



# **Validation d'une puce à SNPs du caribou/renne (Rangifer tarandus) dans un contexte de conservation**

**Mémoire**

**Mallorie Trottier-Lavoie**

**Maîtrise en sciences animales - avec mémoire**  
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

**Validation d'une puce à SNPs du caribou/renne (*Rangifer tarandus*) dans un contexte de conservation**

**Mémoire**

**Mallorie Trottier-Lavoie**

**Sous la direction de :**

**Claude Robert, directeur de recherche  
Steeve D. Côté, codirecteur de recherche**

## Résumé

La majorité des populations de *Rangifer tarandus*, soit le caribou en Amérique du Nord et le renne en Eurasie, est en déclin et plusieurs risquent l'extinction. Les causes potentielles de ces déclin sont multiples et incluent la perturbation des habitats, les changements climatiques et la compétition apparente entraînant une augmentation de la prédation. Bien que des stratégies de gestion et de protection soient en place, l'évaluation de la structure génétique et de la dynamique des populations de caribous sauvages demeure difficile. L'étude génomique offre un moyen de décrire comment la diversité génétique de ces populations varie lorsque soumises à un déclin rapide. Nous rapportons ici le développement d'une plateforme de génotypage basée sur les SNPs (Illumina iSelect caribou/renne 60K) afin de réaliser des analyses génomiques.

L'hypothèse de travail est que la puce à SNPs de *Rangifer tarandus* offre une grande puissance pour déterminer l'origine d'un échantillon dans un contexte d'expertise biologique, mais également pour appuyer de manière rigoureuse la planification des travaux de gestion et de conservation de la faune. Les objectifs de ce projet de recherche sont dans un premier temps de valider et de tester cette plateforme pour sa sensibilité, sa répétabilité, sa robustesse, son habilité à distinguer des échantillons mélangés et sa spécificité. Dans un deuxième temps, nous souhaitons évaluer la capacité d'assignation d'un individu d'une provenance inconnue à un écotype. Un écotype est le regroupement de populations de caribous présentant des comportements et des préférences écologiques similaires.

Les résultats de ce projet ont démontré que la puce à SNPs est robuste, très sensible, fiable et précise et ce en utilisant jusqu'à 10 fois moins d'ADN que recommandé. La qualité de l'ADN a eu peu d'impact sur le taux de réussite (*call rate*) et le type d'échantillons biologiques n'était pas problématique, même pour ce qui est des fèces. L'hybridation inter-espèces a démontré une importante baisse du taux de réussite (*call rate*) et de l'hétérozygotie. Les échantillons mélangés étaient détectables selon la proportion de chacun des individus dans le mélange. Ces étapes de validation étaient cruciales afin de tester la puissance et les limites de ce nouvel outil génomique.

## **Abstract**

The vast majority of *Rangifer tarandus* populations, caribou in North America and reindeer in Eurasia, are declining and many herds are at risk. They are multiple causes for these declines including habitats perturbations, climate change and predation. Although management and protection strategies are in place, assessing the structure and dynamics of wild caribou populations remains difficult. Genomic surveying offers a mean to describe how populations are evolving when facing such rapid declines. We report here the development of a SNP-based genotyping platform to perform such analyses (Illumina iSelect caribou/reindeer 60K).

Our hypothesis is that the *Rangifer tarandus* SNPs chip offers a great power to determine the origin of a sample in the context of bio-forensic expertise. Our objectives are initially to validate and test this platform for its sensitivity, repeatability, robustness, ability to distinguish mixed samples and its specificity. Secondly, we aim to assess the platform ability to assign an individual of unknown provenance to an ecotype. An ecotype is the grouping of caribou populations with similar behaviors and ecological preferences.

Results showed that the SNP chip is robust, highly sensitive, reliable, and accurate at 10 times below recommended DNA input. DNA quality had little impact on call rates, and sample source was not an issue, even for fecal pellets. Interspecies hybridization showed an important drop in call rates and extent of heterozygosity. Mixed samples could be identified according to the proportion of each individual in the sample. These validation steps are crucial to test the power and limitations of this new genetic tool.

# Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Listes des tableaux .....	vii
Liste des figures .....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	x
Avant-propos.....	xi
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Revue de la littérature .....	3
1 Le caribou .....	3
1.1 Évolution de l'espèce .....	3
1.2 Écotypes et aires de répartition .....	3
1.3 Habitat .....	6
1.4 La diversité génétique entre les populations de <i>Rangifer tarandus</i> .....	7
1.5 Le déclin de l'espèce .....	9
1.6 La protection de l'espèce.....	12
1.6.1 Enjeux juridiques .....	12
1.6.2 La chasse.....	14
1.6.2.1 Chasse sportive.....	14
1.6.2.2 Chasse de subsistance.....	15
1.6.2.3 Récolte illégale.....	15
2 Technologies utilisées.....	16
2.1 Génomique des populations .....	16
2.2 Pourquoi utiliser les SNPs plutôt que les microsatellites? .....	16
2.3 Puce à SNPs .....	18
2.4 Le génome de référence et la découverte des SNPs.....	19
3 L'importance des sciences judiciaires fauniques .....	19
3.1 Volet 1 : Validation.....	19
3.2 Volet 2 : Étude des populations.....	22
4 Détermination des paramètres pour la validation de la puce à SNPs du caribou .....	24

4.1	Isolation de l'ADN provenant de différents tissus .....	24
4.2	Hypothèse de travail.....	24
4.3	Objectifs de travail .....	24
4.4	Perspectives .....	24
Chapitre 2 : Validation of a 60K SNP chip for caribou ( <i>Rangifer tarandus</i> ) for use in wildlife forensics, conservation, and management .....		25
Résumé.....		26
Abstract.....		27
1	Introduction.....	28
2	Materials and methods .....	30
2.1	Sample collection .....	30
2.2	Genomic DNA isolation.....	30
2.3	Genomic DNA integrity, concentration measurement and genotyping .....	31
2.4	Validation parameters .....	32
2.4.1	Sensitivity .....	32
2.4.2	Repeatability .....	32
2.4.3	Robustness (DNA quality and tissue type) .....	32
2.4.4	Effect of sample mixing/contamination.....	33
2.4.5	Specificity .....	33
2.4.6	Population assignment .....	33
2.5	Statistics .....	33
2.5.1	Sensitivity .....	34
2.5.2	Repeatability .....	34
2.5.3	Robustness .....	34
2.5.4	Mixed/contaminated samples.....	34
2.5.5	Specificity .....	35
2.5.6	Assignment statistics.....	35
3	Results.....	36
3.1	Sensitivity .....	36
3.2	Repeatability.....	36
3.3	Robustness versus sample quality .....	37
3.4	Robustness versus tissue type.....	37
3.5	Mixed samples .....	37
3.6	Specificity .....	38
3.7	Ecotype/population assignment.....	38

4	Discussion .....	40
5	Conclusion .....	45
6	Figures.....	46
7	Tables.....	54
	Conclusion générale.....	55
	Bibliographie générale .....	60

## Listes des tableaux

Tableau 1.1 Les caribous en Amérique du Nord : Écotype, sous-espèce et répartition. ....	4
Tableau 1.2 Unités de gestion versus groupes génétiques des caribous dans l’Est canadien. Tiré de Yannic et al. (2016). .....	9
Tableau 1.3 Statuts juridiques du fédéral pour le caribou au Canada.....	13
Tableau 1.4 Statuts juridiques du gouvernement provincial pour le caribou au Québec.	14
Tableau 2.1 DNA integrity number (DIN) and DNA concentration in samples used to test the robustness of the caribou SNP chip .....	54



## Liste des figures

Figure 1.1 Distribution des écotypes de caribous ( <i>Rangifer tarandus</i> ) retrouvés au Canada. Tiré de Festa-Bianchet et al. (2011). .....	5
Figure 1.2 Échelle de gradation afin de verbaliser une valeur du rapport de vraisemblance dans le but d'effectuer l'assignation d'un individu à une population de son espèce (Marquis et al., 2016).....	23
Figure 2.1 Caribou SNP chip sensitivity (n = 58) based on ANOVA repeated measures analysis with Bonferroni post hoc test and exponential regression of call rate (A, $y = -13.61e^{-\log(x)} + 94.87$ ) and genotyping error (B, $y = 14.1182e^{-\log(x)} - 0.1269$ ) versus DNA concentration in samples from three individuals. ....	46
Figure 2.2 Caribou SNP chip repeatability (n = 58) based on ANOVA repeated measures analysis with Bonferroni post hoc test of genotyping error versus DNA concentration in samples from three individuals.....	47
Figure 2.3 Caribou SNP chip robustness (n = 497) based on linear regression ( $y = 0.5951x + 89.4269$ ) of call rate versus sample DNA integrity number. ....	47
Figure 2.4 Caribou SNP chip tissue type robustness based on call rate with muscle (n = 6), ear punches (n = 6), hair follicles (n = 6), tendon (n = 3), faeces (n = 5), and blood swabs (n = 4). ....	48
Figure 2.5 Robustness of SNP genotyping of mixed caribou samples based on multivariate normal distribution analysis of homozygosity and call rate as dependent response variables and mixing ratio (two individuals) as explanatory variable. Ellipses indicate 95% confidence interval (n = 13 at each ratio). ....	48
Figure 2.6 SNP genotyping of mixed caribou samples (n = 65). Linear regression of genotyping error versus proportion of mixing of two individuals ( $y = -0.4684x + 53.4518$ ). ....	49
Figure 2.7 Caribou SNP chip specificity (n = 2 or 3 per species) based on ANOVA analysis with Bonferroni post hoc test for call rate (A) and heterozygosity (B) of 13 genotyped species. 'High' and 'Low' refer to the DNA content of the positive controls. ....	50
Figure 2.8 Caribou ecotype assignment (A) Ecotype geographical distribution predicted by genotyping based on 5,189 SNPs; (B) LOD scores associated with non-matching cases (n=5; predicted ecotype disagrees with telemetry data) and matching cases (n=768; genomic and telemetry data agree).....	51
Figure 2.9 Ecotype assignment robustness according to validation parameters. (A) Assignment LOD scores according to DNA quality (DIN) (blue dots = accurate assignments; red dots = inaccurate assignments); (B) Assignment LOD scores according to DNA quantity (same color code for dots while the vertical line marks the 75 ng/μL); (C, D) Heterozygosity and LOD scores according to individual proportion in mixed samples showing that a value lower than 0.4 for heterozygosity can be used as a criterium to discriminate mixed from pure samples (C, D).....	52
Figure 2.10 Geographical distribution of caribou populations according to genomic data (left) and telemetry data (right). ....	53

## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
Gbp	<i>Giga base pair</i>
IC	Intervalle de confiance
MFFP	Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs
MU	<i>Management Unit</i>
Ne	Taille efficace de la population
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
R.t.	<i>Rangifer tarandus</i>
RV	Rapport de vraisemblance
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
SWGDM	<i>Scientific Working Group on DNA Analysis Methods</i>

## **Remerciements**

J'aimerais remercier mon directeur, Claude Robert, pour son soutien, sa confiance, ainsi que de m'avoir poussée à me dépasser et à avoir confiance en moi, et ce tout au long du projet. De plus, j'aimerais remercier Isabelle Gilbert qui a été une personne-ressource essentielle durant ma maîtrise, qui a su être présente durant toutes les étapes de mon projet afin de m'épauler et me diriger durant les différentes manipulations en laboratoire. Ses connaissances, sa patience et son sens de l'humour ont été énormément appréciés. Merci à Julien Prunier, professionnel de recherche, qui m'a apportée son aide précieuse pour certaines analyses bio-informatiques. Je voudrais également remercier William Poisson, étudiant à la maîtrise dans le laboratoire de Claude, qui m'a énormément soutenue lors des moments difficiles et aidée lorsque la bio-informatique avait raison de ma patience légendaire. Je ne pourrais passer sous silence, Mélodie Desnoyers, Karine Dubuc, Alexandra Carrier, Mathilde Marchais et Patricia Tremblay. La maîtrise ne m'a pas qu'apporté de nouvelles connaissances et compétences professionnelles, elle m'a également apporté de merveilleuses amitiés. Je suis choyée d'avoir fait partie de ce laboratoire où le respect et le plaisir sont des valeurs très importantes.

J'aimerais également remercier ma famille et mes amis qui m'ont soutenue tout au long de ma maîtrise et qui m'ont encouragée lors des moments plus difficiles.

Merci à mon co-directeur, Steeve Côté, pour son aide tout au long de mon projet. L'écologie du caribou était un sujet très nouveau pour moi et Steeve a très bien su me diriger au début de ma maîtrise afin de m'initier à cet univers bien unique. De plus, j'aimerais remercier l'équipe du ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs : Joëlle Taillon, Vicky Albert et Vincent Bourret qui ont su répondre à mes mille-et-une questions durant mon projet.

Finalement, je tiens à remercier tous les partenaires ayant rendu mon projet de maîtrise possible. Merci à Génome Canada, à Génome Québec, au ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs, Caribou Ungava et au Zoo de Toronto.

## **Avant-propos**

Ce mémoire comporte deux chapitres. Le premier chapitre est une revue de la littérature permettant de mettre en contexte les lecteurs sur la situation du caribou, ainsi que ce qui motive mon projet de recherche. Le deuxième chapitre est rédigé sous forme d'article scientifique en anglais et présente le cœur de mon projet. Cet article sera soumis à un journal prochainement. Voici les détails concernant cette publication :

### **Chapitre 2: Validation of a 60K SNP chip for caribou (*Rangifer tarandus*) for use in wildlife forensics, conservation, and management**

Soumission prévue à Forensic Science International : Animal and Environment

Auteure principale : Mallorie Trottier-Lavoie

Coauteurs : Julien Prunier, William Poisson, Alexandra Carrier, Isabelle Gilbert, Gabriela Mastromonaco, Vicky Albert, Vincent Bourret, Joëlle Taillon, Steeve D. Côté et Claude Robert.

**Julien Prunier** a développé le script bio-informatique pour l'assignation des populations et a commenté l'article.

**William Poisson** a participé à la manipulation des échantillons en laboratoire et a aidé aux analyses bio-informatiques.

**Alexandra Carrier** a aidé aux analyses bio-informatiques.

**Isabelle Gilbert** a coordonné la gestion des échantillons et a participé à la manipulation des échantillons en laboratoire.

**Gabriela Mastromonaco** a fourni des échantillons de différentes espèces animales et a commenté l'article.

**Vicky Albert, Vincent Bourret et Joëlle Taillon**, représentant le ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs, ont fourni les échantillons de caribous, ont aidé à définir le projet et ont commenté l'article.

**Steeve D. Côté** a aidé à définir le projet et a travaillé à la rédaction de l'article.

**Claude Robert** a défini le projet et a participé à la rédaction de l'article.

## Introduction

Le caribou/renne est une espèce emblématique de l'Amérique du Nord et de l'Eurasie. Il revêt une importance capitale tant culturelle que pour les écosystèmes boréal et arctique (Festa-Bianchet et al., 2011). Les biologistes ont caractérisé ces animaux selon différents écotypes se basant principalement sur la distribution géographique, le comportement et l'écologie des animaux, et dans lesquels on retrouve différentes sous-espèces basées sur l'apparence et les mesures squelettiques (Banfield, 1961; COSEPAC, 2011; Festa-Bianchet et al., 2011; Hummel & Ray, 2008). Cependant, les sous-espèces sont maintenant considérées comme obsolètes. Plusieurs écotypes de caribous subissent présentement un déclin sans précédent (Vors & Boyce, 2009). Différentes approches sont utilisées par les biologistes afin de suivre, gérer et protéger les différentes populations, notamment le suivi par collier satellite, les inventaires aériens et l'utilisation de marqueurs génétiques de différents types. Bien que ces outils aient permis d'étudier le caribou jusqu'à présent, un nouvel outil génomique a été mis sur pied, soit la puce à SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) du caribou (*Rangifer tarandus*) (Carrier, Prunier et al., en révision). La puissance de cet outil se cache derrière les 63,000 SNPs soigneusement identifiés et répartis sur l'ensemble du génome de cette espèce (Carrier, Prunier et al., en révision). C'est à l'aide d'une portion de ces SNPs que des signatures génétiques pour les différents écotypes de caribous ont été identifiées permettant ainsi de déterminer précisément la provenance d'un individu (Carrier, Prunier et al., en révision).

Les objectifs de ce projet de recherche sont dans un premier temps de valider la puce à SNPs du caribou afin d'évaluer sa précision, sa fiabilité, ses limites ainsi que sa spécificité à l'espèce concernée. Pour ce faire, différents paramètres de validation ont été élaborés, soient la sensibilité, la répétabilité, la robustesse, les mélanges d'individus et la spécificité. Dans un deuxième temps, ce projet vise à évaluer le potentiel d'assignation de la puce lorsque soumise à un individu dont la provenance est inconnue.

Ce mémoire est divisé en deux chapitres. D'abord, au chapitre 1, nous retrouvons une revue de littérature qui aborde l'écologie du caribou (*Rangifer tarandus*), la protection de

l'espèce par l'entremise des enjeux législatifs y étant associés, l'importance de la médecine légale faunique, les aspects de la génomique au service de la science faunique et finalement l'univers de la validation. Ensuite, le chapitre 2 se trouve sous forme d'article scientifique et traite de la validation de la puce à SNPs du caribou ainsi que de l'évaluation du potentiel d'assignation de celle-ci.

