

DEMANDE DE DEROGATION

**Présentée par Dr. Benjamin WARREN
Maître de conférences et co-Responsable de la collection d'oiseaux
Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), Paris**

**Suscept-Ext : Comprendre la susceptibilité à l'extinction grâce au
séquençage de génomes d'échantillons historiques et modernes**

Juillet 2021

Table des matières

Résumé	3
Introduction et contexte	3
Méthodes	5
Références	9

Résumé

Bien que l'histoire évolutive de chaque espèce soit un facteur majeur déterminant leur risque d'extinction face aux changements environnementaux, les processus évolutifs impliqués restent encore mal compris. En particulier, bien que de nombreuses études aient identifié des corrélations entre certains traits biologiques et le risque d'extinction à une large échelle taxonomique (macro-écologique et macro-évolutive), les processus populationnels à l'origine de ces corrélations restent d'être déterminés. La génétique des populations caractérise pourtant les processus sous-jacents à ces schémas macro-évolutifs d'extinctions, mais les inférences sont jusqu'ici limitées par l'incertitude sur les échelles de temps et par la nature de ces études, souvent focalisées sur une unique espèce. De plus, la comparaison entre ces études est souvent difficile car les espèces étudiées sont exposées à des changements environnementaux différents, spécifiques à chaque cas.

Le projet actuel surmontera ces problèmes en analysant conjointement, pour huit espèces d'oiseaux, des séries temporelles de génomes obtenus à partir d'échantillons actuels et de spécimens historiques (muséologiques et subfossiles) venant des îles Mascareignes. Ceci permettra donc de comparer des espèces proches avec des caractéristiques biologiques différentes et bien documentées. Certaines de ces espèces se trouvent sur l'île de la Réunion. Plus spécifiquement, les espèces de la Réunion sont *Zosterops oliveaceus*, *Zosterops borbonicus*, et *Nesoenas picturata*. Notre projet constitue une occasion très rare pour caractériser les déterminants évolutifs et écologiques qui modulent le risque d'extinction.

Introduction et contexte

Evolutionary history is expected to play a major role in determining which species decline in population size to extinction in response to environmental change, but the processes by which this comes about are poorly understood. In particular, although many studies have identified broad-scale biological correlates of extinction risk, the population-scale processes driving such large-scale patterns are usually hypotheses that remain to be tested. Although population genetic studies provide much promise to understand the micro-evolutionary processes underlying such patterns of extinction risk, inferences can be limited by our confidence in the timescales inferred, and by the scale of such studies, which frequently include only one lineage. Furthermore, comparisons across studies are frequently confounded by case-specific differences in exposure to environmental change.

In this project we tackle the issues above, applying both ancient DNA methods to historical museum samples and subfossils, and modern DNA methods to fresh genetic samples, to obtain a genome-wide time series for nine Mascarene island bird lineages that differ in abundance and other biological traits. Islands of the Mascarene archipelago, Indian Ocean, are unusual among sizable and biologically diverse landmasses worldwide, in that they had no human population until European arrival 400 years ago. Therefore, there exist museum samples and subfossils spanning the full duration of environmental change. As a consequence, we propose to obtain what is to our knowledge, the first real time assessment of genetic response to anthropogenic environmental change across multiple species

following first human presence. The study setup involves multiple cases in which the effects of common environmental change (deforestation from 1800-1950, introductions of exotic predators) can be compared between a pair of closely related species that differ in abundance (a “rare” species versus a “common” one).

On Reunion, the species concerned are *Zosterops olivaceus*, *Zosterops borbonicus*, and *Nesoenas picturata*. *Zosterops olivaceus* and *Zosterops borbonicus* comprise, respectively, a rare-versus-common sympatric species pair on Réunion that can be compared. *Nesoenas picturata* is considered a common species, that will be compared with *Nesoenas mayeri* of Mauritius (rare).

