa*. Cerf d'élevage tropical privilégié à l'Ile Maurice, la Réunion et dans plusieurs pays d'Asie, le développement d'outils moléculaires applicables à l'étude de cette espèce représente un réel enjeu zootechnique et scientifique. Les premiers résultats obtenus à l'Ile Maurice attestent de la faisabilité d'études de génétique des populations et ouvrent la porte à une meilleure connaissance du cerf rusa. A terme, c'est le développement de systèmes de contrôle de filiation, la mise en place de schémas d'amélioration génétique ou la sélection orientée vers la production de viande ou de velours qui peuvent bénéficier des outils moléculaires que constituent les microsatellites.

BIBLIOGRAPHIE

- Amos, B., Schlotterer, C., and Tautz, D., 1993, Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling, *Science* **260**(5108):670-2.
- Ashley, M. V., and Dow, B. D., 1994, The use of microsatellite analysis in population biology: background, methods and potential applications, *Exs* **69**:185-201.
- Bell, C. J., and Ecker, J. R., 1994, Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*, *Genomics* **19**(1):137-44.
- Bishop, M. D., Kappes, S. M., Keele, J. W., Stone, R. T., Sunden, S. L. F., Hawkings, G. A., Solinas Todo, S., Fries, R., Grosz, M. D., Yoo, J., and Beattie, C. W., 1994, A genetic linkage map of cattle, *Genetics* **136**:619-639.
- Blouin, M. S., Parsons, M., Lacaille, V., and Lotz, S., 1996, Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness, *Mol Ecol* **5**(3):393-401.
- Bowcock, A. M., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, J., Minch, E., Kidd, J. R., and Cavalli-Sforza, L., 1994, High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites, *Nature* **368**(6470):455-7.
- Brelurut, A., Chardonnet, P., and Benoit, M., 1997, L'élevage de cervidés en France : Métropole et Outre-mer, *Renc. Rech. Ruminants* (4):31-38.
- Brezinsky, L., Kemp, S. J., and Teale, A. J., 1993, ILSTS6 - a polymorphic bovine microsatellite., *Animal Genetics* **24**(1):73.
- Bruford, M. W., and Wayne, R. K., 1993, Microsatellites and their application to population genetic studies, *Curr Opin Genet Dev* **3**(6):939-43.
- Callen, D. F., Thompson, A. D., Shen, Y., Philips, H. A., Richards, R. I., Mulley, J. C., and Sutherland, G. R., 1993, Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers., *Am. J. Hum. Genet.* **52**:922-927.
- Cockerham, C. C., 1969, Variance of gene frequencies., *Evolution* (23):72-84.
- Dallas, J. F., 1992, Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred stains of mouse., *Mammalian Genome* **3**:452-456.
- Dallas, J. F., 1995, Population subdivision and gene flow in Danish house mice, *Molecular Ecology* (4):311-20.
- De Gortari, M. J., Freking, B. A., Kappes, S. M., Leymaster, K. A., Crawford, A. M., Stone, R. T., and Beattie, C. W., 1997, Extensive genomic conservation of cattle microsatellite heterozygosity in sheep., *Animal Genetics* (28):274-290
- Dib, C., and al., 1996, A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites., *Nature* (380):152-154.
- Dobzhansky, T., 1970, Genetics of the evolutionary process, Columbia University Press, New-York.
- Edwards, A., Hammond, H. A., Jin, L., Caskey, C. T., and Chakraborty, R., 1992, Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups., *Genomics* **12**:241-253.
- Ellegren H. (1992) Polymerase-Chain Reaction (PCR) analysis of microsatellites - a new approach to studies of genetic relationship in birds. *The Auk* 109 : 886-895