# Chapitre 1 : Revue de la littérature

## 1 Le caribou

### 1.1 Évolution de l'espèce

Le caribou est un grand mammifère faisant partie de la famille des cervidés et se serait développé il y a au moins deux millions d'années (Bergerud & James-abra, 2012; Festa-Bianchet et al., 2011; Forbes & Kumpula, 2009; Weckworth et al., 2012; Yannic et al., 2017). Les biologistes pensent que cette espèce trouve son origine de la Béringie et se serait déplacée autant vers l'Amérique du nord que l'Eurasie occidentale, créant ainsi la lignée de caribous nord-américaine et la lignée euro-béringienne, où l'espèce est nommée renne (Bergerud & James-abra, 2012; Festa-Bianchet et al., 2011; Forbes & Kumpula, 2009; Yannic et al., 2017). Ainsi, on retrouve le caribou dans le nord de l'Amérique du Nord, et le renne en Europe et en Asie (Festa-Bianchet et al., 2011). Bien que répartie sur différents continents, il s'agit d'une seule et même espèce, soit *Rangifer tarandus* (Festa-Bianchet et al., 2011). En Amérique du Nord cette espèce est retrouvée uniquement à l'état sauvage, tandis qu'en Eurasie la domestication s'est développée il y a plus de 1000 ans (Uboni et al., 2016). Ainsi, on retrouve autant de rennes à l'état sauvage qu'à l'état semi-domestiqué (Uboni et al., 2016). Finalement, bien que le caribou et le renne fassent partie de la même espèce, il existe des différences considérables entre les traits phénotypiques de ceux-ci (Cronin et al., 2003). En effet, la morphologie (ex. taille du corps et coloration du pelage) et la physiologie (ex. moment de la reproduction et de la mise bas) ne sont pas les mêmes (Klein, 1980; Klein et al., 1987).

### 1.2 Écotypes et aires de répartition

En Amérique du Nord, le caribou est un animal emblématique et a une très grande importance culturelle chez les nations autochtones. Au Canada, le caribou est divisé en quatre sous-espèces (Tableau 1.1 et Figure 1.1) (Festa-Bianchet et al., 2011). L'aire de répartition des caribous est très vaste (Tableau 1.1) (Boulet et al., 2007; COSEPAC, 2002). En plus de cette vaste distribution canadienne, le caribou est également retrouvé en Alaska et au Groenland (Tableau 1.1) (Mallory & Boyce, 2017).

Tableau 1.1 Les caribous en Amérique du Nord : Écotype, sous-espèce et répartition.

Migration	Écotype	Sous-espèce	Répartition	Références
<b>Migrateur</b>	Migrateur de la toundra	Toundrique ( <i>R. t. groenlandicus</i> )	Territoires du Nord-Ouest Nunavut Yukon Alberta Saskatchewan Manitoba	(COSEPAC, 2011; Hummel & Ray, 2008)
		Grant's ( <i>R. t. granti</i> )	Yukon Alaska	(Hummel & Ray, 2008)
		Caribou des bois ( <i>R. t. caribou</i> )	Ontario Manitoba Québec Labrador	(COSEPAC, 2011; COSEWIC, 2017; Hummel & Ray, 2008)
	Montagnard	Grant's ( <i>R. t. granti</i> )	Yukon Alaska	(Hummel & Ray, 2008)
		Caribou des bois ( <i>R. t. caribou</i> )	Colombie-Britannique Alberta	(Hummel & Ray, 2008)
	Peary	Peary ( <i>R. t. pearyi</i> )	Territoires du Nord-Ouest Nunavut	(COSEPAC, 2011; Hummel & Ray, 2008)
<b>Sédentaire</b>	Forestier	Caribou des bois ( <i>R. t. caribou</i> )	Manitoba Alberta Québec Colombie-Britannique Alberta Territoires-du-Nord-Ouest Saskatchewan Ontario Terre-Neuve-et-Labrador	(COSEPAC, 2011; Hummel & Ray, 2008)
		Grant's ( <i>R. t. granti</i> )	Yukon Alaska	(Hummel & Ray, 2008)
	Montagnard	Caribou des bois ( <i>R. t. caribou</i> )	Québec Colombie-Britannique Terre-Neuve-et-Labrador	(COSEWIC, 2017; Hummel & Ray, 2008)



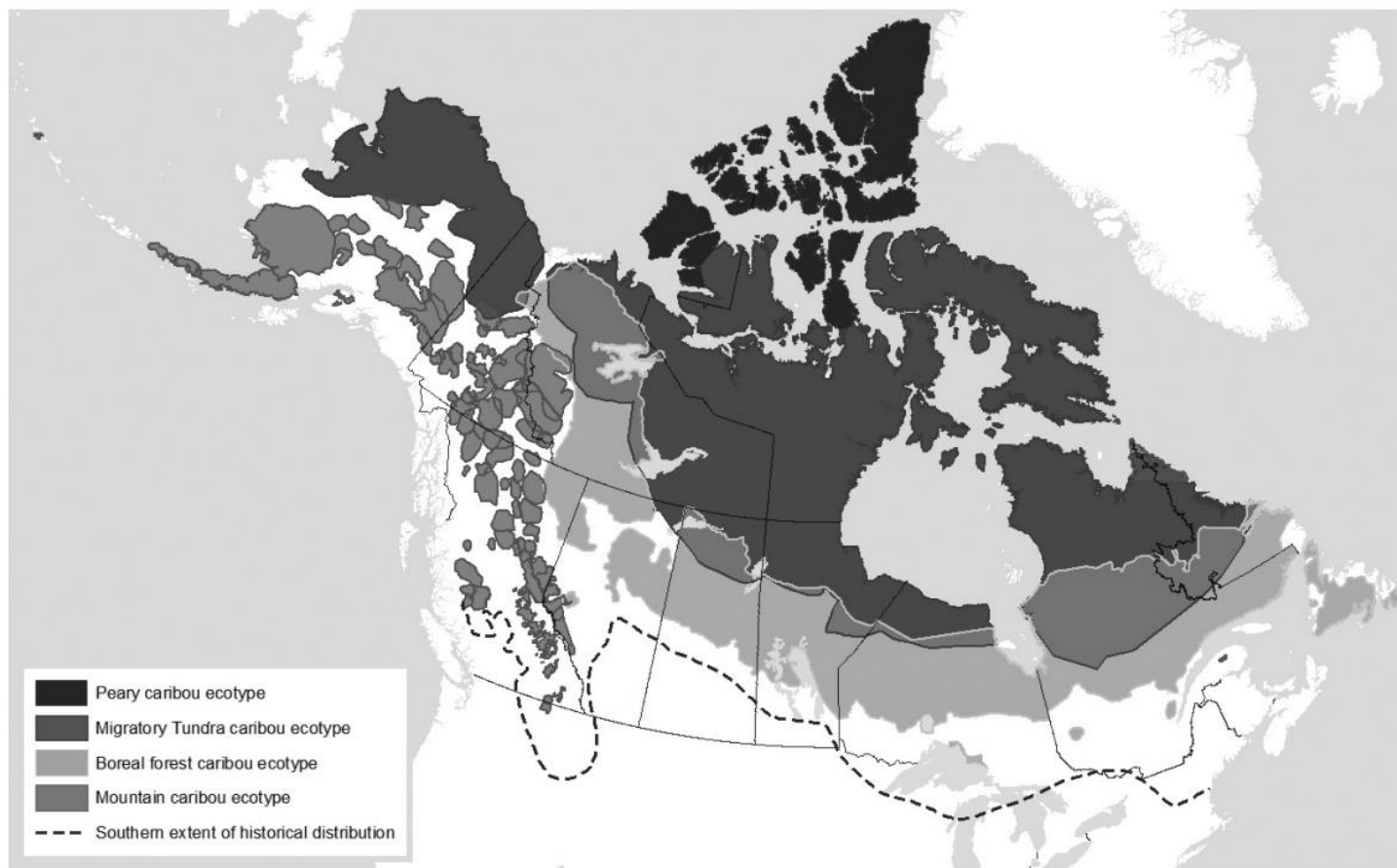


Figure 1.1 Distribution des écotypes de caribous (*Rangifer tarandus*) retrouvés au Canada. Tiré de Festa-Bianchet et al. (2011).

Comme mentionné ci-haut, quatre sous-espèces de caribous peuplent le territoire canadien. Cependant, le Québec se caractérise par la présence d'une seule sous-espèce, soit le caribou des bois (*Rangifer tarandus caribou*) (MFFP, 2021c). Cette sous-espèce se divise en trois écotypes : le caribou migrateur, montagnard et forestier (MFFP, 2021b). De façon sommaire, l'écotype migrateur est composé de deux populations, celle de la Rivière-George et celle de la Rivière-aux-Feuilles (COSEWIC, 2017). Comme le nom de l'écotype l'indique, les caribous migrants effectuent des déplacements saisonniers de centaines de kilomètres entre la forêt boréale et la toundra (Taillon et al., 2016). L'écotype montagnard est représenté par une population se situant en Gaspésie, plus précisément au niveau des hauts plateaux des massifs des Chics-Chocs et des McGerrigle, dans le parc national de la Gaspésie ainsi qu'en périphérie (MFFP, 2021d). Une 2<sup>e</sup> population de montagnards se loge dans les monts Torngat au nord du Québec et au Labrador (COSEWIC, 2017). Finalement, l'écotype forestier est observé en faible densité dans la forêt boréale entre le 49<sup>e</sup> et le 55<sup>e</sup> parallèles (MFFP, 2021b). Les caribous forestiers sont plus sédentaires et demeurent au sein de la forêt boréale dans un espace s'échelonnant sur environ 500 km, malgré qu'ils soient capables de réaliser d'importants déplacements saisonniers (MFFP, 2021b)

### **1.3 Habitat**

Le caribou est une espèce qui, de par sa distribution holarctique, utilise différents biomes et écosystèmes, notamment les forêts boréales et montagneuses, la taïga et la toundra subarctique, arctique ou alpine (Yannic et al., 2017). La grande diversité de climats impose aux caribous des différences quant à la préférence d'habitats, l'utilisation de l'espace et les comportements migratoires (Yannic et al., 2017). C'est pourquoi nous observons différents écotypes tel que mentionné dans les sections ci-haut. Bien que l'habitat diverge d'une population à l'autre, une tendance claire se dessine selon les saisons et le cycle de reproduction (Britton et al., 2009; MFFP, 2021b; Weladji & Forbes, 2002; Yannic et al., 2017). En effet, en été les caribous utilisent des environnements plus ouverts, soient des tourbières ou encore des peuplements de jeunes arbres pour le caribou forestier et des prairies ou la toundra herbacée pour le caribou migrateur (Britton et al., 2009; MFFP, 2021c; Weladji & Forbes, 2002). En hiver, les caribous forestiers se déplacent vers des forêts matures de résineux avec ou sans lichen qui ont moins d'accumulation de neige due

à la protection par les arbres, tandis que les caribous migrateurs vont préférer des régions avec une plus importante disponibilité de lichens dans la taiga (MFFP, 2021c; Sharma et al., 2009; Weladji & Forbes, 2002).

#### **1.4 La diversité génétique entre les populations de *Rangifer tarandus***

La grande distribution géographique et la variété des habitats ont induit une diversité génétique élevée à travers les populations de caribou (Yannic et al., 2017). Ces deux caractéristiques sont les principaux moteurs de la différenciation génétique entre les populations (Yannic et al., 2017). Récemment, les biologistes ont étudié les mécanismes de flux/migration des gènes des troupeaux de caribous et de rennes à l'aide d'analyses phylogénétiques utilisant de l'ADN mitochondrial, des marqueurs microsatellites et des colliers émetteurs (Boulet et al., 2007; Kvie et al., 2016; Yannic et al., 2017). Des analyses phylogénétiques basées sur des régions mitochondriales ont permis la formation de trois principaux groupes de l'espèce *Rangifer tarandus*, soient le groupe béringien, le groupe nord-américain et le groupe eurasien (Flagstad & Røed, 2003). Le groupe béringien est le plus influant par sa contribution génétique à toutes les populations existantes de caribous et représenterait une population glaciaire importante et continue allant de la Béringie à l'Eurasie (Flagstad & Røed, 2003). Le groupe nord-américain aurait été situé au sud de la calotte glaciaire en Amérique du Nord vraisemblablement constitué de différentes populations (Flagstad & Røed, 2003). Le groupe eurasien représente un groupe plus isolé en lien avec l'expansion des glaces dans l'ouest de l'Eurasie (Flagstad & Røed, 2003). Des études ultérieures, notamment celle de Yannic et al. (2014), ont plutôt défini deux groupes génétiques distincts à l'aide d'une approche combinant des données génétiques et des modèles d'analyses spatiales de stabilité climatique. De cette étude, sont sortis le groupe nord-américain et le groupe euro-béringien incluant les rennes de Svalbard et les caribous du Groenland (Yannic et al., 2014).

L'étude de Weckworth et al. (2012) démontre que les caribous peuplant l'Amérique du Nord détiennent un très haut niveau de variation génétique et, d'après la phylogénie à partir de 14 loci de marqueurs microsatellites, seraient génétiquement séparés en deux groupes principaux. D'abord, le groupe du Sud (*Southern group*) trouve son origine en Amérique

du Nord et qui est majoritairement constitué de caribous montagnards du sud et de la forêt boréale. Puis, le groupe du Nord (*Northern group*) qui trouve son origine de la Béringie et qui est majoritairement constitué des caribous montagnards du nord (*R. t. caribou*), de la toundra et de l'Alaska (Weckworth et al., 2012). En plus d'une différenciation génétique à large échelle, il existe également des différenciations génétiques entre les troupeaux d'un même groupe (Weckworth et al., 2012). Le groupe du Nord présenterait une plus grande variabilité génétique comparativement au groupe du Sud (Weckworth et al., 2012). Finalement, Weckworth et al. (2012) ont démontré une divergence apparente entre les caribous de l'ouest et de l'est canadien.

Dans l'étude de Boulet et al. (2007), les trois écotypes de caribou sont étudiés dans l'Est du Canada, à l'aide d'une combinaison de technologies utilisant le suivi par satellite, l'analyse génétique (utilisation de sept loci de microsatellites) et les simulations démographiques. Les niveaux de différenciation génétique les plus forts sont observés entre les troupeaux de caribous sédentaires séparés par de grandes distances (>1000 km) et entre les troupeaux sédentaires et migrants (Boulet et al., 2007). Une autre étude utilisant 16 marqueurs microsatellites et se concentrant également sur les caribous dans l'Est canadien a permis de créer six groupes génétiques (Tableau 1.2) ne concordant pas parfaitement avec les unités de gestion basées sur la répartition géographique des caribous (Yannic et al., 2016). Ainsi, bien que les indices de différenciation génétique ( $F_{st}$ ) soient bas, il existe une distinction génétique significative entre les écotypes forestier, montagnard et migrant (excepté entre migrants et montagnards des Torngat) (Yannic et al., 2016). On observe également une différenciation génétique au sein des trois groupes de caribous forestiers du Québec (Yannic et al., 2016).

Tableau 1.2 Unités de gestion versus groupes génétiques des caribous dans l’Est canadien.  
Tiré de Yannic et al. (2016).

Unités de gestion	Groupe génétique	Écotype	Distribution
MU1	1	Montagnard	Gaspésie
MU2	2	Migrateur de la toundra	Rivière-aux-Feuilles
MU3		Migrateur de la toundra	Rivière-George
MU4		Montagnard	Monts Torngat
MU5	3	Forestier de l’Ouest	Forêt boréale
MU6	4	Forestier du Centre	Forêt boréale
MU 7	5	Forestier de l’Est	Forêt boréale (Labrador)
MU 8	6	Forestier	Forêt boréale (Charlevoix)

### 1.5 Le déclin de l’espèce

Occupant une place centrale dans l’écologie et la culture de plusieurs régions canadiennes et eurasiennes, le caribou fut autrefois largement abondant tant au Canada qu’en Eurasie. Cependant, celui-ci fait maintenant face à un déclin généralisé et est considéré globalement comme une espèce vulnérable par l’Union internationale pour la conservation de la nature (IUCN) depuis 2015. Plusieurs aspects sont responsables du déclin des populations de caribous et de rennes. Parmi ceux-ci on retrouve les changements climatiques qui engendrent une modification des patrons de température causant ainsi diverses problématiques (ex. : diminution du couvert de lichens, augmentation de la saison de harcèlement par les insectes piqueurs et les parasites, augmentation de la fréquence des évènements de pluie sur neige en hiver, etc.), la perte et l’altération de l’habitat (ex. aménagement forestier, feux de forêt, activités humaines récréatives, etc.), la prédation par les loups (*Canis lupus*) et les ours noirs (*Ursus americanus*) dont l’abondance est en croissance grâce à la présence accentuée de proies alternatives (ex. orignaux (*Alces*) et cerfs de Virginie (*Odocoileus virginianus*)), le développement des routes et chemins forestiers

qui facilitent le déplacement des prédateurs et finalement la chasse (MFFP, 2021b; Taillon et al., 2016; Vors & Boyce, 2009). Les populations de caribous et de rennes ont historiquement fluctué dans le temps (Vors & Boyce, 2009). Cependant, les déclinés actuels importants et relativement synchrones des populations sur une distribution circumpolaire sont plus qu'inquiétants et soulignent la vulnérabilité de cette espèce (Vors & Boyce, 2009). Selon les communautés indigènes du nord, les changements météorologiques, les feux de forêts plus fréquents et le développement industriel dans les zones utilisées par les caribous ont affecté négativement la condition corporelle de ces animaux et altéré les déplacements de ceux-ci (Kendrick & Manseau, 2008; Parlee et al., 2005). Le caribou des bois (*R. t. caribou*) a fait état d'un plan de rétablissement depuis 2012 et d'un plan d'action depuis 2018 par le gouvernement du Canada (Environnement et Changement climatique Canada, 2018b). Bien que des efforts de conservation ont été déployés, le déclin de cette sous-espèce de caribou s'est accentué un peu partout à l'échelle canadienne (Gouvernement du Canada, 2020).

