

Étude des risques d'introgression génétique de la caille des blés (*Coturnix coturnix coturnix*) par la caille japonaise (*C. c. japonica*) : comparaison et intégration des données comportementales et moléculaires obtenues dans le sud-est de la France

Olympe CHAZARA⁽¹⁾, Sophie LUMINEAU⁽²⁾, Francis MINVIELLE⁽¹⁾,
Denis ROUX⁽³⁾, Katia FEVE⁽⁴⁾, Boniface KAYANG⁽⁴⁾⁺,
Jean-Marie BOUTIN⁽⁵⁾, Alain VIGNAL⁽⁴⁾, Jean-Luc COVILLE⁽¹⁾,
Xavier ROGNON^{(1)*}

⁽¹⁾ INRA-INA P-G, UMR Génétique et Diversité Animales,
78352 Jouy-en-Josas, France

⁽²⁾ UMR CNRS 6552, Ethologie Evolution Ecologie, Université de Rennes 1,
35042 Rennes, France

⁽³⁾ Station de Sault, ONCFS, 84390 Sault, France

⁽⁴⁾ INRA, Laboratoire de Génétique Cellulaire, 31326 Castanet Tolosan, France ⁽⁵⁾
Station d'études de Chizé, ONCFS, 79360 Villiers en Bois, France

+ adresse actuelle : Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,
University of Ghana, Legon, Ghana

Abstract: Genetic introgression between common quail (*Coturnix coturnix coturnix*) and Japanese quail (*C. c. japonica*): comparaison from behavioural and molecular data in south-eastern France. Many cases of introgressive hybridization were observed among birds, in particular following the introduction of animals belonging to a taxon close to an indigenous species in the environment. This seems to be the case for the *Coturnix coturnix coturnix* whose populations are artificially put in contact with the *C. c. japonica*, mainly further to illegal releases of breeding animals for hunting. We will present here under a work which consisted in the implementation of a panel of tools to allow the study of this phenomenon: nuclear (microsatellite) and mitochondrial DNA (mtDNA sequencing) polymorphism and analysis of the mating call. The sampling of common quails was coordinated by the national network "migrating birds" of the National Game and Wildlife Agency (ONCFS) and the National Federation of Hunters. Ninety animals were sampled in 5 departmental administrative districts in the south-eastern of France during the hunting season. The Japanese quail samples have two origins: a batch (24 individuals) comes from the NILGS (Tsukuba, Japan) and the other batch (23 indi-

* Correspondance et tirés à part : rognon@inapg.fr

viduals) results from experimental strains from INRA (France). The molecular polymorphism highlights a clear differentiation between the two taxa, thus making it possible to seek the existence of possible hybrid animals in the natural quail populations. Three individuals sampled in the wild and thus supposed to be common quails, presented completely particular molecular profiles: (1) they have a *japonica* mtDNA haplotype and (2) their nuclear genotypes place them in an intermediate situation between the two taxa. We are probably in the presence of hybrid individuals (of first generation) whose mother is a Japanese quail. The mating call was studied from recordings carried out *in situ*. Out of the 28 recorded birds, 5 individuals seem to present differences compared to the crow awaited from the common quail. This analysis could let suppose the presence of males, potentially hybrid and seeking to reproduce, within the natural populations. Our study confirms that both quail taxa, very close genetically, can hybridize in nature. This introgression is known as having morphological and behavioral consequences, in particular with the loss of the migratory behavior. It confirms the importance of the fight against the Japanese or hybrid quail releases in order to preserve the genetic integrity of *C.c.coturnix*. The tools developed here are useful for the follow-up of the natural quail populations within the framework of the avifauna management programs. More particularly, the panel of molecular markers, combining microsatellites and mtDNA, allows us a fast diagnosis of the genetic status of any individual taken in the nature or in a breeding and the follow-up of the genes flows in the wild populations.

Coturnix coturnix coturnix/ C. c. japonica/ introgression/ molecular markers/ mating call

Résumé : Depuis quelques décennies, les suspicions d'introgression génétique de la caille japonaise dans les populations françaises de cailles des blés sont grandissantes. Nous présentons ici la mise en œuvre d'un panel d'outils permettant l'étude de ce phénomène dans les populations naturelles : locus microsatellites, séquences d'ADN mitochondrial et analyses du chant des mâles reproducteurs. Quatre-vingt-dix animaux ont été échantillonnés (chasse) dans le sud-est de la France. Deux populations de cailles japonaises ont aussi été échantillonnées. Trois individus « sauvages », et donc présumés être des cailles des blés, ont présenté des profils moléculaires tout à fait particuliers, indiquant vraisemblablement la présence d'hybrides : (1) ils possèdent un ADN mitochondrial de type « japonais » et (2) leur génotype, observé aux locus microsatellites, les place en situation intermédiaire entre les deux taxons. Le chant a été étudié à partir d'enregistrements effectués *in situ*. Sur les 28 oiseaux enregistrés, 5 ont présenté des séquences différentes de celles attendues pour la caille des blés et pouvant être interprétées comme des chants d'animaux hybrides. Notre étude confirme que les deux taxons, très proches génétiquement, peuvent s'hybrider dans la nature et montre l'importance de la lutte envers les lâchers de cailles japonaises.

Coturnix coturnix coturnix/ C. c. japonica/ introgression/ marqueurs moléculaires/ chant reproducteur

1. INTRODUCTION

L'hybridation introgressive est un processus naturel, décrit dans l'ensemble des grands groupes d'organismes [8], qui semble jouer un rôle important en terme de diversité génétique, d'adaptation et de spéciation [3], [7]. Ce processus peut aussi se mettre en place, ou être accéléré, avec l'anthropisation du milieu (introduction de nouvelles espèces, urbanisation, pratiques agricoles,...). Chez les oiseaux, l'isolement reproducteur est très souvent incomplet et de nombreux cas d'hybridation introgressive ont été rapportés [21]. Ce phénomène a été observé aussi bien en l'absence [2] qu'en présence de perturbations liées à l'occupation du milieu par l'homme [39] ou bien à la suite d'actions de relâchers d'animaux dans le milieu naturel [1], [5], [22]. De tels processus ont des conséquences sur l'évolution de la structure génétique des populations ou des espèces concernées et leur conservation [3]. Il est donc nécessaire de disposer d'outils permettant le suivi de l'hybridation et la gestion rationnelle de l'avifaune sauvage. Dans ce travail, nous proposons de mettre en place de tels outils sur une espèce particulièrement sensible en France, la caille des blés, *Coturnix coturnix coturnix* (Linnaeus, 1758).