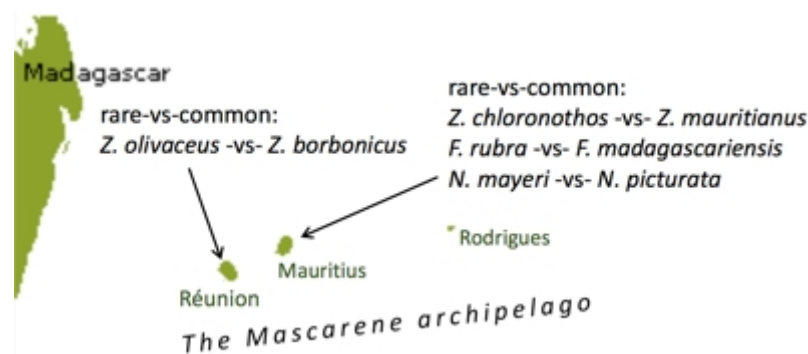


Fig. 1. Carte de l'archipel des Mascareignes montrant les distributions de nos quatre paires d'espèces sympatriques rares vs communes sur les îles de la

Réunion et de Maurice.

By considering common environmental change of well-known duration, our project provides a rare opportunity to dissect the contribution of evolutionary biology and ecology (i.e. susceptibility) in determining which species are threatened with extinction. This includes assessing the relative contribution of a species' evolutionary past (species differing in degree of ecological specialisation, time in situ, trophic level, life history, genetic diversity), versus evolution in action (selection), in defining demographic trajectories.

All such genetic samples can be obtained by mist-netting, capture and release without harming the birds concerned.

(a) Prevalent differences between rare and common species before environmental change

- Genetic diversity
- Abundance
- Evidence of previous decline?
- Position relative to congener in arrival sequence
- Degree of ecological specialisation

(b) Outcome of environmental change

- Rate, duration and nature of demographic change and decline
- Presence or absence of evidence of adaptation to environmental change
- Nature of any adaptive change detected, including strength and number of loci

Fig. 2. Examples of differences that may present links between (a) the status of species at the onset of major environmental change, and (b) the outcome of that change.

We anticipate that immediate products of this project (papers, seminars, and media reports) will have long-lasting outcomes at two levels. First, our results will respond to existing hypotheses for the decline of IUCN threatened Mauritian species (which variably include habitat

destruction, and introduction of mammalian predators in an environment that naturally had none). It will therefore inform conservation action in Mauritius, and may also have implications for any future conservation action concerning *Zosterops olivaceus* on La Réunion. Second, although the core of our approach is necessarily molecular, our results will respond to an important issue in ecology and conservation biology as well as evolutionary biology – why are some species rare and threatened with extinction, while others are abundant. Generalities that hold across our dataset concerning the relationship between a species' status (Fig. 2a) at the onset of major environmental change and its response to the change (Fig. 2b) will be highlighted in our publications. Our synthesised findings will therefore be a unique frame of reference in both Ecology and Evolutionary Biology, with the importance of our generalities as predictions of wider geographic and taxonomic scope being tested by future studies.

Méthodes

Le coordinateur (BW) est le responsable scientifique de l'une des trois plus importantes collections muséologiques mondiales d'oiseaux des Mascareignes. BW est aussi en communication régulière avec plusieurs autres collections concernées dans ce projet et a déjà obtenu toutes les autorisations nécessaires pour les échantillons historiques de l'étude.

Sur l'île de la Réunion les espèces *Zosterops olivaceus* et *Zosterops borbonicus* forment une des paires qui permettent de comparer des espèces « rares » et « communes ». Plus spécifiquement, tandis que *Zosterops olivaceus* est relativement peu abondante, *Zosterops borbonicus* est relativement commune.

Les échantillons modernes doivent inclure, pour chaque espèce, quatre échantillons contenant de l'ADN de haute qualité (résultants en des extractions d'ADN à poids moléculaire élevé) pour pouvoir obtenir des séquences génomiques de référence complètes.