- Ellegren, H., and al., 1995, Handicapped males and extrapair paternity in pied flycatchers : a study using microsatellite markers., *Molecular ecology* (4):739-744.
- Ellegren, H., Savolainen, P., and Rosen, B., 1996, The genetical history of an isolated population of the endangered grey wolf *Canis lupus*: a study of nuclear and mitochondrial polymorphisms, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351(1348):1661-9.
- Emerson, B. C., and Tate, M. L., 1993, Genetic analysis of evolutionary relationships among deer (subfamily Cervinae), *J Wildl Dis* 29(3):481-4.
- Engel, S. R., Linn, R. A., Taylor, J. F., and Davis, S. K., 1996, Conservation of microsatellite loci across species of artiodactyls : implications for population studies., *Journal of Mammology* 77(2):504-518.
- Estoup, A., Solignac, M., Harry, M., and Cornuet, J. M., 1993, Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*, *Nucleic Acids Res* 21(6):1427-31.
- Estoup, A., Solignac, M., Cornuet, J.-M., Goudet J. and Scholls, A., 1996, Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera : Apidae) in Europe, *Molecular Ecology* (4):252-61.
- Field, D., and Wills, C., 1996, Long, polymorphic microsatellites in simple organisms, *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 263(1367):209-15.
- Frankel, O. H. and Soulé, M. E., 1981, Conservation and Evolution, Cambridge University Press, Cambridge.
- Gemmel, N. J., 1997, Enhancement of microsatellite amplification using tetramethylammonium chloride and formamide (TMACIDE)., *Technical Tips Online* ([http : // www.elsevier.nl/locate/tto](http://www.elsevier.nl/locate/tto)) (T40029).
- Georges, M., and Massey, J. M., 1992, Polymorphic DNA markers in *Bovidae*, **Patent W092/13102**.
- Gertsch, P., Pamilo, P., and Varvio, S. L., 1995, Microsatellites reveal high genetic diversity within colonies of *Camponotus* ants, *Mol Ecol* 4(2):257-60.
- Goudet, J., 1995, FSTAT Version 1.2. A computer program to calculate F-statistics., *Journal of Heredity* (86):485-486.
- Groves, C. P., and Grubb, P. G., 1987, Relationships of living deer., in: *Biology and management of the Cervidae* (C. M. Wemmer, ed.), Smithsonian Institution Press, Washington.
- Guo, S. W., and Thompson, E. A., 1992, Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles., *Biometrics* (48):361-372.
- Hardy, G. H., 1908, Mendelian proportions in a mixed population., *Science* (28):49-50.
- Harrington, R., 1985, Evolution and distribution of the *Cervidae*., *R. Soc. N. Z. Bull.* (22):3-11.
- Hearne, C. M., Ghosh, S., and Todd, J. A., 1992, Microsatellites for linkage analysis of genetic traits, *Trends Genet* 8(8):288-94.
- Hearne, C. M., McAleer, M. A., Love, J. M., Aitman, T. J., Cornall, R. J., Ghosh, S., Knight, A. M., Prins, J. B., and Todd, J. A., 1991, Additional microsatellite markers for mouse genome mapping, *Mamm Genome* 1(4):273-82.
- Hillis, D. M., and al., 1996, Molecular Systematics. (I. Sinauer Associates, ed.), Sunderland.

- Holland, M. M., and al., 1993, Short tandem repeat loci : application to forensic and human remains identification., in: *DNA fingerprinting : State of the Science.*, Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, pp. 267-274.
- Hudson, R., 1997, Approximate populations of farmed deer, *Cybercervus* (<http://www.cybercervus.com/farmeddeer.html>).
- Hughes, A. E., 1993, Optimization of microsatellite analysis for genetic mapping, *Genomics* 15(2):433-4.
- Hughes, C. R., and Queller, D. C., 1993, Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism, *Mol Ecol* 2(3):131-7.
- Inoue M. and Takenaka O. (1993) Japanese macaque microsatellite PCR primers for paternity testing. *Primates* 34 : 37-45.
- Janis, C. M., and Scott, K. M., 1987, The interrelationships of higher ruminant families with special emphasis on the members of the *Cervoidea.*, *Am. Mus. Novit.* (2893):1-85.
- Jarne, P., and Lagoda, P. J. L., 1996, Microsatellites, from molecules to populations and back., *Trends in Ecology and Evolution* 11(10):424-429.
- Jimenez, J. A., Hughes, K. A., Alaks, G., Graham, L., and Lacy, R. C., 1994, An experimental study of inbreeding depression in a natural habitat, *Science* 266(5183):271-3.
- Jin, L., and R., C., 1995, Population structure, stepwise mutations, heterozygote deficiency and their implications in DNA forensics., *Heredity* (74):274-285.
- Kijas, J. M., Fowler, J. C., and Thomas, M. R., 1995, An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species, *Genome* 38(2):349-55.
- Kocher T. D., Thomas W. K., Meyer A., Edwards S. V., Pabo S., Villablanca F. X. and Wilson A. C. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals : amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Sci. USA* 86 : 6196-6200.
- Koorey, D. J., Bishop, G. A., and McCaughan, G. W., 1993, Allele non-amplification: a source of confusion in linkage studies employing microsatellite polymorphisms, *Hum Mol Genet* 2(3):289-91.
- Kuhn, R., Anastassiadis, C., and Pirchner, F., 1996, Transfer of bovine microsatellites to the cervine (*Cervus elaphus*), *Animal Genetics* 27(3):199-201.
- Lagercrantz U., Ellegren H. and Andersson L. (1993) The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 21 : 1111-1115.
- Mayr, E., 1974, Populations, espèces et évolution, Hermann, Paris.
- Mauritius Chamber of Agriculture, 1996, Annual Report 1995-1996, Port-Louis, Ile Maurice.
- Mezzelani, A., Zhang, Y., Redaelli, L., Castiglioni, B., Leone, P., Williams, J. L., Toldo, S. S., Wigger, G., Fries, R., and Ferreti, L., 1995, Chromosomal localization and molecular characterization of 53 cosmid-derived bovine microsatellites., *Mammalian Genome* 6(9):629-635.
- Modi, W. S., Gallagher, D. S., and Womack, J. E., 1996, Evolutionary histories of highly repeated DNA families among the *artiodactyla* (mammalia), *Journal of Molecular Evolution* (42):337-349.