Les populations naturelles de caille des blés peuvent être observées en reproduction sur tout le pourtour de la Méditerranée, l'Europe entière et une grande partie de l'Asie, jusqu'aux plateaux de Sibérie centrale [33]. Espèce migratrice, la caille des blés réalise son cycle annuel entre une zone d'hivernage en Afrique sub-saharienne et dans le sud de l'Eurasie (de l'Ukraine à l'Inde) et une zone de reproduction englobant l'Afrique du Nord, l'Europe et allant jusqu'en Sibérie. Le déclin des populations migratrices, dans les années 60 et 70, a motivé la double inscription de la caille des blés en annexe II de la Convention de Bonn et III de celle de Berne en 1979. Cette espèce reste un gibier recherché en Italie, en France et en Espagne. La caille japonaise, *C. c. japonica* (Temminck & Schlegel, 1849), est originaire du Paléarctique oriental (Japon, Est de la Sibérie, Mongolie, Nord de la Chine, Corée,...) et peut migrer au sud de la Chine [13]. Cette aire recouvre celle de la caille des blés autour du Lac Baïkal lors de la saison de reproduction et au Bangladesh lors de la période d'hivernage. En Europe, la caille japonaise est connue sous sa forme domestique. Son élevage pour la chair et les œufs est favorisé par sa forte prolificité et une précocité sexuelle marquée [40].

Si la question de l'hybridation entre les *C. c. coturnix* et *C. c. japonica* reste ouverte aujourd'hui dans le cas de leur principale zone de recouvrement naturelle, le Lac Baïkal [29], [41], ces deux taxons sont connus pour leur aptitude à se croiser en captivité [16], [29]. Les hybridations dans la nature sont soupçonnées depuis quelques décennies par les ornithologues, les agents de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS), les chasseurs

et les chercheurs [14]. Depuis les années 70-80, la caille des blés et la caille japonaise ont été artificiellement mises en situation de sympatrie en Europe. En effet, pour les besoins de la chasse, de nombreux lâchers de « caille de tir » sont effectués chaque année à partir d'animaux d'élevage, animaux issus de cailles japonaises ou de cailles hybrides [23]. La grande proximité entre ces taxons et les connaissances sur d'autres espèces qui ont subi des situations similaires [1], [5], [22], renforcent les inquiétudes sur les lâchers de cailles japonaises ou hybrides dans le milieu naturel [16], [38].

Toutefois, la présence de cailles japonaises ou de cailles hybrides n'a jamais été clairement établie dans les habitats naturels de cailles des blés en France. Cette étude a donc pour objectif la mise au point d'outils permettant le contrôle et le suivi des populations de cailles des blés. La première partie du travail concerne la mise au point des marqueurs moléculaires (nucléaires et mitochondriaux) pour décrire le polymorphisme génétique, rechercher des marqueurs diagnostiques entre les espèces et estimer le degré d'introgession génétique de la caille des blés par la caille japonaise. La seconde partie concerne l'étude du chant des reproducteurs mâles. En effet, au printemps, les mâles cailles des blés s'établissent sur les aires de reproduction et chantent pour attirer les femelles et se signaler aux autres mâles [26]. Une différence dans les chants sexuels mâles existe entre les deux taxons et il a été démontré [16] que des oiseaux hybrides de première et deuxième générations pouvaient présenter des chants intermédiaires. L'écoute des chants sur les aires de reproduction pourrait donc révéler la présence de cailles japonaises ou d'individus hybrides aptes à se reproduire.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Échantillonnage

L'échantillonnage de cailles des blés sauvages a été réalisé par les agents techniques et les techniciens de l'environnement de l'ONCFS et des techniciens des Fédérations départementales de chasseurs dans le cadre du réseau national d'observation « oiseaux de passage » ONCFS / FNC (Fédération Nationale des Chasseurs). Quatre-vingt-trois animaux ont été échantillonnés dans 5 départements du sud-est de la France (tabl. I), lors de la période de chasse. Pour chaque individu, un morceau de muscle a été prélevé et mis dans de l'alcool absolu, et une aile a été conservée. Les échantillons de cailles japonaises ont deux origines : un lot de 24 individus (ADN extrait et envoyé directement) provient du NILGS (Tsukuba, Japon) qui maintient une population d'origine sauvage en captivité depuis 1981, et un lot de 23 individus provenant de troupeaux expérimentaux de l'INRA (échantillonnage par prélèvement de sang).

Tableau I : Origine et effectif des populations échantillonnées.

<i>Taxon</i>	Origine ¹	Effectif	Microsatellites ²	ADN mitochondrial ³
<i>C. coturnix</i> (= « chasse »)	Hautes-Alpes	11	11	8
	Drôme	11	7	2
	Gard	4	4	3
	Lozère	5	5	5
	Vaucluse	52	43	51
<i>C. japonica</i>	Japon	24	24	9
	INRA	23	23	-

¹ origine : département pour les individus issus de la chasse.

² nombre d'individus ayant au plus un locus manquant dans le jeu de données.

³ nombre de séquences réalisées dans l'échantillonnage.

2.2. Marqueurs moléculaires

L'ADN a été obtenu par une extraction phénol-chloroforme [11] pour les échantillons de muscle ou selon un protocole d'extraction rapide (LABOGENA, non publié) pour les échantillons sanguins. A partir d'un jeu initial de 70 locus isolés chez la caille japonaise [34], [35] ou la poule (*Gallus gallus*) (locus ADL0142 [32]), un panel de 25 locus (tabl. II), amplifiant chez *C. c. coturnix* et *C. c. japonica* a été mis au point par le Laboratoire de Génétique Cellulaire (INRA, Centre de Toulouse). Les génotypes ont été obtenus par PCR avec marquage par fluorescence et migration avec un séquenceur ABI Prism 3100 ou 3700 [36]. Le polymorphisme de l'ADN mitochondrial (ADNmt) a été étudié par amplification d'une portion de la région de contrôle, selon le protocole de Fumihito *et al.* [20]. La réaction de séquence a été réalisée avec le kit Big Dye® Terminator v3.1 d'Applied Biosystems et la migration a été faite avec un séquenceur ABI Prism 3700.

