

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2010 - Thèse n° 082



***SEXAGE DES PSITTACIFORMES :
MISE AU POINT D'UN TEST MOLECULAIRE ET
MISE EN APPLICATION D'UNE METHODE PAR
ENDOSCOPIE***

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 26 Novembre 2010
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Yannick LAMBERT
Né le 07 Septembre 1984
à Grenoble (38)



ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2010 - Thèse n°



SEXAGE DES PSITTACIFORMES : MISE AU POINT D'UN TEST MOLECULAIRE ET MISE EN APPLICATION D'UNE METHODE PAR ENDOSCOPIE

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 26 Novembre 2010
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Yannick LAMBERT
Né le 07 Septembre 1984
à Grenoble (38)

Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, membre de UNIVERSITE DE LYON



Nom	Prénom	Grade	
ALOGNINOIWA	Théodore	PR1	UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	MC Classe Normale	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé) - Dpt Production animale
ARCANGIOLI	Marie-Anne	MC Classe Normale	UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale UR UMR ENVL AFSSA Mycoplasmoses des Ruminants
ARTOIS	Marc	PR1	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Production animale UR UMR 5525 CNRS EJV EPHE INP ENVL TIMC-IMAG
AVISON	Timothy	PCEA	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé)
BECKER	Claire	MC Classe Normale Stagiaire	UP Pathologie du bétail UR UMR ENVL AFSSA Mycoplasmoses des Ruminants
BELLI	Patrick	MC Contractuel	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Analyses de Laboratoire
BELLUCO	Sara	MC Classe Normale Stagiaire	UP Pathologie Morphologique et Clinique
BENAMOU-SMITH	Agnès	MC Classe Normale	UP Equine - Dpt Equine UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
BENOIT	Etienne	PR1	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
BERNY	Philippe	PR2	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
BERTHELET	Marie-Anne	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs)
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	PR2	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL ERI 22 (INSERM) Agression Vasculaire Réponse tissulaire PT Logistique Bureau de la Pédagogie et de la Vie Etudiante Direction Adjoint au directeur - Chargée de la Vie étudiante
BOULOCHER	Caroline	MC Classe Normale Stagiaire	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) Dpt Carnivores - UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
BOURDOISEAU	Gilles	PR1	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Carnivores UR Thématique Leishmaniose Direction Adjoint au Directeur
BOURGOIN	Gilles	MC Classe Normale	PT Laboratoires d'analyses Parasitologie
BRUYERE	Pierre	MC Contractuel	UP Reproduction
BUBLOT	Isabelle	MC Contractuel	UP Médecine des Carnivores - Dpt Carnivores
BUFF	Samuel	MC Classe Normale	UP Reproduction - Dpt Carnivores UR UPSP ENVL ISARA Cryoconservation des ressources génétiques par la voie femelle PT CERREC PT Formation continue
BURONFOSSE	Thierry	MC Hors Classe	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Analyses de Laboratoire UR UMR 271 INSERM Hépatites virales
CADORE	Jean-Luc	PR1	UP Médecine des Carnivores - Dpt Equine UR UMR 754 INRA - UCBL - ENVL - EPHE Rétrovirus Pathologie comparée Direction Adjoint au directeur - Chargé de missions
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie UR UMR 958 Protozoaires entériques des volailles
CAROZZO	Claude	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
CHABANNE	Luc	PR2	UP Médecine des Carnivores Dpt Carnivores UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigènes
CHALVET-MONFRAY	Karine	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) Dpt Industrie UR UMR 5525 CNRS EJV EPHE INP ENVL TIMC-IMAG
COMMUN	Loic	MC Contractuel	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé) Dpt Analyses de Laboratoire
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	PR2	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie UR UMR CNRS 5558
DEMONT	Pierre	PR2	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie
DESJARDINS PESSON	Isabelle	MC Contractuel	UP Equine
EGRON-MORAND	Germaine	MC Classe Normale	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé) Dpt Production animale
ESCRIOU	Catherine	MC Classe Normale	UP Médecine des Carnivores Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
FAU	Didier	PR2	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) Dpt Carnivores - UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
FLEURY	Catherine	PR2	UP Equine - Dpt Equine
FOURNEL	Corinne	PR1	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Carnivores UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigènes
FRANCK	Michel	PR1	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé) - Dpt Production animale -
FRIKHA	Mohamed-Ridha	MC Classe Normale	UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale
GANGL	Monika	MC Contractuel	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Equine
GARNIER	François	PR1	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Carnivores
GENEVOIS	Jean-Pierre	PRX	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivores
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	PR2	UP Biologie Fonctionnelle

Nom	Prénom	Grade	
GONTHIER	Alain	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie UR UMR 958 Protozoaires entériques des volailles
GRAIN	Françoise	PR2	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé) Dpt Analyses de Laboratoire PT Logistique Bureau de la Pédagogie et de la Vie Etudiante Direction Adjoint au directeur - Chargée de la Pédagogie
GRANCHER	Denis	MC Hors Classe	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé) - Dpt Production animale UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques Direction Adjoint au directeur - Chargé des relations inférieures
GREZEL	Delphine	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie
GUERIN	Pierre	PR2	UP Reproduction - Dpt Production animale UR UPSP ENVL ISARA Cryoconservation des ressources génétiques par la voie femelle
GUERIN-FAUBLEE	Véronique	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Analyses de Laboratoire UR UMR CNRS 5558
HUGONNARD	Marine	MC Classe Normale	UP Médecine des Carnivores - Dpt Carnivores UR UMR 5557 UCBL CNRS ENVL INRA Ecologie Microbienne
JAUSSAUD	Philippe	PR1	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie PT Laboratoires d'analyses Laboratoire LEPS
JUNOT	Stéphane	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL ERI 22 (INSERM) Agression Vasculaire Réponse tissulaire
KECK	Gérard	PR1	UP Biologie fonctionnelle Dpt Industrie UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
KODJO	Angeli	PR2	UP Santé Publique Vétérinaire Dpt Industrie UR UMR 5557 UCBL CNRS ENVL INRA Ecologie Microbienne
LACHERETZ	Antoine	PR1	UP Santé Publique Vétérinaire Dpt Industrie
LAMBERT	Véronique	MC Classe Normale	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé) Dpt Analyses de Laboratoire
LE-GRAND	Dominique	MC Hors Classe	UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale
LEBLOND	Agnes	PR2	UP Santé Publique Vétérinaire Dpt Equine UMR INRA EPIA - UR 346
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	MC Classe Normale	UP Reproduction - Dpt Equine UR UPSP ENVL ISARA Cryoconservation des ressources génétiques par la voie femelle
LEPAGE	Olivier	PR1	UP Equine - Dpt Equine
LOUKIADIS	Estelle	ISPV	UR UPSP 5201 Microbiologie alimentaire et prévisionnelle
LOUZIER	Vanessa	MC Classe Normale	UP Biologie Fonctionnelle
MARCHAL	Thierry	MC Hors Classe	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Carnivores UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigènes
MARTIN	Gillian	PCEA	PT Logistique LANGUES
MIALET	Sylvie	ISPV	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie
MOUNIER	Luc	MC Classe Normale	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé) - Dpt Production animale UR UMR INRA URH
PIN	Didier	MC Classe Normale	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Carnivores
PONCE	Frédérique	MC Classe Normale	UP Médecine des Carnivores + Dpt Carnivores UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigènes
PORTIER	Karine	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Equine
POUZOT	Céline	MC Contractuel	PT CHEV CHEVAC - SIAMU
PROUILLAC	Caroline	MC Classe Normale	PT CHEV UMR 1233 Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
REMY	Denise	PR2	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivores UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie
RICHARD	Yves	PRX	UR UMR 5557 UCBL CNRS ENVL INRA Ecologie Microbienne PT Logistique Bureau de la Recherche Direction Directeur scientifique
ROGER	Thierry	PR1	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Industrie UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux PT ICLB PT Formation continue
SABATIER	Philippe	PR2	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Production animale UR UMR 5525 CNRS EJF EPHE INP ENVL TIMC-IMAG
SAWAYA	Serge	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) Dpt Equine UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
SERGEANT	Delphine	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie UR UPSP 5201 Microbiologie alimentaire et prévisionnelle
THIEBAULT	Jean-Jacques	MC Hors Classe	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Carnivores
VIALARD	Jacquemine	MC Hors Classe	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé) - Dpt Analyses de Laboratoire -
VIGUIER	Eric	PR1	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	MC Contractuel	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Analyses de Laboratoire
ZENNER	Lionel	PR2	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Production animale

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean-François GUERIN

De la Faculté de médecine de Lyon

Pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse

Hommages respectueux

A Madame le Professeur Françoise GRAIN

De l'École Nationale Vétérinaire de Lyon

Pour nous avoir proposé ce travail et nous avoir encadré lors de sa réalisation

Sincère et profonde reconnaissance

A Monsieur le Professeur Pierre GUERIN

De l'École Nationale Vétérinaire de Lyon

Pour avoir accepté de faire partie de ce jury

Sincères remerciements

A Madame Karine GROUD

Du Laboratoire Vétérinaire Départemental du Rhône

Pour son aide technique, sa disponibilité et ses précieux conseils

Toute ma gratitude

Au Docteur Yannick ROMAN

Du Parc de Clères

Pour son accueil au Parc de Clères en tant que Docteur Vétérinaire, et son aide précieuse pour la réalisation d'une partie de ce travail

Sincère et profonde reconnaissance

A mes parents,
qui ont toujours cru en leurs enfants. Merci pour votre aide, votre soutien, votre présence. Ce travail, symbole de la fin de mes études et du début de ma carrière vous est entièrement dédié. Je suis sans doute aussi fier de vous que vous l'êtes de moi. Merci.

A mes frères et sœurs.

A Nicolas, Cédric, Jérémy, merci pour votre soutien, vos aller-retours à Lyon, votre écoute.

A Laurène que j'aime tant. Continue de briller par ta beauté, ta perfection et ta réussite scolaire.

A Christelle, que je voudrais plus proche.

A Linda et bientôt Alessio que j'aime déjà.

A toute ma famille.

A Delphine et Carine, votre soutien sans limite et votre aide précieuse, votre amitié sans faille, vos hébergements répétés, nos soirées et nos apéros. Merci d'avoir toujours été là.

A Manu, mon meilleur ami, Roxana sa femme et la petite princesse Ida. Votre chemin est un exemple, votre histoire une réussite, votre petite famille parfaite et votre princesse la plus belle. Merci pour vos accueils, votre aide, votre amitié.

A Sabine, qui croit que Delphine et Carine sont ses amies avant d'être les miennes. Je ne sais comment te remercier d'avoir partagé autant de choses avec moi. Nous nous sommes soutenus tout au long de nos études, nous nous sommes suivis, insultés, nous avons gaffé, bu, flippé, pour finalement réussir. A notre carrière et notre avenir. Merci d'être toi.

A Laura, Sarah, Caro, Gaelle, Thierry, leurs moitiés. A notre amitié qui dure déjà depuis des années et qui reste inchangée. A tout ce que nous avons vécu, et ce que nous vivons ensemble.

A tous mes amis de Grenoble.

A tous mes amis de Lyon, en particulier mon groupe de clinique qui a supporté mes humeurs et Julia, ma colocataire, pour toutes ces années passées ensemble.

A la famille Campredon, Julie, Louise et Paul, pour ces années passées ensemble, nos fou-rires, votre aide, votre soutien. Merci.

A Yannick, un deuxième remerciement moins solennel que la page précédente, mais un remerciement spécial, pour m'avoir offert un stage inoubliable dans un parc merveilleux. Tu m'as appris tant de choses qu'il n'est pas possible d'en faire la liste : mon métier avant tout, mais aussi la nature, le goût des bonnes choses, l'utilité de ne jamais s'énerver, la mer et la Normandie. C'est parce que tu m'as transmis cet art de soigner les oiseaux que je me sens capable aujourd'hui de m'occuper d'eux sans qu'ils en laissent trop de plumes. Tu as fais de moi un vrai spécialiste, pour qui tu restes le modèle. Avoir travaillé avec toi est une fierté, merci profondément.

A Julie Levrier, pour avoir accepté de m'héberger, pour m'avoir supporté et écouté, et avoir subi mes gaffes. Merci.

A tous mes amis Normands, à l'équipe du parc de Clères, en particulier Cyril et Didier, pour leur encadrement au cours de ce stage.

A Marie-Clothilde Delvarre que je n'oublierais jamais, pour son accueil chaleureux, et ses mois passés ensemble.

A Mémé, qui supervise de la haut, et guide nos pas. Tu nous manques tant.

TABLE DES MATIÈRES

INDEX DES ILLUSTRATIONS.....	17
INDEX DES TABLES.....	19
LISTE DES ANNEXES.....	21
INTRODUCTION.....	23
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	27
CHAPITRE 1 : TAXONOMIE ET MONOGRAPHIE DES PERRUCHES ET PERROQUETS.....	29
I.Taxonomie.....	29
II.Monographie.....	30
A.Perroquets du continent océanien.....	30
1.La perruche ondulée (<i>Melopsittacus undulatus</i>).....	30
2.La perruche Calopsitte (<i>Nymphicus hollandicus</i>).....	31
3.Les Euphèmes (genre <i>Neophema</i>).....	32
a.La perruche Turquoise (<i>Neophema pulchella</i>).....	32
b.La perruche splendide (<i>Neophema splendida</i>).....	32
c.La perruche élégante (<i>Neophema elegans</i>).....	33
d.La perruche vénuste (<i>Neophema chrysostoma</i>).....	33
e.La perruche de Bourke (<i>Neopsephotus bourkii</i>)	33
4.Les Platycerques (Genre <i>Platycercus</i>).....	33
a.La perruche Omnicolore (<i>Platycercus eximius</i>).....	34
b.La perruche de Pennant (<i>Platycercus elegans</i>).....	34
c.La perruche de Stanley (<i>Platycercus icterotis</i>).....	34
d.La perruche Pallicepe (<i>Platycercus adscitus</i>).....	34
5.Les Polytèles (Genre <i>Polytelis</i>).....	34
a.La perruche Princesse de Galles (<i>Polytelis alexandrae</i>).....	34
b.La perruche Mélanure (<i>Polytelis anthopeplus</i>).....	35
c.La perruche de Barraband (<i>Polytelis swainsonii</i>).....	35
6.Le Genre <i>Barnardius</i>	35
a.La perruche de Barnard (<i>Barnardius barnardi</i>).....	35
b.La perruche Port Lincoln (<i>Barnardius zonarius</i>).....	35
7.Les Pséphotes (Genre <i>Psephotus</i>).....	36
a.La perruche à croupion rouge (<i>Psephotus haematonotus</i>).....	36
b.La perruche multicolore (<i>Psephotus varius</i>).....	36
c.La perruche à ailes d'or (<i>Psephotus chrysopterygius</i>).....	36
d.La perruche à capuchon noir (<i>Psephotus dissimilis</i>).....	36
e.La perruche à bonnet bleue (<i>Northiella haematogaster</i>).....	36
8.Les Kakarikis (<i>Cyanoramphus</i> spp.).....	37
9.Autres grandes perruches australiennes.....	37
a.La perruche à tête pourpre (<i>Purpureicephalus spurius</i>).....	37
b.La perruche royale (<i>Alisterus scapularis</i>).....	37
c.La perruche Érythroptère (<i>Aprosmictus erythropterus</i>).....	37
d.La perruche de Latham (<i>Lathamus discolor</i>).....	37
10.Les Cacatoès (famille des <i>Cacatuidae</i>).....	39
a.Le Cacatoès blanc (<i>Cacatua alba</i>).....	39
b.Le petit Cacatoès à huppe jaune (<i>Cacatua sulphurea</i>).....	39

c.Le Cacatoès des Moluques (<i>Cacatua moluccensis</i>).....	39
d.Le Cacatoès à œil nu (<i>Cacatua sanguinea</i>).....	39
e.Le Cacatoès de Leadbeater (<i>Cacatua leadbeateri</i>).....	39
f.Le Cacatoès rosalbin (<i>Eolophus roseicapillus</i>).....	40
g.Le Cacatoès microglosse (<i>Probosciger aterrimus</i>).....	40
h.Le Cacatoès de Banks (<i>Calyptorhynchus</i> ou <i>C. banksii</i>).....	40
11.L'Eclectus (<i>Eclectus roratus</i>).....	40
12.Loris et Loriquets.....	40
a.Le Lori de Duyvenbode (<i>Chalcopsitta duivenbodei</i>).....	40
b.Le Lori noir (<i>Chalcopsitta atra</i>).....	41
c.Le Lori flamméché (<i>Chalcopsitta scintillata</i>).....	41
d.Le Lori cardinal (<i>Chalcopsitta cardinalis</i>).....	41
e.Le Loriquet orné (<i>Trichoglossus ornatus</i>).....	41
f.Le Loriquet à tête bleue (<i>Trichoglossus haematodus</i>).....	41
g.Le Loriquet de Goldie (<i>Psitteuteles goldiei</i>).....	41
h.Le Lori tricolore (<i>Lorius lory</i>).....	41
i.Le Lori noire (<i>Lorius garrulus</i>).....	41
j.Le Loriquet joli ou coquet (<i>Charmosyna placentis</i>).....	42
k.Le Lori arlequin, ou Lori bleu et rouge (<i>Eos histrio</i>).....	42
l.Le Loriquet papou (<i>Charmosyna papou</i>).....	42
m.Le Lori écarlate (<i>Eos bornea</i>).....	42
n.Le Lori à joues bleues (<i>Eos cyanogenia</i>).....	42
o.Le Lori sombre (<i>Pseudos fuscata</i>).....	42
13. Les Loricules (<i>Loriculus</i> spp.).....	44
14.Les perroquets de Nouvelle-Zélande.....	44
a.Le Kéa (<i>Nestor notabilis</i>).....	44
b.Le Kaka (<i>Nestor meridionalis</i>).....	44
c.Le Kakapo (<i>Strigops habroptilus</i>).....	45
B.Perroquets du continent asiatique : Le genre <i>Psittacula</i>	45
1.La perruche à collier (<i>Psittacula krameri</i>).....	46
2.La perruche à moustache (<i>Psittacula alexandri</i>).....	46
3.La perruche à tête de prune (<i>Psittacula cyanocephala</i>).....	46
4.La perruche Alexandre (<i>Psittacula eupatria</i>).....	46
5.La perruche de Derby (<i>Psittacula derbiana</i>).....	46
C.Perroquets du continent africain.....	48
1.Le Youyou du Sénégal (<i>Poicephalus senegalus</i>).....	48
2.Le perroquet de Meyer (<i>Poicephalus meyeri</i>).....	48
3.Le perroquet Gris du Gabon (<i>Psittacus erithacus</i>).....	48
4.Les Inséparables (Genre <i>Agapornis</i>).....	48
a.Inséparable à tête noire (<i>Agapornis personatus</i>).....	48
b.Inséparable à face rose (<i>Agapornis roseicollis</i>).....	48
c.Inséparable de Fischer (<i>Agapornis fischeri</i>).....	49
d.Inséparable d'Abyssinie (<i>Agapornis taranta</i>).....	49
e.Inséparable à tête grise (<i>Agapornis canus</i>).....	49
D.Perroquets du continent américain.....	49
1.Les perruches moineaux (<i>Forpus</i> spp.).....	49
2.Les Amazones (Genre <i>Amazona</i>).....	49
a.L'Amazone à front bleu (<i>Amazona aestiva</i>).....	49
b.L'Amazone à lores rouges (<i>Amazona autumnalis</i>).....	49
c.L'Amazone à ailes oranges (<i>Amazona amazonica</i>).....	50

d.L'Amazone à front blanc (<i>Amazona albifrons</i>).....	50
e.L'Amazone du Yucatan (<i>Amazona xantholora</i>).....	50
f.L'Amazone à front jaune (<i>Amazona ochrocephala</i>).....	50
g.L'Amazone à joues vertes (<i>Amazona viridigenalis</i>).....	50
3.Les Aras.....	50
a.Ara Hyacinthe (<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>).....	50
b.Ara bleu (<i>Ara ararauna</i>).....	51
c.Ara Chloroptère (<i>Ara chloroptera</i>).....	51
d.Ara rouge ou Ara Macao (<i>Ara macao</i>).....	51
e.Ara militaire (<i>Ara militaris</i>).....	51
f.Ara à collier d'or (<i>Ara</i> ou <i>Propyrrhura auricollis</i>).....	51
g.Ara noble (<i>Diopsittaca nobilis</i>).....	51
h.Ara de Spix (<i>Cyanopsitta spixii</i>).....	51
4.Les Piones (<i>Pionus</i> spp.).....	52
a.Pione à tête bleue (<i>Pionus menstruus</i>).....	52
b.Pione de Maximilien (<i>Pionus maximiliani</i>).....	52
c.Pione à couronne blanche (<i>Pionus senilis</i>).....	52
5.Les Caiques (<i>Pionites</i> spp.).....	52
6.La perruche souris (<i>Myiopsitta monachus</i>).....	52
7.Les Touis (<i>Brotogeris</i> spp.).....	53
CHAPITRE 2 : SEXAGE DES PSITTACIFORMES.....	55
I.Intérêts du sexage.....	55
A.Intérêts pour les programmes de reproduction, pour les populations sauvages et les espèces menacées.....	55
B.Intérêts pour les éleveurs.....	56
C.Intérêts pour les particuliers.....	56
D.Intérêts pour le vétérinaire.....	57
II.Les principales méthodes de sexage.....	57
A.Sexage phanéroptique des adultes chez les espèces dimorphiques.....	57
1.Couleur du plumage.....	57
2.Couleur de l'iris.....	58
3.Taille, forme, couleur du bec, couleur de la cire.....	58
4.Taille, couleur de la huppe érectile.....	58
B.Sexage des espèces monomorphiques par méthodes non moléculaires.....	61
1.Sexage par endoscopie	61
a.Rappels anatomiques.....	61
i.Les sacs aériens.....	61
ii.Les organes génitaux.....	62
b.Méthode	65
c.Avantages / inconvénients du sexage par endoscopie.....	68
2.Sexage par étude du comportement	71
a.Principe.....	71
b.Les différents types de comportement.....	71
i.Comportement reproducteur.....	71
ii.Comportement social de l'oiseau captif.....	74
c.Limites.....	75
3.Sexage par spectrométrie multi-angulaire.....	75
a.Principe.....	75
b.Avantages et inconvénients.....	77

4. Sexage par l'analyse chromosomique.....	77
a. Principe.....	77
b. Avantages et inconvénients.....	81
5. Sexage par dosage des hormones stéroïdes	82
a. Dosage des hormones stéroïdes fécales.....	82
b. Dosage des hormones stéroïdes plasmatiques.....	82
C. Sexage des Psittaciformes par méthodes moléculaires.....	83
1. L'utilisation de la biologie moléculaire pour le sexage des perroquets.....	83
2. Matériel biologique.....	84
a. Extraction à partir de sang.....	84
b. Extraction à partir de plumes.....	85
i. Extraction à partir de bulbes de plumes.....	85
ii. Extraction à partir de sang présent dans l'axe de la plume	87
3. Méthodes de sexage basées sur les techniques d'hybridation moléculaires.....	89
a. Principe.....	89
b. Méthode et application au sexage des perroquets.....	89
c. Avantages et inconvénients.....	91
4. Méthodes de sexage utilisant la technique de polymérisation en chaîne (PCR).....	92
a. La technique de polymérisation en chaîne (PCR).....	92
i. Principe.....	92
ii. Technique.....	92
b. Sexage par méthode AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	94
i. Principe.....	94
ii. Application au sexage.....	95
iii. Avantages et inconvénients.....	96
c. Sexage par méthode RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA).....	97
i. Principe.....	97
ii. Avantages et inconvénients.....	98
d. PCR ciblant des séquences spécifiques.....	99
i. Le gène CHD1.....	99
ii. Application au sexage des perroquets.....	101
iii. Avantages et inconvénients.....	104
iv. Comparaison avec les autres méthodes de sexage moléculaire.....	105
ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.....	107
<u>PREMIÈRE PARTIE DE L'ÉTUDE EXPÉRIMENTALE : MISE AU POINT D'UN TEST DE DÉTERMINATION</u>	
<u>MOLÉCULAIRE DU SEXE CHEZ LES PERROQUETS.....</u>	109
CHAPITRE 1 : OBJECTIFS DE L'ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.....	111
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	113
I. Matériel.....	113
A. Animaux.....	113
B. Matériel expérimental.....	114
1. Matériel commun à toutes les étapes.....	114
2. Matériel nécessaire à l'extraction de l'ADN.....	114
a. Les kits d'extraction.....	114
b. Le KingFisher®.....	115
3. Amorces.....	115
a. Amorces extraites de la littérature et modifiées.....	115
b. Amorces mises au point.....	116
C. Autres matériels de PCR et d'analyse de résultats.....	116

1. Les réactifs.....	116
2. Le thermocycleur.....	116
3. Matériel d'analyse des produits amplifiés.....	116
II. Méthode.....	117
A. Définition des amorces.....	117
1. Spécificité théorique des amorces.....	117
2. Présentation des amorces.....	118
a. Modification des amorces de Griffiths et son équipe.....	118
b. Nouvelles amorces.....	118
i. CHDs3.....	118
ii. CHDas4 et CHDas6.....	118
c. Taille des fragments amplifiés.....	119
3. Préparation des solutions d'amorces.....	120
4. Détermination des températures de fusion et d'hybridation.....	121
B. Prélèvements et extraction de l'ADN.....	121
1. Traitement de l'échantillon de rein de poule.....	121
2. Traitement des plumes.....	121
a. Prélèvement et stockage.....	121
b. Récupération des bulbes.....	121
c. Extraction manuelle / semi-automatisée.....	122
i. Extraction manuelle.....	123
ii. Extraction semi-automatisée.....	123
C. Amplification.....	124
1. Préparation du mélange réactionnel.....	124
2. Addition de l'extrait d'ADN.....	125
a. Variation du volume d'extrait d'ADN incorporé au mélange réactionnel.....	126
b. Réalisation du témoin négatif.....	126
c. Réalisation du témoin positif.....	126
3. Amplification (thermocycleur).....	127
a. Définition de la température d'hybridation.....	128
b. Détermination de la température d'hybridation (Stringence).....	128
c. Programme d'amplification.....	128
d. Variations des constantes d'amplification.....	129
4. Analyse par électrophorèse des produits amplifiés.....	129
a. Électrophorèse.....	129
i. Gel d'électrophorèse.....	129
ii. Tampon d'électrophorèse.....	130
iii. Dépôt.....	130
iv. Migration.....	130
b. Photographie.....	130
5. Suivi des bonnes pratiques de laboratoire.....	131
a. Risques de contamination des échantillons et prévention.....	131
i. Définition des risques.....	131
ii. Prévention des risques.....	131
b. Risques de manipulation des réactifs et prévention.....	132
6. Synthèse des PCR réalisées.....	133
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....	135
I. Résultats obtenus sur l'ADN de l'espèce <i>Gallus gallus</i>	137
II. Résultats obtenus sur l'ADN d' <i>E. coli</i>	142

III.Résultats obtenus sur l'ADN d'Amazone de Finsch.....	146
IV.Résultats obtenus sur l'ADN de Ara à collier d'or.....	148
V.Résultats obtenus sur l'ADN d'Amazone à ailes oranges.....	150
VI.Résultats obtenus sur l'ADN de Perroquet Gris du Gabon, Cacatoès Rosalbin, Pione à tête bleue et Cacatoès des Moluques.....	152
VII.Résultats obtenus sur l'ADN de perruche de Barnard.....	154
VIII.Résultats obtenus sur l'ADN de perruche de Pennant.....	156
IX.Résultats obtenus sur l'ADN de perruche Princesse de Galles.....	158
X.Résultats obtenus sur l'ADN de perruche Kakariki.....	160
XI.Résultats obtenus sur l'ADN de perruche Calopsitte.....	162
XII.Résultats obtenus sur l'ADN de perruche à collier.....	164
XIII.Résultats obtenus sur l'ADN de Youyou du Sénégal.....	168
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	171
I.Gène ciblé.....	171
II.Matériel.....	171
A.Animaux.....	171
B.Prélèvements.....	173
1.Plumes.....	173
2.Prélèvements autres que les plumes	174
3.Qualité des prélèvements.....	175
III.Méthode.....	175
A.Extraction de l'ADN génomique.....	175
1.Kit d'extraction semi-automatisée Magnesil® KF Genomic System, PROMEGA. .	175
2.Kit d'extraction manuelle NucleoSpin Tissue®, MACHEREY-NAGEL.....	176
B.Amplification de l'ADN.....	176
1.Variation de la stringence.....	176
2.Choix des amorces.....	178
3.Sensibilité et spécificité.....	179
a.Sensibilité.....	179
i.Variation.....	179
ii.Mise au point au cours du test de sexage.....	181
b.Spécificité.....	183
i.Variation.....	183
ii.Mise au point au cours du test de sexage.....	184
IV.Résultats.....	184
A.Amorces.....	184
1.Amorce CHDs3.....	184
2.Couples CHDs1 / CHDas2 et CHDs1 / CHDas4.....	185
B.Détermination du sexe du Youyou du Sénégal.....	188
C.Erreur de sexage préalable d'une perruche de Barnard et de l'Amazone à ailes oranges	189
D.Problèmes rencontrés avec les couples CHDs1 / CHDas2 et CHDas4 sur le couple de perruches de Barnard, sur le mâle perruche Princesse de Galles et sur la femelle perruche de Pennant.....	190
V.Proposition d'un test de sexage moléculaire par PCR.....	190
A.Conditions expérimentales finales.....	190
1.Test de sexage basé sur l'utilisation du couple CHDs1 / CHDas4.....	191
2.Test de sexage basé sur l'utilisation du couple CHDs1 / CHDas2.....	192
B.Comparaison aux autres tests de sexage moléculaire par PCR déjà publiés.....	193

**DEUXIÈME PARTIE DE L'ÉTUDE EXPÉRIMENTALE : MISE EN APPLICATION D'UNE MÉTHODE
D'ENDOSCOPIE DE SEXAGE SUR UNE POPULATION CAPTIVE D'ESPÈCES D'OISEAUX, AVANTAGES ET
INCONVÉNIENTS.....195**

CHAPITRE 1 : OBJECTIFS DE L'ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.....	197
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	199
I.Matériel.....	199
A.Animaux.....	199
B.Capture et contention.....	200
C.Anesthésie.....	201
1.Produits de pré-anesthésie.....	201
2.Produits anesthésiques.....	201
3.Surveillance d'anesthésie.....	201
4.Produits de soins intensifs.....	201
D.Équipement d'endoscopie.....	202
E.Equipement de chirurgie.....	202
1.Temps pré-opératoires.....	202
2.Instruments de chirurgie.....	202
3.Consommables de chirurgie.....	202
F.Stérilisation du matériel d'endoscopie.....	203
II.Méthode.....	203
A.Anesthésie.....	203
1.Capture et examen clinique.....	203
2.Induction et entretien.....	203
3.Surveillance de l'anesthésie.....	203
B.Préparation de l'animal.....	203
C.Endoscopie latérale gauche par le sac aérien thoracique caudal.....	204
1.Mode opératoire	204
2.Exploration endoscopique.....	205
a.Sexage.....	205
b.Exploration des différents organes.....	206
D.Compilation et archivage des données de sexage.....	206
E.Suivi post-opératoire	206
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....	207
I.Anesthésie et durée d'intervention.....	207
II.Examen endoscopique.....	207
A.Sexage et examen des gonades.....	207
B.Examen des cavités.....	209
C.Complications.....	209
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	212
I.Animaux et choix de la méthode de sexage.....	212
II.Sexage.....	213
A.Observation du tractus génital et détermination du sexe.....	213
B.Détermination de l'état physiologique des gonades.....	214
III.Exploration des grandes cavités.....	214
IV.Acte chirurgical.....	214
A.Anesthésie et risques anesthésiques.....	214
1.Choix de l'anesthésie.....	214

2.Complications anesthésiques.....	215
B.Complications chirurgicales et post-chirurgicales.....	216
C.Contre-indications de l'endoscopie.....	216

TROISIÈME PARTIE DE L'ÉTUDE EXPÉRIMENTALE : COMPARAISON DES DEUX MÉTHODES DE SEXAGE.....217

CONCLUSION.....	221
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	227
ANNEXES.....	239

INDEX DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Couple de perruches Calopsittes (<i>Nymphicus hollandicus</i>) mutation lutino.....	32
Figure 2 : Couple de perruches royales (<i>Alisterus scapularis</i>).....	38
Figure 3 : Détail des yeux chez un couple de Cacaotès à huppe jaune (<i>Cacatua sulphurea</i>).....	38
Figure 4 : Couple de Cacaotès à oeil nu (<i>cacatua sanguinea</i>).....	38
Figure 5 : Couple d'Eclectus (<i>Eclectus roratus</i>).....	38
Figure 6 : Loriquets ornés (<i>Trichoglossus ornatus</i>).....	43
Figure 7 : Couple de Kéa (<i>Nestor notabilis</i>).....	43
Figure 8 : Couple de perruches de Derby (<i>Psittacula derbiana</i>).....	43
Figure 9 : Youyou du Sénégal (<i>Poicephalus senegalus</i>).....	43
Figure 10 : Couple de perroquets Gris du Gabon (<i>Psittacus erithacus</i>) et Cacaotès à oeil nu (<i>Cacatua sanguinea</i>).....	47
Figure 11 : Couple d'Amazones à joues vertes (<i>Amazona viridigenalis</i>).....	47
Figure 12 : Aras bleus (<i>Ara ararauna</i>).....	47
Figure 13 : Couple de perruches Calopsittes (<i>Nymphicus hollandicus</i>) mutation lutino.....	59
Figure 14 : Représentation de l'appareil génital femelle.....	63
Figure 15 : Représentation de l'appareil génital mâle.....	64
Figure 16 : Appareil génital mâle (Amazone farineuse - <i>Amazona farinosa</i>).....	64
Figure 17 : Voie d'abord d'endoscopie latéral gauche chez un Ara ararauna.....	65
Figure 18 : Triade pôle crânial du rein-surrénal-testicule chez un Ara macao mâle.....	66
Figure 19 : Aspect de l'ovaire sous endoscopie chez une femelle Ara ararauna.....	67
Figure 20 : Organes directement visibles dès l'entrée de l'endoscope dans le sac aérien thoracique caudal.....	69
Figure 21 : Couple de Aras Hyacinthe en période de reproduction.....	72
Figure 22 : Toilettage mutuel chez un couple Ara ararauna.....	72
Figure 23 : Copulation chez des Amazones.....	74
Figure 24 : Tête d'une perruche ondulée (<i>Melopsittacus undulatus</i>) (A) sous lumière blanche, (B) sous rayons ultra-violets induisant une fluorescence jaune.....	76
Figure 25 : Caryotype obtenu chez un Ara Hyacinthe (<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>) de sexe mâle.....	79
Figure 26 : Vue général d'une rémige de Cacaotès rosalin : (A) détail de la vue postérieure de la base de la plume, et (B) coupe longitudinale du calamus.....	88
Figure 27: Empreinte ADN de 25 individus de l'espèce <i>Aratinga guarouba</i> obtenue avec la sonde humaine 33.15.....	90
Figure 28 : Amorces sélectives comportant un acide nucléique supplémentaire noté N, utilisées dans la technique AFLP décrite par Vos et son équipe en 1995.....	95
Figure 29: Mise en évidence du gène CHD1-W lors d'une réaction de PCR.....	100
Figure 30: Mise en évidence du gène CHD1 lors d'une réaction de PCR.....	101
Figure 31 : Représentation des gènes CHD-Z et CHD-W chez <i>Gallus gallus</i> incluant l'intron et les portions de deux exons.....	102
Figure 32 : Fixation des amorces P8 et P2 de Griffiths et son équipe de part et d'autres de l'intron numéro 21 et taille des fragments amplifiés chez <i>Gallus gallus</i>	102
Figure 33 : Représentation des gènes CHD-W et CHD-Z et fixation de l'amorce sens CHDs3 sur l'intron du gène CHD-W (CHDs3 ne se fixe pas sur l'intron du gène CHD-Z).....	118
Figure 34 : Représentation des gènes CHD-W et CHD-Z et fixation des amorces anti-sens CHDas4 et CHDas6 sur l'exon situé en aval de l'intron numéro 21.....	119
Figure 35 : Emplacement des différentes amorces sur le gène CHD-W et taille des fragments attendus (en ligne pleine : intron / en hachuré : exons).....	120
Figure 36 : Emplacement des différentes amorces sur le gène CHD-Z et taille des fragments attendus.....	120
Figure 37 : Plume de couverture de Youyou du Sénégal (<i>Poicephalus senegalus</i>).....	122
Figure 38 : Séparation et récupération du bulbe contenant l'ADN génomique.....	122
Figure 39 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de poule et de coq (<i>Gallus gallus</i>).....	141
Figure 40 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN d'Eclectus (<i>Eclectus roratus</i>).....	145
Figure 41 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN d'Amazone de Finsch (<i>Amazona finschii</i>).....	147

Figure 42 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de Ara à collier d'or (<i>Ara auricollis</i>).....	149
Figure 43 : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN d'Amazone à ailes oranges (<i>Amazona amazonica</i>).....	151
Figure 44 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de Perroquet Gris du Gabon (<i>Psittacus erithacus</i>), Cacatoès rosalbin (<i>Cacatua roseicapilla</i>), Pionne à tête bleue (<i>Pionus m. menstruus</i>) et Cacatoès des Moluques (<i>Cacatua moluccensis</i>).....	153
Figure 45 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche de Barnard (<i>Barnardius Barnardi macgillivrayi</i>).....	155
Figure 46 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche de Pennant (<i>Platycercus elegans</i>).....	157
Figure 47 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche Princesse de Galles (<i>Polytelis alexandrae</i>).....	159
Figure 48 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche Kakariki (<i>Cyanoramphus novaezelandiae</i>).....	161
Figure 49 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche Calopsitte (<i>Nymphicus hollandicus</i>).....	163
Figure 50: Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche à collier (<i>Psittacula krameri</i>).....	167
Figure 51 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de Youyou du Sénégal (<i>Poicephalus senegalus</i>).....	169
Figure 52 : Effet de la variation de la concentration en MgCl ₂ sur l'apparition de signaux non-spécifiques chez la Perruche à collier (couple CHDs3 / CHDas4).....	177
Figure 53 : Influence de l'extraction et du volume d'extrait d'ADN ajouté au "mix" de PCR sur la sensibilité du test de sexage.....	180
Figure 54 : Exemple de l'effet de l'augmentation de la prise d'essai d'ADN chez le couple de perruche Kakariki.....	182
Figure 55 : Influence des différents paramètres sur la spécificité du test de sexage.....	183
Figure 56 : Signaux obtenus à l'aide du couple d'amorce CHDs1 / CHDas2.....	186
Figure 57 : Signaux obtenus à l'aide du couple d'amorce CHDs1 / CHDas4.....	188
Figure 58 : Ara ararauna sur lequel le site opératoire a été préparé : zone plumée, nettoyée et désinfectée à l'aide de povidone iodée.....	204
Figure 59 : Testicule mature chez le Ara Macao mâle.....	209
Figure 60 : Ovaire mature chez une femelle Ara Ararauna.....	209

INDEX DES TABLES

Tableau I : Critères de sexage chez certaines espèces dimorphiques.....	60
Tableau II : Liste des espèces sexées par spectrométrie multi-angulaire.....	77
Tableau III : Liste d'espèces pour lesquelles le caryotype et l'aspect des chromosomes sexuels ont été décrits.....	81
Tableau IV : Liste des espèces sexées par hybridation moléculaire.....	91
Tableau V : Liste des espèces sexées par méthode AFLP.....	96
Tableau VI : Amorces P2 et P8 mises au point par Griffiths et al. (1998).....	101
Tableau VII : Liste des espèces sexées par PCR ciblant le gène CHD1.....	103
Tableau VIII : Liste des espèces sexées par PCR ciblant la séquence Xho I.....	104
Tableau IX : Espèces, sexe et nombre de plumes prélevées.....	113
Tableau X : Échantillons prélevés chez l'espèce <i>Gallus gallus</i>	114
Tableau XI : Amorces CHDs1 et CHDas2 conçues par modification d'amorces publiées.....	115
Tableau XII : Amorces mises au point.....	116
Tableau XIII : Taille des fragments amplifiés attendus avec les différents couples d'amorces.....	119
Tableau XIV : Adaptation des volumes des différents réactifs des kits d'extraction manuelle utilisés au traitement de bulbes de plumes.....	123
Tableau XV : Concentrations et volumes utilisés pour une concentration finale en MgCl ₂ de 1mM et un volume d'extrait d'ADN de 1µl (volume total de 20µl).....	125
Tableau XVI : Concentrations et volumes utilisés pour une concentration finale en MgCl ₂ de 1,5mM et un volume d'extrait d'ADN de 1µl (volume total de 20µl).....	125
Tableau XVII : Concentrations et volumes utilisés pour une concentration finale en MgCl ₂ de 2mM et un volume d'extrait d'ADN de 1µl (volume total de 20µl).....	125
Tableau XVIII : Récapitulatif des amorces testées pour chaque espèce.....	127
Tableau XIX : Résultats obtenus à la suite de l'essai du couple d'amorce CHDs1 / CHDas2 sur l'ADN de poule (<i>Gallus gallus</i>) extrait à partir d'un fragment de rein.....	137
Tableau XX : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de poule et de coq (<i>Gallus gallus</i>) extrait à partir de plumes.....	138
Tableau XXI : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN d' <i>Eclectus</i> (<i>Eclectus roratus</i>).....	142
Tableau XXII : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN d'Amazone de Finsch (<i>Amazona finschii</i>).....	146
Tableau XXIII : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de Ara à collier d'or (<i>Ara auricollis</i>).....	148
Tableau XXIV : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN d'Amazone à ailes oranges (<i>Amazona amazonica</i>).....	150
Tableau XXV : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de Perroquet Gris du Gabon (<i>Psittacus erithacus</i>), Cacatoès rosalbin (<i>Cacatua roseicapilla</i>), Pionne à tête bleue (<i>Pionus m. menstruus</i>) et Cacatoès des Moluques (<i>Cacatua moluccensis</i>).....	152
Tableau XXVI : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche de Barnard (<i>Barnardius Barnardi macgillivrayi</i>).....	154
Tableau XXVII : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche de Pennant (<i>Platycercus elegans</i>).....	156
Tableau XXVIII : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche Princesse de Galles (<i>Polytelis alexandrae</i>).....	158
Tableau XXIX : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche Kakariki (<i>Cyanoramphus novaezelandiae</i>).....	160
Tableau XXX : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche Calopsitte (<i>Nymphicus hollandicus</i>).....	162
Tableau XXXI : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche à collier (<i>Psittacula krameri</i>).....	164
Tableau XXXII : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de Youyou du Sénégal (<i>Poicephalus senegalus</i>).....	168
Tableau XXXIII : Variation du volume de tampon d'élution en fonction du nombre et de la taille des bulbes lors des extractions manuelles.....	181

Tableau XXXIV : Variation du volume de microbilles en fonction du nombre et de la taille des bulbes lors des extractions semi-automatisées.....	183
Tableau XXXV : Liste des espèces sexées avec succès à l'aide du couple d'amorces CHDs1 / CHDas2 aux conditions expérimentales retenues.....	185
Tableau XXXVI : Liste des espèces sexées avec succès à l'aide du couple d'amorces CHDs1 / CHDas4 aux conditions expérimentales retenues.....	187
Tableau XXXVII : Conditions expérimentales retenues du test CHDs1 / CHDas4.....	191
Tableau XXXVIII : Conditions expérimentales retenues du test CHDs1 / CHDas2.....	192
Tableau XXXIX : Liste des oiseaux ayant subi une endoscopie.....	200
Tableau XL: Paramètres d'anesthésie et résultats d'endoscopie chez les oiseaux sexés.....	211

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Les réactifs.....	241
Annexe 2 : Le matériel.....	243
Annexe 3 : Méthode d'extraction d'ADN manuelle avec le kit NucleoSpin® Tissue à partir de l'échantillon de rein (30mg).....	245
Annexe 4 : Méthode d'extraction d'ADN manuelle à partir de bulbes de plumes avec le kit NucleoSpin® Tissue.....	247
Annexe 5 : Méthode d'extraction d'ADN semi automatisée à partir de bulbes de plumes avec le kit MagneSil® KingFisher, genomic system et le KingFisher™	249
Annexe 6 : Les différentes conditions de PCR réalisées.....	251
Annexe 7 : Certificat de sexage de l'Amazone à ailes oranges fourni lors de la récolte du matériel expérimental.....	255

Introduction

Les Psittaciformes (perruches et perroquets, ou perroquets au sens large du terme) sont des oiseaux fascinants : leur plumage aux couleurs flamboyantes, leur capacité d'imiter le langage parlé, leurs doigts préhensiles, leur caractère drôle, joueur et attachant, ainsi que leur intelligence hors du commun justifient l'attrait pour cet oiseau en tant qu'animal de compagnie. L'intérêt porté envers ces oiseaux se justifie également par la menace d'extinction qui plane malheureusement au dessus de certaines populations sauvages. L'engouement est tel que depuis quelques années, les techniques d'élevage, de diagnostic et de thérapeutique évoluent sans cesse. Les connaissances en matière de reproduction occupent une place prépondérante puisque la détermination du sexe des reproducteurs est la base de tout élevage et de tout programme de conservation.

Chez les oiseaux, les gonades ne sont pas visibles extérieurement. Le dimorphisme, qui, quand il existe, permet de déterminer le sexe d'un individu, est absent chez la plupart des espèces de perroquets. Le sexage est donc indispensable pour les éleveurs afin de former des couples, mais également pour les programmes de reproduction, de réintroduction, pour les propriétaires désireux de choisir un nom approprié pour leur pensionnaire, et enfin pour les vétérinaires lors de maladies liées au sexe.

Pour certaines espèces, dites dimorphiques, le sexage est rendu possible par l'observation de la taille, de la couleur de l'iris, de la cire, ou du plumage (par exemple, l'Eclectus mâle a un plumage vert tandis que chez la femelle il est rouge). Les autres, dites monomorphiques, n'extériorisent aucun caractère sexuel secondaire et le mâle est morphologiquement identique à la femelle (c'est le cas par exemple du Youyou du Sénégal ou encore du perroquet Gris du Gabon). Les techniques de sexage sont alors plus ou moins fiables. Des méthodes empiriques, telles que la différence de taille, d'écartement des os pelviens, de chant, ou même de comportement apportent quelquefois des éléments de réponse. Certaines méthodes telles que le dosage des hormones stéroïdes ou le caryotype ne sont plus utilisées aujourd'hui en pratique, tandis que d'autres sont au stade du développement et n'ont été testées que sur un nombre très restreint d'espèces. Les méthodes de choix sont au nombre de deux : le sexage invasif par endoscopie, très utilisée en pratique, et le sexage moléculaire, qui consiste en la recherche de marqueurs génétiques spécifiques du caractère mâle ou femelle dans l'ADN des oiseaux. Il existe plus de trois-cent cinquante espèces de perruches et perroquets (ROWLEY et COLLAR, 1997), dont un nombre important d'espèces maintenues en captivité ou d'intérêt conservatoire. Le sexage prend alors tout son intérêt, du moment que

la méthode utilisée est fiable, sans danger pour l'oiseau, et efficace sur les espèces testées, voire sur toutes les espèces de perroquets. L'endoscopie permet le sexage rapide et efficace de tous les oiseaux, mais reste invasive avec les inconvénients inhérents à l'acte chirurgical lui-même et à l'anesthésie. Parallèlement, le sexage par méthode PCR (*Polymerase chain reaction*) est un acte totalement sans risque pour l'individu à sexer, mais aucun protocole dont l'efficacité est prouvée sur un spectre large de groupes taxonomiques n'est proposé dans la littérature.

Dans la première partie, après une présentation de quelques espèces de perruches et perroquets les plus couramment rencontrées, seront étudiées différentes méthodes de sexage adaptées à une utilisation pratique ou à la recherche fondamentale, ainsi que les méthodes en cours de développement.

La deuxième partie, expérimentale, est composée de deux volets : un premier consistant en la mise au point d'un test de sexage moléculaire de perruches et perroquets par méthode PCR, et un second détaillant la mise en application du sexage invasif par endoscopie sur un groupe d'oiseaux (dont des Psittaciformes) dans le cadre d'un programme de reproduction et de gestion d'une population captive d'espèces.

Etude bibliographique

I. Taxonomie

Cette première partie a pour but de présenter les principales espèces de perroquets et perruches les plus couramment maintenues en captivité, et les caractéristiques qui, présentes chez quelques unes d'entre elles et observées de manière attentive peuvent être une aide dans la détermination empirique du sexe des individus les composant.

Les termes « perruches et perroquets » ou « perroquets » au sens large regroupent les oiseaux arboricoles, dont le plumage est d'une manière générale très coloré et très voyant, appartenant à l'ordre des Psittaciformes. Leur taille varie de 8 centimètres (6 espèces de perruches Pygmés, *Micropsitta spp.* de Nouvelle-Guinée) à 99 centimètres (*Ara hyacinthe - Anodorhynchus hyacinthinus*) et leur poids de 80 à 3000 grammes (*Kakapo -Strigops habroptilus-* de Nouvelle-Zélande). Leur anatomie et morphologie sont néanmoins uniformes. Ils sont munis d'un bec crochu, très puissant, surmonté d'une "cire" bombée (membrane nue à la base du bec et parfois autour des yeux). La mobilité du bec leur permet de l'utiliser comme un troisième membre pour grimper et décortiquer les graines. Leur langue, charnue, musculeuse et conique, est très mobile. Les perroquets l'utilisent avec dextérité. Seuls les Loris et Loriquets en possèdent une fine et allongée, terminée par une brosse capable d'aspirer le nectar et de récolter le pollen. La morphologie des pattes est également une particularité fondamentale des Psittaciformes : les pieds sont dit zygodactyles puisque deux des quatre doigts (doigts 2 et 3) sont orientés vers l'avant tandis que les deux autres (doigts 1 et 4) sont dirigés vers l'arrière (MCLELLAND, 1990). Les doigts, préhensiles, permettent par ailleurs aux perroquets de porter la nourriture à leur bouche.

La classification, difficile en raison du nombre important d'espèces et de la relative homogénéité de morphologie, a donné lieu à de longues discussions entre ornithologues (FORSHAW, 1989). Dorst en 1971 distinguait 323 espèces de Psittaciformes tandis que leur nombre est estimé à 353 en 1997 (ROWLEY et COLLAR, 1997). Différentes systématiques ont été proposées. La première classification fut proposée par Salvadori en 1891 (*in* FORSHAW, 1989). Il distinguait par des critères uniquement visuels sept familles et la plus importante, les *Psittacidae*, était elle-même divisée en six sous-familles. Cette classification a

par la suite été légèrement modifiée par James L. Peters en 1937, qui divise alors une unique famille de Psittacidés en six sous-familles (PETERS, 1937). Verheyen en 1956 distingue, par des critères anatomiques et écologiques, cinq familles dont trois divisées en sous-familles (*in* FORSHAW, 1989). Le superordre des *Psittacimorphae* établi par Sibley Ahlquist ne compte que l'ordre des Psittaciformes que Rowley et Collar répartissent en deux familles : les Cacauidés et les Psittacidés (ROWLEY et COLLAR, 1997). En 1975, George Smith propose une unique famille qu'il divise en quatre sous-familles, et dans chacune d'entre elles, il répartit les espèces en tribus (*in* FORSHAW, 1989).

En 2006, Joseph M. Forshaw à l'aide de critères biochimiques, revoit les relations entre les perroquets et considère que ceux-ci se répartissent en deux familles, les *Cacatuidae* et les *Psittacidae*, divisées en deux sous-familles pour l'une et en cinq sous-familles pour l'autre, dans lesquelles les espèces se répartissent en tribus (FORSHAW, 2006).

En 2010, il propose dans son guide un regroupement des espèces par zone géographique plutôt qu'une classification taxonomique. Outre l'intérêt pratique de cet arrangement (regroupement d'espèces susceptibles d'être rencontrées sur une même zone), ce mode de classification permet de s'affranchir des problèmes encore non résolus que soulève la phylogénie des perroquets (FORSHAW, 2010). Nous suivrons ce mode de présentation dans la suite de l'étude, et les espèces seront présentées suivant les zones géographiques qu'elles peuplent : Océanie, Asie, Afrique et Amérique du Sud.

II. Monographie

(DE WAILLY et al., 2004 ; FORSHAW, 1989 ; FORSHAW, 2010 ; LENNOX et HARRISON, 2006 ; ROWLEY et COLLAR, 1997)

A. Perroquets du continent océanien

1. La perruche ondulée (*Melopsittacus undulatus*)

Dans son milieu naturel, cette petite perruche de dix-huit centimètres a un plumage vert avec une tête jaune. Le dos, le dessus de la tête et les ailes ont un dessin ondulé noir d'où le nom de cet oiseau très fréquemment rencontré en captivité. Un léger dimorphisme sexuel est présent dans ce patron sauvage et concerne la cire surplombant le bec : elle est bleue chez le mâle et brune chez la femelle. Ce dimorphisme n'est malheureusement pas fiable chez les sujets hybrides telles que les perruches ondulées bleues, blanches ou jaunes où la cire peut être par exemple rose chez le mâle comme chez la femelle.

2. La perruche Calopsitte (*Nymphicus hollandicus*)

La perruche Calopsitte étant très largement élevée en grand nombre dans le monde entier, de nombreuses mutations sont apparues. Dans le type sauvage, c'est à dire gris, les sexes sont facilement différenciés. Chez le mâle, le front, la huppe, les joues et la gorge sont jaunes. Les plumes auriculaires sont orange vif et forment deux taches de part et d'autre de la tête. Le dessous du corps, gris clair, est parfois teinté de marron. La femelle est moins colorée que le mâle. Le front est gris légèrement teinté de jaune. La huppe et les joues sont jaunâtres, teintées de gris. Les taches auriculaires sont orange terne. Le dessous des rectrices et des rémiges primaires, gris uniforme chez le mâle sont respectivement striées et tachetées de blanc chez la femelle. A la sortie du nid, les jeunes ressemblent à la femelle avec un bec moins foncé et une huppe moins développée. Le dimorphisme est alors absent. Les sexes ne se reconnaissent qu'à partir de la première mue entre six et neuf mois.

Chez les nombreuses mutations qui existent le dimorphisme sexuel est variable, parfois absent, ou bien subtil.

Pour la mutation panachée, c'est à dire grise avec des taches plus ou moins étendues à dominance de blanc ou de jaune, il n'existe aucun dimorphisme sexuel.

Dans la mutation lutino, caractérisée par un corps entièrement blanc (seules la tête et la huppe sont colorées), la femelle possède des stries jaunâtres sous les rectrices et des spots sous les rémiges primaires très difficiles à distinguer sur un fond blanc. La huppe, le front et les joues sont teintées de la même façon chez les deux sexes (figure 1).

Pour les mutations opaline, cinnamon, fallow cendrée, face blanche, bronze fallow, edged, joues jaunes et face pâle, mâles et femelles se différencient par les stries présentes sur la face ventrale des rectrices et les spots sous les rémiges primaires des femelles. Chez toutes ces mutations, les jeunes sont également identiques à la femelle avant la première mue.



Figure 1 : Couple de perruches Calopsittes (*Nymphicus hollandicus*) mutation lutino. (Photo Yannick Lambert, couple reproducteur d'un élevage situé en Seine-maritime)

3. Les Euphèmes (genre *Neophema*)

Le genre *Neophema* comprend six espèces dont deux inconnues en captivité (perruche à ventre orange et perruche pétrophile). La perruche de Bourke, classiquement classée parmi les Euphèmes, s'en distingue par sa couleur : absence totale de vert dans son plumage et présence d'un dessin écaillé sur le dos.

Leur sexage est en général facile, évident ou difficile, chez l'adulte.

a. La perruche Turquoise (*Neophema pulchella*)

Cette petite perruche d'une vingtaine de centimètres, actuellement menacée à l'état sauvage, exhibe un dimorphisme sexuel important. Le mâle se différencie de la femelle par une face bleue plus intense et plus étendue, par des traces rouges sur les ailes, une bande bleu intense sur les ailes et par l'absence de barre sous-alaire. Les jeunes, à la sortie du nid, ressemblent à la femelle. Le sexage visuel est donc impossible. Ils acquièrent un plumage «sub-adulte » entre quatre et six mois mais le plumage définitif adulte n'est obtenu qu'à partir de la deuxième année.

b. La perruche splendide (*Neophema splendida*)

Le dimorphisme sexuel chez la perruche splendide est également très marqué chez les adultes. Il s'agit de l'espèce la plus colorée dans son genre. La tête est bleue, avec le front, la gorge et les joues plus foncés. Le dessous du corps est jaune et le dessus vert. Le mâle se reconnaît aisément par une coloration rouge écarlate couvrant sa poitrine et son cou. La

femelle se caractérise par une absence de rouge qui est remplacé par du vert et par un masque facial moins foncé et moins étendu. Elle ressemble fortement à la femelle de la perruche Turquoise.

c. La perruche élégante (*Neophema elegans*)

Cette perruche, un peu plus grande que les deux espèces précédentes, est caractérisée par une coloration d'ensemble vert olive et jaunâtre, avec une bande frontale bleu foncé surmontée d'une fine bande bleu ciel qui s'étend jusqu'en arrière de l'œil. La femelle est identique au mâle, en plus sombre. La bande frontale est moins étendue, plus claire, et le ventre est jaune terne. Le sexage visuel est subtil.

d. La perruche vénuste (*Neophema chrysostoma*)

Cette perruche est moins commune que les autres Euphèmes. Elle rappelle par ses couleurs la perruche élégante mais s'en distingue facilement par sa coloration verte plus foncée et plus terne et par la large bande bleu foncé de l'aile. La femelle se distingue du mâle seulement par ses couleurs plus ternes, ainsi que par sa bande frontale légèrement moins étendue.

e. La perruche de Bourke (*Neopsephotus bourkii*)

Nettement moins colorée que les Euphèmes décrits précédemment, la perruche de Bourke s'en distingue par l'absence de vert dans son plumage. L'ensemble de son plumage est brun plus ou moins foncé, avec des nuances de rose et de bleu. Le mâle se distingue facilement de la femelle par la présence d'une bande frontale bleue.

4. Les Platycerques (Genre *Platycercus*)

Les perruches du genre *Platycercus* sont les plus connues des amateurs de grandes perruches. Mesurant de trente à quarante centimètres, les Platycerques sont très colorés, avec un plumage ayant deux particularités : le dos présente un dessin écaillé où chaque plume est noir bordé de jaune, vert ou rouge, et les joues et le menton sont d'une couleur tranchante par rapport au reste du corps. Le dimorphisme sexuel est quasiment absent, les mâles possédant une mandibule supérieure plus large que la femelle et une tête plus forte. Il est plus marqué chez la perruche de Stanley (*Platycercus icterotis*). Les femelles sont en outre plus ternes ou moins colorées que les mâles.

a. La perruche Omnicolore (*Platycercus eximius*)

Cet oiseau extrêmement coloré est très répandu. Le mâle et la femelle sont quasiment identiques. La tête, le cou et la poitrine sont rouge vif. Les joues et le menton sont blancs. Le ventre est jaune et le dos écaillé vert. Les ailes sont également vertes. Le croupion est vert jaune. La femelle est souvent aussi colorée que le mâle.

b. La perruche de Pennant (*Platycercus elegans*)

Cette grande perruche possède un plumage essentiellement rouge. Les joues, le bord de l'aile et la queue sont bleus. La femelle se différencie du mâle par une tête plus petite et plus ronde et par une bande sous-alaire blanche. Les jeunes mâles sont identiques aux femelles avant leur première mue.

c. La perruche de Stanley (*Platycercus icterotis*)

La perruche de Stanley est la plus petite espèce du genre *Platycercus* (vingt-cinq centimètres). C'est également la seule à présenter un dimorphisme sexuel évident. Le mâle a la tête, la poitrine et le dessous du corps rouges. Les joues sont jaunes. Le dos est vert et écaillé. Les plumes des ailes sont bordées de vert foncé. La bande sous-alaire est généralement absente chez le mâle. La femelle a la tête et la poitrine vert mêlé de rouge. La tache jaune sur les joues est moins étendue, et la bande sous-alaire toujours présente.

d. La perruche Pallicept (*Platycercus adscitus*)

La distinction du mâle de la femelle est difficile chez cette perruche. La tête et la gorge sont blanches nuancées de jaune. Le bas des joues est bleu. Les plumes du dos sont bordées de jaune. La poitrine, le ventre, le bord des ailes et la queue sont bleus. La femelle présente une bande sous-alaire blanche absente chez le mâle.

5. Les Polytèles (Genre *Polytelis*)

Le genre *Polytelis* regroupe trois espèces de grande taille (quarante à quarante-cinq centimètres). Les membres de ce groupe exhibent un certain degré de dimorphisme sexuel. Le mâle est souvent plus petit que la femelle, et la femelle ainsi que les jeunes sont généralement plus ternes que le mâle.

a. La perruche Princesse de Galles (*Polytelis alexandrae*)

La corps de cet oiseau est teinté de gris-bleu. Le front, la couronne et la nuque sont bleu ciel. Le menton, la gorge, le bas des joues et le devant du cou sont roses. Les ailes sont

teintées de bleu. La femelle a la tête moins bleue, le croupion est bleu-gris et les retrices centrales sont plus courtes. Chez les deux mutations existantes aujourd'hui (bleue et lutino ainsi que la combinaison qui donne l'albinos) le dimorphisme sexuel est très difficile.

b. La perruche Mélanure (*Polytelis anthopeplus*)

Le plumage de cette perruche est jaune-verdâtre, avec une teinte vert olive sur la nuque et le dos. L'épaule est jaune. Elle possède une queue noire, une croupe vert foncé, une bande alaire rouge et des rémiges noir-bleu. Le dimorphisme sexuel est assez prononcé. Les mâles sont essentiellement jaunes tandis que les femelles sont essentiellement vertes. Le rouge des ailes est plus marqué chez le mâle et ses retrices sont bleues. Les jeunes, dès l'acquisition de leur premier plumage, sont semblables à leur mère. Ce n'est qu'à partir d'environ un an et demi qu'il est possible de les différencier facilement.

c. La perruche de Barraband (*Polytelis swainsonii*)

Le dimorphisme sexuel est assez évident chez cette espèce au corps vert lumineux. Le mâle a le front, les joues et la gorge jaunes tandis que la femelle a la tête entièrement verte. Le sexage visuel des jeunes est très difficile. Vers l'âge de quatre à cinq mois, un léger reflet jaune apparaît sur la gorge des mâles.