Ces génomes complets sont importants comme références pour aligner et orienter les séquences d'ADN obtenues à partir d'échantillons historiques. De plus, ces génomes représentent les points de référence moderne (2021) dans la série chronologique génétique, et sont donc des éléments critique à ajouter à sept échantillons déjà séquencés par un autre groupe. Le filet japonais et les prélèvements sanguins constituent la méthode la plus appropriée pour obtenir, de manière fiable, des échantillons avec de l'ADN de haute qualité à partir d'espèces vivantes, tout en assurant la sécurité des oiseaux prélevés.

Le protocole de terrain pour les filets japonais et les prélèvements sanguins requis est le suivant:

Échantillonnage génétique : impliquant la capture et la libération d'oiseaux indemnes

Localités

Tous les sites sont à l'extérieur du cœur du parc. Site 2 est dans la zone d'adhésion.

1. Basse Vallée et près de la Route Forestière de Mare Longue, Commune St Philippe
2. Alentours de Route Forestière Omega, Commune St Paul
3. Sentier Mollaret près du piton Bleu, Commune le Tampon
4. La Ravine Blanche, Commune le Tampon
5. Saint Gilles Les Hauts, Commune St Paul

Il est important d'avoir des échantillons provenant d'au moins trois localités différentes par espèce.

Sites 1-3 (Fig. 3) ont été choisis parce que ce sont des endroits où l'espèce *Zosterops olivaceus* est présente (même si sa répartition est restreinte) et qu'ils remplissent deux autres conditions importantes :

- (1) Ce sont des sites où *Z. olivaceus* vole relativement bas. Cette condition, due à la hauteur de la végétation à ces sites, est essentielle pour que les individus de *Z. olivaceus* puissent être capturés dans des filets japonais érigés à une certaine hauteur au-dessus du sol.
- (2) Ce sont des sites où il y a relativement peu de conflits entre les activités humaines et la capture au filet japonais. Spécifiquement, ce sont des sites où il n'y a pas de bétail, et où il est possible de s'éloigner de tous les chemins/sentiers fréquentés par un grand nombre de personnes.

Les sites 4 et 5 ont été choisis comme lieux propices à la capture de *Nesoenas picturata*, en raison des fortes densités connues de cette espèce.

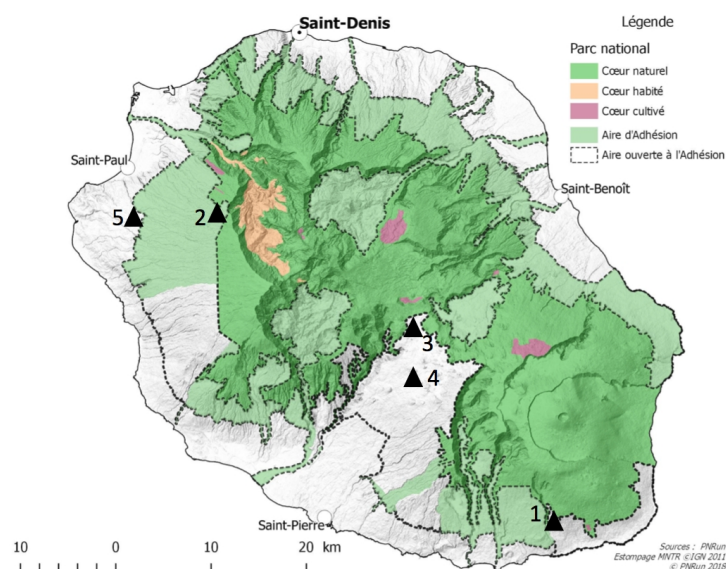


Fig 3. Carte de l'île de la Réunion localisant les sites de capture 1-5 (voir texte pour les noms des sites).