- Moore, S. S., Byrne, K., Berger, K. T., Barendse, W., McCarthy, F., Womack, J. E., and Hetzel, D. J., 1994, Characterization of 65 bovine microsatellites, *Mamm Genome* 5(2):84-90.
- Moore, S. S., Sargeant, L. L., King, T. J., Mattick, J. S., Georges, M., and Hetzel, D. J., 1991, The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species, *Genomics* 10(3):654-60.
- Morin R. A. and Woodruff D. S. (1992) Paternity exclusion using multiple hypervariable microsatellite loci amplified from nuclear DNA or hair cells. In : R. D. Margin, A. F. Dixon and E. J. Wickings (eds) : *Paternity in Primates : Genetic test and theories*, S. Karger, Basel, pp. 63-81.
- Nawrotzki, R., and al., 1996, The genetic basis of neuromuscular disorders, *Trends in Genetics* 12(8):294-298.
- Nei, M., 1973, Analysis of gene diversity in subdivided populations, *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(12):3321-3.
- Nei, M., 1975, Molecular population genetics and evolution, *Front Biol* 40:I-288.
- Owadally, A. W., and Butzler, W., 1972, *The Deer in Mauritius*, Alpha Printing, Port Louis.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., and Strobeck, C., 1995, Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears, *Mol Ecol* 4(3):347-54.
- Pfister-Genskow, M. A., Hawkings, G. A., Doud, L. I., Jurgella, G. L., Murkve, B. T., Werth, L. K., and Bishop, M. D., 1995, Bovine dinucleotide repeat polymorphisms ABS010, ABS011, ABS012, ABS013 and ABS014., *Journal of Animal Science* 73(10):3189.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., McNicol, J. W., Machray, G. C., Doyle, J. J., Tingey, S. V., and Rafalski, J. A., 1995, Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome, *Curr Biol* 5(9):1023-9.
- Primmer, C. R., Moller, A. P., and Ellegren, H., 1996, A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds [published erratum appears in *Mol Ecol* 1997 Jan;6(1):101], *Mol Ecol* 5(3):365-78.
- Queller, D. C., and al., 1993, Microsatellites and kinship., *Trends in Evolution and Ecology* (8):285-288.
- Rafalsky, J. A., and Tingey, S. V., 1993, Genetic diagnostics in plant breeding : RAPDs, microsatellites and machines., *Trends in Genetics* 9(8):275-280.
- Ralls, K. J., Ballou, D. Templeton, A., 1988, Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals., *Cons. Biol.* (2):185-93.
- Rand, D. M., 1994, Concerted evolution and RApping in mitochondrial VNTRs and the molecular geography of cricket populations., in: *Molecular Ecology and Evolution : Approaches and Applications* (B. V. Basel, ed.), Switzerland, pp. 226-32.
- Raymond, M., and Rousset, F., 1995, GENEPOP (Version 1.2) : Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenism, *J. Heredity* (86):248-249.
- Schlötterer C., Amos B. and Tautz D. (1991) Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature* 354 : 63-65.
- Schlötterer, C., and Pemberton, J., 1994, The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations, *Exs* 69:203-14.
- Simonsen, B. T., Hans, R., Arctander, S., P., 1998, Population structure of African buffalo inferred from mtDNA sequences and microsatellite loci : high variation but low differentiation., *Molecular Ecology* (7):225-37.

- Slate, J., Coltman, D. W., Goodman, S. J., MacLean, I., Pemberton, J. M., and Williams, J. L., 1998, Bovine microsatellites loci are highly conserved in red deer (*Cervus elaphus*), sika deer (*Cervus nippon*) and Soay sheep (*Ovis aries*), *unpublished*.
- Sutherlands, G. R., and Richards, R. I., 1995, Simple tandem DNA repeats and human genetic disease., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (92):3636-3641.
- Takasaki H. and Takenaka O. (1991) Paternity testing in chimpanzees with DNA amplification from hairs and buccal cells in wadges : a preliminary note. *In* : A. Ehara, T. Kimura, O. Takenaka and M. Iwamoto (eds) : *Primate Today*. Elsevier, Amsterdam, pp. 612-616.
- Tautz, D., and Renz, M., 1984, Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes., *Nucleic Acids Res.* 12:4127-4138.
- Tautz, D., Trick, M., and Dover, G. A., 1986, Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation., *Nature* (322):652-656.
- Vaiman, D., Mercier, D., Moazami-Goudarzi, K., Eggen, A., Ciampolini, R., Lepingle, A., Velmala, R., Kaukinen, J., Varvio, S. L., Martin, P., and et al., 1994, A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism, *Mamm Genome* 5(5):288-97.
- Viard, F., Bremond, P., Labbo, R., Justy, F., Delay, B. and Jarne, P., Microsatellites and the Genetics of Highly Selfing Populations in the Freshwater Snail *Bulinus truncatus*., *Genetics* (142):1237-1247.
- Washio K. (1992). Genetic identification of nonhuman primates using tandem-repetitive DNA sequences. *In* : R. D. Martin, A. F. Dixon and E. J. Wickings (eds) : *Paternity in Primates : Genetic Tests and Theories*. S. Karger, Basel, pp. 53-62.
- Weber, J. L., 1990, Informativeness of human (dC-dA)_n-(dG-dT)_n polymorphisms., *Genomics* 7:524-530.
- Weinberg, W., 1908, Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahresh., Verein f. vaterl. Naturk. in Württemberg* (64):368-382.
- Weir, B. S., and Cockerham, C. C., 1984, Estimating F-statistics for the analysis of population structure., *Evolution* (38):1358-1370.
- Weissenbach, J., 1993, Microsatellite polymorphisms and the genetic linkage map of the human genome, *Curr Opin Genet Dev* 3(3):414-7.
- Whitehead, G. K., 1993, *The Encyclopedia of Deer*, Swann-Hill, Shrewsbury.
- Wright, S., 1951, The genetical structure of populations., *Ann. Eugen.* (15):323-354.
- Wright, S., 1965, The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating., *Evolution* (19):395-420.
- Wrogemann, K., and al., 1993, Microsatellites and disease : a new paradigm, in *DNA Fingerprinting : State of the Science.*, Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, pp. 141-52.
- Zhao X. and Kochert G. (1993) Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)_n microsatellite from rice (*Oryza stiva* L.). *Plant Mol. Bio.* 21 : 607-614.