6. Le Genre *Barnardius*

Les oiseaux du genre *Barnardius* sont des perruches de grande taille, très colorées, avec comme point commun un demi-collier jaune sur la nuque.

a. La perruche de Barnard (*Barnardius barnardi*)

Cette perruche possède un plumage très coloré, en dégradé de couleurs. Le plumage est vert clair avec des reflets bleutés sur les ailes, et un demi-collier jaune sur la nuque. La queue est marron-bleu. Le dimorphisme sexuel est très subtil. La femelle est en général plus terne avec le dos plus grisâtre.

b. La perruche Port Lincoln (*Barnardius zonarius*)

La robe de cette grande perruche est à dominance verte. La tête est noire aux reflets marron. Le bas des joues est violet. Le haut du ventre est jaune ainsi que le demi-collier présent sur la nuque. Le reste du corps est vert bleuâtre. La femelle est identique au mâle avec une tête pouvant être un peu plus brunâtre.

7. Les Pséphotes (Genre *Psephotus*)

Les Pséphotes sont des perruches de taille moyenne, élancées, possédant une longue queue, et qui présentent un dimorphisme sexuel.

a. La perruche à croupion rouge (*Psephotus haematonotus*)

Cette perruche exhibe un dimorphisme sexuel très important. Le mâle a un plumage à dominante vert émeraude aux reflets bleus sur le dos et les ailes, et le ventre jaune. Le croupion est rouge. La femelle se distingue parfaitement du mâle par un plumage moins voyant, avec un ventre vert olive et les ailes et le dos gris. Le croupion est vert. Les jeunes se sexent rapidement au nid dès l'apparition des plumes rouges sur le croupion des mâles.

b. La perruche multicolore (*Psephotus varius*)

La distinction entre mâles et femelles est possible chez cette perruche. Le mâle est à dominante vert vif avec des marques jaunes sur les ailes et le front et une tache rouge sur la couronne. Le ventre et les cuisses sont orange-rouge. Le bec est gris foncé. La femelle est plus terne. Elle a le front jaune orangé, et la même tache rouge sur la couronne. La tête et la poitrine sont vert brunâtre, le dessous du corps est vert pâle et une bande sous-alaire est présente.

c. La perruche à ailes d'or (*Psephotus chrysopterygius*)

La distinction entre mâles et femelles est aisée chez cette espèce. Le mâle est de couleur bleu turquoise avec la couronne et la nuque noires, le front et les lores (espaces situés entre la partie antérieure des yeux et la base du bec) jaune pâle. Le dos et les ailes sont violets. La bande sous alaire est absente. La femelle a une teinte dominante verte, la couronne et la nuque étant brunâtres. La bande sous alaire est présente.

d. La perruche à capuchon noir (*Psephotus dissimilis*)

La distinction entre mâles et femelles ne pose aucun problème chez les adultes (les jeunes sont encore une fois identiques à la femelle). Le mâle est caractérisé par son capuchon noir et sa couleur dominante bleu turquoise, ainsi que par sa large bande jaune sur l'aile. La femelle est plus terne, à dominante verte, avec la couronne et la nuque brunâtres. La bande sous-alaire n'est présente que chez la femelle.

e. La perruche à bonnet bleue (*Northiella haematogaster*)

La perruche à bonnet bleu, anciennement classée parmi les Pséphotes s'en différencie

notamment par un très faible dimorphisme sexuel. Le plumage est essentiellement brun grisâtre, avec la tête bleu mauve. la poitrine est olive et le ventre jaune avec une tache centrale rouge. La bande sous-alaire est absente chez le mâle et présente chez la femelle.

8. Les Kakarikis (*Cyanoramphus spp.*)

Deux espèces sont très couramment maintenues en captivité : le Kakariki à front rouge (*C. novaezealandiae*) et le Kakariki à front jaune (*C. auriceps*). Le dimorphisme sexuel est quasiment absent. Une bande sous-alaire est présente chez la femelle.

9. Autres grandes perruches australiennes

a. La perruche à tête pourpre (*Purpureicephalus spurius*)

Le plumage de la perruche à tête pourpre est vert, avec un capuchon rouge. Les joues et la gorge sont jaunâtres. Le ventre est rouge verdâtre et les sous-caudales bleu ciel. La femelle est, à l'origine, plus terne que le mâle, mais la sélection vise à obtenir des femelles aussi colorées que leur partenaire. Le sexage visuel est donc difficile.

b. La perruche royale (*Alisterus scapularis*)

Le dimorphisme sexuel est très prononcé chez cette grande perruche d'une quarantaine de centimètres. La femelle est à dominance verte, tandis que le mâle à la tête et le dessous du corps rouge. Les immatures sont semblables aux femelles (figure 2).

c. La perruche Érythroptère (*Aprosmictus erythropterus*)

La perruche Érythroptère présente un dimorphisme sexuel très important. La coloration d'ensemble est vert vif. Le mâle possède une cape noire et un éclat rouge vif sur l'aile. La femelle est uniformément verte. Le dimorphisme est absent chez les immatures.

d. La perruche de Latham (*Lathamus discolor*)

Le plumage est à dominance verte, plus clair sur le dessous du corps, avec des taches rouges sous les ailes et sur la face. Le dimorphisme sexuel est discret et difficile. Il concerne la tache rouge sur la face qui est moins étendue chez la femelle.



Figure 2 : Couple de perruches royales (*Alisterus scapularis*).

Le dimorphisme sexuel est très prononcé. Le mâle (devant) arbore une couleur rouge, absente chez la femelle (au fond). (photo Yannick Lambert)

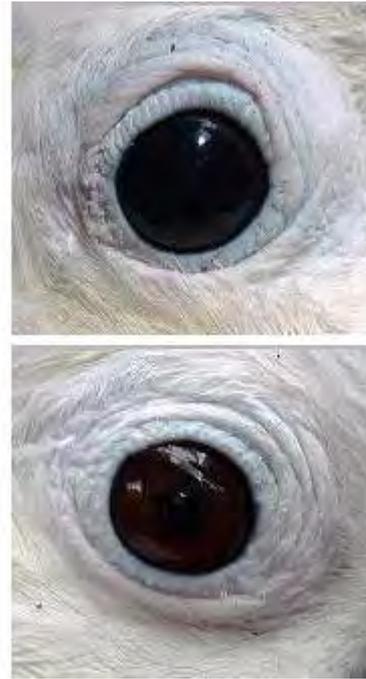


Figure 3 : Détail des yeux chez un couple de Cacaotès à huppe jaune (*Cacatua sulphurea*).

Le dimorphisme sexuel est subtil : l'iris du mâle (en haut) est brun noir, tandis que celui de la femelle est brun-roux. (photo Yannick Lambert, Parc de Clères)



Figure 4 : Couple de Cacaotès à oeil nu (*cacatua sanguinea*).

Le dimorphisme sexuel est très subtil. Mâle (à gauche) et femelle se distinguent par la couleur de l'iris. (photo Yannick Lambert, Parc de Clères)



Figure 5 : Couple d'Eclectus (*Eclectus roratus*).

Cette espèce constitue un exemple de dimorphisme sexuel très évident, le mâle (à droite) à un plumage vert avec un bec beige, tandis que la femelle (à gauche) est rouge-mauve avec le bec noir. (photos Yannick Lambert, Parc de Clères à gauche et Parc aux oiseaux de Villars-les-Dombes à droite).

10. Les Cacatoès (famille des *Cacatuidae*)

La famille des *Cacatuidae* regroupe des perroquets de moyenne à grande taille qui se différencient des autres Psittacidés par l'absence totale de vert ou de bleu dans le plumage. Ils possèdent en outre une huppe érectile qu'ils abaissent ou relèvent en fonction de leur niveau d'agitation, d'excitation ou d'attention. La plupart sont blancs, et il existe quelques espèces noires. Le dimorphisme sexuel, discret chez la plupart des espèces, n'apparaît qu'à l'âge de trois ans en moyenne et intéresse la couleur de l'iris, brun-noir chez le mâle et brun-rouge chez la femelle (figure 3). Le recours à des méthodes de sexage plus complexes est très utile.

a. Le Cacatoès blanc (*Cacatua alba*)

Ce perroquet entièrement blanc est assez répandu. Le dimorphisme discret concernant la couleur de l'iris est présent chez les adultes.

b. Le petit Cacatoès à huppe jaune (*Cacatua sulphurea*)

Le petit Cacatoès à huppe jaune est de loin le plus maintenu en captivité suite aux nombreuses importations pour le commerce international. Sa population sauvage a dramatiquement diminuée. Il existe plusieurs sous-espèces qui diffèrent par la taille. Le plumage est entièrement blanc avec une huppe jaune. Une légère zone bleutée est présente autour des yeux. La distinction des sexes se fait par la couleur de l'iris (figure 3).

c. Le Cacatoès des Moluques (*Cacatua moluccensis*)

La rareté de ce grand perroquet en milieu sauvage a conduit à son inscription en annexe I de la Convention de Washington. Son plumage est blanc légèrement teinté de rose. L'iris du mâle est brun noirâtre, celui de la femelle plus clair.

d. Le Cacatoès à œil nu (*Cacatua sanguinea*)

Ce Cacatoès est caractérisé par une zone annulaire glabre relativement large autour des yeux, de couleur gris-bleuté. Le dimorphisme sexuel, discret, concerne également la couleur de l'iris (figure 4).

e. Le Cacatoès de Leadbeater (*Cacatua leadbeateri*)

Ce Cacatoès est rare en captivité. Le dessous du corps est rose, le dessus blanc pur. La huppe est blanche, rouge et jaune. Le dimorphisme concerne également la couleur de l'iris noir chez le mâle et brun chez la femelle.

f. Le Cacatoès rosalbin (*Eolophus roseicapillus*)

Ce perroquet est considéré comme nuisible dans les régions agricoles de son milieu d'origine où il est massacré (Australie). Le dos est grisé, le dessous rosé. Le dimorphisme est le même que chez les autres Cacatoès et concerne la couleur de l'iris.

g. Le Cacatoès microglosse (*Probosciger aterrimus*)

Ce grand Cacatoès noir se distingue des autres Cacatoès par une mandibule supérieure proéminente et une petite mandibule inférieure. Il a également les joues nues, de couleur rouge dont l'intensité varie selon l'état d'excitation de l'animal. Mâles et femelles sont identiques.

h. Le Cacatoès de Banks (*Calyptorhynchus* ou *C. banksii*)

Ce Cacatoès est également appelé Cacatoès magnifique ou Cacatoès noir à queue rouge du fait de la couleur des rectrices. Un important dimorphisme sexuel est visible. On différencie les adultes au premier coup d'œil : le mâle est noir uniforme tandis que la femelle présente une multitude de petites taches jaunes sur la tête, le cou et le corps.

11. L'Eclectus (*Eclectus roratus*)

Le genre *Eclectus* ne comprend qu'une seule espèce mais un grand nombre de sous-espèces. L'Eclectus est un perroquet de taille moyenne (environ trente-cinq centimètres) de forme trapue, au bec massif et à la queue courte et carrée. Le dimorphisme sexuel est très évident. Chez toutes les sous-espèces, le mâle a un plumage vert avec un bec beige, tandis que la femelle est rouge-mauve avec le bec noir (HEINSOHN, 2008) (figure 5).

12. Loris et Loriguets

Les Loris et Loriguets sont représentés par de nombreuses espèces toutes nectarivores et frugivores. La différence entre les deux est arbitraire, les Loriguets étant moins trapus que les Loris. Leur plumage est de manière générale très coloré, mais leur détention se heurte souvent à l'obstacle de leur régime alimentaire composé de nectar, d'insectes et de fruits. Leur langue, allongée et se terminant par une brosse, est parfaitement adaptée à ce régime. Les sexes sont le plus souvent identiques.

a. Le Lori de Duyvenbode (*Chalcopsitta duivenbodei*)

Ce perroquet présente un plumage marron foncé avec le front, la gorge, le bord et le dessus de l'aile, ainsi que les cuisses orange. La femelle est identique au mâle, avec cependant

une taille légèrement plus petite et un plumage moins coloré.

b. Le Lori noir (*Chalcopsitta atra*)

Il existe un certain nombre de sous-espèces, dont la principale est entièrement noire avec le dessous de la queue olive. La femelle est légèrement plus petite que le mâle, et son iris est brun tandis que celui du mâle est brun-rougeâtre.

c. Le Lori flamméché (*Chalcopsitta scintillata*)

Il s'agit d'un perroquet au plumage vert olive, dont le ventre et la poitrine sont striés de jaune ou d'orange. Le front est rouge. Ce Lori ne présente aucun dimorphisme sexuel.

d. Le Lori cardinal (*Chalcopsitta cardinalis*)

Cet oiseau au plumage uniformément rouge bordeaux est rare en captivité. Mâles et femelles sont identiques.

e. Le Loriquet orné (*Trichoglossus ornatus*)

Le Loriquet orné au plumage brillamment coloré est assez fréquent chez les aviculteurs. Il n'existe aucun dimorphisme sexuel (figure 6).

f. Le Loriquet à tête bleue (*Trichoglossus haematodus*)

Également appelé Loriquet arc-en-ciel, il est le plus répandu des Loris et Loriquets. Son plumage est le plus coloré du genre. La tête et le ventre sont bleu foncé, le dos et la queue sont verts, la poitrine et le bec orange. Les deux sexes sont totalement identiques.

g. Le Loriquet de Goldie (*Psitteuteles goldiei*)

Le Loriquet de Goldie est un petit perroquet d'une vingtaine de centimètres. Son corps est vert pomme orné de multiples stries verticales noires. La tête est rouge violacé. Le dimorphisme sexuel est totalement absent.

h. Le Lori tricolore (*Lorius lory*)

Le Lori tricolore est l'espèce la plus connue du genre *Lorius*. Le rouge vif domine dans son plumage. La tête est ornée d'une calotte noire. Le ventre et le dos sont bleus. Les ailes sont vertes. Aucun dimorphisme sexuel n'est présent chez ce perroquet.

i. Le Lori noira (*Lorius garrulus*)

Le Lori noira possède un plumage à dominante rouge. Les ailes et l'extrémité de la queue sont brun vert. Il n'existe aucun dimorphisme sexuel, le mâle étant seulement

légèrement plus gros que la femelle.

j. Le Loriquet joli ou coquet (*Charmosyna placentis*)

Cette petite espèce de seize centimètres exhibe un dimorphisme sexuel évident. Le plumage est à base de vert. Le mâle possède des joues rouges qui deviennent caudalement bleues, jusqu'à la nuque. A la différence du mâle, la femelle présente des joues vertes striées de jaune.

k. Le Lori arlequin, ou Lori bleu et rouge (*Eos histrio*)

Ce Lori bleu et rouge est un Lori figurant en annexe I de la convention de Washington. Des cas de reproduction de ce perroquet bleu et rouge sont de plus en plus signalés dans le monde et son sexage prend alors toute son importance. Il n'y a pas de dimorphisme sexuel chez cette espèce.

l. Le Loriquet papou (*Charmosyna papou*)

Le Loriquet papou peut se rencontrer dans son environnement naturel sous sa forme mélanique, qui est une mutation, où l'ensemble du plumage est noir à l'exception du croupion et des sous-caudales, ainsi que du bec qui restent rouges, ou bien sous sa forme normale, où le plumage est rouge vif. Dans la phase rouge, la femelle se reconnaît par la couleur jaune des côtés du croupion et du bas du dos. Dans la phase noire, ces zones sont vertes.

m. Le Lori écarlate (*Eos bornea*)

Chez cette espèce entièrement rouge avec des zones bleues sur les ailes et les plumes sous-caudales, les deux sexes sont identiques, la femelle pouvant être légèrement plus petite que le mâle.

n. Le Lori à joues bleues (*Eos cyanogenia*)

Le Lori à joues bleues arbore un plumage brillant rouge et noir. Mâles et femelles sont identiques.

o. Le Lori sombre (*Pseudos fuscata*)

Son plumage est un mélange de couleurs vives. Deux patrons de couleurs coexistent dans la nature : le jaune et le rouge-orangé. Le sexage visuel est impossible chez cette espèce.



Figure 6 : Loriguets ornés (*Trichoglossus ornatus*).

Le dimorphisme sexuel est inexistant chez cette espèce brillamment colorée. (photo Yannick Lambert, Parcs aux oiseaux de Villars-les-dombes)



Figure 7 : Couple de Kéa (*Nestor notabilis*). La femelle, à droite possède un bec plus court et moins incurvé que le mâle, à gauche. (photos Yannick Lambert, Parc aux oiseaux de Villars-les-Dombes)



Figure 8 : Couple de perruches de Derby (*Psittacula derbiana*).

Le mâle (à droite) se distingue aisément de la femelle par la couleur de son bec : rouge à extrémité jaune. (photo Yannick Lambert, Parc de Clères)



Figure 9 : Youyou du Sénégal (*Poicephalus senegalus*).

Mâle (sexé par méthode moléculaire) (photo Yannick Lambert)

13. Les Loricules (*Loriculus spp.*)

Les Loricules sont des petits perroquets de neuf à quinze centimètres, frugivores et nectarivores, dont le dimorphisme sexuel est évident. Leur plumage est principalement vert. Le Loricule ou Coryllis à tête bleue (*Loriculus galgulus*) est le plus représenté en captivité. Vers l'âge d'un an, dès l'acquisition du plumage adulte, d'une part la femelle n'a pas la tache rouge sur la gorge, et d'autre part la tache jaune d'or sur le manteau et la bleue sur la couronne sont plus faiblement marquées.

14. Les perroquets de Nouvelle-Zélande

Trois espèces sont endémiques de Nouvelle-Zélande : Le Kéa (*Nestor notabilis*), le Kaka (*Nestor meridionalis*) et le Kakapo (*Strigops habroptilus*). Ce sont des oiseaux crépusculaires d'environ cinquante centimètres, possédant un bec fin et allongé. Ils se distinguent, par leur apparence et leur mode de vie, des autres perroquets.

a. Le Kéa (*Nestor notabilis*)

Le Kéa, au plumage globalement brun, a la particularité d'occuper les zones montagneuses de Nouvelle-Zélande. Il niche au sol, à une altitude comprise entre 700 et 2000 mètres. Contrairement aux deux autres espèces, il n'est pas considéré comme menacé avec une population estimée en 1985 entre 1000 et 5000 individus (ROWLEY et COLLAR, 1997). Le dimorphisme sexuel est subtil, et contrairement à la grande majorité des espèces de perroquets, des études ont quantifié les différences morphologiques entre mâles et femelles, suggérant que le mâle est environ 5% plus grand que la femelle avec un bec 12 à 14% plus long. La femelle présente également un bec moins incurvé (figure 7).

Cette différence de taille semble en outre présente avant la maturité sexuelle ce qui implique une différenciation possible des juvéniles (BOND et al., 1991).

b. Le Kaka (*Nestor meridionalis*)

Le Kaka, dont le plumage est à dominante brun-rouge, fréquente les forêts compactes de basse et de moyenne altitude de Nouvelle-Zélande. L'espèce est considérée comme vulnérable, avec une population en déclin du fait de la destruction de son habitat, et de l'introduction de prédateurs (ROWLEY et COLLAR, 1997). Le Kaka, comme le Kéa, présente également un certain degré de dimorphisme sexuel. Des études ont montré que les mâles sont en moyenne 4% environ plus grands que les femelles, et présentent un culmen,

arête dorsale de la mandibule supérieure, en moyenne 13,6% plus long que celui des femelles. Ce dimorphisme existe également chez les juvéniles et sub-adultes (MOORHOUSE et al., 1999).

c. **Le Kakapo (*Strigops habroptilus*)**

Le Kakapo est l'espèce la plus menacée de Nouvelle-Zélande (en menace critique d'extinction) (ROWLEY et COLLAR, 1997). L'effectif a drastiquement diminué depuis l'arrivée des européens et l'introduction de prédateurs. L'espèce, nocturne et incapable de voler, est peu prolifique avec une ponte comprenant un à deux œufs, rarement trois. Le mâle, polygame, ne participe qu'à l'accouplement, et la femelle, seule pour la couvaison, doit quitter le nid chaque nuit pour se nourrir, laissant ainsi les œufs puis les jeunes sans surveillance. Ils font l'objet d'un plan de sauvegarde par les autorités néo-zélandaises, avec déplacement initial de populations sur des îles dépourvues de prédateurs. Le Kakapo est ainsi considéré aujourd'hui comme éteint dans son milieu d'origine. En janvier 1997, la population était estimée à 50 individus, dont 19 femelles (ROWLEY et COLLAR, 1997). La détermination des mécanismes responsables d'un tel sex-ratio de 2 mâles pour une femelle est primordial pour le programme de sauvegarde. Le sexage, prend également toute son importance chez cet oiseau au dimorphisme subtil (ROBERTSON et al., 2000). Il n'existe aucune différence de taille entre le mâle et la femelle (ROWLEY et COLLAR, 1997), mais cette dernière semblerait moins lourde. Malheureusement, ce critère se heurte à la forte variation périodique du poids au cours de l'année (ROBERTSON et al., 2000). Différencier les sexes par observation du comportement sexuel est possible car les mâles, regroupés sur une même zone, adoptent un comportement particulier et émettent une vocalisation caractéristique pour attirer la femelle (MERTON et al., 1984), mais la reproduction est rarement obtenue et observée (ROWLEY et COLLAR, 1997). Une étude menée en 2000 a démontré l'existence d'une différence de patron de coloration des rémiges primaires. Le sexage moléculaire, possible, est une excellente alternative (ROBERTSON et al., 2000).

B. Perroquets du continent asiatique : Le genre *Psittacula*

Le genre *Psittacula* regroupe des espèces de moyenne à grande taille se distinguant par une longue queue étroite et par un bec robuste. L'autre particularité de ces espèces est de présenter un collier ou une "moustache". Lorsqu'il s'agit d'un collier, seul le mâle en est orné, et lorsqu'il s'agit d'une moustache, les deux sexes la possèdent. Le dimorphisme sexuel est très

marqué chez les adultes, mais absent chez les jeunes avant qu'ils n'aient acquis leur plumage définitif, vers l'âge de trois ans. Le plumage, avant trois ans, est alors le même que celui des femelles et le recours à des techniques de sexage plus complexes est obligatoire.

1. La perruche à collier (*Psittacula krameri*)

Il existe quatre sous-espèces de perruche à collier. Il s'agit d'oiseaux au corps élancé, dont les mutations de couleur sont nombreuses et pour lesquelles le dimorphisme sexuel peut être absent. Dans le patron sauvage, le dimorphisme est évident mais n'apparaît qu'à l'âge de trois ans. Seuls les mâles possèdent un collier noir et rose séparant la tête du reste du corps. La femelle n'en possède pas ou alors un flou et diffus. Avant l'âge de trois ans, les jeunes sont semblables aux femelles.

2. La perruche à moustache (*Psittacula alexandri*)

La sous-espèce *Psittacula alexandri fasciata* est la plus courante en captivité. Cette élégante perruche se reconnaît facilement par le collier noir incomplet dessiné sur les joues dont l'emplacement et la forme rappellent une moustache. La tête est gris-bleu vif, le corps généralement vert et la poitrine rosée. Le dimorphisme est très marqué chez cette sous-espèce. Les deux sexes se reconnaissent très facilement par la coloration du bec qui est rouge chez le mâle et noir chez la femelle. Les jeunes n'acquièrent la couleur définitive du plumage et du bec qu'entre huit et quinze mois. Avant cet âge, le sexage visuel est impossible.

3. La perruche à tête de prune (*Psittacula cyanocephala*)

Le dimorphisme sexuel, très évident, n'apparaît également qu'à la troisième année de vie. La mâle se distingue de la femelle par une tête rouge prune. La femelle, comme les jeunes, a une tête gris bleuté.

4. La perruche Alexandre (*Psittacula eupatria*)

La perruche Alexandre ressemble fortement à la perruche à collier par ses couleurs mais avec une taille supérieure. Le collier noir et rose du mâle, absent chez la femelle, n'apparaît qu'à la troisième année. Les jeunes des deux sexes sont identiques aux femelles.

5. La perruche de Derby (*Psittacula derbiana*)

Cette grande perruche possède une « moustache » noire, séparant la tête bleue du reste du corps vert sur le dessus et violet au dessous. Le dimorphisme sexuel est très marqué chez les adultes. Le bec est noir chez la femelle, rouge à extrémité jaune chez le mâle (figure 8).



Figure 10 : Couple de perroquets Gris du Gabon (*Psittacus erithacus*) et Cacatoès à oeil nu (*Cacatua sanguinea*).

Au premier plan, couple de Gris du Gabon : Le mâle (à droite) est totalement identique à la femelle. En arrière plan, couple de Cacatoès à oeil nu dont le dimorphisme est très discret (photo Yannick Lambert, Parc de Clères)



Figure 11 : Couple d'Amazones à joues vertes (*Amazona viridigenalis*).

Le dimorphisme sexuel est absent, le mâle (à gauche) est totalement identique à la femelle (à droite). (photo Yannick Lambert, Parc de Clères)

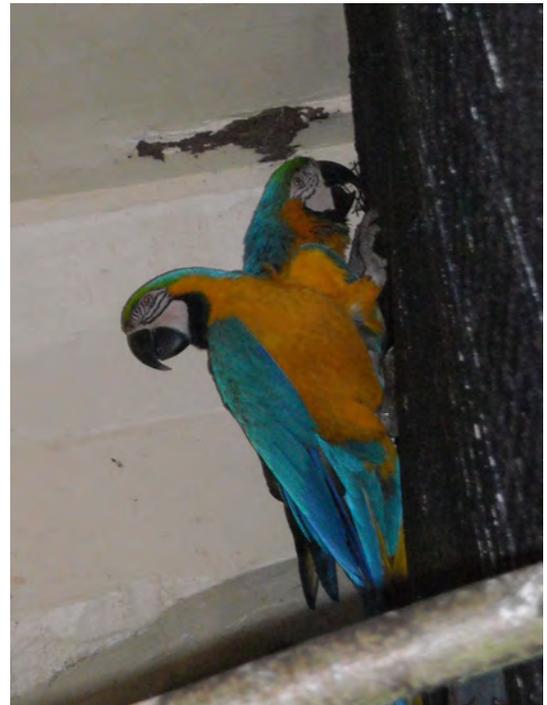


Figure 12 : Aras bleus (*Ara ararauna*).

Le dimorphisme sexuel est absent chez cette espèce. La taille supérieure de l'individu du fond ainsi que sa tête plus puissante laissait croire qu'il s'agissait du mâle. Un sexage par endoscopie a montré qu'il s'agissait de deux femelles. (photo Yannick Lambert, Parc de Clères)

C. Perroquets du continent africain

1. Le Youyou du Sénégal (*Poicephalus senegalus*)

Le youyou est un des perroquets les plus maintenus en captivité du fait de sa petite taille, de son caractère et de sa capacité à imiter toute sorte de sons. Il s'agit d'un petit perroquet d'une vingtaine de centimètres, au corps trapu et à la queue courte. Le corps est vert et la tête grise. L'abdomen est teinté de jaune-orange. La reproduction est aisée mais le dimorphisme sexuel totalement absent (figure 9).

2. Le perroquet de Meyer (*Poicephalus meyeri*)

Le perroquet de Meyer est un petit perroquet à l'allure trapue, au ventre vert et au dos gris, avec une tache jaune sur le front et sur les épaules. Les mâles sont identiques aux femelles.

3. Le perroquet Gris du Gabon (*Psittacus erithacus*)

Le Gris du Gabon est le plus familier et le plus répandu de tous les perroquets. Sa popularité est due à son apprivoisement aisé et à ses capacités extraordinaires d'imitation. La reproduction est très importante en captivité. Le dimorphisme est cependant totalement absent, et le recours à des méthodes de sexage plus complexes est obligatoire (figure 10).

4. Les Inséparables (Genre *Agapornis*)

Les inséparables (neuf espèces) sont des petits perroquets d'une quinzaine de centimètres, au corps trapu, à la queue courte et au bec puissant. Ils sont souvent réunis par deux collés l'un à l'autre. Le dimorphisme sexuel peut être absent, subtil à évident.

a. Inséparable à tête noire (*Agapornis personatus*)

Ce perroquet est caractérisé par une tête noire et un cercle oculaire blanc. La couleur du reste du plumage peut varier selon les différentes mutations. Le dimorphisme sexuel est totalement absent.

b. Inséparable à face rose (*Agapornis roseicollis*)

Il existe de nombreuses mutations de cet inséparable, mais toutes ont comme point commun un plumage rose formant un masque sur la face. Le dimorphisme sexuel est inexistant.

c. Inséparable de Fischer (*Agapornis fischeri*)

Aucun dimorphisme n'est présent chez cet inséparable caractérisé par un corps vert, la tête et la gorge orange pêche, le collier jaune et le bec rouge.

d. Inséparable d'Abyssinie (*Agapornis taranta*)

Il s'agit de l'espèce la plus grande du genre *Agapornis*. Le dimorphisme sexuel est évident : la femelle est entièrement verte tandis que le mâle présente une coloration rouge vif sur le front et le tour de l'œil.

e. Inséparable à tête grise (*Agapornis canus*)

Le dimorphisme sexuel est évident chez cet inséparable. La femelle est entièrement verte. Le mâle possède la tête, le cou et la poitrine gris-blanc.

D. Perroquets du continent américain

1. Les perruches moineaux (*Forpus spp.*)

Les perruches moineaux forment un groupe d'oiseaux trapus et à queue courte, dont la morphologie rappelle les inséparables. Le dimorphisme sexuel est évident. Les femelles sont entièrement vertes, alors que les mâles présentent une dominante verte, avec des marques bleues sur le croupion et les ailes.

2. Les Amazones (Genre *Amazona*)

Les Amazones sont des perroquets trapus, d'une trentaine de centimètres, à l'intelligence hors du commun et dotés d'une forte personnalité. Le plumage est à dominante verte chez toutes les espèces. Aucune ne présente de dimorphisme sexuel à l'exception de l'Amazone à front blanc (*Amazona albifrons*) et de son espèce voisine l'Amazone du Yucatan (*Amazona xantholora*).

a. L'Amazone à front bleu (*Amazona aestiva*)

C'est l'espèce la plus répandue. Le plumage est vert avec des éclats de jaune. Le front est bleu et jaune dans différentes proportions.

b. L'Amazone à lores rouges (*Amazona autumnalis*)

Les deux sexes sont également identiques chez cette espèce au plumage entièrement vert à l'exception du front rouge et du sommet de la tête légèrement bleuâtre.

c. L'Amazone à ailes oranges (*Amazona amazonica*)

Ce perroquet est souvent confondu avec l'Amazone à front bleu. Il s'en distingue par sa taille plus petite, et une coloration bleue qui tire sur le mauve. Le dimorphisme sexuel est inexistant.

d. L'Amazone à front blanc (*Amazona albifrons*)

Le dimorphisme sexuel existant chez cette espèce n'est évident qu'à partir de la deuxième année. Le mâle présente alors des marques rouges sur les plumes de couverture primaires. La femelle est verte.

e. L'Amazone du Yucatan (*Amazona xantholora*)

Il s'agit d'une espèce voisine de l'Amazone à front blanc. Le dimorphisme sexuel est présent, et la femelle se reconnaît par l'absence de tache blanche sur le front et de marques rouges sur les plumes de couvertures.

f. L'Amazone à front jaune (*Amazona ochrocephala*)

Il existe plusieurs sous-espèces qui se différencient par l'importance des marques jaunes sur la face. Le plumage est entièrement vert à l'exception de quelques rémiges rouges et le front est jaune. Aucun dimorphisme sexuel n'est visible.

g. L'Amazone à joues vertes (*Amazona viridigenalis*)

L'Amazone à joues vertes se reconnaît par sa couronne et son front rouges. Deux bandes violettes s'étendent des yeux jusqu'à la nuque de part et d'autre de la tête. Le reste du corps est vert, les plumes étant bordées de brun. Mâles et femelles sont totalement identiques (figure 11).

3. Les Aras

On regroupe sous ce terme des grands perroquets, au bec puissant et possédant une longue queue. Le plumage est souvent brillamment coloré. La famille des Aras comprend le genre *Ara*, le plus connu, le genre *Anodorhynchus*, le genre *Diopsittaca*, et le genre *Cyanopsitta*, dont l'unique espèce, le Ara de Spix est au bord de l'extinction à l'état sauvage. Le dimorphisme sexuel est inexistant chez tous les Aras.

a. Ara Hyacinthe (*Anodorhynchus hyacinthinus*)

Le Ara Hyacinthe est le plus grand des perroquets. Sa taille est d'environ un mètre,

pour un poids de 1,6 kilogramme à l'âge adulte. Le plumage est entièrement bleu, avec des cercles oculaires jaunes. Le dimorphisme sexuel est totalement absent.

b. Ara bleu (*Ara ararauna*)

Il s'agit du plus répandu des Aras en captivité. Son plumage est vivement coloré avec le front vert, la nuque, la croupe et les ailes bleues, le cou, la poitrine et l'abdomen jaunes. Mâles et femelles sont identiques (figure 12).

c. Ara Chloroptère (*Ara chloroptera*)

Il s'agit d'un grand perroquet de quatre-vingt dix centimètres de longueur. La peau nue des joues est striée de rouge. Le corps est rouge, avec les rémiges et quelques rectrices bleues. Les plumes de couverture alaires sont vertes. Les sexes sont identiques.

d. Ara rouge ou Ara Macao (*Ara macao*)

Le Ara Macao, inscrit en annexe I de la convention de Washington, est le plus coloré du genre. Le plumage est écarlate, avec les plumes de la croupe et du dessus de la queue bleues. La queue est rouge. Les ailes sont rouges, jaune vif et bleues. Les zones glabres du contour des yeux sont blanches.

e. Ara militaire (*Ara militaris*)

Son nom provient de la dominance verte de son plumage. Le dimorphisme sexuel est absent.

f. Ara à collier d'or (*Ara ou Propyrrhura auricollis*)

Le Ara à collier d'or se reconnaît par la marque horizontale jaune qu'il porte sur l'arrière et les côtés du cou. La tête vire au bleu tandis que le reste du corps est vert foncé. Les sexes sont encore une fois identiques.

g. Ara noble (*Diopsittaca nobilis*)

Il s'agit du plus petit des Aras. Le plumage est à dominance verte rehaussée d'une trace rouge aux épaules. Cette espèce ne présente aucun dimorphisme sexuel.

h. Ara de Spix (*Cyanopsitta spixii*)

La détermination du sexe revêt une importance capitale dans le cas de ce Ara au plumage entièrement bleu décrit en 1819 par Von Spix, dont il n'existe plus aucun individu à l'état sauvage et une petite soixantaine d'individus en captivité (DE WAILLY et al., 2004). Le

déclin de la population de ce perroquet, causé par la capture afin d'alimenter le commerce et la réduction de son habitat, a conduit à des plans de sauvegarde, menés par des groupes de conservation tel que le CPRAA (Permanent Committee for the Recovery of Spix's Macaw) responsable du monitoring, du programme de reproduction et de la protection des derniers individus (CAPARROZ et al., 2001 ; GRIFFITHS 2000). Sous la pression du gouvernement brésilien, les individus captifs sont ainsi devenus une colonie de reproducteurs, dans le but d'augmenter la taille de la population et de réintroduire la descendance dans le milieu naturel. Les efforts de reproduction tentés pour sauver cette espèce qui semble perdue et dont le dimorphisme sexuel est absent passe donc par la formation de couples nécessaires aux programmes de sauvegarde et par le sexage moléculaire (GRIFFITHS et TIWARI, 1995).

4. Les Piones (*Pionus spp.*)

Les perroquets du genre *Pionus* sont de taille moyenne. Le corps est trapu et leur queue courte. On les reconnaît par leurs plumes sous-caudales rouge vif. Aucun ne présente de dimorphisme sexuel.

a. Pione à tête bleue (*Pionus menstruus*)

Il s'agit de la Pione la plus répandue en captivité. Le plumage est vert. La tête et le cou sont bleus, les zones auriculaires sont noires. Le dessous des retrices est rouge.

b. Pione de Maximilien (*Pionus maximiliani*)

Elle rappelle la Pione à tête bleue. La tête est couverte de plumes vertes bordées de bleu. Un large collier bleu est présent au niveau de la gorge. Les yeux sont bordés d'un cercle oculaire blanc dénudé.

c. Pione à couronne blanche (*Pionus senilis*)

Le plumage est à dominance verte avec des reflets bleuâtres. Le front, le sommet du crâne et la gorge sont blancs. Les cercles oculaires sont roses.

5. Les Caiques (*Pionites spp.*)

Les Caiques sont des petits perroquets d'une vingtaine de centimètres aux couleurs vives et contrastées. Le dimorphisme sexuel est totalement absent et la formation de couples reproducteurs implique un sexage par ADN ou par endoscopie.

6. La perruche souris (*Myiopsitta monachus*)

La perruche souris, d'une trentaine de centimètres, possède un plumage vert avec la

face, la poitrine et le ventre gris souris. Elle est reconnue dans son milieu naturel comme un nuisible bruyant. L'espèce est monomorphique.

7. Les Touis (*Brotogeris spp.*)

Les huit espèces du genre *Brotogeris* sont de petite taille (seize à vingt-cinq centimètres). Leur plumage est à dominance verte, avec une tache colorée au menton, au front, sur les primaires ou bien sous les ailes. Elles sont toutes monomorphiques.

Le terme « Psittaciforme » regroupe un grand nombre d'espèces. De morphologie uniforme, la majorité des perroquets ont également en commun un dimorphisme sexuel quasi-inexistant, voire totalement absent. Pour quelques espèces seulement, parmi les plus représentées en captivité ou les espèces d'intérêt conservatoire, des différences de morphologie ou de plumage permettent une différenciation plus ou moins aisée des sexes.

CHAPITRE 2 : SEXAGE DES PSITTACIFORMES

Soixante-quinze pour cent des Psittaciformes sont considérés comme sexuellement monomorphiques (SANTOS et al., 2006). Plus particulièrement chez les jeunes oiseaux, la détermination du sexe par l'analyse de leur morphologie externe est quasiment impossible.

I. Intérêts du sexage

A. Intérêts pour les programmes de reproduction, pour les populations sauvages et les espèces menacées

La chute du nombre d'individus de certaines espèces de perroquets, causée par la destruction des habitats naturels et par le commerce illégal (BERMUDEZ-HUMARAN et al., 2002), a conduit à envisager des plans de renforcement des populations. C'est notamment le cas de la plupart des espèces de Aras (BERMUDEZ-HUMARAN et al., 2002), en particulier du Ara de Spix (*Cyanopsitta spixii*) (GRIFFITHS et TIWARI, 1995), ou de l'amazone de Saint-Vincent (*Amazona guildingii*) dont l'extinction est causée par une activité volcanique intense sur l'île de Saint-Vincent, par la capture et la chasse (RUSSELLO et AMATO, 2001). C'est également le cas du Kakapo (*Strigops habroptilus*) dont la diminution drastique du nombre d'individus a été causée par l'arrivée des Européens en Nouvelle-Zélande et par l'introduction de prédateurs (ROWLEY et COLLAR, 1997). Certains parcs zoologiques ont pour vocation de préserver des espèces en voie de disparition hors de leur habitat naturel tant que celui-ci est menacé, c'est le cas pour la forêt amazonienne, (MIYAKI et al., 1998) ou tant que le braconnage et le prélèvement d'oiseaux destinés à l'exportation sévissent. En amont de ces projets il faut bien entendu qu'il y ait des plans de reproduction à l'échelle du parc zoologique ou organisés entre les différents parcs. Le gouvernement de Saint-Vincent a ainsi initié dans les années 1980 un programme de support de la population sauvage de l'Amazone endémique de l'île, consortium résultant d'un effort des zoos, des éleveurs particuliers et du gouvernement lui-même (RUSSELLO et AMATO, 2001). Il est alors nécessaire de sexer les individus destinés au programme en vue de former des couples dont la descendance sera réintroduite (MIYAKI et al., 1997a ; RUSSELLO et AMATO, 2001). Le choix de la méthode de sexage est un aspect primordial des programmes de reproduction d'espèces captives. Différentes études tendent à mettre au point une méthode fiable, rapide, peu coûteuse et non invasive afin de sexer les futurs reproducteurs des espèces monomorphiques menacées

(BERMUDEZ-HUMARAN et al., 2002 ; GRIFFITHS et TIWARI, 1995 ; ROBERTSON et al., 2000 ; RUSSELLO et AMATO, 2001). Le meilleur exemple constitue celui du Ara de Spix, dont le dernier individu sauvage, découvert dans les années 1980, fut la clé du programme de sauvegarde. Cet individu connaissait son milieu d'origine, la nourriture et les prédateurs qu'y s'y trouvent. Son sexage était indispensable, mais une capture suivie d'une méthode invasive étaient hors de question (GRIFFITHS, 2000). En 1995, la méthode choisie fut donc le sexage moléculaire à partir de plume de mue ; elle indiqua qu'il s'agissait d'un mâle (GRIFFITHS et TIWARI, 1995).

B. Intérêts pour les éleveurs

Le sexage des reproducteurs est l'étape incontournable pour optimiser la reproduction en captivité. L'élevage des perroquets représente un véritable challenge. Les infrastructures nécessaires s'avèrent souvent très onéreuses. Le coût d'acquisition de certains reproducteurs est très élevé. Enfin, la maturité sexuelle est de manière générale atteinte à l'âge de 4 ou 5 ans. L'éleveur doit donc pouvoir sexer ses oiseaux le plus tôt possible, afin d'éviter d'accoupler inutilement pendant plusieurs années des mauvaises paires (CERIT et AVANUS, 2007). L'enjeu économique est également corrélé à la demande par les particuliers d'acquérir des oiseaux déjà sexés. L'avantage pratique pour l'éleveur est de pouvoir, par certaines méthodes, déterminer le sexe des oisillons au nid dès l'apparition des premières plumes.

C. Intérêts pour les particuliers

La détermination du sexe des perroquets est indispensable pour les propriétaires souvent désireux de choisir un nom approprié pour leur pensionnaire, d'avoir une idée de son comportement futur, et qui entretiennent généralement des relations très étroites de jeu et de communication avec leur perroquet. En outre, les mâles sont souvent considérés comme plus doués pour l'imitation du langage parlé, et ceci crée parfois une différence de prix entre les mâles et les femelles (CERIT et AVANUS, 2007). Pour les amateurs, le maintien de ces volatiles est devenu une véritable passion, dont l'ultime étape est souvent d'obtenir leur reproduction ce qui est également le constat indéniable d'un animal en parfaite santé. Mais pour observer des œufs puis des oisillons il faut bien entendu au préalable constituer un couple. Les responsables d'animaleries sont également confrontés au même problème. En effet, le prélèvement d'oiseaux sauvages n'est plus souhaité. La convention de Washington réglemente de plus en plus strictement les importations, voire les interdit. Certains clients, enfin, refusent catégoriquement ces oiseaux importés souvent très sauvages et agressifs. Les

sujets reproduits en élevage, bien plus sociables, représentent la plus sérieuse des alternatives. Mais là encore, il faut pouvoir s'approvisionner en oiseaux issus de couples reproducteurs.

D. Intérêts pour le vétérinaire

La connaissance du sexe de l'oiseau représente pour le vétérinaire une information très utile lors de maladie liée au sexe. C'est le cas pour les rétentions d'œuf, la ponte extra-utérine, le picage ou les combats entre individus dont le sexage oriente le diagnostic (RIVAL, 2005). Le vétérinaire doit également pouvoir faire, entre les différentes méthodes de sexage, le choix le plus approprié. Ainsi selon l'âge de l'animal, les équipements à disposition, le comportement plus ou moins docile de l'oiseau, son état de santé, et les capacités financières du propriétaire, il va s'orienter vers une méthode de sexage en particulier.

II. Les principales méthodes de sexage

A. Sexage phanéroptique des adultes chez les espèces dimorphiques

Le sexage des oiseaux présentant un dimorphisme sexuel ne présente aucune difficulté. Cette partie s'inscrit comme un résumé de la partie *Taxonomie* à laquelle il faudra se référer afin de trouver les éléments de différenciation sexuelle chez telle ou telle espèce dimorphique. Notons au préalable que le dimorphisme n'est en général présent qu'après l'acquisition des caractéristiques morphologiques d'adulte, c'est à dire, après plusieurs mois à plusieurs années chez certaines espèces. Notons également que, même s'il est présent, le dimorphisme sexuel est parfois fort subtil, et ne permet alors pas de s'affranchir d'autres méthodes de sexage.

1. Couleur du plumage

Chez quelques espèces de perroquets une différence de couleur permet aisément de différencier le mâle de la femelle. Un fort dimorphisme est rare chez les perroquets. C'est le cas de l'Eclectus, dont le dimorphisme sexuel est très évident, à tel point que le mâle (dont les premiers individus ont été découverts en 1776) et la femelle (découverte en 1837) ont été considérés comme deux espèces distinctes jusqu'en 1874 (HEINSOHN, 2008). Le mâle a un plumage vert tandis que la femelle est rouge mauve (figure 5). Chez la perruche royale, la femelle a la tête verte, tandis que celle du mâle est rouge vif (figure 2).

Ces différences de couleur sont malheureusement le plus souvent absentes chez les nombreuses mutations existantes de certaines espèces de perruches. C'est le cas par exemple de la perruche Calopsitte chez laquelle le dimorphisme n'est évident que dans le type sauvage (figure 13), ou encore de la perruche à collier, chez laquelle, dans le patron sauvage, seul le mâle est orné d'un collier noir au niveau du cou.

2. Couleur de l'iris

Il existe chez les Cacatoès une discrète différence concernant la couleur de l'iris chez les deux sexes, brun-noir chez le mâle, brun-rouge chez la femelle (figure 3). Cette différence très subtile n'apparaît qu'à l'âge de trois ans, et le recours à des méthodes de sexage plus complexes est en général très utile.

3. Taille, forme, couleur du bec, couleur de la cire

La différenciation du sexe est parfois possible par l'observation du bec et de la cire.

Dans le patron sauvage de la perruche ondulée par exemple, la cire surplombant le bec est bleue chez le mâle tandis qu'elle est brune chez la femelle. Cette différenciation n'est pas fiable chez les sujets hybrides.

Chez l'Eclectus, le mâle possède un bec beige, tandis qu'il est noir chez la femelle (figure 5).

Un autre exemple concerne la perruche à moustache ou la perruche de Derby chez qui les deux sexes sont facilement reconnaissables par la coloration du bec rouge chez le mâle, noir chez la femelle, cette différence n'apparaissant qu'après acquisition de la couleur définitive du plumage et du bec, entre huit et quinze mois (figure 8).

Enfin, chez le Kéa et le Kaka, la femelle présente un bec plus court et moins incurvé (BOND et al., 1991 ; MOORHOUSE et al., 1999). Le dimorphisme est possible dès lors qu'une comparaison est possible entre deux individus de sexe opposé (figure 7).

4. Taille, couleur de la huppe érectile

Cette caractéristique s'applique à la perruche Calopsitte, possédant une huppe érectile dont la couleur et la taille varient légèrement entre le mâle (jaune, effilée) et la femelle (jaune teintée de gris, plus courte). Cette caractéristique est malheureusement absente ou très subtile chez certaines mutations de couleur (figure 13).



Figure 13 : Couple de perruches Calopsittes (*Nymphicus hollandicus*) mutation lutino.

La distinction des sexes est difficile chez cette mutation. La longueur de la huppe de l'individu de gauche pourrait indiquer qu'il s'agit du mâle. La femelle se situerait à droite.

(Photo Yannick Lambert, couple reproducteur d'un élevage situé en Seine-maritime)

Le tableau I résume les principaux critères de dimorphisme chez certaines espèces de perroquets.

ESPECE (INDIVIDUS ADULTES)	MALE	FEMELLE
Perruche ondulée (variété sauvage)	<ul style="list-style-type: none"> • Cire nasale bleue 	<ul style="list-style-type: none"> • Cire nasale marron
Perruche calopsitte (variété sauvage)	<ul style="list-style-type: none"> • Dessous des rémiges primaires et rectrices gris uniforme • Plumes auriculaires orange vif • Huppe jaune vif 	<ul style="list-style-type: none"> • Dessous des rémiges primaires et rectrices striés • Ensemble plus terne
Perruche turquoisine	<ul style="list-style-type: none"> • Face bleue intense • Traces rouges sur les ailes 	<ul style="list-style-type: none"> • Bande sous-alaire
Perruche splendide	<ul style="list-style-type: none"> • Cou et poitrine rouge écarlate 	<ul style="list-style-type: none"> • Rouge remplacé par du vert • Masque facial moins étendu et moins foncé
Perruche de Bourke	<ul style="list-style-type: none"> • Bande frontale bleue 	<ul style="list-style-type: none"> • Absence de bande frontale
Perruche de Stanley	<ul style="list-style-type: none"> • Tête, poitrine et dessous du corps rouge • tache jaune sur les joues plus étendues 	<ul style="list-style-type: none"> • Tête, poitrine et dessous du corps vert mêlé de rouge • Bande sous-alaire
Perruche mélanure	<ul style="list-style-type: none"> • Essentiellement jaune 	<ul style="list-style-type: none"> • Essentiellement verte
Perruche de Barraband	<ul style="list-style-type: none"> • Front, joues, gorge jaunes 	<ul style="list-style-type: none"> • Entièrement verte
Perruche à croupion rouge	<ul style="list-style-type: none"> • Dominance vert émeraude aux reflets bleus • Ventre jaune • Croupion rouge 	<ul style="list-style-type: none"> • Ventre vert olive • Ailes et dos gris • Croupion vert
Perruche multicolore	<ul style="list-style-type: none"> • Plumage vert vif • Marques jaunes sur les ailes • Ventre et cuisses orange-rouge 	<ul style="list-style-type: none"> • Plumage plus terne • Plumage vert brunâtre • Dessous du corps vert pâle • Bande sous-alaire
Perruche à ailes d'or	<ul style="list-style-type: none"> • Plumage bleu turquoise • Couronne et nuque noires • Front et lores jaunes 	<ul style="list-style-type: none"> • Teinte dominante verte • Bande sous-alaire
Perruche à capuchon noir	<ul style="list-style-type: none"> • Capuchon noir • Plumage à dominante bleu turquoise • Large bande jaune sur l'aile 	<ul style="list-style-type: none"> • Plumage à dominante vert • Couronne et nuque brunâtre • Bande sous-alaire
Perruche royale	<ul style="list-style-type: none"> • Tête et dessous du corps rouge 	<ul style="list-style-type: none"> • Plumage essentiellement vert
Perruche érythroptère	<ul style="list-style-type: none"> • Cape noire • Marque rouge vif sur l'aile 	<ul style="list-style-type: none"> • Plumage uniformément vert
Cacatoès de Banks	<ul style="list-style-type: none"> • Noir uniforme 	<ul style="list-style-type: none"> • Multitudes de taches jaunes sur l'ensemble du corps
Eclectus	<ul style="list-style-type: none"> • Plumage vert, bec beige 	<ul style="list-style-type: none"> • Plumage rouge, bec noir
Loriquet joli	<ul style="list-style-type: none"> • Joues rouges, nuque bleue 	<ul style="list-style-type: none"> • Joues vertes striées de jaune
Loriquet papou	<ul style="list-style-type: none"> • Plumage uniforme 	<ul style="list-style-type: none"> • Zones jaunes (phase rouge) ou vertes (phase mélanique) sur le dos et les côtés du croupion
Loricules à tête bleue	<ul style="list-style-type: none"> • tache rouge sur la gorge 	<ul style="list-style-type: none"> • Couleurs moins marquées • Absence de tache rouge
Perruche à collier	<ul style="list-style-type: none"> • Collier noir et rose 	<ul style="list-style-type: none"> • Collier diffus ou absent
Perruche à moustache	<ul style="list-style-type: none"> • Bec rouge 	<ul style="list-style-type: none"> • Bec noir
Perruche tête de prune	<ul style="list-style-type: none"> • Tête rouge prune 	<ul style="list-style-type: none"> • Tête gris bleuté
Perruche Alexandre	<ul style="list-style-type: none"> • Collier noir et rose 	<ul style="list-style-type: none"> • Absence de collier
Perruche de Derby	<ul style="list-style-type: none"> • Bec rouge à extrémité jaune 	<ul style="list-style-type: none"> • Bec noir
Inséparable d'Abyssinie	<ul style="list-style-type: none"> • Front et contour de l'œil rouge vif 	<ul style="list-style-type: none"> • Plumage entièrement vert
Inséparable à tête grise	<ul style="list-style-type: none"> • Tête, cou et poitrine gris-blanc 	<ul style="list-style-type: none"> • Plumage entièrement vert
Perruches moineaux	<ul style="list-style-type: none"> • Marques bleues sur le croupion et les ailes 	<ul style="list-style-type: none"> • Plumage entièrement vert
Amazone à front blanc	<ul style="list-style-type: none"> • Marques rouges sur les ailes 	<ul style="list-style-type: none"> • Plumage entièrement vert
Amazone du Yucatan	<ul style="list-style-type: none"> • Front blanc • Marques rouges sur les ailes 	<ul style="list-style-type: none"> • Absence de tache blanche et de marques rouges

Tableau I : Critères de sexage chez certaines espèces dimorphiques

B. Sexage des espèces monomorphiques par méthodes non moléculaires

1. Sexage par endoscopie

L'endoscopie, également appelée cœlioscopie ou laparoscopie, est un ensemble de techniques invasives d'exploration des cavités internes de l'oiseau, par examen direct ou indirect (vidéo) des organes qu'elles contiennent (BOUGEROL, 1992). Outre son intérêt dans le diagnostic clinique (recherche de lésions macroscopiques, de corps étrangers, de parasites...) elle permet la réalisation de prélèvements (CROSTA et al., 2002) et également la mise en œuvre de diagnostic de convenance dans le cas du sexage d'oiseaux appartenant à des espèces monomorphiques.

Les équipements et les techniques d'endoscopie sont utilisés en médecine humaine depuis les années 1960. Dans les années 1970 à 1980, ces techniques ont été adaptées à la médecine vétérinaire et en particulier à la médecine aviaire (BOUGEROL, 1992 ; GANCZ et TAYLOR, 2006). Les équipements utilisés étaient alors ceux de la médecine humaine. Ce n'est que dans les années 1990 (BOUGEROL, 1992 ; GANCZ et TAYLOR, 2006), que des systèmes d'endoscopes entièrement dédiés à la médecine vétérinaire ont été développés. Cette technique est aujourd'hui reconnue comme un outil performant et indispensable en médecine des oiseaux (GANCZ et TAYLOR, 2006), et a révolutionné l'élevage de la majorité des Psittaciformes sexuellement monomorphiques (BOUGEROL, 1992 ; HARCOURT-BROWN, 1997).

a. Rappels anatomiques

i. Les sacs aériens

Les particularités anatomiques des oiseaux expliquent le succès de cet examen complémentaire qui peut s'utiliser de manière presque routinière (CHAI et ROMAN, 2005).

- Le diaphragme est absent, et permet l'existence d'une unique grande cavité thoraco-abdominale.
- Celle-ci se divise en de nombreux sacs aériens qui permettent une très bonne visibilité immédiate des organes sans utiliser d'insufflateur. Ces sacs aériens sont au nombre de neuf (un claviculaire, deux cervicaux, deux thoraciques crâniens, deux thoraciques caudaux et deux abdominaux) et occupent la majeure partie de la cavité coelomique, la

divisant en « chambres ». Ils communiquent par des ostiums avec les poumons, petits, rigides et plaqués contre la voûte dorsale du thorax. La respiration des oiseaux connaît un circuit complexe au travers de cet ensemble. Les mouvements du sternum agissent sur le volume des sacs aériens, ce qui génère des mouvements d'air à sens unique au travers des parabronches composant les poumons. Les sacs aériens sont en outre parfaitement transparents et étroitement plaqués aux viscères environnants. L'endoscopie consiste à visualiser les organes depuis ces sacs aériens. Le système urogénital est visualisé au niveau des sacs aériens abdominaux par une voie d'abord latérale (CHAI et ROMAN, 2005).

ii. Les organes génitaux

La reproduction chez les perroquets et chez les oiseaux en général suit un cycle sexuel contrôlé par des facteurs environnementaux (photopériode, température, disponibilité en nourriture) (POLLOCK et OROSZ, 2002). La morphologie et la couleur des gonades évoluent considérablement au cours du cycle sexuel, leur taille, et leur poids augmentant en périodes de reproduction et diminuant hors période sexuelle.

- Le tractus génital femelle (ovaire et oviducte) (figure 14) se visualise à gauche puisque le tractus droit dégénère au cours du développement embryonnaire et est absent chez la femelle adulte (POLLOCK et OROSZ, 2002). La grappe ovarienne au repos se présente sous la forme d'un amas granuleux, évoluant vers une morphologie en « grappe de raisin » au fur et à mesure de la maturation des follicules (BOUGEROL, 1992 ; POLLOCK et OROSZ, 2002). En période d'activité sexuelle, l'ovaire se présente ainsi sous la forme d'une grappe de follicules en général blanchâtre, ou noire (présence de mélanine dans le tissu interstitiel) chez certaines espèces (Cacatoès, certains Aras etc. (CHAI et ROMAN, 2005 ; POLLOCK et OROSZ, 2002)). L'oviducte est trois fois plus gros que les uretères et longe les lobes rénaux pour atteindre le cloaque. Chez une femelle juvénile, l'ovaire se présente sous la forme d'une bande étroite. (CHAI et ROMAN, 2005).

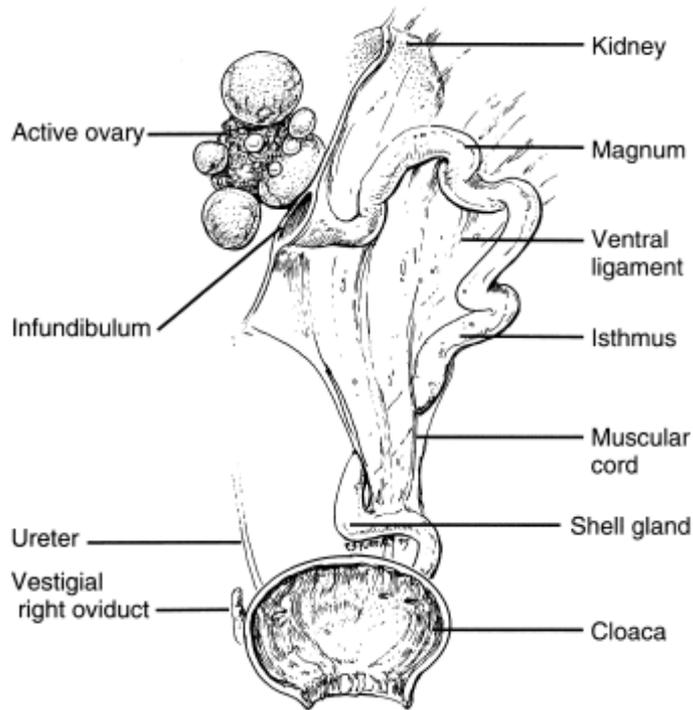


Figure 14 : Représentation de l'appareil génital femelle.

L'ovaire unique, situé à gauche se trouve à proximité du pôle crânial du rein gauche. Ce dernier croise le ligament suspenseur de l'infundibulum de l'oviducte. (d'après POLLOCK et OROSZ, 2002)

- Le tractus génital mâle est visible à droite et à gauche (figure 15 et figure 16). Les deux testicules sont présents chez l'adulte. Classiquement, ils présentent une surface lisse et une forme de haricot de taille excessivement variable selon l'état d'activité sexuel (en période de reproduction, leur volume peut être multiplié par cent (CHAI et ROMAN, 2005). La couleur peut varier, ivoire ou noire chez certaines espèces (Cacatoès, certains Aras etc.). Le canal déférent est parallèle aux uretères, et est plus petit ou de même calibre (CHAI et ROMAN, 2005). La couleur des testicules dormants varie de brun clair à jaune. Leur taille réduite peut rendre difficile leur observation hors période de reproduction (BOUGEROL, 1992).