- 1) Mise en place d'un maximum de 30 mètres de filet spécialement conçu pour la capture d'oiseaux : Un maillage de 15-17 mm sera utilisé ;
- 2) Inspection du filet toutes les 15 minutes pour réduire au minimum le stress causé aux oiseaux capturés ;
- 3) Repasser des chants et des cris de *Zosterops olivaceus* pendant des périodes limitées (maximum 30 minutes) afin d'attirer cette espèce qui s'approche plus rarement du filet que *Zosterops borbonicus* ;

4) Extraire l'oiseau du filet et le mettre dans un sac à oiseau pour le déplacer entre le filet et le lieu de mesures et prélèvements sanguins, à quelques mètres du filet ;

5) Mesurer et photographier les oiseaux capturés. Prendre quelques gouttes de sang (maximum 50 μ L) à l'aide d'une aiguille et d'un capillaire. Conserver une de partie ces gouttes dans de l'azote et répartir l'autre partie entre deux tubes - un tube avec 100% d'éthanol un autre tube avec du tampon de lyse « Queen's ». Arrêter la circulation sanguine avec du coton. L'aiguille est changée entre chaque individu ;

6) Relâcher l'oiseau au site de capture ;

7) Démonter le filet à la fin de toutes sessions de travail et ne jamais le laisser sans surveillance.

Matériels utilisés : filets japonais, sacs pour oiseaux, règles et étriers pour mesurer, aiguille et capillaire pour prélever des échantillons sanguins, bonbon à l'azote, azote, éthanol et tampon de lyse « Queen's » dans des tubes eppendorf (1.5 ml).

Mesures prises pour réduire l'impact sur les oiseaux : La mesure la plus importante pour réduire l'impact sur les oiseaux est que BW restera toujours à moins de 10-20 mètres du filet pour pouvoir le contrôler régulièrement. La plupart des filets seront donc contrôlés toutes les 5 minutes, avec 15 minutes étant l'intervalle le plus long possible entre les contrôles. Une surveillance fréquente du filet garantit que les oiseaux capturés ne surchauffent pas et ne se déshydratent pas. Les filets seront toujours érigés à l'ombre et seront vérifiés particulièrement fréquemment si certaines parties sont ultérieurement exposées aux rayons du soleil (c'est-à-dire parce que le soleil s'est déplacé).

Travail moléculaire

Un financement a été obtenu auprès de l'Agence nationale de la recherche (ANR) pour tous les travaux moléculaires, ainsi que pour le salaire d'un post-doctorant et d'un doctorant (3 ans chacun) qui travaillerons sur les données.

Tache 1-3 : [To be completed]

Toutes ces données seront mises à la disposition de la DEAL Réunion. Elles seront également stockées sur GenBank comme l'exigent les revues scientifiques dans ce domaine.

Comptes rendus

Les travaux serviront de base à des publications dans des revues scientifiques. Je serais heureux de fournir des exemplaires de ces publications à la DEAL Réunion et au Parc National de la Réunion. Je fournirai aussi un rapport à la DEAL Réunion à la fin de la session de terrain précisant les espèces, le nombre et la localisation des captures.

Personnel impliqué dans le programme de terrain

Responsable du programme :

Benjamin WARREN (voir résumé d'expérience en dessous).

Assistant (si disponible) :

Damien CHIRON, SEOR

Période de la mission

Le travail sera effectué lors d'une visite à la Réunion d'une durée d'environ 2-3 semaines. Mon intention est d'exécuter le travail entre le 15/10/2021 et le 30/06/2022. Cependant, je demande une durée de validité de permis plus longue en raison des grandes incertitudes liées à COVID-19 concernant les déplacements et les travaux sur le terrain, du **15/10/2021 au 30/06/2023**.

Mon expérience avec la capture-libération d'oiseaux et le prélèvement de sang

En plus de mon suivi d'un stage de formation théorique CRBPO, je détaille ci-dessous ma formation et mon expérience sur le terrain. Précisions : Lieu, année, durée approximative du travail sur le terrain (en utilisant un filet japonais en moyenne 6 jours sur 7, sauf indication contraire), couverture taxonomique, (1) mes publications issues du travail (voir liste), (2) publications des collègues que j'ai assisté sur le terrain.