ANNEXE 1

Wizard Genomic™ DNA Purification Kit

Blood Samples

Whole blood must be collected in EDTA-, heparin- or citrate-coated tubes to prevent clotting of the blood and DNA degradation. Blood samples may be stored at 2-8°C for up to two months.

Genomic DNA Purification Procedure

When the procedure is completed, the isolated DNA may be rehydrated overnight at room temperature (22-25°C) or at 65°C for 1 hour. If you intend to rehydrate at 65°C, equilibrate a water bath at the proper temperature before beginning the procedure. If performing the optional RNase step, equilibrate a water bath at 37°C before beginning.

1. Add 900µl of Cell Lysis Solution to a sterile 1.5ml microcentrifuge tube.
2. Gently rock the tube of blood until thoroughly mixed, then transfer 300µl of blood to the tube containing the Cell Lysis Solution. Invert the tube 5-6 times to mix.
3. Incubate the mixture for 10 minutes at room temperature (invert 2-3 times once during the incubation) to lyse the red blood cells. Centrifuge for 20 seconds at 13,000-16,000 x g at room temperature.
4. Remove and discard as much supernatant as possible without disturbing the visible white pellet. Approximately 10-20µl of residual liquid will remain.

Note: Some red blood cells or red cell debris may be visible along with the white blood cells. If the pellet appears to contain **only** red blood cells, add an additional 300 µl of Cell Lysis Solution and repeat Steps 3-4.

5. Vortex the tube vigorously until the white blood cells are resuspended (10-15 seconds).

Note: To obtain efficient cell lysis, it is essential that the white blood cells are completely resuspended.

6. Add 300 µl of Nuclei Lysis Solution to the tube containing the resuspended cells. Pipet the solution 5-6 times to lyse the white blood cells. The solution should become very viscous. If clumps of cells are visible after mixing, incubate the solution at 37°C until the clumps are disrupted. If the clumps are still visible after 1 hour, add an additional 100 µl of Nuclei Lysis Solution and repeat the incubation.
7. **OPTIONAL :** Add 1.5 µl of RNase Solution to the nuclear lysate and mix the sample by inverting the tube 25 times. Incubate the mixture at 37°C for 15 minutes. Cool the sample to room temperature before proceeding.
8. Add 100 µl of Protein Precipitation Solution to the nuclear lysate and vortex vigorously for 10-20 seconds. Small protein clumps may be visible after vortexing.

Note: If it was necessary to use additional Nuclei Lysis Solution in Step 6, add a total of 130 µl of Protein Precipitation Solution.

9. Centrifuge at 13,000-16,000 g for 3 minutes at room temperature. A dark brown protein pellet should be visible. If no pellet is observed, refer to the Troubleshooting Section.

10. Transfer the supernatant to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube containing 300 μ l of room temperature isopropanol.

Note: Some supernatant may remain in the original tube containing the protein pellet. Leave this residual liquid in the tube to avoid contaminating the DNA solution with the precipitated protein.
11. Gently mix the solution by inversion until the white thread-like strands of DNA form a visible mass.
12. Centrifuge for 1 minute at 13,000-16,000 x g at room temperature.
13. Decant the supernatant and add 300 μ l of room temperature 70 % ethanol to the DNA. Invert the tube gently several times to wash the DNA pellet and the sides of the microcentrifuge tube. Centrifuge for 1 minute at 13,000-16,000 x g at room temperature.
14. Carefully aspirate the ethanol using either a drawn Pasteur pipet or a sequencing pipet tip. The DNA pellet is very loose at this point and care must be used to avoid aspirating the pellet into the pipet. Invert the tube on clean absorbant paper and air dry the pellet for 10-15 minutes.
15. Add 100 μ l of DNA Rehydration Solution (10 mM Tris-HCL / 1 mM EDTA, pH 7.4) to the tube and rehydrate the DNA by incubating at 65°C for 1 hour. Periodically mix the solution by gently tapping the tube. Alternatively, rehydrate the DNA by incubating the solution overnight at room temperature.
16. Store the DNA at 2-8°C.