### *Écotype Forestier*

C'est notamment la situation du caribou forestier qui depuis les dernières décennies a connu une perte importante de son aire de répartition, pouvant aller jusqu'à une diminution de 50 % (Gouvernement du Canada, 2020). Selon le gouvernement du Canada, « pour 37 des 51 populations où des tendances sont disponibles, 81 % sont en déclin » (Gouvernement du Canada, 2020). Le déclin du caribou forestier est particulièrement grand en Alberta, dans le nord-est de la Colombie-Britannique et au Labrador (Gouvernement du Canada, 2020). Du côté québécois, le caribou forestier fait l'objet d'un plan de rétablissement depuis 2013 (Équipe de rétablissement du caribou forestier au Québec, 2013). Diverses hypothèses émises par l'équipe de rétablissement du caribou forestier expliquent le déclin de celui-ci. L'une de ces hypothèses réside dans le fait que le caribou forestier vit à très faible densité et possède un faible potentiel de recrutement limitant ainsi la croissance des populations (Équipe de rétablissement du caribou forestier au Québec, 2013). En effet, le caribou forestier se caractérise par plusieurs petites hardes réparties en dix régions administratives au Québec (Équipe de rétablissement du caribou forestier au Québec, 2013). Bien qu'il soit difficile d'estimer l'abondance des hardes de caribous

forestiers car il n'y a pas d'inventaire systématique réalisé pour cet écotype, la population de caribous forestiers du Québec était estimée entre 5 980 et 8 770 bêtes en 2012 (Équipe de rétablissement du caribou forestier au Québec, 2013; MFFP, 2021a).

### *Écotype migrateur*

De son côté, un important déclin du caribou migrateur de l'Est canadien est observé (COSEWIC, 2017). C'est notamment le cas des caribous du troupeau Rivière-aux-Feuilles dans le nord du Québec, qui est passé d'environ 1 193 000±567 100 individus en 2001 à 199 000 ± 15 920 en 2016 (COSEWIC, 2017). De son côté, le troupeau Rivière-George est passé de 823 000±102 000 individus en 1993 à 8 100 individus en 2020 (COSEWIC, 2017; MFFP, 2020). Bien que ces nombres soient très élevés, il est important de mentionner que de grandes fluctuations naturelles pour les deux populations du Québec-Labrador existent depuis longtemps. Des études portant sur les cicatrices laissées par les sabots de caribous sur les racines d'épinettes noires (*Picea mariana*) ont d'ailleurs démontré qu'un déclin de la population Rivière-George se serait amorcé en 1870, pour s'accroître entre 1905-1915, remonter entre 1920-1930, pour redécliner vers 1940 et finalement remonter de manière importante entre 1950 et 1980 (Morneau & Payette, 2000). Cependant, la situation actuelle est sans précédent avec des effectifs les plus bas jamais enregistrés (COSEWIC, 2017).

### *Écotype sédentaire montagnard*

Pour le caribou montagnard des monts Torngat, trois inventaires ont été effectués en l'espace de 30 ans (COSEWIC, 2017). De ce fait, la taille de la population des monts Torngat était estimée à 5 000 individus en 1980 (Bélanger & Le Hénaff, 1985; COSEWIC, 2017). En 2014, un inventaire aérien a été mené et aucun caribou n'a été observé au sud du fjord Hebron, suggérant une diminution de cette population se situant maintenant fort probablement dans une fourchette de 616 à 1 453 individus (Couturier et al., 2015). Ainsi le déclin observé entre 1980 et 2014 serait d'environ 81 % (COSEWIC, 2017). Cependant, un autre inventaire en 2017 a montré que le nombre d'individus des monts Torngat augmentait de 13 % par année depuis 2014 (Couturier et al., 2018). Un autre déclin important d'une population d'écotype montagnard est celui de la Gaspésie qui est passée d'environ 200 individus dans les années 2000 à environ 40 individus en 2019 (IC 95%)

(Équipe de rétablissement du caribou de la Gaspésie, 2018; M. Morin & Lesmerises, 2020). Cette population fait d'ailleurs l'objet d'un plan de rétablissement pour la période 2019-2029 (Équipe de rétablissement du caribou de la Gaspésie, 2018).

## **1.6 La protection de l'espèce**

Cette section se concentre sur le caribou au Canada et porte une attention particulière au caribou du Québec.

### **1.6.1 Enjeux juridiques**

La structure juridictionnelle pour la gestion et la conservation du caribou au Canada est complexe. Effectivement, celle-ci est répartie en plusieurs niveaux, soit fédéral, provincial et territorial (Environnement et Changement climatique Canada, 2018a). De plus, les nations autochtones partagent des responsabilités avec le gouvernement quant à la gestion de la faune (Environnement et Changement climatique Canada, 2018a). De façon générale, pour qu'une espèce soit protégée elle doit d'abord détenir un statut d'espèce en péril (Environnement et Changement climatique Canada, 2018a). Ce statut est attribué par le *Comité sur la situation des espèces en péril du Canada* (COSEPAC) (COSEPAC, 2021). Par la suite, la *Loi sur les Espèces en Péril* (LEP) permet aux espèces ayant un statut en péril d'acquérir une protection législative fédérale (Gouvernement du Canada, 2022). La conservation de la majorité des espèces est sous la responsabilité des gouvernements provinciaux et territoriaux qui ne possèdent pas nécessairement de législation pour les espèces en péril (Festa-Bianchet et al., 2011). Pour sa part, le Québec détient une législation pour les espèces en péril (Festa-Bianchet et al., 2011). Ainsi, différents statuts, tant fédéraux que provinciaux, sont octroyés aux écotypes selon leur situation. Le Tableau 1.3 regroupe les statuts juridiques fédéraux pour chaque écotype de chaque sous-espèce. Pour sa part, le Tableau 1.4 regroupe les statuts provinciaux du caribou au Québec.



Tableau 1.3 Statuts juridiques du fédéral pour le caribou au Canada.

Nom commun (Sous-espèce)	Écotype	Population	Statut fédéral COSEPAC (date du statut)
Caribou toundrique ( <i>R. t. groenlandicus</i> )	Migrateur de la toundra	-	En voie de disparition (2017)
Caribou de Peary ( <i>R. t. pearyi</i> )	Migrateur de la toundra	-	Menacée (2015)
Caribou de Grant ( <i>R. t. granti</i> )	Migrateur de la toundra	-	Menacée (2016)
Caribou des bois ( <i>R. t. caribou</i> )	Migrateur de la toundra	Rivière-aux-Feuilles  Rivière-George	En voie de disparition (2017)
	Montagnard	Monts Torngat	En voie de disparition (2016)
		Gaspésie	En voie de disparition (2002)
	Forestier	Forêt boréale	Menacée (2002)

Tableau 1.4 Statuts juridiques du gouvernement provincial pour le caribou au Québec.

Nom commun (Sous-espèce)	Écotype	Population	Statut Provincial MFFP (date du statut)
Caribou des bois ( <i>R. t. caribou</i> )	Migrateur de la toundra	Rivière-aux-Feuilles	Aucun statut
		Rivière-George	
	Montagnard	Monts Torngat	Aucun statut
		Gaspésie	Espèce menacée (2009)
	Forestier	Forêt boréale	Vulnérable (2005)

## 1.6.2 La chasse

La chasse aux caribous est de manière générale régulée sur la base des écotypes (Festa-Bianchet et al., 2011). Lorsqu'on parle de chasse, il est important de distinguer la chasse sportive, la récolte à des fins alimentaires, rituelles ou sociales par des membres de communautés autochtones (chasse de subsistance) et la récolte illégale (braconnage).

### 1.6.2.1 Chasse sportive

Tout d'abord, les règlements entourant la chasse sportive du caribou au Canada sont établis par les provinces ou les territoires (Festa-Bianchet et al., 2011). De ce fait, au Québec, la chasse sportive au caribou montagnard de la Gaspésie, au caribou forestier et au caribou migrateur (Rivière-George) est interdite depuis 1949, 2001 et 2012 respectivement, et depuis 2018 pour la population migratrice Rivière-aux-Feuilles (Équipe de rétablissement du caribou de la Gaspésie, 2018; Équipe de rétablissement du caribou forestier au Québec, 2013; MFFP, 2021d).

### **1.6.2.2 Chasse de subsistance**

Pour sa part, la récolte à des fins alimentaires, rituelles ou sociales par des membres de communautés autochtones se caractérise par un droit constitutionnel qu'ont les nations autochtones de chasser pour subvenir à leurs besoins (Festa-Bianchet et al., 2011). En fait, au Québec, certaines nations autochtones ont signé des traités confirmant leur accès privilégié au caribou comme ressource faunique, et ce en encadrant leur récolte qui est généralement subordonnée au principe de conservation (Équipe de rétablissement du caribou forestier au Québec, 2013). Ainsi, les nations autochtones concernées travaillent de pair avec le gouvernement du Québec afin d'établir des niveaux de récolte durables permettant de répondre aux enjeux de conservation touchant chaque écotype de caribou (Équipe de rétablissement du caribou forestier au Québec, 2013). Cependant, certaines communautés autochtones du Québec n'ont pas signé de traités relatifs à l'accès au caribou ou sont en cours de discussion avec le gouvernement du Québec (Équipe de rétablissement du caribou forestier au Québec, 2013). De ce fait, celles-ci peuvent pratiquer la chasse au caribou en vertu de leurs droits ancestraux ou issus de traités, établis ou revendiqués de manière crédible (Équipe de rétablissement du caribou forestier au Québec, 2013). Cependant, cette récolte peut être limitée, restreinte ou encore interdite pour des raisons de conservation et de protection d'une espèce faunique (Gouvernement du Québec, 2002). Pour sa part, le caribou migrateur a fait état, en 2017, d'une entente historique entre sept nations autochtones pour limiter la chasse de subsistance (Table ronde autochtone du caribou de la péninsule d'Ungava, 2017).

### **1.6.2.3 Récolte illégale**

L'étendue réelle du braconnage du caribou est inconnue. Cependant, celui-ci est jugé comme étant assez rare pour l'ensemble des écotypes (Équipe de rétablissement du caribou forestier au Québec, 2013). Au Québec, les agents de la protection de la faune effectuent une surveillance plus importante dans les régions où l'on retrouve le caribou forestier (Équipe de rétablissement du caribou forestier au Québec, 2013). Somme toute, bien que des mesures soient mises en place pour protéger le caribou au Québec, il est très difficile pour les agents de la faune de différencier les caribous des écotypes forestier et migrateur

seulement par leur apparence physique (Taillon et al., 2016). Ainsi, la mise en place d'un outil génétique est nécessaire afin de discriminer de manière fiable les différents écotypes.

## **2 Technologies utilisées**

### **2.1 Génomique des populations**

La génomique des populations est, selon Luikart et al. (2019), (traduction personnelle), « l'utilisation d'approches conceptuellement nouvelles afin de traiter de questions insolubles par les méthodes génétiques traditionnelles en utilisant des marqueurs à haute densité du génome (par exemple : ADN, ARN, marques épigénétiques) pour fournir un pouvoir élevé de détection des régions génomiques associées à des traits ou processus évolutifs tels que la condition physique, les phénotypes et la sélection ». Ainsi, la génomique des populations au sens large utilise de nouvelles technologies et un grand nombre de loci afin de répondre à des questions en génétique des populations, telles que la découverte de la fonction de gènes provenant de l'évolution adaptative, ou encore la mise en lumière des paramètres des populations (ex. : la taille efficace, la structure, etc.) en utilisant des millions de marqueurs neutres (Luikart et al., 2019). Somme toute, les approches génomiques offrent une image plus complète des paramètres génétiques sur l'ensemble du génome contrairement aux marqueurs moléculaires traditionnels, tels les microsatellites, qui ne fournissent des informations que sur une petite fraction du génome (Luikart et al., 2019).

### **2.2 Pourquoi utiliser les SNPs plutôt que les microsatellites?**

Le microsatellite est une séquence d'ADN constituée d'une répétition en tandem de 2 à 5 nucléotides (Morin et al., 2004; Schlötterer, 2004; Vignal et al., 2002). Le motif de répétition de ces nucléotides est généralement plus petit que 100 paires de bases, ce qui fait en sorte que celui-ci est facilement amplifiable par PCR standard (Morin et al., 2004; Schlötterer, 2004; Vignal et al., 2002). Plusieurs caractéristiques des microsatellites ont fait de ceux-ci un choix de marqueurs génétiques par excellence pour effectuer la cartographie des chromosomes, les tests de paternité ou encore la génétique des populations (Schlötterer, 2004; Vignal et al., 2002). Effectivement, les microsatellites sont hautement polymorphes, abondants et répartis assez uniformément dans le génome (Schlötterer, 2004; Vignal et al., 2002). Cependant, malgré toutes ces caractéristiques positives, les

microsatellites possèdent des allèles nuls ainsi que des modèles de mutations très complexes et variables engendrant des ambiguïtés dans l'analyse génétique des populations (Morin et al., 2004; Schlötterer, 2004). Qui plus est, malgré une présence importante des loci microsatellites dans le génome chez la plupart des eucaryotes, ceux-ci peuvent être dispersés les rendant difficiles à trouver chez certaines espèces (Morin et al., 2004; Schlötterer, 2004). De ce fait, différentes études, notamment celle de Yannic et al. (2016), ont démontré que l'utilisation de marqueurs moléculaires, tels que les microsatellites, n'a pas permis de faire ressortir des différences génétiques significatives suffisamment grandes entre les écotypes de caribous du Québec pour faire une assignation de manière assez certaine.

La solution afin d'effectuer une analyse de la génétique des populations de caribous avec un plus grand pouvoir de discrimination se trouve peut-être dans une approche faisant appel à un autre type de marqueurs moléculaires, soit les SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*). Effectivement, les SNPs possèdent des mutations abondantes et répandues dans le génome, et ce autant dans les régions codantes que non codantes (Morin et al., 2004; Schlötterer, 2004). Contrairement aux microsatellites, ces dites mutations évoluent d'une manière bien décrite par des schémas de mutations simples (Morin et al., 2004; Schlötterer, 2004; Vignal et al., 2002). Sommairement, les SNPs sont une variation d'une seule paire de nucléotides (A, T, G ou C) dans le génome entre les individus d'une même espèce (Morin et al., 2004). Les avantages d'utiliser plusieurs SNPs pour l'étude des populations, plutôt que les microsatellites, sont qu'on obtient un échantillon plus représentatif du génome en entier et on diminue la variance d'échantillonnage inter loci (Morin et al., 2004). Somme toute, des différences génétiques existent entre les populations de caribous et une approche génomique par SNPs pourrait être plus appropriée afin de mettre en lumière des différences génétiques correspondant aux écotypes actuels qui se basent sur l'écologie et le comportement du caribou.

### 2.3 Puce à SNPs

Bien que chez les espèces d'élevage les puces à SNPs soient une technologie bien établie, notamment au niveau de l'élevage porcin et bovin (Ramos et al., 2009; Seidel, 2010), il s'agit d'une approche génomique encore peu utilisée en science faunique. De par ses particularités, les SNPs sont devenus les marqueurs génétiques de prédilection pour les technologies associées aux études de la génomique des populations (Rajora, 2019). Dans le cadre de cette étude, la technologie mise de l'avant est l'utilisation d'une puce à SNPs pour la gestion et la protection du caribou. Il s'agit d'une méthode de génotypage permettant de déterminer la signature génétique d'un individu rendant ainsi possible son association à une population en particulier (Rajora, 2019). Aujourd'hui, les deux technologies commerciales les plus utilisées pour la création d'une puce à SNPs personnalisée pour le génotypage à haut débit sont disponibles chez *Illumina* (Infinium iSelect BeadChip) et *Affymetrix* (Thermo-Fisher, Axiom). Les deux plateformes ont une performance et une précision pour le génotypage similaire. Toutefois, la technologie d'Illumina a été choisie pour son format d'hybridation plus convivial permettant de génotyper en format de 24 individus (une lame contient 24 *arrays*) comparativement à Affymetrix où il faut génotyper les individus en lot de 384 (une lame contient 384 *arrays*).

De manière plus précise, la technologie d'Illumina iSelect BeadChip permet d'associer 700 000 cibles de SNPs et repose sur le principe de l'hybridation de l'ADN fragmenté à un réseau de billes, chacune de ces billes contenant des oligomères correspondant à une séquence complémentaire d'une vingtaine de nucléotides se situant avant ou après le SNP d'intérêt et qui se termine une base avant celui-ci (Rajora, 2019). La spécificité de l'oligomère est conférée par une extension à base unique qui comprend un nucléotide marqué d'un fluorophore (Sobrino et al., 2005; Rajora, 2019). La compétition naturelle existant entre les 4 bases (A, T, G et C) minimise les sources de biais, permettant ainsi à la polymérase de prolonger la sonde avec la bonne base correspondant à l'ADN cible (Sobrino et al., 2005; Rajora, 2019). Finalement, un laser va exciter les nucléotides marqués, engendrant ainsi un signal détecté par le scanner Illumina (Rajora, 2019). Selon la couleur et l'intensité émise, il est possible de déterminer quel nucléotide se situe au site du SNP (Rajora, 2019).