- Formation, 30 jours (pendant une période de 2.5 mois) : Equateur, 1996, communauté entière d'oiseaux forestiers, (1) Pople et al. 1997, 1998.
- République de Maurice (2 îles), 1999, 2 mois, *Foudia*, *Hypsipetes*, *Zosterops*, *Terpsiphone*, (1) Warren et al. 2003, 2005, 2006, 2012, Bristol et al. 2013.
- Mayotte, Union des Comores (les 3 îles), et République des Seychelles (4 îles), 2000, 4,5 mois, *Foudia*, *Hypsipetes*, *Nectarinia*, *Zosterops*, *Terpsiphone*, *Nesillas*, (1) Warren et al. 2003, 2005, 2006, 2012, Bristol et al. 2013, Fuchs et al. 2016.
- Panama, 2001, 3 semaines, *Wilsonia pusilla*, (2) Clegg et al. 2002, 2003, 2004.
- Madagascar, 2002, 1.5 mois, *Foudia*, *Hypsipetes*, *Nectarinia*, *Zosterops*, *Terpsiphone*, *Nesillas*, (1) Warren et al. 2003, 2005, 2006, 2012, Bristol et al. 2013, Fuchs et al. 2016.
- République de Maurice, 2007, 2 semaines, *Zosterops mauritianus* (1) Mila et al. 2010.
- République de Maurice, 2020, 2 semaines, *Phedina*, *Aerodramus*, *Nesoenas*, *Zosterops*, *Foudia* (Analyses génétiques en cours).

Références

X

Balmford, A. (2012). *Wild Hope: On the Front Lines of Conservation Success*. University of Chicago Press, Chicago IL.

Benazzo, A., Trucchi, E., Cahill, J.A., Delser, P.M., Mona, S., Fumagalli, M. *et al.* (2017). Survival and divergence in a small group: The extraordinary genomic history of the endangered Apennine brown bear stragglers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, E9589-E9597.

Bristol, R., Fabre, P-H., Irestedt, M., Jonsson, K. A., Warren, B. H., and Groombridge, J. 2013. Molecular phylogeny of the Indian Ocean *Terpsiphone* paradise flycatchers: undetected evolutionary diversity revealed amongst island populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67: 336-347.

Cheke, A.S. & Hume, J. (2008). *Lost land of the dodo: an ecological history of Mauritius, Réunion and Rodrigues*. T & AD Poyser, London.

Fuchs, J., Lemoine, D., Parra, J. L., Pons, J. M., Raheirilalao, M. J., Prys-Jones, R., Thébaud, C., Warren, B. H., and Goodman, S.M. 2016. Long-distance dispersal and inter-island colonization are the main drivers of diversification in brush-warblers (Passeriformes: *Nesillas*), a passerine lineage endemic to the western Malagasy region. *Biological Journal of the Linnean Society*, 119: 873-889.

Goossens, B., Chikhi, L., Ancrenaz, M., Lackman-Ancrenaz, I., Andau, P. & Bruford, M.W. (2006). Genetic Signature of Anthropogenic Population Collapse in Orang-utans. *PLoS Biology*, 4, e25.

Greenberg, D.A., Palen, W.J., Chan, K.C., Jetz, W. & Mooers, A. (2018). Evolutionarily distinct amphibians are disproportionately lost from human-modified ecosystems. *Ecology Letters*, 21, 1530-1540.

Harris, S.E., Xue, A.T., Alvarado-Serrano, D., Boehm, J.T., Joseph, T., Hickerson, M.J. *et al.* (2016). Urbanization shapes the demographic history of a native rodent (the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*) in New York City. *Biology Letters*, 12.

Johnson, C. 2006. *Australia's mammal extinctions: a 50 000 year history*. Cambridge University Press.

Johnson, K. P., S. de Kort, K. Dinwoodey, A. C. Mateman, C. ten Cate, C. M. Lessells, and D. H. Clayton. 2001. A molecular phylogeny of the dove genera *Streptopelia* and *Columba*. *The Auk* 118:874-887.