Quantitation of the DNA

The spectrophotometric method of DNA quantitation is commonly used to determine both the concentration and relative purity of nucleic acids in a solution. However, Promega strongly suggests that you do not use the A260 measurement to quantitate the DNA isolated by this procedure. The rapid agarose gel electrophoresis method outlined below has been shown to provide a much more accurate quantitation of the genomic DNA isolated with the Wizard™ Genomic DNA Purification Kit.

1. Mix 3.5 μ l of the DNA solution prepared in Step 16 with gel loading buffer (e.g., 4.5% Ficol® 400, 0.1 % bromophenol blue, 0.1 % xylene cyanol FF, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) and centrifuge at top speed for 2 seconds in a microcentrifuge.
2. Prepare a 1 % agarose gel containing 0.5 μ g/ml ethidium bromide.

Caution: Ethidium bromide is a mutagen. Always wear gloves while handling gels or solutions containing the dye.

3. Load the sample into one of the wells. In the adjacent wells, load equal volumes of a series of DNA concentration standards (e.g., unmethylated lambda DNA in the range of 25-500ng/ μ l).
4. Run the gel at 5 volts/cm. When the bromophenol blue tracking dye has migrated at least 2 cm from the wells, the run can be stopped.
5. Examine the gel on an ultraviolet light transilluminator. Intact DNA will be visible as a band near the wells. A smear extending from the well to the dye front indicates that the DNA has been fragmented. Photograph the gel.

Caution: Avoid excessive exposure to the UV light. Always wear a full face UV protection shield *when working with a transilluminator*.

6. From the photograph, estimate the quantity of DNA in the test samples by comparison to the DNA concentration standards.

Expected Results

The yield should be in the range of 5-15pg of DNA per 300 µl of fresh whole blood, with an average size ≥ 50 kb.

Troubleshooting

Blood clots present in blood samples

Cause: Tube stored improperly, blood not mixed thoroughly or inappropriate tubes were used for drawing blood.

Solution: Discard the clotted blood and draw new samples using EDTA-coated tubes.

No protein pellet

Cause: The sample was not cooled to room temperature before adding the Protein Precipitation Solution.

Solution: Cool the sample to room temperature and vortex for 20 seconds, centrifuge for 3 minutes at 13,000-16,000 x g and proceed with the protocol.

Cause: The Protein Precipitation Solution was not thoroughly mixed with the nuclear lysate.

Solution: Always mix the nuclear lysate and Protein Precipitation Solution completely.

Protocole PCR

La réaction de PCR est faite dans un volume final de 25 µl contenant :

- 1 µl de solution d'ADN (environ 50 ng),
- 0,2 mM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP),
- 2mM de solution de MgCl₂ (Perkin Elmer),
- 1 UI d'AmpliTaq Gold (Perkin Elmer),
- 1X GeneAmp 10X PCR Buffer,
- 0,2 µM de chacune des deux amorces.

Thermocycleur

Les conditions d'amplification ont été les suivantes :

12 min à 94°C

35 cycles définis comme suit :

1 min à 94°C

1 min à la température d'appariement

1 min à 72°C

10 min à 72°C

puis descente et maintien de la température à 4°C jusqu'à arrêt du thermocycleur

Electrophorèse

Les produits d'amplification sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 10%. L'électrophorèse est réalisée dans un tampon TBE (Tris-borate EDTA). Les deux gels sont préparés selon le protocole suivant :

Acry-Biscarylamide 19 : 1 (40 %)	15 ml
H ₂ O	39 ml
TBE 10X	6 ml
SDS 10%	300 µl
TEMED	40 µl

Visualisation des produits d'amplification

Les gels sont déposés dans une cuve contenant du bromure d'éthidium, colorant spécifique des bases de l'ADN. Les produits d'amplification séparés par électrophorèse sont alors visualisés par transillumination sous lumière UV et photographiés.

ANNEXE 2

**PROGRAMME DE PRISE DE SANG
PERIODE DE CHASSE 1998
STAGE FREDERIC MAUDET**

- (1) DOMAINE D'ES – RESPONSABLE : M. CLAUDE HAREL
Date de Chasse : jeudi 25 juin 1998**
- (2) STE GRD MADAME LAURENT – RESPONSABLE : M. ROLAND NICOLIN
Date de Chasse : dimanche 5 juillet 1998**
- (3) F.U.E.L. – RESPONSABLE : M. DOMINIQUE ROUSSET
Date de Chasse : samedi 11 juillet 1998**
- (4) DEEP RIVER BEAU CHAMP. – RESPONSABLE : M. CHRISTIAN MAROT
Date de Chasse : dimanche 12 juillet 1998**
- (5) BEL OMBRE SE. – RESPONSABLE : M. NICOLAS CHAUVEAU
Date de Chasse : jeudi 16 juillet 1998**
- (6) MONTILLE LTEE. – RESPONSABLE : M. THIERRY REY
Date de Chasse : samedi 18 juillet 1998**
- (7) PARC AUX CERFS. – RESPONSABLE : M. ALAIN PILOT
Date de Chasse : dimanche 26 juillet 1998**
- (8) RICHE EN EAU. – RESPONSABLE : M. ALAIN BAX
Date de Chasse : samedi 8 août 1998**
- (9) MEDINE SE. – RESPONSABLE : M. MAURICE KOENIG
Date de Chasse : août 1998**
- (10) STE DE MARCO. – RESPONSABLE : M. PATRIC DE MAROUSSEM
Date de Chasse : août 1998**