Tableau II : Diversité génétique observée à 25 locus microsattellites pour les trois populations de cailles échantillonnées.

Locus (A_l)	« chasse »	Japon	INRA
	$Hnb^1 - A^2 (sp^3)$	$Hnb^1 - A^2 (sp^3)$	$Hnb^1 - A^2 (sp^3)$
ADL 142 (9)	0,749 – 9 (1/5)	0,669 – 3	0,654 – 4
GUJ 0011 (13)	0,8576 – 13 (3/9)	0,5594 – 3	0,3092 – 3
GUJ 0021 (15)	0,8249 – 14 (3/8)	0,7662 – 5 (1/1)	0,5691 – 4
GUJ 0027 (13)	0,7768 – 12 (2/9)	0,2332 – 4 (0/1)	0,1246 – 2
GUJ 0028 (17)	0,8741 – 16 (4/12)	0,6676 – 5	0,7585 – 4
GUJ 0029 (15)	0,8264 – 14 (3/8)	0,7784 – 5 (1/1)	0,5449 – 4
GUJ 0037 (15)	0,8617 – 14 (3/6)	0,8183 – 7 (1/1)	0,7256 – 6
GUJ 0039 (21)	0,9112 – 21 (7/15)	0,7323 – 5	0,4957 – 2
GUJ 0041 (14)	0,7966 – 14 (1/9)	0,7793 – 5	0,3720 – 2
GUJ 0050 (7)	0,7359 – 7 (1/4)	0,1560 – 2	0,6019 – 3
GUJ 0052 (8)	0,3189 – 7 (0/3)	0,6850 – 5 (0/1)	0,5324 – 3
GUJ 0059 (20)	0,9170 – 20 (4/14)	0,6906 – 4	0,7198 – 4
GUJ 0062 (22)	0,9279 – 22 (5/16)	0,3555 – 3	0,5923 – 5
GUJ 0065 (22)	0,9179 – 22 (3/16)	0,6844 – 5	0,6676 – 3
GUJ 0068 (18)	0,8710 – 17 (1/11)	0,7633 – 5	0,7768 – 5
GUJ 0069 (11)	0,6979 – 9 (2/6)	0,6268 – 4 (1/2)	0,6696 – 3
GUJ 0073 (14)	0,8304 – 13 (3/10)	0,5479 – 4 (1/1)	0,6725 – 3
GUJ 0074 (20)	0,9268 – 20 (6/16)	0,5877 – 3	0,4915 – 3
GUJ 0083 (15)	0,8787 – 15 (1/8)	0,5895 – 3	0,8473 – 7
GUJ 0085 (32)	0,9594 – 32 (4/28)	0,5328 – 4	0,1981 – 2
GUJ 0087 (11)	0,8526 – 11 (2/7)	0,6427 – 3	0,6957 – 4
GUJ 0090 (7)	0,3877 – 6 (0/1)	0,7332 – 4	0,4918 – 4 (1/1)
GUJ 0093 (21)	0,8934 – 20 (6/15)	0,7376 – 5	0,1623 – 2
GUJ 0097 (27)	0,9157 – 27 (1/19)	0,7846 – 6	0,7391 – 5
GUJ 0098 (13)	0,8566 – 13 (5/10)	0,4493 – 3	0,3942 – 2
<i>Valeurs moyennes</i>	$H^4 (ET^5) - A_m^6$	$H^4 (ET^5) - A_m^6$	$H^4 (ET^5) - A_m^6$
	0,815 (0,154) – 15,52	0,623 (0,171) – 4,2	0,552 (0,198) – 3,56

¹ Hnb = taux d'hétérozygotie attendue sans biais² A = nombre d'allèles³ sp = nombre d'allèles spécifiques (fréquence > 5%/nb total)⁴ H = taux moyen d'hétérozygotie attendue sans biais / locus⁵ ET = écart-type⁶ A_m = nombre moyen d'allèle / locus⁷ A_l = nombre total d'allèle au locus

2.3. Étude du chant

Les chants de caille des blés ont été enregistrés sur le terrain (commune de Sault, département du Vaucluse) en 2004 (23 juin - 07 juillet) et en 2005 (26 mai - 26 juin) lors du chorus matinal ou crépusculaire. Les enregistrements ont été effectués à l'aide d'un réflecteur parabolique de marque TELINGA Pro-II-S, équipé d'un microphone stéréo à enregistrement omnidirectionnel et d'un magnétophone numérique DAT (Digital Audio Tape) de marque Sony (TC D3) qui fonctionne sur batterie ou analogique de marque Continental Edison modèle MC 8226. Au total, 661 chants de vingt-huit cailles différentes ont été enregistrés (24 en 2005 : C1 à C24 ; et 4 en 2004 : C25 à C28). Ils sont organisés en 177 séquences de chant.

2.4. Analyses statistiques

2.4.1. Données moléculaires

Les fréquences alléliques aux locus microsattellites, le nombre moyen d'allèles par locus et les taux d'hétérozygotie moyenne attendue non biaisée [42] ont été calculés à l'aide du logiciel GENETIX 4.05 [9]. Une Analyse Factorielle des Correspondances (AFC) des scores multilocus des individus [10] a été réalisée avec GENETIX 4.05, afin de mettre en évidence des phénomènes d'introgression et de mélanges génétiques [43]. Les séquences mitochondriales ont été éditées sous BioEdit [30] et les distances entre les haplotypes ont été calculées selon le modèle de Kimura [37] avec le programme DNADIST de la suite de logiciels PHYLIP version 3.65 [19].

2.4.2. Analyse des chants

Les enregistrements ont été saisis par un logiciel d'analyse de sons ANA [44]. Chaque chant est transformé en sonagramme, qui correspond à l'évolution de la fréquence du son en fonction du temps. Nous avons extrait plusieurs types de données à partir de ces saisies.