Lapierre, M., Lambert, A. & Achaz, G. (2017). Accuracy of demographic inferences from the site frequency spectrum: The case of the Yoruba population. *Genetics*, 206, 439-449.

Leonardi, M., Librado, P., Sarkissian, C.D., Schubert, M., Alfarhan, A.H., Alquraishi, S.A. *et al.* (2017). Evolutionary patterns and processes: lessons from ancient DNA (vol 66, pg e1, 2017). *Systematic Biology*, 66, 660-660.

Librado, P., Gamba, C., Gaunitz, C., Sarkissian, C.D., Pruvost, M., Albrechtsen, A. *et al.* (2017). Ancient genomic changes associated with domestication of the horse. *Science*, 356, 442-445.

Malaspinas, A.S. (2016). Methods to characterize selective sweeps using time serial samples: an ancient DNA perspective. *Mol. Ecol.*, 25, 24-41.

Mila, B., Warren, B. H., Heeb, P. and Thébaud, C. 2010. The geographic scale of diversification on islands: genetic and morphological divergence at a very small spatial scale in the Mascarene grey white-eye (Aves: *Zosterops borbonicus*). *BMC Evolutionary Biology* 10: 158

Pople, R. G., Burfield, I. J., Clay, R. P., Cope, D. R., Kennedy, C. P., Lopez Lanus, B., and Warren, B. 1998. Project Ortalis '96: interesting and important results of bird surveys in western Ecuador. *Cotinga* 8: 59-63.

Pople, R. G., Burfield, I. J., Clay R. P., Cope, D. R., Kennedy, C. P., Lopez Lanus, B., Reyes, J., Warren, B. and Yagual, E. 1997. Bird surveys and conservation status of three sites in western Ecuador: final report of Project Ortalis '96. Cambridge, UK: CSB Conservation Publications.

Warren, B. H., E. Bermingham, R. C. K. Bowie, R. P. Prys-Jones, and C. Thebaud. 2003. Molecular phylogeography reveals island colonization history and diversification of western Indian Ocean sunbirds (Nectarinia: Nectariniidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29:67-85.

Warren, B. H., E. Bermingham, R. P. Prys-Jones, and C. Thébaud. 2005. Tracking island colonization history and phenotypic shifts in Indian Ocean bulbuls (Hypsipetes: Pycnonotidae). *Biol. J. Linnean Soc.* 85:271-287.

Warren, B.H., Bermingham, E., Prys-Jones, R.P. & Thebaud, C. (2006). Immigration, species radiation and extinction in a highly diverse songbird lineage: white-eyes on Indian Ocean islands. *Mol. Ecol.*, 15, 3769-3786.

Warren, B. H., E. Bermingham, Y. Bourgeois, L. K. Estep, R. P. Prys-Jones, D. Strasberg, and C. Thébaud. 2012. Hybridization and barriers to gene flow in an island bird radiation. *Evolution* 66:1490-1505.

Warren, B.H., Hagen, O., Gerber, F., Thébaud, C., Paradis, E. & Conti, E. (2018). Evaluating alternative explanations for an association of extinction risk and evolutionary uniqueness in multiple insular lineages. *Evolution*, 72, 2005-2024.

Warren, B.H., Simberloff, D., Ricklefs, R.E., Aguilée, R., Condamine, F.L., Gravel, D. *et al.* (2015). Islands as model systems in ecology and evolution: prospects fifty years after MacArthur-Wilson. *Ecology Letters*, 18, 200-217.

Yessoufou, K. & Davies, T.J. (2016). Reconsidering the loss of evolutionary history: How does non-random extinction prune the tree-of-life? In: *Biodiversity Conservation and Phylogenetic Systematics: Preserving our evolutionary heritage in an extinction crisis* (eds. Pellens, R & Grandcolas, P). Springer International Publishing, pp. 57-80.

Fait à Paris le 20/07/2021

Ben Wamer