AGENDA DE MISSION

de Frédéric Maudet

07 avril - 07 mai

Mauritius Deer Farming Co-operative Society Ltd

Ile Maurice

Lundi 07 avril

vol Paris - Ile Maurice

Mardi 08 avril

arrivée à l'Ile Maurice

réunion avec les membres de la « **Mauritius Deer Farming Co-operative Society Ltd** »

déjeuner à Quatre-Bornes

visite du **chassé de Yemen** avec **M. Robert de Marroussen**. Safari touristique

Mercredi 08 avril

mise au point du déroulement de la mission à Maurice

discussion du planning prévisionnel au cours d'une réunion de travail avec **Mme Jacqueline Sauzier**

visite du « feed-lot » de la **Société de Palmyre** avec **M. Denis Hardy**

Jeudi 09 avril

début d'élaboration des questionnaires (chassés / « feed-lots »)

Vendredi 10 avril

rencontre avec **M. Jean Li Yuen Fong** et **M. Jean-Cyrille Monty** de la **Mauritius Meat Producers Association** à la chambre d'agriculture de Maurice

discussion des prélèvements dans les chassés

visite du « feed-lot » de **Constance et la Gaieté SE Co Ltd** (côte est) avec **M. Jean René Nicolin**

Lundi 13 avril
fin des questionnaires

Mardi 14 avril
recherches d'informations a la bibliothèque de l'université

Mercredi 15 avril
rencontre avec **M. François Legoupil**, chef de la mission française de coopération
rencontre avec **Rajen Sookhareea** employé au ministère de l'agriculture a la section agronomie, titulaire d'un Phd en Australie, university of Queensland Gatton College : « the effects of castration and age on carcass and meat quality, and digestive efficiency of javan rusa (*Cervus timorensis*) male deer »

Jeudi 16 avril
visite du « feed-lot » de **Medine SE** avec **M. Maurice Koenig** et **M. Robert de Maroussem**

Vendredi 17 avril
visite du « feed-lot » de **Bel Ombre SE** avec **M. Nicolas Cheveau**.
rencontre avec **M. Eric Bestel**. Premiers prélèvements

Lundi 20 avril
visite de la société de **Marco** et de la réserve naturelle de **Wolmar** avec **M. Patrick de Maroussem**
rencontre avec **M. Jean Alain Lalouette**, directeur du **FARC** (Food and Agriculture Research Council)

Mardi 21 avril
visite du chassé de **M. Clément Maurel** (**Ti Dimoune Deer Farming**)

Mercredi 22 avril
session de travail au bureau de la coopérative à Quatre Bornes

Jeudi 23 avril
rencontre du **Dr Beeharry** à la **DSV** (direction des services vétérinaires)
réunion avec **M. Thierry Rey**, président de la société des chasseurs de l'Ile Maurice

Vendredi 24 avril
préparation des prélèvements sanguins du 29 avril

Lundi 27 avril
visite du chassé de **Riche en eau** avec **M. Bertrand Desvaux**

Mardi 28 avril
rencontre avec le **Dr Hulman** à l'**AREU** (Agriculture Research and Extension Unit), le **Dr Ramchun** et le **Dr Françoise Driver** à l'université de Maurice

Mercredi 29 avril
prélèvements dans quatre « feed-lots » de la côte ouest : **Sovil**, **Medine SE**, **Société RPA de Ravel**, **Baie du Cap Deer Farming**.

Jeudi 30 avril

finalisation des fiches de données du mois de juin

Dimanche 03 mai

rencontre avec **M. Roland Nicolin** et visite du **chassé de Nouvelle France**

Lundi 04 mai

rencontre avec le **Dr Beekhee** a l'**AREU**

visite du « feed-lot » de **Fuel** en compagnie de **M. Dominique Roussel**

Mardi 05 mai

prélèvements dans deux paddocks distincts du « feed-lot » de **Constance et la Gaieté SE Co Ltd**

Mercredi 06 mai

prélèvements dans le « feed-lot » de **Beau Champ SE**

Jeudi 07 mai

vol Ile Maurice – Paris

ANNEXE 4

Article soumis au FARC (*Food and Agriculture Research Council*) pour publication dans *FARC Proceedings*.