## 2.4 Le génome de référence et la découverte des SNPs

Sur le site du National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, consulté le 1 septembre 2021), il existe actuellement quatre versions de génome pour le caribou, soit celui de Li et al. (2017), celui de Taylor et al. (2019), celui de Weldenegodguad et al. (2020) et finalement celui de Prunier et al. (2021) qui a été développé dans le cadre de ce projet. Le génome de référence utilisé pour le développement de la puce à SNPs est celui de Prunier et al. (2021). Ce génome est d'une grandeur de 2,59 Gbp, détient un N50 de 13 994 *scaffolds* et possède 90% de gènes BUSCO (Prunier et al., 2021). La puce à SNPs du caribou a été développée par Prunier & Carrier (2022, en révision) et comprend un total de 62 597 SNPs répartis le plus également possible sur le génome du caribou, dont 7 948 SNPs associés à l'assignation à une population, 1 630 SNPs associés au comportement du caribou et 53 021 SNPs pangénomique.

## 3 L'importance des sciences judiciaires fauniques

Différentes approches en sciences judiciaires fauniques permettent d'attribuer la provenance d'un échantillon animal ou végétal. De ces approches on retrouve notamment l'analyse de l'ADN, l'analyse morphologique ou encore l'analyse chimique (Moore et al., 2021). Chacune d'entre elles doit être soigneusement validée afin d'assurer la certitude du résultat. Dans le cas présent, la puce à SNPs du caribou est une approche relative à l'ADN qui est considérée comme très reproductible (Alacs et al., 2010). Afin d'encadrer la validation, plusieurs organismes, autant chez l'humain qu'en sciences fauniques, présentent des normes et lignes directrices. Notons entre autres le *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods* et le *Society for Wildlife Forensic Science* (Moore et al., 2021; SWGDAM, 2016). La science judiciaire faunique se divise en deux volets autant importants l'un que l'autre : La validation et l'étude des populations.

### 3.1 Volet 1 : Validation

La validation est essentielle afin de déterminer les conditions et les limites d'un nouvel outil génomique (SWGDAM, 2016). Celle-ci est évaluée selon différents paramètres de

validation à partir d'échantillons de référence médico-légaux (SWGDM, 2016). Les paramètres de la sensibilité, de la répétabilité, de la robustesse, de la spécificité et de mélanges d'individus permettent l'évaluation de la performance d'une plateforme de génotypage. Chacun de ces paramètres détient une fonction bien précise.

Premièrement, la sensibilité évalue la capacité de la plateforme de génotypage d'obtenir un résultat fiable à partir d'un intervalle de quantité d'ADN (SWGDM, 2016). Ce paramètre est souvent utilisé afin de valider des groupes de SNPs. C'est notamment le cas dans l'étude de Cronn et al. (2021) qui teste un intervalle de concentration allant de 0,24 à 6 ng/ul afin de valider un groupe de SNPs ciblant les érables à grande feuille (*Acer macrophyllum Pursh*), ou encore dans l'étude d'Okitsu & al. (2013) qui évalue la réponse de la puce à SNPs de l'humain à un intervalle de quantités d'ADN allant de 0,8 ng à 200 ng.

Deuxièmement, la répétabilité reflète la précision et l'exactitude de la puce à SNPs en évaluant les pourcentages d'erreur de différents échantillons génotypés à partir du même individu (SWGDM, 2016). Ce paramètre vient de pair avec la sensibilité, car en effectuant des duplicatas et des triplicatas d'échantillons il est possible d'analyser le pourcentage d'erreur de génotypage pour un intervalle de quantités d'ADN. C'est de cette façon qu'Okitsu et al. (2013) ont évalué la précision de la puce à SNPs de l'humain.

Troisièmement, la robustesse en terme de qualité de l'ADN évalue la capacité de la plateforme à générer des données sans erreur à partir de différentes qualités d'ADN (Bose et al., 2018). La qualité de l'ADN est en fait le degré de fragmentation de celui-ci. Plus un échantillon d'ADN a de courts fragments, plus celui-ci est dégradé et donc de mauvaise qualité. Inversement, plus un échantillon d'ADN a de longs fragments, plus celui-ci est intact et donc de bonne qualité. Ce paramètre est important dans un contexte de médecine légale faunique car la prise d'échantillons non-invasifs est priorisée afin de réduire le stress causé aux animaux sauvages (Thaden et al., 2017; Zemanova, 2020). Les échantillons non-invasifs sont entre autres des fèces ou encore des poils récupérés à l'aide, par exemple, de fils de fer barbelés installés sur une structure où l'animal pourra se frotter (Zemanova,



2020). Cependant, comme ce type d'échantillon est retrouvé dans la nature, celui-ci n'est pas conservé dans des conditions optimales pour empêcher la dégradation de l'ADN, ce qui se traduit par une fragmentation de celui-ci (Thaden et al., 2017). De ce fait, il est important de vérifier l'impact du niveau de qualité de l'ADN. L'étude de Bourgeois et al. (2019) s'est d'ailleurs articulée autour de l'impact de la qualité de l'ADN prélevé sur des fèces d'éléphants (*Loxodonta cyclotis*) sur une plateforme de génotypage de 107 SNPs. À la suite de leur étude, Bourgeois et al. (2019) ont déterminé un temps maximal d'entreposage des fèces selon le temps post-défécation afin d'assurer un succès de génotypage minimal de 75%.

Quatrièmement, la robustesse en termes de types de tissus biologiques évalue la capacité de la puce à génotyper l'ADN provenant de différents tissus biologiques (Dagnall et al., 2018). Dans le même ordre d'idées que pour la qualité de l'ADN, la science faunique utilise une grande variété de tissus biologiques et chacun présente ses propres défis. Par exemple, l'ADN prélevé à partir du mucus fécal peut présenter de l'ADN exogène, ou encore des inhibiteurs PCR (Bourgeois et al., 2019). Un autre exemple est le sang sur coton-tige où l'ADN peut rester sur celui-ci lors de l'extraction (Adamowicz et al., 2014). Ce paramètre est étudié dans l'étude de Dagnall et al. (2018) afin d'évaluer la réponse de la puce à SNPs de l'humain à différents tissus biologiques, tels le sang et les prélèvements buccaux. On retrouve également ce genre de paramètres de validation dans Howard et al. (2008) qui évaluent la réponse d'un système multilocus de dix STR présents dans le génome de *Cannabis sativa* à différents tissus provenant de la plante du cannabis (racine, feuille et tige).

Cinquièmement, la spécificité évalue la capacité de la puce à générer des informations génétiques sur des espèces ciblées (SWGDM, 2016). Bien qu'étant très simple, ce paramètre est essentiel en médecine légale faunique afin de confirmer qu'un outil génomique est en mesure d'identifier spécifiquement l'espèce ciblée (Linacre & Tobe, 2011). C'est d'ailleurs le cas dans l'étude d'Ewart et al. (2021) qui soumet des échantillons d'ADN provenant de différentes espèces de pangolin (*Manis spp.*) afin de valider la spécificité de leur plateforme contenant différents marqueurs génétiques. Un autre exemple

de ce paramètre est présenté dans l'étude de Jäger et al. (2017) qui évalue la spécificité d'un groupe de SNPs chez l'humain en lui soumettant des échantillons d'ADN de différentes espèces animales.

Finalement, le mélange d'individus est un autre paramètre très important qui évalue l'interprétation de la plateforme de génotypage lorsqu'elle est soumise à un contexte de contamination d'un échantillon ou encore la présence de multiples contributeurs à l'échantillon de départ (SWGDM, 2016). En effet, dans un contexte médico-légal, les mélanges d'individus peuvent survenir dans divers contextes. Par exemple, au niveau de la médecine légale faunique, de la viande hachée saisie ou encore le prélèvement de sang sur un couteau de chasse, pourrait contenir l'ADN de plus d'un individu. Ce qui rend l'interprétation des mélanges d'individus difficile est lorsque les profils d'ADN des individus concernés ne sont pas connus. De ce fait, il est impossible de comparer le mélange à une référence. Il est donc primordial de valider ce paramètre afin d'être en mesure d'évaluer comment l'outil génomique détecte et interprète les mélanges. Ainsi, plusieurs études effectuent des mélanges à différents ratios. Par exemple, Jäger et al. (2017) ont évalué 3 mélanges d'ADN humain pour plusieurs ratios allant de 99,9% : 0,01% à 50% :50%. Leur étude a permis de démontrer la capacité de leur système à détecter les allèles contributeurs mineurs partagés et non partagés à moins de 5% du donneur principal. Un autre exemple est au niveau de l'étude de Bose et al. (2018), où un mélange de 2 individus a été fait à raison de quatre différents ratios afin d'évaluer une plateforme de 451 SNPs chez l'humain. De leur côté, Bose et al. (2018) ont pu démontrer qu'environ 85% des allèles contributeurs mineurs uniques ont été observés dans un mélange à 5% à une quantité d'ADN totale de 10 ng. L'utilisation de marqueurs haploïdes et multi-alléliques a amélioré la détection des mélanges de deux personnes en révélant deux ou plus de deux allèles dans un mélange (Bose et al., 2018).

### **3.2 Volet 2 : Étude des populations**

La capacité d'un outil génomique d'identifier la population source d'un échantillon est essentielle dans un contexte de médecine légale faunique. Ainsi, ce volet évalue la capacité d'assignation de la plateforme, c'est-à-dire l'utilisation des informations génétiques

générées par la plateforme pour déterminer l'appartenance d'un individu ou d'un groupe d'individus à une population (Manel et al., 2005). Dans le cas à l'étude, ce volet est évalué à partir d'un script bio-informatique qui utilise les SNPs d'assignation présents sur la puce. En fait, ce script permet d'effectuer une analyse comparative entre les signatures génétiques d'un échantillon d'origine inconnue et des signatures génétiques de populations de référence, permettant ainsi d'estimer un intervalle de confiance statistique quant à l'appartenance de l'échantillon à chacune des populations de référence (Chen et al., 2018).

En science biomédicale de la faune, l'approche statistique la plus acceptée est une approche Bayésienne qui utilise le rapport de vraisemblance (RV) (Gittelson et al., 2018). Au Québec, le MFFP utilise cette approche (Bourret, V., Direction générale de la protection de la faune, MFFP, communication personnelle, 9 septembre 2021). En fait, le RV fournit une comparaison quantitative de la probabilité d'observer les preuves génétiques dans deux scénarios concurrents (Manel et al., 2005; Ogden & Linacre, 2015). La valeur de RV obtenue est ensuite positionnée dans une échelle de gradation qui permet de verbaliser la valeur obtenue en fonction de la force de la preuve ou encore de donner une indication de la valeur probante du résultat (Marquis et al., 2016; Ogden & Linacre, 2015). Le schéma (Figure 3.1) suivant présente les intervalles de RV versus la conclusion d'assignation interprétée.

Valeur de RV	1 et 10	10 et 100	100 et 1000	1000 et 10,000	10,000 et plus
	↓	↓	↓	↓	↓
Interprétation de l'assignation	Ne permet pas de conclure	Il s'agit possiblement de ...	Il s'agit probablement de ...	Il s'agit fort probablement de ...	Il s'agit presque assurément de ...

Figure 1.2 Échelle de gradation afin de verbaliser une valeur du rapport de vraisemblance dans le but d'effectuer l'assignation d'un individu à une population de son espèce (Marquis et al., 2016).

## **4 Détermination des paramètres pour la validation de la puce à SNPs du caribou**

### **4.1 Isolation de l'ADN provenant de différents tissus**

L'étude génomique des animaux sauvages présente le défi d'extraire l'ADN des tissus de façon non-invasive, donc de différentes sources telles que les fèces, le sang sur coton-tige et les follicules de poils, et ce en quantité suffisante. Ainsi, les problématiques du projet étaient surtout en lien avec le développement de protocoles d'extraction d'ADN efficaces pour différents types de tissus afin d'obtenir un bon rendement en ADN.

### **4.2 Hypothèse de travail**

La puce à SNPs de *Rangifer tarandus* offre une grande puissance pour déterminer l'origine d'un échantillon dans un contexte d'expertise bio-légale, ainsi que dans un contexte de gestion et de conservation de la faune.

### **4.3 Objectifs de travail**

L'objectif général du volet validation est de documenter les spécifications de la puce à SNPs du caribou en abordant différents paramètres de validation, soient la sensibilité, la répétabilité, la robustesse en termes de type de tissus et de qualité d'ADN, l'étude de mélanges d'individus et finalement la spécificité. Chacun des paramètres de validation a son propre objectif.

### **4.4 Perspectives**

À terme, l'outil de génotypage vise à aider les experts du MFFP en tant qu'outil médico-légal, mais également en tant qu'outil de suivi des populations à des fins de gestion et de conservation des populations. En effet, cette puce permettra d'effectuer l'assignation des individus à une population et le suivi de la diversité génétique des troupeaux de caribous. Somme toute, la puce à SNPs de *Rangifer tarandus* est un outil puissant qui révolutionnera possiblement les études génétiques sur le caribou en permettant de décrire les populations en fonction de leur similitude ou de leur diversité génétique. Un suivi temporel permettra de déterminer si ces métriques fluctuent dans le temps en fonction des effectifs connus.

## **Chapitre 2 : Validation of a 60K SNP chip for caribou (*Rangifer tarandus*) for use in wildlife forensics, conservation, and management**

TROTTIER-LAVOIE Mallorie<sup>1,2</sup>, PRUNIER Julien<sup>3</sup>, POISSON William<sup>1,2</sup>, CARRIER Alexandra<sup>1,2</sup>, GILBERT Isabelle<sup>1,2</sup>, MASTROMONACO Gabriela<sup>6</sup>, ALBERT Vicky<sup>4</sup>, BOURRET Vincent<sup>4</sup>, TAILLON Joëlle<sup>4</sup>, CÔTÉ Steeve D.<sup>5</sup>, ROBERT Claude<sup>1,2\*</sup>

### **Affiliations:**

- 1- Département des sciences animales, Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation, Université Laval, Québec, QC, Canada
- 2- Centre de recherche en Reproduction, Développement et Santé Intergénérationnelle (CRDSI), Québec, QC, Canada
- 3- Plateforme de Bio-Informatique, Département de médecine moléculaire, Faculté de médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada
- 4- Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs du Québec (MFFP)
- 5- Caribou Ungava, Département de biologie and Centre d'études nordiques, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Québec, QC, Canada
- 6- Toronto Zoo, Toronto, ON, Canada

\*Corresponding author: [clauderobert@fsaa.ulaval.ca](mailto:clauderobert@fsaa.ulaval.ca)

### **Keywords:**

SNP chip, genotyping, *Rangifer tarandus*, DNA extraction, DNA quality, population assignment, forensic

## Résumé

Les plateformes de génotypage à grande échelle sont actuellement développées pour plusieurs espèces sauvages. En plus d'être utile afin de décrire et surveiller les populations, l'utilisation de milliers de locus polymorphes sur l'ensemble d'un génome peut également agir comme outil médico-légal dans le but d'identifier une population d'origine et d'appliquer des lois anti-braconnage. Notre objectif était d'évaluer les capacités génomiques d'une nouvelle puce à SNPs pour le caribou (*Rangifer tarandus*) (Illumina iSelect caribou 60K) en termes de sensibilité, de répétabilité, de robustesse, de capacité à distinguer des échantillons mélangés et de spécificité. L'impact des types de tissus sur la quantité et la qualité de l'ADN extrait a également été évalué. Nous montrons que la qualité et la quantité d'ADN varient selon le type d'échantillon, mais que la puce à SNPs est robuste, très sensible, fiable et précise à plus de 10 fois sous de la quantité d'ADN recommandée. La qualité de l'ADN avait peu d'impact sur les performances de la puce tout comme le type de tissus, même pour les fèces. L'hybridation inter-espèces ainsi que les échantillons mélangés ont montré une forte baisse du taux de réussite (*call rate*) et du niveau d'hétérozygotie. À partir d'un sous-ensemble de SNP ciblés présents sur la puce, la ré-assignation de 981 individus à un groupe fonctionnel (ici référant à un écotype de caribou) fut précise (99,49%) et l'erreur de ré-assignation a été contrôlée à l'aide du logarithme des coefficients de probabilité. La puce à SNPs s'est donc avérée adaptée à l'analyse des génomes de caribou et de renne et ce même avec un échantillonnage sous-optimal et donc utile pour la gestion des populations et la médecine légale faunique.

## **Abstract**

Large scale genotyping platforms are currently being developed for several wild species. By querying thousands of polymorphic loci, genomics can be useful for describing and monitoring populations, and as a forensic tool for identifying the population of origin and enforcing anti-poaching laws. Our aim was to evaluate the genomic capabilities of a new SNP chip for caribou (*Rangifer tarandus*) (Illumina iSelect caribou 60K) in terms of sensitivity, repeatability, robustness, ability to distinguish mixed samples, and specificity. The impact of tissue source on extracted DNA quantity and quality was also assessed. We show that DNA quality and quantity vary with sample type, but the SNP chip is robust, highly sensitive, reliable, and accurate at more than 10 fold below the recommended DNA input. DNA quality had little impact on chip performance, as did the source, even for fecal pellets. Inter-species hybridization as well as mixed samples showed a large drop in call rate and level of heterozygosity. Based on a population-targeted subset of SNPs included in the chip design, reassignment of 981 samples to a functional group (here to a caribou ecotype) was very accurate (99.49%) and the reassignment error was controlled using the logarithm of odds score. The SNP chip was thus found suitable for analysis of caribou/reindeer genomes, even with suboptimal sampling, and hence useful for population management and forensics.