- Nombre moyen de chants composant une séquence de chant (sur les chants de 2005).
- Détermination de la structure spécifique du chant : chant correspondant à un chant de caille des blés, à un chant de caille japonaise ou à un chant de structure différente (potentiellement chant hybride). La caille japonaise émet un chant composé de 2 syllabes similaires suivies d'un long trille. La caille des blés présente deux thèmes de chant. Le vibrato introductif (*wana*) est composé de deux syllabes modulées similaires de fréquence basse (rarement trois) et le triolet (*huit-huit-huit*) de trois syllabes similaires sifflées courtes, l'intervalle

entre les deux premières syllabes étant plus long que celui séparant les deux dernières syllabes (fig. 1).

- Enfin, nous avons effectué des mesures temporelles sur les triolets afin de vérifier s'ils correspondaient à des critères de chants de caille des blés (fig. 1).

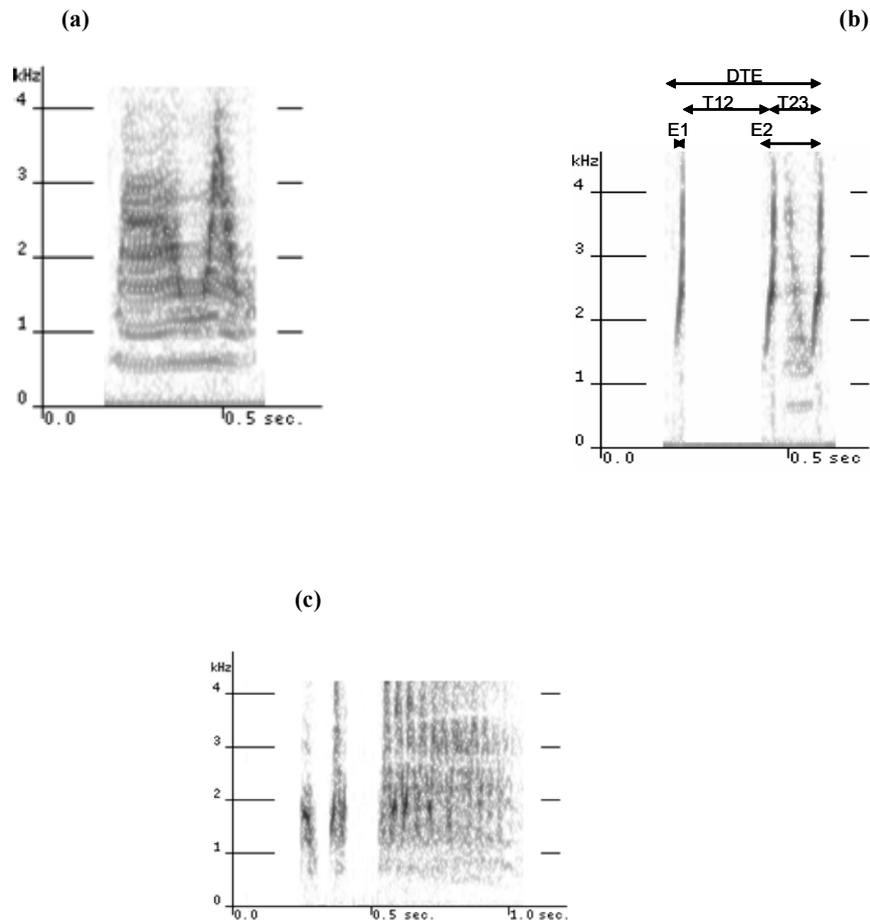


Figure 1 : Sonagrammes des chants de caille. (a) *wawa* introductif et (b) triolet de la caille des blés. (c) chant de caille japonaise. Sur le sonagramme du triolet (b), les mesures temporelles réalisées sont notées : durée du premier (E1) et du second (E2) élément, intervalle de temps entre les deux premières (T12) ou les deux dernières (T23) syllabes et durée totale du chant (DTE).

3. RÉSULTATS

3.1. Marqueurs moléculaires

Tous les locus analysés se sont avérés polymorphes et, sur l'ensemble, 400 allèles ont été identifiés. Le nombre d'allèles par locus (tabl. II) varie entre 7 (*GUJ0050*, *GUJ0090*) et 32 (*GUJ0085*). Il est plus élevé chez les cailles des blés que chez les cailles japonaises. Dans le cadre de notre échantillonnage, des allèles spécifiques ont été identifiés chez *C. c. coturnix* (264) et chez *C. c. japonica* (11). Certains de ces allèles ont une fréquence supérieure à 5 % : 71 chez *C. c. coturnix* et 6 chez *C. c. japonica*. L'Analyse Factorielle des Correspondances (fig. 2) montre une claire différenciation entre les cailles des blés et les cailles japonaises et, au sein de ces dernières, entre les individus provenant du Japon et ceux des troupeaux expérimentaux de l'INRA. Trois individus, appartenant à l'échantillon « cailles des blés - chasse » se positionnent exactement entre les deux groupes taxonomiques. Ces individus seront nommés *individus remarquables* dans la suite du texte.

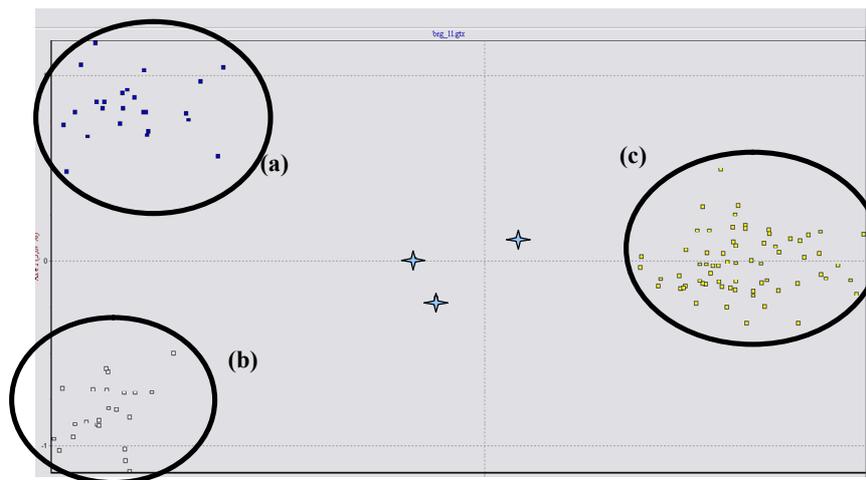


Figure 2 : Analyse Factorielle des Correspondances réalisée à partir des fréquences alléliques de tous les animaux génotypés en microsatellites. (a) cailles japonaises (échantillon du Japon) ; (b) cailles japonaises (souche INRA) ; (c) cailles des blés (sud-est de la France). Les ◆ représentent les trois individus provenant de l'échantillonnage d'animaux issus de la chasse et exhibant une position intermédiaire, sur l'AFC, entre les deux taxons.