STUDY OF GENETIC DIVERSITY IN A RUSA DEER (*Cervus timorensis russa*) POPULATION IN MAURITIUS USING DERIVED BOVINE MICROSATELLITES

F. Maudet[©], *J.-C. Maillard*, *P. Chardonnet*, *J. Sauzier*

F. Maudet, ECONAP, CIRAD-EMVT, France
J.-C. Maillard, PATHOTROP, CIRAD-EMVT, France
P. Chardonnet, ECONAP, CIRAD-EMVT, France
J. Sauzier, manager of the Mauritius Deer Farming Co-operative Society Ltd

ABSTRACT

Bovine microsatellite systems were used to amplify rusa deer (*Cervus timorensis russa*) DNA. We tested 9 markers, (ABS12, BM2934, CSSM041, IDVGA55, ILSTS006, INRA040, TGLA57, TGLA122, TGLA126) showing different polymorphisms in bovine and other deer species (red, sika). Seven of them gave PCR amplification products in rusa deer (no amplification for CSSM041 and ILSTS006) of which 3 were polymorphic. These are the first results obtained in a rusa deer population completing previous studies on various deer species.

Keywords : *Cervus timorensis russa*, microsatellites, PCR, polymorphism, rusa deer.

INTRODUCTION

Microsatellite loci are often conserved among related species. This conservation has been shown in various species such as cattle and sheep (Moore *et al.*, 1992), humans and chimpanzees (Deka *et al.*, 1994) or dog and fox (Fredholm and Winters, 1995). Multi-allelic microsatellite systems are therefore very powerful for most population genetics, linkage mapping and parentage studies (Bruford and Wayne, 1993 ; Jarne and Lagoda, 1996). Transfer of bovine microsatellites between families of the *artiodactyla* order has been demonstrated several times (Slate *et al.*, 1998 ; Kuhn *et al.*, 1996 ; Engel *et al.*, 1996).

MATERIALS AND METHODS

Animal population

Sampled deers are originated from 7 farms (Medine SE, Sovil, Bel Ombre SE, Baie du cap Deer Farming, Société RPA de Ravel, Beau Champ SE, Constance et la Gaieté SE Co Ltd) located on the east and the west coasts of the island. All the farmers are members of the Mauritius Deer Farming Co-operative Society Ltd.

[©] Corresponding author : Frédéric MAUDET, CIRAD-EMVT, programme ECONAP, BP 5035, 34032 MONTPELLIER
E-mail : fmaudet@aol.com

Samples collection

Blood samples from 110 rusa deers of both sexes and different ages were collected in EDTA vacutainers.

DNA extraction

Purified genomic DNA was extracted from white blood cells using the Promega Wizard™ Genomic DNA Purification Kit.

Markers tested

We used bovine microsatellites known to also amplify red (*Cervus elaphus*) and sika (*Cervus nippon*) deers. We chose 9 markers showing a high polymorphism level for both species in Slate study (Slate *et al.*, 1998).

PCR protocol

Twenty five (25) ng of DNA was used in 25µl PCR-reaction with 0,2 µM of each primer, 200 µM of each DNTP, 2 mM MgCl₂, 2,5 µl GeneAmp 10X PCR Buffer (Perkin Elmer), 1UI of *Taq* polymerase (Ampli*Taq* Gold, Perkin Elmer).

PCR amplification was performed as follows : 12 min denaturation step at 94 °C (hot start) ; 35 cycles of 1 min denaturation at 94°C, 1 min at annealing temperature, 1 min extension at 72°C. The final elongation step was extended to 10 min.

PCR amplification products were migrated on 4 % ethidium bromide stained agarose gels (Metaphor). After electrophoresis (80 volts, 2 hours), the gels are visualised on a UV-light transilluminator. Photographs are taken and used for the allele discrimination.

RESULTS

The results obtained for these polymorphic loci are summarised in Table 1. Cattle chromosomal location, size of alleles in cattle and number of alleles found in rusa deer are compared.

Table 1 : polymorphic loci results

Microsatellite marker	Bovine chromosome location	Bovine allele size (bp)	Annealing temperature (°C)	Alleles number found in rusa deer	Estimated allele size in rusa deer	reference
TGLA 57	1	80-104	55	3	88-90	(Georges and Massey, 1992)
INRA40	2	205-230	65	4	200-240	(Vaiman <i>et al.</i> , 1994)
ABS12	26	-	55	7	139-163	(Pfister-Genskow <i>et al.</i> , 1995)

DISCUSSION

These preliminary results confirm that microsatellites can be transferred between families of the *artiodactyla* order. The microsatellite systems used in our study had previously amplified successfully red, sika (Slate *et al.*, 1998) and now rusa deer DNA.

The identification of rusa deer microsatellite systems sets up the first basis of Mauritius rusa deer genetic investigations. The results that will follow this study may lead to an enhancement of rusa deer farming in Mauritius by the proposal of efficient breeding schemes. Furthermore, microsatellite systems could be applied in New-Caledonia, Australia or Reunion Island allowing comparisons between other rusa deer populations.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Mauritius Deer Farming Co-operative Society Ltd and all the farmers involved in the study for their entire collaboration and willing support for making their animals suitable.

