

## **TITRE DU PROJET:**

# **Etude préliminaire: Diversité alimentaire et parasitaire des caméléons *Furcifer***

## **PERSONNEL DU PROJET**

### **Principal Investigateur :**

Dr. Benjamin L. Rice, PhD, Université de Princeton, États-Unis

### **Co-investigateurs:**

Prof. Robert M. Pringle, PhD, Université de Princeton, États-Unis

Mme Estelle Raobson, MSc, Association Vahatra et Projet de paludisme de Princeton

### **Autres membres:**

1. Mme Ciara M. Nutter, BA, Université de Princeton, États-Unis
2. Étudiant (e) diplômé de la Mention Zoologie et Biodiversité Animale, Université d'Antananarivo, Antananarivo, Madagascar (2-4 mois)

## **OBJECTIFS DU PROJET**

Les caméléons de Madagascar (*Furcifer*, *Calumma*, et *Brookesia* spp.) sont très diversifiés, charismatiques, en danger et sont très recherchés pour le commerce des animaux de compagnie. Actuellement, encore peu d'informations sont disponibles sur l'écologie de ces espèces. Les informations de base sur la composition du régime alimentaire et la nutrition sont, par exemple, manquantes pour la majorité des espèces de caméléons dans le monde. Ce projet permettra de collecter de nouvelles données sur les régimes alimentaires, la parasitologie et les conditions environnementales des espèces de caméléons coexistant dans un endroit spécifique. La collecte de données écologiques de base servira à trois objectifs:

1. Comprendre l'évolution et le maintien de la diversité des populations de caméléons dans son habitat naturel;
2. Comparer les régimes alimentaires entre les espèces de caméléons vivant dans les zones protégées et les zones non protégées;
3. Améliorer les soins, la santé et la reproduction des espèces en captivité pour les efforts de conservation.

Le premier objectif permettra de caractériser les principales menaces de maladies et la diversité alimentaire des espèces de caméléons sympatriques. Le deuxième objectif permettra de comparer les régimes alimentaires entre les espèces de caméléons vivant dans les zones protégées et les zones non protégées et dégradées. Par exemple, pour les espèces communes comme *F. pardalis* et *F. oustaleti*, nous comparerons les individus capturés au sein des aires protégées à ceux en dehors des aires protégées. Le troisième objectif est important du point de vue du bien-être animal, par exemple, pour les espèces

comme *Furcifer pardalis*, une espèce élevée en captivité dans le monde entier et largement gardée comme animaux de compagnie ou utilisée à des fins de recherche. Cependant, les propriétaires de caméléons en captivité manquent souvent d'informations importantes pour permettre aux animaux de mener une vie longue et saine. Le dernier objectif est aussi important pour les initiatives de conservation actuelles et futures car l'élevage en captivité pourrait être nécessaire pour assurer la survie des espèces menacées et à aire de répartition restreinte.

## **ZONE D'ÉTUDE**

La zone d'étude de ce projet sera le nord, le nord-ouest et le nord-est de Madagascar (régions administratives DIANA, SAVA, Atsinanana et Analanjirofo). Nous nous concentrerons d'abord dans la partie nord-ouest, en échantillonnant sur Antsohihy, Ambanja et la péninsule d'Ampasindava, puis au nord dans les zones autour d'Antsiranana, Ambohitra/Joffreville, Montagne des Français et PN Montagne d'Ambre. De plus, nous comparerons les échantillons collectés dans d'autres localités situées approximativement dans la région de Sambava, PN Masoala et Tamatave.

L'échantillonnage dans les zones non protégées inclura l'échantillonnage des caméléons trouvés dans les habitats perturbés par l'homme dans les zones urbaines, périurbaines et rurales. Ceux-ci seront comparés aux échantillons collectés dans les zones protégées suivantes:

1. Réserve Spéciale d'Ankarana
2. Paysage Harmonieux Protégé d'Ampasindava
3. Parc National de Montagne d'Ambre
4. Montagne des Français
5. Parc National de Marojejy
6. Parc National de Masoala et Nosy Mangabe
7. Réserve Naturelle Intégrale de Betampona
8. Parc Ivoloina

## **ESPÈCES CIBLES (CATÉGORIE DE LA LISTE ROUGE DE L'UICN)**

Les espèces de caméléons (Famille Chamaeleonidae) des genres *Furcifer*, *Calumma* et *Brookesia* seront échantillonnées. Pour chaque genre, un maximum de 50 individus par localité sera échantillonné. Des échantillons fécaux seront collectés pour tous les individus des deux sexes, qui sont capturés. Pour les juvéniles et les espèces de petite masse corporelle, seuls les individus de genre *Furcifer* et *Calumma* de plus de 100 grammes seront soumis à un prélèvement sanguin.