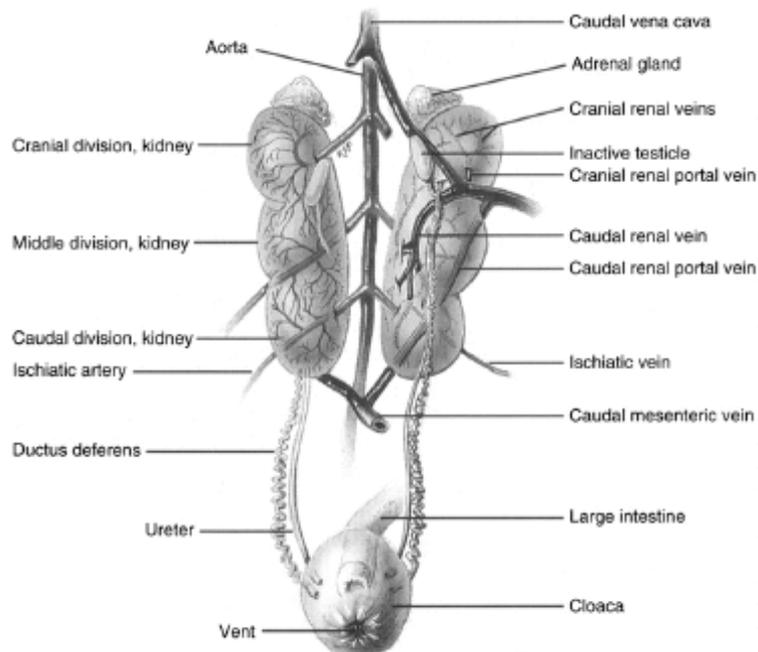


Figure 15 : Représentation de l'appareil génital mâle.
 Les testicules, ici de petite taille, sont en dormance, et se trouvent au sein de la triade pôle crânial du rein-surrénal-gonade. (d'après POLLOCK et OROSZ, 2002)

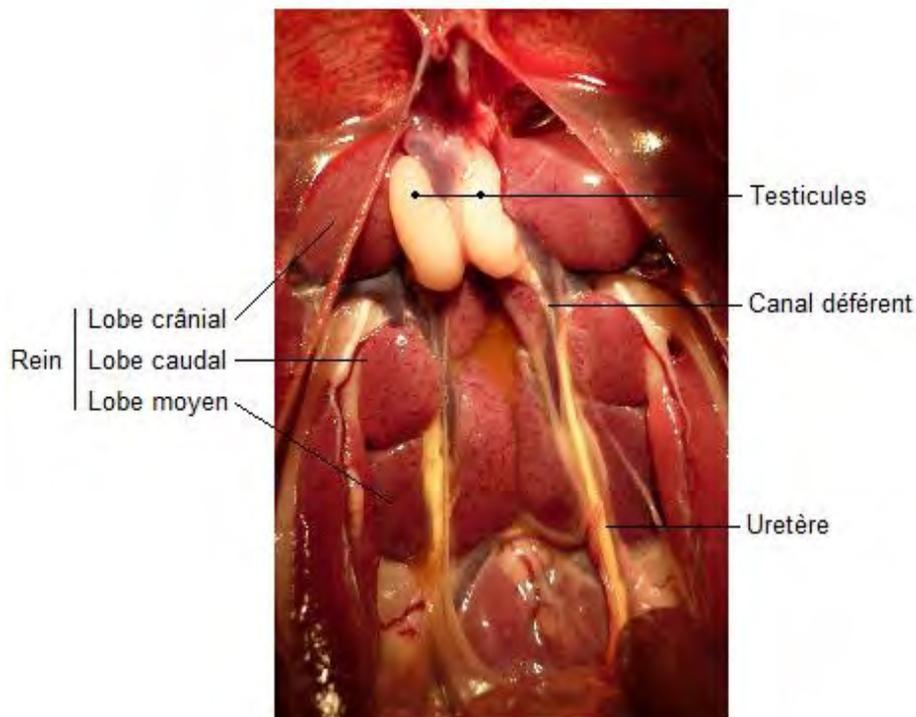


Figure 16 : Appareil génital mâle (*Amazona farinosa*).
 (photo Yannick Lambert, autopsie effectuée au Parc de Clères)

b. Méthode

L'endoscopie est un examen chirurgical invasif, et nécessite une préparation classique de l'oiseau (anesthésie de l'individu, zone d'intervention déplumée et nettoyée, usage de champs opératoires stériles, port de gants de chirurgie) (BOUGEROL, 1992 ; CHAI et ROMAN, 2005 ; GANCZ et TAYLOR, 2006).

Chez la femelle, seule la grappe ovarienne gauche étant développée, l'oiseau à sexer, anesthésié, est disposé en décubitus latéral droit ce qui permet l'exploration du flanc gauche (BOUGEROL, 1992 ; CHAI et ROMAN, 2005 ; HARCOURT-BROWN, 1997 ; RICHNER, 1989).

Pour le sexage, la voie d'accès est latérale par le sac aérien thoracique caudal. Deux voies d'accès sont couramment utilisées (CHAI et ROMAN, 2005) :

- L'oiseau est en décubitus latéral droit avec les ailes étendues dorsalement. La patte gauche est étendue crânialement. Le point d'entrée est repéré en palpant l'endroit où le muscle semi-membraneux croise la dernière côte (CHAI et ROMAN, 2005 ; CROSTA et al., 2002). L'incision est alors pratiquée juste derrière la dernière côte ainsi qu'une dissection mousse des muscles sous-jacents.
- L'oiseau est en décubitus latéral droit avec les ailes étendues dorsalement. La patte gauche est ici étendue caudalement. L'insertion se fait entre les deux dernières côtes à mi-chemin entre le grand trochanter et la crête du bréchet (figure 17).



Figure 17 : Voie d'abord d'endoscopie latéral gauche chez un Ara ararauna.

L'oiseau est anesthésié et positionné en décubitus latéral droit. Les ailes sont attachées de manière à dégager la zone d'intervention. Celle-ci est plumée et nettoyée. Le point d'entrée se situe entre les deux dernières côtes, à mi-chemin entre le bréchet et grand trochanter. Par la suite, un champ stérile est appliquée et l'endoscopie est alors pratiquée (photo Yannick Lambert, Parc de Clères).

Le sac aérien thoracique caudal en regard de l'incision est perforé et l'endoscope est introduit. On visualise le testicule ou l'ovaire aux travers de l'interface formée par l'accolement des parois du sac aérien thoracique crânial gauche et du sac aérien abdominal gauche, ou bien après ponction de celle-ci (le passage est réalisé en trocardant la paroi qui les sépare à l'aide de l'optique (CHAI et ROMAN, 2005)), au sein de la triade pôle crânial du rein-surrénale-gonade (CHAI et ROMAN, 2005 ; POLLOCK et OROSZ, 2002 ; RIVAL, 2005) (figure 18 et 19).

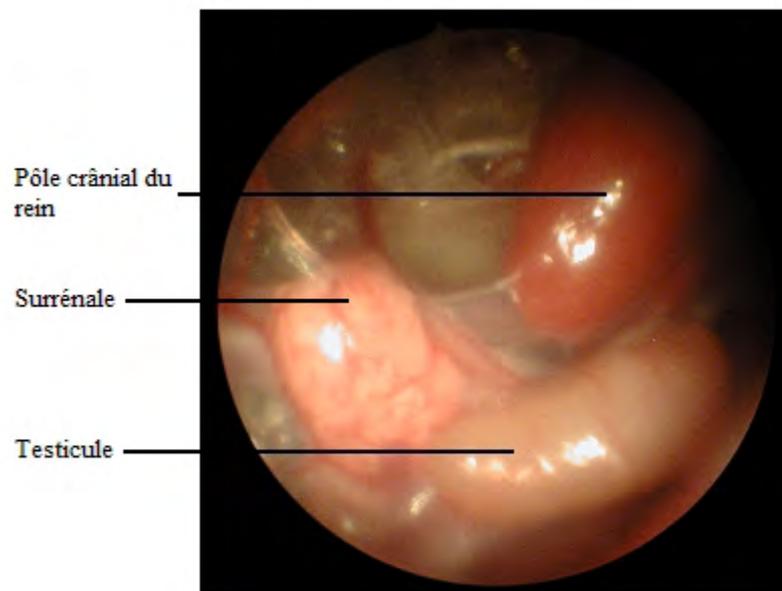


Figure 18 : Triade pôle crânial du rein-surrénal-testicule chez un Ara macao mâle.

(Photo Yannick Roman et Yannick Lambert)

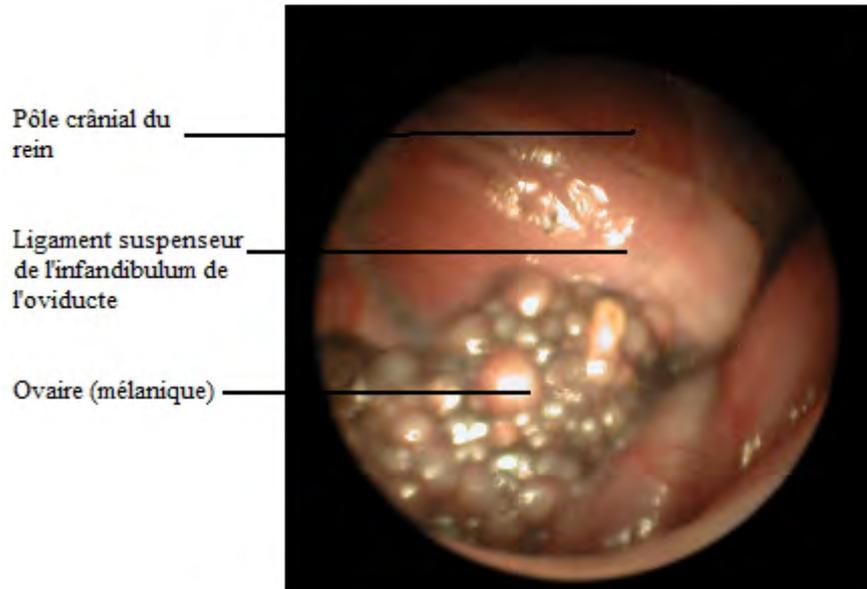


Figure 19 : Aspect de l'ovaire sous endoscopie chez une femelle *Ara ararauna*.

Le ligament suspenseur de l'infundibulum de l'oviducte est montré. L'ovaire, mélanique, a un aspect d'ovaire mature (Photo Yannick Roman et Yannick Lambert)

Selon l'état reproducteur de l'individu, les gonades sont parfois difficiles à identifier (GRIFFITHS, 2000) et le repérage de la triade rein-surrénale-testicule (figure 18) peut être d'une aide précieuse. Chez une femelle, le repérage du ligament suspenseur de l'infundibulum de l'oviducte croisant le rein au niveau de sa division crâniale peut également aider la diagnose dans certains cas de figure (BOUGEROL, 1992) (figure 19). Chez le mâle, la visualisation de la totalité du contour du testicule peut permettre de ne pas le confondre avec une anse digestive. L'aspect mélanique de ce dernier facilite parfois sa diagnose.

La cicatrisation des parois des sacs aériens est rapide (moins de quinze jours). La nécessité de suture des différents plans anatomiques au niveau de la voie d'abord varie selon les auteurs :

- suture en deux plans (sac aérien et musculature inter-costale en masse et suture cutanée) (CHAI et ROMAN, 2005) ;
- suture de la paroi abdominale et de la peau à l'inverse du sac aérien (RIVAL, 2005) ;
- suture cutanée unique (BOUGEROL, 1992 ; CHAI et ROMAN, 2005) ;
- aucune suture. A la ménagerie du Jardin de Plantes du Muséum national d'Histoire naturelle (Paris), aucune suture n'a été réalisée sur plusieurs centaines d'endoscopies de routine sans aucune conséquences cliniques (CHAI et ROMAN, 2005).

c. Avantages / inconvénients du sexage par endoscopie

Les oiseaux sont des candidats idéaux à l'endoscopie. Ils sont en effet « pré-insufflés » de part la présence des sacs aériens aux parois transparentes permettant la visualisation de la quasi-totalité de la cavité cœlomique (BOUGEROL, 1992 ; CHAI et ROMAN, 2005 ; GROSSET, 2009 ; MURRAY et al., 2001).

Pendant des années l'endoscopie a servi au sexage, mais elle a perdu de son intérêt avec le développement des techniques moléculaires (CHAI et ROMAN, 2005). Elle reste toutefois la technique de choix dans le cadre d'un sexage associé à un examen des organes internes, et notamment des organes reproducteurs (HARCOURT-BROWN, 1997). À la différence des autres méthodes de sexage, elle trouve alors toute sa puissance en tant qu'outil diagnostique et thérapeutique associé au diagnostic de convenance par visualisation immédiate et rapide des gonades, dans le cadre de programmes de reproduction des Psittaciformes d'espèces monomorphiques.

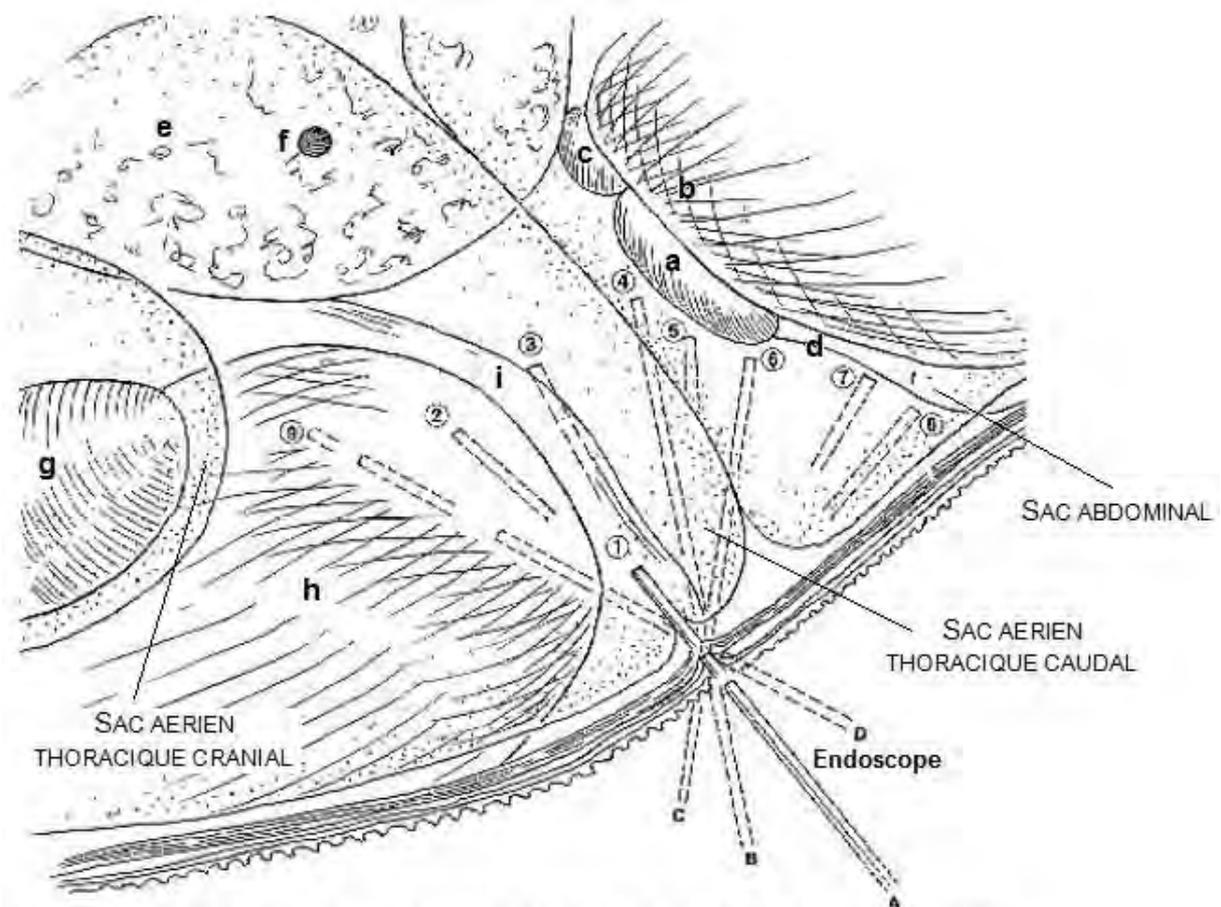
De part les possibles complications inhérentes à son caractère invasif, il paraît peu judicieux de l'utiliser dans l'unique but de déterminer le sexe des perroquets, et assez hasardeux de la pratiquer dans ce but chez un perroquet précieux par sa rareté ou par sa valeur (GRIFFITHS, 2000).

Le sexage peut cependant être pratiqué de manière accessoire lors d'endoscopies à visée médicale telle que la recherche d'un processus pathologique affectant un organe spécifique (recherche de granulome fongique sur un sac aérien par exemple), la pratique d'une biopsie ou encore lors d'une exploration chirurgicale (GANCZ et TAYLOR, 2006). L'examen endoscopique doit donc inclure l'examen de nombreux organes, et pas seulement des gonades, ce qui, dans le cadre de la reproduction, permet de rassembler des informations utiles autres que le sexe de l'individu (BOUGEROL, 1992 ; CHAI et ROMAN, 2005 ; GROSSET, 2009 ; HARCOURT-BROWN, 1997 ; TAYLOR, 1994). Elle doit comporter la recherche d'éventuelles affections de l'appareil pulmonaire, digestif, hépatique ou rénal, des sacs aériens etc... permettant d'objectiver l'état de santé de l'oiseau et pouvant expliquer des échec de reproduction (CROSTA et al., 2002).

La figure 20 montre les différents organes visibles dès l'entrée dans le sac aérien thoracique caudal.

Elle comprend évidemment un examen visuel approfondi des organes génitaux et la détermination de l'activité sexuelle de l'individu, ainsi que la possibilité de prélèvements (biopsies) (CROSTA et al., 2002) :

- Chez la femelle : taille de l'ovaire, nombre de follicules, présence éventuelle de kystes ovariens, accumulation de graisse ou de matériel caséux au site d'ovulation, aspect de l'oviducte... Les affections de l'ovaire ou de l'oviducte sont en effet une cause fréquente d'infertilité.
- Chez le mâle : taille, aspect, couleur des gonades et des voies génitales, signes éventuels d'orchite (cause fréquente d'infertilité), ou de fibrose...(CROSTA et al., 2002).



(a.) Gonade au sein de la triade formée avec le pôle crânial du rein (b.) et la glande surrénale (c.)
 (d.) Uretère, voies génitales / (e.) Poumon et ostiums pulmonaires (f.) / (g.) Coeur / (h.) Foie / (i.) Proventricule

Figure 20 : Organes directement visibles dès l'entrée de l'endoscope dans le sac aérien thoracique caudal.

Un examen visuel des différents organes peut alors être entrepris en plus de l'observation des gonades. On visualise la surface caudale du poumon et les ostiums pulmonaires, la membrane séparant le sac aérien thoracique caudal des deux autres sacs aériens adjacents, ainsi que le proventricule et le lobe gauche du foie. Le cœur s'examine dans le sac aérien thoracique crânial, tandis que le sac aérien abdominal donne accès à la masse viscérale, au rein gauche, à la rate, au gésier, au proventricule et aux gonades. (d'après TAYLOR, 1994).

Les inconvénients de l'endoscopie sont liés à son caractère invasif, ainsi qu'à la nécessité d'anesthésier l'individu à sexer.

Les risques associés à l'endoscopie sont d'autant plus rares que le manipulateur est expérimenté, et bien moins importants qu'une exploration chirurgicale classique. L'anesthésie et le caractère invasif de l'intervention (ouverture de la cavité coelomique) sous-entendent la possibilité de complications, néanmoins exceptionnelles (CHAI et ROMAN, 2005 ; GANCZ et TAYLOR, 2006 ; RICHNER, 1989) :

- Risques anesthésiques, contrebalancés par la relative sécurité que procure l'utilisation de l'anesthésie gazeuse (Isoflurane) (GANCZ et TAYLOR, 2006 ; HARCOURT-BROWN, 1997 ; MURRAY et al., 2001) ;
- Traumatisme d'un organe (foie, rate, proventricule...) en particulier lors d'organomégalie ;
- Hémorragie ;
- Emphysème sous-cutané (complication peu grave) ;
- Affections nosocomiales (l'asepsie de l'intervention et la stérilité du matériel sont indispensables) ;
- Hernie au point d'entrée.

Ces complications impliquent en outre l'existence de contre-indications (CHAI et ROMAN, 2005 ; GANCZ et TAYLOR, 2006) :

- Obésité : l'accumulation de réserves graisseuses rend l'exploration difficile ;
- Ascite : il y a un risque de perforer le sac aérien et de se retrouver dans la cavité péritonéale hépatique ventrale ou dans la cavité péritonéale intestinale. Un tel incident entraînerait un écoulement de liquide d'ascite dans le sac aérien, et donc potentiellement dans le poumon ;
- Distension du tractus digestif ou sévère aérosacculite d'origine quelconque, pouvant engendrer des lésions réduisant fortement la taille des sacs aériens ;
- Femelle en ponte : la voie latérale gauche est à éviter, car il y a un encombrement par l'ovaire et diminution de la taille du sac aérien thoracique caudal et donc risque de rupture d'un ovule lors de l'intervention. On utilise donc plutôt une voie rétro-pubienne d'accès au sac aérien abdominal ;
- Troubles de la coagulation : une évaluation pré-opératoire du temps de saignement

peut être pratiquée ;

- Oiseau en mauvaise condition, ce qui diminue ses capacités à supporter l'anesthésie.

2. Sexage par étude du comportement

a. Principe

Cette méthode consiste en l'observation des individus dans leur comportement de reproduction, de la recherche d'un partenaire à l'élevage des jeunes. Cette méthode n'est donc possible que sur des individus adultes ayant atteint leur maturité sexuelle, bien que certains Psittaciformes immatures puissent exprimer une ébauche de comportement sexuel. En captivité, elle consiste également à observer le comportement social de l'oiseau captif vis-à-vis de son propriétaire.

Cette méthode semble illusoire mais l'observation attentive des oiseaux dans certaines conditions en particulier lors de la reproduction donne quelquefois des éléments de réponse. La connaissance de ces comportements peut ainsi être une aide utile dans la détermination du sexe des perroquets en captivité (LUESCHER, 2006).

b. Les différents types de comportement

i. Comportement reproducteur

Les perroquets sont réputés pour leur fidélité. Un couple formé peut le rester à vie (DAVIS, 1997) et chez certaines espèces, outre la copulation à proprement parler, le comportement du mâle en période de reproduction diffère de celui de la femelle. Connaître ces comportements, peut, s'ils sont observés, permettre de distinguer les deux sexes (figure 21). Il existe tout de même de faux couples (LUESCHER, 2006) au sein desquels deux individus de même sexe peuvent cohabiter, se nourrir et se toiletter mutuellement, se lisser les plumes, voire même pondre des œufs stériles pour les femelles (figure 22).



Figure 21 : Couple de Aras Hyacinthe en période de reproduction.

La femelle se trouve dans le nid au moment du cliché. Le dimorphisme sexuel est totalement absent chez cette espèce. (Photo Yannick Lambert, Parc aux oiseaux, Villars-les-Dombes)



Figure 22 : Toilettage mutuel chez un couple *Ara ararauna*.

Son observation ne permet pas d'identifier le sexe des individus car deux oiseaux du même sexe peuvent exprimer un tel comportement. (Photo Nicolas Aubert, Touroparc)

➤ Vocalisations

Des vocalisations spécifiques en période de reproduction ont été observées chez de nombreuses espèces de perroquets. Chez quelques-unes d'entre elles, le répertoire vocal, différent chez les deux protagonistes, peut permettre, avec une observation attentive, de distinguer le mâle de la femelle. Chez la perruche Calopsitte, le mâle courtise la femelle par des cris stridents, tandis que la femelle prête répond par un jacassement incessant. Le mâle Perruche ondulée courtise sa femelle avec des gazouillis plus complexes et d'un niveau sonore plus élevé que sa compagne, pouvant durer des heures, et qui sembleraient liés au taux de testostérone (NESPOR et al., 1996). A l'inverse, chez d'autres espèces, comme le Toui à menton d'or, les sexes ne se distinguent pas par le chant nuptial puisque celui-ci est interprété en duo, d'une manière totalement symbiotique semblant provenir d'un unique oiseau.

Chez le Kakapo, espèce en menace critique d'extinction de Nouvelle-Zélande, les mâles courtisent les femelles par groupes, sur une même zone, en émettant des sons très caractéristiques qui résonnent sur plusieurs kilomètres. Ce comportement, appelé « Lek » (MERTON et al., 1984), est malheureusement peu observé tant la reproduction de cet oiseau est difficile à obtenir (ROBERTSON et al., 2000).

➤ Copulation

L'accouplement ne laisse en général aucun doute sur la nature des protagonistes mais, d'une durée d'environ une minute, il est souvent difficile de l'observer, même en captivité. La facilité à différencier les deux sexes est notamment vraie chez les petites espèces (petites perruches, Inséparables, Conures, Loris...) pour lesquelles, afin d'obtenir le contact cloacal, le mâle se tient avec les deux pattes sur le dos de la femelle. Elle est néanmoins moins évidente chez les grandes espèces (Amazones, Aras...) pour lesquelles le mâle se tient à côté et contre la femelle puis lui pose une patte sur le dos (HARRISON, 1994) (figure 23).

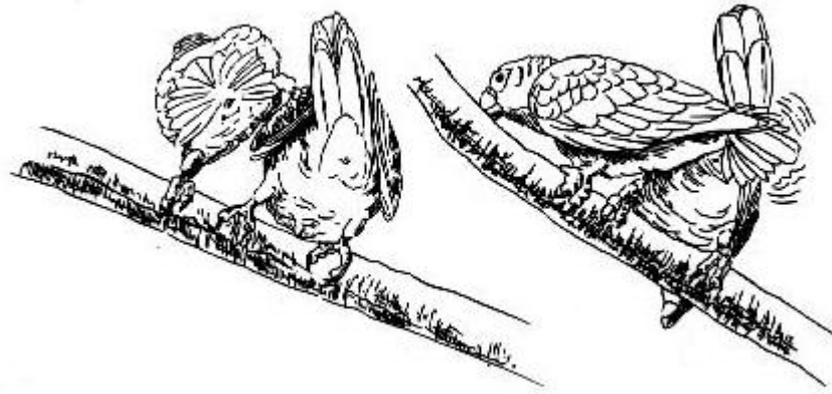


Figure 23 : Copulation chez des Amazones.
Comme chez les Aras, le mâle (ici à gauche) se tient à côté et contre la femelle et place une patte sur son dos. (d'après HARRISON, 1994)

➤ Recherche et construction du nid

Chez certaines espèces, notamment le cacatoès Microglosse, seul le mâle s'occupe de rechercher un nid et de le décorer avant d'y attirer la femelle. A l'inverse, chez l'inséparable à face rose, la femelle transporte seule les éléments pour la nidification.

➤ Couvaion

Concernant la couvaion, celle-ci peut être partagée (perruche Calopsitte, Conures, et quelques espèces de Cacatoès) (LUESCHER, 2006), mais pour certaines espèces, seule la femelle couve. C'est le cas de certains Aras. Les amazones mâles ne pénètrent dans le nid que très rarement (HARRISON, 1994 ; LUESCHER, 2006). Chez la perruche Calopsitte, la couvaion est partagée de manière bien définie, le mâle couvant durant la journée, la femelle prenant le relai la nuit (ALDERTON, 1992). Chez la plupart des espèces, le mâle assiste la femelle au moment de la couvaion. Il la nourrit, garde le nid et participe également au nourrissage de la progéniture (LUESCHER, 2006).

ii. Comportement social de l'oiseau captif

Il peut exister quelques différences de caractère entre deux individus de même espèce mais de sexe opposé. De manière générale, les comportements agressifs sont plus fréquents chez les mâles que chez les femelles. Ils sont également plus dominants (LUESCHER, 2006). Les mâles Youyou du Sénégal peuvent manifester un comportement territorial à la maturité sexuelle. Chez la perruche Calopsitte, c'est un comportement agressif qui peut se développer chez le mâle, en particulier envers les enfants. A l'inverse, les mâles Eclectus sont en général plus doux que leurs femelles (LENNOX et HARRISON, 2006).

Les capacités de chant et d'imitation du langage parlé sembleraient également varier entre les deux sexes. Les mâles, considérés comme plus doués (CERIT et AVANUS, 2007), seraient également plus bruyants.

c. Limites

Cette méthode de sexage reste pertinente dans le cas où l'on peut observer un accouplement (dans le cas du Kakapo par exemple la reproduction est difficile à obtenir (ROBERTSON et al., 2000)), mais également les différents comportements de nidification et d'élevage des jeunes à condition que le mâle et la femelle aient un comportement différent. Les différences de caractère entre individus de sexe opposé ne peuvent évidemment pas être généralisés à tous les individus d'une espèce, chaque oiseau ayant un comportement influencé par son éducation et son environnement (LUESCHER, 2006).

3. Sexage par spectrométrie multi-angulaire

La dichotomie monomorphe-dimorphe est basée sur la morphologie et la couleur du plumage que l'œil humain est capable de voir. Dans ce système, environ 70 à 80% des espèces d'oiseaux sont reconnues comme dimorphes, mais 75% des espèces de perroquets sont considérées comme monomorphes, dont l'amazone à front bleu (*Amazona aestiva*), par exemple, pour lequel l'œil humain est incapable de distinguer des différences de couleur entre le mâle et la femelle.

a. Principe

La coloration du plumage des oiseaux résulte du dépôt lors de la formation de la plume de différents pigments. Les caroténoïdes (jaune à rouge), la mélanine (marron et noir) et d'autres pigments confèrent à certains plumages, notamment celui de la plupart des perroquets, un aspect souvent très coloré. Outre ces pigments, la coloration des plumes résulte également d'une coloration structurelle visible dans le spectre ultra-violet (GRIGGIO et al., 2010).

Les oiseaux sont capables de distinguer différentes longueurs d'onde dans l'ultra-violet (ARNOLD et al., 2002), et le plumage de la majorité des espèces réfléchit ces longueurs d'ondes. Ces observations ont été faites pour la première fois chez le Pigeon biset (*Columbia livia*) et chez le Colibri à ventre blanc (*Colibri serrirostris*) (HUTH et BURKHARDT, 1972 ; WRIGHT, 1972). Un grand nombre d'espèces utilisent ainsi leur capacité à détecter la lumière UV dans leurs déplacements, leurs interactions sociales et le choix du partenaire lors de la reproduction (GRIGGIO et al., 2010).

La figure 24 montre les couleurs visibles sous rayonnement ultra-violet chez une perruche ondulée (*Melopsittacus undulatus*).

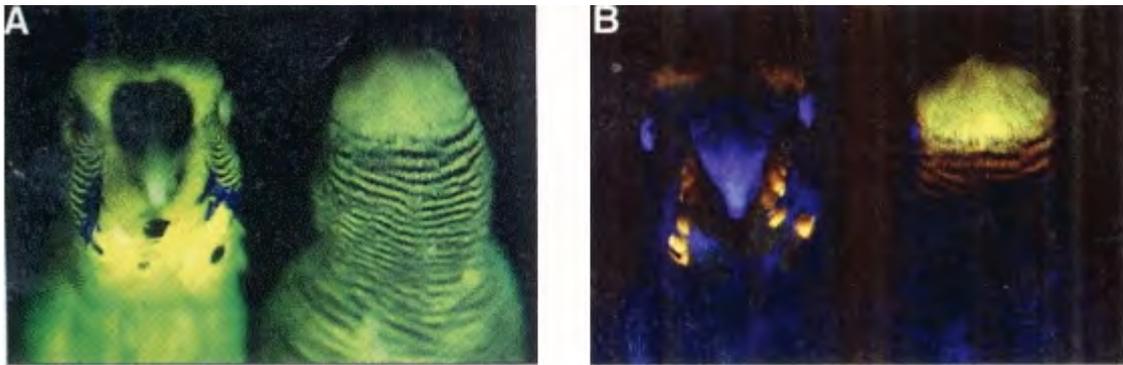


Figure 24 : Tête d'une perruche ondulée (*Melopsittacus undulatus*) (A) sous lumière blanche, (B) sous rayons ultra-violets induisant une fluorescence jaune.

(d'après ARNOLD et al., 2002)

D'autres études, par ailleurs, ont permis de mettre en évidence, par mesure spectrophotométrique, que la plupart des espèces d'oiseaux initialement classées comme monochromatiques (et donc monomorphiques) sont actuellement considérées comme dichromatiques (dimorphiques) lorsque l'on considère le spectre ultra-violet (HUNT et al., 1999).

Dans l'étude menée par Susana I.C.O. Santos et son équipe en 2006 (SANTOS et al., 2006) plusieurs longueurs d'ondes ont été utilisées ainsi que la spectrométrie multi-angulaire afin d'analyser les ondes réfléchies par les plumes de différentes parties du corps de 30 amazones à front bleu adultes sexées par observation directe des gonades (autopsie) ou par méthodes moléculaires (18 femelles et 12 mâles).

Les résultats de cette étude ont démontré que, pour 100% des individus utilisés, les valeurs des paramètres mesurés dans le spectre ultra-violet sont significativement différentes ($p \leq 0.05$) entre les mâles et les femelles pour certaines régions du corps, tel que le front. Il existe donc un dimorphisme sexuel dans cette espèce qui ne peut pas être perçu par l'œil humain.

La liste des espèces sexées par spectrométrie multi-angulaire sont indiquées dans le tableau II.

Tableau II : Liste des espèces sexées par spectrométrie multi-angulaire

Nom commun	Nom latin	Références
Amazonne à front bleu	<i>Amazona aestiva</i>	Santos et al., 2006
Perruche ondulée (figure 24)	<i>Melopsittacus undulatus</i>	Arnold et al. 2002

b. Avantages et inconvénients

L'avantage de cette technique n'est pas négligeable puisque totalement non invasive, elle permettrait rapidement et efficacement de déterminer le sexe des perroquets. La spectrométrie multi-angulaire serait une méthode d'avenir, qui requiert néanmoins d'autres études dans le but de démontrer son utilité en pratique sur un panel d'espèces. De plus, des études ont montré que la couleur du plumage perçue dans le spectre ultra-violet par les oiseaux reflète le statut immunitaire du mâle (GRIGGIO et al., 2010), son état de santé et sa qualité reproductrice (SANTOS et al., 2006). Il est donc possible que cette technique, outre sa capacité à détecter le sexe des individus, puisse avoir d'autres intérêts en médecine vétérinaire. Cette méthode requiert malheureusement un matériel adapté, et l'anesthésie de l'individu à sexer.

4. Sexage par l'analyse chromosomique

Une particularité fondamentale distingue les oiseaux des Mammifères, et concerne les chromosomes sexuels. Chez les oiseaux, la femelle est hétérogamétique, et porte un chromosome Z et un chromosome W. Le mâle, quant à lui, porte deux chromosomes Z, et est homogamétique. Une des options de sexage fut l'observation de ces chromosomes dans le noyau cellulaire.

a. Principe

Le principe de la méthode est la mise en évidence à partir d'une culture de cellules vivantes des chromosomes sexuels Z et W.

En théorie, l'identification microscopique du sexe semble relativement simple. Plusieurs protocoles ont été proposés (AQUINO et FERRARI, 1990 ; DE BOER et BELTERMAN, 1980 ; FILLON et SEQUELA, 1995). Les chromosomes sont préparés à partir d'une culture cellulaire elle-même faite à partir d'un prélèvement sanguin (FILLON et SEQUELA, 1995) ou de la pulpe du bulbe d'une plume en croissance (AQUINO et FERRARI, 1990 ; GRIFFITHS, 2000). L'ajout de colchicine ou d'un dérivé, la colcémide (FILLON et SEQUELA, 1995) bloque les divisions cellulaires en métaphase. Les cellules subissent

ensuite un choc hypotonique. Après étalement, les lames sont colorées au Giemsa (coloration conventionnelle) pour analyse caryotypique, ou bien traitées par la technique des bandes C qui met en évidence l'hétérochromie constitutive. Le chromosome W en étant riche, celui-ci apparaît noir après traitement et se repère ainsi plus facilement. Les lames sont ensuite examinées et le sexe déterminé.

En pratique, un certain nombre de difficultés rendaient l'analyse chromosomique difficile et chronophage :

- Les cellules sanguines des oiseaux sont difficiles à cultiver (FILLON et SEQUELA, 1995 ; GRIFFITHS, 2000) et le volume sanguin prélevé doit être élevé, au moins un millilitre (FILLON et SEQUELA, 1995) (sachant que le volume sanguin représente chez l'oiseau 10% du poids vif et que l'on ne peut prélever qu'une quantité inférieure à 10% de ce volume). La meilleure source de cellules pour la culture est la pulpe de plume en croissance. Ces plumes ne sont présentes chez l'oiseau qu'après la mue, après arrachage d'une plume et remplacement de celle-ci, ou bien chez un jeune oiseau acquérant un nouveau plumage. Ceci réduit fortement la facilité d'échantillonnage.
- Les oiseaux possèdent un très grand nombre de chromosomes. Les Psittaciformes en possèdent en moyenne 70 à 80 (DE LUCCA et al., 1991 ; VAN DONGEN et DE BOER, 1984), ce qui complique l'interprétation du caryotype.

A l'examen du caryotype, les chromosomes peuvent être classés en deux catégories de taille :

- Les plus grands sont les macrochromosomes. Les perroquets en possèdent en moyenne sept à huit (DE LUCCA et al., 1991 ; VAN DONGEN et DE BOER, 1984). Le chromosome Z appartient à cette catégorie et sa taille est généralement identique ou légèrement inférieure à celle des chromosomes de la paire n°4 (Chez le Cacatoès noir, le chromosome Z a la même taille que le plus gros des macrochromosomes, c'est à dire la paire n°1) (DE LUCCA et al., 1991 ; GRIFFITHS, 2000 ; VAN DONGEN et DE BOER, 1984).
- Les plus petits sont les microchromosomes. Leur taille est significativement beaucoup plus petite que les macrochromosomes, et n'excède pas 1 micron de long (FILLON et SEQUELA, 1995). Le chromosome W fait partie de cette catégorie. Ce chromosome étant riche en hétérochromatine constitutive, la technique des bandes C permet de le visualiser facilement (AQUINO et FERRARI, 1990 ; FILLON et SEQUELA, 1995).

Pour faciliter l'analyse chromosomique, les chromosomes sont classés par paire et par ordre de taille décroissante. Ainsi, les caryotypes des femelles comprennent une paire de chromosomes hétérologues (ZW, le W étant le plus petit des deux) tandis que pour les mâles (ZZ) les deux chromosomes Z constituent une paire de chromosomes homologues qu'il n'est pas toujours possible d'identifier parmi les autres paires de macrochromosomes (FILLON et SEGUELA, 1995). Cette difficulté est par ailleurs contrebalancée par les publications décrivant en détail le caryotype d'un grand nombre d'espèces de Psittaciformes et l'aspect du chromosome Z chez chacune d'entre elles (AQUINO et FERRARI, 1990 ; DE LUCCA et al., 1991 ; VAN DONGEN et DE BOER, 1984). La figure 25 est un caryotype obtenu chez un Ara Hyacinthe femelle.

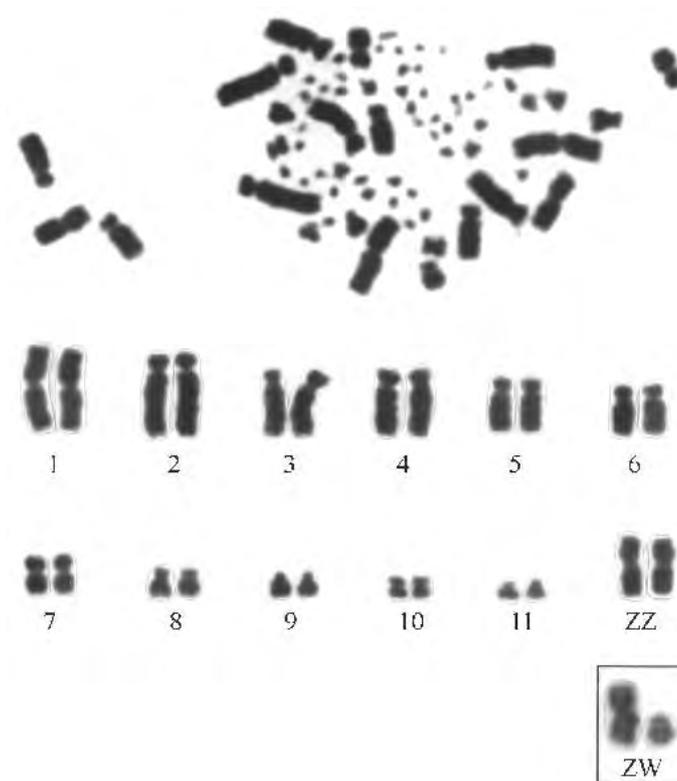


Figure 25 : Caryotype obtenu chez un Ara Hyacinthe (*Anodorhynchus hyacinthinus*) de sexe mâle. Dans l'encadré : chromosomes sexuels ZW caractéristiques du sexe femelle. (d'après LUNARDI et al., 2003)

Le tableau III présente la liste des espèces pour lesquelles le caryotype a été décrit.

Nom commun	Nom latin	Références
Lori à ventre violet	<i>Lorius hypoinochrous</i>	
Lori tricolore	<i>L. lory</i>	
Lori des Fidji	<i>Phigys solitarius</i>	
Amazone à lores rouges	<i>Amazona automnalis</i>	
Conure jandaya	<i>Aratinga jandaya</i>	
Eclectus	<i>Eclectus roratus</i>	
Pione de Maximilien	<i>Pionus maximiliani</i>	
Pione à tête bleue	<i>P. menstruus</i>	
Pione à couronne blanche	<i>P. senilis</i>	De Lucca et al., 1991
Pione givrée	<i>P. seniloides</i>	
Youyou du Sénégal	<i>Poicephalus senegalus</i>	
Princesse de Galles	<i>Polytelis alexandrae</i>	
Amazone à front jaune	<i>Amazona ochrocephala</i>	
Ara ararauna	<i>Ara ararauna</i>	
Ara macao	<i>A. macao</i>	
Perruche à collier	<i>Psittacula krameri</i>	
Gris du Gabon	<i>Psittacus erithacus</i>	
Conure de Molina	<i>Pyrrhura molinae</i>	
Conure couronnée	<i>Aratinga aurea</i>	
Conure des cactus	<i>A. cactorum</i>	De Lucca, 1984
Conure à tête d'or	<i>A. auricapilla</i>	
Conure soleil	<i>A. solstitialis</i>	
Conure pavouane	<i>A. leucophthalmus</i>	
Conure dorée	<i>A. guarouba</i>	Goldschmidt et al., 1997
Conure à tête bleue	<i>A. acuticaudata</i>	
Perruche moineaux	<i>Forpus xanthopterygius</i>	De Lucca et De Marco, 1983
Toui à front do'r	<i>Brotogeris sanctithomae</i>	De Lucca, 1985
Toui à ailes variées	<i>B. versicolorus</i>	
Amazone à ailes orange	<i>Amazona amazonica</i>	Aquino et Ferrari, 1990
Amazone à front bleu	<i>A. aestiva</i>	
Ara de Spix	<i>Cyanopsitta spixii</i>	Duarte et Giannoni, 1990
Ara hyacinthe (figure 25)	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	Lunardi et al., 2003
Papageai maillé	<i>Derophtus accipitrinus</i>	
Ara de Lear	<i>Anodorhynchus leari</i>	Nogueira et al., 2006
Cacatoès des Moluques	<i>Cacatua moluccensis</i>	Schmuts et Prus, 1987
Cacatoès de Goffin	<i>C. goffini</i>	
Cacatua corella	<i>C. sanguinea</i>	
Pione de Maximilien	<i>Pionus maximiliani</i>	Caparroz et Duarte, 2004
Caïque à queue courte	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	
Amazone à face jaune	<i>Salvatoria xanthops</i>	
Ara chloroptère	<i>Ara chloroptera</i>	Francisco et Galetti, 2001
Ara maracana	<i>Propyrrhura maracana</i>	
Conure nanday	<i>Nandayus nenday</i>	
Amazone à front bleu	<i>Amazona aestiva</i>	Duarte et Caparroz, 1995
Amazone à joues bleues	<i>A. brasiliensis</i>	
Amazone meunier	<i>A. farinosa</i>	
Amazone à lores rouges	<i>A. automnalis</i>	
Amazone festive	<i>A. festiva</i>	
Amazone de Kawall	<i>A. kawalli</i>	
Amazone à front jaune	<i>A. ochrocephala</i>	
Amazone à sourcils rouges	<i>A. rhodocorytha</i>	
Amazone vinacea	<i>A. vinacea</i>	

Amazone de Prêtre Amazone à face jaune	<i>A. pretrei</i> <i>Salvatoria xanthops</i>	Duarte et Caparroz, 1995
Ara macao Ara ararauna Cacatoès à huppe jaune Cacatoès de Banks Cacatoès microglosse Psittrichas de Pesquet Amazone à joues vertes Perruche ondulée	<i>Ara macao</i> <i>Ara ararauna</i> <i>Cacatua galerita</i> <i>Calyptorhynchus magnificus</i> <i>Probosciger aterrimus</i> <i>Psittrichas fulgidens</i> <i>Amazona viridigenalis</i> <i>Melopsittacus undulatus</i>	Van Dongen et De Boer, 1984

Tableau III : Liste d'espèces pour lesquelles le caryotype et l'aspect des chromosomes sexuels ont été décrits

b. Avantages et inconvénients

Du fait des difficultés que soulève la culture cellulaire (DE BOER et BELTERMAN, 1980 ; FILLON et SEQUELA, 1995) et l'analyse des nombreux chromosomes aviaires afin d'identifier les chromosomes sexuels, cette méthode, compliquée et onéreuse, bien que développée sur un grand nombre d'espèces de Psittaciformes, n'a pas été adoptée comme méthode de sexage dans le cercle scientifique et n'est plus guère utilisée aujourd'hui (GRIFFITHS, 2000). Les inconvénients relèvent également du prélèvement minutieux d'une quantité relativement élevée de sang à acheminer rapidement vers un laboratoire, ou bien de l'obligation d'arracher des plumes en croissance (FILLON et SEQUELA, 1995).

Dans une étude menée par Prus et Schmutz en 1987 sur 22 perroquets (PRUS et SCHMUTZ, 1987), le sexage par analyse chromosomique (cellules issues de culture sanguine ou de bulbes de plumes) est comparée au sexage par endoscopie (efficacité, coût, qualité de la détermination du sexe et risque). Excepté le risque pour l'oiseau, le sexage chirurgical apparaît préférable à l'analyse du caryotype pour tous les points de comparaison.

Cependant, d'autres applications de l'analyse chromosomique existent à l'occasion desquelles le sexage peut être effectuée : recherche d'anomalies chromosomiques pouvant être la cause d'échec de la reproduction, études phylogénétiques, recherche fondamentale sur la cytogénétique des oiseaux...

5. Sexage par dosage des hormones stéroïdes

(CLUBB, 1986)

La détermination du sexe par dosage des hormones stéroïdes sexuelles fut une alternative aux techniques de sexage invasives à partir des années 1970. Les concentrations en œstradiol et en testostérone étaient déterminées par dosage, à partir des fientes ou d'un échantillon de plasma, par des méthodes immunologiques à l'aide d'anticorps anti-testostérone et de testostérone tritiée, ou bien d'anticorps anti-œstradiol et d'œstradiol tritié. Les fractions immunoréactives stéroïdiennes étaient quantifiées par la mesure de la radioactivité (CZEKALA et LASLEY, 1977).

Ces techniques avaient pour avantage d'indiquer le statut hormonal des individus destinés à la reproduction et d'étudier le cycle sexuel. Le principal inconvénient concernait les oiseaux immatures, hors période d'activité sexuelle et d'âge inconnu. La fiabilité des tests était de 95 à 99% chez des animaux matures en période sexuelle (CLUBB, 1986). De plus, les variations interspécifiques imposaient de fixer des intervalles de valeurs en étudiant un certain nombre d'animaux. Enfin, outre l'appareillage coûteux, les temps de manipulation étaient nombreux, et chaque laboratoire devaient établir ses propres valeurs de référence en fonction des réactifs utilisés. Cette méthode n'est plus utilisée aujourd'hui.

a. Dosage des hormones stéroïdes fécales

Cette technique fut adaptée à partir des tests de grossesse utilisés en médecine humaine. L'excrétion d'œstradiol et de testostérone était mesurée à partir du mélange fécal. Seule la partie urate était nécessaire mais l'ensemble fécès-urine était collecté pendant deux ou trois jours. Les échantillons étaient congelés et dirigés vers un laboratoire compétent. L'avantage de cette technique était l'absence totale de contention et la facilité de récolter rapidement du matériel biologique en grande quantité (CLUBB, 1986).

b. Dosage des hormones stéroïdes plasmatiques

Le sang était collecté dans des tubes héparinés à partir de la veine jugulaire droite ou de la veine alaire. Le plasma était ensuite envoyé à un laboratoire compétent, qui transmettait les résultats sous une à deux semaines. L'avantage de cette méthode par rapport au dosage fécal était la réduction des risques de contamination et la moindre dépendance des résultats au cycle sexuel (CLUBB, 1986).

C. Sexage des Psittaciformes par méthodes moléculaires

Le développement des techniques de sexage moléculaire a constitué un réel progrès pour la fiabilité et la rapidité de la détermination du sexe chez les perroquets, et a permis de passer du niveau cytologique au niveau moléculaire. Dans la littérature, les méthodes rapportées se basent sur deux types de techniques :

- les techniques d'hybridation de l'ADN permettant de détecter des séquences spécifiques d'un sexe dans l'ADN génomique grâce à l'utilisation de sondes ADN complémentaires ;
- la technique de polymérisation en chaîne ou PCR (Polymerase Chain Reaction) permettant la détection puis l'amplification d'une séquence spécifique grâce à l'utilisation d'amorces.

Ces méthodes, basées sur l'analyse à l'échelle moléculaire, nécessitent au préalable l'obtention d'ADN purifié. Les techniques d'extraction peuvent se faire à partir de n'importe quel échantillon contenant des cellules nucléées. Par soucis de commodité, le sexage moléculaire est en général réalisé à partir de plumes et de sang (HARVEY et al., 2006 ; RIVAL, 2005).

1. L'utilisation de la biologie moléculaire pour le sexage des perroquets

Le sexage par méthodes moléculaires nécessite de mettre en évidence des marqueurs génétiques, séquences d'ADN qui peuvent être communes au deux chromosomes sexuels Z et W (le sexage est alors permis par un polymorphisme de longueur), ou bien spécifiques du chromosome W (la différenciation des genres se faisant alors par la mise en évidence ou non de ce marqueur). Historiquement, le problème a été de trouver de tels marqueurs.

A l'instar du chromosome Y présent chez les mammifères de sexe mâle, et à l'inverse du chromosome Z, le chromosome W tend à dégénérer et a perdu au cours de l'évolution une bonne partie de ses gènes. Les régions non codantes de ce chromosome ont peu à peu gagné en proportion, et sa taille a diminué. Malgré ces différences, une petite région présente sur les deux chromosomes sexuels est homologue, et est appelée « région pseudo-autosomale ». Évidemment, cette région « pseudo-autosomale » ne peut contenir des marqueurs du chromosome W, non présents sur le chromosome Z. De plus, 95% du génome est considéré comme non-codant. Le chromosome W porte moins de gènes que les autres chromosomes, et une plus grosse proportion de celui-ci est composée de régions non-codantes. Les séquences

constituant ces régions ne sont pas uniques, se retrouvent sur d'autres chromosomes, et se répètent dans tout le génome plusieurs milliers de fois (GRIFFITHS, 2000). Ces considérations impliquent automatiquement une réduction importante de la quantité d'ADN spécifique au chromosome W. Celui-ci ne représentant qu'environ un à deux pour cent du génome aviaire, trouver une séquence d'ADN spécifique du sexe femelle a été difficile.

Afin de mettre en évidence ces marqueurs spécifiques du chromosome W, des séquences appartenant au groupe des régions non-codantes de l'ADN ont été explorées. L'inconvénient de ces régions, par leur caractère peu conservé, est de n'autoriser la mise au point de tests que sur un nombre restreint d'espèces proches sur le plan phylogénétique. Parmi elles figurent les micro- et minisatellites utilisés pour les empreintes génétiques.

La méthode PCR est également utilisée. Des PCR non spécifiques, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (GRIFFITHS, 2000 ; GRIFFITHS et ORR, 1999 ; LESSELLS et MATEMAN, 1998) ont permis également de mettre en évidence des marqueurs situés sur les régions non codantes du génome. Enfin, des amorces spécifiques de séquences très conservées au sein de la classe des oiseaux ont finalement été mises au point. Des réaction PCR ciblant de tels marqueurs ont pu être utilisées, autorisant ainsi le sexage par un unique test d'espèces parfois très éloignées.

2. Matériel biologique

a. Extraction à partir de sang

Chez les oiseaux, l'ADN est extrait à partir des érythrocytes (nucléés).

La quantité de sang nécessaire à l'extraction de l'ADN est faible (25µl de sang représentant environ 200 à 300ng d'ADN génomique (BERMUDEZ-HUMARAN et al., 2002), 0,01 à 0,1ml de sang sont nécessaire afin d'obtenir une quantité suffisante d'ADN (LONGMIRE et al., 1993). Il est prélevé, selon la taille de l'oiseau et son âge, à la veine jugulaire, brachiale ou métatarsienne médiale dans un tube EDTA et stocké à 4°C (DUBIEC et ZAGALSKA-NEUBAUER, 2006 ; GRIFFITHS et HOLLAND, 1990).

L'ADN est extrait de manière manuelle (BERMUDEZ-HUMARAN et al., 2002 ; GRIFFITHS et HOLLAND, 1990 ; PETERSEN et al., 2003 ; ROBERTSON et al., 2000) ou à l'aide de kits d'extraction automatique (CHANG et al., 2008 ; SACCHI et al., 2004). Le choix de la méthode d'extraction se fait selon son efficacité, son coût et la quantité de travail à fournir. Les kits disponibles permettent des extractions de bonne qualité, mais sont cependant

chers et augmentent considérablement le coût du sexage lorsqu'une étude à grande échelle est effectuée (étude de sex-ratio par exemple).

➤ **Avantages / inconvénients**

Le prélèvement sanguin, acte réservé exclusivement aux vétérinaires, garantit une absence de contamination possible par de l'ADN étranger à l'oiseau à sexer. Cette méthode nécessite cependant une contention adéquate de l'oiseau et est relativement invasive (ponction veineuse). Elle peut cependant se faire à la faveur d'un prélèvement sanguin initialement effectué pour une autre raison.

b. Extraction à partir de plumes

La deuxième source d'ADN consiste à utiliser l'extrémité du calamus de la plume (bulbe) (DUBIEC et ZAGALSKA-NEUBAUER, 2006 ; SACCHI et al., 2004 ; SILVEIRA RAMOS et al., 2009) ou bien à partir du caillot sanguin incrusté dans l'axe de la plume (HORVÁTH et al., 2005).

i. Extraction à partir de bulbes de plumes

➤ **Structure de la plume, source d'ADN**

Le constituant principal est formé de kératine comparable à celle des cheveux et poils des mammifères. Chaque plume est constituée d'une part d'une hampe dont la base est insérée dans la peau et d'autre part d'un rachis aérien (portant des barbes et barbules) (MCLELLAND, 1990). La partie insérée dans la peau contient des cellules vivantes et donc de l'ADN. La quantité d'ADN présent est plus importante dans les grosses plumes (rémiges et rectrices) que dans les petites plumes (plumes de couverture ou tectrices) (SEGELBACHER, 2002). Une plume qui n'est plus en croissance, fraîchement prélevée et dont le rachis est de diamètre inférieur à 0,2 mm contient plusieurs centaines de cellules dans sa pulpe et ainsi plusieurs centaines de copies de chaque gène (TABERLET et BOUVET, 1991). Ceci représente quelques nanogrammes de tissu suffisant pour l'extraction. Une plume en croissance quant à elle, contient plusieurs microgrammes de tissu vivant (TABERLET et BOUVET, 1991). Enfin, une plume perdue par l'oiseau au cours de la mue et prélevée au sol, ou au fond d'une volière, contient une quantité beaucoup plus faible d'ADN et de cellules vivantes (GRANT, 2001). Bien qu'une analyse génétique soit possible à partir d'une plume tombée naturellement, il a été montré que le succès d'une amplification par PCR du génome nucléaire est supérieur lorsque l'extraction se fait à partir d'une plume arrachée par rapport à

une plume de mue (seulement 50% de succès des PCR à partir de plumes de mue) (SEGELBACHER, 2002).

Une fois la plume arrachée ou tombée lors de la mue, les cellules à la base du bulbe sont directement exposées à des contaminations par de l'ADN exogène. L'ADN est en outre dégradé par la moisissure, les températures élevées et les microbes présents dans l'environnement de l'oiseau (GRANT, 2001).

C'est sur la base de ces principes que les règles de prélèvement des plumes pour l'extraction de l'ADN à partir du bulbe ont été établies.

➤ Prélèvement

Il suffit de prélever deux à trois plumes de couverture, en croissance ou non, sur la poitrine ou la base du cou de l'animal (SILVEIRA RAMOS et al., 2009). Une unique plume peut être utilisée du moment que la taille du bulbe est suffisante (TABERLET et BOUVET, 1991). Au cours du prélèvement, la plume doit être tenue à sa base, pour éviter qu'elle ne se casse. Une plume coupée à sa base inhibe en effet la croissance d'une autre plume et peut être à l'origine d'une infection (MARSDEN et MAY, 1984). Afin de diminuer tout stress et douleur, il est important de n'arracher qu'une plume à la fois. Des mesures visant à éviter toute contamination de l'échantillon doivent être prises (ne pas toucher le bulbe par exemple) et il est même recommandé de prélever les plumes à l'aide de pinces sans toucher l'extrémité (TABERLET et BOUVET, 1991).

Les plumes au sol ne doivent pas être utilisées du fait de la faible quantité d'ADN qu'elle contiennent, mais également du fait que dans le cas où plusieurs oiseaux sont maintenus ensemble, il peut être difficile de savoir de quel individu elles proviennent (GRANT, 2001).

Les plumes ainsi arrachées peuvent être stockées dans des tubes contenant de l'éthanol à 70% à 4°C (TABERLET et BOUVET, 1991), ou bien des pochettes en papier ou des sachets plastiques aussi propres et secs que possible, fermés et réfrigérés (SACCHI et al., 2004 ; GRANT, 2001) jusqu'à leur utilisation, bien que l'ADN ait été extrait avec succès à partir de plumes stockées à température ambiante après un à trois ans (MORIN et al., 1994).

➤ Avantages / inconvénients de ce type de prélèvement

Le principal avantage de cette méthode est l'absence quasiment totale de stress ou de douleur pour l'oiseau. L'acte est peu invasif, et respecte parfaitement le bien-être de l'animal. En pratique clinique, elle permet de simplifier les prélèvements destinés à l'étude du génome

aviaire particulièrement lorsque la ponction sanguine est difficile du fait de l'âge ou de la taille de l'oiseau (BELLO et al., 2001). Elle permet également aux propriétaires de réaliser un prélèvement extrêmement simple sans passer par un vétérinaire. En outre, les plumes prélevées peuvent être acheminées dans un laboratoire spécialisé dans une simple enveloppe. Ce type de prélèvement est tout à fait adapté au sexage à grand échelle (étude de populations par exemple).

L'inconvénient de cette technique est la possible contamination des plumes par de l'ADN étranger lors du prélèvement.

ii. Extraction à partir de sang présent dans l'axe de la plume

Beaucoup d'études ont montré la possibilité d'extraction d'ADN génomique à partir du bulbe des plumes (BELLO et al., 2001 ; COSTANTINI et al., 2008 ; HARVEY et al., 2006 ; MORIN et al., 1994 ; PETERSEN et al., 2003 ; SACCHI et al., 2004 ; SILVEIRA RAMOS et al., 2009 ; TABERLET et BOUVET, 1991). Il a été démontré également la faible teneur en ADN du bulbe des plumes de mue ramassées à même le sol (SEGELBACHER, 2002). En revanche, une alternative et potentiellement abondante source d'ADN à partir de plumes tombées naturellement a été également étudiée, et correspond au caillot sanguin incrusté dans l'axe des plumes matures (HORVÁTH et al., 2005).

➤ Structure de la plume, source d'ADN

La formation d'une plume commence par la prolifération de cellules germinatives entourées d'une gaine (prolongement de l'épiderme), hors du follicule. Cette masse pulpeuse contient une artère axiale. Au bout de quelques jours, la gaine stoppe sa croissance et la plume commence à apparaître à son extrémité. En fin de croissance, la masse pulpeuse ainsi que les structures vasculaires sont totalement résorbées et seule une couronne de cellules kératinisées subsiste. Par usure, la gaine disparaît progressivement, et laisse apparaître l'axe de la plume dont seule la partie inférieure est insérée dans la peau et contient encore des cellules vivantes (le bulbe) à l'extrémité du calamus. L'autre extrémité de la plume (rachis) n'est plus qu'une structure morte ne recevant plus aucun apport sanguin. Cependant, au niveau de l'ombilic supérieur (situé à la jonction calamus-rachis, et vestige du canal par lequel passe la pulpe lors du développement de la plume) est visible un caillot sanguin incrusté dans la structure (figure 26), vestige de l'artère axiale résorbée.