This work has been granted by the International Game Foundation (IGF, Paris) and by the Center for International Cooperation in Agronomic Research and Development (CIRAD, Montpellier).

REFERENCES

- BRUFORD, M. W., and WAYNE, R. K., 1993, Microsatellites and their application to population genetic studies., *Current Opinion in Genetics and Development* 3:939-943.
- DEKA, R., SHRIVER, M. D., YU, L. M., AND AL., 1994, Conservation of human chromosome 13 polymorphic microsatellite (CA)_n repeats in chimpanzees, *Genomics* 22:226-230.
- ENGEL, S. R., LINN, R. A., TAYLOR, J. F., AND DAVIS, S. K., 1996, Conservation of microsatellite loci across species of artiodactyls : implications for population studies., *Journal of Mammalogy* 77(2):504-518.
- FREDHOLM, M., AND WINTERS, A. K., 1995, Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the *Canidae* family., *Mammalian Genome* 6:8-11.
- GEORGES, M., AND MASSEY, J. M., 1992, Polymorphic DNA markers in *Bovidae*, Patent W092/13102.
- JARNE, P., AND LAGODA, P. J. L., 1996, Microsatellites, from molecules to populations and back., *Trends in Ecology and Evolution* 11(10):424-429.
- KUHN, R., ANASTASSIADIS, C., AND PIRCHNER, F., 1996, Transfer of bovine microsatellites to the cervine (*Cervus elaphus*), *Animal Genetics* 27(3):199-201.
- MOORE, S. S., BARENDSE, W., BERGER, K. T., ARMITAGE, S. M., AND HETZEL, D. J., 1992, Bovine and ovine DNA microsatellites from the EMBL and GENBANK databases, *Animal Genetics* 23(5):463-7.
- PFISTER-GENSKOW, M. A., HAWKINGS, G. A., DOUD, L. I., JURGELLA, G. L., MURKVE, B. T., WERTH, L. K., AND BISHOP, M. D., 1995, Bovine dinucleotide repeat polymorphisms ABS010, ABS011, ABS012, ABS013 and ABS014., *Journal of Animal Science* 73(10):3189.
- SLATE, J., COLTMAN, D. W., GOODMAN, S. J., MACLEAN, I., PEMBERTON, J. M., AND WILLIAMS, J. L., 1998, Bovine microsatellites loci are highly conserved in red deer (*Cervus elaphus*), sika deer (*Cervus nippon*) and Soay sheep (*Ovis aries*), *Animal Genetics* (submitted).
- VAIMAN, D., MERCIER, D., MOAZAMI-GOUDARZI, K., EGGEN, A., CIAMPOLINI, R., LEPINGLE, A., VELMALA, R., KAUKINEN, J., VARVIO, S. L., MARTIN, P., LEVERZIEL, H., AND GUERIN, G., 1994, A set of 99 cattle microsatellites-characterisation, synteny mapping and polymorphism., *Mammalian Genome* 5(5):288-297.

RESUME

Une étude préliminaire de caractérisation génétique des populations de cerfs rusa en élevage à L'île Maurice a été décidée conjointement par la « Mauritius Deer Farming Co-operative Society Ltd », le CIRAD et la fondation internationale pour la sauvegarde de la faune. Des microsatellites bovins, choisis en fonction de leur polymorphisme chez les cerfs sika et elaphe, ont été utilisés pour amplifier l'ADN des cerfs rusa échantillonnés au cours d'une mission à l'île Maurice. Nous avons testé 9 marqueurs dérivés des bovins (ABS12, BM2934, CSSM041, IDVGA55, ILSTS006, INRA040, TGLA57, TGLA122, TGLA126) présentant des polymorphismes importants chez les cerfs elaphe et sika. Sept ont donné des produits d'amplification PCR parmi lesquels 3 se sont avérés polymorphes. Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide a permis d'identifier les allèles et ainsi de conduire une étude simple de génétique des populations. Aucune différence n'a été détectée entre les cerfs élevés sur la côte ouest de l'île et ceux de la côte est. L'étude n'a pas non plus mis en évidence de consanguinité au sein du cheptel mauricien.

ABSTRACT

A study of the genetic variability of rusa deers farmed in Mauritius was organized by the Mauritius Deer Farming Co-operative Society Ltd, CIRAD and International Game Foundation. Bovine microsatellite systems were used to amplify rusa deer (*Cervus timorensis russa*) DNA. We tested 9 markers, (ABS12, BM2934, CSSM041, IDVGA55, ILSTS006, INRA040, TGLA57, TGLA122, TGLA126) showing different polymorphisms in bovine and other deer species (red, sika). Seven of them gave PCR amplification products in rusa deer (no amplification for CSSM041 and ILSTS006) of which 3 were polymorphic. These are the first results obtained in a rusa deer population completing previous studies on various deer species. A limited population genetic study was then conducted showing no differences between rusa deer from the west coast and those located on the east coast of the island.

MOTS CLES

allèles, Cerf rusa, *Cervus timorensis russa*, hétérozygotie, microsatellites, PCR, polymorphisme, variabilité génétique.