## 1 Introduction

Individual genetic signatures are routinely used to estimate population connectivity, genetic diversity, effective population sizes and kinship, and to support forensic identification of animal provenance. DNA polymorphisms, mitochondrial DNA markers or microsatellite markers in the nuclear genome, can be used to determine the origin of single samples (Yannic et al., 2014). More recently, SNP panels have become tools of choice for this purpose, because technological platforms now allow querying of hundreds of thousands of loci for more comprehensive coverage of the genome (Morin et al., 2004; Schlötterer, 2004; Thaden et al., 2017; Vignal et al., 2002). Such a genotyping chip has recently been developed for *Rangifer tarandus* (Carrier et al., under review).

The term ‘caribou’ refers to the species *Rangifer tarandus* in North America, while ‘reindeer’ is used for the same species in Europe and Asia (Festa-Bianchet et al., 2011; Yannic et al., 2018). Woodland caribou is the only subspecies found in the province of Quebec and is divided in three ecotypes: migratory, sedentary (boreal) and mountain (MFFP, 2021b). Worldwide, many caribou and reindeer populations are declining, and in some cases rapidly (Festa-Bianchet et al., 2011; Vors & Boyce, 2009). Protection of this species is urgent, and molecular genetic tools can support and improve population monitoring and conservation. Developed in collaboration with the wildlife department of the province of Quebec, the genotyping chip includes, among others, a set of 5,189 SNPs selected specifically to delineate the three ecotypes that are monitored and managed in Québec according to their specific ecological and behavioral traits (MFFP, 2021).

Field sampling in remote locations or forensic situations can be challenging because storage and environmental conditions affect the quantity and quality of the recoverable DNA. This is especially true given that wildlife research is shifting from invasive to non-invasive sampling and monitoring methods (Thaden et al., 2017; Zemanova, 2020). Earlier genotyping platforms required DNA of consistent quality (Morin & McCarthy, 2007; Ogden, 2011). However, current SNP genotyping chips rely on hybridization of small, targeted DNA segments, which are recoverable from low quality DNA samples (Thaden



et al., 2017). We therefore expected the *Rangifer* SNP genotyping chip to be robust and to perform well over a wide range of sample quality.

Here, we present the testing and validation of the *Rangifer* platform under field conditions. We examined the sensitivity, repeatability, robustness in terms of DNA quality and tissue types, sample mixing, and specificity. The choice of validation parameters was based on the guidelines of the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM), the reference in human forensic DNA technology (SWGDM, 2016). We also tested the reliability of the procedure of assignment to the original ecotype subset.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Sample collection

Caribou were sampled from live captures and from wildlife officers enforcement activities (anti-poaching investigations). Live wildlife sampling was performed in compliance with the Canadian Council on Animal Care guidelines and received approval from the Université Laval animal protection committee. Caribou samples (ear punches, hair follicles, blood swabs, tendons, and feces) were provided by the Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs du Québec hereinafter called the MFFP, who also provided muscle samples from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), moose (*Alces americanus*), and sheep (*Ovis aries*). Cell samples from American elk (*Cervus canadensis*), yak (*Bos grunniens*), European bison (*Bison bonasus*), wood bison (*Bison bison*), muskox (*Ovibos moschatus*), bighorn sheep (*Ovis canadensis*), and barbary sheep (*Ammotragus lervia*) were provided in pellet form ( $7 \times 10^5$  cells) by the Toronto Zoo (Ontario, Canada). Bovine and swine muscle samples were collected in local slaughterhouses (Québec, Canada). Human samples such as prostate and ovary DNA were purchased from OriGene Technologies, Inc. (Rockville, Maryland, USA). Samples of lichens *Cladonia rangiferina* and *Evernia furfuracea* were collected in the Lac-Saint-Jean area (Québec, Canada). All animal and plant samples were received and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Cell pellets and human genomic DNA were received on dry ice and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2 Genomic DNA isolation

Genomic DNA was isolated from caribou muscle and tendon using MagAttract HMV DNA kits (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) with 40  $\mu\text{L}$  of proteinase K before the overnight incubation step. For ear punches, hair ( $\sim 300$  follicles/sample), blood swabs, and cell pellets, DNeasy Blood & Tissue kits (Qiagen) were used in accordance with, respectively, the *purification of total DNA from animal tissues*, *purification of DNA from nails, hair, or feathers*, *isolation of total DNA from surface and buccal swabs*, and *purification of total DNA from animal blood or cells* protocols. Lichen samples were homogenized in a bead disruptor homogenizer (VWR International, Mississauga, ON, Canada) with 800  $\mu\text{L}$  of API buffer (Qiagen). Qiagen DNeasy plant Mini kits were then used in accordance with

the manufacturer's instructions. Genomic DNA was extracted from fecal samples using DNeasy Blood & Tissue kits (Qiagen) with modifications proposed by Ball et al. (2007) in accordance with an MFFP in-house protocol. Briefly, two frozen fecal pellets were thawed in phosphate buffered saline (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) for 4 to 6 minutes. The mucus coat was removed carefully from the thawed fecal matter using a cotton swab, which was placed (tip only) in a 1.5 mL microcentrifuge tube with 360  $\mu$ L of ATL buffer and 40  $\mu$ L of proteinase K. After thorough vortex mixing, the tube was placed in a rotator oven (Robbins Scientific model 400) for 2 h at 56°C and 12 rpm. RNase (4  $\mu$ L, 100 mg/ml) was then mixed in and held for 2 min at room temperature and 400  $\mu$ L of AL buffer (Qiagen) were mixed in, followed by 10 min in the rotator oven at 56°C and 12 rpm. Ethyl alcohol anhydrous (400  $\mu$ L) was then mixed in, the swab tip was removed from the tube with sterile forceps, placed on a DNeasy mini spin column and centrifuged for 1 min at 4,200 x g. The swab was then removed and discarded, the buffer/EtOH mixture was placed on the column and centrifuged for 1 min at 12,100 x g. The extracts were stored at -80°C.

### **2.3 Genomic DNA integrity, concentration measurement and genotyping**

Total gDNA integrity and concentration were evaluated using the 4200TapeStation and genomic DNA kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Samples with a DNA integrity number (DIN) over 6 were chosen, except for some blood swab samples for robustness evaluation, in which case a DIN range of 1 to 10 was accepted. This scale represents DNA sample quality in terms of degree of fragmentation, 10 indicating no fragmentation and hence the best possible quality.

All samples were genotyped using the caribou/reindeer 60K SNP BeadChip from Illumina (Carrier et al., under review) developed using sequences from nearly a thousand samples aligned with a caribou reference genome (Prunier et al., 2021). Sample hybridizations and genotype calling were performed at the *Centre d'expertise et de services de Génome Québec* (Montreal, Quebec, Canada).

## **2.4 Validation parameters**

### **2.4.1 Sensitivity**

Sensitivity was evaluated using three caribou: *RATA-F* (muscle), *CA-35* (tendon), and *0006801* (muscle). For *RATA-F*, gDNA was isolated from 6 samples (25 mg each). For *CA-35* and *0006801*, 12 samples were used. All were analyzed for integrity and concentration and then pooled, giving 39,750 ng of gDNA with an average DIN of 8.7 for *RATA-F*, 54,225 ng (DIN 8.8) for *CA-35*, and 100,000 ng (DIN 6.9) for *0006801*. The three pools were each concentrated to 350 ng/ $\mu$ L using a Speedvac, diluted with Tris-EDTA buffer to 200 ng/ $\mu$ L and then 2-fold serially down to 0.195 ng/ $\mu$ L. For genotyping, duplicates at 350 ng/ $\mu$ L to 6.25 ng/ $\mu$ L and triplicates at 3.125 ng/ $\mu$ L to 0.195 ng/ $\mu$ L were plated. All pools were genotyped on different plates and at different moments to prevent any batch effect. A total of 87 samples were genotyped (20  $\mu$ L each). Genotyping error percentage has been evaluated by comparing each DNA quantity to its reference of 2000 ng.

### **2.4.2 Repeatability**

Repeatability was evaluated using sensitivity duplicate and triplicate test samples, from 0.195 ng/ $\mu$ L to 200 ng/ $\mu$ L. Genotyping error percentage has been evaluated by comparing each individual respective triplicate and duplicate genotypes for each DNA quantity.

### **2.4.3 Robustness (DNA quality and tissue type)**

The effect of DNA quality on the robustness of the results was evaluated using 497 samples (ear punches or hair follicles) at concentrations ranging from 50 ng/ $\mu$ L to 100 ng/ $\mu$ L and DIN ranging from 1.0 to 9.7. Samples were distributed in 20  $\mu$ L aliquots on 8 different plates and genotyped at different moments.

The impact of tissue type on the robustness of the DNA analysis was evaluated using ear punches (n = 6), hair follicles (n = 6), muscle (n = 6), tendon (n = 3), feces (n = 5), and blood swabs (n = 4). These samples represented various DNA integrity numbers and

concentrations (Table 1). Samples were distributed in 20  $\mu$ L aliquots on a single plate and genotyped at the same moment.

#### **2.4.4 Effect of sample mixing/contamination**

Mixed samples contained DNA from two animals paired in ratios of 87.5/12.5, 75/25 and 50/50. The pairings were migratory + migratory, migratory + boreal (twice), and boreal + boreal (4 animals in total). Each animal was genotyped independently to serve as a reference genotype. All samples were adjusted to 20  $\mu$ L at 100 ng/ $\mu$ L, distributed on the same plate, and genotyped in the same run.

#### **2.4.5 Specificity**

The specificity of the analysis was evaluated by comparing 13 different species. Three samples from each species (two from yak, barbary sheep, and sheep) were genotyped on the caribou SNP chip. Samples (20  $\mu$ L at 100 ng/ $\mu$ L) were distributed on two different plates and genotyped at different moments. Three caribou samples with 2000 ng of DNA and three with 4 ng of DNA (3 other animals) were used as high and low positive controls, respectively.

#### **2.4.6 Population assignment**

Samples used to validate assignment to one of the three ecotypes (migratory, boreal, mountain) were collected over several years in Quebec. DNA was extracted from a total of 1,235 samples (ear punches, hair follicles or fecal pellets) and genotyped on the SNP chip.

### **2.5 Statistics**

Call rate and percent genotyping error were chosen as the basic quality control metrics. The call rate is the number of SNPs unambiguously genotyped (generating a positive signal above the threshold) out of the number of SNPs targeted by the chip. The percent genotyping error is the proportion of called genotypes that are not matched (allele dropout or false alleles) with the reference sample positive signal in compliance with Illumina DNA

quantity and quality criteria. JASP statistics implementation software (<https://jasp-stats.org/>) was used unless otherwise specified.

### **2.5.1 Sensitivity**

The coherence of DNA quantity with call rate or genotyping error was visualized by exponential regression using the R stats *lm()* function. Since the sensitivity data were not normally distributed according to the Shapiro-Wilk test and were repeated measurements, and each group contained more than two samples, repeated measures ANOVA with a Friedman test followed by a Bonferroni post hoc test were performed.

### **2.5.2 Repeatability**

The genotyping error was analyzed at 4 ng to 4,000 ng of DNA. Although these data were normally distributed according to the Shapiro-Wilk test, repeated measurements on more than two samples per group led to a non-parametric test, which is a repeated measures ANOVA with a Friedman test followed by a Bonferroni post hoc test.

### **2.5.3 Robustness**

The coherence of the call rate with DNA quality was examined by performing linear regression using the R stats *lm()* function. Coherence with tissue type (which was not normally distributed, based on the Shapiro-Wilk test) was examined using ANOVA with a Kruskal-Wallis test followed by a Bonferroni post hoc test.

### **2.5.4 Mixed/contaminated samples**

To examine the impact of mixing two genomes within one sample, we investigated the ratio of the proportion of homozygosity to the call rate for the pure sample (100%) and the same sample mixed at 87.5%, 75% and 50% with DNA from another individual. The 95% confidence intervals around the centroid were determined for each mixture using the *stat\_ellipse* function from the R *ggplot2* package ([https://www.rdocumentation.org/packages/ggplot2/versions/1.0.1/topics/stat\\_ellipse](https://www.rdocumentation.org/packages/ggplot2/versions/1.0.1/topics/stat_ellipse)).

The coherence of genotyping error with mixing proportion was tested by linear regression using the R stat *lm()* function.

### 2.5.5 Specificity

According to a Shapiro-Wilk test, species data were not normally distributed, and since they were not repeated measurements and were based on more than two samples per group, ANOVA with a Kruskal-Wallis test followed by a Bonferroni post hoc test was performed to assess the impact of the species on call rate and overall heterozygosity.

### 2.5.6 Assignment statistics

Since the assignment of a field sample to a population may be used to enforce anti-poaching laws, it must be highly reliable, and the error rate must be controlled. Genetic signatures of 981 samples from the province of Quebec were assigned using the R *assignPOP* package (Chen et al., 2018). The ecotype for each sample was ascertained from telemetry monitoring carried out by the MFFP. The genetic pool of each ecotype was delineated first using the 5,189 SNPs with 968 samples to yield a reference cluster to which subsequent samples were compared. Then all samples, including the 13 not used for the reference cluster, were assigned blindly to each ecotype using no knowledge other than the genomic data. Of the three models available in *assignPOP* for assigning a new sample to an ecotype, the one that gave the lowest error rate was retained. The logarithm of odds (LOD) score for each assignment was calculated as follows:

$$\text{LOD} = -\log_{10}((1-P_i)/(1-P_{j-k}))$$

where  $P_i$  is the highest probability associated with the predicted ecotype and  $P_{j-k}$  is the sum of the probabilities associated with the other ecotypes. This LOD score was intended to show the confidence in the prediction and to control for the low confidence results possibly leading to erroneous assignment.

To test the granularity of assignment based on the genomic data obtained using this newly developed SNP chip, the procedure was reproduced using population information instead of ecotypes, to assign individual animals to a recognized population and thereby possibly identify caribou that may have migrated recently from one population to another.

### **3 Results**

Wildlife genomic studies may involve invasive sampling (muscle or tendon biopsy, ear punch, blood swab) or non-invasive sampling (hair follicles, fecal pellets). Sampling by non-invasive methods raises the technical challenge of analyzing DNA that may be scant or degraded (Thaden et al., 2017). It is also true for wildlife forensic investigations which often rely on analysis of trace samples (Jaquet-Chiffelle & Casey, 2021). This must be considered when validating any new method for field use.

#### **3.1 Sensitivity**

Our first objective was to evaluate the lower and upper limits of the quantity of DNA loaded onto the caribou/reindeer SNP chip. The manufacturer's standard protocol requires at least 2,000 ng of genomic DNA to perform both quality control and the hybridization. As expected, the call rate increased, and the genotyping error decreased as the quantity of DNA increased over the range of 4 ng to 7,000 ng (Figure 1), although the changes were not significant above 62 ng, based on the Bonferroni post hoc test. The effect was most notable up to 31 ng. Although we see no reason to doubt that the optimal input is around 2,000 ng, our results showed that the chip is very sensitive even with a DNA input 30 times lower than this amount.

#### **3.2 Repeatability**

Regardless of the sensitivity of the SNP chip, it is key to determine the DNA input below which genotyping will not be accurate or reliable. We determined this threshold using the same samples as for the sensitivity test. DNA from a single animal was diluted up to 100 times. Almost no change in variance was detected over the range of 125 ng to 4,000 ng (Figure 2), indicating good repeatability of the assay, even with 16 times less DNA than recommended. Below 62 ng, the variance did increase significantly. Based on our sensitivity and repeatability tests, we are confident that this SNP chip is reliable when used with 125 ng to 2000 ng of input DNA.



### **3.3 Robustness versus sample quality**

For ethical and practical reasons, non-invasive sampling is often preferred even though the DNA thus obtained might be degraded. The impact of DNA fragmentation on the genotyping results must therefore be evaluated. Call rates were relatively stable as the DIN ranged from 6 to 10 (Figure 3). Variance increased at DIN below 6, but the call rate remained high (> 88%). A few outliers were observed below the trend. The hypothesis put forward is that potential problems may have arisen during library preparation prior to the hybridization of the samples on the chip. Since these outliers represent only 0.8% of the samples, we conclude that DNA fragmentation does not appear to influence unduly the call rate obtained using this chip.

### **3.4 Robustness versus tissue type**

Since wildlife studies may involve collecting a large variety of tissue types, we tested the ability of the caribou/reindeer SNP genotyping chip to function properly with muscle, ear punch and tendon samples, hair follicles, and feces. The call rate averaged 94% with these materials. In contrast, blood swab samples yielded call rates ranging from 13% to 91%. Most tissue type thus had little or no impact on the results, whereas blood swab DNA appears problematic in certain cases.

### **3.5 Mixed samples**

In wildlife forensic investigations, the materials analyzed may come from more than one animal or source. The effect of genome mixture ratio on the SNP chip call rate and detection of homozygosity was therefore tested. SNP homozygosity is the proportion of SNPs found on both chromosomes, relative to the total number of SNPs genotyped (expressed as a percentage). Overall, mixed samples had lower and more variable call rates and homozygosity, this tendency was not detected at a ratio of 87.5:12.5, but increased as mixing approached 50:50 (Figure 5). The linear regression in Figure 6 shows that the genotyping error rate increased as the genotype mixing ratio approached 50:50, albeit variance increased at higher individual proportions. Because of cluster overlapping, the

SNP chip does not indicate the mixing ratio, but clearly allows recognition of a mixed sample.

### **3.6 Specificity**

Because the chip was designed to detect *Rangifer tarandus* SNPs and is intended for use in anti-poaching investigations, its species specificity is essential. We therefore compared the call rates and heterozygous SNP percentages obtained for other *Cervidae* and some non-cervids. The call rate range differed significantly from caribou for all species except white-tailed deer, moose, and the American elk (Figure 7A). However, even these other cervids could be distinguished from caribou based on percent heterozygosity, whether the amount of DNA was low or high (Figure 7B). The caribou SNP chip therefore may be considered highly specific for *R. tarandus*.