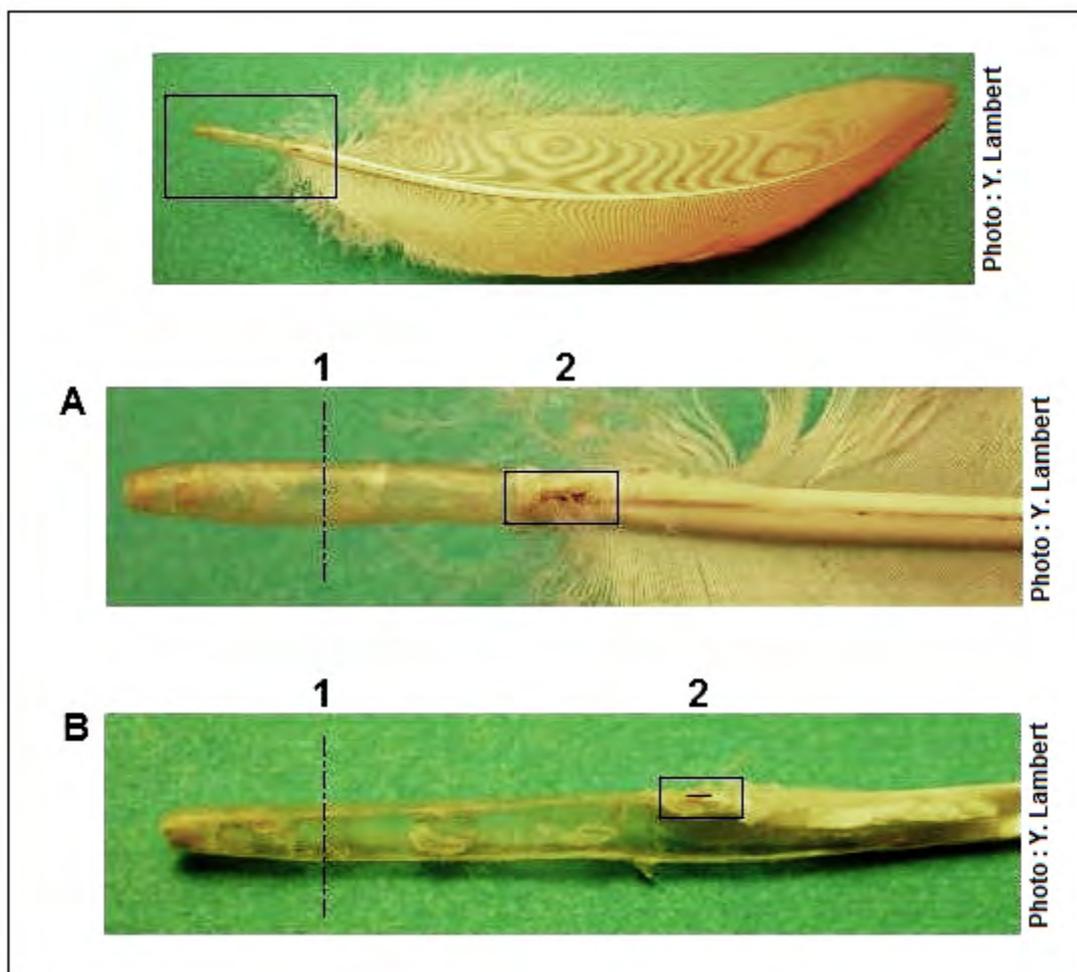


Figure 26 : Vue général d'une rémige de Cacatoès rosablin : (A) détail de la vue postérieure de la base de la plume, et (B) coupe longitudinale du calamus. Les deux différents sites d'extraction sont notés : (1) bulbe et (2) caillot sanguin de l'ombilic supérieur (HORVÁTH et al., 2005)

➤ Avantages et inconvénients de ce type de prélèvement

Les prélèvements non invasifs de plumes sont très utiles pour les études génétiques tel que le sex-ratio des espèces fragiles, en danger d'extinction ou pour les individus hors d'atteinte. L'extraction à partir du caillot sanguin en regard de l'ombilic supérieur est une alternative efficace permettant d'extraire de l'ADN en quantité suffisante (HORVÁTH et al., 2005). Elle permet de s'affranchir de la capture de l'individu, et de supprimer totalement les différentes conséquences de l'arrachage des plumes (douleur, stress, potentiels risques d'infections). En pratique courante, le prélèvement de plumes sur l'individu est aisé et cette méthode n'est pas nécessaire. Lorsque des animaux sont maintenus en captivité en groupe, seules les plumes dont on connaît de manière certaine l'individu qui les a perdu (lors de manipulations par exemple) peuvent être utilisées pour le sexage (GRANT, 2001).

3. Méthodes de sexage basées sur les techniques d'hybridation moléculaires

a. Principe

Les minisatellites sont des séquences de l'ADN simples et courtes, constituées d'un motif k répété n fois, et entourées de part-et-d'autre de deux séquences uniques de bases. La longueur du motif k varie de 1 à 6 paires de bases. Les séquences minisatellites mesurent en moyenne 15 paires de bases de long et se trouvent dans des groupes qui comprennent jusqu'à 1000 à 3000 répétitions.

Ces séquences répétitives présentent un fort polymorphisme de longueur. Le polymorphisme et l'exceptionnel pouvoir discriminant de ces séquences leur ont permis de conquérir de nombreux domaines en génétique humaine (médecine, paternité par empreintes génétiques...) et en recherche vétérinaire telle que la génétique de populations aviaires. L'empreinte génétique obtenue lors de l'étude de ces minisatellites permettant l'analyse de nombreux loci, des études de parenté et de diversité génétique sont ainsi menées sur de nombreuses espèces de perroquets menacées ou en voie de disparition et permettent le management génétique de populations captives lors de programmes de sauvegarde ou de reproduction (BROCK et WHITE, 1992 ; CAPARROZ et al., 2001 ; LONGMIRE et al., 1993 ; MIYAKI et al., 1995 ; MIYAKI et al. 1997b).

Le chromosome sexuel W de l'oiseau (présent uniquement chez la femelle) contient en outre une large proportion de ces séquences répétitives qui peuvent être utilisées comme des marqueurs de la présence de ce chromosome dans le génome et donc comme des marqueurs liés au sexe femelle (DUBIEC et ZAGALSKA-NEUBAUER, 2006). Le principe de la technique est donc de comparer la série de bandes obtenues chez un mâle et chez une femelle afin de détecter la présence d'une bande spécifique de la femelle dans l'échantillon d'ADN extrait à partir de sang (LONGMIRE et al., 1993 ; MIYAKI et al., 1992 ; MIYAKI et al., 1995 ; MIYAKI et al., 1997a) ou de bulbe de plumes. L'empreinte génétique a ainsi été utilisée afin de déterminer le sexe chez certaines espèces de perroquets telles que *Aratinga spp.* (MIYAKI et al., 1992 ; MIYAKI et al., 1997a), *Anodorhynchus spp.*, *Cyanopsitta spixii*, *Guaruba guarouba* et *Nandayus nandey*. (MIYAKI et al., 1997a).

b. Méthode et application au sexage des perroquets

La technique utilisée permet d'obtenir une empreinte génétique présentant des bandes correspondants à des fragments d'ADN.

La sonde du minisatellite humain 33.15 utilisée permet d'étudier un grand nombre de loci minisatellites et permet d'obtenir une empreinte génétique chez un grand nombre d'espèces d'oiseaux.

A partir de l'échantillon d'ADN extrait, 5µg d'ADN sont digérés par des enzymes de restriction spécifiques (*MboI* et *HaeIII*) (MIYAKI et al., 1992 ; MIYAKI et al., 1995 ; MIYAKI et al., 1997a), et les fragments sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à un pour cent permettant de les séparer par taille, puis transférés sur une membrane en nylon (Capillary Southern blotting). Cette membrane est ensuite incubée dans une solution contenant une sonde marquée radioactivement (sonde 33.15 marquée au ³²P (MIYAKI et al., 1992 ; MIYAKI et al., 1995 ; MIYAKI et al., 1997a)) qui va s'hybrider avec les séquences d'ADN génomique complémentaires. En révélant les hybridations par autoradiographie, on obtient ainsi une carte d'empreinte génétique présentant un profil de fragments d'ADN spécifique (figure 27).

Par comparaison entre des cartes mâles et femelles, certains de ces fragments, correspondant à des loci de minisatellites, ont été identifiés comme étant liés au chromosome W. Certains Psittacités présentent ainsi de 2 à 4 fragments liés au sexe femelle, propres à chaque espèce.

La figure 27 montre un exemple d'empreinte génétique obtenue chez 25 individus de l'espèce *Aratinga guarouba*.

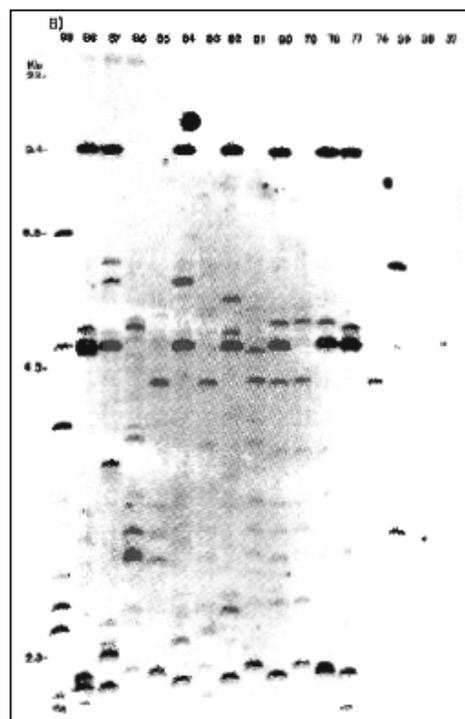


Figure 27: Empreinte ADN de 25 individus de l'espèce *Aratinga guarouba* obtenue avec la sonde humaine 33.15. (d'après MIYAKI et al., 1995)

Le tableau IV présente les espèces sexées par la méthode d'hybridation moléculaire.

Tableau IV : Liste des espèces sexées par hybridation moléculaire

Espèces	Enzyme de restriction	Sonde utilisée	Présence de bandes spécifiques au sexe femelle	Références
<i>Amazona spp. (8 espèces)</i>	MboI (ou HaeIII)*	33.15	Non	<i>Miyaki et al., 1997a</i>
<i>Aratinga spp.</i>				<i>Miyaki et al. 1992</i> <i>Miyaki et al., 1997a</i>
<i>Ara spp.</i>				
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	Hae III (ou MboI)*	33.15	Oui	
<i>Anodorhynchus leari</i>				<i>Miyaki et al., 1997a</i>
<i>Cyanopsitta spixii</i>				
<i>Guaruba guarouba</i>				
<i>Nandayus nenday</i>				
<i>Pionus menstruus</i>				
<i>Deroptyus accipitrinus</i>				
<i>Pionites leucogaster</i>				
<i>Pionopsitta pileata</i>	HaeIII (ou MboI)*	33.15	Non	<i>Miyaki et al., 1997a</i>
<i>Pyrrhura egregia</i>				
<i>Pyrrhura frontalis</i>				
<i>Pyrrhura picta</i>				
<i>Triclaria malachitacea</i>				

*entre parenthèses figure l'enzyme de restriction également utilisée mais dont les détails des résultats ne sont pas présentés dans les différentes publications. L'absence de bandes liées au sexe femelle n'est donc pas liée au différentes enzymes de restriction utilisées (MIYAKI et al., 1997a)

Cette méthode n'a pas permis de sexer les espèces du genre *Amazona*. Ceci peut s'expliquer par l'histoire évolutive de ce minisatellite lié au sexe (perte de la séquence) et cela soutient par ailleurs la séparation phylogénétique précoce du genre *Amazona* des autres taxons de perruches et perroquets (MIYAKI et al., 1997a). Cette méthode n'a en outre pas permis le sexage des trois espèces du genre *Pyrrhura*, ainsi que de *Pionus menstruus*, *Pionites leucogaster*, *Pionopsitta pileata*, *Deroptyus accipitrinus*, et *Triclaria malachitacea*.

c. Avantages et inconvénients

Outre l'application de la carte ADN à la gestion génétique des populations captives d'espèces menacées (BROCK et WHITE, 1992 ; MIYAKI et al., 1995 ; MIYAKI et al., 1997a ; MIYAKI et al., 1997b) ou en voie de disparition (CAPARROZ et al., 2001) (apport d'informations nécessaires à l'augmentation des performances en reproduction et au maintien

de la diversité génétique en diminuant les pourcentages de consanguinité au sein des populations captives) ou son utilité dans la surveillance du commerce illégal d'espèces en danger (MIYAKI et al., 1997b), cette méthode permet également et efficacement de sexer certaines espèces de perroquets dont la plupart ne présente aucun dimorphisme sexuel externe. Il est donc possible chez ces espèces, lors des programmes de sauvegarde, d'associer le sexage au management génétique.

Les études menées ont cependant démontré son efficacité sur un nombre restreint d'espèces. Cette méthode est également relativement lente et son application reste limitée (GRIFFITHS, 2000).

4. Méthodes de sexage utilisant la technique de polymérisation en chaîne (PCR)

a. La technique de polymérisation en chaîne (PCR)

i. Principe

La technique de polymérisation en chaîne consiste à amplifier de manière exponentielle un fragment précis d'ADN, et de mettre en évidence les fragments obtenus par des techniques de migration sur gel.

Elle exploite deux propriétés fondamentales de la molécule d'ADN : la thermolabilité des liaisons entre les bases complémentaires de chaque brin et la complémentarité dans l'enchaînement orienté des bases.

Lorsque les liaisons entre les bases sont rompues par la chaleur (dénaturation), les brins obtenus (ADN monocaténaire) sont capables de se réassocier (hybridation) en reformant l'appariement de départ ou avec toute autre structure présentant une séquence complémentaire (ARN ou oligonucléotide de taille donnée).

La technique PCR utilise la capacité d'une enzyme naturelle, l'ADN-polymérase, de synthétiser à partir d'un brin d'ADN l'autre brin constitué de nucléotides complémentaires.

Cette technique impose une relative connaissance de la séquence cible afin de mettre au point des amorces parfaitement complémentaires, par un séquençage, ou par recherche bibliographique.

ii. Technique

Les réactifs utilisés sont rassemblés dans le mélange réactionnel :

- La Taq-polymérase : la technique repose sur l'emploi d'une enzyme thermorésistante, l'ADN polymérase de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* ou Taq-polymérase.

Cette enzyme résiste à des températures supérieures à 95°C, et son activité d'élongation, optimale au environ de 72°C peut varier en fonction des températures d'élongation choisies. Son activité décroît au cours des cycles du fait des divers changements de température. En outre, son activité est Mg^{2+} dépendante. La concentration en Mg^{2+} dans le tampon doit être calculée de manière optimale, l'activité de l'enzyme pouvant être totalement inhibée.

- Le tampon : la concentration en ions magnésium est vérifiée très précisément puisque ceux-ci sont indispensables au bon fonctionnement de la réaction et représentent un facteur critique de l'amplification.
- Les amorces : ce sont de courtes séquences de nucléotides d'environ 20 à 25 paires de bases, complémentaires des deux extrémités de l'ADN cible.
- Les désoxynucléotides tri-phosphates (dNTP) : précurseurs lors de la phase d'élongation.

L'ADN à polymériser issu d'un échantillon pré-traité (étape d'extraction) est ensuite ajouté à ce mélange, ou « mix », qui subit alors les différentes étapes de l'amplification.

Le principe de la réaction repose sur l'alternance cyclique de trois étapes. Chaque cycle dure environ trente secondes à une minute. La première phase est une phase de dénaturation (destruction des liaisons hydrogènes) des deux brins d'ADN afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténaïres, à température élevée (94°C). La seconde est une phase d'hybridation des amorces oligonucléotidiques complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire cible. Les amorces sont les bornes de la séquence à amplifier. La température d'hybridation est à fixer selon les amorces, et se situe en général entre 40 et 60°C. Enfin, la troisième étape du cycle est une phase d'élongation, c'est à dire de synthèse d'un nouveau brin d'ADN (complémentaire de la séquence ciblée par les amorces), par la Taq-polymérase dans le sens 5'-3'. La température optimale de cette dernière phase est de 72°C. Ce cycle est répété n fois (en moyenne 45). A chaque cycle, le nombre de copies d'ADN est doublé. En fin de réaction s'instaure un phénomène de plateau à partir duquel le nombre de copies n'augmente plus. Ce plateau s'explique par la diminution d'enzyme disponible et par l'inactivation progressive des réactifs.

La révélation des produits amplifiés se fait après migration par électrophorèse sur gel d'agarose. La présence d'un marqueur de poids moléculaire, ou ladder, permet d'évaluer la longueur en paires de bases de chaque produit d'amplification. La révélation se fait sous rayonnement ultra-violet grâce à la présence de bromure d'éthidium contenu dans le tampon

de migration et le gel d'agarose, et qui est capable, après s'être glissé entre les bases d'ADN, d'absorber la lumière sous ultra-violets et d'émettre une fluorescence orange.

La technique de sexage est basée sur la mise en évidence de marqueurs génétiques appropriés à l'identification de régions génomiques permettant la diagnose du sexe de l'individu, par l'utilisation d'amorces permettant de cibler ces séquences.

b. Sexage par méthode AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

i. Principe

L'AFLP est une technique basée sur l'utilisation successive d'enzymes de restriction et d'amplification par PCR. Le protocole utilisé est généralement celui décrit par Vos et son équipe en 1995 (DUBIEC et ZAGALSKA-NEUBAUER, 2006 ; LUCCHINI, 2003 ; VOS et al., 1995), mais des kits d'analyse AFLP disponibles ont également été utilisés (GRIFFITHS et ORR, 1999). L'AFLP se fait en cinq étapes :

- L'ADN extrait est d'abord digéré par des enzymes de restriction. Selon la technique décrite par Vos et son équipe, la digestion est réalisée simultanément par *EcoRI* (TTAA) et *MseI* (GAATTC) (VOS et al., 1995). La digestion peut également être réalisée par *EcoRI* et *TaqI* (LUCCHINI, 2003). Les fragments ainsi obtenus sont très nombreux. Afin de rendre le profil électrophorétique lisible il faut alors n'en amplifier qu'une partie. Puisque l'on s'intéresse au polymorphisme de restriction, il faut, pour le mettre en évidence, utiliser des amorces spécifiques des sites de restriction. Or, ceux-ci sont trop courts pour permettre une hybridation de l'amorce et une seconde étape est donc réalisée.
- La seconde étape, consiste alors en la synthèse de fragments d'ADN double brin d'une vingtaine de paires de bases de long qui vont se lier aux sites de restriction grâce à l'action d'une ligase. Ces fragments sont appelés adaptateurs. Chaque adaptateur étant spécifique de chaque enzyme de restriction, il faut donc en utiliser deux différents lorsque la digestion a été réalisée simultanément par *EcoRI* et *MseI*.
- La troisième étape est dite de « pré-amplification ». Elle consiste en une amplification pré-sélective par PCR afin de réduire le pool de fragments et rendre le profil électrophorétique lisible, par l'utilisation d'amorces spécifiques des adaptateurs utilisés lors de la deuxième étape. Les amorces utilisées sont composées de trois régions successives qui sont, en partant de l'extrémité 5', la région complémentaire à l'adaptateur, la région complémentaire au site de restriction, et un acide nucléique

supplémentaire qui permet l'amplification sélective de certains fragments seulement (VOS et al., 1995) (En effet, l'ajout d'un nucléotide particulier du côté 3' d'une amorce n'autorise statistiquement et théoriquement que l'amplification de ¼ des fragments). Ces amorces sont *EcoRI*-n et *MseI*-n (figure 28) ou *EcoRI*-n et *TaqI*-n.

	Adaptateur	Site de restr.	Acide nucléique suppl.
<i>EcoRI</i>	5' – GACTGCGTACC	AATTC	N – 3'
<i>MseI</i>	5' – GATGAGTCCTGAG	TAA	N – 3'

Figure 28 : Amorces sélectives comportant un acide nucléique supplémentaire noté N, utilisées dans la technique AFLP décrite par Vos et son équipe en 1995 (VOS et al., 1995).

- La quatrième étape, dite de « sélection » est une étape d'amplification utilisant les mêmes amorces que la troisième étape, mais auxquelles sont ajoutés du côté 3' trois nucléotides supplémentaires (*EcoRI*-nnn et *MseI*-nnn).
- La cinquième étape consiste en la révélation, grâce à un marquage radioactif, des produits d'amplification par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (GRIFFITHS et ORR, 1999 ; VOS et al., 1995).

ii. Application au sexage

Entre deux individus de la même espèce, les bandes présentes sur les profils électrophorétiques présentent en général des variations (utiles par ailleurs pour les études de génétique des populations au même titre que les marqueurs minisatellites), mais qui ne sont pas obligatoirement liées au sexe. Par l'utilisation de certaines séquences «-nnn » à l'extrémité 3' des amorces AFLP, et en comparant les profils de mâles et de femelles, certaines bandes apparaissent comme étant spécifiques du sexe femelle, et donc comme des marqueurs de la présence du chromosome W. Si aucune bande spécifique du chromosome W n'apparaissent, des amorces différentes sont utilisées jusqu'à l'apparition en fin de réaction de bandes intéressantes (GRIFFITHS, 2000). Par exemple, Griffiths et Orr en 1999 (GRIFFITHS et ORR, 1999), observent que l'utilisation combinée des amorces *EcoRI*-AGG et *MseI*-CAG permet de mettre en évidence deux marqueurs sexuels chez l'Autruche, tandis que *EcoRI*-AGG et *MseI*-CAA en fait apparaître un troisième.

Des marqueurs sexuels sont mis en évidence par Lucchini en 2003 (LUCCHINI, 2003), chez des espèces du genre *Ara* et *Anodorhynchus* (tableau V).

Tableau V : Liste des espèces sexées par méthode AFLP

Espèces	Enzyme de restriction	Protocole utilisé	Présence de marqueurs sexuels	Référence
<i>Ara spp.</i>	<i>EcoRI / TaqI</i>	Vos et al. 1995	Oui	Lucchini, 2003
<i>Anodorhynchus</i>				

iii. Avantages et inconvénients

Au même titre que le « fingerprinting » obtenu par l'étude des minisatellites, l'AFLP permet également d'obtenir de manière très efficace (VOS et al., 1995) des empreintes génétiques utiles lors de l'étude génétique des populations d'espèces menacées. Étudier la systématique, les relations phylogénétiques entre les espèces ainsi que les relations de parenté entre les individus est une phase primordiale des programmes de sauvegarde. Décrite comme simple et robuste par Lucchini en 2003, celui-ci l'utilise chez plusieurs espèces du genre *Ara* et *Anodorhynchus* dans le cadre de ce type de programmes, et outre l'analyse parentale qu'il obtient, il parvient également à mettre en évidence des marqueurs permettant de déterminer le sexe des individus étudiés (LUCCHINI, 2003). L'avantage de cette méthode est donc sa double application dans le cadre de programmes de sauvegarde et de reproduction des espèces menacées (« fingerprinting »-sexage). Elle permet, par comparaison des produits de PCR de mâles et de femelles, de mettre en évidence des marqueurs sexuels spécifiques du chromosome W, utiles soit pour le sexage direct d'individus, soit pour la mise au point d'amorces utilisables lors de tests de sexage par PCR standard (basée sur la mise en évidence des marqueurs AFLP) dont les protocoles sont nettement moins complexes.

Cependant, si un test de sexage est requis, le marqueur sexuel doit être isolé de manière efficace, et dans certains cas, la moins coûteuse possible. La méthode RAPD (GRIFFITHS et TIWARI, 1993), similaire à l'AFLP, apparaît comme plus performante, plus simple (pas d'emploi de gel de polyacrylamide ni de marqueurs radioactifs) moins longue et moins onéreuse (GRIFFITHS et ORR, 1999).

Peu de références bibliographiques relatent le sexage de perruches ou de perroquets par cette méthode.

c. Sexage par méthode RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

Aucune espèce de perroquets n'a été sexée par cette méthode. Sa description, succincte, sera néanmoins faite puisque, au même titre que la méthode AFLP ou l'étude des minisatellites, elle a permis la recherche et la mise en évidence de marqueurs génétiques sexuels chez les oiseaux (GRIFFITHS et TIWARI, 1993).

Le protocole suivi est celui décrit par Griffiths et Tiwari (GRIFFITHS et TIWARI, 1993).

i. Principe

La RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA ou ADN polymorphe amplifié aléatoirement) consiste à réaliser une PCR sur l'ADN génomique de l'oiseau en utilisant un seul type d'amorce de séquence arbitraire et de courte taille (10 nucléotides) (GRIFFITHS et TIWARI, 1993 ; LESSELLS et MATEMAN, 1998). La particularité de cette réaction est l'utilisation d'une faible température permettant de réduire la spécificité de la réaction et autorisant ainsi une certaine répétabilité des résultats (DUBIEC et ZAGALSKA-NEUBAUER, 2006). L'amorce utilisée s'hybride sur l'ADN simple brin étudié chaque fois qu'elle rencontre une séquence qui lui est complémentaire. L'amplification n'a alors lieu que si deux amorces s'hybrident à une distance n'excédant pas 2 à 3kb (GRIFFITHS et TIWARI, 1993) et si la polymérisation a lieu dans le sens convergent.

La faible spécificité de la réaction conduit en l'obtention en un grand nombre de produits d'amplification. Ceux-ci sont visualisés sur gel d'agarose après électrophorèse. La procédure d'identification d'un marqueur sexuel requiert deux échantillons, un correspondant à de l'ADN mâle, et un second correspondant à des individus femelles.

- Le premier type de résultats correspond à l'obtention de fragments de taille identique chez les mâles et les femelles. Ceux-ci dérivent d'une amplification d'une région autosomale, ou bien d'un locus lié au chromosomes Z et W et porté par les deux sexes.
- Le second type de résultats est moins fréquent et correspond à l'obtention d'une bande présente uniquement dans les échantillons femelles (sexe hétérogamétique ZW). Cette bande correspond donc de manière probable à une séquence liée au chromosome W, autrement dit à un marqueur du sexe femelle (GRIFFITHS et TIWARI, 1993).
- Le troisième type correspond à des fragments provenant de loci polymorphes dont la présence est individu-dépendante. Comme la RAPD fut initialement conçue pour étudier le polymorphisme génétique, la différence entre deux individus peut provenir d'un polymorphisme autosomal ou lié au chromosome Z. Ainsi, afin de discriminer les

marqueurs sexuels de ces marqueurs polymorphes, des échantillons correspondant à un pool d'ADN mâle et à un pool d'ADN femelle ont été comparés (DUBIEC et ZAGALSKA-NEUBAUER, 2006 ; GRIFFITHS et TIWARI, 1993).

La RAPD est un processus au cours duquel plusieurs amorces sont testées, jusqu'à l'obtention de marqueurs sexuels. La taille des amorces utilisées est très importante puisque la fréquence d'occurrence des sites d'hybridation est une fonction inverse de la taille de l'amorce : plus l'amorce est courte, plus les sites d'hybridation seront nombreux ce qui augmente les chances d'amplifier une séquence liée au sexe. Griffiths et Tiwari, en 1993, testent ainsi 16 amorces avant de mettre en évidence de tels marqueurs chez la Mésange charbonnière (*Parus major*) (GRIFFITHS et TIWARI, 1993). Dans l'étude de Bello et Sanchez en 1999, 29 amorces sur 200 initialement testées génèrent des marqueurs potentiellement intéressants chez l'Autruche (BELLO et SANCHEZ, 1999).

Lorsqu'une amorce permettant la mise en évidence d'un marqueur sexuel est découverte, plusieurs utilisations sont possibles afin de déterminer le sexe des oiseaux (GRIFFITHS et TIWARI, 1993) :

- Elle peut être utilisée lors de réaction de polymérisation de basse spécificité similaire à celle utilisée lors de la RAPD. L'avantage de cette procédure est que l'amorce co-amplifie des fragments non spécifiques du sexe mais qui servent de témoins positifs de la réaction (LESSELLS et MATEMAN, 1998) ;
- Les fragments identifiés comme marqueurs sexuels lors du screening initial peuvent être séquencés, et des amorces spécifiques utilisées lors de PCR standard peuvent être mises au point.

ii. Avantages et inconvénients

Aucune publication ne rapporte le sexage de perruches ou de perroquets par méthode RAPD. Cependant, bien que les amorces utilisées soient spécifiques d'espèces (chaque protocole permet le sexage d'un nombre restreint d'espèces) (GRIFFITHS, 2000), et outre la possibilité qu'offre cette technique pour le sexage de certaines espèces d'oiseaux (LESSELLS et MATEMAN, 1998) elle a permis de mettre en évidence des séquences d'ADN provenant du chromosome W, c'est à dire des marqueurs du sexe femelle (GRIFFITHS et TIWARI, 1993). Ces marqueurs ont par la suite permis la mise au point d'amorces spécifiques permettant le sexage par PCR standard (GRIFFITHS, 2000 ; GRIFFITHS et TIWARI, 1993).

d. PCR ciblant des séquences spécifiques

Les méthodes de sexage moléculaire par étude des micro- et mini-satellites, par AFLP et RAPD n'ont permis le sexage que d'un nombre restreint d'espèces d'oiseaux, dont une dizaine seulement d'espèces de perroquets. Le but ultime recherché lors de la mise au point d'un test de sexage étant sa capacité d'utilisation chez la plupart, voire toutes les espèces d'oiseaux (GRIFFITHS, 2000), des marqueurs mis en évidence par certaines de ces méthodes ont ensuite servi à la mise au point d'amorces spécifiques utilisables lors de réaction de polymérisation en chaîne permettant d'obtenir un tel test.

Deux marqueurs sexuels ont permis la mise au point d'amorces spécifiques :

- Le gène CHD1
- La séquence répétitive Xho I du chromosome W de la poule (DE MATTOS et al., 1998).

i. Le gène CHD1

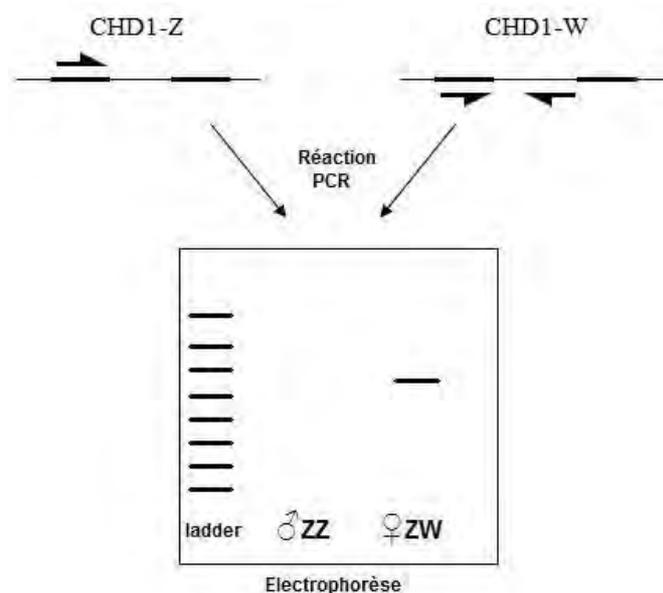
La problématique de l'universalité du sexage moléculaire fut résolue grâce à la mise en évidence d'un marqueur sexuel par la méthode RAPD effectuée sur la Mésange charbonnière (*Parus major*) et le Diamant mandarin (*Taeniopygia guttata*). À cette étape, le test ne fonctionnait que sur ces passereaux et amplifiait une région non codante du chromosome W. Une telle région évoluant rapidement, elle est donc peu conservée entre les espèces au sein de la classe des oiseaux, ce qui explique par ailleurs pourquoi les tests mis au point jusqu'alors n'étaient fonctionnels que sur un nombre limité d'espèces proches sur le plan phylogénétique (LESSELLS et MATEMAN, 1998). Cependant, cette région non-codante, comprise dans un gène, constitue un intron entouré d'exons, c'est à dire de séquences codantes, bien plus conservées au sein de la classe. Cette caractéristique fut découverte suite au séquençage des deux séquences entourant ce marqueur. Des alignements ont permis de découvrir que celles-ci présentaient de grandes similarités avec les séquences présentes dans le gène CHD1 de la souris (GRIFFITHS et al., 1998).

Le gène CHD1-W ou CHD-W (Chromobox-Helicase-DNA-binding-gene) fut ainsi le premier découvert chez les oiseaux (GRIFFITHS et al., 1998). Ce gène est remarquablement conservé au sein de la classe et seulement cinq pour cent de différences ont été mises en évidence entre des espèces aussi éloignées que la poule et les Aras (GRIFFITHS, 2000). Ceci signifie que si un couple d'amorces ciblant ce gène CHD1-W est mis au point chez la poule, il est susceptible également de fonctionner chez les autres espèces, à l'exception des Ratites (GRIFFITHS et al., 1998). En outre, ce gène étant compris dans la région pseudo-autosomale

du chromosome W, cela implique qu'une copie existe sur le chromosome Z. Ce gène, CHD1-Z (ou CHD-Z) est également conservé au sein de la classe, et les amorces amplifiant le gène CHD1-W amplifient également CHD1-Z (GRIFFITHS, 2000 ; GRIFFITHS et al., 1998).

Dès lors, connaissant la structure de ces deux gènes (exon-intron-exon), deux types d'amorces ont été mises au point :

- Des amorces permettant seulement l'amplification d'une partie du gène CHD1-W, et conduisant après PCR et électrophorèse, à une bande chez la femelle (ZW) et aucune chez le mâle (ZZ) (figure 29). L'absence de bande visible indique que l'individu est de sexe mâle, mais peut également être due à un défaut d'amplification et peut conduire alors à une erreur de sexage (GRIFFITHS, 2000 ; GRIFFITHS et TIWARI, 1995) ;
- Des amorces amplifiant simultanément des séquences des deux gènes, la bande correspondante à CHD1-Z apparaît alors chez tous les individus, et permet de s'assurer que le test a fonctionné. L'intron, peu conservé, est alors utilisé comme discriminant entre les bandes provenant de la copie Z ou W des gènes CHD1. Les amorces mises au point ciblent en effet les exons situés de part et d'autre de cet intron qui diffère en taille entre les deux gènes. A l'issue de l'électrophorèse, les femelles portent alors deux bandes Z et W, tandis que les mâles sont identifiés par la présence d'une bande unique Z (GRIFFITHS, 2000) (figure 30).



Une séquence du gène CHD1-W (présent uniquement chez la femelle) est ciblée spécifiquement par les amorces. Une des amorces utilisées ici est complémentaire d'une séquence de l'intron du gène CHD1-W (en ligne fine sur la figure). A l'issue de la réaction, les produits d'amplification migrent sur un gel d'agarose à côté d'un marqueur de taille (ladder). Une unique bande est visible chez la femelle, aucune chez le mâle.

Figure 29: Mise en évidence du gène CHD1-W lors d'une réaction de PCR.

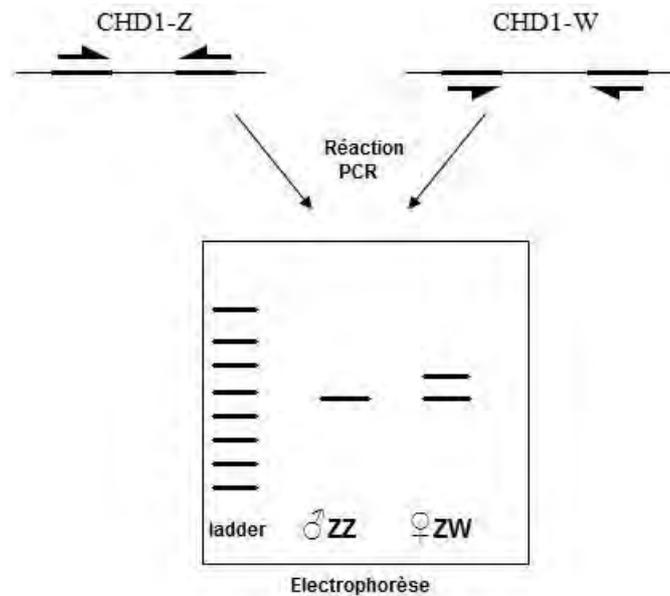


Figure 30: Mise en évidence du gène CHD1 lors d'une réaction de PCR.

Une section identique de chaque gène (CHD1-Z présent chez les deux sexes et CHD1-W présent uniquement chez la femelle) est ciblée par les amorces. Les amorces utilisées ici sont complémentaires d'une séquence des exons (en ligne épaisse sur la figure) entourant un intron (en ligne fine) dont la taille varie entre les deux gènes. A l'issue de la réaction, les produits d'amplification migrent sur un gel d'agarose à côté d'un marqueur de taille (ladder). Une unique bande est visible chez le mâle, deux chez la femelle.

ii. Application au sexage des perroquets

➤ Ciblage du Gène CHD1

Dans l'étude de Griffiths et son équipe (GRIFFITHS et al., 1998), 27 espèces sur 28 (dont trois appartenant à l'ordre des Psittaciformes) ont été sexées de manière efficace à l'aide de deux amorces P8 et P2 (tableau VI), mises au point à partir de la séquence du gène CHD de la poule domestique (*Gallus gallus*).

Tableau VI : Amorces P2 et P8 mises au point par Griffiths et al. (1998)

Amorces CHD Griffiths et al.	
<i>P8 (Sens)</i>	5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'
<i>P2 (Antisens)</i>	5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'

Ces amorces amplifient une région du gène CHD1 (CHD) incluant un intron (intron numéro 21) dont la taille varie de 17 nucléotides entre CHD-Z et CHD-W chez la poule (figure 31).

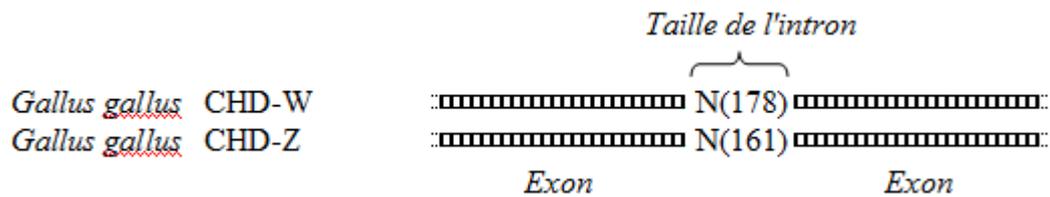


Figure 31 : Représentation des gènes CHD-Z et CHD-W chez *Gallus gallus* incluant l'intron et les portions de deux exons. N(Nucléotide) et le nombre entre parenthèse indique la taille de la région

Les amorces permettent donc la synthèse de fragments de tailles différentes entre les chromosomes Z et W (17 nucléotides), et l'électrophorèse finale permet de mettre en évidence une bande pour les mâles et deux bandes pour la femelle (figures 30 et 32).

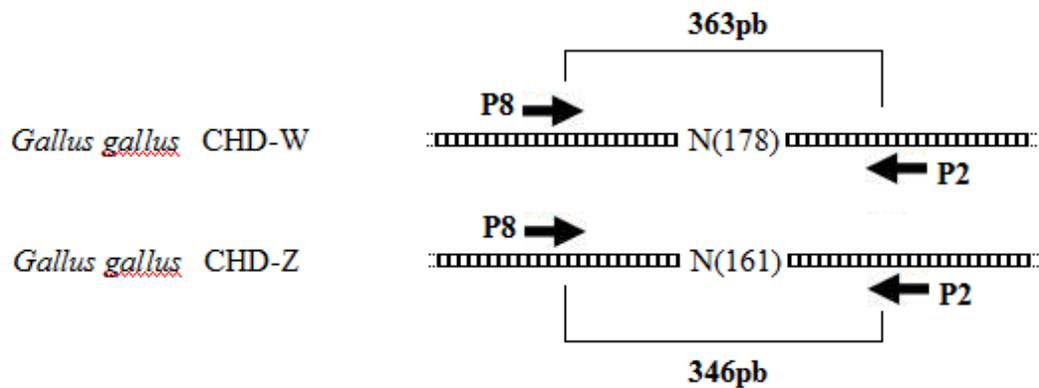


Figure 32 : Fixation des amorces P8 et P2 de Griffiths et son équipe de part et d'autres de l'intron numéro 21 et taille des fragments amplifiés chez *Gallus gallus*.

Le tableau VII répertorie différentes espèces sexées par méthode PCR ciblant le gène CHD1 à l'aide du couples d'amorces P2 et P8 ainsi que des couples nommés P2/P3 et P2/P1.

Tableau VII : Liste des espèces sexées par PCR ciblant le gène CHD1

Amorces	Espèces sexées	Références	
	Ara de Spix (<i>Cyanopsitta spixii</i>) Perruche de Pennant (<i>Platycercus elegans</i>) Cacatoès de Latham (<i>Calyptorhynchus lathami</i>)	Griffiths et al., 1998	
	Perruche Calopsitte (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	Cerit et Avanus, 2007	
P2 P8	5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3' 5'-CTCCAAGGATGAGRAAYTG-3'	Amazone à front bleu (<i>Amazona aestiva</i>) Amazone à ailes orangées (<i>A. amazonica</i>) Amazone à joues bleues (<i>A. brasiliensis</i>) Amazone à front jaune (<i>A. ochrocephala</i>) Amazone de Prêtre (<i>A. pretrei</i>) Amazone vinacea (<i>A. vinacea</i>) Ara hyacinthe (<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>) Ara de Lear (<i>Anodorhynchus leari</i>) Ara ararauna (<i>Ara ararauna</i>) Ara à collier d'or (<i>A. auricollis</i>) Ara chloroptère (<i>A. chloroptera</i>) Ara macao (<i>A. macao</i>) Ara maracana (<i>A. maracana</i>) Ara noble (<i>Diopsittaca nobilis</i>) Conure à tête bleue (<i>Aratinga acuticaudata</i>) Conure couronnée (<i>A. aurea</i>) Conure pavouane (<i>A. leucophthalmus</i>) Conure mitrée (<i>A. mitrata</i>) Conure soleil (<i>A. solstitialis</i> spp.) Ara de Spix (<i>Cyanopsitta spixii</i>) Papegeai maillé (<i>Deropteryx accipitrinus</i>) Perruche moineau (<i>Forpus xanthopterygius</i>) Conure dorée (<i>Guaruba guarouba</i>) Lori noire (<i>Lorius garrulus</i>) Caïque à ventre blanc (<i>Pionites leucogaster</i>) Caïque mitré (<i>Pionopsitta pileata</i>) Pione à tête bleue (<i>Pionus menstruus</i>) Perruche de Barraband (<i>Polytelis swainsonii</i>) Conure de Vieillot (<i>Pyrrhura frontalis</i>) Conure roséifrons (<i>P. picta roseifrons</i>) Crick à ventre bleu (<i>Tricharia malachitacea</i>)	Miyaki et al., 1998
	Kakapo (<i>Strigops habroptilus</i>)	Robertson et al., 2000	
	Amazone de Saint-Vincent (<i>Amazona guildingii</i>)	Russello et Amato, 2001	
P2 P3	5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3' 5'-AGATATTCTGGATCTGATAGTGA-3'	Ara ararauna (<i>Ara ararauna</i>) Ara chloroptère (<i>A. chloroptera</i>) Ara macao (<i>A. macao</i>) Ara de Coulon (<i>Ara couloni</i>) Ara militaire (<i>Ara militaris</i>)	Bermudez-Humaran et al., 2002
CHD1F CHD1R	5'-TATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGT-3' 5'-CCTTTTATTGATCCATCAAGCCT-3'	Amazone à front jaune (<i>A. ochrocephala</i>)	Lee et al., 2010
P2 P3	5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3' 5'-AGATATTCTGGATCTGATAGTGA-3'	Ara de Spix (<i>Cyanopsitta spixii</i>)	Griffiths et Tiwari, 1995
P2 P1	5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3' 5'-ATATTCTGGATCTGATAGTGA(C/T)TC-3'		

➤ Ciblage de la séquence Xho I

De Mattos et son équipe sont parvenus à sexer en 1998 deux espèces du genre *Amazona* en ciblant une séquence répétée appelée Xho I (tableau VIII) présente sur le chromosome W (124 paires de bases) et absente sur le chromosome Z.

Tableau VIII : Liste des espèces sexées par PCR ciblant la séquence Xho I

Amorces	Espèces sexées	Références
Xho I 5'-AACTACCACTTTTCTCACGG-3'	Amazone à front bleu (<i>Amazona aestiva</i>)	De Mattos et al., 1998
Xho II 5'-TTCAGATGTATAACGCATGG-3'	Amazone à ailes orangées (<i>A. amazonica</i>)	

iii. Avantages et inconvénients

Le PCR ciblant le gène CHD1 est sans nul doute la méthode de choix pour le sexage des perruches et perroquets.

- Elle est efficace, relativement simple, peu onéreuse et rapide (le protocole incluant l'extraction de l'ADN, la réaction de polymérisation en chaîne et la révélation des produits d'amplification par électrophorèse peut durer moins de cinq heures (DUBIEC et ZAGALSKA-NEUBAUER, 2006) ;
- L'ensemble du procédé, de la récolte des échantillons à l'analyse ADN proprement dite est dans sa globalité peu invasive. Lorsque l'ADN est extrait à partir de plumes arrachées, ou bien de plumes tombées naturellement, cette technique est très utile dans les études génétiques et les programmes de reproduction des espèces sensibles ou rares (CERIT et AVANUS, 2007 ; MIYAKI et al., 1998 ; RUSSELLO et AMATO, 2001).

Des comparaisons effectuées entre cette méthode de sexage par PCR et d'autres méthodes dont l'approche est plus délicate ont été effectuées et démontrent son efficacité ainsi que sa répétabilité. Dans l'étude menée par Miyaki et son équipe en 1998 (MIYAKI et al., 1998) les résultats obtenus chez 31 espèces de perroquets sont comparables à ceux obtenus par caryotype, autopsie, observation du dimorphisme sexuel externe ou du comportement reproducteur, ou encore par mise en évidence de minisatellites liés au chromosome sexuel W.

Enfin, son utilité est démontrée également par ses nombreuses applications dans différents domaines :

- Études des sex-ratio et mise en place de programmes de reproduction des populations captives ou sauvages d'espèces menacées ou en voie d'extinction, dont le célèbre et rarissime Ara de Spix ou encore l'Amazone de Saint-Vincent (BERMUDEZ-

HUMARAN et al., 2002 ; GRIFFITHS et TIWARI, 1995 ; MIYAKI et al., 1998 ; ROBERTSON et al., 2000 ; RUSSELLO et AMATO, 2001) ;

- Sexage rapide et efficace des perruches et perroquets de cages et de volières (CERIT et AVANUS, 2007 ; GRIFFITHS, 2000 ; GRIFFITHS et al., 1998 ; RIVAL, 2005) ;
- En dehors du cadre du sexage, les amorces utilisées peuvent en outre permettre des études phylogénétiques (GARCIA-MORENO et MINDELL, 2000).

Au même titre que l'étude des minisatellites, l'AFLP ou la RAPD, cette méthode s'applique à l'échelle moléculaire. Ainsi, bien qu'elle soit totalement indépendante de l'âge de l'individu (sexage précoce des perroquets au nid, avant l'apparition des premières plumes ou du plumage d'adulte), elle possède un inconvénient majeur : elle ne renseigne en aucun cas sur l'état fonctionnel de l'appareil reproducteur (lors d'une laparoscopie, les gonades sont visualisées directement, un examen minutieux est effectué, et d'éventuels signes d'affections sont recherchés (CHAI et ROMAN, 2005)).

iv. Comparaison avec les autres méthodes de sexage moléculaire

Parmi les différentes méthodes de sexage moléculaire, le ciblage par PCR de marqueurs spécifiques tel que le gène CHD1 est la meilleure alternative (DUBIEC et ZAGALSKA-NEUBAUER, 2006) du fait des différents avantages qu'elle procure et de ses applications aisées dans différents domaines. Les autres techniques, plus laborieuses, chronophages et onéreuses ne sont appliquées qu'en recherche fondamentale, pour la mise en évidence de marqueurs sexuels, ou lors de sexages effectués en parallèle d'études phylogénétiques ou de parenté. La répétabilité de l'AFLP est supérieure à celle de la RAPD et elle permet de produire plus de bandes visibles à l'issue de l'électrophorèse terminale ce qui augmente les chances de mettre en évidence des marqueurs sexuels. Cependant, du fait de sa complexité et de son coût, elle n'est utilisée pour le sexage que de manière exceptionnelle (DUBIEC et ZAGALSKA-NEUBAUER, 2006). Les analyses basées sur l'hybridation de l'ADN sont efficaces mais relativement lentes. Enfin, les marqueurs mis en évidence par ces trois méthodes sont généralement situés dans des régions non codantes, à évolution rapide, et dont la variabilité est donc importante au sein de la classe des oiseaux. Les marqueurs identifiés ont donc des applications restreintes à quelques espèces proches sur le plan phylogénétique (DUBIEC et ZAGALSKA-NEUBAUER, 2006 ; GRIFFITHS, 2000). La méthode par RAPD a cependant permis la mise au point du ciblage du gène CHD1 par des amorces spécifiques. Ce dernier test est aujourd'hui utilisé en routine par les laboratoires.

Soixante-quinze pour cent des Psittaciformes sont considérés comme monomorphiques. Leur sexage revêt une importance particulière dans le cadre de l'élevage, du diagnostic de convenance ou encore lors d'études de sex-ratio ou de mise en place de programme de reproduction d'espèces d'intérêt conservatoire. Parmi les méthodes mises au point, le sexage moléculaire par PCR et l'endoscopie sont les deux techniques pour lesquelles la fiabilité a été vérifiée sur le plus grand nombre d'espèces. Ce sont également les plus utilisées aujourd'hui.

Etude expérimentale

PREMIÈRE PARTIE DE
L'ÉTUDE EXPÉRIMENTALE :
**Mise au point d'un test de
détermination moléculaire du
sexe chez les perroquets**

CHAPITRE 1 : OBJECTIFS DE L'ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

La première partie consistait en l'étude bibliographique des différentes méthodes mises au point afin de sexer les oiseaux du groupe des Psittaciformes. Le premier volet de cette deuxième partie a pour but de décrire la mise au point d'un nouveau test de sexage moléculaire de ces oiseaux par méthode de polymérisation en chaîne (PCR). Ce type de sexage a été précédemment décrit, et des couples d'amorces ont déjà été mis au point sur certaines espèces. Nous présenterons ici le test de cinq nouveaux couples sur un groupe d'espèces dont certaines n'apparaissent pas dans la littérature.

Devant l'engouement existant envers les perroquets, les rapports entretenus entre ces oiseaux et leur propriétaire, et devant l'intérêt conservatoire de certaines espèces, il est important que ce test soit facile à mettre en œuvre, rapide, efficace, et qu'il respecte parfaitement le bien-être de l'oiseau à sexer.

Le test a été mis au point sur des bulbes de plumes, afin de diminuer le caractère invasif du test et de faciliter le prélèvement (le prélèvement sanguin est possible mais beaucoup moins aisé, invasif et de ce fait plus risqué, et le conditionnement et l'acheminement plus délicats) et de permettre en outre aux propriétaires ou détenteurs de perruches ou perroquets de le pratiquer eux-mêmes.

Le matériel expérimental a été rassemblé grâce à un éleveur de perruches qui a accepté que je vienne prélever ses oiseaux reproducteurs. Je me suis également déplacé dans un parc zoologique qui m'a autorisé à prélever les perroquets de sexe connu présents dans la collection. Un propriétaire désireux de confirmer le sexe de son perroquet Youyou du Sénégal m'a également permis de récolter des plumes.

Nous avons également rassemblé des plumes de poule et de coq (*Gallus gallus*) ainsi que des prélèvements d'organes, effectués sur une carcasse de poulet femelle destiné à la consommation. La poule, qui n'appartient pas au groupe des perruches et perroquets, a fait partie de la stratégie de mise au point de l'extraction d'ADN à partir de plumes, et de la mise au point des différents couples d'amorces de PCR testés.

Les tests ont été réalisés grâce au support logistique du Laboratoire Vétérinaire Départemental du Rhône (LVD69) dans lequel j'ai participé aux différentes étapes de la mise au point du protocole en réalisant plusieurs stages.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODE

I. Matériel

A. Animaux

Les plumes à partir desquelles l'ADN a été prélevé ont été obtenues par prélèvement direct sur des perruches appartenant à Monsieur Joanny, éleveur à Charly (Rhône), et formant des couples reproducteurs (dont le sexe et de ce fait connu par l'éleveur), et sur des individus maintenus en captivité dans le parc ornithologique de Villars-les-dombes (Ain), et dont le sexe a déjà été identifié par méthode moléculaire.

Des plumes ont également été prélevées sur un perroquet Youyou du Sénégal non sexé mais dont des méthodes empiriques de sexage (analyse du comportement envers l'humain, de la capacité à imiter, des vocalises) laissent présumer qu'il s'agit d'un mâle.

Les plumes appartiennent à 15 espèces, la plupart du temps représentées par un mâle et une femelle (Tableau IX).

Tableau IX : Espèces, sexe et nombre de plumes prélevées

Non vulgaire	Nom scientifique	Sexe	Nombre de plumes
Perruche Calopsitte	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Mâle	4
-	-	Femelle	5
Perruche Kakariki	<i>Cyanoramphus novaezelandiae</i>	Mâle	5
-	-	Femelle	5
Perruche Princesse de Galles	<i>Polytelis alexandrae</i>	Mâle	4
-	-	Femelle	3
Perruche de Barnard	<i>Barnardius Barnardi macgillivrayi</i>	Mâle	4
-	-	Femelle	7
-	-	(?)	2
Perruche de Pennant	<i>Platycercus elegans</i>	Mâle	4
-	-	Femelle	3
Perruche à collier	<i>Psittacula krameri</i>	Mâle	6
-	-	Femelle	10
Amazone de Finsch	<i>Amazona finschii</i>	Mâle	7
-	-	Femelle	8
Amazone à ailes oranges	<i>Amazona amazonica</i>	Femelle	5
Ara à collier d'or	<i>Ara auricollis</i>	Mâle	9
-	-	Femelle	6
Cacatoès des Moluques	<i>Cacatua moluccensis</i>	Mâle	6
Cacatoès Rosalbin	<i>Cacatua roseicapilla</i>	Femelle	8
Eclectus	<i>Eclectus roratus</i>	Mâle	2
-	-	Femelle	7
Gris du Gabon	<i>Psittacus erithacus</i>	Femelle	8
Pionie à tête bleue	<i>Pionus m. menstruus</i>	Mâle	7
Youyou du Sénégal	<i>Poicephalus senegalus</i>	(?)	6

Nos recherches et nos contacts nous ont permis de rassembler les espèces les plus couramment maintenues en captivité.

Des plumes de poules et de coq ont par ailleurs été prélevées pour la mise au point de la méthode d'extraction et destinées à servir de témoin positif des PCR (tableau X).

Enfin, sur une carcasse de poulet femelle a été prélevé un morceau de rein destiné à servir de témoin positif de l'extraction (tableau X). Cette dernière étant effectuée avec un kit d'extraction approprié.

Tableau X : Échantillons prélevés chez l'espèce *Gallus gallus*

Nom vulgaire, signalement	Nom scientifique	Sexe	Échantillon : Origine (nombre)
Poule noire	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Femelle	Plumes (12)
Poule rousse	-	Femelle	Plumes (7)
Poule naine blanche	-	Femelle	Plumes (16)
Coq	-	Mâle	Plumes (1)
Carcasse de poulet	-	Femelle	Rein (1)

B. Matériel expérimental

1. Matériel commun à toutes les étapes

Ce matériel est présent dans les différentes pièces du laboratoire et est utilisé dans toutes les étapes de la manipulation : des jeux de pipettes, des cônes avec ou sans filtre et des tubes eppendorf de tailles différentes.

2. Matériel nécessaire à l'extraction de l'ADN

a. Les kits d'extraction (Annexe 1)

Pour l'extraction manuelle, nous avons utilisé le kit d'extraction Nucleospin®Tissue (laboratoire MACHEREY-NAGEL) ainsi que son homologue adapté à des petits volumes Nucleospin®Tissue XS.

Pour l'extraction semi-automatisée, nous avons utilisé le kit Magnesil® KF Genomic System du laboratoire PROMEGA utilisé avec le KingFisher®. Pour cette extraction automatisée, nous avons aussi eu besoin de barrettes de 5 puits et d'embouts de protection des tiges métalliques qui sont fournis par THERMO ELECTRON CORPORATION.

b. Le KingFisher®

C'est une machine commercialisée par THERMO LABSYSTEMS (Annexe 2). Elle permet une extraction semi-automatique de l'ADN de 15 échantillons en même temps. Son fonctionnement est basé sur l'utilisation de billes magnétiques recouvertes de silice, sur lesquelles se fixe l'ADN. Ces billes sont transférées d'un milieu réactionnel au suivant grâce à une attraction électromagnétique via des tiges métalliques plongeant successivement dans les différents milieux.

3. Amorces

- Les amorces utilisées pour la mise au point de ce test, d'une vingtaine de nucléotides, sont, d'une part, des amorces déjà parues dans la littérature, et d'autre part, des amorces élaborées par nos soins à partir de portions de séquences des gènes CHD-Z (présent chez le mâle et la femelle) et CHD-W (présent uniquement chez la femelle) chez différentes espèces d'oiseaux.
- Chaque PCR a donc été réalisée grâce à un couple d'amorces sens (-s) et anti-sens (-as) s'hybridant spécifiquement à une séquence du gène CHD-Z et/ou CHD-W.
- Les amorces ont été commandées à la société EUROGENTEC S.A. et reçues sous forme lyophilisée accompagnée d'une fiche technique mentionnant la méthode de mise en solution.

a. Amorces extraites de la littérature et modifiées

Ces amorces sont CHDs1 (amorce sens) et CHDs2 (amorce anti-sens). Leur séquence, issue d'une modification des amorces P2 et P8 (tableau VI) utilisées par Griffiths et son équipe (GRIFFITHS et al., 1998), est confidentielle (tableau XI).

Tableau XI : Amorces CHDs1 et CHDas2 conçues par modification d'amorces publiées. (T_m °C : température de fusion en degrés Celsius)

<i>Locus</i>	<i>Amorces CHD (T_m°C)</i>	
CHDZ et	s1 : Séquence confidentielle	(60)
CHDW	as2 : Séquence confidentielle	(60)

b. Amorces mises au point

Ces amorces sont CHDs3 (amorce sens), CHDas4 et CHDas6 (amorces anti-sens). Les séquences de ces amorces sont confidentielles (tableau XII).

Tableau XII : Amorces mises au point. (T_m °C : température de fusion en degrés Celsius)

Locus	Amorces CHD (T_m °C)	
CHDW (intron 21)	s3 : Séquence confidentielle	(64)
CHDZ et CHDW	as4 : Séquence confidentielle	(62)
	as6 : Séquence confidentielle	(62)

C. Autres matériels de PCR et d'analyse de résultats

1. Les réactifs

Les réactifs sont indiqués en annexe 1.

La Red Taq polymérase, les dNTP, l'ADN extrait, les ladders 100pb et le tampon de charge ont été conservés à -20°C et remis à température ambiante avant leur utilisation.

Les kits d'extraction ont été conservés à température ambiante.

2. Le thermocycleur (Annexe 2)

- Le thermocycleur utilisé pour réaliser les PCR est un MWG-BIOTECH Primus 96®.
- Le thermocycleur utilisé pour réaliser les PCR à gradient de température est un Thermocycleur AVISO® avec gradient de BIOTECH.

3. Matériel d'analyse des produits amplifiés (Annexe 2)

- La migration des fragments a été réalisée dans un gel d'agarose à 3% additionné de bromure d'éthidium, dans une cuve d'électrophorèse Mupid-2® EUROGENTEC.
- Les fragments, après migration, ont été visualisés au moyen d'une table à rayonnement ultraviolet puis photographiés avec un appareil photographique argentique de marque POLAROÏD.
- Enfin les photographies ont été numérisées (Photosmart C4480® de HEWLETT PACKARD) puis traitées au moyen d'un logiciel de traitement d'image (MICROSOFT Office Picture Manager®).

II. Méthode

A. Définition des amorces

- Leurs séquences ont été définies en s'assurant de la parfaite complémentarité avec les séquences cibles à disposition bien qu'un défaut de complémentarité d'une ou deux paires de bases inhérent aux différences dans la séquence des gènes entre les différentes espèces testées ne perturbe pas l'hybridation dans les conditions utilisées.
- Nous nous sommes fixés la contrainte pour les couples CHDs3 / CHDas2, CHDs3 / CHDas4 et CHDs3 / CHDas6 d'obtenir un fragment amplifié chez la femelle et aucun chez le mâle.

1. Spécificité théorique des amorces

Des alignements de séquences d'une portion des gènes CHD-Z et CHD-W, centrée sur l'intron numéro 21, de différentes espèces d'oiseaux (Diamant mandarin, Aigle Jean le blanc, Ara d'Illiger, Ara de Spix, perruche Omnicolore, Cygne tuberculé et Poule domestique) ont été réalisés dans un premier temps et ont permis de mettre en évidence une grande homologie de séquence. Les amorces ont alors été définies sur les régions consensus à partir des alignements des séquences de perruche omnicolore, de ara de Spix, de ara d'Illiger et de poule.

Dans un second temps, nous avons utilisé, lors de la conception des amorces, le logiciel Amplify® à partir de portions de séquence du gène cible chez différentes espèces à disposition. Ce logiciel permet de vérifier la spécificité d'hybridation de nos amorces avec la séquence cible et de simuler des amplifications à partir des amorces dont la séquence a été définie. Il analyse les différentes combinaisons possibles entre les oligonucléotides créés et détermine quelles régions du gène sont amplifiées. Ceci ne garantit la spécificité des amorces que par rapport à la séquence du gène étudié et n'assure donc pas de l'absence d'éventuelles hybridations non désirées avec d'autres séquences du génome lors de la réalisation des PCR.

2. Présentation des amorces

a. Modification des amorces de Griffiths et son équipe

Les amorces P2 et P8 de l'étude de Griffiths et son équipe (GRIFFITHS et al., 1998) ont été testées à l'aide du logiciel Amplify®. Du fait de l'obtention de bandes non spécifiques, elles ont été modifiées et nommées CHDs1 et CHDas2.

b. Nouvelles amorces

A partir des alignements de séquences, et dans les portions du gène présentant les plus grandes homologies, les amorces sens (CHDs3), et anti-sens (CHDas4 et CHDas6) ont été mises au point.

La taille approximative des fragments amplifiés a également été déterminée à partir de ces alignements

i. CHDs3

Cette amorce se fixe spécifiquement sur l'intron du gène CHD-W. Ne se fixant pas sur le gène CHD-Z, elle est donc spécifique du chromosome W. Aucun produit d'amplification ne doit donc être obtenu à partir d'extrait d'ADN issu de perroquets mâles.

La position de cette amorce sur le gène est indiquée sur la figure 33.

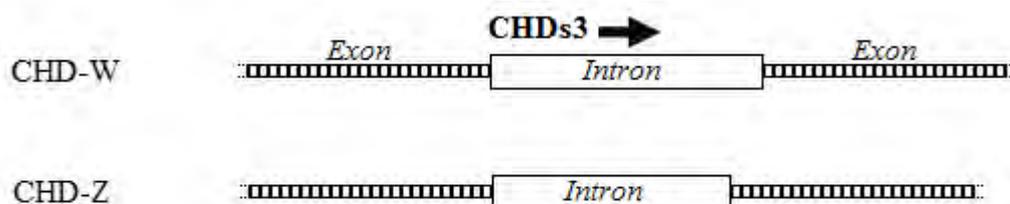


Figure 33 : Représentation des gènes CHD-W et CHD-Z et fixation de l'amorce sens CHDs3 sur l'intron du gène CHD-W (CHDs3 ne se fixe pas sur l'intron du gène CHD-Z).

ii. CHDas4 et CHDas6

Ces deux amorces anti-sens se fixent sur l'exon situé en aval de l'intron numéro 21.