Huit haplotypes mitochondriaux ont été observés. L'un (Hj) est présent chez tous les individus appartenant au taxon caille japonaise ainsi que chez les mêmes *individus remarquables*. Les 7 autres haplotypes (H1 – H7) ne sont trouvés que chez les cailles provenant de la chasse. L'estimation de la dis-

tance génétique entre les haplotypes révèle une divergence maximale entre H_j et l'ensemble des autres haplotypes (1,670 – 2,307 % de divergence nucléotidique), de l'ordre de quatre à huit fois supérieure à celle observée entre les haplotypes H₁ à H₇ (0,206 – 0,621 %).

3.2. Chants

Pour les 24 cailles enregistrées en 2005, nous avons traité 152 séquences de chant avec, en moyenne, 6,3 séquences par individu (de 3 à 12 séquences selon les individus). Le nombre moyen de chants par séquence pour chaque individu est illustré à la figure 3. Les individus ont présenté entre 1 et 8 chants par séquence, avec une moyenne proche de 4 chants, certains présentant même jusqu'à 6 chants en moyenne par séquence. Aucun mâle n'émet de chant isolément de manière répétée comme le ferait un mâle de caille japonaise. Seuls deux individus ont des séquences composées en moyenne proche de 3 chants par séquence (caille C1 : $3,0 \pm 0,3$, n = 9 ; caille C4 : $2,9 \pm 0,1$, n = 7).

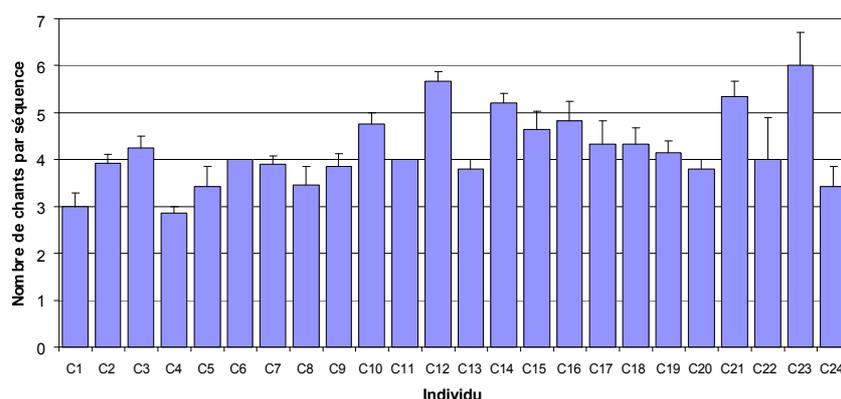


Figure 3 : Nombre de chants par séquence (m+ES) pour chaque caille enregistrée (C1 à C24).

En ce qui concerne les structures de chant, nous n'avons identifié aucun chant de caille japonaise. Les 28 oiseaux échantillonnés ont majoritairement montré des structures typiques de la caille des blés, c'est à dire des triolets, des *wawa* ou *wawawa*. Toutefois, 9 cailles (2 en 2004 et 7 en 2005) ont aussi émis des chants de structure anormale par rapport aux chants de la caille des blés (tabl. III) dont la proportion varie d'environ 5 à 25 % des chants enregistrés par individu (fig. 4). Les chants anormaux sont principalement des chants introductifs à la séquence (fig. 5). Il s'agit de combinaisons de notes de *wawa* (les *wa*) et de triolets (les *buit*). Ces chants sont le plus souvent composés de 3 syllabes tels que les chants *wawabuit* et *buitwawa* qui sont émis

Introgression génétique chez la caille des blés

chacun par quatre individus différents. Les combinaisons *buitbuitwa* et *buitwabuit* n'ont été émises qu'une seule fois par deux individus différents. De manière individuelle, apparaissent d'autres combinaisons de 2 syllabes (*buitbuit*) ou de 4 syllabes (*buitwawabuit* ou *buitbuitbuitbuit*). Ainsi, la plupart des mâles n'émettent qu'un type de chant de structure anormale alors que d'autres peuvent (mâle C13) en produire jusqu'à 4 différents (tabl. III). On notera que les mâles C10, C16, C26 et C27 n'ont émis que peu de chants anormaux (entre 1 et 3), soit moins de 10 % de leur production vocale échantillonnée.

Tableau III : Effectif des différentes combinaisons de chants anormaux émis par chaque caille. En grisé : les animaux pour lesquels plus de 10 % de la production vocale enregistrée est anormale.

Caille	<i>buitbuit</i>	<i>wawabuit</i>	<i>buitbuitwa</i>	<i>buitwawa</i>	<i>buitwabuit</i>	<i>buitwawabuit</i>	<i>buitbuitbuitbuit</i>
C7		4					
C10		1					
C11		6					
C12			1	3			
C13		1		1	1	1	
C14	6						
C16				2			
C26				3			
C27							1

Les mesures temporelles sur les triolets (paramètres E1, E2, T12, T23 et DTE – fig. 1) ont été effectuées sur les sonagrammes de 366 triolets parmi les 573 enregistrés, 200 enregistrements ne permettant pas une analyse correcte (faible intensité, bruit de fond...). Pour tous les oiseaux, les valeurs de ces paramètres (résultats non montrés) correspondent à celles observées habituellement chez la caille des blés [25], [27].

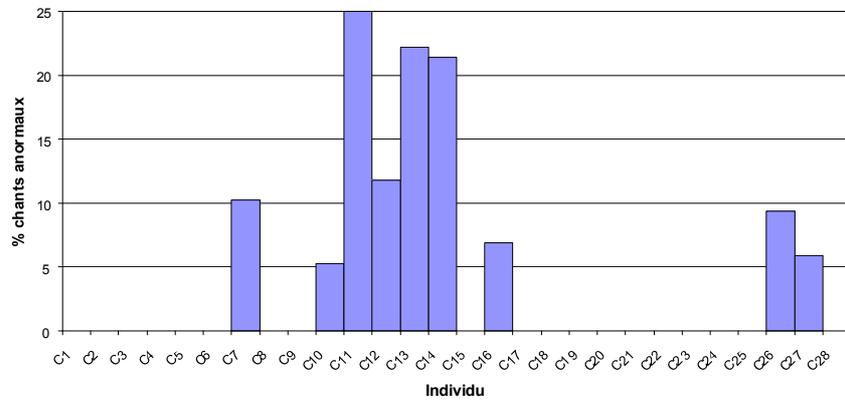


Figure 4 : Pourcentage de chants anormaux émis par tous les oiseaux (C1 à C 28).