### Genre *Furcifer*

- *Furcifer bifidus* (LC) (Betampona, Ivoloïna, Toamasina, Marojejy)
- ***Furcifer pardalis*** (LC) (répandu dans le NE et le NO)
- *Furcifer petteri* (VU) (Ankarana, Antsiranana, Joffreville, Montagne d'Ambre, Montagne des Français)
- ***Furcifer oustaleti*** (LC) (répandu dans le NE et le NO)
- *Furcifer timoni* (NT) (Montagne d'Ambre, Marojejy)
- *Furcifer viridis* (LC) (répandu dans le O et le NO)

### Genre *Calumma*

- *Calumma amber* (NT) (Montagne d'Ambre)
- *Calumma ambreense* (NT) (Montagne d'Ambre)
- *Calumma boettgeri* (LC) (Marojejy, Montagne d'Ambre)
- *Calumma brevicorne* (LC) (Glaw et Vences n'ont pas de localités à proximité de la zone focale)
- *Calumma cucullatum* (VU) (Marojejy, Toamasina)
- *Calumma guillaumeti* (VU) (Marojejy)
- *Calumma jevy* (VU) (Marojejy)
- *Calumma linotum* (LC) (Montagne d'Ambre)
- *Calumma malthe* (LC) (Marojejy)
- *Calumma marojejense* (LC) (Marojejy)
- *Calumma nasutum* (LC) (Andapa, Maroantsetra, Marojejy, Montagne d'Ambre, Nosy Mangabe, Sambava, Toamasina)
- *Calumma parsonii* (NT) (Ambanja)
- *Calumma peyrierasi* (VU) (Marojejy)

### Genre *Brookesia*

- *Brookesia ambreensis* (NT) (Montagne d'Ambre)
- *Brookesia antakarana* (NT) (Montagne d'Ambre)
- *Brookesia betschi* (VU) (Marojejy)
- *Brookesia ebenau* (VU) (Antsiranana, Montagne d'Ambre, Montagne des Français)
- *Brookesia griveaudi* (NT) (Masoala, Maroantsetra, Marojejy)
- *Brookesia stumpffi* (LC) (Ambanja, Ambilobe, Antsiranana, Antsohihy, Montagne d'Ambre, Montagne des Français)
- *Brookesia superciliaris* (LC) (Marojejy, Toamasina)

- *Brookesia tuberculata* (VU) (Montagne d'Ambre)
- *Brookesia vadoni* (VU) (Marojejy)

## **OBJECTIFS SPÉCIFIQUES**

Des observations nocturnes vont être réalisées pour localiser et capturer les caméléons afin de prélever des échantillons de matières fécales et de sang. Ces échantillons seront analysés pour déterminer le régime alimentaire et les parasites intestinaux. Les échantillons de sang seront analysés pour déterminer les génotypes de l'hôte (ex: pour l'analyse phylogénétique), les parasites sanguins, ainsi que les génotypes de parasites. Nous enregistrons également les coordonnées GPS et les données environnementales importantes pour les sites de repos où les caméléons sont capturés. Ces données fourniront un aperçu détaillé des adaptations et des différences écologiques qui favorisent la coexistence des espèces locales, et identifieront les paramètres cibles pour ceux qui gardent ces animaux en captivité à des fins de conservation et de recherche (par exemple, comment simuler le régime alimentaire naturel et les conditions environnementales nocturnes). La température ambiante et l'humidité de l'habitat vont être également enregistrées.