### **3.7 Ecotype/population assignment**

Among the three population assignment models contained in the *assignPOP* R package, the Bayesian model was the most accurate, based on the assignment error rate both for the unknown ( $n = 13$ ) and the reference samples ( $n = 968$ ). The overall correct assignment to the presumed ecotype based on telemetry data for each sample was 99.49%. All 13 unknown samples were assigned correctly. Consistent with these results, the geographic distribution of the ecotypes showed an almost perfect split (Fig. 8A). Of the 981 individuals, only 5 presented discordance between the genomic data and the telemetry data. Among these, three presented LOD scores below 15 and two presented LOD scores between 15 and 25. All 5 were of the forest ecotype according to telemetry data but were found to be migratory based on genomic analysis.

LOD scores ranged from 2.3 to 40 and averaged 36.62, and were therefore skewed strongly towards the upper limit (Fig. 8B). Many of the samples ( $n = 751$ ) presented the maximal score of 40 while the remaining 227 presented scores below 34.54. The highest scores were noted mainly among the expectedly less genetically diverse populations, namely the mountain and boreal ecotypes, while the migratory ecotype presented lower scores.

Exploring the assignment accuracy and LOD scores according to the validation parameters, the DIN variation was not related to the assignment LOD scores or accuracy (Fig. 9A). Similarly, the assignment accuracy and LOD scores were not associated with DNA quantity (Fig. 9B), although inaccurate assignments were found for a DNA concentration below 75ng. The occurrence of two different DNA genomes within the same sample may also impact the assignment accuracy and LOD score but mixed samples presented an overall SNPs heterozygosity often higher than 0.4 while very few expected pure samples presented such high heterozygosity (Fig. 9C). While mixed samples could present inaccurate assignments with high LOD scores ( $> 25$ ), this was not the case for pure samples in which all samples with high LOD scores were accurate (Fig. 9D).

Using the same assignment procedure with population information instead of ecotype yielded 93.58% agreement between genomic data and telemetry data (Fig. 10). In 62 cases of misassignment, the individual was assigned to a neighboring population, suggesting that it was a recent migrant, whereas one misassignment was to a more distant population and may be truly faulty in view of the very low LOD score of 1.37. As a result, the maps representing the sample population assignments based on genomic data and population information were highly similar. This appears to validate the SNP chip for use in population management.

#### 4 Discussion

When designing a SNP chip for wild species such as *Rangifer tarandus*, it is clear that the results may be affected by the history of the material analyzed, because field samples may be received after storage under suboptimal conditions or the specimen may be found already in a state of advanced decomposition, notably in forensic cases. Manufacturers of SNP chips specify the minimal quality and quantity criteria that must be met for the results to be valid. SNP chip platforms are generally regarded as reliable and robust. For the Illumina Bead chip, a minimal genomic DNA input of 2,000 ng is recommended without integrity parameters (Infinium Assay Guide) whereas the Thermo-Fisher/Axiom platform requires 200 ng of high quality (>10 kb fragment size) and pure ( $OD_{260}/OD_{280} = 1.8 - 2.0$ ) genomic DNA (Axiom Assay User Manual).

It is nevertheless essential to determine if reliable information can be generated by analyzing samples obtained under poor conditions, that is, the impact of DNA quantity and integrity on the quality of genotyping with the SNP Chip platform. Two parameters to consider are chip sensitivity and assay repeatability. We found that the caribou SNP chip can generate reliable data with much less DNA (16 times less) than the minimum recommended by the manufacturer. It has been observed previously that human genotypes can be confirmed with 10 times less DNA than the chip manufacturer recommendation (Okitsu et al. 2013).

The number of caribou SNPs targeted had little or no impact on sensitivity, since the chip targets 63,259 SNPs compared to 730,525 SNPs in the human case. In fact, the data were of acceptable quality even at 30 times less DNA than the recommended amount. Only at 250 times less DNA than recommended did the call rate drop by 1.5 times more than what was found for the human SNP chip (Okitsu et al. 2013).

Based on the serial dilutions of three different animals, the proportion of genotyping errors was very low when the DNA was diluted to 30 times less than the recommended concentration. This confirms that the impact of reducing input DNA affects mainly the call rate, although the calls remain reliable. Furthermore, repeating the genotyping of the same

individual using the same DNA quantity consistently yielded the same results. In forensic science, data loss is less problematic than erroneous data, the latter being more likely to lead to incorrect functional group (i.e., ecotype or population) assignment.

The DIN value, used to estimate the extent to which the DNA in a specimen is degraded, ranged from 1 to 10, the lowest value indicating an average fragment size of 250 bp whereas the highest value indicates an average fragment size over 50,000 bp (Agilent Technologies Inc., 2015). Based on this index, the performance of the caribou SNP chip appears to be largely unaffected by fragmentation, the call rate dropping by only 4% for highly degraded samples. It has been shown previously that DNA degraded to fragments of less than 75 bp nevertheless allowed reporting of 99-100% of the SNPs (Bose et al., 2018). As mentioned in other studies, SNP markers are more suitable than microsatellite markers for genotyping degraded samples since the targeted polymorphisms are single nucleotides, and shorter detection probes may be used (Bose & al. 2018; Fries & Durstewitz, 2001; Martínez-Arias et al., 2001; Morin et al., 2004). This makes the performance of SNP chip platforms more robust over a wider range of DNA sample condition concentrations and/or fragmentation. This validation parameter therefore provides thresholds for anticipating the impact of specimen quality (e.g., forensic) on genotyping results.

Using a variety of tissue types, we tested a range of DNA concentrations, because muscle biopsies or ear punches have a high cell density and thus provide more DNA per milligram of sample than, for example, fecal material, in which most of the DNA is of plant or microbial origin. In this context, the amount of animal DNA present in a sample may be expected to have the most impact on genotyping accuracy. We indeed found that tissues that provided similar amounts of DNA generated similar call rates, as reported previously (Dagnall et al., 2018). Results were most variable for blood swabs, which are collected on various surfaces by wildlife field officers. The amount of blood present is unknown and may differ among samples. In addition, the only blood cells that contain DNA in mammals are leukocytes, which numbers per mL vary naturally depending on various conditions, including the health of the individual (Palmer et al., 2006). Significant amounts of DNA

can also be retained on cotton swabs (Adamowicz et al., 2014). Genotyping failure is therefore more frequent with blood swab samples. Regardless of tissue type, the risk of failure can be minimized by determining, prior to genotyping, the amount of DNA present and hence the quantity of sample to analyze.

Forensic samples collected on hunting or investigation sites may contain DNA from more than one animal. This can of course confound genotyping results. We nevertheless observed that call rates were comparable whether samples were mixed or from a single animal, depending on the mixing proportions. When the sample is mixed, the genotype is biased towards the DNA present in the highest proportion. This could still be problematic because erroneous genotyping could lead to wrongful assignment. The caribou SNP chip can detect mixing of samples. Mixed and non-mixed samples can be distinguished by combining call rate with homozygosity clustering patterns. This seems counterintuitive because heterozygosity is usually proportional to the number of genotypes present (Bose et al., 2018; Jäger et al., 2017). However, genotype calling on Illumina Bead Chip platform is based on ratios of a reference allele to an alternative allele (Vignal et al., 2002). In a single individual sample, the expected proportions are 100% for homozygotes and 50% for heterozygotes. However, in a mixed sample, lopsided proportions appear, leading the software to decline to call and thus increase the proportion of “no calls” (Steemers & Gunderson, 2007). For example, a sample containing 75% heterozygote AB and 25% homozygote AA will generate the irregular proportions 62.5% A and 37.5% B, which the software cannot interpret with confidence and therefore does not make a call. On the other hand, when both animals bear the same allele, the proportion of homozygous genotypes called increases. By plotting both metrics, mixed samples can be identified, although some overlap exists between mixture ratio clusters. This provides a solution to the previously reported difficulty of identifying mixed samples when using bi-allelic SNPs (Westen et al. 2009). Indeed, the non-mixed sample ratio clustering is quite distinct from mixed sample ratio clustering.

Forensic samples of DNA are often collected without confirmation of the species of origin. The caribou SNP chip was therefore tested for the likelihood of generating misleading

calls. We found that for species other than caribou, the call rate was significantly lower, even when the sample was of low quantity. However, using the call rate alone, white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), moose (*Alces alces*) and the American elk (*Cervus canadensis*) could be mistaken for a very low quantity caribou sample. The genetic proximity between these four species is well known (Fontana & Rubini, 1990). Fortunately, a high degree of heterozygosity distinguishes caribou from all other species. The loci selected for the caribou SNP chip are mostly monomorphic in the three other cervid species, which are thus detected easily as excessive homozygosity or insufficient heterozygosity. This makes confusion unlikely even when the sample is of poor quality.

In the province of Quebec, the boreal ecotype caribou is designated as vulnerable under the Loi sur les espèces menacées ou vulnérables (LEMV) and cannot be hunted. We therefore sought to develop a low-error procedure for assigning a sample of unknown origin to an ecotype. Analyzing the 5,189 SNPs using a Bayesian model provided in the *assignPOP* R package proved to be very efficient for this purpose. The assignment accuracy was very high, and the robustness was linked to the LOD scores. To limit the range, the highest LOD score was set arbitrarily at 40, which gave a large group (scores can be much higher, in the hundreds) to which 100% of the animals were assigned correctly. Thresholds of lower certainty were set based on LOD scores indicating questionable sample quality. At scores below 25, five individuals were assigned incorrectly while 81 (94.2%) were assigned to the correct ecotype. Among the 12 individuals with LOD scores below 15, nine (75%) were assigned correctly. Genotypic data from other species did not generate LOD scores because the test could not assign the samples to a reference ecotype (data not shown). The following intervals are therefore proposed where a LOD score below 15 indicates limited robustness or inconclusive results: 15–25 strongly supports the assignment, 25–35 very strongly supports the assignment, and > 35 indicates near certainty of the assignment. By comparison, the use of a panel of 16 microsatellites generated median LOD scores ranging from 2.5 to 6.2. The use of 5 189 biallelic loci provided much more discriminatory power. Different parameters possibly impacting the ecotype assignment accuracy were tested, namely DNA quality, DNA quantity and occurrence of mixed samples in various individuals' proportions. While the DNA quality seemed to have little impact on

assignment accuracy, a conservative minimum DNA quantity of 75 ng would ensure an accurate result. Contrastingly, mixed samples were often yielding inaccurate results. However, using heterozygosity/homozygosity and call rate jointly alleviate the problem because samples with high heterozygosity ( $>0.4$ ) and a call rate lower than 0.95 could be discarded to ensure accurate assignment.

Because prosecution of poaching depends on the certainty of identifying the boreal ecotype, assigning a migratory caribou to the boreal ecotype could be prejudicial. In this study, no migratory caribou was wrongfully assigned to the boreal ecotype. Conversely, assignment of a sample collected within the ecological range of the boreal ecotype to the migratory ecotype could more likely be due to past incursions by migratory individuals into the boreal ecotype populations (Boulet et al., 2007).

Comparing genomic-based and telemetry-based assignments to populations of origin further showed the power of our method at a finer level of granularity. Almost all individuals were assigned correctly, and misassignments were mostly to neighbouring populations, hence likely representing recent migrants or hybridization with such migrants. The SNP chip could thus be used to help population conservation efforts.



## 5 Conclusion

The new 60K caribou/reindeer SNP chip was tested in accordance with the SWGDAM validation guidelines for DNA analysis methods (2016). Overall, this genomic tool proved to be highly robust and specific. Poor conditions of sampling could affect the reliability of the analysis, but their main impact appears to be a decrease in call rate (loss of genotypic information) with minimal introduction of genotypic errors. Even mixed samples provide results that are sufficiently distinctive to be identified and discarded before ecotype assignment. The use of thousands of SNPs provides unprecedented power for discriminating between closely related cervid specimens. New confidence intervals were defined such that probabilistic ecotype assignment can be defined clearly and distinctly as doubtless or questionable.

## 6 Figures

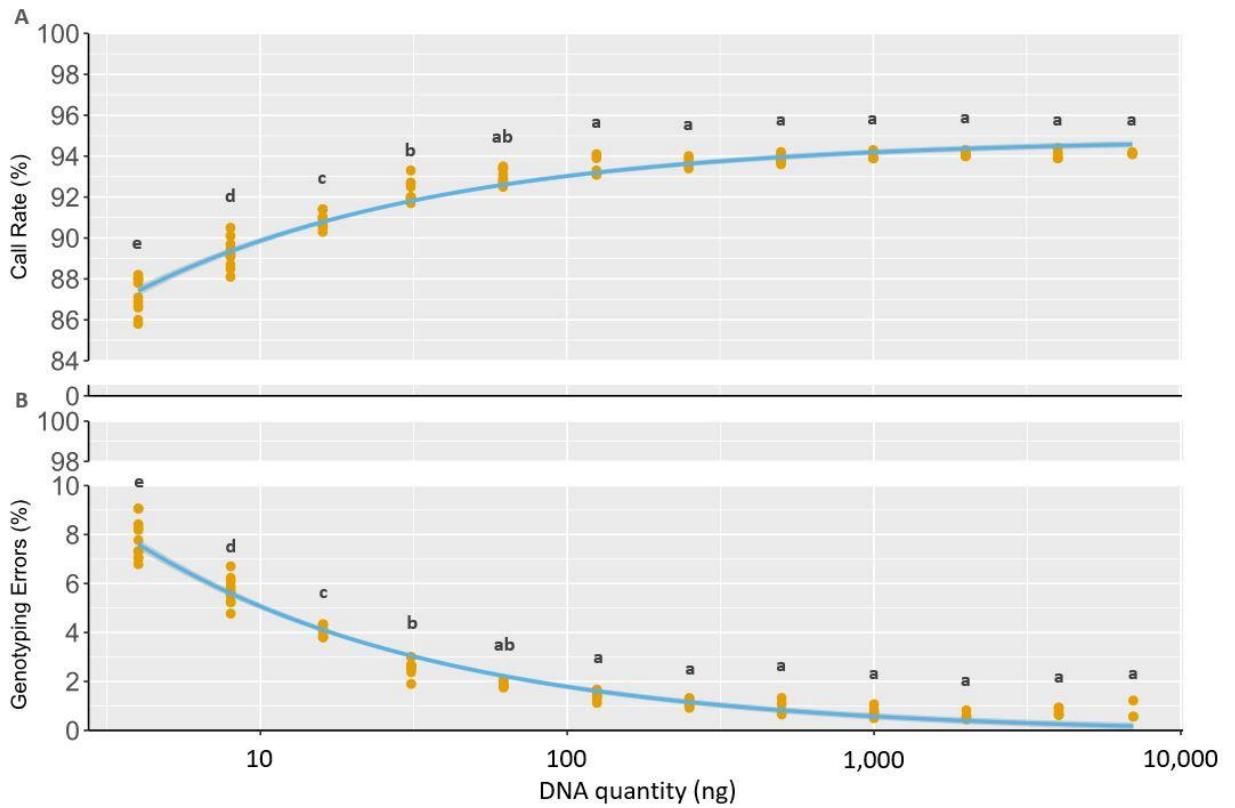


Figure 2.1 Caribou SNP chip sensitivity (n = 58) based on ANOVA repeated measures analysis with Bonferroni post hoc test and exponential regression of call rate (A,  $y = -13.61e^{-\log(x)} + 94.87$ ) and genotyping error (B,  $y = 14.1182e^{-\log(x)} - 0.1269$ ) versus DNA concentration in samples from three individuals.

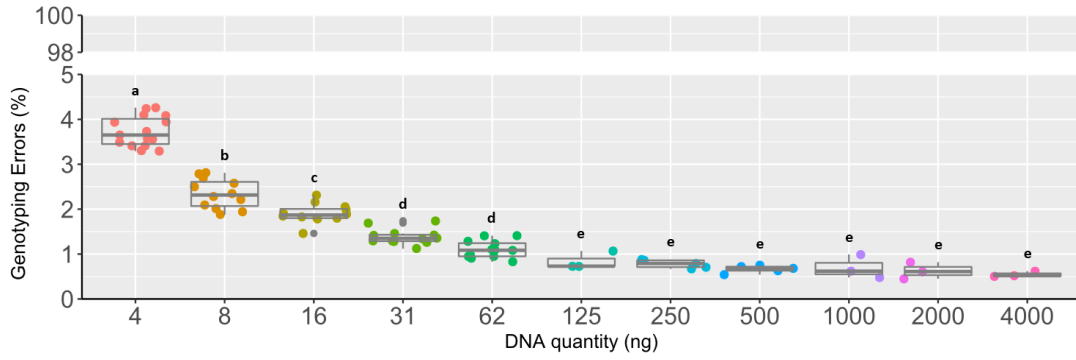


Figure 2.2 Caribou SNP chip repeatability (n = 58) based on ANOVA repeated measures analysis with Bonferroni post hoc test of genotyping error versus DNA concentration in samples from three individuals.