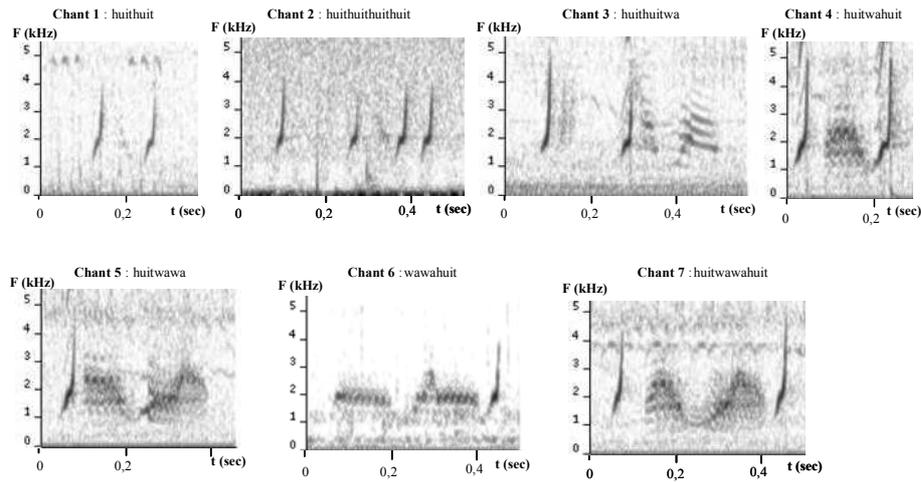


Figure 5 : Sonagramme de chants anormaux de caille des blés. Ce sont soit des combinaisons de 2 ou 4 notes de triolet (chant 1 et 2), soit des combinaisons de 3 (chant 2 à 5) voire 4 notes (chant 6) de triolet et de *wawa*.

4. DISCUSSION

Dans notre étude, 3 *individus remarquables* (sur 83 oiseaux échantillonnés dans le milieu naturel) sont clairement identifiés comme étant des hybrides. L'utilisation conjointe des marqueurs nucléaires et mitochondriaux permet la mise en évidence de l'introgression génétique et l'étude du sens de cette introgression, c'est à dire la participation d'un seul ou des deux sexes de

chaque taxon à ce processus [4], [45]. Nous sommes ici vraisemblablement en présence d'individus hybrides de première génération, dont la mère est une caille japonaise. Une hybridation préférentiellement dirigée dans le sens femelle *C. c. japonica* x mâle *C. c. coturnix* concorde avec les études montrant que les femelles de cailles japonaises répondent de manière identique aux chants des mâles, qu'ils soient japonais, blés ou hybrides alors que les femelles de cailles des blés répondent surtout aux mâles de la même espèce [15], [23]. De tels hybrides sont probablement des animaux nés et élevés en captivité. En effet, l'analyse de leurs ailes révèle la présence de rémiges aux extrémités cassées, ce qui aurait pu survenir si ces animaux avaient été élevés en cage, où leurs ailes se seraient abîmées par frottements contre les barreaux. Une étude récente [6] a mis en évidence l'existence d'animaux hybrides au sein des populations naturelles présentes en Espagne, en Italie et au Sénégal. Si les données mitochondriales sont tout à fait comparables aux nôtres, on notera que seuls 6 locus microsatellites ont été utilisés, ce qui entraîne un risque non négligeable de voir apparaître des individus mal classés [12], [18].

Aucun chant spécifique de caille japonaise n'a été observé, au cours de notre étude, sur les aires de reproduction en tant que mâle chanteur. Il semble donc que les cailles japonaises trouvées en France en automne lors des périodes de chasse (ONCFS, communication personnelle ; Rognon, données non publiées), interviennent peu lors de la phase de reproduction au printemps, la plupart d'entre elles ayant été tuées pendant la période de chasse ou bien ne survivant pas durant l'hiver. Bien sûr, ces éléments n'excluent pas la présence et la persistance d'oiseaux hybrides dans la population reproductrice de cailles des blés. En effet, nos enregistrements ont révélé la présence d'oiseaux qui présentaient des séquences de chant plus courtes que les cailles des blés et qui pourraient correspondre à des hybrides [14]. Mais, durant la séquence de chants, les mâles commencent par des chants de faible intensité (60 dB) pour finir par des chants de plus fortes intensités (90 dB) [25], et donc, selon la position de l'expérimentateur, les premiers chants de la séquence pourraient être non perçus et la taille de la séquence alors sous-estimée. Le résultat le plus tangible, par rapport à l'hybridation, réside dans le fait de trouver certains individus qui présentent des chants de structure anormale par rapport à la structure des vibratos introductifs et des triolets de la caille des blés, car les combinaisons entre les notes de triolet et les notes de *wawa* introductifs sont sans conteste révélatrices d'hybridation. Étant donné que les cailles C10, C16, C26 et C27 n'ont émis que peu de chants anormaux (entre 1 et 3, ce qui correspond à moins de 10 % de leur production vocale échantillonnée), il semble prudent de ne pas tirer de conclusion sur ces individus. Il reste cependant 5 oiseaux ayant produit des chants de structure atypique par rapport à ceux de la caille des blés. Toutefois, les mâles issus de la seconde génération d'hybrides ou de

rétrocroisements peuvent aussi exprimer des chants identiques à la caille des blés [16], d'où une sous-estimation des individus potentiellement hybrides. Une particularité supplémentaire est que ces chants anormaux sont observés alors que les oiseaux émettent en majorité des triolets normaux. En effet, la caille des blés présente un chant déterminé génétiquement avec une forte stabilité intra-individuelle [28]. Un mâle ne devrait émettre qu'un *wawa* et qu'un triolet de structure unique. Cette diversité est indicatrice d'oiseaux hybrides. Des structures aberrantes de chant de caille ont déjà été entendues dans le sud-ouest de la France dès les années 80 [31]. En retrouver dans la région de l'étude ne semble pas étonnant en raison de sa proximité avec l'Italie où une situation d'introggression génétique de certaines populations de cailles des blés a été aussi observée [6].