## **QUALIFICATIONS DES CHERCHEURS**

- Professeur Robert Pringle possède plus de 20 ans d'expérience dans l'étude des lézards, des serpents et d'autres animaux en Afrique (Kenya, Mozambique), en Australie et en Amérique du Nord et a publié plus de 115 articles scientifiques.
- Dr. Benjamin Rice possède plus de 9 ans d'expérience dans l'étude des maladies écologiques et des maladies de la faune sauvage dans d'autres endroits et a rédigé plus de 20 articles scientifiques.
- Mme Estelle Raobson possède de l'expérience dans la recherche sur le terrain ainsi que dans la recherche des parasites à Madagascar.
- Mme Ciara Nutter est spécialisée dans la gestion opérationnelle et logistique de la recherche sur le terrain et en laboratoire, en particulier le métabarcoding de l'ADN.

## **METHODOLOGIE**

### **Travaux sur le terrain**

Les observations nocturnes utilisant une lampe torche est la meilleure façon de trouver des caméléons et d'autres lézards arboricoles. Pour trouver des caméléons, les observations vont se faire le long des routes et des sentiers. Après avoir localisé un caméléon endormi, les coordonnées GPS, l'altitude, le type d'habitat, la hauteur du perchoir, la température ambiante et l'humidité, ainsi que la température corporelle

(à l'aide d'un thermomètre laser) vont être enregistrés. Pour *F. pardalis*, des petits enregistreurs de données (hygrochrons iButton, Dallas Semiconductor) vont être fixés au site de repos pour enregistrer les profils de température et d'humidité pendant plusieurs nuits.

### **Manipulation des individus collectés**

Les protocoles de manipulation des animaux et de prélèvement de matières fécales suivent généralement ceux déjà utilisés pour les lézards *Anolis*, qui sont écologiquement similaires aux caméléons (Kartzinel & Pringle, 2015; Pringle et al., 2019). Les individus vont être collectés à la main et seront temporairement placés dans des récipients en plastique avec une petite branche en bois à laquelle ils pourront s'agripper pour plus de confort. La masse et la longueur des animaux capturés seront enregistrées. Les animaux seront retenus manuellement et un membre qualifié de l'équipe prélèvera un petit échantillon de sang (environ 1 mL, maximum 0.5% de masse corporelle) par ponction à l'aiguille de la veine caudale (voir ci-dessous pour plus de détails sur le prélèvement sanguin). Les caméléons seront ensuite conservés dans des récipients en plastique, à l'intérieur à température ambiante (20-28°C) jusqu'à ce qu'ils défèquent. Les récipients seront inspectés toutes les 4 heures pour les matières fécales. Si un caméléon n'a pas déféqué dans les 40 heures suivant sa capture, il va être placé dans de l'eau chaude (30°C, une température corporelle diurne confortable pour les caméléons malgaches) pour favoriser la défécation (voir ci-dessous pour plus de détails sur les prélèvements fécaux). Les individus capturés ne seront conservés que pendant 48 heures maximum et seront ramenés exactement sur le site de capture, aucun approvisionnement en nourriture et en eau; les caméléons peuvent rester des jours sans boire et des semaines sans manger. Pendant cette courte période en captivité, les caméléons seront visuellement isolés les uns des autres pour minimiser le stress.

### **Prélèvement et analyse d'échantillons de sang**

Pour obtenir un échantillon de sang à analyser pour détecter les parasites sanguins et effectuer le génotypage, les animaux capturés seront immobilisés manuellement par un membre qualifié de l'équipe de recherche. Un petit échantillon de sang (environ 0.5-1 mL) sera prélevé par ponction à l'aiguille de la veine caudale. Le volume maximum de l'échantillon de sang correspond à un rapport de 0,5 % de la masse corporelle tel que 500 µL de sang peuvent être prélevés pour 100 grammes de masse corporelle. Une partie du sang (environ 500 µL) total sera placée sur un papier filtre FTA pour être conservée sous forme de tache de sang séché. Le reste de l'échantillon de sang (environ 500 µL de sang total) sera conservé dans des tubes à ADN sanguin PAXgene. Après le prélèvement de sang, les animaux seront remis dans leurs récipients en plastique pour le prélèvement d'échantillons fécaux.