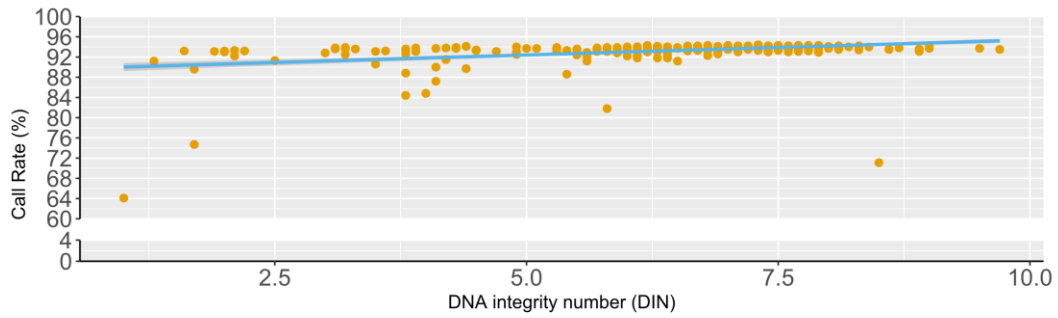


Figure 2.3 Caribou SNP chip robustness (n = 497) based on linear regression ( $y = 0.5951x + 89.4269$ ) of call rate versus sample DNA integrity number.

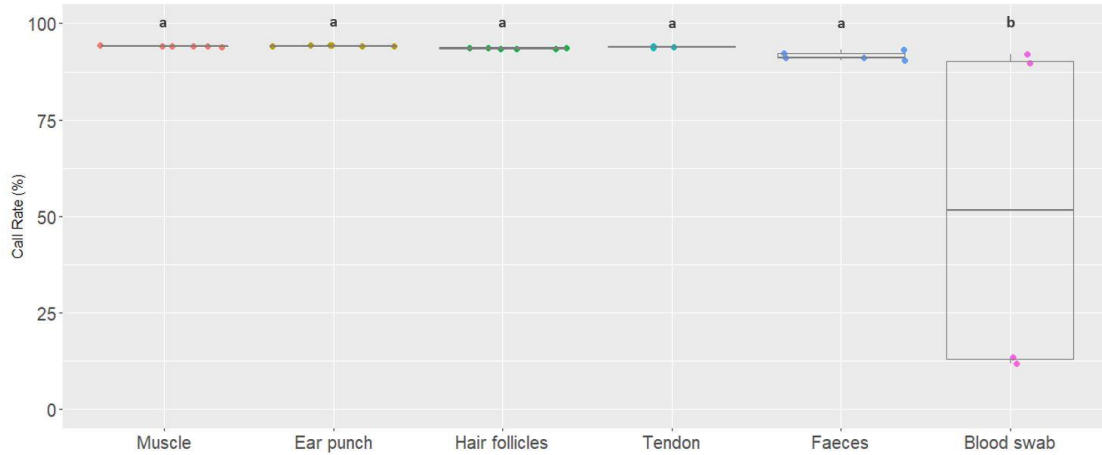


Figure 2.4 Caribou SNP chip tissue type robustness based on call rate with muscle (n = 6), ear punches (n = 6), hair follicles (n = 6), tendon (n = 3), faeces (n = 5), and blood swabs (n = 4).

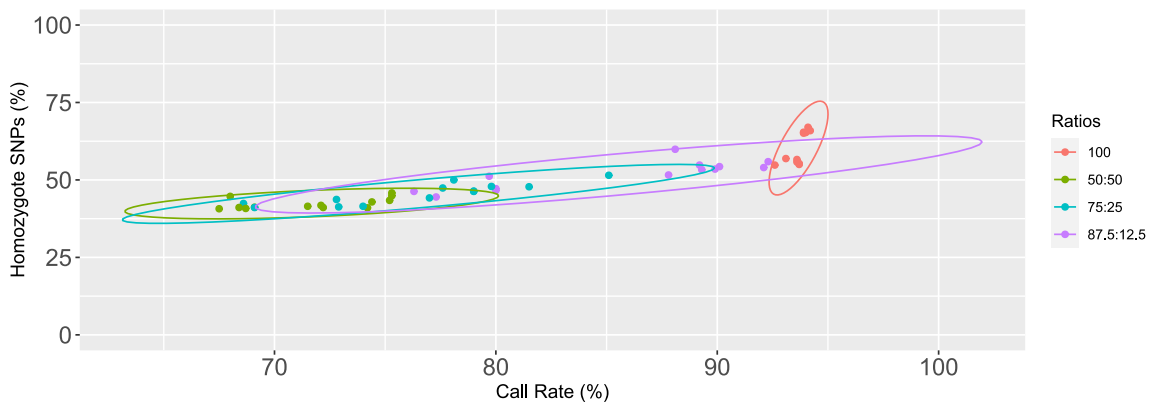


Figure 2.5 Robustness of SNP genotyping of mixed caribou samples based on multivariate normal distribution analysis of homozygosity and call rate as dependent response variables and mixing ratio (two individuals) as explanatory variable. Ellipses indicate 95% confidence interval (n = 13 at each ratio).

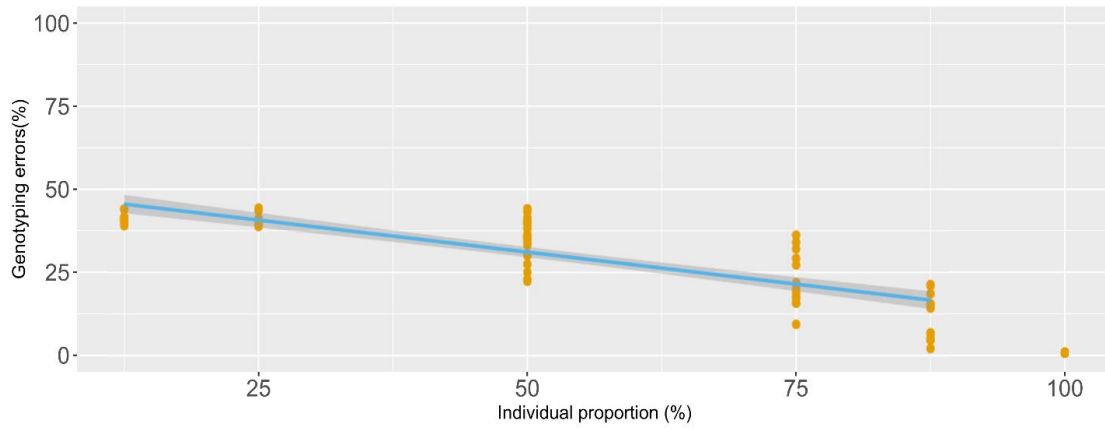


Figure 2.6 SNP genotyping of mixed caribou samples (n = 65). Linear regression of genotyping error versus proportion of mixing of two individuals ( $y = -0.4684x + 53.4518$ ).

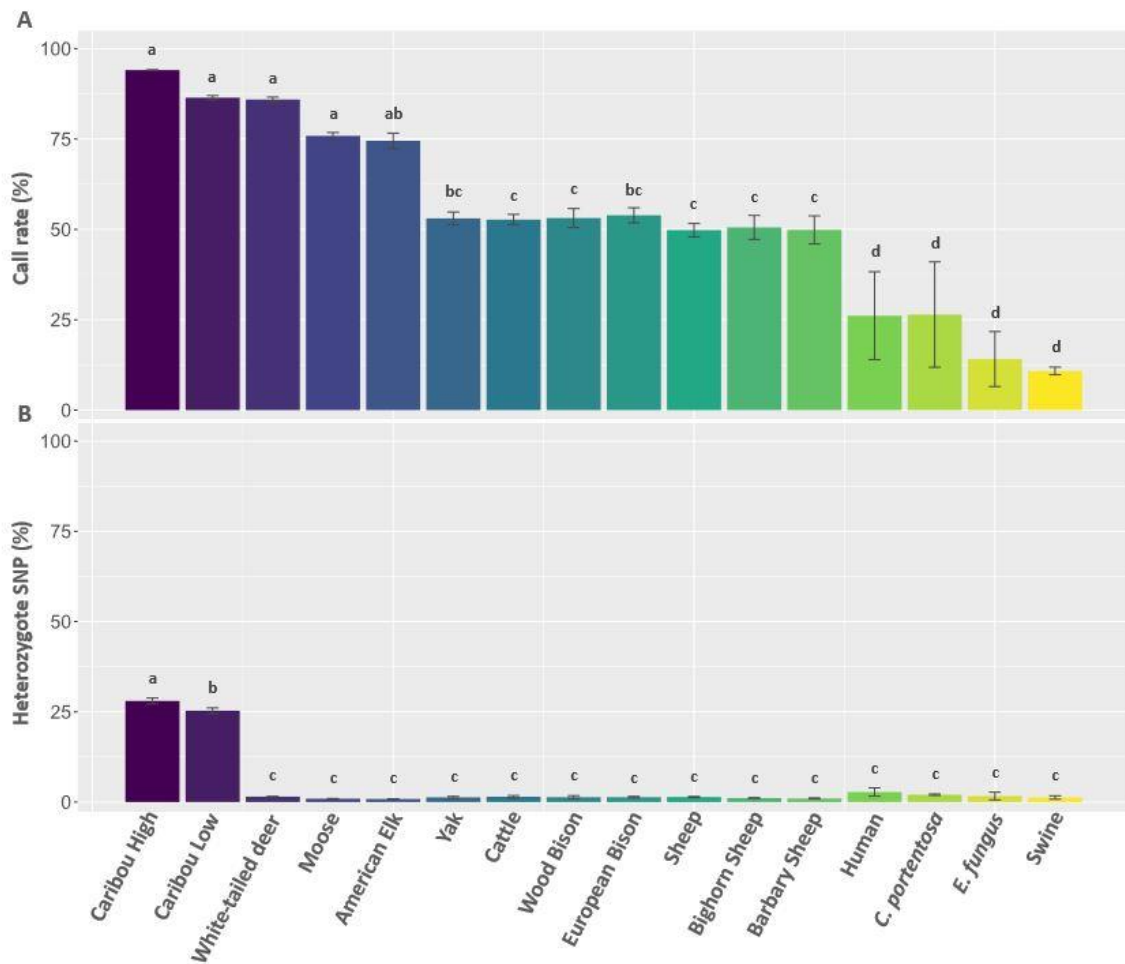


Figure 2.7 Caribou SNP chip specificity ( $n = 2$  or  $3$  per species) based on ANOVA analysis with Bonferroni post hoc test for call rate (A) and heterozygosity (B) of 13 genotyped species. ‘High’ and ‘Low’ refer to the DNA content of the positive controls.

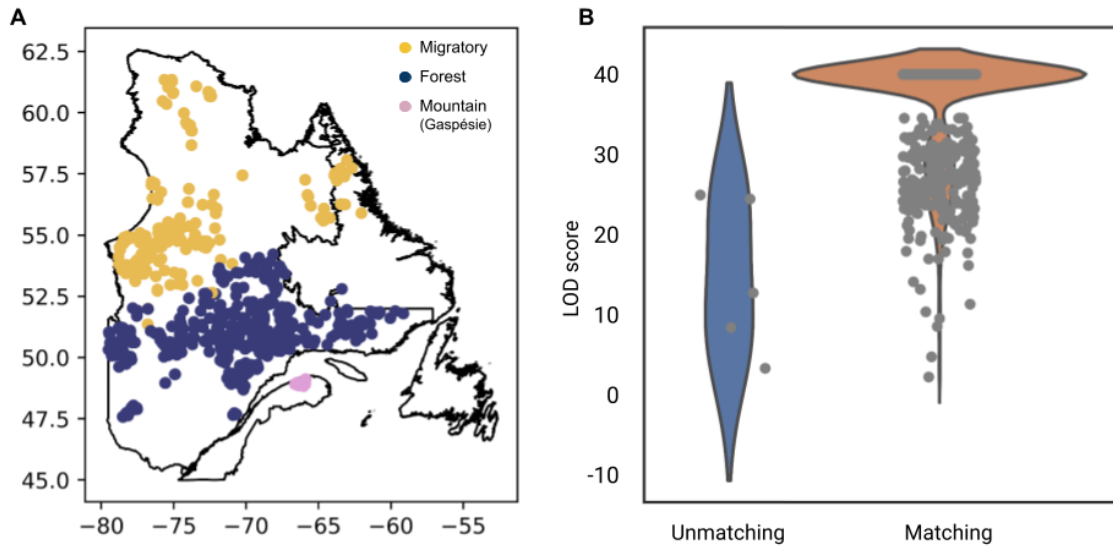


Figure 2.8 Caribou ecotype assignment (A) Ecotype geographical distribution predicted by genotyping based on 5,189 SNPs; (B) LOD scores associated with non-matching cases (n=5; predicted ecotype disagrees with telemetry data) and matching cases (n=768; genomic and telemetry data agree).

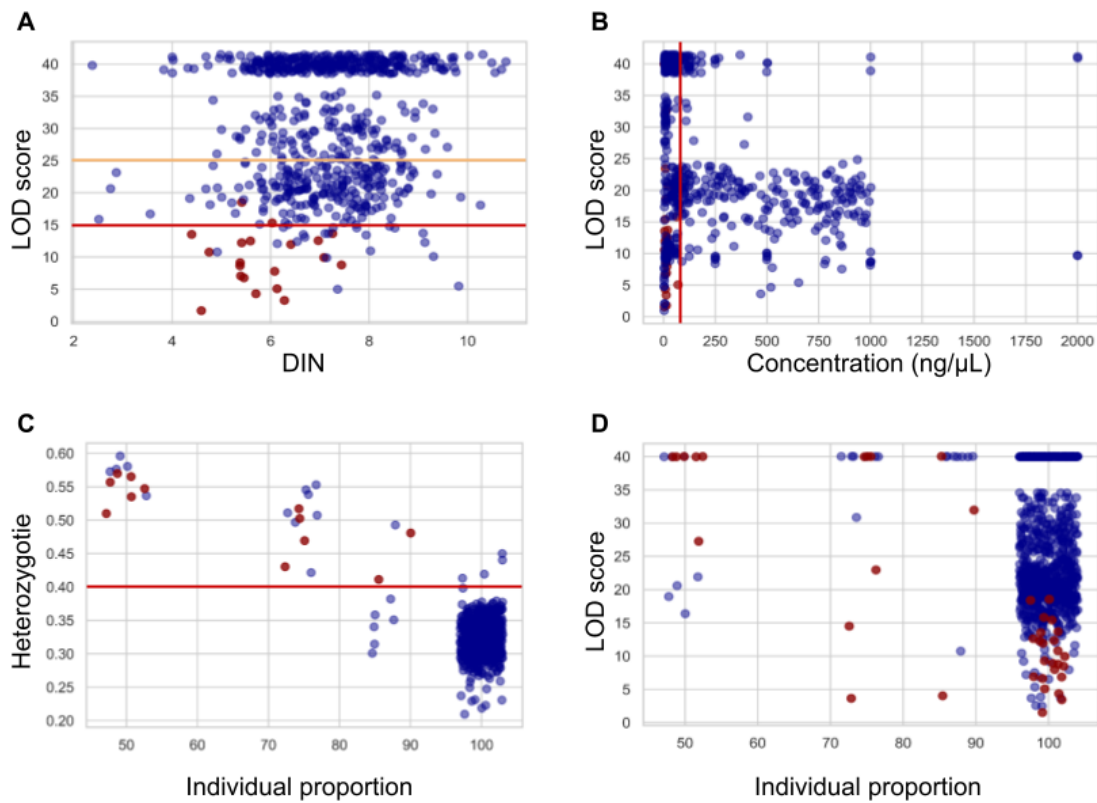


Figure 2.9 Ecotype assignment robustness according to validation parameters. (A) Assignment LOD scores according to DNA quality (DIN) (blue dots = accurate assignments; red dots = inaccurate assignments); (B) Assignment LOD scores according to DNA quantity (same color code for dots while the vertical line marks the 75 ng/μL threshold); (C, D) Heterozygosity and LOD scores according to individual proportion in mixed samples showing that a value lower than 0.4 for heterozygosity can be used as a criterium to discriminate mixed from pure samples (C, D).



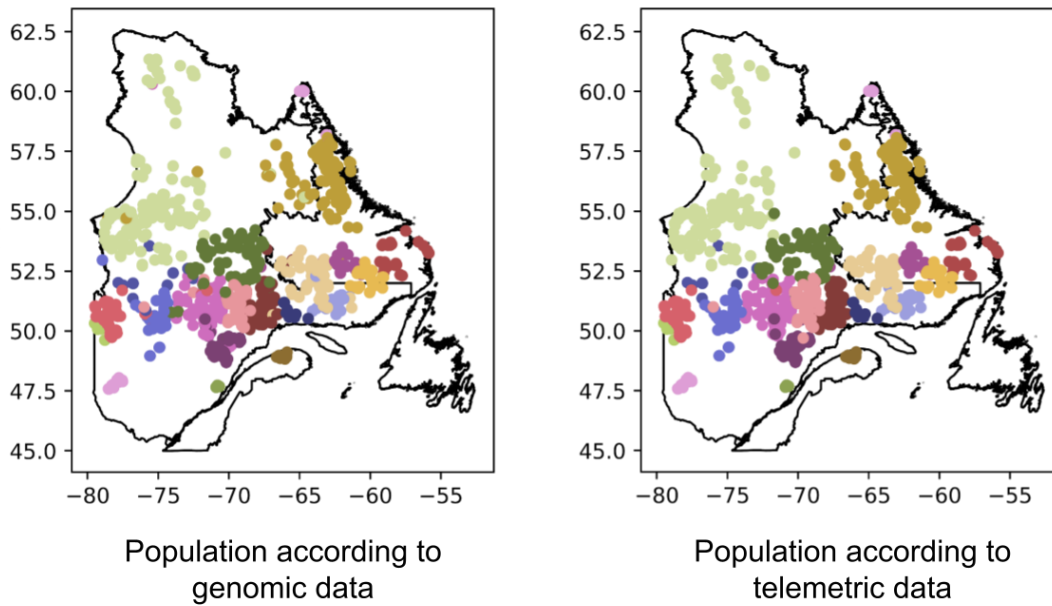


Figure 2.10 Geographical distribution of caribou populations according to genomic data (left) and telemetry data (right).