Les premiers résultats concernant la pertinence de ce caractère (le chant des mâles reproducteurs) pour le suivi et la gestion des populations sauvages de cailles des blés sont encourageants mais ils demandent à être confirmés par de nouvelles analyses *in situ* et *ex situ*. Il s'agit notamment d'améliorer les conditions d'enregistrement des chants et d'accroître la base de données de chants de références, tant pour les deux taxons, que pour les animaux hybrides, afin de mieux connaître la gamme de variation rencontrée au sein et entre tous ces types génétiques.

Notre étude confirme que les deux taxons de cailles, très proches génétiquement, sont susceptibles de s'hybrider dans la nature. Cette introggression a des conséquences morphologiques et comportementales. En effet, les individus issus de croisement n'expriment généralement pas le comportement migratoire de leur parent « sauvage », ou alors, avec une intensité plus faible [17], [24]. Il y a donc un risque de voir apparaître des populations d'animaux sédentaires ou faiblement migrateurs qui, sous nos latitudes, survivront difficilement pendant l'hiver. Ce phénomène sera d'autant plus important que le flux d'animaux d'élevage est quantitativement élevé. Malheureusement, nous ne possédons pas ou peu d'information sur les lâchers car ces derniers sont illégaux. Notamment, il n'y a pas d'information disponible sur la survie des animaux lâchés, au contraire de la situation rencontrée chez d'autres espèces de gibier comme le faisane ou la perdrix. Depuis les années 80 et 90, le durcissement du règlement concernant la protection de l'avifaune (UE - Directive oiseaux sauvages 79/409) a permis de limiter cette activité. Si des lâchers illégaux persistent encore aujourd'hui, les introductions d'animaux d'élevage sont principalement dues à des échappées de cailles d'élevage utilisées pour le dressage des chiens d'arrêts (qui est aussi une pratique interdite). Ceci confirme l'importance de la lutte envers les lâchers de cailles japonaises afin de conserver l'intégrité génétique de *C. a. coturnix*. Les outils développés ici seront utiles au suivi des populations naturelles de cailles dans le cadre des programmes de gestion de l'avifaune. Plus

particulièrement, le panel de marqueurs moléculaires, associant microsatellites et ADNmt, nous permet un diagnostic rapide du statut génétique de tout individu prélevé dans la nature ou dans un élevage et le suivi des flux de gènes dans les populations sauvages.

REMERCIEMENTS

Nous souhaitons remercier les agents techniques et techniciens de l'environnement à l'ONCFS, les techniciens des fédérations départementales des chasseurs et les chasseurs qui ont participé à l'échantillonnage des cailles des blés sauvages, ainsi que les professeurs M. INOUE-MURAYAMA et S. ITO qui nous ont aimablement fourni l'échantillon d'ADN de cailles provenant du Japon. Nous remercions également Jean-Charles GUYOMARC'H et Sébastien DERÉGNAUCOURT pour leurs commentaires sur les analyses des chants. Ce projet a été financé par le Bureau des Ressources Génétiques.

RÉFÉRENCES

- [1] Aebischer N., Lucio A., Red-legged Partridge, in: Hagemeyer W.J.M., Blair M. (eds) The EBCC Atlas of European Breeding Birds: Their Distribution and Abundance, Poyser. London, 1997, pp. 208-209.
- [2] Andersson M., Hybridization and skua phylogeny, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 266 (1999) 1579-1585.
- [3] Arnold M.L., Natural hybridization and evolution, Oxford University Press. New York, Oxford, 1997, 215 p.
- [4] Avise C., Molecular markers, natural history and evolution, Chapman & Hall, New York, London, 1994, 511 p.
- [5] Baratti M., Ammannati M., Magnelli C., Dessi-Fulgheri F., Introgression of chukar genes into a reintroduced red-legged partridge (*Alectoris rufa*) population in central Italy, Anim. Genet. 36 (2005) 29-35.
- [6] Barilani M., Derégnaucourt S., Gallego S., Galli L., Mucci N., Piombo R., Puigcerver M., Rimondi S., Rodriguez-Teijeiro J.D., Spano S., Randi, E., Detecting hybridization in wild (*Coturnix c. coturnix*) and domesticated (*Coturnix c. japonica*) quail populations, Biol. Conserv. 126 (2005) 445-455.
- [7] Barton N.H., The role of hybridization in evolution, Mol. Ecol. 10 (2001) 551-568.
- [8] Barton N.H., Hewitt G.M., Adaptation, speciation and hybrid zones, Nature 341 (1989) 497-502.
- [9] Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F., GENETIX 4.05, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (1996-2004).
- [10] Benzécri J.P., L'Analyse des données. Tome 2: Analyse des correspondances, Dunod, Paris, 1973.