La position de ces amorces sur le gène est indiquée sur la figure 34.

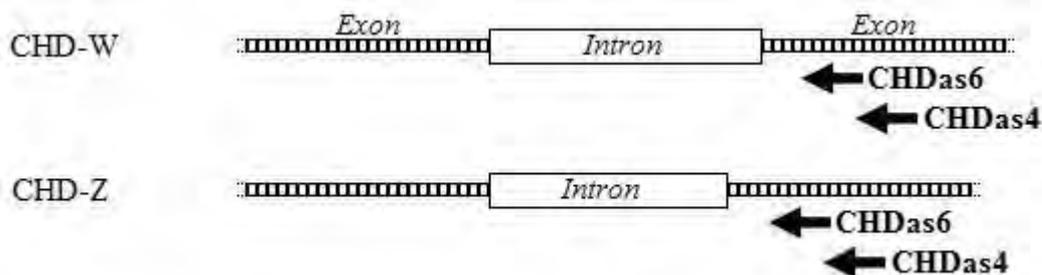


Figure 34 : Représentation des gènes CHD-W et CHD-Z et fixation des amorces anti-sens CHDas4 et CHDas6 sur l'exon situé en aval de l'intron numéro 21.

c. Taille des fragments amplifiés

La taille approximative des fragments amplifiés a été déterminée à partir des séquences du gène CHD-Z et CHD-W de certaines espèces à disposition et du logiciel Amplify®. Les différentes tailles attendues sont indiquées dans le tableau XIII.

Tableau XIII : Taille des fragments amplifiés attendus avec les différents couples d'amorces.

		Amorces anti-sens		
		CHDas2	CHDas4	CHDas6
Tm °C		60	62	62
Amorces sens	CHDs1	Z : ~346 pb W : ~363 pb <u>Mâle (ZZ)</u> : 1 signal ~346pb <u>Femelle (ZW)</u> : 2 signaux ~346 et ~363pb	Z : 308 pb W : 325 pb <u>Mâle (ZZ)</u> : 1 signal ~308pb <u>Femelle (ZW)</u> : 2 signaux ~308 et ~325pb	
	CHDs3	W : 281 pb <u>Mâle (ZZ)</u> : aucun signal <u>Femelle (ZW)</u> : 1 signal ~281pb	W : 219 pb <u>Mâle (ZZ)</u> : aucun signal <u>Femelle (ZW)</u> : 1 signal ~219pb	W : 215 pb <u>Mâle (ZZ)</u> : aucun signal <u>Femelle (ZW)</u> : 1 signal ~215pb

Les couples d'amorces CHDs1 / CHDas2 et CHDs1 / CHDas4 ont été choisis de telle sorte que la taille des fragments amplifiés obtenus soit différentes entre le gène CHD-Z et CHD-W.

La longueur attendue des différents fragments est une longueur approximative déterminée chez l'espèce *Gallus gallus*, ou bien chez une espèce de perruche ou perroquet en particulier. Nous n'avons pas pu déterminer les longueurs exactes car nous n'avons pas les séquences complètes des deux gènes chez toutes nos espèces d'intérêt. Ceci n'est pas gênant puisque le gène est relativement bien conservé au sein de la classe des Oiseaux.

Les figures 35 et 36 illustrent les emplacements des différentes amorces sur les gènes CHD-W et CHD-Z ainsi que la taille des fragments attendus.

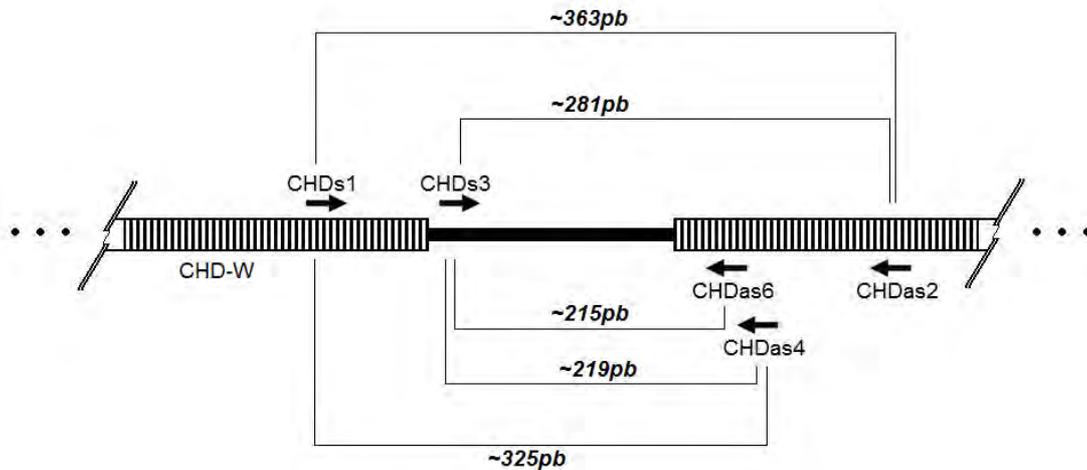


Figure 35 : Emplacement des différentes amorces sur le gène CHD-W et taille des fragments attendus (en ligne pleine : intron / en hachuré : exons).

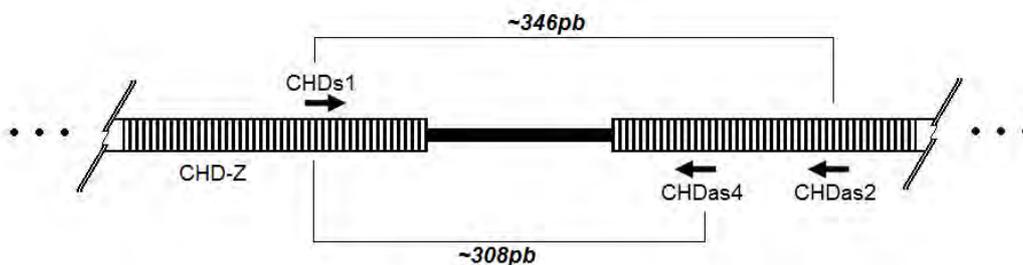


Figure 36 : Emplacement des différentes amorces sur le gène CHD-Z et taille des fragments attendus (en ligne pleine : intron / en hachuré : exons).

3. Préparation des solutions d'amorces

Pour chaque amorce, une solution mère de concentration 0,5mM a été préparée en ajoutant de l'eau ultra pure au lyophilisat reçu. Ensuite, des solutions filles de concentration 10 μ M ont été préparées à partir de la solution mère. Toutes ces solutions ont été conservées à -20°C. Cette méthode a permis d'éviter les trop nombreuses phases de congélation/décongélation qui auraient pu altérer la qualité des amorces.

4. Détermination des températures de fusion et d'hybridation

Les températures de fusion sont calculées en fonction de la séquence nucléotidique : chaque base guanine et cytosine apporte 4°C, tandis que chaque base adénine et thymine apporte 2°C.

La température d'hybridation est généralement de 5 à 10°C inférieure à la température de fusion moyenne des amorces.

B. Prélèvements et extraction de l'ADN

1. Traitement de l'échantillon de rein de poule

Les échantillons de muscle, de rein et d'ovaire d'environ un centimètre cube ont été découpés sur une même carcasse de poulet femelle, et directement placés dans des tubes de prélèvement afin d'être conservés à 4°C avant leur traitement.

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée sur un fragment de 30mg de rein, à l'aide du kit d'extraction manuelle NucleoSpin® Tissue en suivant les instructions du fournisseur (Annexe 3).

2. Traitement des plumes

a. Prélèvement et stockage

Les plumes appartenant à un même individu ont été arrachées à la main, au niveau de la poitrine ou de la base du cou de l'oiseau, et immédiatement placées, après vérification de la présence du bulbe et sans toucher à celui-ci, dans une enveloppe en papier ou un tube de prélèvement stérile (afin d'éviter toute contamination) portant le nombre de plumes prélevées, l'espèce et le sexe. Afin d'éviter tout stress excessif chez l'oiseau, les plumes ont été arrachées une par une, en évitant l'apparition de sang à la base de celle-ci.

Chaque lot de plumes a ensuite été stocké dans leur étui à 4°C avant l'extraction d'ADN.

b. Récupération des bulbes

L'ADN génomique a été isolé à partir de la pulpe contenue dans le bulbe des plumes. Ce bulbe, dont la taille varie de 1 à 5 millimètres selon la taille de la plume et la zone anatomique de l'oiseau dont elle provient, a été repéré au bout du calamus (figure 37), puis coupé et récupéré dans un tube eppendorf de 1,5 millilitres (figure 38) juste avant chaque

extraction. Le nombre de bulbes utilisés pour chaque espèce et à chaque extraction a varié de 1 à 5 en fonction du nombre de plumes à disposition.

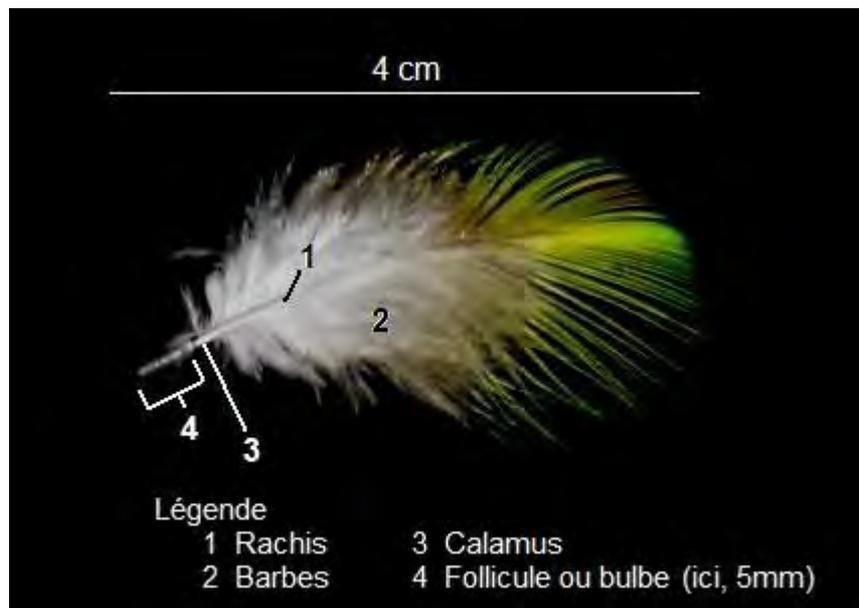


Figure 37 : Plume de couverture de Youyou du Sénégal (*Poicephalus senegalus*) prélevée sur la poitrine. Le bulbe, situé à l'extrémité du calamus, mesure ici 5mm. (Photo Yannick Lambert)

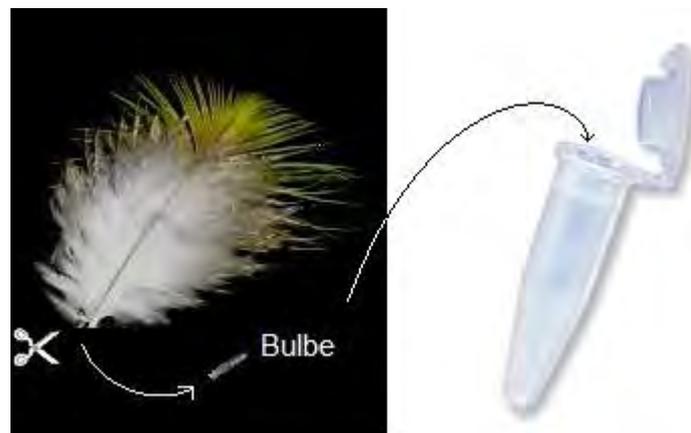


Figure 38 : Séparation et récupération du bulbe contenant l'ADN génomique. (Photo Yannick Lambert)

c. Extraction manuelle / semi-automatisée

L'étape suivante a consisté en l'extraction de l'ADN génomique de la pulpe des plumes. Deux méthodes d'extraction ont été utilisées, manuelle et semi-automatisée. Quelque soit la technique, le principe est sensiblement le même et comprend quatre grandes étapes : la lyse des cellules, la dégradation des protéines libérées, la séparation des acides nucléiques des autres composants et la purification de l'ADN.

i. Extraction manuelle

Les étapes de ce protocole se sont faites selon les instructions du fournisseur du kit d'extraction *NucleoSpin Tissue*®, de MACHEREY-NAGEL (dont le volume des différents réactifs a été adapté au traitement de 3 à 5 bulbes de plumes) et de son homologue *NucleoSpin Tissue XS*®, de MACHEREY-NAGEL (adapté au traitement de 1 à 2 bulbes de plumes (Annexe 4). Le protocole choisi comme le plus judicieux a été celui correspondant à l'extraction à partir de la queue de rat.

Les volumes des différents réactifs sont indiqués dans le tableau XIV.

Cette méthode d'extraction passe par une étape de lyse cellulaire grâce à la protéinase K, et une dégradation des protéines susceptibles d'inhiber l'action de l'enzyme Taq-polymérase. Se déroule ensuite l'adsorption de l'ADN sur un gel de silice. Une série de lavages permet alors d'éliminer les contaminants et de purifier l'ADN. Ce dernier subit enfin une étape d'éluion afin d'être solubilisé (Annexe 4).

Tableau XIV : Adaptation des volumes des différents réactifs des kits d'extraction manuelle utilisés au traitement de bulbes de plumes

Traitement pré-extraction :	1 à 2 plumes	3 à 5 plumes
<u>Pré-lyse sur la nuit</u>		
Tampon de pré-lyse T1	80µl	180µl
Protéinase K	8µl	25µl
<u>Extraction</u>		
Tampon de lyse B3	80µl	200µl
Ethanol absolu	80µl	210µl
Tampon BW	50µl	500µl
Tampon B5	50µl	600µl
Tampon d'éluion BE	15 ou 20µl	100µl

ii. Extraction semi-automatisée

Les étapes de ce protocole se sont faites selon les recommandations du fournisseur de kits d'extraction automatisée (Magnesil® KF Genomic System, PROMEGA), et à l'aide d'un automate (King Fisher®). L'extraction est dite « semi-automatisée » (ou « semi-automatique ») car une étape préalable de lyse a été effectuée, et les différents réactifs ont été ajoutés de manière manuelle. Le programme choisi comme le plus judicieux a été celui de l'extraction à partir du lait. La mise au point a consisté en un ajustement du volume de

certain réactifs. Deux volumes différents de particules magnétiques ont donc été testés (100µl et 200µl). En outre, la dernière étape de ce protocole consistait en une élution dans de l'eau (Nuclease free water ou NFW) dont nous avons fait varier le volume de 100 à 50µl afin d'améliorer le signal final des PCR (Annexe 5)

C. Amplification

1. Préparation du mélange réactionnel

Le milieu réactionnel (Annexe 1), couramment dénommé "mix", est un mélange précis de réactifs qui permettent l'amplification de l'ADN. Il s'agit d'une solution aqueuse tamponnée dans laquelle sont ajoutés les composants nécessaires à la synthèse nucléotidique et dont l'optimisation est obligatoire pour obtenir les meilleures conditions d'utilisation de la PCR. Sont ainsi incorporés les dNTP, l'enzyme thermostable Taq polymérase assurant la polymérisation et les amorces sens et anti-sens spécifiques à tester. Le mix contient également du MgCl₂ dont la concentration participe à établir le degré de stringence du milieu. Le MgCl₂ permet de former des complexes solubles avec l'ADN reconnu par l'enzyme de polymérisation. Plus la concentration en MgCl₂ augmente, plus les hybridations non-spécifiques sont susceptibles de se produire. Une mise au point se justifiait donc en fonction du degré de stringence exigé. La concentration a été fixée à 1mM, 1,5mM ou 2mM suivant les cas.

Ce mélange a été préparé sous une hotte à flux laminaire, dans un même tube eppendorf puis réparti dans chaque tube PCR. Les volumes des réactifs ont été calculés en fonction de la concentration des solutions mères et de la concentration souhaitée dans le mélange.

Les volumes et concentrations utilisés pour différents volumes d'extrait d'ADN pour un volume final total de 20µl, sont résumés dans les tableaux XV, XVI et XVII.

- Pour une concentration finale en MgCl₂ de 1mM :

Tableau XV : Concentrations et volumes utilisés pour une concentration finale en MgCl₂ de 1mM et un volume d'extrait d'ADN de 1µl (volume total de 20µl).

Concentration de la solution mère	Concentration de la solution finale	Volume pour un échantillon en µl
H ₂ O	qsp 20 µl	13,6
Tampon 10X	1X	2
MgCl₂ 25 mM	1 mM	0,8
dNTP 10 mM	200 µM	0,4
Amorce sens 10 µM	0,4 µM	0,8
Amorce anti-sens 10 µM	0,4 µM	0,8
Taq-polymérase 1 U/µL	0,03 U/µl	0,6

- Pour une concentration finale en MgCl₂ de 1,5mM :

Tableau XVI : Concentrations et volumes utilisés pour une concentration finale en MgCl₂ de 1,5mM et un volume d'extrait d'ADN de 1µl (volume total de 20µl).

Concentration de la solution mère	Concentration de la solution finale	Volume pour un échantillon en µl
H ₂ O	qsp 20 µl	13,2
Tampon 10X	1X	2
MgCl₂ 25 mM	1,5 mM	1,2
dNTP 10 mM	200 µM	0,4
Amorce sens 10 µM	0,4 µM	0,8
Amorce anti-sens 10 µM	0,4 µM	0,8
Taq-polymérase 1 U/µL	0,03 U/µl	0,6

- Pour une concentration finale en MgCl₂ de 2mM :

Tableau XVII : Concentrations et volumes utilisés pour une concentration finale en MgCl₂ de 2mM et un volume d'extrait d'ADN de 1µl (volume total de 20µl).

Concentration de la solution mère	Concentration de la solution finale	Volume pour un échantillon en µl
H ₂ O	qsp 20 µl	12,8
Tampon 10X	1X	2
MgCl₂ 25 mM	2 mM	1,6
dNTP 10 mM	200 µM	0,4
Amorce sens 10 µM	0,4 µM	0,8
Amorce anti-sens 10 µM	0,4 µM	0,8
Taq-polymérase 1 U/µL	0,03 U/µl	0,6

2. Addition de l'extrait d'ADN

Les extraits d'ADN sont les derniers composants incorporés au mélange réactionnel, en dehors de la hotte à flux laminaire.

Lors des différents tests, les extraits congelés à -20°C après l'étape d'extraction ont été décongelés avant chaque PCR.

a. Variation du volume d'extrait d'ADN incorporé au mélange réactionnel

Le volume d'extrait d'ADN ajouté a varié. Selon les conditions expérimentales testées 1µl, 2µl, 3µl ou 5µl (dans un but de moduler l'intensité des signaux à l'issue des PCR) ont été ajoutés au mélange. Le volume d'eau ajouté au mélange réactionnel a été ajusté en fonction du volume d'ADN extrait afin de respecter un volume total de solution finale de 20µl.

b. Réalisation du témoin négatif

Un témoin négatif, constitué par la substitution du volume d'extrait d'ADN par un même volume d'eau stérile, a été réalisé pour chaque PCR afin de s'assurer de l'absence de contamination des milieux réactionnels.

c. Réalisation du témoin positif

Un témoin positif, constitué par la substitution du volume d'extrait d'ADN par un même volume d'extrait d'ADN de bulbe de plume d'une espèce pour laquelle on est sûr que les amorces fonctionnent, a été réalisé pour la plupart des PCR afin de s'assurer de l'efficacité du programme d'amplification. Pour certaines PCR, l'ADN de poule (*Gallus gallus*) a été utilisé. Pour d'autres, le témoin positif choisi contenait l'ADN d'*Eclectus* femelle.

Le tableau XVIII est un récapitulatif des amorces testées pour l'espèce *gallus* et chaque espèce de perruches et perroquets (les conditions expérimentales, prise d'ADN, MgCl₂ et température, n'étant pas pris en compte)

Tableau XVIII : Récapitulatif des amorces testées pour chaque espèce

Non vulgaire	Sexe	CHDs1 / CHDas2	CHDs3 / CHDas2	CHDs3 / CHDas4	CHDs3 / CHDas6	CHDs1 / CHDas4
Perruche Calopsitte	Mâle	x		x		x
-	Femelle	x		x		x
Perruche Kakariki	Mâle	x		x		x
-	Femelle	x		x		x
Perruche Princesse de Galles	Mâle	x		x		x
-	Femelle	x		x		x
Perruche de Barnard	Mâle	x		x		x
-	Femelle	x		x		x
Perruche de Pennant	Mâle	x		x		x
-	Femelle	x		x		x
Perruche à collier	Mâle	x	x	x	x	x
-	Femelle	x	x	x	x	x
Amazone de Finsch	Mâle	x	x		x	x
-	Femelle	x	x		x	x
Amazone à ailes oranges	Femelle	x				x
Ara à collier d'or	Mâle	x	x		x	x
-	Femelle	x	x		x	x
Cacatoès des Moluques	Mâle	x				x
Cacatoès Rosalbin	Femelle	x				x
Eclectus	Mâle	x	x	x	x	x
-	Femelle	x	x	x	x	x
Gris du Gabon	Femelle	x				x
Pione à tête bleue	Mâle	x				x
Youyou du Sénégal	(?)	x	x		x	x
Poule	Femelle	x	x	x	x	x
Coq	Mâle	x	x			

3. Amplification (thermocycleur)

La succession des cycles d'amplification s'est faite en suivant la programmation du thermocycleur définie par l'opérateur.

a. Définition de la température d'hybridation

Afin de déterminer la température d'hybridation, il convient au préalable de calculer la température de fusion moyenne (T_m) des amorces utilisées, qui dépend de la séquence nucléotidique de celles-ci. Chaque base guanine (G) et cytosine (C) apporte 4°C, chaque base adénine (A) et thymine (T) apporte 2°C.

On utilise la formule :

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

La température d'hybridation (T_h) est un paramètre variable calculé en fonction de la température de fusion des amorces. Elle est en général inférieure de 5 à 10°C à la moyenne des températures de fusion des amorces. Elle a pu être modifiée selon le niveau de stringence désiré et la qualité obtenue des résultats.

b. Détermination de la température d'hybridation (Stringence)

La température d'hybridation participe, avec la concentration en $MgCl_2$, à établir le degré de stringence du milieu.

Plus la température d'hybridation est haute, plus le risque d'obtenir des hybridations non spécifiques est faible. La stringence du milieu augmente avec la température. Un ajustement de la température d'hybridation pour trouver la température optimale est donc nécessaire et se fait en fonction des résultats obtenus, c'est à dire de la présence ou non d'hybridations non-spécifiques et de l'intensité du signal spécifique.

c. Programme d'amplification

Les PCR réalisées pour les différents couples d'amorces ont été effectuées avec 45 cycles d'amplification. Chaque cycle étant défini par des températures de dénaturation, d'hybridation et d'élongation prédéfinies.

Les mélanges réactionnels ont été déposés dans le thermocycleur dont le programme consistait en :

- Une phase de dénaturation initiale de 3 minutes à 94°C ;
- 45 cycles de trois étapes :

Une première étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes ;

Une deuxième étape d'hybridation des amorces à la température d'hybridation (Th) choisie, pendant 45 secondes ;

Une troisième étape d'élongation à 72°C pendant 45 secondes ;

- Une étape finale d'élongation à 72°C pendant 10 minutes ;
- Une étape de conservation à 8°C si l'électrophorèse est décalée dans le temps.

Programme d'amplification :

94°C 3 minutes	45 cycles
94°C 30 secondes	
Th°C 45 secondes	
72°C 45 secondes	
72°C 10 minutes	
8°C forever	

d. Variations des constantes d'amplification

Pour l'ensemble des PCR, la température d'hybridation a été fixée entre 55°C et 59°C. Certaines mises au point ont nécessité l'utilisation de PCR à gradient avec notamment les gammes de températures suivantes :

- 56°C ± 2°C
- 55-56-57-58°C
- 56-57-58°C
- 57-58°C

4. Analyse par électrophorèse des produits amplifiés

L'analyse des produits amplifiés s'est faite grâce à la technique de migration par électrophorèse sur gel d'agarose.

a. Électrophorèse

i. Gel d'électrophorèse

La préparation du gel a consisté en la dissolution de 3g d'agarose solide dans 100ml d'une solution de tampon TBE 0,5X (tris-borate-EDTA) contenant 0,5µg/ml de bromure d'éthidium nécessaire à la révélation des fragments amplifiés (le bromure d'éthidium est un

agent capable de se fixer sur la molécule d'ADN et qui, une fois exposé à des rayonnements ultra-violet, révèle les produits amplifiés par fluorescence). Le mélange obtenu a ensuite été porté à ébullition puis immédiatement coulé dans un moule spécifique avec un "peigne" assurant la formation des puits dans lesquels ont été déposés les différents échantillons après amplification. Le gel se polymérise une fois la température inférieure à 40°C environ.

ii. Tampon d'électrophorèse

Une fois solidifié, le gel a été extrait du moule puis placé dans une cuve d'électrophorèse et recouvert d'une solution tampon de migration TBE 0,5X contenant une concentration finale de 0,5µg/ml de bromure d'éthidium.

iii. Dépôt

Les produits amplifiés ont été déposés dans les puits (à raison de 9µl par puits) en suivant scrupuleusement l'ordre défini par un plan de dépôt. Le volume restant de chaque échantillon a été conservé à -20°C.

Chaque électrophorèse a été réalisée avec 5µl de ladder 100 paires de bases (avec double bande à 800 paires de bases et coloré au bleu de bromophénol) déposé dans un puits. Le ladder 100 a permis l'étalonnage du gel toutes les 100 paires de bases et ainsi d'estimer la taille des fragments amplifiés après l'étape de migration.

iv. Migration

Un courant électrique continu de 100 Volts alimentant la cuve a permis d'obtenir la migration en 40 minutes environ. Lors de cette étape, l'ADN, chargé négativement, migre du pôle négatif (puits) au pôle positif (autre extrémité du gel). Les fragments de petite taille migrent plus loin que les fragments de grosse taille du fait du poids moléculaire plus élevé.

b. Photographie

Le gel d'électrophorèse a ensuite été placé dans une chambre noire sous un rayonnement ultra-violet. Les fragments ont été révélés grâce au bromure d'éthidium sous forme de bandes fluorescentes orangées. Une photographie de chaque gel a été réalisée afin de pouvoir analyser les résultats ultérieurement.

5. Suivi des bonnes pratiques de laboratoire

a. Risques de contamination des échantillons et prévention

i. Définition des risques

Dans le laboratoire, il existe plusieurs sources d'aérosols d'ADN susceptibles de contaminer les nouveaux échantillons et donc d'aboutir à des faux positifs. Il est donc important de connaître les points critiques tout au long de l'enchaînement des étapes expérimentales afin de prévenir les éventuelles contaminations. Les différentes étapes que sont la phase de prélèvement, l'extraction d'ADN, la préparation des MIX, l'amplification et la révélation peuvent toutes être des phases de contamination potentielle.

ii. Prévention des risques

➤ La rigueur lors des prélèvements

Les prélèvements de plumes ont été faits de manière propre, en prenant garde de ne pas toucher directement le bulbe avec les doigts. Une fois prélevées, celles-ci ont été immédiatement placées dans un tube de prélèvement ou une enveloppe en papier non souillée.

Afin de ne pas mélanger les plumes d'individus différents, il a fallu faire attention à réaliser les prélèvements l'un après l'autre et veiller à noter sur chaque conditionnement l'identité précise de l'oiseau.

➤ L'adaptation des locaux

Les locaux doivent permettre une séparation des étapes, dans le temps mais aussi dans l'espace et permettre le principe de marche en avant.

Le principe de marche en avant est défini par le fait qu'un échantillon ne doit pas revenir à une étape après l'avoir quittée. Il entre d'un côté du laboratoire et en ressort modifié de l'autre côté.

La séparation des étapes consiste à utiliser, idéalement, une pièce par étape de PCR. Il y a une pièce de stockage des prélèvements, une d'extraction, une pour la préparation du MIX et l'addition d'ADN, une pour l'amplification où se trouve le thermocycleur et une de révélation où se trouve la cuve à électrophorèse et une chambre noire pour permettre la révélation. Les étapes les plus cruciales sont la préparation des MIX et la révélation des fragments amplifiés : les deux pièces servant à ces étapes sont équipées d'un sas dans lequel le manipulateur change de blouse et de sabots et porte une charlotte. Le matériel nécessaire à chaque étape est dans la pièce qui lui est dédiée.

Après chaque manipulation, le plan de travail a été nettoyé à l'alcool.

➤ **La prévention lors de la préparation des MIX**

Plusieurs mesures ont été mises en œuvre pour éviter la contamination des MIX. Tout d'abord, les divers réactifs ont été aliquotés (dNTP, amorces, MgCl₂, eau Aguetant) : certains étaient à usage unique (MgCl₂, eau Aguetant) et d'autres étaient à usages multiples mais si une contamination était révélée, ils pouvaient être éliminés rapidement (le fait d'aliquoter permet de ne perdre qu'une petite quantité de produit si une contamination survient). Tous les éléments en contact avec les réactifs étaient à usage unique (cônes, tubes,...). Les micropipettes étaient à usage multiple mais les cônes étaient équipés de filtres pour éviter leur contamination. De plus, le mélange des réactifs s'est fait sous une hotte à flux laminaire, toujours pour éviter les contaminations. Il s'est fait dans un ordre bien précis et s'est terminé par l'ajout des amorces. L'ajout d'ADN ne s'est pas réalisé sous la hotte, toujours dans le même but. Cet ajout s'est fait avec une micropipette et des cônes réservés à cet effet.

➤ **Le contrôle des contaminations**

Pour chaque PCR, on a réalisé un témoin négatif dont le parcours était identique à celui des autres échantillons : ceci permettait de repérer immédiatement une éventuelle contamination.

➤ **Identification des échantillons**

Chaque réactif et chaque échantillon, tout au long des étapes, a été scrupuleusement identifié afin d'éviter les mélanges, sources d'erreurs. Une fois l'extraction d'ADN réalisée, un numéro d'extraction a été associé à l'échantillon (ex : 08-125 signifie 125^{ème} extraction de l'année 2008). Le numéro d'extraction suivait l'échantillon jusqu'aux résultats de la PCR.

b. Risques de manipulation des réactifs et prévention

Le personnel qui manipulait les réactifs était exposé aux risques de chaque réactif. En conséquence : chaque personne portait une blouse blanche et des sabots restant au laboratoire ; chaque manipulateur devait aussi porter des gants pour se protéger des différents tampons (certains lysent les cellules) et du bromure d'éthidium (qui est cancérigène). La protection contre les UV s'est faite derrière une vitre dans la chambre noire.

Les déchets ont été éliminés selon leur origine et leur degré de dangerosité.

6. Synthèse des PCR réalisées

Le Récapitulatif des conditions expérimentales testées pour chaque PCR est indiqué en annexe 6.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

Les résultats de la totalité des PCR réalisées sont présentés sous forme de tableaux et de figures (photographies des gels après électrophorèse) pour chacune des espèces testées. Les tableaux indiquent, pour chaque réaction, l'ensemble des conditions expérimentales que nous avons fait varier, ainsi que les renvois éventuels aux illustrations des résultats notables. Pour chaque couple d'amorces, le nombre de paramètres expérimentaux que l'on a fait varier est élevé. De plus, l'efficacité du sexage est lié à un facteur important : l'espèce. C'est pour ces deux raisons, ainsi que pour obtenir une meilleure lisibilité dans la synthèse des résultats, que nous avons choisi une présentation espèce par espèce plutôt que par couple d'amorces.

Pour certaines espèces (Eclectus, Poule et Coq) les sexes étaient connus de manière indiscutable du fait de leur fort dimorphisme sexuel. Le comportement du Youyou du Sénégal (de sexe inconnu) laissait présumer qu'il s'agissait d'un mâle.

Sous chaque bande d'électrophorèse figure un symbole « mâle » ou « femelle » seulement lorsque les signaux obtenus sont cohérents avec le sexe noté sur l'échantillon.

Les espèces sexées lors de notre étude sont présentées dans l'ordre suivant :

- I. Poule et Coq (tableau XIX et XX, figure 39) (sexes connus de manière certaine)
- II. Eclectus (tableau XXI, figure 40) (sexe connu de manière certaine)
- III. Amazone de Finsch (tableau XXII, figure 41)
- IV. Ara à collier d'or (tableau XXIII, figure 42)
- V. Amazone à ailes oranges (tableau XXIV, figure 43)
- VI. Gris du Gabon, Cacatoès Rosalbin, Pionne à tête bleue, Cacatoès des Moluques (tableau XXV, figure 44)
- VII. Perruche de Barnard (tableau XXVI, figure 45)
- VIII. Perruche de Pennant (tableau XXVII, figure 46)
- IX. Perruche Princesse de Galles (tableau XXVIII, figure 47)
- X. Perruche Kakariki (tableau XXIX, figure 48)
- XI. Perruche Calopsitte (tableau XXX, figure 49)
- XII. Perruche à collier (tableau XXXI, figure 50)
- XIII. Youyou du Sénégal (tableau XXXII, figure 51)

I. Résultats obtenus sur l'ADN de l'espèce *Gallus gallus*

Tableau XIX : Résultats obtenus à la suite de l'essai du couple d'amorce CHDs1 / CHDas2 sur l'ADN de poule (*Gallus gallus*) extrait à partir d'un fragment de rein.

		Extraction manuelle									
Espèce	Echantillon	Volume de tampon d'éluion	Amorces	T°C	MgCl2	Volume d'ADN extrait	Résultats attendus	Résultats obtenus	Figure n°		
Poule <i>Gallus gallus</i>	Fragment rein 30mg	100µl	CHDs1 / CHDas2	56°C	1mM	1µl	2 signaux Z = 346pb W = 363pb	2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)	-	-	
					1,5mM						
					2mM	2µl					
					1mM						
					1,5mM						
					2mM						

Tableau XX : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de poule et de coq (*Gallus gallus*) extrait à partir de plumes.

Espèce	Extraction				Amorces	T°C	MgCl2	Volume d'ADN extrait	Résultats attendus	Résultats obtenus	Figure n°								
	Nombre de plumes récoltées	Nombre de plumes utilisées	Manuelle	Semi automatique															
			Volume de tampon d'éluion	Volume de tampon de éluion															
Poule <i>Gallus gallus</i>	36	3	100µl		CHDs1 / CHDas2	55°C	2mM	2µl	2 signaux Z : 346pb W : 363pb	1 signal (faible) (CHD-Z)	-								
						56°C				1mM 1,5mM 2mM	1 signal W : 281pb	2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)	39a						
						57°C						1mM	Aucun signal	-	-				
						58°C								1 signal (faible) (CHD-Z)	-				
						56°C	1mM 1,5mM 2mM	2µl	1 signal W : 219pb			1 signal (intense) (CHD-W)	39l						
						56°C				1 signal (faible) (CHD-W)	-								
						58°C				1 signal (faible) (CHD-W)	-								
						58°C				1 signal (faible) (CHD-W)	-								
						36	5	100µl		CHDs3 / CHDas6	59°C	1mM 1,5mM 2mM	2µl	1 signal W : 215pb	Aucun signal	-			
											56°C				1mM 1,5mM 2mM	1 signal (moyen) (CHD-W)	39s		
																	2mM	1 signal (moyen) (CHD-Z)	-
																			2 signaux (faibles) (CHD-Z et CHD-W)
	2mM	2µl	2 signaux (faibles) (CHD-Z et CHD-W)	39c															
				2mM	2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)						39e								
											Aucun signal	-							
				Aucun signal	-														
	1	15µl			CHDs1 / CHDas4	55°C	1mM 1,5mM 2mM	2µl	2 signaux Z : 308pb W : 325pb	Aucun signal	-								
						56°C				1mM 1,5mM 2mM	Aucun signal	-							
												1mM	Aucun signal	-					
														58°C	1mM 1,5mM 2mM	1 signal non spécifique (< à 308pb)	39k		
56°C							1 signal non spécifique (< à 308pb)	-											
58°C						1 signal non spécifique (< à 308pb)	-												
58°C						1 signal non spécifique (< à 308pb)	-												

		Extraction											
Espèce	Nombre de plumes récoltées	Nombre de plumes utilisées	Manuelle		Semi automatique		Amorces	T°C	MgCl2	Volume d'ADM extrait	Résultats attendus	Résultats obtenus	Figure n°
			Volume de tampon d'éluotion	Volume de tampon d'éluotion	Volume de tampon d'éluotion	Volume de tampon d'éluotion							
Poule <i>Gallus gallus</i>	36	3	100µl	100µl	100µl	CHDs1 / CHDas2	56°C	2mM	2µl	2 signaux Z : 346pb W : 363pb	2 signaux (très faibles) (CHD-Z et CHD-W)	39b	
													100µl
	1mM	2 signaux (moyens) (CHD-Z et CHD-W)	-										
	1,5mM	2 signaux Z : 346pb W : 363pb	39d										
	2mM	2 signaux (moyens) (CHD-Z et CHD-W)	39f										
	Poule <i>Gallus gallus</i>	36	2	100µl	100µl	50µl	CHDs3 / CHDas2	56°C	2mM	2µl	1 signal W : 281pb	1 signal (moyen) (CHD-W)	39m
100µl													
		1mM	2 signaux (très faibles) (CHD-Z et CHD-W)	39g									
		1,5mM	2 signaux Z : 346pb W : 363pb	-									
		2mM	1 signal (faible) (CHD-Z)	-									
Cocq <i>Gallus gallus</i>		2	1	100µl	100µl	50µl	CHDs3 / CHDas2	56°C	2mM	2µl	1 signal W : 281pb	1 signal (intense) (CHD-W)	39n
	100µl												
		1mM	2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)	39h									
		1,5mM	2 signaux Z : 346pb W : 363pb	-									
		2mM	1 signal (moyen) (CHD-Z)	-									
	Cocq <i>Gallus gallus</i>	2	1	200µl	200µl	50µl	CHDs3 / CHDas2	56°C	2mM	2µl	Aucun signal	Aucun signal	39o
200µl													
		1mM	1 signal (intense) (CHD-Z)	39i									
		1,5mM	Aucun signal	39p									
		2mM	Aucun signal	-									
Cocq <i>Gallus gallus</i>		2	1	200µl	200µl	50µl	CHDs3 / CHDas2	56°C	2mM	2µl	1 signal 346pb	1 signal (intense) (CHD-Z)	39j
	200µl												
		1mM	Aucun signal	39p									
		1,5mM	Aucun signal	-									
		2mM	1 signal (intense) (CHD-Z)	39j									
	Cocq <i>Gallus gallus</i>	2	1	200µl	200µl	50µl	CHDs3 / CHDas2	56°C	2mM	2µl	1 signal 346pb	1 signal (intense) (CHD-Z)	39j
200µl													
		1mM	Aucun signal	39p									
		1,5mM	Aucun signal	-									
		2mM	1 signal (intense) (CHD-Z)	39j									

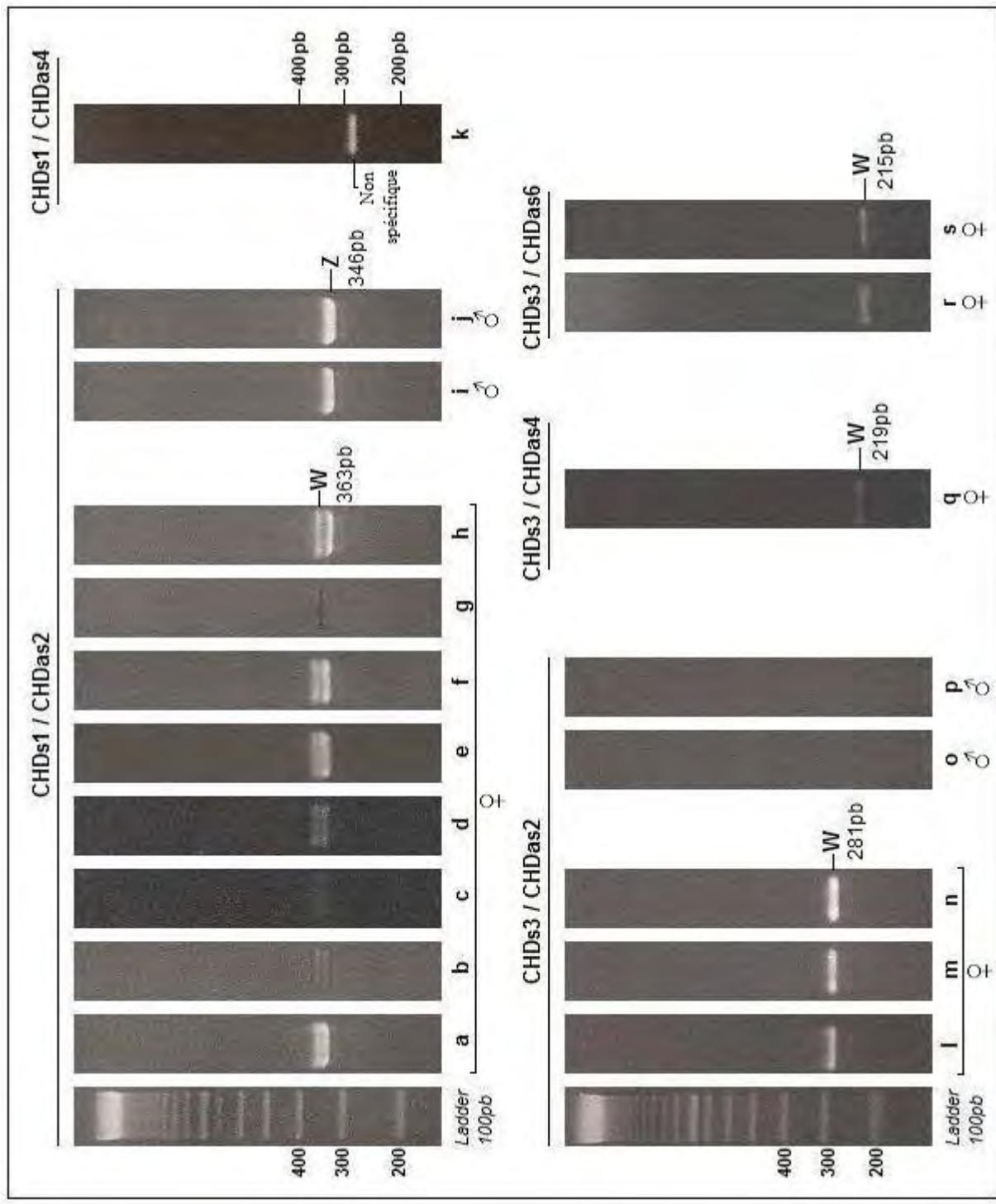


Figure 39 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de poule et de coq (*Gallus gallus*) (Voir tableau XX).

II. Résultats obtenus sur l'ADN d'*Eclectus*

Tableau XXI : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN d'*Eclectus roratus*.

Espèce de plumes récoltées	Nombre de plumes utilisées	Extraction		Amorces	T°C	MgCl2	Volume d'ADN extrait	Résultats attendus	Résultats obtenus	Figure n°			
		Manuelle	Semi automatique										
<i>Eclectus mâle</i>	2		50µl	CHDs3 / CHDas2	56°C	1,5mM	2µl	Aucun signal	1 signal non spécifique entre 300 et 400pb (> 281pb) Aucun signal	40a			
				CHDs3 / CHDas4	56°C	1mM	2µl	Aucun signal	1 signal non spécifique entre 200 et 300pb (>219pb) Aucun signal	-			
	58°C				1,5mM	1µl	Aucun signal	1 signal non spécifique entre 200 et 300pb (>219pb) Aucun signal	-				
	55°C				2mM		Aucun signal	1 signal non spécifique entre 200 et 300pb (>219pb) Aucun signal	-				
	CHDs3 / CHDas6			56°C	1mM	1µl	Aucun signal	1 signal non spécifique entre 200 et 300pb (>219pb) Aucun signal	-				
				57°C	1,5mM	1µl	Aucun signal	1 signal non spécifique entre 200 et 300pb (>219pb) Aucun signal	40c				
				58°C	2mM		Aucun signal	1 signal non spécifique entre 200 et 300pb (>219pb) Aucun signal	-				
	CHDs1 / CHDas2			1	200µl	50µl	CHDs3 / CHDas6	58°C	1,5mM	2µl	Aucun signal	Aucun signal	40g
							CHDs1 / CHDas2	55°C		3µl	1 signal (très faible) (CHD-Z)	-	
								56°C	2mM		1 signal (intense) (CHD-Z)	40i	
								57°C			1 signal (très faible) (CHD-Z)	-	
	58°C				1 signal (moyen) (CHD-Z)	-							
	CHDs1 / CHDas2			1	200µl	50µl	CHDs1 / CHDas2	56°C	2mM	2µl	Aucun signal	1 signal (moyen) (CHD-Z)	40k
							58°C			1 signal (moyen) (CHD-Z)	-		

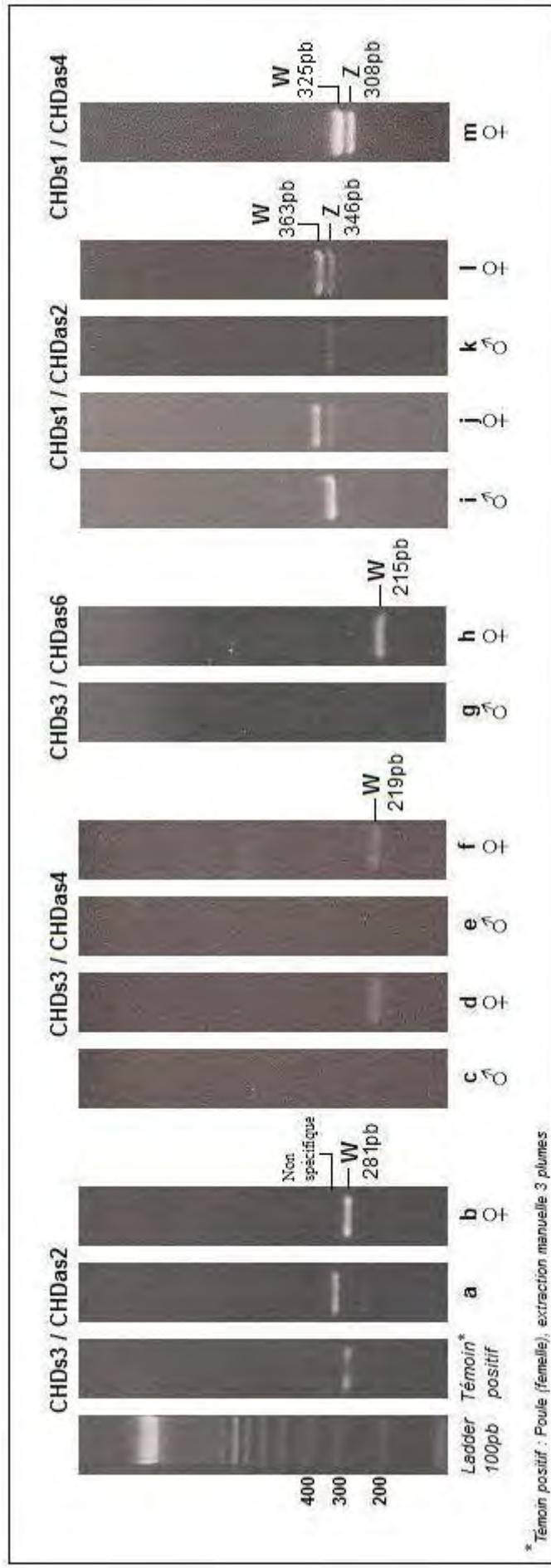


Figure 40 : Signaux obtenus à la suite de l'essai de différents couples d'amorces sur l'ADN d'*E. roratus* (voir tableau XXI).

III. Résultats obtenus sur l'ADN d'Amazone de Finsch

Tableau XXII : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN d'Amazone de Finsch (*Amazona finschii*).

Espèce	Nombre de plumes récoltées	Nombre de plumes utilisées	Extraction			Amorces	T°C	MgCl2	Volume d'ADN extrait	Résultats attendus	Résultats obtenus	Figure n°	
			Manuelle	Volume de tampon d'éluotion	Volume de microbilles								Semi automatique
Amazone de Finsch mâle	7	3	[hatched]	[hatched]	[hatched]	CHDs3 / CHDas2	56°C	1,5mM	2µl	Aucun signal	1 signal non spécifique entre 300 et 400pb	41a	
						CHDs3 / CHDas6	58°C	1,5mM	2µl	Aucun signal	1 signal non spécifique entre 200 et 300pb	41c	
						CHDs1 / CHDas2	56°C	2mM	2µl	<u>1</u> signal Z : 346pb	1 signal (moyen) (CHD-Z)	41e	
	[hatched]	[hatched]	[hatched]	[hatched]	[hatched]	CHDs1 / CHDas4	58°C	1,5mM	3µl	<u>1</u> signal Z : 308pb	1 signal (moyen) (CHD-Z)	41g	
						CHDs1 / CHDas4	58°C	1,5mM	2µl	<u>1</u> signal Z : 308pb	Défaut de migration	-	
						CHDs3 / CHDas2	56°C	1,5mM	2µl	<u>1</u> signal W : 281pb	1 signal (moyen) (CHD-W)	41b	
Amazone de Finsch femelle	[hatched]	[hatched]	[hatched]	[hatched]	[hatched]	CHDs3 / CHDas6	58°C	1,5mM	2µl	<u>1</u> signal W : 215pb	Aucun signal	41d	
						CHDs1 / CHDas2	56°C	2mM	2µl	<u>2</u> signaux Z : 346pb W : 363pb	2 signaux (moyens) (CHD-Z et CHD-W)	41f	
	[hatched]	[hatched]	[hatched]	[hatched]	[hatched]	[hatched]	CHDs1 / CHDas4	58°C	1,5mM	3µl	<u>2</u> signaux Z : 308pb W : 325pb	2 signaux (moyens) (CHD-Z et CHD-W)	41h
							CHDs1 / CHDas4	58°C	1,5mM	2µl	<u>2</u> signaux Z : 308pb W : 325pb	1 signal (très faible) (CHD-Z)	41i

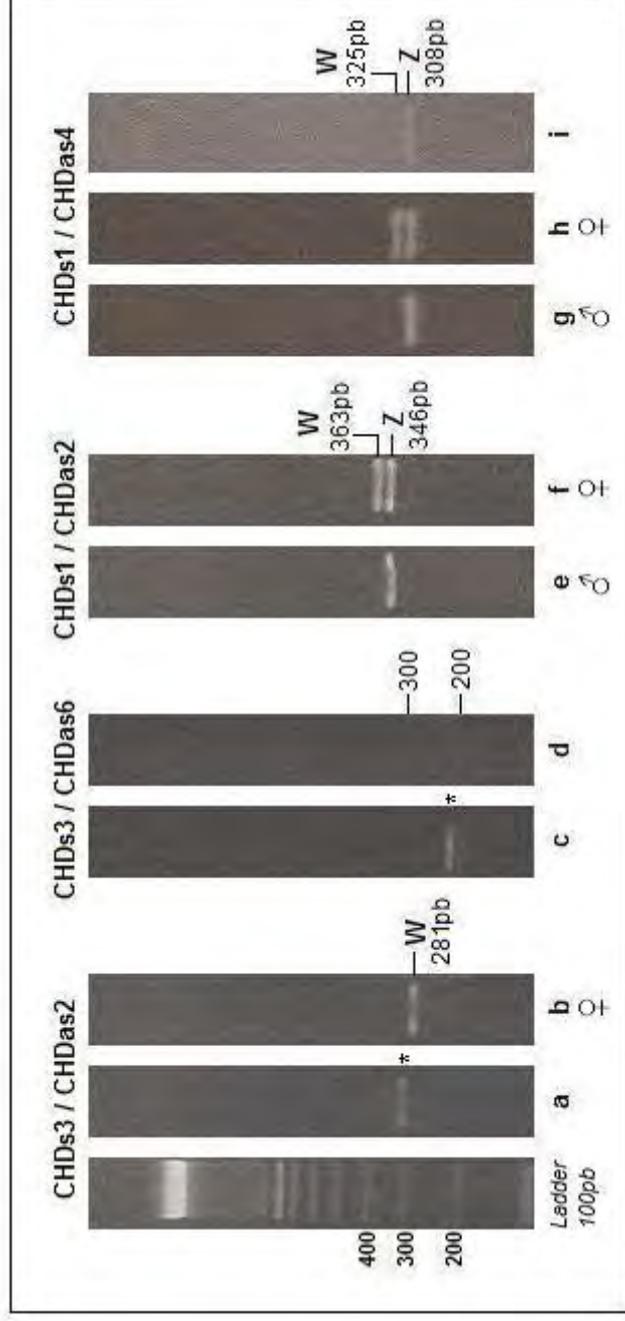


Figure 41 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN d'Amazona de Finsch (*Amazona finschii*) (voir tableau XXII). *Signal non spécifique

IV. Résultats obtenus sur l'ADN de Ara à collier d'or

Tableau XXIII : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de Ara à collier d'or (*Ara auricollis*).

Espèce	Nombre de plumes récoltées	Nombre de plumes de plumes utilisées	Extraction			Amorces	T°C	MgCl2	Volume d'ADN extrait	Résultats attendus	Résultats obtenus	Figure n°
			Manuelle	Semi automatique								
			Volume de tampon d'élué	Volume de microbilles	Volume de tampon d'élué							
Ara à collier d'or mâle	9	3	20µl	100µl	50µl	CHDs3 / CHDas2	56°C	1,5mM	2µl	Aucun signal	1 signal non spécifique entre 300 et 400pb	42a
							58°C	1,5mM 1mM	2µl	Aucun signal	Aucun signal	-
						CHDs3 / CHDas6	59°C	1,5mM 2mM	2µl	Aucun signal	1 signal non spécifique (faible) entre 200 et 300pb	42e
							55°C				Aucun signal	-
							56°C	2mM	3µl	1 signal	1 signal (intense) (CHD-Z)	-
							57°C			Z : 346pb	1 signal (intense) (CHD-Z)	42g
						CHDs1 / CHDas2	58°C				1 signal (faible) (CHD-Z)	-
							58°C	1,5mM	2µl	1 signal	1 signal (intense) (CHD-Z)	42i
							58°C	1,5mM	2µl	1 signal	1 signal (intense) (CHD-W)	42b
							58°C	1,5mM	2µl	W : 281pb	1 signal (intense) (CHD-W)	-
Ara à collier d'or femelle	6	3	20µl	100	50	CHDs3 / CHDas2	56°C	1,5mM	2µl	1 signal	1 signal (intense) (CHD-W)	42d
							58°C	1,5mM 1mM	2µl	1 signal	1 signal (intense) (CHD-W)	-
						CHDs3 / CHDas6	59°C	1,5mM 2mM	2µl	W : 215pb	1 signal (intense) (CHD-W)	42f
							55°C				1 signal (intense) (CHD-W)	-
							55°C				2 signaux (faibles) (CHD-Z et CHD-W)	-
							56°C	2mM	3µl	2 signaux	2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)	42h
						CHDs1 / CHDas2	57°C				2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)	-
							58°C				2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)	-
							58°C	1,5mM	2µl	2 signaux	2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)	42j
							58°C	1,5mM	2µl	Z : 308pb W : 325pb	2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)	-

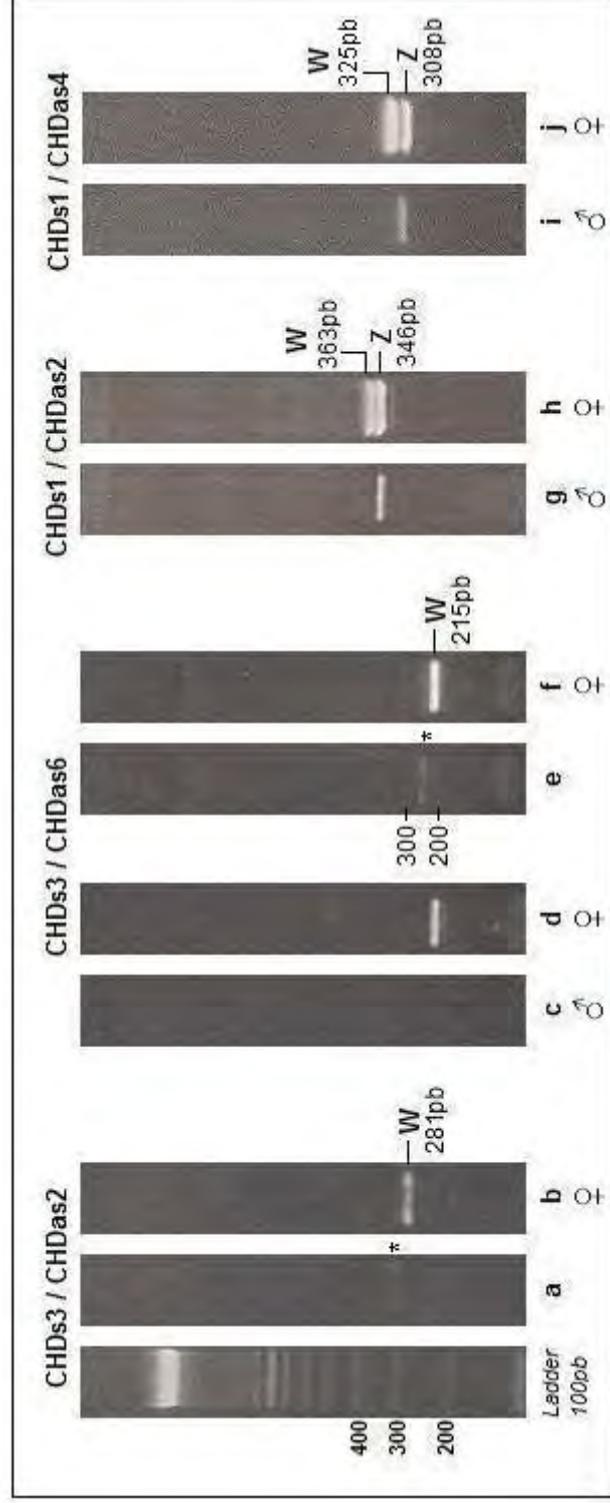


Figure 42 : Signaux obtenus à la suite de l'essai de l'amorces sur l'ADN de Ara à collier d'or (*Ara auricollis*) (voir tableau XXIII). *Signal non spécifique

V. Résultats obtenus sur l'ADN d'Amazone à ailes oranges

Tableau XXIV : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN d'Amazone à ailes oranges (*Amazona amazonica*).

Espèce	Nombre de plumes récoltées	Nombre de plumes utilisées	Extraction			Amorces	T°C	MgCl2	Volume d'ADN extrait	Résultats attendus	Résultats obtenus (Intensité du signal)	Figure n°
			Manuelle	Volume de tampon d'éluion	Volume de microbilles							
Amazone à ailes oranges femelle	5	1	[hatched]	[hatched]	200µl	CHDs1 / CHDas2	55°C	2mM	2µl	2 signaux Z : 346pb W : 363pb	1 signal (moyen) à 346pb (CHD-Z)	43a
							56°C				1 signal (intense) à 346pb (CHD-Z)	43b
							57°C				1 signal (moyen) à 346pb (CHD-Z)	43c
							58°C				1 signal (faible) à 346pb (CHD-Z)	43d
	2	[hatched]	[hatched]	20µl	CHDs1 / CHDas4	58°C	1,5mM	3µl	2 signaux Z : 308pb W : 325pb	1 signal (faible à moyen) à 308pb (CHD-Z)	43e	
						58°C	1,5mM	2µl	2 signaux Z : 308pb W : 325pb	1 signal (moyen) à 308pb (CHD-Z)	43f	

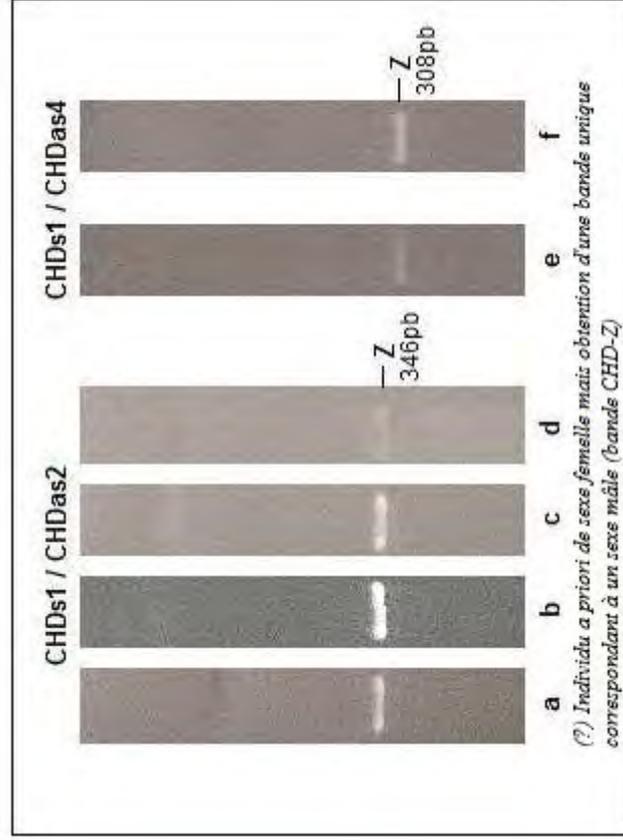


Figure 43 : Résultats obtenus à la suite de l'essai de différents couples d'amorces sur l'ADN d'Amazonie à ailes oranges (*Amazona amazonica*) (voir tableau XXIV).

VI. Résultats obtenus sur l'ADN de Perroquet Gris du Gabon, Cacatoès Rosalbin, Pione à tête bleue et Cacatoès des Moluques

Tableau XXV : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de Perroquet Gris du Gabon (*Psittacus erithacus*), Cacatoès rosalbin (*Cacatua roseicapilla*), Pione à tête bleue (*Pionus m. menstruus*) et Cacatoès des Moluques (*Cacatua moluccensis*).