Les échantillons de sang seront traités par extraction d'ADN, amplification de l'ADN cible par PCR et génotypage. L'extraction de l'ADN et l'analyse PCR seront effectuées au Laboratoire Mahaliana, Antananarivo. L'extraction de l'ADN sera réalisée à l'aide de kits commerciaux (QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini Kit) et la détection par PCR des parasites hémosporeidiens ciblera le cytochrome b du locus mitochondrial à l'aide des amorces de Pacheco et al., 2018. Les échantillons PCR positifs pour les parasites seront envoyés pour séquençage d'amplicons pour Oxford Nanopore MinION au Laboratoire Mahaliana, Antananarivo ou à l'Institut Lewis Sigler for Comparative Genomics à l'Université de Princeton.

### **Collecte des échantillons de matières fécales et analyse de l'ADN fécal**

Les récipients en plastique seront inspectés toutes les 4 heures durant le jour (et après 8 heures durant la nuit) pour détecter les matières fécales. Les échantillons fécaux (à l'exclusion de tout urate) seront prélevés à l'aide de gants en nitrile stériles, homogénéisés entre le pouce et l'index, et une portion d'environ 1 mL en volume sera transféré dans des tubes contenant des gels de silica et un tampon de stabilisation/lyse (DNA/RNA Shield ; Zymo Research). Les échantillons seront vortexés pour lyser les cellules et libérer l'ADN, puis congelés ou réfrigérés (selon les installations). Les échantillons stockés seront transférés au laboratoire du chercheur principal à l'Université de Princeton, spécialisé dans l'analyse de l'ADN fécal. Le transport et l'analyse à l'Université de Princeton sont justifiés par la nature spécialisée de l'analyse de l'ADN fécal, uniquement disponible dans le laboratoire du chercheur principal, qui permet une analyse précise et rentable qui n'est pas possible ailleurs.

L'ADN total sera extrait de l'échantillons fécaux utilisant les kits commerciaux (Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit, Zymo Research). Les extraits d'ADN, ainsi que divers contrôle positifs et négatifs, seront amplifiés en triple avec trois jeux d'amorces:

- Pour l'analyse du régime alimentaire, nous amplifierons un fragment d'ADN mitochondrial 16S au sein du phylum Arthropoda (incluant insectes, araignées et d'autres proies probables des caméléons) à l'aide de l'ensemble d'amorce **Arth02** (5'-GATAGAAACCRACCTGGYT-3' & 5'-AARTTACYTTAGGGATAACAG-3') (Taberlet et al., 2018)
- Pour l'analyse bactérienne, nous amplifierons la région des variables V4 du ARNr 16S à l'aide des amorces **515F** (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') et **806R** (5'-GGACTACH-VGGGTWTCTAAT-3') (Caporaso et al., 2012)
- Pour les parasites gastro-intestinaux, nous amplifierons la région ITS-2 du gène ARN ribosomal pour détecter l'ADN Strongylida: **NC1** (5'- ACGTCTGGTTCAGGGTTGTT -3') et **NC2** (5'- TTAGTTTCTTTTCCCTCCGCT - 3') (Gasser et al., 1993).

Les produits de PCR seront purifiés et séquencés sur une plateforme de séquençage à haut débit Illumina au Lewis Sigler Institute for Comparative Genomics de l'Université de Princeton.

## REFERENCES

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>

Gasser, R. B., Chilton, N. B., Hoste, H., & Beveridge, I. (1993). Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic acids research*, 21, 2525–2526. <https://doi.org/10.1093/nar/21.10.2525>

Kartzinel, T. R., & Pringle, R. M. (2015). Molecular detection of invertebrate prey by vertebrate predators: trophic ecology of Caribbean island lizards. *Molecular Ecology Resources*, 15, 903–914. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12366>

Pringle, R. M., Kartzinel, T. R., Palmer, T. M., Thurman, T. J., Fox-Dobbs, K., *et al.* (2019). Predator-induced collapse of niche structure and species coexistence. *Nature*, 570, 58–64. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1264-6>

Pacheco MA, Cepeda AS, Bernotienė R, Lotta IA, Matta NE, Valkiūnas G, Escalante AA. Primers targeting mitochondrial genes of avian haemosporidians: PCR detection and differential DNA amplification of parasites belonging to different genera. *Int J Parasitol.* 2018 Jul;48(8):657-670.

Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., & Coissac, É. (2018). *Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198767220.001.0001>