- [11] Bernachez L., Savard L., Dodson J.J., Pallotta D., Mitochondrial DNA sequence heterogeneity among James-Hudson Bay anadromous coregonines, *Fin. Fish. Res.* 9 (1988) 17-26.
- [12] Bjørnstad G., Roed K. H., Breed demarcation and potential for breed allocation of horses assessed by microsatellite markers, *Anim. Genet.* 32 (2001) 59-65.
- [13] Del Hoyo J., Elliott A., Sargatal J., Handbook of the birds of the world, vol 2, Lynx, Barcelona, 1994, 509 p.
- [14] Derégnaucourt S., Hybridation entre la caille des blés (*Coturnix c. coturnix*) et la caille japonaise (*Coturnix c. japonica*) : mise en évidence des risques de pollution génétique des populations naturelles par les cailles domestiques. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1, 2000, 260 p.
- [15] Derégnaucourt S., Guyomarc'h J.-C., Mating call discrimination in female European (*Coturnix c. coturnix*) and Japanese quail (*Coturnix c. japonica*). *Ethology*, 109 (2002), 107-119.
- [16] Derégnaucourt S., Guyomarc'h J.-C., Richard V., Classification of hybrid crows in quail using artificial neural networks, *Behav. Process.* 56 (2001) 103-112.
- [17] Derégnaucourt S., Guyomarc'h J.-C., Belhamra M., Comparison of migratory tendency in European quail *Coturnix c. coturnix*, domestic Japanese quail, *Coturnix c. japonica* and their hybrids. *Ibis* 147 (2005) 25-36.
- [18] Estoup A., Gharbi K., SanCristobal M., Chevalet C., Haffray P., Guyomard R., Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55 (1998) 715-725.
- [19] Felsenstein J., PHYLIP Phylogeny Inference Package, version 3.65, Seattle, University of Washington (1980-2005).
- [20] Fumihito A., Miyake T., Sumi S.I., Takada M., Ohno S., Kondo N., One subspecies of the red junglefowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 12505-12509.
- [21] Grant P.R., Grant B.R., Genetics and the origin of bird species, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 7768-7775.
- [22] Green A., Hughes B., Plan d'action pour l'Erismature à tête blanche en Europe, in: Heredia B. (ed) Les oiseaux mondialement menacés, situation en Europe plans d'action, Eds du Conseil de l'Europe. Strasbourg, 1997, pp. 141-170.
- [23] Guyomarc'h J.C., Elements for a common quail (*Coturnix c. coturnix*) management plan, *Game Wildl. Sci.* 20 (2003) 1-92.
- [24] Guyomarc'h J.C., Belhamra M., Effets de la sélection sur l'expression des tendances sexuelles et migratoires chez une population captive de caille des blés (*Coturnix c. coturnix*), *Cah. Ethol.* 18 (1998) 1-16.
- [25] Guyomarc'h J.C., Guyomarc'h C., Vocal communication in European quail; comparison with Japanese quail, *C. R. Acad. Sci. Paris* 319 (1996) 827-834.
- [26] Guyomarc'h J.C., Thibout E., Rythmes et cycles dans l'émission du chant chez la caille japonaise (*Coturnix c. japonica*), *Rev. Comp. Anim.* 3 (1969) 37-49.
- [27] Guyomarc'h J.C., Hémon Y.A., Guyomarc'h C., Michel R., Le mode de dispersion des mâles de cailles des blés (*Coturnix c. coturnix*), *C. R. Acad. Sci. Paris* 299 (1984) 805-808.

- [28] Guyomarc'h J.C., Aupiais A., Guyomarc'h C., Individual differences in the long-distance vocalizations used during pair bonding in European quail (*Coturnix coturnix*), *Ethol. Ecol. Evol.* 10 (1998a) 333-346.
- [29] Guyomarc'h J.-C., Combreau O., Puigcerver M., Fontoura P., Aebischer N., *Coturnix coturnix*: Quail, BWP Update 2 (1998b) 27-46.
- [30] Hall T., BioEdit version 5.0.6, Biological sequence alignment editor for Win95/98/NT/2K/XP (1997-2005) - <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- [31] Hémon Y.A., Structure vocale, positionnement et dispersion des chanteurs chez la caille des blés en Lauragais. Mémoire de DEA, Université de Rennes 1, 1983.
- [32] Inoue-Murayama M., Kayang B.B., Kimura K., Ide H., Nomura A., Takahashi H., Nagamine Y., Takeda T., Hanada H., Tatsuda K., Tsudzuki M., Matsuda Y., Mizutani M., Murayama Y. and Ito S., Chicken microsatellite primers are not efficient markers for Japanese quail. *Anim. Genet.* 32 (2001) 7-11
- [33] Johnsgard P.A., Genus *Coturnix* Bonnaterre 1791, in: Johnsgard P.A. (ed) *The quails, Partridges and Francolins of the world*, Oxford University Press. Oxford, 1988, pp. 192-205.
- [34] Kayang B.B., Inoue-Murayama M., Nomura A., Kimura K., Takahashi H., Mizutani M., Ito S., Fifty microsatellite markers for Japanese quail, *J. of Hered.* 91(2000) 502-505.
- [35] Kayang B.B., Inoue-Murayama M., Hoshi T., Matsuo K., Takahashi H., Minezawa M., Mizutani M., Ito S., Microsatellite loci in Japanese quail and cross-species amplification in chicken and guinea fowl. *Gen. Select. Evol* 34 (2002) 233-253.
- [36] Kayang B.B., Fillon V., Inoue-Murayama M., Miwa M., Leroux S., Fève K., Monvoisin J.-L., Pitel F., Vignoles M., Mouilhayrat C., Beaumont C., Ito S., Minvielle F., Vignal A., Integrated maps in quail (*Coturnix japonica*) confirm the high degree of synteny conservation with chicken (*Gallus gallus*) despite 35 million years of divergence. *BMC Genetics* (sous presse).
- [37] Kimura M., A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *J. Mol. Evol.* 16 (1980) 111-120.
- [38] Lefeuvre J.C. (Coordonnateur), Rapport scientifique sur les données à prendre en compte pour définir les modalités de l'application des dispositions légales et réglementaires de chasse aux oiseaux d'eau et oiseaux migrateurs en France. Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, 1999, 204 pp.
- [39] Mank J.E., Carlson J.E., Brittingham M.C., A century of hybridization: Decreasing genetic distance between American black duck and mallards *Conserv. Genet.* 5 (2004) 375-403.
- [40] Minvielle F., Genetics and breeding of Japanese quail for production around the world, in: *Proceedings of the 6th Asian Pacific Poultry Congress*, Nagoya, June 4-7th 1998, Japan Poultry Science Association, 1998, pp. 122-127.
- [41] Moreau R.E., Wayre P., On the Palearctic quails, *Ardea* 56 (1968) 209-226
- [42] Nei M., *Molecular evolutionary genetics*, Columbia University Press, New York, 1987, 505 p.
- [43] Orth A., Adama T., Din W., Bonhomme F., Hybridation naturelle entre deux sous-espèces de souris domestique, *Mus musculus domesticus* et *Mus musculus castaneus*, près du lac Casitas (Californie) *Genome* 41 (1998) 104-110.

- [44] Richard JP., Sound analysis and synthesis using an Amiga micro-computer, *Bioacoustics* 3 (1991) 45-60.
- [45] Rognon X., Guyomard R., Large extent of mitochondrial-DNA transfer from *Oreochromis aureus* to *O. niloticus* in West Africa, *Mol. Ecol.* 12 (2003) 435-445.