Espèce	Nombre de plumes récoltées	Nombre de plumes utilisées	Extraction		Amorces	T°C	MgCl2	Volume d'ADN extrait	Résultats attendus	Résultats obtenus (Intensité du signal)	Figure n°
			Manuelle	Semi automatique							
			Volume de tampon d'éluion	Volume de tampon de tampon microbilles d'éluion							
Perroquet Gris du Gabon femelle	8	3		200µl	CHDs1 / CHDas2	56°C	2mM	2µl	2 signaux Z : 346pb W : 363pb	2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)	44a
Cacatoès Rosalbin femelle	8	3		200µl	CHDs1 / CHDas2	56°C	2mM	2µl	2 signaux Z : 346pb W : 363pb	2 signaux (faibles) (CHD-Z et CHD-W)	44b
Pione à tête bleue mâle	7	3		200µl	CHDs1 / CHDas4	58°C	1,5mM	3µl	2 signaux Z : 308pb W : 325pb	2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)	44f
Cacatoès des Moluques mâle	6	1		200µl	CHDs1 / CHDas2	56°C	2mM	2µl	1 signal Z : 346pb	1 signal (intense) (CHD-Z)	44c
Cacatoès des Moluques mâle	6	1		200µl	CHDs1 / CHDas4	58°C	1,5mM	3µl	1 signal Z : 308pb	1 signal (intense) (CHD-Z)	44g
Cacatoès des Moluques mâle	6	1		200µl	CHDs1 / CHDas2	56°C	2mM	2µl	1 signal Z : 346pb	1 signal (intense) (CHD-Z)	44d
Cacatoès des Moluques mâle	6	1		200µl	CHDs1 / CHDas4	58°C	1,5mM	3µl	1 signal Z : 308pb	1 signal (intense) (CHD-Z)	44h

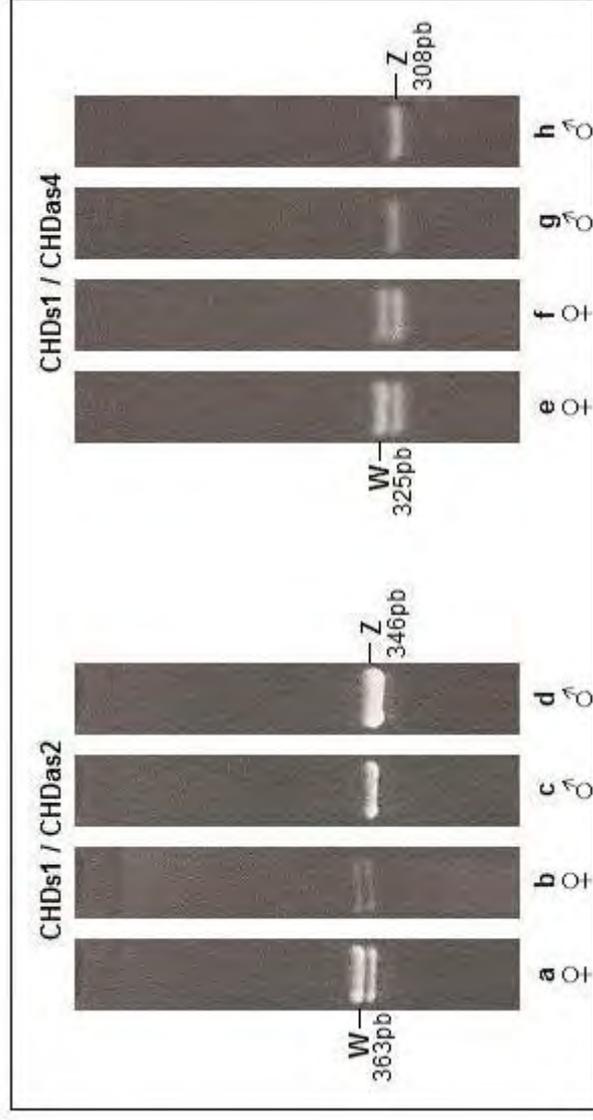


Figure 44 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de Perroquet Gris du Gabon (*Psittacus erithacus*), Cacatoès rosalin (*Cacatua roseicapilla*), Pion à tête bleue (*Pionus m. menstruus*) et Cacatoès des Moluques (*Cacatua moluccensis*) (voir tableau XXV).

VII. Résultats obtenus sur l'ADN de perruche de Barnard

Tableau XXXVI : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche de Barnard (*Barnardius Barnardi macgillivrayi*).

Espèce	Nombre de plumes récoltées	Nombre de plumes utilisées	Extraction			Amorces	T°C	MgCl2	Volume d'ADN extrait	Résultats attendus	Résultats obtenus	Figure n°			
			Manuelle	Volume de tampon d'éluion	Volume de microbilles								Semi automatique	Volume de tampon d'éluion	
Perruche de Barnard mâle	4	3	20µl	50µl	200µl	CHDs3 / CHDas4	57°C	1mM	2µl	Aucun signal	1 signal (intense) (CHD-W)	45a			
							58°C	1,5mM					1 signal (intense) (CHD-W)		
								1mM						Aucun signal	
								1,5mM							Aucun signal
								55°C						2mM	
							56°C	Aucun signal							
	57°C	Aucun signal													
	58°C		1 signal Z : 308pb	Aucun signal											
	58°C	Aucun signal													
	7		1	20µl	50µl	200µl	CHDs1 / CHDas4	57°C	1,5mM	2µl	2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)	2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)	45g		
		58°C						1mM	1 signal W : 219pb						
								1,5mM						Aucun signal	
1mM								Aucun signal							
1,5mM														2 signaux Z : 346pb W : 363pb	
55°C		1,5mM						2 signaux Z : 308pb W : 325pb							
56°C	Aucun signal														
57°C			Aucun signal												
58°C	2 signaux Z : 308pb W : 325pb	Aucun signal													
58°C			Aucun signal												
Perruche de Barnard femelle	1	20µl		50µl	200µl	CHDs1 / CHDas4	58°C	1,5mM	2µl	2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)	2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)	45h			
			58°C				1,5mM	1 signal W : 219pb							
													55°C	2mM	Aucun signal
													57°C	1,5mM	2 signaux Z : 308pb W : 325pb
			58°C				1,5mM	2 signaux Z : 308pb W : 325pb							

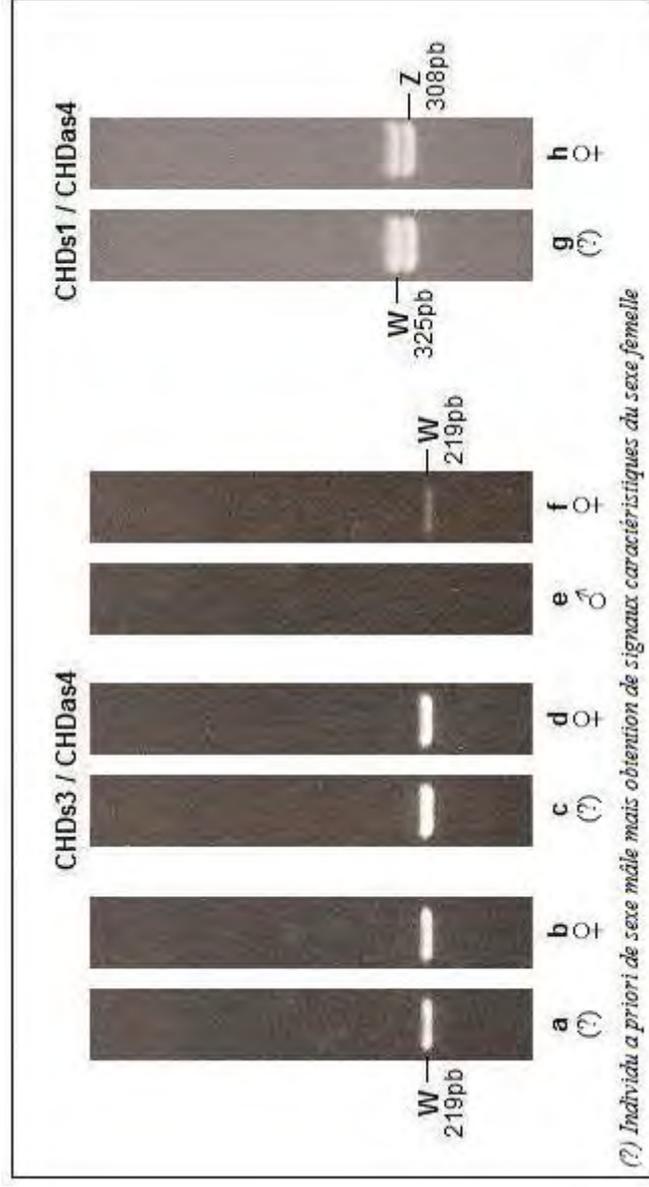


Figure 45 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche de Barnard (*Barnardius Barnardi macgillivrayi*) (voir tableau XXVI).

VIII. Résultats obtenus sur l'ADN de perruche de Pennant

Tableau XXVII : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche de Pennant (*Platyercus elegans*).

Espèce	Nombre de plumes récoltées	Nombre de plumes utilisées	Extraction		Amorces	T°C	MgCl2	Volume d'ADN extrait	Résultats attendus	Résultats obtenus	Figure n°	
			Manuelle	Semi automatique								
Perruche de Pennant mâle	4	3	Volume de tampon d'éluion	Volume de tampon d'éluion	CHDs3 / CHDas4	57°C	1mM	2µl	Aucun signal	1 signal non spécifique entre 200 et 300pb (>219pb)	-	
						58°C	1,5mM			1 signal non spécifique entre 200 et 300pb (>219pb)	46a	
							1mM			1 signal non spécifique entre 200 et 300pb (>219pb)	-	
							1,5mM			1 signal non spécifique entre 200 et 300pb (>219pb)	46c	
	4	3	200µl	50µl	CHDs1 / CHDas2	55°C	2mM	2µl	1 signal Z : 346pb	1 signal (intense) (CHD-Z)	-	
						56°C				1 signal (intense) (CHD-Z)	46e	
						57°C				1 signal (intense) (CHD-Z)	-	
						58°C				1 signal (intense) (CHD-Z)	-	
	4	3	200µl	50µl	CHDs1 / CHDas4	58°C	1,5mM	3µl	1 signal Z : 308pb	1 signal (intense) (CHD-Z)	46g	
						57°C	1mM	2µl	1 signal W : 219pb	1 signal (faible) (CHD-W)	-	
							1,5mM			1 signal (moyen) (CHD-W)	46b	
							1mM			~1 signal (intense) (CHD-W)	-	
3	3	200µl	50µl	CHDs3 / CHDas4	58°C	1mM	2µl	2 signaux W : 219pb	~1 signal non spécifique de taille > à 219pb	-		
						1,5mM			~1 signal (intense) (CHD-W)	46d		
						55°C			2µl	2 signaux Z : 346pb W : 363pb	Aucun signal	-
											56°C	Aucun signal
3	3	200µl	50µl	CHDs1 / CHDas2	57°C	2mM	2µl	2 signaux Z : 346pb W : 363pb	Aucun signal	-		
					58°C	1,5mM			Aucun signal	-		
									Aucun signal	-		
									Aucun signal	-		
3	3	200µl	50µl	CHDs1 / CHDas4	58°C	1,5mM	3µl	2 signaux Z : 308pb W : 325pb	2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)	46h		

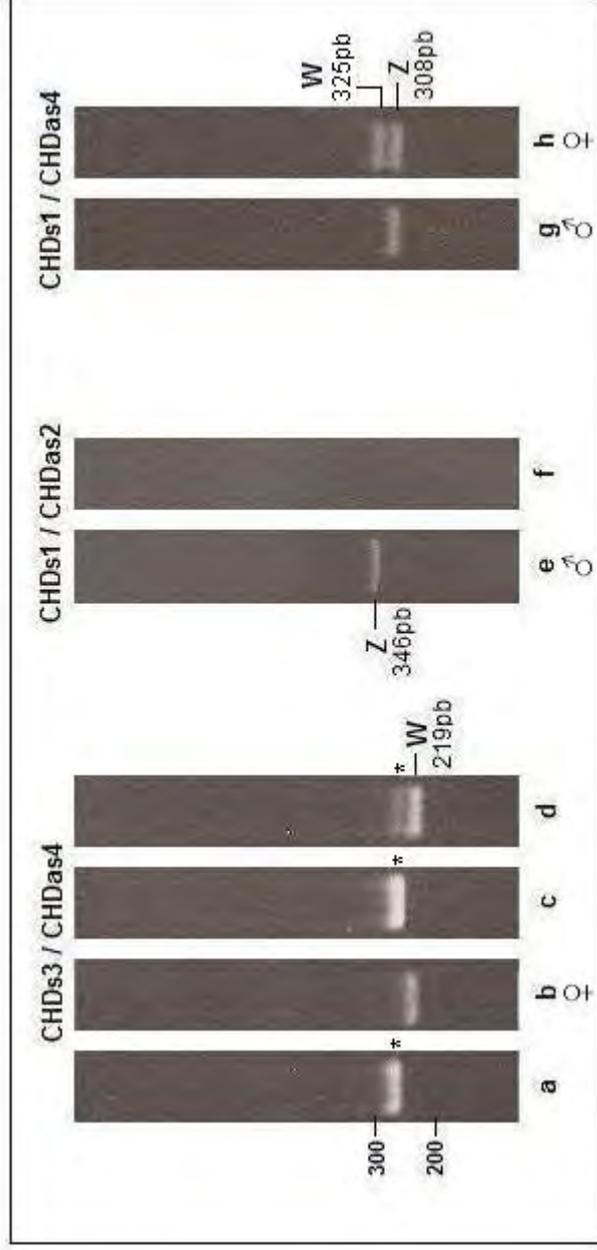


Figure 46 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche de Pennant (*Platycercus elegans*) (voir tableau XXVII). *Signal non spécifique

IX. Résultats obtenus sur l'ADN de perruche Princesse de Galles

Tableau XXVIII : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche Princesse de Galles (*Polytelis alexandrae*).

Espèce de Perruche Princesse de Galles	Extraction		Amorces	T°C	MgCl2	Volume d'ADN extrait	Résultats attendus	Résultats obtenus	Figure n°			
	Manuelle	Semi automatique										
Perruche Princesse de Galles mâle	4	3	CHDs3 / CHDas4	57°C	1mM	2µl	Aucun signal	Aucun signal	-			
					1,5mM			Aucun signal	-			
				58°C	1mM			Aucun signal	-			
					1,5mM			Aucun signal	47a			
			3	CHDs1 / CHDas2	55°C	2mM	2µl	1 signal	Aucun signal	-		
								56°C	1 signal	Aucun signal	-	
								57°C	Z : 346pb	1 signal (moyen) (CHD-Z)	47c	
								58°C	Aucun signal	Aucun signal	-	
				CHDs1 / CHDas4	58°C	1,5mM	3µl	1 signal	1 signal (intense) (CHD-Z)	47e		
								Z : 308pb				
						1mM	2µl	1 signal	Aucun signal	Aucun signal	Aucun signal	
						1,5mM						
Perruche Princesse de Galles femelle	3	3	CHDs3 / CHDas4	57°C	1mM	2µl	W : 219pb	Aucun signal	-			
					1,5mM			Aucun signal	-			
				58°C	1mM			Aucun signal	-			
					1,5mM			1 signal (faible) (CHD-W)	47b			
				CHDs1 / CHDas2	55°C	2mM	2µl	2 signaux	2 signaux (moyens)	-		
									56°C	(CHD-Z et CHD-W)	-	
									57°C	Z : 346pb	2 signaux (moyens)	47d
									58°C	W : 363pb	2 signaux (moyens)	-
				CHDs1 / CHDas4	58°C	1,5mM	3µl	2 signaux	2 signaux (intenses)	47f		
								Z : 308pb	2 signaux (intenses)	(CHD-Z et CHD-W)		
								W : 325pb				

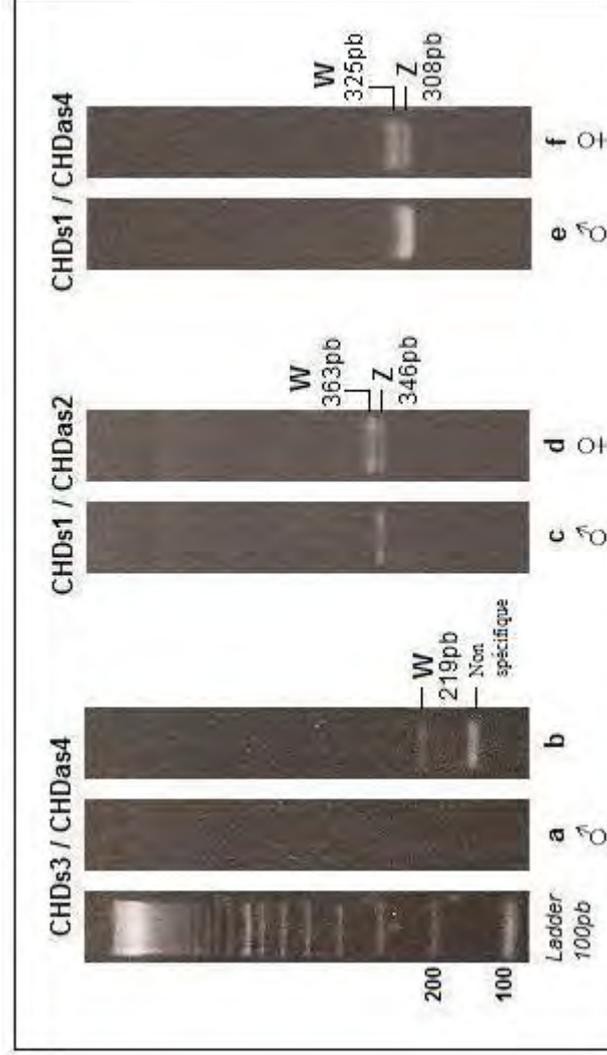


Figure 47 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche Princesse de Galles (*Polytelis alexandrae*) (voir tableau XXVIII).

X. Résultats obtenus sur l'ADN de perruche Kakariki

Tableau XXIX : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche Kakariki (*Cyanoramphus novaezelandiae*).

Espèce	Nombre de plumes récoltées	Nombre de plumes utilisées	Extraction		Amorces	T°C	MgCl2	Volume d'ADN extrait	Résultats attendus	Résultats obtenus (intensité du signal)	Figure n°	
			Manuelle	Semi automatique								
Perruche Kakariki mâle	5	3	Volume de tampon d'éluat	Volume de tampon de tampon d'éluat	CHDs3 / CHDas4	57°C	1mM	2µl	Aucun signal	1 signal non spécifique entre 200 et 300pb (>219pb)	48a	
							1,5mM			1 signal non spécifique entre 200 et 300pb (>219pb)		
							1mM			1 signal non spécifique entre 200 et 300pb (>219pb)		
							1,5mM			1 signal non spécifique entre 200 et 300pb (>219pb)		
							2mM			1 signal (moyen) (CHD-Z)		
							1,5mM			1 signal (très faible) (CHD-Z)		
	Perruche Kakariki femelle	5	3	Volume de tampon d'éluat	Volume de tampon de tampon d'éluat	CHDs1 / CHDas2	56°C	2µl	2µl	1 signal Z : 346pb	1 signal (moyen) (CHD-Z)	48e
								3µl			1 signal (très faible) (CHD-Z)	
								5µl			1 signal (intense) (CHD-Z)	
								1mM			1 signal (intense) (CHD-W)	
								1,5mM			~1 signal (intense) (CHD-W)	
								1,5mM			~1 signal non spécifique (plus faible) de taille > à 219pb	
Perruche Kakariki femelle	5	3	Volume de tampon d'éluat	Volume de tampon de tampon d'éluat	CHDs3 / CHDas4	57°C	2µl	2µl	1 signal W : 219pb	1 signal (intense) (CHD-W)	48d	
										1mM		~1 signal non spécifique (plus faible) de taille > à 219pb
										1,5mM		~1 signal (intense) (CHD-W)
										1,5mM		~1 signal non spécifique (plus faible) de taille > à 219pb
										2mM		2 signaux (moyens) (CHD-Z et CHD-W)
										1,5mM		2 signaux (très faibles) (CHD-Z et CHD-W)
Perruche Kakariki femelle	5	3	Volume de tampon d'éluat	Volume de tampon de tampon d'éluat	CHDs1 / CHDas2	56°C	2µl	2µl	2 signaux Z : 346pb W : 363pb	2 signaux (moyens) (CHD-Z et CHD-W)	48f	
										3µl		2 signaux (très faibles) (CHD-Z et CHD-W)
										5µl		2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)
										1,5mM		2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)
										2mM		2 signaux (très faibles) (CHD-Z et CHD-W)
										1,5mM		2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)

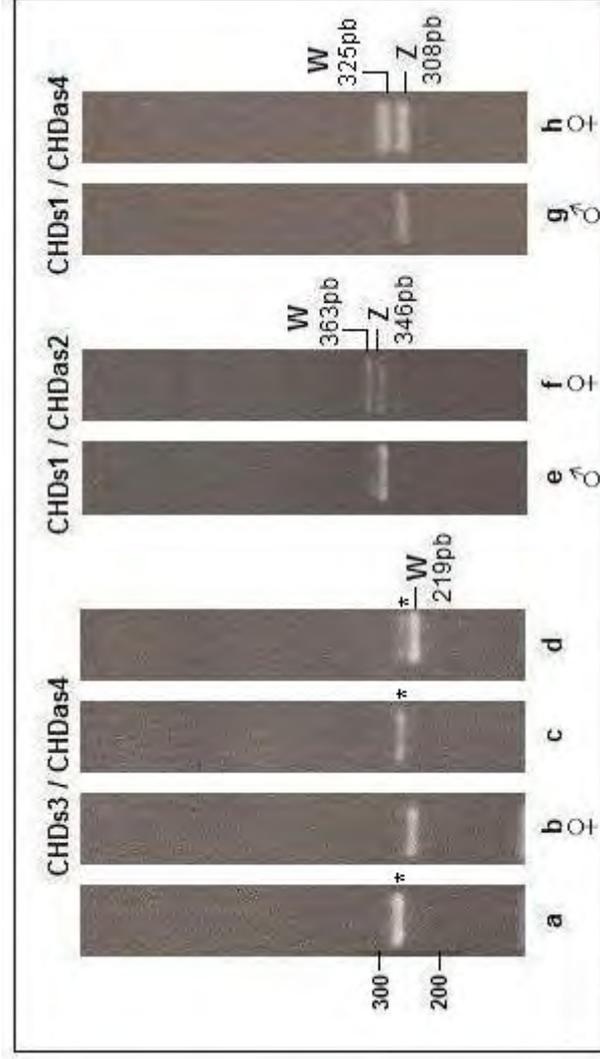


Figure 48 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche Kakariki (*Cyanoramphus novaezelandiae*) (voir tableau XXIX). *Signal non spécifique

XI. Résultats obtenus sur l'ADN de perruche Calopsitte

Tableau XXX : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche Calopsitte (*Nymphicus hollandicus*).

Espèce	Extraction				Amorces	T°C	MgCl2	Volume d'ADN extrait	Résultats attendus	Résultats obtenus (Intensité du signal)	Figure n°								
	Manuelle	Semi automatique																	
	Nombre de plumes récoltées	Nombre de plumes utilisées	Volume de tampon d'éluion	Volume de tampon d'éluion															
Perruche Calopsitte male	4	3	200µl	50µl	CHDs3 / CHDas4	57°C	1mM	2µl	Aucun signal	Aucun signal	49a								
						58°C	1,5mM					Aucun signal	49c						
							1mM							Aucun signal	-				
							1,5mM									Aucun signal	-		
56°C	2mM	1 signal	1 signal (intense) (CHD-Z)	49e															
Perruche Calopsitte femelle	5	3	200µl	50µl	CHDs1 / CHDas2	58°C	1,5mM	2µl	1 signal	1 signal (très faible) (CHD-Z)	-								
						57°C	1mM					3µl	1 signal	1 signal (très faible) (CHD-Z)					
															1,5mM	5µl	1 signal	1 signal (moyen) (CHD-Z)	49g
58°C	1,5mM	2µl	1 signal	1 signal (intense) (CHD-W)	49d														
						1mM	1 signal (faible) (CHD-W)	-											
1,5mM	1 signal (faible) (CHD-W)	-																	
56°C			2mM	2 signaux	2 signaux (intenses) (CHD-Z et CHD-W)	49f													
Perruche Calopsitte femelle	5	3	200µl	50µl	CHDs1 / CHDas2	58°C	1,5mM	2µl	2 signaux	2 signaux (très faibles) (CHD-Z et CHD-W)	-								
						57°C	1mM					3µl	2 signaux	2 signaux (très faibles) (CHD-Z et CHD-W)					
															1,5mM	5µl	2 signaux	2 signaux (moyens) (CHD-Z et CHD-W)	49h
1,5mM	2 signaux	2 signaux (moyens) (CHD-Z et CHD-W)	-																

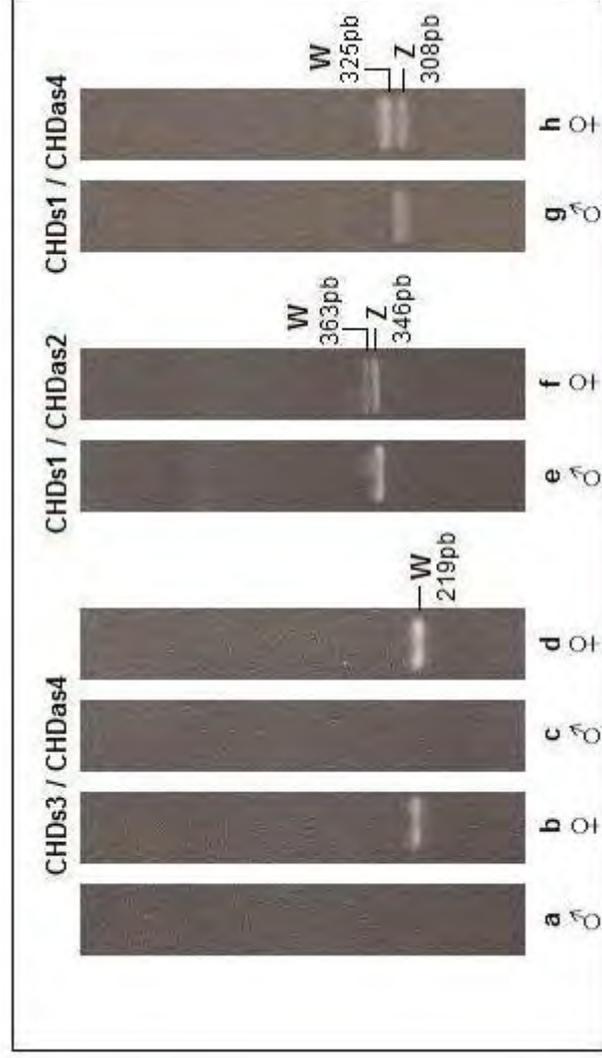


Figure 49 : Signaux obtenus à la suite de l'essai de différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche Calopsitte (*Nymphicus hollandicus*) (voir tableau XXX).

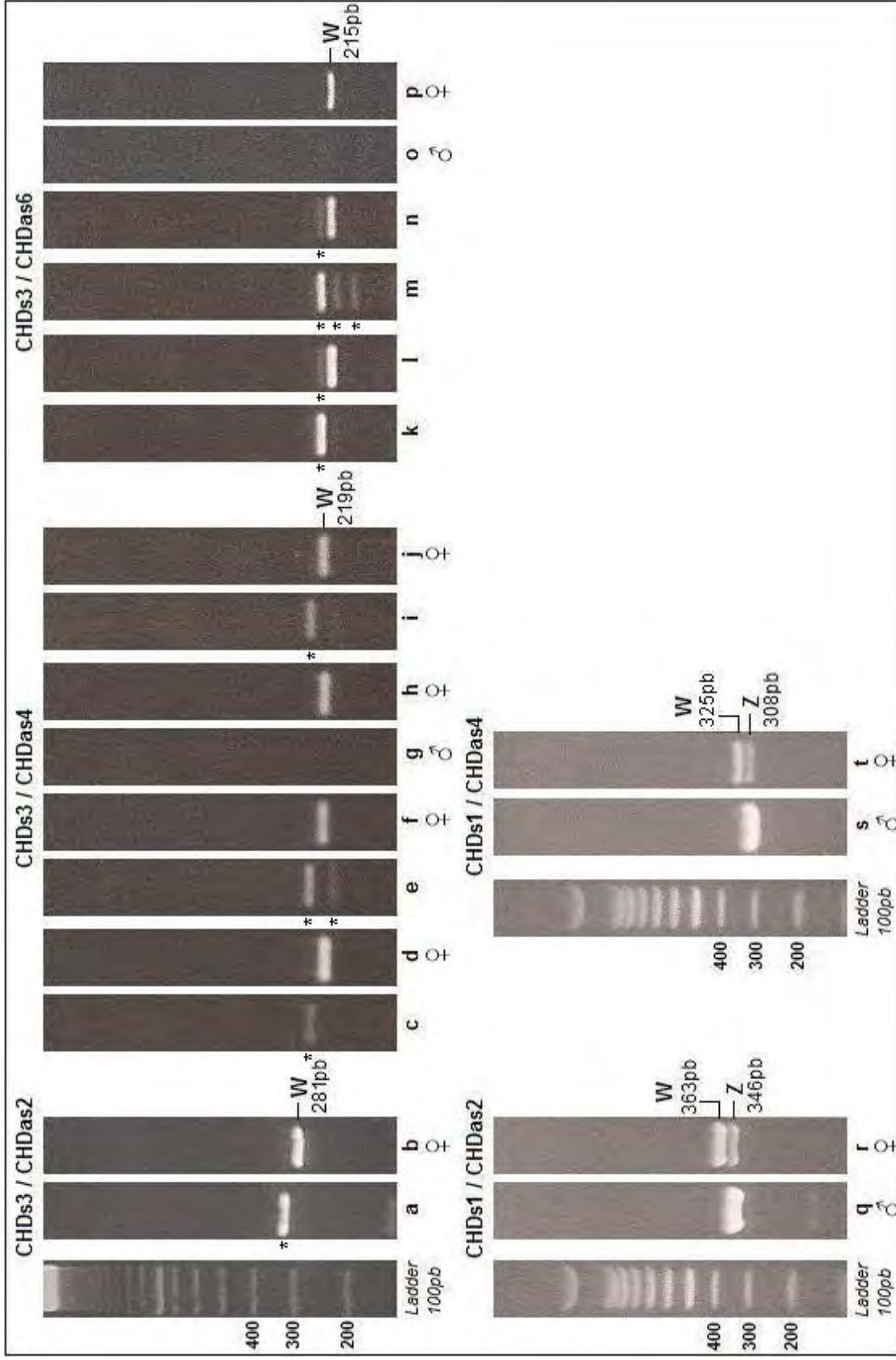


Figure 50: Signaux obtenus à la suite de l'essai de différents couples d'amorces sur l'ADN de perruche à collier (*Psittacula krameri*) (voir tableau XXXI). *Signal non spécifique

XIII. Résultats obtenus sur l'ADN de Youyou du Sénégal

Tableau XXXII : Résultats obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de Youyou du Sénégal (*Poicephalus senegalus*).

Espèce	Nombre de plumes récoltées	Nombre de plumes utilisées	Extraction			Amorces	T°C	MgCl2	Volume d'ADN extrait	Résultats attendus	Résultats obtenus	Figure n°						
			Manuelle	Semi automatique														
			Volume de tampon d'éluion	Volume de microbilles	Volume de tampon d'éluion													
Youyou du Sénégal (sexu inconnu)	6	4	20µl	100µl	50µl	CHDs3 / CHDas2	56°C	1mM	2µl	Mâle Aucun signal Femelle 1 signal	Aucun signal	51a						
							56°C	1,5mM		W : 281pb	1 signal (intense) entre 300 et 400pb	51b						
							56°C	2mM		W : 215pb	1 signal (intense) entre 300 et 400pb	51c						
							58°C	1,5mM	2µl	Aucun signal	Aucun signal	-						
							55°C		3µl	Mâle 1 signal Z : 346pb	1 signal (moyen) (CHD-Z)	51d						
							56°C		2µl	Z : 346pb	1 signal de taille > à 363pb	51e						
	6					CHDs1 / CHDas2	56°C	2mM	3µl	Femelle 2 signaux Z : 346pb	1 signal (moyen) (CHD-Z)	51f						
							56°C		5µl	1 signal de taille > à 363pb	51g							
							57°C		3µl	Z : 346pb	1 signal (moyen) (CHD-Z)	51h						
							58°C		3µl	W : 363pb	1 signal (moyen) (CHD-Z)	51i						
							2					CHDs1 / CHDas4	58°C	1,5mM	2µl	Mâle 1 signal Z : 308pb Femelle 2 signaux Z : 308pb W : 325pb	1 signal (intense) (CHD-Z)	51j

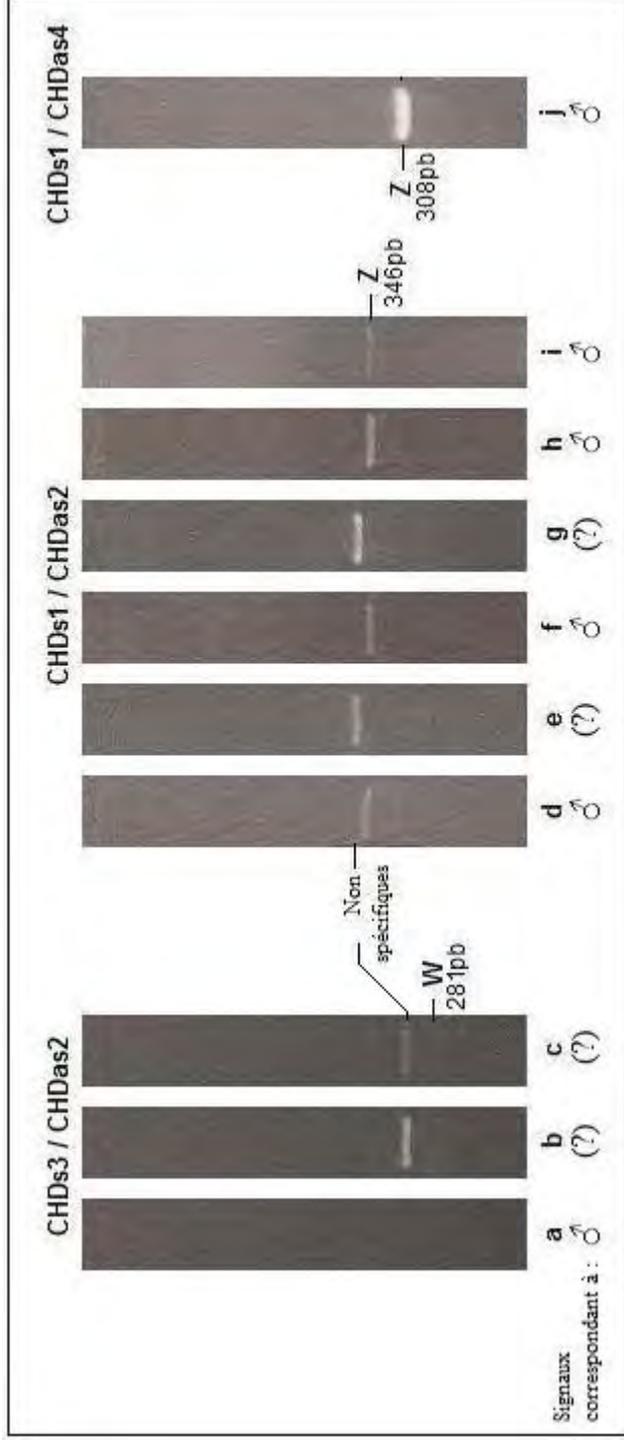


Figure 51 : Signaux obtenus à la suite de l'essai des différents couples d'amorces sur l'ADN de Youyou du Sénégal (*Poicephalus senegalus*) (voir tableau XXXII).

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

I. Gène ciblé

Nous avons ciblé au cours de notre étude le gène CHD1 (présentant deux copies, CHD1-Z et CHD1-W) dont la forte conservation au sein de la classe des oiseaux et dont l'utilité dans leur sexage a été préalablement démontrée (GRIFFITHS, 2000 ; GRIFFITHS et al., 1998). La structure du gène étant parfaitement connue (introns et exons), nous avons décidé de mettre au point des amorces exploitant les différences entre mâle et femelle de l'intron numéro 21 :

- d'une part la différence de séquence nous permet l'utilisation d'une amorce spécifique du gène CHD-W et donc spécifique du sexe femelle ;
- d'autre part existe un polymorphisme de longueur entre les copies CHD1-Z et CHD1-W : cette différence de taille sert alors de discriminant entre les bandes provenant de la copie Z ou W des gènes CHD1.

II. Matériel

A. Animaux

Nous avons utilisé, pour la mise au point de l'extraction, un fragment de rein provenant d'une carcasse de poulet femelle dont le sexe a été déterminé de manière certaine par visualisation directe des gonades. Cet échantillon, dont la nature ne correspond pas à l'intitulé du sujet nous a servi de témoin positif pour les premières extractions effectuées à partir du bulbe de plumes.

Les plumes utilisées et destinées à la mise au point de la méthode d'extraction proviennent de trois poules (35 plumes) et un coq (1 plume). Le sexe de chaque individu a été facilement déterminé du fait du fort dimorphisme sexuel existant chez cette espèce.

Nous avons par ailleurs prélevé 15 espèces, dont huit étaient représentées par un couple, une par trois individus, et six par un unique oiseau. Nous aurions aimé pour la mise au point du protocole de sexage avoir accès à un plus grand nombre d'espèces de perruches et

perroquets mais nous avons rencontré plusieurs difficultés lors du rassemblement de notre matériel expérimental :

- Du fait de la grande valeur de ces oiseaux et malgré nos recherches nous n'avons pu rassembler que ces 16 espèces. Celles-ci sont cependant parmi les plus répandues en captivité, et sans nul doute, quand aucun dimorphisme sexuel existe, celles qui font le plus souvent l'objet d'une demande de sexage.
- La mise au point d'une méthode de sexage nécessite l'utilisation de prélèvement provenant d'animaux dont le sexe est connu de manière certaine. Notre attention s'est portée sur des animaux dont nous avons des indications sur le sexe. Celui-ci a été au préalable déterminé de trois manières :
 - Fort dimorphisme sexuel ;
 - Observation du comportement reproducteur et confiance allouée à l'éleveur propriétaire des oiseaux ;
 - Sexage moléculaire par un laboratoire spécialisé privé (certificat de sexage à l'appui) (Annexe 7).

Hormis l'Eclectus présentant un fort dimorphisme sexuel, il a été difficile de trouver des animaux déjà sexés de manière fiable :

- Certaines espèces ne sont représentées que par un seul sexe, mais les résultats obtenus à l'issue de notre étude restent cohérents ;
- Écartement de l'étude d'une perruche de Barnard de sexe inconnu puisque nous avons déjà des prélèvements provenant de deux individus de sexes opposés appartenant à cette espèce ;
- Le Youyou du Sénégal de sexe inconnu a été utilisé dans un but de déterminer son sexe (son comportement laissait présumer qu'il s'agissait d'un mâle) ;
- Les sexes des perruches provenant de l'élevage étaient parfaitement connus par l'éleveur du fait de ses observations. D'après nos résultats, un individu (perruche de Barnard) n'était pas du sexe indiqué par le propriétaire ;
- Les perroquets provenant du parc zoologique ont tous été sexés par méthode PCR par des laboratoires privés. Or, nos recherches bibliographiques ne nous ont pas permis de trouver une étude présentant un couple d'amorces testé sur un éventail large d'espèces de perroquets. Nous étions alors déjà convaincus des risques d'erreurs du sexage moléculaire. Les résultats obtenus sur l'amazone à ailes oranges (mâle), qui ne

coïncident pas avec le sexe femelle noté sur le certificat de sexage (Annexe 7) ne mettent pas en doute la fiabilité de notre test, car l'individu a été identifié comme mâle au cours de la saison de reproduction qui a suivi notre étude (voir partie « Résultats » de la discussion).

Pour chaque individu prélevé, le sexe indiqué lors du prélèvement a été noté sur le conditionnement de manière précautionneuse afin de ne pas commettre d'erreur d'identification. Pour les perroquets provenant du parc zoologique, les certificats de sexage nous ont été fournis lorsque ceux-ci étaient disponibles (Annexe 7).

Il aurait été en outre intéressant dans le cadre de l'étude de pouvoir sexer ces mêmes animaux par d'autres méthodes (endoscopie) afin de confronter nos résultats mais ceci n'a pas pu être mis en œuvre.

B. Prélèvements

1. Plumes

Dans notre étude, l'ADN a été isolé à partir des bulbes de plumes. Les plumes sont faciles à obtenir et permettent à un propriétaire ou à un éleveur de réaliser le prélèvement lui-même sans passer par un vétérinaire. C'est également le prélèvement de choix lorsque l'on veut sexer un grand nombre d'individus (étude de sex-ratio de populations captives ou sauvages de perroquets par exemple). En outre, la faible douleur infligée à l'oiseau ainsi qu'une contention réduite assure le respect du bien-être animal ainsi qu'une absence quasiment totale de stress ce qui est important dans le cas d'espèces fragiles ou de grande valeur financière, sentimentale, ou conservatoire (exemple du Ara de Spix). Enfin, le stockage réfrigéré est aisé, et l'acheminement possible sans aucune contrainte par voie postale si besoin.

Il est utile de rappeler que le prélèvement des plumes doit être effectué en prenant les précautions suivantes :

- Les plumes doivent être des plumes de couverture prélevées sur une zone anatomique facilement accessible ;
- Elles doivent être arrachées une par une d'un geste franc, en faisant un contre-appui avec un doigt (si possible) et dans le sens de la pousse, afin de ne pas causer une trop vive douleur, et surtout afin de ne pas léser l'épiderme fragile de l'oiseau ;
- Leur nombre ne doit pas être excessif afin de ne pas altérer l'esthétique de l'oiseau ;

- Notre méthode a été mise au point à partir de plumes arrachées et non ramassées à même le sol ;
- Le bulbe ne doit pas être directement touché avec les doigts, et la plume doit être immédiatement placée dans un tube de prélèvement ou une enveloppe en papier propres ;
- Les plumes provenant de plusieurs oiseaux ne doivent surtout pas être mélangées (un prélèvement doit contenir les plumes d'un seul individu). Il faut donc faire attention à réaliser les prélèvements l'un après l'autre et veiller à noter sur chaque conditionnement l'identité précise de l'oiseau.

Il est important de ne pas prélever des rémiges qui sont importantes pour le vol, et dont les bulbes sont en étroite relation anatomique avec le périoste de l'ulna et du métacarpien sous-jacents. Leur arrachage provoquerait une douleur trop importante pour l'animal. De plus, les risques de saignement ainsi que de repousse anormale sont élevés. Il en est de même pour les rectrices qui ont un calamus de gros calibre, et qui servent à l'orientation de l'oiseau pendant le vol. Un prélèvement de ce type nuirait également à l'esthétique de l'individu.

Le test aurait pu être mis au point sur des prélèvements sanguins. L'extraction d'ADN à partir de sang est en effet une technique parfaitement bien maîtrisée, qui permet d'obtenir une grande quantité d'ADN (rendement supérieur par rapport à une extraction à partir de bulbes de plumes) et dont l'utilité pour le sexage a été prouvée, mais les inconvénients inhérents à ce type de prélèvement, en particulier son caractère invasif, nous ont naturellement conduit à écarter cette piste de notre étude.

2. Prélèvements autres que les plumes

L'échantillon de rein a été utilisé pour une première extraction d'ADN. Nous avons choisi ce type de prélèvement car la technique d'extraction d'ADN à partir de tissus mous est une technique bien maîtrisée qui permet d'obtenir une grande quantité d'ADN. Celle-ci ayant été réalisée à l'aide d'un kit d'extraction manuelle, nous avons pu alors facilement obtenir un échantillon d'ADN nous servant par la suite de témoin positif lors des premières extractions effectuées à partir de bulbes de plumes.

3. Qualité des prélèvements

Le prélèvement du fragment de rein et son stockage à 4°C n'a pas altéré sa qualité puisque il nous a permis d'obtenir de l'ADN amplifié avec succès à l'aide du couple d'amorces CHDs1 / CHDas2.

Les précautions prises lors de l'arrachage des plumes (bulbes non touchés directement avec les doigts lors de la manipulation et placés immédiatement dans un tube de prélèvement stérile ou une enveloppe de papier), de leur acheminement, de leur stockage à 4°C et de leur traitement n'ont *a priori* pas altéré leur qualité puisque chacun des échantillons extraits nous a permis de réaliser des amplifications efficaces.

III. Méthode

A. Extraction de l'ADN génomique

La mise au point de notre protocole de sexage a nécessité en premier lieu la mise au point d'un protocole d'extraction efficace. Le protocole que nous avons privilégié est l'extraction semi-automatisée, pour son caractère pratique.

1. Kit d'extraction semi-automatisée *Magnasil® KF Genomic System, PROMEGA*

Ce kit d'extraction, que nous avons privilégié et utilisé majoritairement, nous a permis d'extraire de manière efficace l'ADN à partir des bulbes de plumes de tous les individus testés. Il a pour avantage de comporter une série d'étapes réalisées par un automate, permettant de réduire les manipulations toujours considérées comme source d'erreur possible.

Cependant, son rendement étant de manière générale inférieur à celui de l'extraction manuelle, la quantité d'ADN extraite est plus faible. Ainsi, la mise au point a consisté à augmenter cette quantité d'ADN afin d'améliorer la qualité des signaux obtenus à l'issue des PCR. Pour cela :

- nous avons fait varier le nombre de bulbes de plumes de départ selon leur taille ;
- nous avons également fait varier le volume de microbilles et de tampon d'élution utilisés au cours de l'extraction.

2. **Kit d'extraction manuelle *NucleoSpin Tissue*[®], *MACHEREY-NAGEL***

Ce kit a été utilisé afin d'extraire l'ADN de l'échantillon de rein de poule (réalisation du témoin positif d'extraction) et également à partir de bulbes de plumes. L'adaptation du protocole d'extraction à partir de la queue de rat au bulbe de plume a été efficace pour tous les échantillons traités.

Les paramètres que nous avons fait varier sont :

- le nombre de bulbes de départ selon leur taille
- le volume de tampon d'élution

B. Amplification de l'ADN

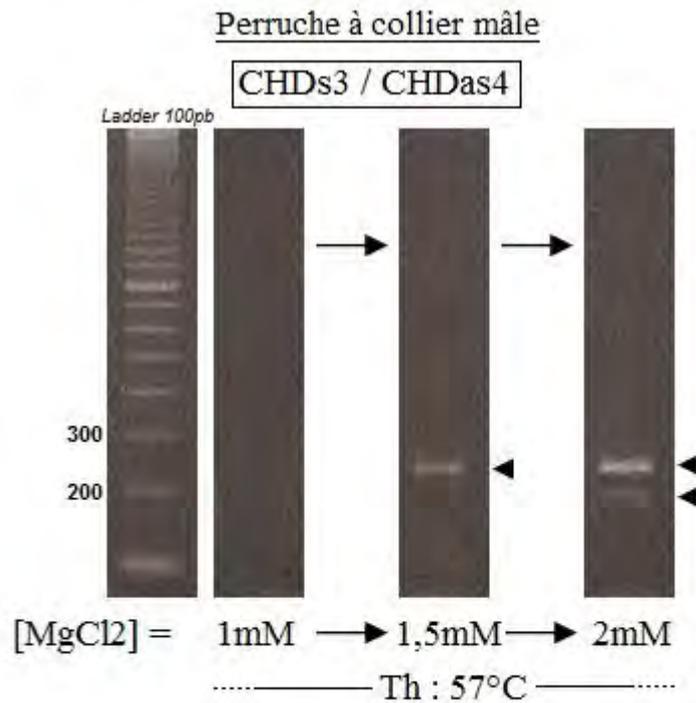
1. Variation de la stringence

La stringence est la capacité qu'a un ensemble de conditions d'une réaction à agir sur le processus d'appariement de l'ADN. Si la stringence est élevée, l'appariement de l'ADN est plus difficile. Pour faire varier la stringence on peut jouer sur deux paramètres : la concentration en $MgCl_2$ et la température d'hybridation.

➤ **Chlorure de magnésium**

Le réactif soumis à variation au cours de notre étude est le chlorure de magnésium ($MgCl_2$). Les ions magnésium (Mg^{2+}) sont nécessaires pour la réalisation de la réaction enzymatique. Nous avons fait varier cette concentration de 1 à 2mM (1 / 1,5 / 2 mM) selon les cas. Plus la concentration en Mg^{2+} augmente, plus les hybridations non-spécifiques sont susceptibles de se produire (figure 52). A l'inverse, lorsque nous diminuons leur concentration, nous limitons la capacité d'hybridation des amorces c'est à dire que nous rendons le milieu plus stringent. Si la concentration est inférieure à 1mM, aucune hybridation spécifique et non spécifique des amorces n'a lieu.

Ainsi, la détermination d'une concentration optimale en $MgCl_2$ vise à atténuer le risque d'apparition de bandes non spécifiques (diminution de la concentration) tout en augmentant l'intensité du signal obtenu à l'issue de la réaction et de l'électrophorèse (augmentation de la concentration).



Amorces	T°C	MgCl ₂	Volume d'extrait d'ADN	Résultats attendus	Résultats obtenus
CHDs3 / CHDas4	57°C	1mM	1µl	Aucun signal	Aucun signal
		1,5mM			1 signal non-spécifique entre 200 et 300pb (>219pb)
		2mM			2 signaux non-spécifiques entre 200 et 300pb

Figure 52 : Effet de la variation de la concentration en MgCl₂ sur l'apparition de signaux non-spécifiques chez la Perruche à collier (couple CHDs3 / CHDas4).

➤ Température d'hybridation

La température d'hybridation théorique est généralement de 5 à 10°C inférieure à la moyenne des températures de fusion (T_m) des amorces utilisées. Cependant, la détermination de la température d'hybridation optimale qui doit être utilisée n'est permise que par l'expérience, en fonction des résultats obtenus, c'est à dire de la présence ou non d'hybridations non-spécifiques.

En augmentant la température d'hybridation, nous augmentons la stringence du milieu, c'est à dire que nous limitons la capacité d'hybridation des amorces. Ainsi, plus la température d'hybridation est haute, plus le risque d'obtenir des hybridations non spécifiques est faible. En contrepartie, si nous voulons augmenter l'intensité du signal recherché, nous devons diminuer cette température.

2. Choix des amorces

Plusieurs couples d'amorces ont été testés afin d'optimiser les signaux dans le but de favoriser celui ou ceux qui permettent, par les bandes obtenus à l'issue de l'électrophorèse, une différenciation aisée des mâles et des femelles. Pour cela, les couples CHDs3 / CHDas2, CHDs3 / CHDas4 et CHDs3 / CHDas6 ont été utilisés (CHDs3 ne se fixe que sur l'intron du gène CHD-W), mais ceux-ci n'ont pas permis, en faisant varier la concentration en $MgCl_2$ et la température d'hybridation, d'obtenir les résultats escomptés, à savoir aucune bande pour les mâles et une unique bande pour les femelles, pour la majorité des espèces de perruches et perroquets testées. Bien que lors de la mise au point sur l'espèce *Gallus gallus* les résultats étaient concluants, nous avons obtenu, avec des conditions de stringence similaires, chez les mâles des autres espèces et de manière variable, des bandes non-spécifiques. Les signaux présents chez les deux sexes étaient alors de taille différentes et permettaient néanmoins la diagnose du sexe.

- Pour le couple CHDs3 / CHDas2 (signal femelle CHD-W théorique de 281 paires de bases) nous avons obtenu un signal non spécifique chez le mâle de taille comprise entre 300 et 400 paires de bases ;
- Pour le couple CHDs3 / CHDas4 et CHDs3 / CHDas6 (signaux femelles CHD-W théorique respectivement de 219 et 215 paires de bases), le signal non spécifique présent chez le mâle était de taille comprise entre 200 et 300 paires de bases).

Cependant, afin de comprendre pourquoi un tel signal non-spécifique était présent chez certains mâles de certaines espèces, il nous fallait séquencer le gène incriminé. Nous avons préféré tester les autres amorces mises au point.

Les couples CHDs1 / CHDas2 et CHDs1 / CHDas4 ont ainsi été favorisés et testés avec succès chez l'espèce *gallus* ainsi que chez la majorité des espèces de perruches et perroquets à disposition. L'avantage de ces deux couples d'amorces est de permettre l'amplification simultanée de séquences des deux gènes CHD-Z et CHD-W. La bande correspondante au gène CHD-Z apparaît alors chez tous les individus et permet de s'assurer que le test a fonctionné. L'intron numéro 21 est utilisé comme discriminant entre les deux gènes. Les amorces CHDs1, CHDas2 et CHDas4 se fixent en effet sur les exons situés de part et d'autre de cet intron qui diffère en taille entre les deux gènes.

Le test est considéré comme efficace si :

- Pour le couple CHDs1 / CHDas2 le mâle présente une bande unique Z d'environ 346 paires de bases et la femelle une bande Z de même taille ainsi qu'une bande W d'environ 363 paires de bases ;
- Pour le couple CHDs1 / CHDas4 le mâle présente une bande unique Z d'environ 308 paires de bases et la femelle une bande Z de même taille ainsi qu'une bande W d'environ 325 paires de bases.

3. Sensibilité et spécificité

La sensibilité et la spécificité des amorces ont été évaluées pour chacune des PCR et pour chacune des espèces testées. La perte de sensibilité correspond à une perte d'intensité du signal tandis que la perte de spécificité correspond à l'apparition de signaux inattendus appelés fragments non-spécifiques.

a. Sensibilité

i. Variation

La sensibilité d'un test PCR est en théorie excellente puisque l'amplification du fragment cible n'est pas linéaire mais exponentielle (le nombre de fragments d'ADN est théoriquement doublé à chaque cycle). Ainsi, si on a 10 molécules d'ADN dans le mélange réactionnel et si on applique 45 cycles d'amplification, on obtient en théorie 10^{45} fragments, ce qui est largement suffisant pour les mettre en évidence lors de la révélation. La sensibilité de la réaction est donc liée à la concentration d'ADN dans le mélange réactionnel de PCR. Plus il y a d'ADN au départ, plus le nombre de fragments amplifiés est important. Avec l'extrait d'ADN provenant du morceau de rein de poule (extraction effectuée à partir de 30mg, au cours de la mise au point de la méthode d'extraction), il n'y a pas de problème puisque la quantité d'ADN extrait est importante. Par contre, avec les bulbes de plumes, la quantité d'ADN extrait est moins importante. Il faut donc faire varier différents paramètres afin de pouvoir améliorer la sensibilité du test (figure 53). Les bulbes de plumes ont la particularité, par rapport aux autres phanères (les poils), de présenter des tailles très variables en fonction de l'espèce et de sa taille, du type de plumes (les plumes de couverture sont de taille très inférieure aux rémiges et rectrices) et de la zone anatomique d'où elle proviennent. Il ne faut donc pas seulement prendre en compte le nombre de bulbes utilisés mais aussi leur taille : petite (inférieure à 3mm de longueur) / moyenne (3-5mm) / grande (supérieure à 5mm). Le volume des réactifs utilisés au cours des deux types d'extraction est également à faire varier et à adapter aux caractéristiques des bulbes.

- **Extraction manuelle** : afin d'améliorer le rendement (souvent supérieur à celui d'une extraction semi-automatisée) nous avons fait varier le volume de tampon d'éluion (de 100µl à 15µl chez la poule, 20µl à 15µl chez les perruches et perroquets) en fonction du type de bulbes et de leur nombre. Pour des bulbes en faible nombre (1 à 2) on diminue le volume de tampon à 15 / 20µl, pour des petits bulbes en nombre élevé (3 à 5), on augmente celui-ci à 100µl (cas de la poule lors de la mise au point, et pour laquelle le nombre de plumes disponibles était élevé). Diminuer dans la mesure du possible le volume de tampon permet d'augmenter la sensibilité.
- **Extraction semi-automatisée** : nous avons fait varier ici le volume de microbilles (100µl à 200µl) ainsi que le volume de tampon d'éluion (50µl à 100µl chez la poule et le coq, fixé à 50µl chez les perruches et perroquets). Augmenter dans la mesure du possible le volume de microbilles permet d'améliorer la sensibilité.

Afin de palier à la quantité d'ADN trop insuffisante à l'issue de l'extraction, il faut également au besoin augmenter le volume d'extrait ajouté au mélange réactionnel de la PCR (1µl à 5µl) (augmenter la prise d'essai d'ADN permet d'améliorer l'intensité des signaux obtenus).

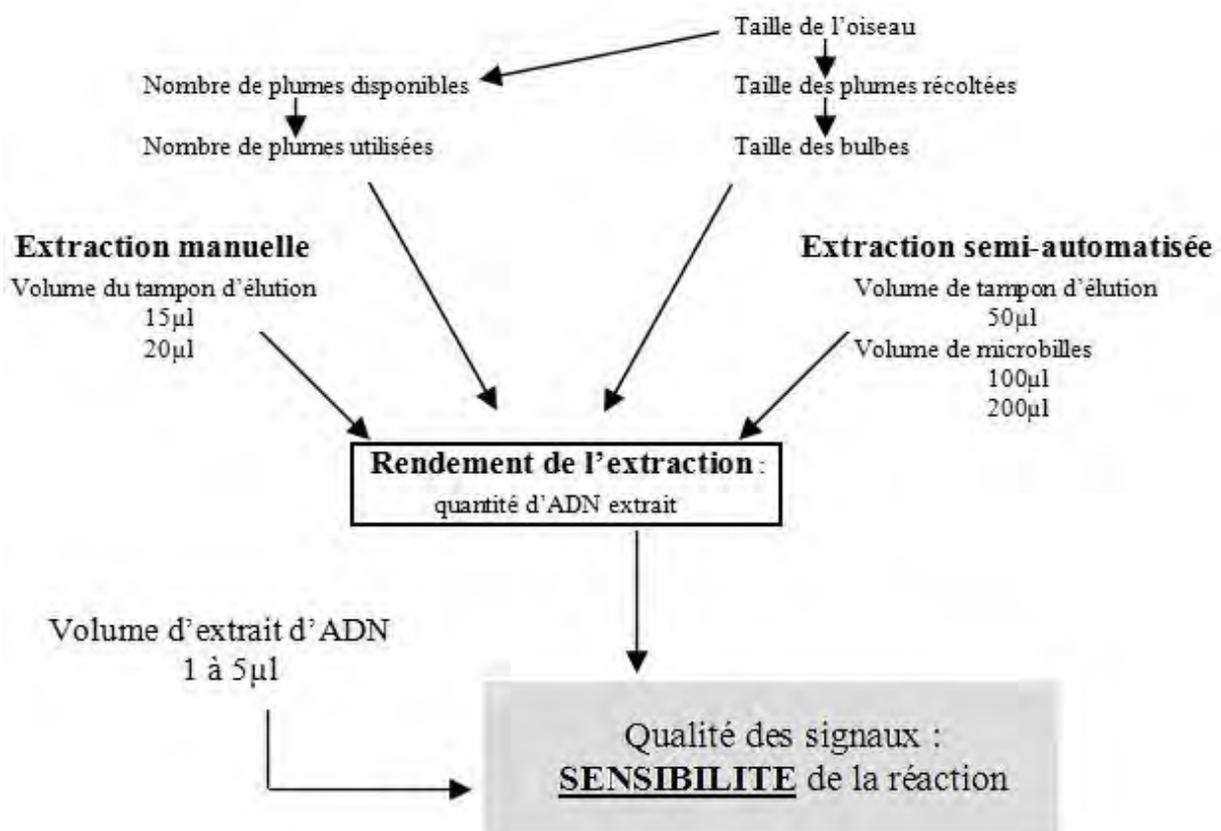


Figure 53 : Influence de l'extraction et du volume d'extrait d'ADN ajouté au "mix" de PCR sur la sensibilité du test de sexage

ii. Mise au point au cours du test de sexage

Pendant la mise au point du test de sexage, la sensibilité a été variable en fonction des conditions expérimentales utilisées (extraction, température d'hybridation, concentration en $MgCl_2$) et de l'espèce. Une fois les conditions de température et de concentration en $MgCl_2$ optimales déterminées pour chaque couple d'amorces, il a fallu déterminer les meilleures conditions d'extraction.

Pour l'extraction manuelle (utilisée avec le couple d'amorces CHDs1 / CHDas4), l'utilisation de deux bulbes de taille moyenne (3-5mm) ainsi que d'un volume de tampon d'élution de 20 μ l a permis sans augmentation de la prise d'essai d'ADN (2 μ l) d'obtenir des signaux de très bonne qualité permettant de lire aisément l'électrophorégramme (cas du Youyou du Sénégal, de l'Amazone à ailes oranges, de l'Amazone de Finsch, du Ara à collier d'or et de la perruche à collier). Un unique gros bulbe a été également suffisant (cas de la perruche de Barnard). Pour des bulbes de petite taille (inférieure à 3mm) au nombre de deux, nous avons obtenus des signaux de même intensité en diminuant le volume de tampon d'élution à 15 μ l tout en utilisant la même prise d'essai d'ADN de 2 μ l (cas de l'Eclectus femelle) (tableau XXXIII).

Tableau XXXIII : Variation du volume de tampon d'élution en fonction du nombre et de la taille des bulbes lors des extractions manuelles.

	Nombre	Tampon d'élution	
Bulbes de petite taille (<3mm)	2	15 μ l	CHDs1 / CHDas4 Th : 58°C / [MgCl2] : 1,5mM Prise d'ADN : 2 μ l → Signaux moyens à intenses
Bulbes de taille moyenne ([3-5]mm)	2	20 μ l	
Bulbes de grosse taille (>5mm)	1	20 μ l	

Pour les différentes extractions semi-automatisées appliquées aux bulbes des différentes espèces de perruches et perroquets, nous avons fixé le volume de tampon d'élution à 50 μ l. Nous avons seulement adapté le volume de microbilles au nombre et à la taille des bulbes, afin d'augmenter l'intensité des signaux obtenus. Il a parfois fallu, afin de rendre le profil électrophorétique facilement lisible, augmenter le volume d'extrait d'ADN ajouté au « mix » de PCR. La figure 54 illustre l'effet de l'augmentation de la prise d'essai d'ADN chez le couple de perruche Kakariki.

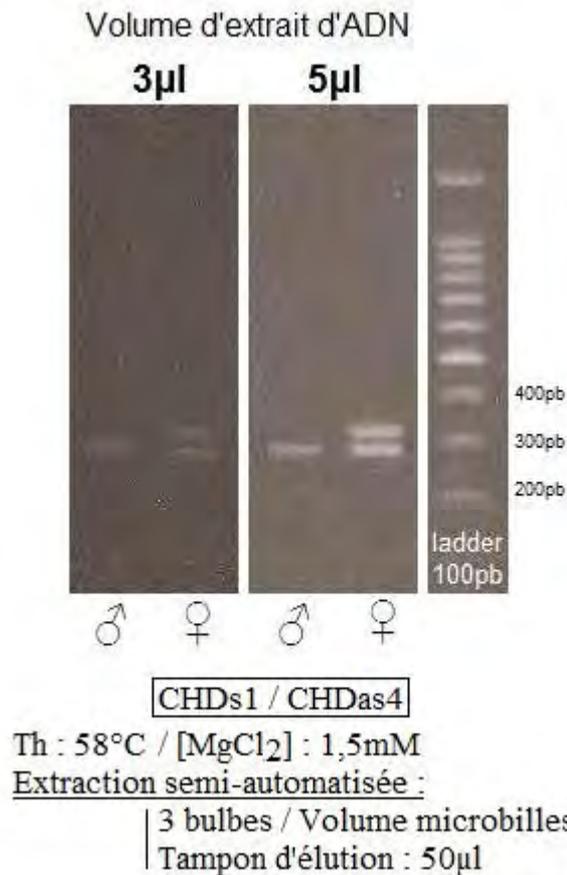


Figure 54 : Exemple de l'effet de l'augmentation de la prise d'essai d'ADN chez le couple de perruche Kakariki.

- Pour des bulbes de taille moyenne (cas de la perruche de Pennant, Calopsitte, Kakariki, Princesse de Galles, perruche à collier et Cacatoès Rosalbin) à grande (cas du perroquet Gris du Gabon et Pione à tête bleue) nous sommes parvenus à intensifier les signaux par l'utilisation de 3 à 4 bulbes et de 200µl de microbilles. Pour les bulbes dont les calibres étaient les plus petit (perruche Calopsitte et Kakariki), il a fallu, pour le couple CHDs1 / CHDas4 augmenter la prise d'essai de 3µl à 5µl afin d'obtenir des signaux intenses.

- Pour des bulbes de grande taille (cas de l'Amazone de Finsch et du Ara à collier d'or) 100µl de microbilles sur 3 bulbes ont été efficaces ou bien 200µl sur un bulbe unique pour les plus gros (cas du Cacatoès des Moluques, de l'Eclectus et de l'Amazone à ailes oranges).

Il est donc possible de tirer de nos résultats des conditions d'extraction ainsi qu'une adaptation du volume d'extrait d'ADN ajouté au mélange réactionnel permettant d'améliorer la qualité des signaux (tableau XXXIV). Cela nous permet en outre d'expliquer les résultats obtenus pour le Youyou du Sénégal pour lequel un volume de 100µl de microbilles appliqué à 4 bulbes de taille moyenne s'est révélé insuffisant (4 bulbes de ce type requiert 200µl de microbilles).

Tableau XXXIV : Variation du volume de microbilles en fonction du nombre et de la taille des bulbes lors des extractions semi-automatisées.

	Nombre	Volume de microbilles	Volume d'extrait d'ADN	
			CHDs1 / CHDas2	CHDs1 / CHDas4
Bulbes de taille $\leq 5\text{mm}$	3 à 4	200 μl		
Bulbes de taille $\geq 5\text{mm}$	3	100 μl	2 μl	3 à 5 μl
	1	200 μl		
			Th : 56°C [MgCl ₂] : 2mM	Th : 58°C [MgCl ₂] : 1,5mM

b. Spécificité

i. Variation

La spécificité correspond à la fixation correcte des amorces aux endroits attendus. Parfois, les amorces (qui ne sont pas parfaitement complémentaires à la séquence à amplifier, surtout dans le cas d'un test multi-spécifique comme dans notre étude) ne se fixent pas aux endroits voulus et il y a alors apparition de fragments non-spécifiques. Les fragments non-spécifiques peuvent aussi être dus à une hybridation des amorces entre elles (appelée dimérisation d'amorces) ou à une formation de structure en « épingle à cheveux » au sein même d'une amorce (repli de l'amorce sur elle-même).

La spécificité du test de sexage varie en fonction de la stringence du milieu (concentration en MgCl₂ et température d'hybridation) ainsi que du couple d'amorces utilisé (figure 55).

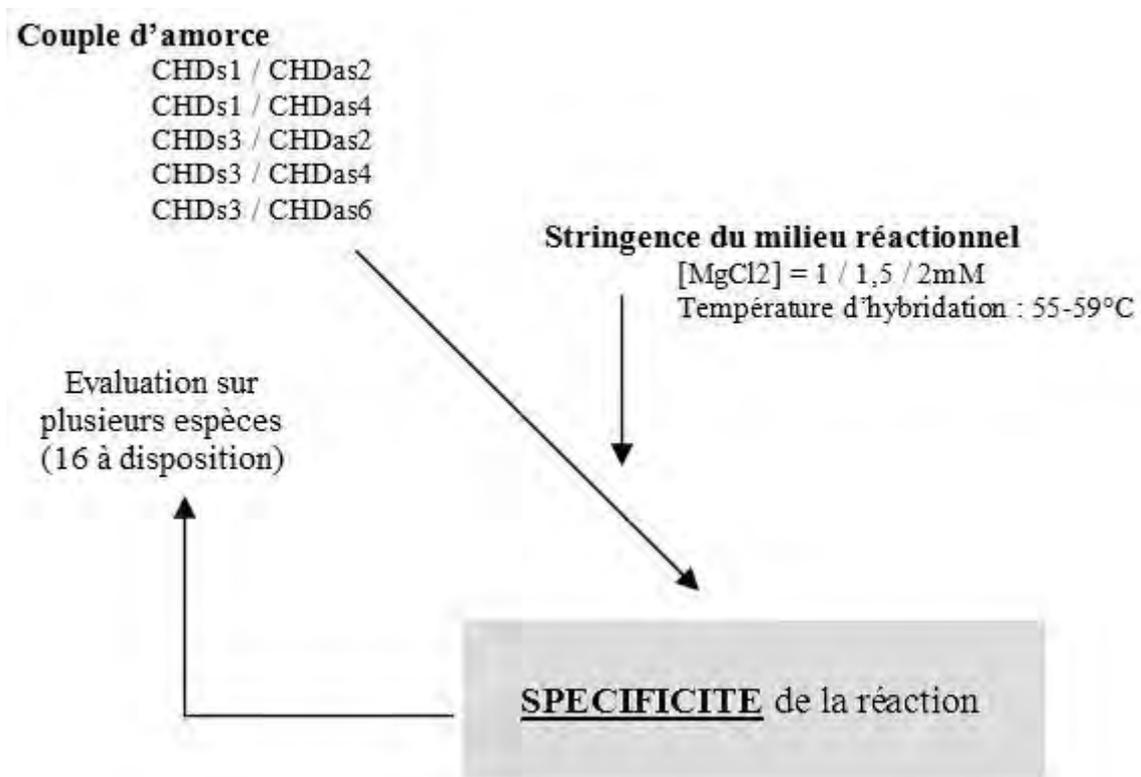


Figure 55 : Influence des différents paramètres sur la spécificité du test de sexage

ii. **Mise au point au cours du test de sexage**

Lors de la mise au point du test et de l'essai des différents couples d'amorces, des bandes non-spécifiques sont apparues.

- Dans le cas de l'amorce CHDs3, les modifications des conditions expérimentales ne nous ont pas permis de supprimer les signaux non-spécifiques apparaissant chez les mâles pour toutes les espèces testées. Ces bandes ne gênaient pas la lecture du gel, mais nous avons préféré écarter les couples CHDs3 / CHDas2, CHDas4 et CHDas6.
- Dans le cas des couples CHDs1 / CHDas2 et CHDas4, nous avons trouvé des conditions expérimentales permettant une excellente spécificité du test, c'est à dire l'obtention d'un signal unique chez les mâles correspondant au gène CHD-Z et de deux signaux chez les femelles correspondants au gène CHD-Z et CHD-W.

IV. Résultats

Dans notre étude, l'extraction ainsi que les amorces ont tout d'abord été testées chez la poule et le coq mais la mise au point a été réalisée pour chacune des espèces de perruches et de perroquets. L'efficacité des couples d'amorces ainsi que la sensibilité du test a ainsi été évalué pour chaque espèce. Lors de cette évaluation nous avons remarqué des différences parfois importantes entre certaines espèces. Nous sommes parvenus à sexer à l'aide des couples CHDs1 / CHDas2 et CHDs1 / CHDas4 la majorité pour l'un, et la totalité des espèces pour l'autre.

A. Amorces

1. Amorce CHDs3

Du fait de son manque de spécificité (signaux non-spécifiques présents chez tous les mâles), l'amorce CHDs3 (couples CHDs3 / CHDas2 ; CHDs3 / CHDas4 et CHDs3 / CHDas6) a été écartée de l'étude.

2. Couples CHDs1 / CHDas2 et CHDs1 / CHDas4

Le couple CHDs1 / CHDas2 a permis de sexer efficacement avec des conditions expérimentales homogènes 12 espèces parmi 15 (tableau XXXV, figure 56).

Tableau XXXV : Liste des espèces sexées avec succès à l'aide du couple d'amorces CHDs1 / CHDas2 aux conditions expérimentales retenues.

Conditions retenues	
CHDs1 / CHDas2	
Température d'hybridation	56°C
Concentration en MgCl ₂	2mM
Espèces	Perruche Kakariki (couple) Perruche Calopsitte (couple) Perruche à collier (couple) Eclectus (couple) Perroquet Gris du Gabon (femelle) Cacatoès Rosalbin (femelle) Pionne à tête bleue (mâle) Cacatoès des Moluques (mâle) Amazone de Finsch (couple) Ara à collier d'or (couple) Youyou du Sénégal (mâle) Amazone à ailes oranges
Espèces non satisfaisantes	Perruche de Barnard (couple) Perruche Princesse de Galles (mâle) Perruche de Pennant (femelle)

*La Perruche Princesse de Galles femelle et Perruche de Pennant mâle
présentent des signaux normaux*

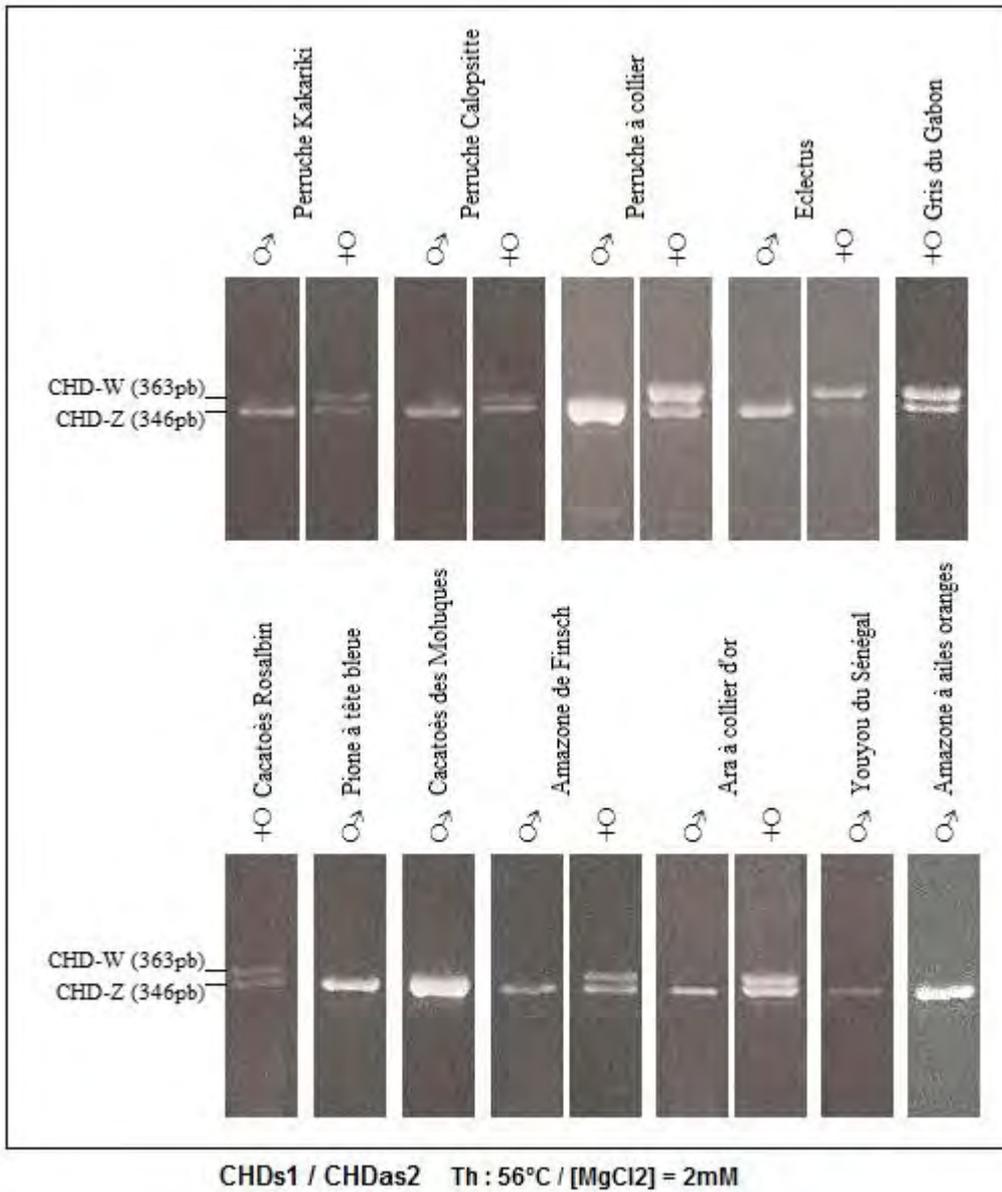


Figure 56 : Signaux obtenus à l'aide du couple d'amorce CHDs1 / CHDas2.

Le couple CHDs1 / CHDas4 a été efficace pour l'ensemble des espèces de notre étude et des conditions expérimentales communes. Ce couple peut donc être retenu pour le sexage moléculaire de ces espèces (tableau XXXVI, figure 57).

Tableau XXXVI : Liste des espèces sexées avec succès à l'aide du couple d'amorces CHDs1 / CHDas4 aux conditions expérimentales retenues.

Conditions retenues	
CHDs1 / CHDas4	
Température d'hybridation	58°C
Concentration en MgCl ₂	1,5mM
Espèces	Perruche Kakariki (couple) Perruche Calopsitte (couple) Perruche à collier (couple) Perruche de Pennant (couple) Perruche Princesse de Galles (couple) Eclectus (femelle) Perroquet Gris du Gabon (femelle) Cacatoès Rosalbin (femelle) Pionne à tête bleue (mâle) Cacatoès des Moluques (mâle) Amazone de Finsch (couple) Ara à collier d'or (couple) Youyou du Sénégal (mâle) Amazone à ailes oranges Perruche de Barnard (2 femelles)
Espèces non satisfaisantes	Aucune

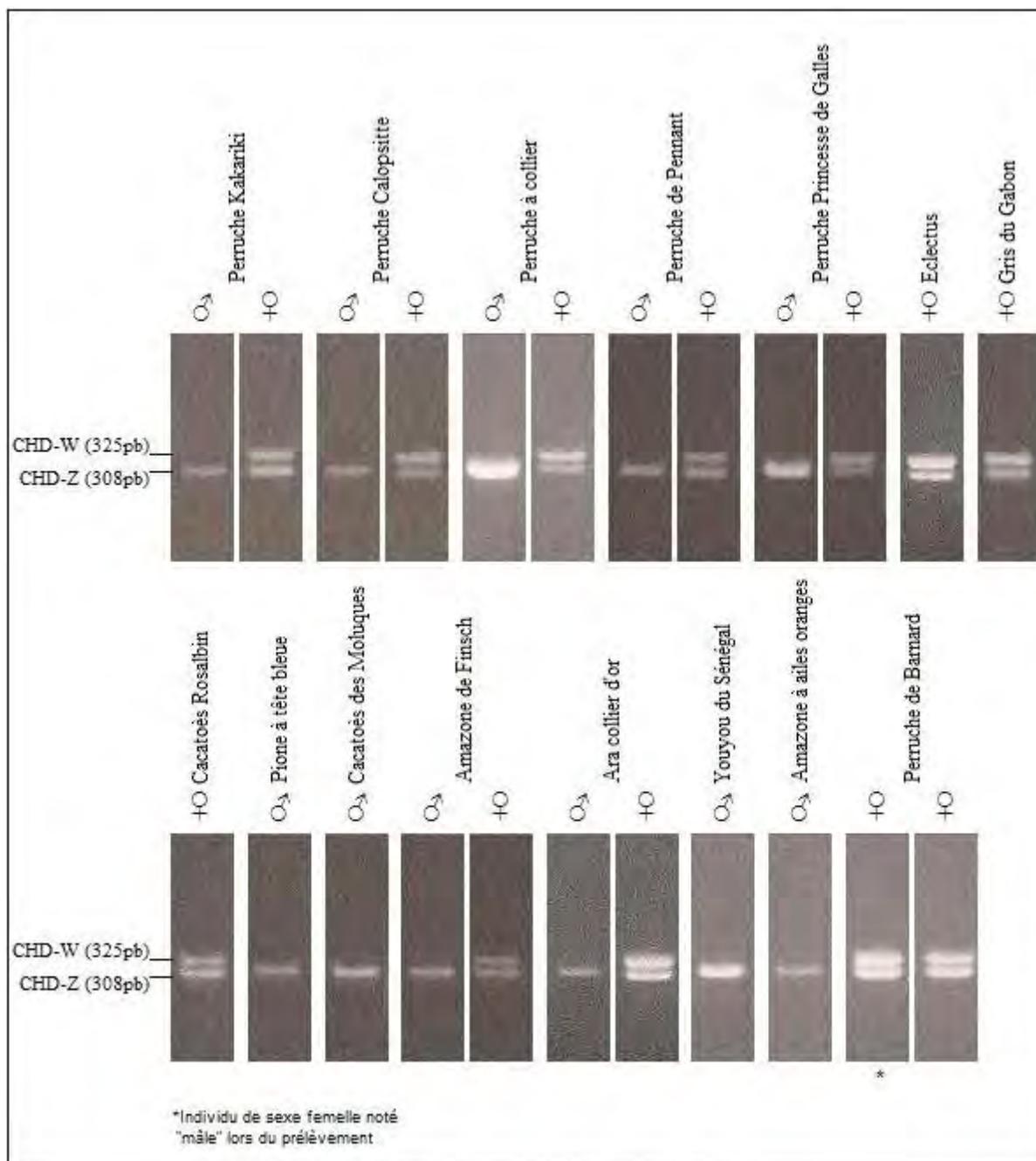


Figure 57 : Signaux obtenus à l'aide du couple d'amorce CHDs1 / CHDas4.

L'éventail d'espèces pouvant être sexées par ces deux tests pourrait être élargi par d'autres études complémentaires.

B. Détermination du sexe du Youyou du Sénégal

Cet individu présente un comportement social d'oiseau captif laissant penser qu'il s'agit d'un mâle. Il est relativement bruyant, doué pour l'imitation du langage parlé (CERIT et

AVANUS, 2007) et d'un caractère dominant (LUESCHER, 2006). Il présente également un comportement sexuel dévié envers son propriétaire, c'est à dire que lors d'une grande excitation ou de jeu, il parade.

Les résultats obtenus à partir d'ADN extrait de manière manuelle ou semi-automatique et à l'aide des couples d'amorces CHDs3 / CHDas2, CHDs3 / CHDas6, CHDs1 / CHDas2 et CHDs1 / CHDas4 sous différentes conditions expérimentales de PCR (stringence, prise d'essai) indiquent qu'il s'agit d'un mâle et sont parfaitement cohérents avec ces observations. Ce perroquet est en outre destiné à la reproduction.

C. Erreur de sexage préalable d'une perruche de Barnard et de l'Amazone à ailes oranges

A l'issue de notre étude, les résultats de détermination du sexe à l'aide de nos amorces de 21 individus sur 23 déjà sexés sont cohérents avec le sexe noté lors du prélèvement. D'après nos résultats, deux individus n'étaient pas du sexe indiqué par le propriétaire ou le détenteur :

- La perruche de Barnard, indiquée mâle, s'est en fait révélée être une femelle à l'issue de notre étude. Le dimorphisme sexuel chez cette espèce est très subtil, et son sexe avait été déterminé par observation de son comportement reproducteur. Nos résultats, obtenus à partir d'ADN extrait de manière manuelle et semi-automatique, et à l'aide de trois couples d'amorces (CHDs1 / CHDas2, CHDs1 / CHDas4 et CHDs3 / CHDas4) au cours de PCR réalisées sous différentes conditions expérimentales (stringence, prise d'essai), sont cohérents entre eux.
- L'amazone à ailes oranges indiquée femelle s'est révélée à l'issue de notre étude être un mâle. Le dimorphisme sexuel est totalement absent chez cette espèce, et son sexe avait été déterminé par méthode moléculaire par un laboratoire privé spécialisé (sexe inscrit sur son certificat de sexage (Annexe 7)). De même que pour la perruche de Barnard, nos résultats, obtenus à partir d'ADN extrait de manière manuelle et semi-automatique, et à l'aide de deux couples d'amorces (CHDs1 / CHDas2 et CHDs1 / CHDas4) au cours de PCR réalisées sous différentes conditions expérimentales (stringence, prise d'essai), sont également cohérents entre eux. Son sexe mâle a été ultérieurement confirmé par l'observation d'un accouplement de cet individu avec une femelle au cours de la saison de reproduction ayant suivi notre étude.

D. Problèmes rencontrés avec les couples CHDs1 / CHDas2 et CHDas4 sur le couple de perruches de Barnard, sur le mâle perruche Princesse de Galles et sur la femelle perruche de Pennant

Lors du test de ces deux couples d'amorces sur l'ADN de la perruche de Barnard extrait de manière semi-automatique, nous n'avons obtenu aucun signal avec des conditions expérimentales identiques aux autres espèces. Ces résultats inattendus proviennent sans doute de l'extrait d'ADN vieillissant au moment du test.

Nous avons rencontré le même problème pour le test du couple CHDs1 / CHDas2 sur l'ADN extrait de manière semi-automatisée de la perruche Princesse de Galles mâle et Pennant femelle.

V. Proposition d'un test de sexage moléculaire par PCR

A. Conditions expérimentales finales

Le test proposé repose sur l'emploi du couple CHDs1 / CHDas4 (tableau XXXVII). Ce test est efficace sur l'ensemble des espèces à disposition (tableau XXXVI)

Le test basé sur l'emploi du couple CHDs1 / CHDas2 est également proposé (tableau XXXVIII) mais n'a pu être validé que sur 12 espèces parmi 15 (tableau XXXV).

Les conditions finale des tests ont été choisies parmi celles qui donnaient les meilleurs résultats (figure 56 et 57). Les tests reposent sur deux grandes étapes : l'extraction et l'amplification par PCR. Pour chaque test, on introduit un témoin négatif (permettant de s'assurer qu'il n'y a eu aucune contamination) et un témoin positif (ADN de poule). Il est à noter qu'en théorie, le témoin positif n'est pas obligatoire puisque les mâles et les femelles présentent une bande CHD-Z commune qui permet de s'assurer que le test a fonctionné.

1. Test de sexage basé sur l'utilisation du couple CHDs1 / CHDas4

Tableau XXXVII : Conditions expérimentales retenues du test CHDs1 / CHDas4.

CHDs1 / CHDas4							
Nature du prélèvement	Bulbe de plume						
Extraction	Manuelle à l'aide du kit <i>NucleoSpin Tissue®</i> , <i>Macherey-Nagel</i>			Semi-automatisée à l'aide du kit <i>Magnasil® KF Genomic System</i> , <i>Promega</i>			
Taille des bulbes	<3mm	[3-5]mm	>5mm	≤5mm	≥5mm		
Nombre	2	2	1	3 à 4	1	3	
Tampon d'éluion	15µl	20µl		50µl			
Volume de microbilles				200µl	200µl	100µl	
Amplification							
Prise d'essai	2µl			3 à 5µl	3µl		
Tampon 10X	1X						
dNTP 10mM	200µM						
[MgCl ₂]	1,5mM						
[CHDs1 / CHDas2]	0,4µM						
Taq 1U/µl	0,03U/µl						
Température d'hybridation	58°C						
Cycle thermocycleur	94°C - 3min ; $\frac{94^{\circ}\text{C}-30\text{s} ; 56^{\circ}\text{C}-45\text{s} ; 72^{\circ}\text{C}-45\text{s}}{45 \text{ cycles}} ; 72^{\circ}\text{C} - 10\text{min} ; 8^{\circ}\text{C} - \infty$						
Migration							
Gel utilisé	Agarose 3% ; TBE (0,5X) ; BET (0,5µg/ml)						
Tampon de migration	TBE (0,5X) ; BET (0,5µg/ml)						
Ladder 100pb	5µl						
Migration	100 Volts - 40min						
Résultats et interprétation				<p>1. Poule (femelle) avec un fragment CHD1-Z à 308pb et un fragment CHD1-W à 325pb</p> <p>2. Mâle avec un fragment CHD1-Z à environ 308pb</p> <p>3. Femelle avec deux fragments CHD1-Z et CHD1-W à environ 308 et 325pb</p>			

2. Test de sexage basé sur l'utilisation du couple CHDs1 / CHDas2

Tableau XXXVIII : Conditions expérimentales retenues du test CHDs1 / CHDas2.

CHDs1 / CHDas2						
Nature du prélèvement	Bulbe de plume					
<u>Extraction</u>	Manuelle à l'aide du kit <i>NucleoSpin Tissue®</i> , <i>Macherey-Nagel</i>			Semi-automatisée à l'aide du kit <i>Magesil® KF Genomic System</i> , <i>Promega</i>		
Taille des bulbes	<3mm	[3-5]mm	>5mm	≤5mm	≥5mm	
Nombre	2	2	1	3 à 4	1	3
Tampon d'éluion	15µl	20µl		50µl		
Volume de microbilles				200µl	200µl	100µl
<u>Amplification</u>						
Prise d'essai	2µl					
Tampon 10X	1X					
dNTP 10mM	200µM					
[MgCl ₂]	2mM					
[CHDs1 / CHDas2]	0,4µM					
Taq 1U/µl	0,03U/µl					
Température d'hybridation	56°C					
Cycle thermocycleur	94°C - 3min ; $\frac{94^{\circ}\text{C}-30\text{s} ; 56^{\circ}\text{C}-45\text{s} ; 72^{\circ}\text{C}-45\text{s}}{45 \text{ cycles}}$; 72°C - 10min ; 8°C - ∞					
<u>Migration</u>						
Gel utilisé	Agarose 3% ; TBE (0,5X) ; BET (0,5µg/ml)					
Tampon de migration	TBE (0,5X) ; BET (0,5µg/ml)					
Ladder 100pb	5µl					
Migration	100 Volts - 40min					
<u>Résultats et interprétation</u>				<p>1. Poule (femelle) avec un fragment CHD1-Z à 346pb et un fragment CHD1-W à 363pb</p> <p>2. Mâle avec un fragment CHD1-Z à environ 346pb</p> <p>3. Femelle avec deux fragments CHD1-Z et CHD1-W à environ 346 et 363pb</p>		

B. Comparaison aux autres tests de sexage moléculaire par PCR déjà publiés

Nous avons légèrement modifié les amorces présentées par Griffiths et son équipe en 1998 (GRIFFITHS et al., 1998) (P8 et P2) que l'on a nommé CHDs1 et CHDas2. Dans notre étude, nous présentons l'efficacité de ce couple sur 9 nouvelles espèces :

- Perruche Kakariki
- Perruche à collier
- Eclectus
- Perroquet Gris du Gabon
- Cacatoès Rosalbin
- Cacatoès des Moluques
- Youyou du Sénégal
- Perruche Princesse de Galles
- Amazone de Finsch

La liste complète des espèces sexées par notre méthode est détaillée dans le tableau XXXV.

Nous avons également mis au point une nouvelle amorce nommée CHDas4 qui nous a permis de sexer avec succès l'ensemble de nos 15 espèces. Parmi elles, la perruche de Barnard, pour laquelle aucune publication relatant un sexage moléculaire n'a été trouvée. Chez cette perruche le dimorphisme sexuel est très subtil et son sexage moléculaire présente beaucoup d'intérêt.

La liste des espèces sexées par notre méthode est détaillé dans le tableau XXXVI.

Ces deux tests nous ont permis en outre de confirmer les risques d'erreur de sexage existant avec certaines méthodes actuellement utilisées :

- L'observation du comportement sexuel et du dimorphisme subtil de la perruche de Barnard notée mâle lors du prélèvement n'ont pas permis un sexage correct ;
- Le sexage moléculaire de l'Amazone à ailes oranges était erroné, et une erreur subsiste sur le certificat de sexage établi par le laboratoire prestataire. Une étude comparative de sexages effectués par différents laboratoires prestataires permettrait éventuellement de préciser la marge d'erreur existante. Ce type d'erreur peut avoir des conséquences

fâcheuses dans le cadre du sexage d'individus appartenant à des espèces menacées donnant lieu à des programmes de reproduction.

Enfin, l'utilité pratique de notre test par rapport aux besoins des demandeurs se mesure par sa simplicité, sa rapidité, ainsi que par la facilité du prélèvement :

- Le besoin en plume est minimal. Notre test requiert au maximum 4 plumes dont l'arrachage peut être pratiqué par un propriétaire, sans passage par le vétérinaire, et qui limite au maximum la douleur pour l'oiseau si les règles de prélèvement fixées sont respectées ;
- L'acheminement est aisé, possible dans une simple enveloppe en papier.

Il répond parfaitement à une demande de propriétaires désireux de connaître le sexe de leur compagnon de manière efficace et non invasive pour leur oiseau. Cette méthode est totalement indépendante de l'âge de l'oiseau et peut se pratiquer au nid, dès l'apparition des premières plumes.

Dans le cadre de l'élevage, elle a pour avantage de pouvoir être pratiquée en période de reproduction, lorsqu'un éleveur veut s'assurer du sexe de deux individus qui se sont appariés, sans craindre de compromettre leur désir de reproduire (notre test est non invasif).

Elle ne renseigne par contre en aucun cas sur l'état fonctionnel de l'appareil reproducteur de l'individu. Les éleveurs en sont conscients et choisissent la plupart du temps l'endoscopie pour le sexage de leurs reproducteurs (HARCOURT-BROWN, 1997), lorsque l'état de l'oiseau le permet, et lorsque celle-ci peut se pratiquer loin de la période de reproduction (l'endoscopie est un acte invasif). Elle leur permet alors d'obtenir des informations sur la maturité sexuelle de leurs oiseaux, et d'estimer ainsi quand la reproduction pourra potentiellement débiter (HARCOURT-BROWN, 1997).

Le développement de notre méthode de sexage moléculaire par PCR chez des espèces d'intérêt conservatoire, ou bien dans le cadre de programme de reproduction à grande échelle serait de part ses différents avantages très utile. Rappelons également le risque d'erreur existant lors du sexage par les laboratoires, qui serait à confirmer par une étude comparative entre les résultats fournis par différents prestataires et une autre méthode fiable telle que l'endoscopie invasive.

DEUXIÈME PARTIE DE
L'ÉTUDE EXPÉRIMENTALE :

**Mise en application d'une
méthode d'endoscopie de sexage
sur une population captive
d'espèces d'oiseaux, avantages
et inconvénients**

CHAPITRE 1 : OBJECTIFS DE L'ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

Le premier volet de la partie expérimentale de notre étude consistait en la mise au point d'un test de sexage moléculaire des Psittaciformes. Parmi les nombreux avantages de cette méthode figurent son caractère totalement non invasif ainsi que son efficacité sur les espèces testées. Elle ne renseigne en outre en aucun cas sur l'état physiologique de l'oiseau, ni sur l'état des gonades.

Cette deuxième partie expérimentale est une mise en application d'une méthode de sexage par endoscopie préalablement décrite dans la littérature, associé à un examen endoscopique général de l'oiseau, sur un ensemble varié d'espèces dont des Psittaciformes. L'endoscopie est un examen de choix, et malgré son caractère invasif, elle reste irremplaçable lorsque l'on veut examiner l'aspect macroscopique des organes. Elle permet un sexage fiable, immédiat tout en renseignant sur les capacités reproductrices de l'oiseau.

Ce travail a été mis en œuvre au parc zoologique de Clères (Seine-maritime, Haute Normandie) en collaboration avec le Docteur Vétérinaire du parc, à l'occasion d'un stage de plusieurs mois que j'ai effectué dans le cadre d'une formation en médecine aviaire (CES de pathologie aviaire). La majorité des sexages par endoscopie décrits dans cette partie s'inscrivent dans un programme de reproduction et de gestion de la collection du parc de Clères, mis en place au cours de mon stage, afin de sexer les individus seuls et dont le sexe n'était pas connu de manière certaine (dans un objectif de former des couples reproducteurs) et afin de sexer les individus en couple mais ne reproduisant pas. Les quelques autres endoscopies ont été pratiquées à des fins diagnostiques, le sexe ayant été déterminé de manière accessoire.

Mon travail a consisté, après formation par le vétérinaire du parc zoologique, à pratiquer les endoscopies à des fins de sexage et de diagnostic.

Nous présenterons dans cette partie la méthode d'endoscopie, ainsi que les résultats, les difficultés de sexage et les complications rencontrées dans certains cas.

I. Matériel

A. Animaux

La totalité des oiseaux endoscopés (n=20) appartenait à la collection ornithologique du Parc de Clères en Seine-maritime (Haute Normandie).

Trois individus de sexe connu (dimorphisme sexuel présent) ont été endoscopés à des fins diagnostiques dans le cadre d'un plan de prophylaxie, suite à un examen sanguin (électrophorèse des protéines plasmatiques) ayant révélé un état inflammatoire. Dans leur cas, le sexage a été fait de manière accessoire. Un de ces oiseaux appartenait à l'ordre des Galliformes (Faisan du Vietnam) et deux à l'ordre des Ansériformes (Tadorne de belon et Bernache du Canada).

Les oiseaux sur lesquels une endoscopie de sexage proprement dite a été pratiquée sont au nombre de 17. Ils appartenait à l'ordre des Psittaciformes (n=11), des Colombiformes (n=3), des Musophagiformes (n=2) et des Ansériformes (famille des *Anhimidae*) (n=1). Ils ont été sélectionnés dans le cadre d'un programme de reproduction et de ce fait de gestion de la collection du parc zoologique, selon plusieurs critères :

- Animaux sans dimorphisme sexuel, maintenus jusqu'alors seuls, d'intérêt conservatoire ou visuel et dont le sexe n'était pas connu de manière certaine (n=11). Le but était de former des couples dans le Parc zoologique de Clères (en faisant rentrer dans la collection des animaux de sexe opposé), ou bien dans un autre parc zoologique dans le cadre d'un échange ;
- Animaux sans dimorphisme sexuel, d'intérêt visuel ou conservatoire, maintenus en couple mais ne reproduisant pas (n=6). Le but était, pour ces animaux, de comprendre les échecs de reproduction.

Les identités de chaque individu ont été vérifiées par lecture de la bague ou de la puce électronique.

Les oiseaux ayant subi une endoscopie au cours de notre étude sont indiqués dans le tableau XXXIX.

Tableau XXXIX : Liste des oiseaux ayant subi une endoscopie.

	Nom commun	Nom latin	Ordre
	Faisan du Vietnam	<i>Lophura hatinhensis</i>	Galliforme
	Tadorne de belon	<i>Tadorna tadoma</i>	Ansériforme
	Bernache du Canada	<i>Branta canadensis</i>	Ansériforme
	Ara macao	<i>Ara macao</i>	Psittaciforme
	Cacatoès à huppe jaune	<i>Cacatua galerita galerita</i>	Psittaciforme
	Cacatoès à huppe blanche	<i>Cacatua alba</i>	Psittaciforme
Individus maintenus seuls	Amazone farineuse	<i>Amazona farinosa guatemalae</i>	Psittaciforme
	Amazone à ailes oranges	<i>Amazona amazonica amazonica</i>	Psittaciforme
	Amazone à front bleu	<i>Amazona aestiva aestiva</i>	Psittaciforme
	Amazone à front jaune	<i>A. ochrocephala ochrocephala</i>	Psittaciforme
	Amazone diadème	<i>Amazona autumnalis autumnalis</i>	Psittaciforme
	Perroquet Gris du Timneh	<i>Psittacus erithacus timneh</i>	Psittaciforme
	Pigeon Wonga	<i>Leucosarcia melanoleuca</i>	Colombiforme
	Kamichi à collier	<i>Chauna torquata</i>	Ansériforme
Individus maintenus en couple (aucune reproduction observée)	Ara ararauna	<i>Ara ararauna</i>	Psittaciforme
	Ara ararauna	<i>Ara ararauna</i>	Psittaciforme
	Touraco à huppe blanche	<i>Tauraco leucolophus</i>	Musophagiforme
	Touraco à huppe blanche	<i>Tauraco leucolophus</i>	Musophagiforme
	Pigeon ducula bicolore	<i>Ducula bicolor</i>	Colombiforme
	Pigeon ducula bicolore	<i>Ducula bicolor</i>	Colombiforme

B. Capture et contention

La capture des oiseaux s'est faite dans leurs volières respectives à l'aide d'une époussette prévue à cet effet, en veillant à ne pas blesser les animaux. Pour les perroquets les plus dociles, la capture s'est faite de manière douce, à l'aide d'une serviette éponge enroulée autour de l'oiseau. La contention s'est faite à mains nues.

C. Anesthésie

Du fait des caractéristiques anatomiques et physiologiques (SINN, 1994), l'induction et le réveil sont plus rapides chez les oiseaux que chez les mammifères. En plus des particularités individuelles, les modalités de contention, la sensibilité au stress, le métabolisme varie également d'un groupe zoologique à l'autre, voire d'une espèce à l'autre.

1. Produits de pré-anesthésie

Dans certains cas, une injection de Doxapram (Dopram® laboratoire VETOQUINOL) a été pratiquée en pré-anesthésie, à raison de 20mg/kg par voie intramusculaire, afin de prévenir tout risque de dépression respiratoire due à l'anesthésie à l'isoflurane (SINN, 1994).

2. Produits anesthésiques

Pour réaliser les endoscopies, nous avons besoin d'atteindre un stade anesthésique 2 et ceci pendant un minimum de 10 minutes, le temps de la manipulation. L'anesthésie gazeuse à l'isoflurane (laboratoire BELAMONT) étant de loin la plus sûre et la plus indiquée chez l'oiseau (ROMAN, 2005 ; SINN, 1994), celle-ci a été utilisée dans le cadre de notre étude. En outre, la profondeur de l'anesthésie peut être modulée en fonction des besoins du chirurgien, et l'isoflurane n'est quasiment pas métabolisé ce qui permet un réveil rapide.

3. Surveillance d'anesthésie

L'usage de champs opératoires transparents nous a permis la visualisation des mouvements respiratoires de l'oiseau en per-opératoire (CHAI et NORIN, 2005 ; SINN, 1994). En outre, un monitoring de la fonction respiratoire a été pratiqué par l'utilisation d'un appareil détecteur d'apnée (Apalert®) branché sur la sonde endotrachéale (SINN, 1994). La profondeur de l'anesthésie a été surveillée par la vitesse du réflex cornéen (celui-ci doit être présent, sans être trop lent ni trop rapide) (ROMAN, 2005 ; SINN, 1994).

4. Produits de soins intensifs

Des molécules de soins intensifs étaient à notre disposition tout au long de la chirurgie, en particulier :

- Doxapram (Dopram®, laboratoire VETOQUINOL) en cas de dépression respiratoire ;
- Adrénaline Aguetant® (laboratoire AGUETTANT) en cas de bradycardie ou d'arrêt cardiaque, qui sont des conséquences possibles de l'anesthésie générale.

D. Équipement d'endoscopie

Toutes les endoscopies ont été réalisées à l'aide du même matériel.

- Un endoscope rigide, matériel de base indispensable, d'une longueur de 20cm et d'un diamètre de 5mm, muni d'une lentille biseauté à 30° (marque STORZ) ;
- Une source de lumière froide de 150W au Xénon ainsi qu'un guide de lumière en fibre de verre (marque OPTOMED) ;
- Une caméra (marque OPTOMED) ;
- Un moniteur (marque SONY).

E. Equipement de chirurgie

1. Temps pré-opératoires

La désinfection du site opératoire s'est faite par utilisation de povidone iodée (Vétédine® savon, et Vétédine® solution, VÉTOQUINOL).

2. Instruments de chirurgie

Les instruments nécessaires à ce type de chirurgie mineure sont ceux habituellement utilisés pour la chirurgie des tissus mous. Pour l'acte chirurgical nécessaire à l'endoscopie invasive, nous avons utilisé en particulier :

- Pour la voie d'abord : une pince mousse de *Adley* (pour les oiseaux de plus petit gabarit) ou une pince mousse fine (pour les oiseaux de plus grande taille), et des ciseaux de *Brophy* courbes à bout pointu ;
- Pour les sutures : un porte-aiguille de *Mayo*.

3. Consommables de chirurgie

L'endoscopie invasive a nécessité les consommables habituels de toute chirurgie mineure :

- champs transparents permettant de visualiser les repères anatomiques pendant l'intervention ainsi que les mouvements respiratoires de l'oiseau ;
- Compresses stériles ;
- Fils de suture résorbables de type Vicryl® 4/0 (décimal 1,5) ;
- Bandes de type Vetrap® afin d'attacher les ailes de l'oiseau pour dégager le site opératoire.

F. Stérilisation du matériel d'endoscopie

La stérilisation de l'endoscope a été réalisée par un trempage d'une durée de 15 à 20 minutes dans une solution de glutaraldéhyde à 2% (Alkacide®, ALKAPHARM) suivi d'un rinçage et d'un séchage selon le protocole proposé par Taylor en 1994 (TAYLOR, 1994).

II. Méthode

A. Anesthésie

1. Capture et examen clinique

Les oiseaux ont été capturés quelques minutes avant l'endoscopie directement dans leurs volières respectives. L'endoscopie étant un acte chirurgical nécessitant une anesthésie, un examen clinique a été pratiqué.

2. Induction et entretien

Les oiseaux ont été directement induits à l'isoflurane à une concentration de 5%, à l'aide d'un masque. Une fois induit, chaque oiseau a été intubé (sonde endotrachéale à usage unique) afin d'assurer le relai de l'anesthésie. La dose a alors été diminuée en fonction de l'individu et de ses réactions.

3. Surveillance de l'anesthésie

La surveillance de l'anesthésie a consisté en un monitoring de la fonction respiratoire par visualisation directe des mouvements respiratoires au travers du champ opératoire transparent et par utilisation du détecteur d'apnée (émission d'un signal sonore à chaque expiration de l'animal).

La profondeur de l'anesthésie a été évaluée par estimation de la présence et de la rapidité du réflex cornéen (ROMAN, 2005).

B. Préparation de l'animal

Le site opératoire a été préparé classiquement : nettoyage et désinfection approfondie de la peau préalablement plumée.

La figure 58 montre la zone opératoire plumée et nettoyée de façon chirurgicale.



Figure 58 : *Ara ararauna* sur lequel le site opératoire a été préparé : zone plumée, nettoyée et désinfectée à l'aide de povidone iodée.
(photo Yannick Lambert, Parc de Clères)

Le champ stérile transparent préalablement fenêtré a ensuite été posé et collé à l'aide de colle à champ en aérosol (Adhesive spray®, KRUISE) prévue à cet effet.

C. Endoscopie latérale gauche par le sac aérien thoracique caudal

1. Mode opératoire

L'oiseau était placé en décubitus latéral droit avec les ailes étendues dorsalement (attachées à l'aide de Vetrap®). La patte gauche était étendue caudalement et fixée à la table de chirurgie à l'aide de ruban adhésif. L'insertion s'est faite entre les deux dernières côtes à mi-chemin entre le grand trochanter et la crête du bréchet. La peau a été incisée sur une longueur de 3 à 4mm et la paroi musculaire sous-jacente disséquée à l'aide des ciseaux pointus. Le fait de ponctionner le sac aérien se caractérise alors par un léger bruit (« pop ») et par l'odeur caractéristique de l'isoflurane qui s'échappe de l'orifice. L'endoscope a été introduit au travers de la paroi du sac aérien thoracique caudal, à 45° par rapport à la table et dans l'axe longitudinal de l'oiseau, en direction crâniale. Au cours de l'endoscopie, l'endoscope a été maintenu au niveau de l'ouverture à l'aide d'une compresse stérile, garantissant une stérilité parfaite de l'opération, un contrôle optimal de l'endoscope ainsi qu'une diffusion limitée de gaz anesthésiques dans la salle de chirurgie.

Une fois l'endoscopie terminée, l'ouverture a été refermée à l'aide d'un point de suture en croix prenant en masse la musculature et la paroi du sac aérien, et à l'aide d'un second point cutané en U.

2. Exploration endoscopique

Une fois dans le sac aérien thoracique caudal, nous avons visualisé :

- De 11h à 1h la surface du poumon et les ostiums pulmonaires ;
- De 2h à 3h la membrane séparant le sac aérien thoracique caudal du sac aérien abdominal ;
- De 4h à 6h le proventricule ;
- De 7h à 8h le lobe gauche du foie ;
- De 9h à 10h la membrane séparant le sac aérien thoracique caudal du sac aérien thoracique crânial.

a. Sexage

Les gonades ont été visualisées après ponction de la membrane séparant le sac aérien thoracique caudal et le sac aérien abdominal, au niveau du pôle crânial du rein. Afin de ne pas confondre un ovaire immature avec la glande surrénale (LIERZ, 2006), la triade gonade – surrénale – pôle crânial du rein a été identifiée à chaque endoscopie.

Par déplacement de l'endoscope, l'examen de la totalité de la gonade a été effectuée, ainsi que la recherche, quand cela était possible, des voies reproductrices (oviducte, spermiducte). La diagnose de la gonade, lorsque celle-ci était difficile, a été facilitée par le repérage de certaines structures anatomiques :

- Chez la femelle, le repérage de la triade gonade – surrénale – pôle crânial du rein ainsi que du ligament suspenseur de l'infundibulum de l'oviducte croisant le pôle crânial du rein (LIERZ, 2006) ;
- Chez le mâle, dans certains cas, la recherche du testicule controlatéral par transparence au travers de la paroi du sac aérien a été pratiquée (LIERZ, 2006). En outre, afin de ne pas confondre le testicule avec une anse digestive, la visualisation de la totalité de son contour a été effectuée.

L'aspect mélanique des gonades chez certains oiseaux a permis une identification facile.

b. Exploration des différents organes

Les mouvements de l'endoscope dans les trois dimensions ont permis l'exploration des trois sacs aériens du côté gauche et des organes qu'ils tapissent. Afin de se déplacer dans le sac aérien thoracique crânial et le sac aérien abdominal, la tête de l'endoscope était appliquée contre leur paroi, et une légère pression contrôlée permettait de trocarer celle-ci.

Pour tous les oiseaux une exploration complète a été effectuée :

- Exploration des organes directement visibles dès l'entrée dans le sac aérien thoracique caudal (poumon, gésier) ;
- Exploration du sac aérien abdominal donnant accès outre aux gonades, à la masse viscérale (notamment jonction iléo-cæcale, première anse duodénale et pancréas), au rein gauche et à la rate ;
- Pénétration dans le sac aérien thoracique crânial donnant accès au cœur et au proventricule.

D. Compilation et archivage des données de sexage

Chaque sexe a été noté sur une feuille de chirurgie comportant la date, les différents paramètres de l'anesthésie, ainsi que les différentes observations relatives à l'exploration chirurgicale. Cette feuille a ensuite été transmise au responsable de la collection animale (détenteur d'un « Certificat de capacité ») afin qu'il puisse enregistrer le sexe de chaque individu dans la base de données informatique du parc. Le capacitaine a eu par la suite pour rôle, dans le programme de reproduction, de former des couples tout en assurant une consanguinité minimale et une gestion du sex-ratio correct pour les espèces concernées.

E. Suivi post-opératoire

Dans les jours qui ont suivi l'endoscopie, chaque oiseau a été surveillé par les soigneurs du parc zoologique afin de s'assurer d'une récupération normale, d'un comportement alimentaire correct et de l'absence de tout comportement inhabituel.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

I. Anesthésie et durée d'intervention

Les durées d'anesthésie ont varié de 8 à 30 minutes avec une moyenne de 15 minutes. Les oiseaux se sont endormis en moyenne en 2 minutes. Les réveils ont été rapides (environ 2 à 3 minutes) pour la quasi-totalité des animaux (n=18). Les réveils ont été plus longs pour deux animaux du fait d'une surcharge graisseuse importante (Pigeon Wonga et Amazone à front bleu).

Sur les 20 anesthésies pratiquées, trois ont conduit à des complications :

- Arrêt respiratoire chez l'Amazone à ailes oranges géré par un injection de Doxapram (Dopram®) à raison de 20mg/kg en intramusculaire ;
- Apnée de courte durée chez le Perroquet Gris du Timneh malgré une injection en pré-opératoire de Doxapram à raison de 20mg/kg en intramusculaire ;
- Arrêt cardio-respiratoire et mort de l'Amazone farineuse malgré la mise en œuvre de soins intensifs : ventilation assistée, injection de 0,2ml d'Adrenaline (Adrénaline Aguetant®) par voie intracardiaque sous contrôle endoscopique et injection intramusculaire de Doxapram (20mg/kg). L'autopsie de cet individu a par la suite révélé une affection intercurrente (maladie de dilatation du proventricule) ainsi qu'une aérosacculite.

Chez l'Amazone à front bleu présentant une surcharge graisseuse très importante, une injection de Doxapram (20mg/kg en intramusculaire) a été pratiquée en pré-opératoire.

Dix-neuf oiseaux sur 20 se sont réveillés correctement, se sont parfaitement remis de leur anesthésie, et aucune anomalie de leur comportement n'a été notée par la suite.

II. Examen endoscopique

Les endoscopies proprement dites ont duré en moyenne 10 minutes (de 3 à 25 minutes selon le niveau de difficulté et les éventuelles complications).

A. Sexage et examen des gonades

Nous avons sexé 16 mâles et quatre femelles. Chez 15 oiseaux, la détermination du sexe a été aisée et rapide. Néanmoins, chez cinq mâles, il a été difficile de déterminer le sexe de manière immédiate :

- du fait d'un dépôt de tissu graisseux important ayant rendu l'exploration difficile chez l'Amazone à front bleu et le Pigeon Wonga. Chez ce dernier, bien que les repères anatomiques de la voie d'abord aient été les mêmes que pour les autres espèces, nous avons initialement pénétré la cavité coelomique et non le sac aérien thoracique caudal. Ceci était probablement lié au dépôt adipeux ayant déplacé les structures anatomiques.
- du fait d'une aéosacculite créant une opacité des sacs aériens et rendant difficile l'observation des différents organes chez le Kamichi à collier, l'Amazone farineuse et l'Amazone à ailes oranges ;
- du fait du faible volume des différents sacs aériens chez l'Amazone farineuse et l'Amazone à ailes oranges. Dans le cas de l'Amazone farineuse, ceci peut s'expliquer par le volume relatif occupé par le proventricule chez un oiseau présentant une maladie de dilatation du proventricule.

Chez ces animaux, l'observation du spermiducte ou bien du testicule controlatéral vu par transparence au travers de la paroi du sac aérien abdominal a permis de confirmer la diagnose du sexe.

De plus, quatre oiseaux ont présenté des gonades mélanisées (couleur noirâtre à noire) : le Cacatoès à huppe jaune femelle, le Cacatoès à huppe blanche mâle, ainsi que les deux Touracos à huppe blanche mâles. Dans le cas de ces derniers, l'aspect mélanique des testicules a facilité leur diagnose.

L'examen des gonades nous a permis de connaître l'état reproducteur des individus sexés : les testicules observés étaient de taille conséquente et d'aspect vascularisé ce qui indiquait une maturité sexuelle normale. En outre, pour les femelles, la taille et l'aspect des follicules (petits, blanchâtres) composant l'ovaire, notamment chez les deux Aras Ararauna, indiquaient que celui-ci était mature mais au repos (les follicules d'un ovaire actif ont une taille très augmentée, sont de couleur jaune et encombrant les sacs aériens caudaux, ce qui représente par ailleurs une contre-indication au sexage par endoscopie (CHAI et ROMAN, 2005)).

Les figures 59 et 60 montrent les résultats de sexage par endoscopie chez le Ara Macao mâle et un Ara Ararauna femelle.

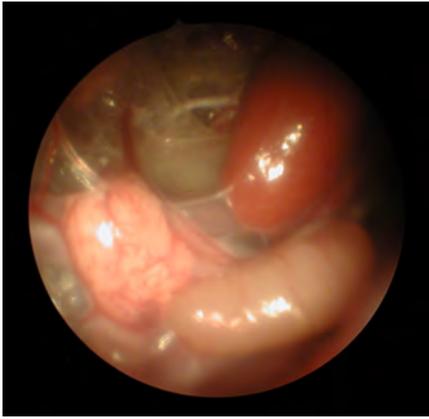


Figure 59 : Testicule mature chez le *Ara Macao* mâle (photo Yannick Roman et Yannick Lambert).



Figure 60 : Ovaire mature chez une femelle *Ara Ararauna* (photo Yannick Roman et Yannick Lambert).

B. Examen des cavités

Seules quelques lésions ont été mises en évidence durant l'endoscopie. Chez l'Amazone farineuse, l'Amazone à ailes oranges et le Kamichi à collier nous avons observé des lésions d'aérosacculite. Un kyste rénal d'environ 1 à 1,5mm de diamètre (lobe moyen du rein gauche) a également été mis en évidence chez un pigeon *Ducula bicolor*. Enfin, chez le Tadorne de belon, l'examen endoscopique a révélé un rein gauche polykystique.

C. Complications

Le moment le plus dangereux de l'endoscopie est l'effraction des sacs aériens. Afin d'éviter tout accident, la manipulation de l'endoscope doit se faire avec douceur en s'assurant le maximum de stabilité (CHAI et ROMAN, 2005). Aucune complication (hémorragie, traumatisme d'un organe et emphysème sous-cutané) due à l'endoscopie n'a eu lieu.

Le tableau XL présente les paramètres des anesthésies ainsi que les résultats d'endoscopie chez les oiseaux sexés.

Nom commun	Age (années)	Durée (minutes)	Anesthésie			Endoscopie		
			Pré-anesthésie	Entretien	Complications	Durée (minutes)	Sexage	Exploration
Faisan du Vietnam	10	30	-	2,0%	-	25	Mâle	-
Tadorne de belon	16	25	-	2,5%	-	20	Mâle	Rein gauche polykystique
Bernache du Canada	13	25	-	2,5%	-	20	Femelle	Dépôt graisseux important
Ara macao	9	15	-	2,0%	-	10	Mâle	-
Cacatoès à huppe jaune	5	25	-	2,0%	-	20	Femelle	Ovaire mélanisé
Cacatoès à huppe blanche	37	15	-	2,5%	-	10	Mâle	Testicules mélanisés
Amazone farineuse	24	24	-	2,5%	Arrêt cardio-respiratoire	20	Mâle (difficile)	Difficile Aérosacculite Sacs aériens de petite taille Doxapram (20mg/kg IM) Adrenaling (0,2ml intra-cardiaque) Mort / Autopsie : Maladie de dilatation du proventricule
Amazone à ailes oranges	25	15	-	3,0%	Apnée (Doxapram 20mg/kg IM)	10	Mâle (difficile)	Difficile Aérosacculite Sacs aériens de petite taille
Amazone à front bleu	>1,5	10	Doxapram 20mg/kg IM	2-2,5%	Réveil long	5	Mâle (difficile)	Dépôt graisseux important
Amazone à front jaune	?	10	-	2,5-3%	-	5	Mâle	-
Amazone diadème	19	10	-	2,5%	-	5	Mâle	-
Peroquet Gris du Timneh	34	8	Doxapram 20mg/kg IM	1,5%	Apnée de courte durée	4	Mâle	-
Pigeon Wonga	6	10	-	3,0%	Réveil long	5	Mâle (difficile)	Dépôt graisseux important Passage par la cavité coelomique
Kamichi à collier	14	15	-	3,5%	-	10	Mâle (difficile)	Difficile Aérosacculite

Sex e connu

Individus maintenus seuls

Nom commun	Age (années)	Anesthésie					Endoscopie			
		Durée (minutes)	Pré-anesthésie	Entretien	Complications	Durée (minutes)	Sexage	Exploration	Remarques	
Ara ararauna	9	20	-	2,0%	-	15	Femelle	-	Ovaire au repos	
Ara ararauna	9	15	-	2,0%	-	10	Femelle	-	Ovaire au repos	
Touraco à huppe blanche	11	10	-	1,5%	-	5	Mâle	-	Testicules mélanisés	
Touraco à huppe blanche	14	8	-	3,0%	-	3	Mâle	-	Testicules mélanisés	
Pigeon ducula bicolore	7,5	10	-	2,0%	-	5	Mâle	-	-	
Pigeon ducula bicolore	15	10	-	3,0%	-	5	Mâle	kyste rénal (lobe moyen gauche)	-	

Individus maintenus en couple (aucune reproduction observée)

Tableau XL: Paramètres d'anesthésie et résultats d'endoscopie chez les oiseaux sexés.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Cette étude illustre parfaitement les intérêts du sexage par endoscopie. Nous avons utilisé l'endoscopie pour son indication dans le sexage ainsi que dans l'exploration des grandes cavités de l'oiseau. Ceci nous a permis, outre le fait de pouvoir effectuer une diagnose fiable du sexe des individus, de mettre en évidence certaines lésions silencieuses, et également de montrer certains inconvénients inhérents au caractère invasif de la procédure et à la nécessité de pratiquer une anesthésie.

I. Animaux et choix de la méthode de sexage

Nous avons sexé au cours de notre étude 20 oiseaux dont 11 perroquets appartenant tous à une collection de parc zoologique. Le sexage s'est inscrit dans un programme de reproduction et de gestion du sex-ratio de la population, ainsi que dans un cadre diagnostique (cas particuliers du Faisan du Vietnam, du Tadorne de belon et de la Bernache du Canada).

L'endoscopie est un acte invasif et ne doit donc pas être pratiquée en période de reproduction afin de ne pas compromettre celle-ci (GRIFFITHS, 2000). Notre étude ayant été menée au printemps (début de la saison de reproduction pour la majorité des espèces) nous avons donc endoscopé en priorité, les animaux seuls, ou bien les animaux en couple n'ayant pas reproduit l'année précédente, et pour lesquels nous avons donc des doutes sérieux sur la nature de leur sexe (cas du couple de pigeon *Ducula bicolor*, des Touracos à huppe blanche et des aras *Ararauna*).

Nous avons choisi le sexage par endoscopie pour le caractère immédiat de son résultat, ainsi que pour sa faculté à donner des informations sur l'état physiologique des gonades (au repos ou en activité). Il est à noter que l'observation des gonades ne fournit aucune indication sur le potentiel reproducteur des individus, et que si une anomalie est visualisée, seule une biopsie peut alors donner des informations à ce sujet (LIERZ, 2006 ; TAYLOR, 1994). De plus, la voie d'abord utilisée nous a permis une visualisation directe de différents organes internes des individus.

Les oiseaux examinés appartiennent à quatre ordres, Psittaciformes, Colombiformes, Musophagiformes et Ansériformes, assez éloignés sur le plan phylogénique, et de morphologies variées (d'une vingtaine de centimètres de long pour les Colombiformes à plus de soixante-quinze centimètres pour le Kamichi à collier (Anséforme)). Ceci nous a donc permis de mettre en application la méthode de sexage par endoscopie sur un éventail assez

large de morphotypes, et donc d'adapter les gestes techniques aux différentes conformations individuelles et inter-spécifiques rencontrées.

Le bien-être des oiseaux a été pris en considération. Les manipulations et la contention ont été réduites au minimum, et les individus n'ont été relâchés dans leurs volières que parfaitement réveillés. La mort de l'Amazone farineuse au cours de l'anesthésie a été surprenante. Son état général était correct et l'examen clinique pré-opératoire n'avait rien laissé transparaître. Son comportement était normal, mais elle présentait une affection à bas bruit que nous ne soupçonnions pas.

II. Sexage

Le sexage par endoscopie par la voie latérale gauche, présente un avantage majeur. Le sac aérien thoracique caudal est en effet un point d'entrée clef pour explorer les sacs aériens adjacents (sacs aériens thoracique crânial et abdominal) et les organes qu'ils tapissent (figure 20) (CHAI et ROMAN, 2005 ; TAYLOR, 1994). Nous avons donc utilisé cette technique au cours de notre étude (l'entrée se fait par le côté gauche puisque chez les femelles adultes seul l'ovaire gauche est développé (CHAI et ROMAN, 2005)).

A. Observation du tractus génital et détermination du sexe

Notre étude a permis d'illustrer la technique de détermination du sexe par endoscopie décrite dans la littérature (CHAI et ROMAN, 2005). Les différentes méthodes permettant une diagnose fiable et rapide des gonades présentées par différents auteurs ont été mises à profit et se sont révélées efficaces :

- Visualisation de la triade pôle crânial du rein-surrénale-gonade afin de ne pas confondre un ovaire immature avec la glande surrénale de couleur le plus souvent crème et d'aspect hétérogène (CHAI et ROMAN, 2005 ; LIERZ, 2006), ou bien recherche du ligament suspenseur de l'infundibulum.
- Recherche de la deuxième gonade controlatérale pour la diagnose d'un testicule (LIERZ, 2006).

Nous avons pu observer, comme il a été décrit, le caractère mélanique des gonades chez certaines espèces (CHAI et ROMAN, 2005 ; HARCOURT-BROWN, 1997 ; POLLOCK et OROSZ, 2002).

B. Détermination de l'état physiologique des gonades

Les caractéristiques morphologiques des gonades matures décrites dans différentes publications (CHAI et ROMAN, 2005 ; HARCOURT-BROWN, 1997 ; TAYLOR, 1994) et permettant une détermination de l'état physiologique des individus se sont également révélées utiles :

- Nous n'avons observé que des testicules de grosse taille, d'aspect arrondi et vascularisé nous permettant d'apprécier leur caractère actif ;
- Ceci est également vrai pour les femelles qui présentaient toutes des ovaires caractéristiques d'individus adultes (grappe de follicules). Les ovaires immatures se présentent en effet sous la forme d'une large bande droite d'aspect spiralée.

III. Exploration des grandes cavités

Au cours de notre étude, nous avons, en plus du sexage, réalisé une exploration systématique des cavités abdominales et thoraciques, permise par la voie d'abord que nous avons utilisée (CHAI et ROMAN, 2005). Cette exploration est possible du fait des particularités anatomiques des oiseaux, dépourvus de diaphragme et dont la cavité thoraco-abdominale est occupée par les sacs aériens permettant la visualisation immédiate des organes internes (TAYLOR, 1994). Elle nous a permis de mettre en évidence des lésions encore silencieuses au moment de l'examen endoscopique (aérosacculite, kyste rénal) et ainsi d'illustrer le potentiel diagnostique de l'endoscopie invasive (CHAI et ROMAN, 2005 ; GANCZ et TAYLOR, 2006 ; GROSSET, 2009 ; HARCOURT-BROWN, 1997).

La perforation des sacs aériens nécessaire à l'exploration de la totalité de la cavité thoraco-abdominale, décrite comme sans conséquences (CHAI et ROMAN, 2005), n'a effectivement eu aucune incidence sur la santé des différents individus que nous avons endoscopé.

IV. Acte chirurgical

A. Anesthésie et risques anesthésiques

1. Choix de l'anesthésie

Nous avons choisi l'anesthésie gazeuse car elle est de loin la plus indiquée chez les oiseaux (CHAI et ROMAN, 2005 ; ROMAN, 2005 ; SINN, 1994). En effet, chez ces animaux, le volume respiratoire et la surface d'échange sont supérieurs par rapport aux

Mammifères. Ces caractéristiques induisent l'absorption rapide des anesthésiques volatiles, et un équilibre entre les gaz inspirés et le sang artérielle rapidement atteint. L'induction et le réveil sont donc rapides, et la modulation de la profondeur de l'anesthésie rapidement mise en œuvre (SINN, 1994). Ceci nous a effectivement permis d'obtenir des anesthésies de bonne qualité. Les inductions ont été rapides, et nous avons pu rapidement réduire la profondeur de l'anesthésie, par diminution de la concentration en isoflurane, lors d'arrêts respiratoires. La sécurité de ce type d'anesthésie rapportée dans la littérature (SINN, 1994) a également été vérifiée par un recouvrement rapide du comportement normal après l'intervention pour chaque individu.

2. Complications anesthésiques

Les arrêts respiratoires ainsi que l'arrêt cardio-respiratoire rencontrés font partie des risques inhérents à l'anesthésie (SINN, 1994), mais ont pu être gérés dans certains cas par les techniques de réanimation décrites et grâce à l'arsenal thérapeutique d'urgence :

- Arrêt de l'anesthésie et mise sous oxygène pur : purge du circuit anesthésique et des sacs aériens (SINN, 1994) ;
- Injection de Doxapram (en cas d'arrêt respiratoire), et d'Adrénaline (en cas d'arrêt cardiaque) (ROMAN, 2005).

Ces techniques ont été efficaces au cours de notre étude dans deux cas sur trois (inefficaces chez l'Amazone farineuse).

Les différentes complications que nous avons rencontrées (apnées, réveil lent, arrêt cardio-respiratoire) sont celles décrites dans la littérature et étaient dues soit au seul effet dépresseur respiratoire de l'agent anesthésique (cas du perroquet Gris du Timneh) , soit à l'état de santé de l'oiseau (cas de l'Amazone farineuse), ou à son état d'embonpoint (un dépôt graisseux important interfère avec la capacité à ventiler de l'oiseau) (SINN, 1994).

Il est à noter qu'un oiseau stressé est plus sujet à faire des apnées (ROMAN, 2005), ce qui peut éventuellement expliquer l'arrêt respiratoire observé chez le perroquet Gris du Timneh.

L'amazone farineuse présentait une maladie de dilatation du proventricule (PDD). La place occupée par le proventricule entraînait donc une diminution importante du volume des sacs aériens et donc une ventilation difficile (GANCZ et TAYLOR, 2006 ; TULLY et HARRISON, 1994).

Afin d'améliorer l'efficacité de la surveillance de l'anesthésie, il aurait été utile d'utiliser un capnographe (EDLING, 2006) mais nous n'en avons pas à disposition. Dans le cas de l'Amazone farineuse, celui-ci nous aurait permis d'anticiper l'arrêt respiratoire.

B. Complications chirurgicales et post-chirurgicales

Les complications chirurgicales et post-chirurgicales précédemment décrites comme rares (CHAI et ROMAN, 2005 ; GANCZ et TAYLOR, 2006) ont été évitées par le respect des règles d'asepsie et de pratique de l'endoscopie. Les gestes adoptés étaient précis avec une stabilité maximale afin d'éviter les traumatismes d'organes, ou encore les hémorragies (CHAI et ROMAN, 2005). Le protocole de stérilisation du matériel d'endoscopie proposé par Taylor (TAYLOR, 1994) ainsi que le respect des règles d'asepsie chirurgicale se sont révélés efficaces puisque aucune infection nosocomiale n'a été observée suite aux différentes interventions pratiquées.

Bien qu'il ait été proposé par certains auteurs de ne pas suturer (CHAI et ROMAN, 2005) sans qu'aucune complication n'ait été rapportée, nous avons préféré effectuer une suture afin d'éviter tout risque d'emphysème sous-cutané et de hernie au point d'entrée (TAYLOR, 1994).

C. Contre-indications de l'endoscopie

Plusieurs contre-indications sont rapportées dans la littérature et sont au nombre de cinq (CHAI et ROMAN, 2005 ; GANCZ et TAYLOR, 2006 ; TAYLOR, 1994). Ces contre-indications représentent soit des facteurs aggravant les risques anesthésiques, soit des facteurs rendant l'exploration difficile. Au cours de notre étude, des complications ont été rencontrées lorsque le volume respiratoire était réduit par diminution de la taille des sacs aériens par effet de masse (accumulation intra-abdominale de tissu adipeux, ou bien dilatation du proventricule (TULLY et HARRISON, 1994)) ou par une aérosacculite. Ces contre-indications, sont largement décrites, et illustrées par notre étude.

TROISIEME PARTIE DE
L'ÉTUDE EXPÉRIMENTALE :
Comparaison des deux
méthodes de sexage

L'endoscopie répond parfaitement à une demande de sexage ainsi que d'examen visuel des gonades et des organes internes des oiseaux. Elle possède des avantages et des inconvénients qui lui sont propres par rapport au sexage moléculaire. Il s'agit d'un acte invasif, nécessitant une anesthésie de l'individu ainsi qu'un suivi post-opératoire afin de s'assurer que celui-ci recouvre ses capacités. La qualité du résultat est dépendante de l'âge de l'oiseau (en particulier du fait de la diagnose difficile des gonades immatures) et ne peut se pratiquer que sur des oiseaux en bonne santé. Dans le cadre d'un élevage, cette méthode a pour inconvénient de ne pouvoir être pratiquée qu'en dehors de la saison de reproduction, afin de ne pas risquer de compromettre l'élevage (GRIFFITHS, 2000). En ces points, le sexage moléculaire apporte des solutions très intéressantes.

Cependant, nous avons pu mettre en évidence dans notre étude sur le sexage moléculaire les inconvénients de cette méthode et notamment son incapacité à donner des informations sur l'état sexuel des individus et sur leur état de santé, contrairement à l'endoscopie, ce qui explique par ailleurs l'intérêt de cette dernière dans les programmes de reproduction, lorsque l'on désire par exemple comprendre certains échecs d'élevage.

Au bilan, il convient de préciser les critères pouvant orienter vers l'un ou l'autre de ces deux types de sexage qui sont aujourd'hui les deux méthodes de choix pour la détermination du sexe des oiseaux, en particulier chez les Psittaciformes présentant peu ou pas de dimorphisme sexuel. Le choix doit se faire en fonction des informations que l'on veut obtenir, de l'oiseau, et des possibilités.

Tout d'abord, le contexte est à prendre en considération et le choix peut s'orienter vers le sexage moléculaire lorsque l'on veut étudier le sex-ratio d'une populations sauvage ou captive, ou lorsque l'on veut simplement connaître le sexe d'un perroquet dans le cadre d'un diagnostic d'une maladie liée au sexe, ou dans le cadre d'un diagnostic de convenance. Le choix s'orientera vers l'endoscopie lors le sexage s'inscrit dans un programme de reproduction et de gestion d'une population, ou lors du sexage de perroquets appartenant à un éleveur désirant former des couples féconds, ou encore lors d'échec de reproduction. Dans ce cas, le choix sera également influencé par le désir d'obtenir de manière immédiate des informations sur l'état des différents organes internes ainsi que sur l'état des gonades et leur état d'activité.

Les critères à prendre également en considération concernent l'oiseau. Selon son état physiologique (proximité de la période de reproduction), son rôle en tant que reproducteur et

son espèce on s'orientera vers l'une ou l'autre des techniques. Le sexage moléculaire sera très utile de part la sécurité qu'il procure lors du sexage d'espèces de grand intérêt conservatoire (comme ça a été le cas pour le dernier Ara de Spix sauvage, dont le sexage moléculaire a été réalisé par Griffiths et Tiwari en 1995), financier ou sentimental. Il sera également préféré chez un animal dont la fragilité, ou l'état général (embonpoint, maladie intercurrente) compromettraient une anesthésie sécurisée (cas de l'Amazone farineuse n'ayant pas supporté l'anesthésie du fait d'une maladie de dilatation du proventricule). Dans le cadre d'animaux destinés à l'élevage, ou encore lors d'échec de reproduction (doute sur le sexe), l'endoscopie pourra être pratiquée si la morphologie (taille suffisante) et l'état de l'oiseau le permettent et si le sexage est pratiqué en dehors de la période de reproduction (GRIFFITHS, 2000).

Enfin, les autres critères à prendre en compte sont d'ordre logistique. Le choix de la méthode se fera selon le nombre d'individus à sexer, le temps disponible, le matériel à disposition et les possibilités d'accès à l'une ou l'autre des méthodes.

L'endoscopie nécessite un déplacement des oiseaux vers une structure adaptée (dans notre étude, les endoscopies ont été effectuées au sein même du parc zoologique, équipé d'une salle de chirurgie et d'un endoscope). A l'inverse, le sexage par PCR nécessite simplement l'acheminement des prélèvements, par voie postale dans des conditionnements simples, vers un laboratoire compétent. En outre, une endoscopie sera pratiquée lorsque le sexe doit être déterminé de manière immédiate (un laboratoire prestataire de sexage par méthode moléculaire fournit un certificat de sexage en moyenne quatre à cinq jours après réception des échantillons). Le choix sera également fait selon le nombre d'individus à sexer et le prix de la prestation. Les analyses moléculaires peuvent être sériées (comme ça a été le cas au cours de notre mise au point d'un test de sexage moléculaire des perroquets) et certains laboratoires proposent des prix dégressifs en fonction du nombre d'échantillons reçus, les tarifs variant environ de 15 à 20 euros* par oiseau. Une endoscopie coûte en moyenne 41 euros* (anesthésie et prise en charge chirurgicale comprises) mais ce tarif peut augmenter si le manipulateur est amené à effectuer des prélèvements et analyses de routine, ou bien si les résultats de l'exploration chirurgicale le nécessitent.

Concernant le sexage pratiqué par des laboratoires prestataires, nous avons pu mettre en évidence un risque possible d'erreur de sexage moléculaire (cas de l'Amazone à ailes oranges). Ce risque n'a cependant pas été quantifié par des études comparatives de sexages par PCR proposés au public par les laboratoires (en envoyant par exemple les mêmes prélèvements à différents établissements et en comparant les résultats par endoscopie). De

telles études pourraient permettre d'affirmer ou d'infirmer cet hypothèse, et d'avoir une idée de la fiabilité des tests moléculaires utilisés en routine.

(*Tarifs approximatifs constatés chez différents prestataires.)

Conclusion

CONCLUSION

Le monde des Psittaciformes, regroupant les perroquets au sens large du terme, est vaste et l'objet de nombreuses études scientifiques. Leur côté attractif d'animal de compagnie, doté d'une intelligence hors du commun, passionne le public et la recherche. Cependant, certaines espèces de cet ordre étant en danger d'extinction, mener à bien un programme de reproduction revêt une importance capitale. Ainsi, le sexage est la clé de voûte de tout élevage et de toute étude du sex-ratio de populations captives ou sauvages, dans le cadre de leur sauvegarde. En clientèle, il s'inscrit souvent comme un examen de convenance ou dans une démarche diagnostique entreprise par le vétérinaire praticien.

Chez les oiseaux, les gonades ne sont pas visibles extérieurement. Si, pour quelques espèces de perroquets, les différences morphologiques entre le mâle et la femelle autorisent un sexage rapide par une simple observation, pour soixante-quinze pour cent d'entre eux ce dimorphisme est absent. Pour une grande majorité également, il n'apparaît que très tardivement, ce qui reporte d'autant la formation de couples ou la date de cession d'un oisillon. Le sexage d'un perroquet appartenant à une espèce monomorphe consiste à mettre en évidence un caractère propre au mâle ou à la femelle, que ce soit à l'échelle de l'organe, du noyau cellulaire, ou encore depuis l'avènement de la génétique moléculaire, à l'échelle du gène. Certaines méthodes ne sont actuellement plus utilisées en routine de par leur manque de fiabilité, leur coût ou leur difficulté de mise en œuvre. D'autres ne sont encore qu'au stade de la recherche expérimentale. Deux techniques répondent aujourd'hui parfaitement à la problématique de l'efficacité du sexage des perroquets : la PCR et l'endoscopie.

Notre étude a montré la fiabilité et le caractère pratique du test de sexage moléculaire par PCR, à partir de bulbes de plumes, mis au point au Laboratoire Vétérinaire Départemental du Rhône sur quinze espèces. L'utilisation de l'endoscopie dans le cadre d'un élevage de perroquets au parc zoologique de Clères (Seine-Maritime, Haute Normandie) nous a permis d'en faire ressortir les avantages et les inconvénients.

Le caractère comparatif de l'étude expérimentale associant la mise au point de la méthode moléculaire et la mise en application de l'endoscopie de sexage permet d'illustrer les capacités et les limites de chacune.

La PCR réalisée à partir de l'ADN extrait de plumes est une méthode rapide, fiable sur les espèces testées, peu invasive et non stressante pour l'animal. Elle peut être effectuée, sans risque pour des perroquets dont les valeurs sentimentale, économique ou conservatoire sont souvent élevées. La démarche peut être entreprise par le propriétaire s'adressant directement à un laboratoire prestataire. La commercialisation et l'utilisation, à une plus grande échelle, du test mis au point par le Laboratoire Vétérinaire Départemental du Rhône seraient possibles après vérification de son application à d'autres espèces de Psittaciformes voire à d'autres espèces d'oiseaux.

L'endoscopie comprend des risques inhérents au caractère invasif de l'acte chirurgical mais permet, outre le sexage, une exploration des fonctions reproductrices et de l'état de santé de l'oiseau par visualisation directe des gonades et des organes internes. La fiabilité du résultat est dépendante de l'âge de l'animal, et les risques sont liés à son état de santé et aux capacités du manipulateur.

Pour ces deux méthodes, les risques d'erreur de sexage sont aussi évoqués. Des conditions expérimentales ou des amorces inadaptées à l'espèce au cours du sexage moléculaire, ou bien l'éventuelle difficulté de visualisation ou de diagnose des gonades lors

d'endoscopie peuvent conduire à de mauvais résultats. Les conséquences peuvent être sérieuses, en particulier dans le cadre d'espèces d'intérêt conservatoire ou financier. Les risques d'erreurs pourraient être quantifiés par une étude comparative à grande échelle de sexage par PCR par différents prestataires couplés à des endoscopies.

L'utilité du sexage par PCR a été démontré à plusieurs reprises dans le cadre de la conservation d'espèces bénéficiant d'un programme de reproduction comme le célèbre Ara de Spix ou le Kakapo de Nouvelle-Zélande. Son utilité pour les propriétaires soucieux du stress infligé par une chirurgie ainsi que lors de cessions d'oisillons par les éleveurs dont le choix repose sur des considérations économiques, provient de la sécurité et du coût de la méthode. Le choix s'oriente vers l'endoscopie lorsque le sexage s'inscrit dans un suivi d'élevage lors d'échec de reproduction, ou lorsque la nécessité de l'associer à un bilan sanitaire se fait sentir.

Le professeur responsable
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

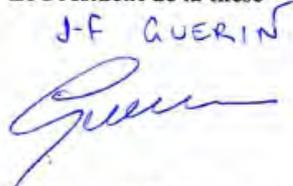
F. Grain


Vu : Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Par délégation
Pr F. Grain - DEVE

VetAgro Sup
Campus Vétérinaire

Le Président de la thèse

J-F GUERIN


Vu et permis d'imprimer

Lyon, le

19 OCT. 2018

Pour le Président de l'Université,
Le Président du Comité de Coordination des Études Médicales,
Professeur F.N GILLY



Références bibliographiques

- Aquino R., Ferrari I. (1990)
 Chromosome study of *Amazona amazonica* and *Amazona aestiva* (Aves :
 Psittaciformes) : determination of chromosome number and identification of sex
 chromosomes by C-banding methods.
 Genetica 81, (1), 1-3
- Alderton D. (1992)
 Parrots.
 Editions Whittet Books, London. 128p.
- Arnold K.E., Owens I.P., Marshall N.J. (2002)
 Fluorescent signaling in parrots.
 Science, 295, (5552), 92
- Bello N., Sanchez A. (1999)
 The identification of sex-specific DNA marker in the ostrich using a random amplified
 polymorphic DNA (RAPD) assay.
 Mol. Ecol., 8, (4), 667-669
- Bello N., Francino O., Sánchez A. (2001)
 Isolation of genomic DNA from feathers.
 J. Vet. Diagn. Invest., 13, (2), 162-164
- Benett A.T.D., Cuthill I.C., Partridge I.C., Maier E.J. (1996)
 Ultraviolet vision and mate choice in zebra finches
 Nature, 380, (6573), 433-435
- Bermudez-Humaran L.G., Garcia-Garcia A., Leal-Garza C.H., Riojas-Valdes V.M., Jaramillo-
 Rangel G., Montes-de-Oca-Luna R. (2002)
 Molecular sexing of monomorphic endangered Ara birds.
 J. exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol., 292, (7), 677-680
- Bond A.B., Wilson K.J., Diamond J. (1991)
 Sexual dimorphism in the Kea *Nestor notabilis*.
 Emu, 91, (1), 12-19
- Bougerol C. (1992)
 L'endoscopie chez les oiseaux : application au sexage.
 Rec. Med. Vét., 168, (3 / 4), 303-307
- Brock M.K., White B.N. (1992)
 Application of DNA fingerprinting to the recovery program of the endangered Puerto
 Rican parrot.
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 11121-11125

- Caparroz R., Duarte J.M.B. (2004)
 Chromosomal similarity between the Scaly-headed parrot (*Pionus maximiliani*), the Short-tailed parrot (*Graydidascalus brachyurus*) and the Yellow-faced parrot (*Salvatoria xanthops*) (Psittaciformes : Aves) : A cytotaxonomic analysis.
 Genet. Mol. Biol., 27, (4), 522-528
- Caparroz R., Miyaki C.Y., Bampi M.I., Wajntal A. (2001)
 Analysis of the genetic variability in a sample of the remaining group of Spix's Macaw (*Cyanopsitta spixii*, Psittaciformes : Aves) by DNA fingerprinting.
 Biol. Conserv., 99, (3), 307-311
- Cerit H., Avanus K. (2007)
 Sex determination by CHDW and CHDZ genes of avian sex chromosomes in *Nymphicus hollandicus*.
 Turk. J. Vet. Anim. Sci., 31, (6), 371-374
- Chai N., Roman Y. (2005)
 L'endoscopie invasive et non invasive.
 Point vét., 253, 66-73
- Chang H.W., Chou T.C., Gu D.L., Cheng C.A., Chang C.C., Yao C.T. et al. (2008)
 An improved PCR method for gender identification of eagles.
 Mol. Cell. Probes, 22, (3), 184-188
- Clubb S.L. (1986)
 Sex determination techniques.
 In : Harrison G.J., Harrison L.R. [eds.]. Clinical avian medicine and surgery.
 W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA. 613-619
- Costantini V., Guaricci A.C., Laricchiuta P., Rausa F., Lacalandra G.M. (2008)
 DNA sexing in Humboldt Penguins (*Spheniscus humboldti*) from feather samples.
 Anim. Reprod. Sci., 106, (1-2), 162-167
- Crosta L., Gerlach H., Bürkle M., Timossi L. (2002)
 Endoscopic Testicular Biopsy Technique in Psittaciformes.
 J. Avian Med. Surg., 16, (2), 106-110
- Czekala N.M., Lasley B.L. (1977)
 A technical note on sex determination in monomorphic birds using faecal steroid analysis.
 Int. Zoo Yearb., 17, 209-211
- Davis C. (1997)
 Behavior.
 In : Altman R.B., Clubb S.L., Dorrestein G.M., Quesenberry K., [eds.]. Avian Medicine and Surgery.
 WB Saunders, Philadelphia, 96-100

- De Boer, L.E.M., Belterman R.H.R. (1980).
The somatic chromosomes of three parrots: The Kea (*Nestor notabilis*), the Yellow-headed Parrot (*Amazona ochrocephala*) and the Grey Parrot (*Psittacus erithacus*).
Acta zool. pathol. Antverp , 75, 9-18
- De Lucca E.J. (1984)
A comparative study of the chromosomes in 5 species of birds from the genus *Aratinga* (Psittaciformes : Aves).
Cytologia, 49, (3), 537-545
- De Lucca E.J. (1985)
The somatic chromosomes of *Brotogeris sanctithomae* and *Brotogeris versicolorus*.
Genet. Iber., 37, 39-45
- De Lucca E.J., De Marco D.A (1983)
Chromosomal polymorphism in *Forpus xanthopterygius* (Psittaciformes : Aves).
Caryologia, 36, (4), 355-361
- De Lucca E.J., Shirley L.R., Lanier C. (1991)
Karyotype studies in twenty-two species of parrots (Psittaciformes : Aves).
Rev. Brasil. Genet. 14, (1), 73-98
- De Mattos K.K., Nassif del Lama S., Sallez A.R.C., Francisco M.R., Medaglia A., Moreira Tomasulo A. et al. (1998)
Sex determination of parrots *Amazona a. aestiva* and *Amazona amazonica* using the polymerase chain reaction.
J. exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol., 281, (3), 217-219
- De Wailly P., Prin J., Prin G. (2004)
Atlas de l'ornithologie. Vol. 1. Perruches et perroquets.
Animalia Editions, Paris, France. 192 p.
- Duarte J.M.B., Giannoni M.L. (1990)
Karyotype of the little blue macaw *Cyanopsitta spixii* (Psittaciformes, Aves).
Braz. J. Genet., 13, (1), 137-140
- Duarte J.M.B., Caparroz R. (1995)
Cytotaxonomic analysis of Brazilian species of the genus *Amazona* (Psittacidae, Aves) and confirmation of the genus *Salvatoria* (Ribeiro, 1920).
Braz. J. Genet., 18, (4), 623-628
- Dubiec A., Zagalska-Neubauer M. (2006)
Molecular techniques for sex identification in birds
Biol. Lett., 43, (1), 3-12
- Edling T.M. (2006)
Updates in anesthesia and monitoring.
In : Harrison G.J., Lightfoot T.L. [eds.]. Clinical avian medicine, Volume II.
Spix Publishing, Inc., Palm Beach, Florida. 747-760

- Fillon V., Seguela A. (1995)
Le sexage des oiseaux par l'analyse chromosomique.
Rev. Méd. Vét., 146, (1), 53-58
- Forshaw J.M. (1989)
Parrots of the World. 3rd Ed.
Weldon Publishing, Willoughby, Australia. 672 p.
- Forshaw J.M. (2006)
Parrots of the World : An Identification Guide.
Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA. 400 p.
- Forshaw J.M. (2010)
Parrots of the World.
Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA. 336 p.
- Francisco M.R., Galetti P.M. (2001)
Cytotaxonomic considerations on Neotropical Psittacidae birds and description of three new karyotypes.
Hereditas, 134, (3), 225-228
- Gancz A.Y., Taylor W.M. (2006)
Applications of endoscopy for avian medicine.
Isr. J. vet. Med., 61, (1), 20-25
- Garcia-Moreno J., Mindell D.P. (2000)
Rooting a phylogeny with homologous genes on opposite sex chromosomes (gametologs) : a case study using avian CHD.
Mol. Biol. Evol., 17, (12), 1826-1832
- Goldschmidt B., Nogueira D.M., Monsores D.W., Souza L.M. (1997)
Chromosome study in two *Aratinga* species (*A. guarouba* and *A. acuticaudata*) (Psittaciformes).
Braz. J. Genet., 20, (4), 659-662
- Grant A. (2001)
DNA sexing of brown kiwi (*Apteryx mantelli*) from feather samples.
DOC Science Internal Series 13, Department of Conservation, Wellington, 16 p.
- Griffiths R. (2000)
Sex identification in birds.
Sem. Avian Exot. Pet Med., 9, (1), 14-26
- Griffiths R., Holland P.W.H. (1990)
A novel avian W chromosome DNA repeat sequence in the lesser black-backed gull (*Larus fuscus*).
Chromosoma, 99, (4), 243-250

- Griffiths R., Tiwari B. (1993)
The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8324-8326
- Griffiths R., Tiwari B. (1995)
Sex of the last wild Spix's macaw.
Nature, 375, (6531), 454
- Griffiths R., Orr K. (1999)
The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers.
Mol. Ecol., 8, (4), 671-674
- Griffiths R., Double M.C., Orr K., Dawson R.J.G. (1998)
A DNA test to sex most birds.
Mol. Ecol., 7, (8), 1071-1075
- Griggio M., Zanollo V., Hoi H. (2010)
UV plumage color is an honest signal of quality in male budgerigars.
Ecol. Res., 25, (1), 77-82
- Grosset C. (2009)
L'endoscopie rigide, un outil diagnostique et thérapeutique.
Dépêche vet., 1043
- Harcourt-Brown N. (1997)
Endoscopy in parrots.
In Practice, 19, 2-13
- Harrison G.J. (1994)
Perspective on parrot behavior.
In : Ritchie B.W., Harrison G.J., Harrison L.R. [eds.]. Avian medicine : principles and applications.
Wingers Publishing, Fort Worth, Florida. 97-108
- Harvey M.G., Bonter D.N., Stenzler L.M., Lovette I.J. (2006)
A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing.
J. Field Ornithol., 77, (2), 136-140
- Heinsohn R. (2008)
Ecology and evolution of the enigmatic Eclectus parrot (*Eclectus roratus*).
J. Avian Med. Surg., 22, (2), 146-150
- Horváth M.B., Martínez-Cruz B., Negro J.J., Kalmár L., Godoy J.A. (2005)
An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds.
J. Avian Biol., 36, (1), 84-88

- Hunt S., Cuthill I.C., Benett A.T.D., Griffiths R. (1999)
 Preferences for ultraviolet partners in the blue tit
Anim. Behav., 58, (4), 809-815
- Huth H.H., Burkhardt D. (1972)
 Der spektrale Sehebereich eines Violettöhr-Kolibris.
Naturwissenschaften, 59, 650
- Lee J.C., Tsai L.C., Hwa P.Y., Chan C.L., Huang A., Chin S.C. et al. (2010)
 A novel strategy for avian species and gender identification using the CHD gene.
Mol. Cell. Probes, 24, (1), 27-31
- Lennox A.M., Harrison G.J. (2006)
 The companion bird.
 In : Harrison G.J., Lightfoot T.L. [eds.]. *Clinical avian medicine, Volume I.*
 Spix Publishing, Inc., Palm Beach, Florida. 29-44
- Lessells C.M., Mateman A.C. (1998)
 Sexing birds using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers.
Mol. Ecol. 7, (2), 187-195
- Lierz M. (2006)
 Diagnostic value of endoscopy and biopsy.
 In : Harrison G.J., Lightfoot T.L. [eds.]. *Clinical avian medicine, Volume II.*
 Spix Publishing, Inc., Palm Beach, Florida. 631-652
- Longmire J.L., Maltbie M., Pavelka R.W., Smith L.M., Witte S.M., Ryder O.A. et al. (1993)
 Gender identification in birds using microsatellite DNA fingerprint analysis.
The Auk, 110, (2), 378-381
- Lucchini V. (2003)
 AFLP : a useful tool for biodiversity conservation and management.
C. R. Biol., 326, (Suppl. 1), S43-S48
- Luescher A.U. [eds.]. (2006)
 Manual of parrot behavior.
 Blackwell Publishing, Ames, Iowa. 332p
- Lunardi V.O., Francisco M.R., Rocha G.T., Goldschmidt B., Galetti Junior P.M. (2003)
 Karyotype description of two Neotropical Psittacidae species: The endangered
 Hyacinth Macaw, *Anodorhynchus hyacinthinus*, and the Hawk-headed
 Parrot, *Deroptryus accipitrinus* (Psittaciformes : Aves), and its significance for
 conservation plans.
Genet. Mol. Biol., 26, (3), 283-287
- Marsden J.E., May B. (1984)
 Feather pulp : a non-destructive sampling technique for electrophoretic studies of
 birds.
Auk, 101, (1), 173-175

- McLelland J. (1990)
 External features and integument.
 In : A colour atlas of avian anatomy.
 Wolf Publishing Ltd, Aylesbury, England. 9-32
- Merton D.V., Morris R.B., Atkinson I.A.E. (1984)
 Lek behaviour in a parrot : the Kakapo *Stringops habroptilus* of New Zealand.
 Ibis, 126, (3), 277-283
- Miyaki C.Y., Hanotte O., Wajntal A., Burke T. (1992)
 Sex typing of *Aratinga* parrots using the human minisatellite probe 33.15.
 Nucleic Acids Res., 20, (19), 5235-5236
- Miyaki C.Y., Hanotte O., Wajntal A., Burke T. (1995)
 DNA fingerprinting in the endangered parrot *Aratinga guarouba* and other *Aratinga*
 species.
 Braz. J. Genet., 18, (3), 405-411
- Miyaki C.Y., Duarte J.M.B., Caparroz R., Nunes A.L.V., Wajntal A. (1997a)
 Sex identification of South American parrots (Psittacidae, Aves) using the human
 minisatellite probe 33.15.
 The Auk, 114, (3), 516-520
- Miyaki C.Y., Pereira S.L., Biasia I., Wajntal A. (1997b)
 DNA fingerprinting applied to parrot captive breeding programs.
 Ararajuba, 5, (2), 127-133
- Miyaki C.Y., Griffiths R., Orr K., Nahum L.A., Pereira S.L., Wajntal A. (1998)
 Sex identification of Parrots, Toucans, and Curassows by PCR : Perspectives for wild
 and captive population studies.
 Zoo Biol., 17, (5), 415-423
- Moorhouse R.J., Sibley M.J., Lloyd B.D., Greene T.C. (1999)
 Sexual dimorphism in the North Island Kaka *Nestor meridionalis septentrionalis* :
 selection for enhanced male provisioning ability ?
 Ibis, 141, (4), 644-651
- Morin P.A., Messier J., Woodruff D.S. (1994)
 DNA extraction, amplification, and direct sequencing from hornbill feathers.
 J. Sci. Soc. Thailand, 20, (1), 31-41
- Murray M.J., Schildger B., Taylor M. (2001)
 Endoscopy in Birds, Reptiles, Amphibians and Fish.
 Endo-Press [eds.], Tuttlingen, Germany. 8-9
- Nespor A.A., Lukazewicz M.J., Dooling R.J., Ball G.F. (1996)
 Testosterone induction of male-like vocalizations in female budgerigars
 (*Melopsittacus undulatus*).
 Horm. Behav., 30, (2), 162-169

- Nogueira D.M., De Souza L.M., Goldschmidt B., Pinheiro Da Silva C., Monsores D.W. (2006)
The karyotype of the critically endangered Lear's macaw, *Anodorhynchus leari* Bonaparte 1856 (Aves, Psittaciformes).
Genet. Mol. Biol., 29, (4), 656-658
- Peters J.L. (1937)
Check-List of Birds of the World, Volume III.
Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA., 311 p.
- Petersen J.L., Bischof R., Krapu G.L., Szalanski A.L. (2003)
Genetic Variation in the Midcontinental Population of Sandhill Cranes, *Grus canadensis*.
Biochem. Genet., 41, (1-2), 1-12
- Pollock C.G., Orosz S.E. (2002)
Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology.
Vet. Clin. Exot. Anim., 5, 441-474
- Prus S.E., Schmutz S.M. (1987)
Comparative efficiency and accuracy of surgical and cytogenetic sexing in Psittacines.
Avian Dis., 31, (2), 420-424
- Richner H. (1989)
Avian laparoscopy as a field technique for sexing birds and an assessment of its effects on wild birds.
J. Field Ornithol., 60, (2), 137-142
- Rival F. (2005)
Aspects pratiques du sexage des oiseaux.
Pratique Vét. Anim. Comp. 13, 5-8
- Robertson B.C., Millar C.D., Minot E.O., Merton D.V., Lambert D.M. (2000)
Sexing the critically endangered kakapo *Strigops habroptilus*.
Emu, 100, (4), 336-339
- Roman Y. (2005)
Oiseaux
In : Chai N. [eds.]. Capture et anesthésie des animaux sauvages et exotiques.
Editions Yaboumba, Paris, France. 93-117
- Rowley I., Collar N.J. (1997)
Order Psittaciformes.
In : Del Hoyo J., Elliott A., Sargatal J. [eds.] Handbook of the birds of the world. Vol. 4. Sandgrouse to Cuckoos.
Lynx Edicions, Barcelona, Spain. 246-477

- Russello M.A., Amato G. (2001)
Application of a noninvasive, PCR-based test for sex identification in a endangered parrot, *Amazona guildingii*.
Zoo Biol., 20, (1), 41-45
- Sacchi P., Soglia D., Maione S., Meneguz G., Campora M., Rasero R. (2004)
A non-invasive test for sex identification in Short-toed Eagle (*Circaetus gallicus*).
Mol. Cell. Probes, 18, (3), 193-196
- Santos S.I.C.O., Elward B., Lumeij T. (2006)
Sexual dichromatism in the blue-fronted amazon parrot (*Amazona aestiva*) revealed by multiple-angle spectrometry.
J. Avian Med. Surg., 20, (1), 8-14
- Schmutz S.M., Prus S.E. (1987)
A cytogenetic study of four species of cockatoos and Amazon parrots.
Genetica, 74, (1), 69-71
- Segelbacher G. (2002)
Noninvasive genetic analysis in birds : testing reliability of feather samples.
Mol. Ecol. Notes, 2, (3), 367-369
- Silveira Ramos P., Bastos E., Mannan R.W., Guedes-Pinto H. (2009)
Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism applied to sex identification of *Accipiter cooperii*.
Mol. Cell. Probes, 23, (2), 115-118
- Sinn L.C. (1994)
Anesthesiology.
In : Ritchie B.W., Harrison G.J., Harrison L.R. [eds.]. *Avian medicine : principles and applications*.
Wingers Publishing, Fort Worth, Florida. 1066-1080
- Taberlet P., Bouvet J. (1991)
A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies.
Auk, 108, (4), 959-960
- Taylor M. (1994)
Endoscopic examination and biopsy techniques.
In : Ritchie B.W., Harrison G.J., Harrison L.R. [eds.]. *Avian medicine : principles and applications*.
Wingers Publishing, Fort Worth, Florida. 327-354
- Tully T.N., Harrison G.J. (1994)
Pneumology.
In : Ritchie B.W., Harrison G.J., Harrison L.R. [eds.]. *Avian medicine : principles and applications*.
Wingers Publishing, Fort Worth, Florida. 556-581

- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M. et al. (1995)
AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.
Nucleic Acids Res., 23, (21), 4407-4414
- Van Dongen M.W.M., De Boer L.E.M. (1984)
Chromosome studies of 8 species of parrots of the families *Cacatuidae* and
Psittacidae (Aves : Psittaciformes).
Genetica, 65, (1), 109-117
- Wright A.A. (1972)
Psychometric and psychophysical hue discrimination functions for the pigeon.
Vision Res., 12, (9), 1447-1464

Annexes

Annexe 1 : Les réactifs

➤ Réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN

- *Kit NucleoSpin® Tissue*, MACHERY NAGEL, réf 740952.50 permettant de réaliser 50 extractions qui comprend :
 - 20 ml de Buffer T1
 - 12 ml de Buffer B1
 - 3 ml de Reagent B2
 - 2x7 ml de Buffer B5
 - 30 ml de Buffer BW
 - 15 ml de Buffer BE
 - 30 mg de Protéinase K
 - 1,8 ml de Protéinase Buffer

- *Kit magneSil® KF, Genomic system*, PROMEGA, réf. MD1460 permettant de réaliser 200 extractions qui comprend :
 - 40 ml de billes magnétiques
 - 160 ml de tampon de lyse cellulaire
 - 200 ml de solution de lavage saline
 - 220 ml de solution de lavage à l'alcool
 - 2 fois 25 ml d'une solution de « nuclease free »

➤ Réactifs utilisés pour la préparation du mélange réactionnel (MIX de PCR)

- *RED Taq DNA polymerase without MgCl₂*, SIGMA®, réf. D2812 contenant :
 - RED Taq DNA Polymerase 1U/μl : il s'agit d'un mélange de Taq polymérase et d'un colorant rouge inerte. Ce colorant a un double intérêt : d'une part, il permet de vérifier que la Taq a bien été ajoutée dans le mélange réactionnel et qu'il est bien homogène et d'autre part, il constitue un marqueur du front de migration.
 - Tampon PCR 10x
 - MgCl₂ 25 mM

- *dNTP Set, 100 mM Solutions*, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH®, réf. 27-2035-01 contenant :
 - 100 mM de dATP
 - 100 mM de dCTP
 - 100 mM de dGTP
 - 100 mM de dTTP

- *Eau ultra-pure et stérile*, AGUETTANT®

➤ **Réactifs utilisés pour l'électrophorèse**

- *100 Base-Pair Ladder*, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH®, réf. 27-4007-01, tube de 100µl
- Agar, SIGMA®, réf. A7002 présenté sous forme de poudre
- *Nusieve*®, FMC, réf. 50082 présenté sous forme de poudre
- *Agar HD*, SIGMA®, présenté sous forme de poudre
- *TBE 10x* (Tris Borate EDTA), SIGMA®, réf. 4415
- « Lester » : glycérol, SIGMA®
- Marqueurs de front de migration :
 - *Bleu de bromophénol*, SIGMA®, réf B5525, pot de 5g de poudre
 - *Xylène cyanol FF*, SIGMA®, réf.X4126, pot de 10g de poudre
 - *Orange G*, SIGMA®, réf. O3756
- *Bromure d'éthidium*, SIGMA®, solution à 10 mg/ml

Annexe 2 : Le matériel

- Équipement nécessaire pour l'extraction de l'ADN
 - KingFisher® ml, THERMO LABSYSTEMS®
- Équipement nécessaire pour la préparation du mélange réactionnel
 - Hotte à flux laminaire VERTICAL FASTER, ELVETEC®
- Équipement nécessaire pour l'amplification
 - Thermocycleur MWG-BIOTECH Primus 96®
 - Thermocycleur AVISO avec gradient, BIOTECH® (PCR à gradient)
- Équipement nécessaire pour l'électrophorèse
 - Cuve d'électrophorèse MUPID-2, EUROGENTEC®
- Équipement nécessaire à la révélation des fragments amplifiés
 - Transilluminateur Table UV, AMILABO®
 - Appareil photo Polaroid

Annexe 3 : Méthode d'extraction d'ADN manuelle avec le kit NucleoSpin® Tissue à partir de l'échantillon de rein (30mg)

Étape	Réactifs	Description
Préparation de l'échantillon de tissu		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Coupe de 30mg de rein en petits morceaux
Pré-lyse	180µL de tampon T1 25µL de protéinase K	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubation à 56°C toute une nuit
Lyse	Mélange précédent après vortex 200µL de tampon B3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mélange des réactifs ▪ Vortex ▪ Incubation à 70°C, 10 à 15min
Ajustement des conditions d'adsorption de l'ADN	Mélange précédent 210µL d'éthanol (96-100%)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ajout du réactif ▪ Vortex
Adsorption de l'ADN		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disposition sur une colonne avec membrane de silice avec un tube collecteur ▪ Centrifugation à 11000g, 1min ▪ Elimination du tube
Premier lavage de la membrane de silice	500µL de tampon BW	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ajout d'un nouveau tube collecteur de 2mL ▪ Ajout du réactif ▪ Centrifugation à 11000g, 1min
Second lavage de la membrane de silice	600µL de tampon B5	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ajout d'un nouveau tube collecteur de 2 mL ▪ Ajout du réactif ▪ Centrifugation à 11000g, 1min
Séchage de la membrane de silice		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Centrifugation à 11000g, 1min
Élution de l'ADN	100µL de tampon BE (70°C)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ajout d'un nouveau tube de 1,5mL ▪ Ajout du réactif ▪ 1 min à T°C ambiante ▪ Centrifugation à 11000 g, 1min

Annexe 4 : Méthode d'extraction d'ADN manuelle à partir de bulbes de plumes avec le kit NucleoSpin® Tissue

1. Etape de lyse sur la nuit

Ajout de 180µl de tampon T1 (tampon de pré-lyse) et 25µl de protéinase K sont ajoutés dans le tube eppendorf de 1,5ml contenant les bulbes. Après un vortexage, et après s'être assuré que la totalité des échantillons sont recouverts par la solution de pré-lyse, le tube est placé en incubation à 56°C sur la nuit. La protéinase K va ainsi dégrader la plupart des protéines, notamment celles fixées sur l'ADN.

2. Etape intermédiaire : récupération du produit de lyse sans le reste des bulbes

La solution est pipetée en prenant garde de laisser le reste des bulbes non digérés, inutilisés par la suite, et placée dans un nouveau tube eppendorf de 1,5ml.

3. Extraction

- 200µl de tampon de lyse B3 est ensuite ajouté. Le tube est vortexé vigoureusement et placé en incubation à 70°C pendant 10 minutes. La conformation de la molécule d'ADN est ainsi modifiée.
- 210µl d'éthanol absolu (100%) est ensuite ajouté à la solution et après vortexage, ce mélange est appliqué directement sur la colonne (placée sur un tube de collecte de 2ml). La colonne est mise à centrifuger 1 minute à 11000 g (13,2 rpm). Le produit de filtration est jeté et la colonne est placée sur un tube collecteur neuf.
- Le premier lavage de la membrane de silice est effectué : 500µl du tampon BW est déposé sur la colonne. Le tout est centrifugé 1 minute à 11000 g. Le produit de filtration est jeté et la colonne est placée sur un nouveau tube collecteur.
- Le deuxième lavage est effectué : 600µl du tampon B5 est déposé sur la colonne. Le tout est centrifugé 1 minute à 11000 g. Le produit de filtration est jeté et la colonne est placée sur un nouveau tube collecteur.
- La membrane de silice est séchée par une centrifugation à vide (1 minute à 11000 g).
- Elution de l'ADN : la colonne est placée dans un tube de 1,5ml. 100µl du tampon d'élution BE chauffé à 70°C est appliqué sur la colonne. Après 1 minute d'incubation à température ambiante, l'ADN est récupéré par une centrifugation de 1 minute à 11000 g.

Annexe 5 : Méthode d'extraction d'ADN semi automatisée à partir de bulbes de plumes avec le kit MagneSil® KingFisher, genomic system et le KingFisher™

1. Etape de lyse sur la nuit

Ajout de 200µl de tampon de lyse (lysis buffer) et 25µl de protéinase K sont ajoutés dans le tube eppendorf de 1,5ml contenant les bulbes. A l'instar de l'extraction manuelle, après un vortexage et après s'être assuré que la totalité des échantillons sont recouverts par la solution de pré-lyse, le tube est placé en incubation à 56°C sur la nuit. La protéinase K va ainsi dégrader la plupart des protéines, notamment celles fixées sur l'ADN.

2. Etape intermédiaire : récupération du produit de lyse sans le reste des bulbes

La solution est pipetée en prenant garde de laisser le reste des bulbes non digérés, inutilisés par la suite, et placée dans un nouveau tube eppendorf de 1,5ml.

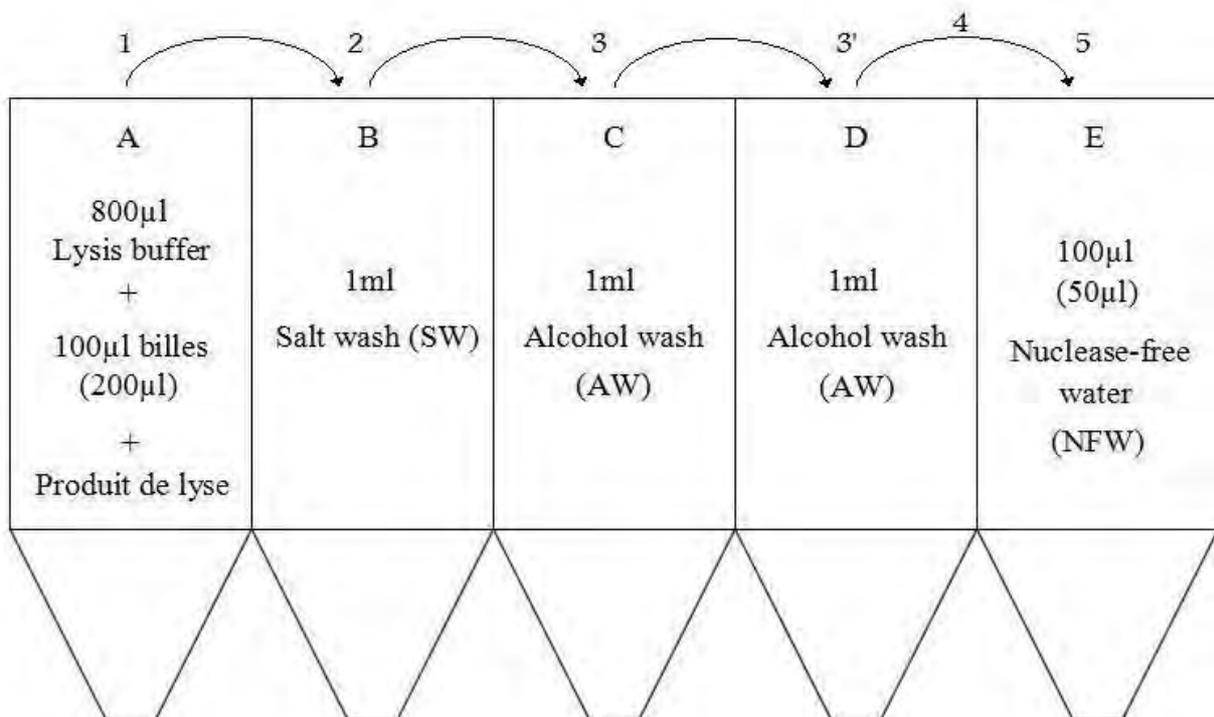
3. Extraction

- Les 5 tubes d'extraction sont préparés et alignés, avec de gauche à droite :
 - Le tube A, à gauche dans lequel le produit de lyse est placé, auquel on ajoute 100µl (ou 200µl) de billes magnétiques MagneSil® KF et 800µl de tampon de lyse lysis buffer MagneSil® KF.
 - Le tube B, qui contient 1ml de solution « Salt wash » (SW).
 - Les tubes C et D, contenant chacun 1ml d' « Alcohol wash » (AW).
 - Le tube E, le plus à droite, contient quant à lui 100µl (ou 50µl) de solution « Nuclease-free water » (NFW).
- Les tubes sont ensuite mis en place dans l'automate, alignés dans l'ordre. Le capot de l'automate est fermé, et l'appareil est programmé. La suite de l'extraction est entièrement automatisée.

Description de l'extraction :

- 1. Lyse et adsorption de l'ADN** : La première étape consiste en une lyse de l'échantillon dans le premier tube (A) de l'automate. L'ADN est libéré et l'ADN est adsorbé à la surface des billes magnétiques.
- 2. « Salt wash »** : Les billes magnétiques portant l'ADN sont ensuite transférées dans le second tube (B), où elles sont rincées à l'aide de la solution SW.

3. « **Alcohol wash** » : Les billes sont transférées lors de la troisième étape dans le tube (C) pour le premier des deux lavages alcooliques. Le deuxième lavage alcoolique est effectué lorsque les billes magnétiques sont transférées dans le quatrième tube (D).
4. **Séchage des billes magnétiques** : A l'issue du deuxième lavage alcoolique, les billes sont suspendue et séchées à l'air.
5. **Elution** : Enfin, lors de la cinquième et dernière étape, l'ADN lié aux particules magnétiques est libéré dans de l'eau (Nuclease-free water), prêt à être utilisé pour une PCR.



Assemblage des tubes dans le King Fisher® ml, et indication des volumes des différents réactifs.

Annexe 6 : Les différentes conditions de PCR réalisées

PCR n°	Amorces (concentration : 0,4µM)	Echantillon / extraction	Prise d'ADN	MgCl ₂			T°C
				1mM	1,5m M	2 nM	
CHD 1	CHDs1 CHDas2	T+ : Poule (rein-MN) Poule (5pl.-MN) Poule (5pl.-KF)	1 µl	x	x	x	56
CHD 2	CHDs1 CHDas2	T+ : Poule (rein-MN) Poule (3pl.-MN) Poule (5pl.-MN) Poule (3pl.-KF) Poule (5pl.-KF)	2 µl			x	56
CHD 3	CHDs1 CHDas2	T+ : Poule (rein-MN) Poule (3pl.-KF) Poule (5pl.-KF) Youyou du S. (4pl.-KF)	2 µl			x	56
CHD 4	CHDs3 CHDas2	Poule (3pl.-MN) Youyou du S. (4pl.-KF)	2 µl	x	x	x	56
CHD 5	CHDs3 CHDas2	T+ : Poule (3pl.-MN) Poule (2pl.-KF) Coq (1pl. KF)	2 µl	x	x	x	56
CHD 6	CHDs1 CHDas2	T+ : Poule (3pl.-MN) Poule (2pl.-KF) Coq (1pl. KF) Youyou du S. (4pl.-KF)	2 µl			x	56
CHD 7	CHDs3 CHDas2	T+ : Poule (3pl.-MN) Am. de Finsch M (3pl.-KF) Am. de Finsch F (3pl.-KF) Ara à collier d'or M (3pl.-KF) Ara à collier d'or F (3pl.-KF) Eclectus M (1pl.- KF) Eclectus F (1pl.- KF)	2 µl		x		56
CHD 8	CHDs3 CHDas2	T+ : Poule (3pl.-MN) Eclectus M (1pl.- KF) Perruche à collier M (4pl.-KF) Eclectus F (1pl.- KF) Perruche à collier F (4pl.-KF)	2 µl		x		56
CHD 9	CHDs3 CHDas4	T+ : Poule (3pl.-MN) Eclectus M (1pl.- KF) Eclectus F (1pl.- KF)	2 µl	x	x	x	56
CHD 10	CHDs3 - CHDs3 CHDas6	T+ : Poule (3pl.-MN) Eclectus M (1pl.- KF) Eclectus F (1pl.- KF)	2 µl		x		58
CHD 11	CHDs3 CHDas6	T+ : Poule (3pl.-MN) Am. de Finsch M (3pl.-KF) Am. de Finsch F (3pl.-KF) Ara à collier d'or M (3pl.-KF) Ara à collier d'or F (3pl.-KF) Perruche à collier M (4pl.-KF) Perruche à collier F (4pl.-KF) Youyou du S. (4pl.-KF)	2 µl		x		58
CHD 12	CHDs3 CHDas6	T+ : Poule (3pl.-MN) Ara à collier d'or M (3pl.-KF) Ara à collier d'or F (3pl.-KF)	2 µl	x	x	x	59
CHD 13	CHDs1 CHDas2	T+ : Poule (3pl.-MN) Eclectus M (1pl.- KF) Eclectus F (1pl.- KF)	2 µl			x	56 ± 2°C
CHD 14	CHDs3 CHDas4	Perruche à collier M (4pl.-KF) Perruche à collier F (4pl.-KF)	1 µl	x	x	x	55 / 56 / 57 / 58
CHD 15	CHDs3 CHDas6	Perruche à collier M (4pl.-KF) Perruche à collier F (4pl.-KF)	1 µl	x	x	x	55 / 56 / 57 / 58
CHD 16	CHDs3 CHDas4	Eclectus M (1pl.- KF) Eclectus F (1pl.- KF)	1 µl	x	x	x	55 / 56 / 57 / 58

CHD 17	CHDs3 CHDas4	Perr. Calopsitte M. (3pl-KF) Perr. Calopsitte F. (3pl-KF) Perr. Kakariki M (3pl-KF) Perr. Kakariki F (3pl-KF)	2 µl	x	x		57 / 58
CHD 18	CHDs3 CHDas4	Princesse de G. M (3pl-KF) Princesse de G. F (3pl-KF) Perr. de Barnard M (3pl-KF) Perr. de Barnard F (3pl-KF)	2 µl	x	x		57 / 58
CHD 19	CHDs3 CHDas4	Perr. de Pennant M (3pl-KF) Perr. de Pennant F (3pl-KF)	2 µl	x	x		57 / 58
CHD 20	CHDs1 CHDas2	T+ : Poule (2pl.-KF) Youyou du S. (4pl.-KF) Ara à collier d'or M (3pl.-KF) Ara à collier d'or F (3pl.-KF) Eclectus M (1pl.- KF) Eclectus F (1pl.- KF) Perruche à collier M (4pl.-KF) Perruche à collier F (4pl.-KF)	2 µl 3 µl			x	55 / 56 / 57 / 58
CHD 21	CHDs1 CHDas2	T+ : Poule (2pl.-KF) Youyou du S. (4pl.-KF) Ara à collier d'or M (3pl.-KF) Ara à collier d'or F (3pl.-KF) Eclectus M (1pl.- KF) Eclectus F (1pl.- KF)	2 µl 3 µl			x	56 / 57 / 58
CHD 22	CHDs1 CHDas2	T+ : Poule (2pl.-KF) Am. de Finsch M (3pl-KF) Am. de Finsch F (3pl-KF) Eclectus M (1pl.- KF) Eclectus F (1pl.- KF) C. des Moluques M (1pl-KF) Am. à ailes oranges F (1pl-KF) P. à tête bleue M (3pl-KF) Gris du Gabon F (3pl-KF) C. Rosalbin F (3pl.-KF)	T+ : 1µl 2 µl			x	56
CHD 23	CHDs1 CHDas2	T+ : Poule (2pl.-KF) Perr. Calopsitte M. (3pl-KF) Perr. Calopsitte F. (3pl-KF) Perr. Kakariki M (3pl-KF) Perr. Kakariki F (3pl-KF) Princesse de G. M (3pl-KF) Princesse de G. F (3pl-KF) Perr. de Barnard M (3pl-KF) Perr. de Barnard F (3pl-KF) Perr. de Pennant M (3pl-KF) Perr. de Pennant F (3pl-KF)	T+ : 1µl 2 µl			x	56
CHD 24	CHDs1 CHDas2	T+ : Poule (3pl-MN) Princesse de G. M (3pl-KF) Princesse de G. F (3pl-KF) Perr. de Barnard M (3pl-KF) Perr. de Barnard F (3pl-KF) Perr. de Pennant M (3pl-KF) Perr. de Pennant F (3pl-KF) Am. à ailes oranges F (1pl-KF)	2 µl			x	55 / 56 / 57 / 58
CHD 25	CHDs1 CHDas4	T+ : Poule (1pl.-MN) Eclectus F (2pl.-MN)	2µl	x	x	x	55 56 58
CHD 26	CHDs1 CHDas4	T+ : Eclectus F (2pl.-MN) Am. à ailes oranges F (1pl-KF) Perr. Calopsitte M. (3pl-KF) Perr. Calopsitte F. (3pl-KF) Perr. Kakariki M (3pl-KF) Perr. Kakariki F (3pl-KF) Princesse de G. M (3pl-KF) Princesse de G. F (3pl-KF) Perr. de Barnard M (3pl-KF) Perr. de Barnard F (3pl-KF) Perr. de Pennant M (3pl-KF) Perr. de Pennant F (3pl-KF) Am. de Finsch M (3pl-KF) Am. de Finsch F (3pl-KF) C. des Moluques M (1pl-KF) P. à tête bleue M (3pl-KF) Gris du Gabon F (3pl-KF) C. Rosalbin F (3pl.-KF)	T+ : 2µl 3µl			x	58

CHD 27	CHDs1 CHDas4	T+ : Eclectus F (2pl.-MN) Perr. Calopsitte M. (3pl-KF) Perr. Calopsitte F. (3pl-KF) Perr. Kakariki M (3pl-KF) Perr. Kakariki F (3pl-KF)	T+ : 2µl 5µl		x		58
CHD 28	CHDs1 CHDas4	T+ : Eclectus F (2pl.-MN) Am. de Finsch M (2pl-MN) Am. de Finsch F (2pl-MN) Ara à collier d'or M (2pl.-MN) Ara à collier d'or F (2pl.-MN) Eclectus F (1pl.-MN) A. à ailes oranges F (2pl-MN) Perruche à collier M (2pl.-MN) Perruche à collier F (2pl.-MN) Perr. de Barnard M (1pl-MN) Perr. de Barnard F (1pl-MN) Youyou du S. (2pl.-MN)	2µl		x		58
CHD 29	CHDs1 CHDas4	T+ : Eclectus F (2pl.-MN) Perr. de Barnard F (1pl-MN) Ara à collier d'or F (2pl.-MN)	2µl		x		58

T+ : Témoin positif

pl. : plume(s)

MN : Extraction manuelle

KF : Extraction semi-automatisée au King-Fisher

M : Mâle

F : Femelle

Annexe 7 : Certificat de sexage de l'Amazone à ailes oranges fourni lors de la récolte du matériel expérimental

LABORATOIRE D' ANALYSES DE BIOLOGIE VETERINAIRE ET DE L' ENVIRONNEMENT

Demandeur

Nom : PARC DES OISEAUX
Adresse :
Commune : 01330 VILLARS LES DOMBES

PARC DES OISEAUX

01330 VILLARS LES DOMBES

CERTIFICAT DE SEXAGE

N° DOSSIER : 021001 010778 01

N° de l'échantillon : 2555

Identification du prélèvement : 000125 4F56

Nature du prélèvement : Plumes

Espèce : Amazone à ailes oranges
Amazona amazonica

Résultat du sexage par ADN : Femelle

Validé le : 08/11/2002

Les résultats mentionnés ne sont applicables qu'aux échantillons soumis au Laboratoire, tels qu'ils sont définis dans le présent document.

LAMBERT Yannick

SEXAGE DES PSITTACIFORMES : MISE AU POINT D'UN TEST MOLECULAIRE ET MISE EN APPLICATION D'UNE METHODE PAR ENDOSCOPIE

Thèse Vétérinaire : Lyon , 2010

RESUME :

Le sexage est une étape clé de la sauvegarde, de l'élevage ou du maintien en captivité des Psittaciformes dont la majorité sont monomorphiques.

Le nombre d'espèces est important, et parmi les plus couramment rencontrées, quelques-unes seulement présentent des caractéristiques morphologiques, parfois discrètes, permettant de déterminer le sexe des individus. Pour les autres, plusieurs méthodes ont été développées : certaines ne sont plus utilisées, d'autres ne sont encore qu'au stade expérimental.

La méthode PCR (*Polymerase chain reaction*), consistant en la mise en évidence des copies Z ou W du gène CHD1, a été mise au point sur quinze espèces au LVD69 et permet un sexage rapide et fiable chez ces espèces ; elle est non invasive et peu stressante pour l'animal. Le sexage chirurgical par endoscopie, permettant la visualisation directe des gonades, appliquée à une vingtaine d'oiseaux du Parc zoologique de Clères (76), est une méthode invasive dont la fiabilité est manipulateur-dépendante. Elle permet cependant d'effectuer un bilan sanitaire de l'oiseau et d'explorer ses fonctions reproductrices. Le choix de l'une ou l'autre de ces méthodes se fait selon le cadre dans lequel s'inscrit le sexage et à la lumière des avantages et inconvénients de chacune des techniques.

MOTS CLES :

- Psittaciformes
- Sexage
- Gène CHD
- PCR
- Endoscopie

JURY :

Président : Monsieur le Professeur Jean-François GUERIN
1er Assesseur : Madame le Professeur Françoise GRAIN
2ème Assesseur : Monsieur le Professeur Pierre GUERIN

DATE DE SOUTENANCE :

26 Novembre 2010

ADRESSE DE L'AUTEUR :

2 rue François Truffaut
38120 Saint-Egrève