## 7 Tables

Tableau 2.1 DNA integrity number (DIN) and DNA concentration in samples used to test the robustness of the caribou SNP chip

<b>Sample type</b>	<b>DIN</b>	<b>DNA Concentration (ng/<math>\mu</math>L)</b>
Ear punch	7.3–8.1	100
Hair follicle	8.1–9.7	100
Muscle biopsy	6.0–8.8	100
Tendon	8.4–9.1	100
Fecal pellet	5.8	43
Blood swab	3.2–5.9	5–100

## Conclusion générale

Les populations de caribous et de rennes sont en déclin presque partout sur la planète. Les caribous sur le territoire de la province de Québec ne font pas exception. Le ministère des Forêts, de la faune et des parcs est responsable de l'élaboration des plans de rétablissement des espèces sauvages. Le caribou est une espèce emblématique ayant une très grande importance pour plusieurs communautés pratiquant la chasse de subsistance. Étant très mobile, l'aire de répartition du caribou couvre la majeure partie de l'aire au nord du St-Laurent. C'est ce qui en fait une espèce sentinelle face aux perturbations environnementales telles les changements climatiques ou la destruction des habitats forestiers.

Malgré le fait que l'ensemble des caribous occupant le territoire québécois soit de la même sous-espèce, cette grande « population » peut être fragmentée en sous-groupes selon les écotypes. Ces différents sous-groupes sont basés sur la localisation géographique, le type de territoire, les comportements de migration ainsi que certaines caractéristiques morphologiques. La définition des écotypes a également été appuyée par des données génétiques provenant d'analyses antérieures basées sur l'ADN mitochondrial et des microsatellites (Boulet et al., 2007; Yannic et al., 2016).

Tous les plans de réhabilitation des espèces impliquent deux aspects, soit la gestion et la protection de l'espèce. Le premier aspect implique le dénombrement et le suivi des animaux alors que le deuxième demande l'application de lois interdisant la collecte d'animaux. Les travaux de ce mémoire touchent l'aspect de la protection des caribous contre le braconnage. Dans ce contexte, il fallait tester le nouvel outil visant à utiliser l'information génomique pour déterminer la provenance d'un échantillon récupéré chez un suspect de chasse illégale.

Dépendamment de leurs états populationnels, la législation contrôlant la chasse du caribou peut changer dans le temps. Le principal objectif est de ségréger le caribou de l'écotype forestier de celui de l'écotype migrateur. Avec la baisse des effectifs, il y a moins de

contacts entre les populations, mais étant donné que le caribou est capable de très longues migrations, il n'est pas impossible que les populations reçoivent des migrants. Par conséquent, il est très important de s'assurer que l'analyse faite pour identifier l'animal puisse discriminer les écotypes avec suffisamment de certitude pour supporter une poursuite judiciaire.

Les travaux ont donc été exécutés afin de mettre le nouvel outil d'identification génomique du caribou à l'épreuve. Sachant que les échantillons prélevés sur les lieux d'une enquête peuvent être de qualité très variable, il était nécessaire de valider la robustesse et la puissance de l'outil. Par ses caractéristiques d'être robuste, très sensible et fiable, peu impactée par la qualité de l'ADN et spécifique au caribou, la puce à SNPs du caribou démontre sa puissance et sa capacité à générer des génotypes même à partir d'échantillons non-invasifs tels les fèces et les poils. Aujourd'hui, une grande importance est attribuée aux échantillons non-invasifs dû à leur facilité de prélèvement dans la nature ainsi qu'à l'absence de stress causé aux animaux. De ce fait, plusieurs études se sont articulées autour de l'utilisation de matériel fécal. C'est notamment le cas de l'étude de Ball et al. (2007) qui caractérise la quantité et la qualité d'ADN prélevé au niveau du mucus de fèces de caribous et de renards (*Vulpes velox*). Dans notre étude, on démontre le succès de leur protocole d'extraction d'ADN au niveau des fèces de caribou et la capacité d'amplification par PCR de ce type d'échantillon (Ball et al., 2007). De plus, une étude de Flasko et al. (2017) démontre toute la versatilité des études potentielles à l'aide de matériel fécal. Effectivement, en plus d'effectuer l'identification des individus au niveau des populations boréales et des montagnes centrales de caribous à partir de l'ADN provenant des fèces, les fèces leur ont également permis d'identifier les classes d'âge des individus grâce à leur morphologie ainsi qu'à leur contenu en hormones sexuelles (progestérone et testostérone) (Flasko et al., 2017). Finalement, Taylor et al. (2021) ont été en mesure de re-séquencer le génome du caribou à partir de matériel fécal, ce qui est une grande avancée en termes de génomique de conservation non invasive. Ainsi, la possibilité de génotyper de tels échantillons à l'aide d'une puce à SNPs appuie l'utilité grandissante des fèces dans la génomique de conservation.

Par ailleurs, la puce à SNPs du caribou a permis d'appuyer le système d'écotypes déjà établi par les biologistes, qui se base entre autres sur le comportement des animaux, en démontrant qu'il existe bel et bien des signatures génétiques spécifiques à chacun d'eux. De plus, cette technologie permettra de préciser encore plus la diversité génétique, car elle sera en mesure de distinguer si certains individus diffèrent des signatures établies et pourraient par exemple résulter d'un croisement entre deux écotypes, soit un caribou migrateur et un caribou forestier. En effet, bien que les microsatellites possèdent une puissance statistique élevée quant à l'inférence génétique à une population dus à leurs particularités (hauts taux de mutations et nombre élevé d'allèles par locus), l'utilisation d'un grand nombre de SNPs confère un effet pangénomique très avantageux (Allendorf, 2017; Puckett, 2017). Un nombre élevé de SNPs offre une excellente couverture génomique comparativement à l'utilisation d'une dizaine de microsatellites, permettant ainsi d'améliorer considérablement la puissance d'estimation des paramètres génétiques et démographiques d'une population (ex : le flux de gènes et la taille efficace d'une population) (Allendorf, 2017). Différentes études ont démontré que les modèles de structure et de diversité génétiques obtenus avec un groupe de SNPs diffèrent de ce qui est obtenu à partir de microsatellites. C'est notamment le cas dans l'étude de Camacho-Sanchez et al. (2020) dont les résultats démontrent qu'un grand nombre de SNPs offre des inférences plus fiables quant à la structure et à la diversité génétique, au niveau des échelles spatiales et temporelles, comparativement à ce qui est obtenu avec une dizaine de microsatellites. D'autres études abondent dans le même sens (Jeffries et al., 2016; Puckett & Eggert, 2016; Rašić et al., 2014). Ainsi, l'aspect pangénomique de la puce à SNPs du caribou permet de fournir différents paramètres génétiques clés en conservation tels que la diversité génétique de chaque population estimée par l'hétérozygotie ( $H_e$ ), le coefficient de consanguinité de chaque population, le degré d'apparentement entre paire d'individus (parent-enfant, frères, demi-frère, cousins, etc.), l'identification de sous-groupes d'individus au sein des populations et l'identification de migrants récents. En effet, l'étude de l'évolution des populations à partir de signatures pangénomiques produites par la puce à SNPs du caribou est plus que pertinente. Sur une longue période, celle-ci est très importante car elle reflète les événements démographiques passés permettant d'évaluer le

potentiel adaptatif futur de ces populations. En déterminant des signatures génétiques de populations, il est possible d'évaluer si celles-ci arborent suffisamment de variation génétique ancestrale pour se reconstituer. L'étude de Dedato et al. (Évaluation éditoriale en attente) a utilisé une approche étudiant les signatures des populations de caribous du Québec à partir de données de séquençage et de gènes orthologues. Cette étude met en évidence la façon dont les modèles génomiques sont nuancés et parfois trompeurs, d'où l'importance d'intégrer certaines métriques (ex. :  $N_e$  ancestral,  $D$  de Tajima, etc.) dans les modèles génomiques afin de prendre de meilleures décisions de conservation (Dedato et al., 2022). Ainsi, l'aspect pangénomique de la puce offre une force d'assignation importante et pourrait mieux appuyer les décisions de conservation. Qui plus est, la puce à SNPs du caribou offre d'autres perspectives intéressantes quant à la conservation de cette espèce. Par exemple, la puce à SNPs permet également le sexage des individus à l'aide de SNPs présents sur le chromosome X ainsi qu'avec les SNPs en lien avec le gène SRY présent sur le chromosome Y, ce qui est un atout très intéressant notamment quant à l'utilisation d'échantillons non-invasifs où le sexe de l'animal est inconnu (Prunier & Carrier, 2022 en révision).

Malgré toutes ces qualités de la puce à SNPs du caribou, celle-ci présente tout de même certaines limites. Effectivement, en présence d'un mélange il n'est pas possible de conclure sur l'écotype de l'animal. Cependant, la présence d'un mélange d'ADN est détectable grâce aux paramètres d'hybridation de la puce. Par conséquent, un échantillon contenant de l'ADN de plusieurs individus ne pourra servir pour incriminer une personne, car la détermination de l'écotype de l'animal présent dans le mélange sera impossible, ainsi celui-ci sera retiré de la preuve.

Les travaux ont permis de tester la nouvelle puce à SNPs du caribou principalement dans l'objectif d'en démontrer la puissance dans le contexte de la protection des populations de caribous dans un contexte bio-légal. La détermination des limites de la puce est une étape essentielle afin de s'assurer de la rigueur de la preuve lorsqu'il est question de chasse illégale. Tel que mentionné, le caribou est une espèce sentinelle pour le Québec parce qu'il occupe une grande partie du territoire. C'est un animal sensible aux perturbations

environnementales (Mallory & Boyce, 2017). Les changements climatiques, l'exploitation des ressources naturelles, l'occupation du territoire sont des facteurs qui influencent le caribou (MFFP, 2021a; Taillon et al., 2016; Vors & Boyce, 2009). L'utilisation de la puce à SNPs est un nouvel outil afin d'effectuer des suivis populationnels et s'ajoute aux autres outils de suivi et de recensement visant à aider les décideurs à prendre des décisions éclairées basées sur des données factuelles complètes. La puce à SNPs offre un rendement supérieur à ce qui était anticipé au départ et offre une description du bagage génétique complet d'un individu à une fraction du coût (environ 110\$) d'un séquençage de génome complet. Les données générées représentent le génotype pour près de 63 000 SNPs. La gestion des données est plus simple qu'un séquençage complet qui requiert une expertise en bio-informatique pour faire l'alignement des séquences sur le génome de référence.

Finalement, la puce à SNPs vise un grand nombre de régions génomiques ce qui en fait un outil qui sera efficace longtemps. Il est bien connu que la consanguinité modifie les fréquences génotypiques en augmentant l'homozygotie au détriment de l'hétérozygotie (Curik et al., 2014). En effet, l'augmentation de l'homozygotie se traduit par l'apparition de ROH qui sont des étendues d'allèles homozygotes dans le génome (Yıldız et al., 2022). Ainsi, dans des populations isolées, telle que la population de la Gaspésie, la présence de ROH dans le génome sera plus marquée. Ceci ayant donc comme effet de diminuer la diversité des SNPs et ainsi rendre plus complexe la différenciation entre les individus ayant les mêmes allèles fixés dans certaines régions. Cependant, le grand nombre de SNPs présents sur la puce fait en sorte d'éviter qu'une augmentation de l'homozygotie associée notamment à la consanguinité ne permette pas de fixer l'ensemble des 63 000 allèles. Il y aura donc toujours de la diversité génétique pour discriminer les individus.

## Bibliographie générale

- Adamowicz, M. S., Stasulli, D. M., Sobestanovich, E. M., & Bille, T. W. (2014). Evaluation of methods to improve the extraction and recovery of DNA from cotton swabs for forensic analysis. *PloS One*, 9(12), e116351. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116351>
- Agilent Technologies Inc. (2015). *DNA Integrity Number (DIN) For the Assessment of Genomic DNA Samples in Real-Time Quantitative PCR (qPCR) Experiments*. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-6368EN.pdf>
- Alacs, E. A., Georges, A., FitzSimmons, N. N., & Robertson, J. (2010). DNA detective: A review of molecular approaches to wildlife forensics. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 6(3), 180–194. <https://doi.org/10.1007/s12024-009-9131-7>
- Allendorf, F. W. (2017). Genetics and the conservation of natural populations: Allozymes to genomes. *Molecular Ecology*, 26(2), 420–430. <https://doi.org/10.1111/mec.13948>
- Ball, M. C., Pither, R., Manseau, M., Clark, J., Petersen, S. D., Kingston, S., Morrill, N., & Wilson, P. (2007). Characterization of target nuclear DNA from faeces reduces technical issues associated with the assumptions of low-quality and quantity template. *Conservation Genetics*, 8(3), 577–586. <https://doi.org/10.1007/s10592-006-9193-y>
- Banfield, A. W. F. (1961). *A revision of the reindeer and caribou, genus Rangifer* (Ottawa: Canada, Department of Northern Affairs and National Resources).
- Bélangier, M., & Le Hénaff, D. (1985). Distribution, abundance and regulation of caribou hunting in Québec. Ministère de l'environnement et de la faune du Québec. 3–13.
- Bergerud, A. t., & James-abra, E. (2012, January 17). *Caribou*. L'encyclopédie Canadienne. <https://www.thecanadianencyclopedia.ca/fr/article/caribou-1>
- Bose, N., Carlberg, K., Sensabaugh, G., Erlich, H., & Calloway, C. (2018). Target capture enrichment of nuclear SNP markers for massively parallel sequencing of degraded and mixed samples. *Forensic Science International. Genetics*, 34, 186–196. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.01.010>
- Boulet, M., Couturier, S., Côté, S. D., Otto, R. D., & Bernatchez, L. (2007). Integrative use of spatial, genetic, and demographic analyses for investigating genetic connectivity between migratory, montane, and sedentary caribou herds. *Molecular Ecology*, 16(20), 4223–4240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03476.x>
- Bourgeois, S., Kaden, J., Senn, H., Bunnefeld, N., Jeffery, K. J., Akomo-Okoue, E. F., Ogden, R., & McEwing, R. (2019). Improving cost-efficiency of faecal genotyping: New tools for elephant species. *PloS One*, 14(1), e0210811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210811>
- Britton, K., Grimes, V., Dau, J., & Richards, M. P. (2009). Reconstructing faunal migrations using intra-tooth sampling and strontium and oxygen isotope analyses: A case study of modern caribou (*Rangifer tarandus granti*). *Journal of Archaeological Science*, 36(5), 1163–1172. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2009.01.003>
- Camacho-Sanchez, M., Velo-Antón, G., Hanson, J. O., Veríssimo, A., Martínez-Solano, Í., Marques, A., Moritz, C., & Carvalho, S. B. (2020). Comparative assessment of range-wide patterns of genetic diversity and structure with SNPs and



- microsatellites: A case study with Iberian amphibians. *Ecology and Evolution*, 10(19), 10353–10363. <https://doi.org/10.1002/ece3.6670>
- Carrier, A., Prunier, J., Poisson, W., Trottier-Lavoie, M., Gilbert, I., Kantanen, J., Musiani, M., Côté, S. D., Albert, V., Taillon, J., Bourret, V., Droit, A., & Robert, C. (2022, under review). Design and validation of Illumina iSelect Caribou 60K BeadChip for the reindeer (*Rangifer tarandus*).
- Chen, K.-Y., Marschall, E. A., Sovic, M. G., Fries, A. C., Gibbs, H. L., & Ludsin, S. A. (2018). assignPOP: An r package for population assignment using genetic, non-genetic, or integrated data in a machine-learning framework. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(2), 439–446. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12897>
- COSEPAC. (2002). *Rapport de situation du COSEPAC sur le caribou des bois (Rangifer tarandus caribou) au Canada – Mise à jour, in Évaluation et Rapport de situation du COSEPAC sur le caribou des bois (Rangifer tarandus caribou) au Canada – Mise à jour*. Comité sur la situation des espèces en péril au Canada. <https://www.registrelep-sararegistry.gc.ca/default.asp?lang=Fr&n=F9E5752E-1&offset=6>
- COSEPAC. (2011). *Unités désignables du caribou (Rangifer tarandus) au Canada*. Ottawa. [https://cosewic.ca/images/cosewic/pdf/COSEWIC\\_Caribou\\_DU\\_Report\\_23Dec2011\\_Fr.pdf](https://cosewic.ca/images/cosewic/pdf/COSEWIC_Caribou_DU_Report_23Dec2011_Fr.pdf)
- COSEPAC. (2015). *Évaluation et rapport de situation du COSEPAC sur le caribou de Peary, Rangifer tarandus pearyi, au Canada*. [https://cosewic.ca/images/cosewic/pdf/COSEWIC\\_Caribou\\_DU\\_Report\\_23Dec2011\\_Fr.pdf](https://cosewic.ca/images/cosewic/pdf/COSEWIC_Caribou_DU_Report_23Dec2011_Fr.pdf)
- COSEPAC. (2021). *Cosewic / Cosepac—Accueil*. <https://cosewic.ca/index.php/fr/>
- COSEWIC. (2017). *COSEWIC assessment and status report on the caribou, Rangifer tarandus, eastern migratory population, Torngat Mountains population, in Canada*. [http://epe.lac-bac.gc.ca/100/201/301/weekly\\_acquisitions\\_list-ef/2018/18-08/publications.gc.ca/collections/collection\\_2018/eccc/CW69-14-754-2017-eng.pdf](http://epe.lac-bac.gc.ca/100/201/301/weekly_acquisitions_list-ef/2018/18-08/publications.gc.ca/collections/collection_2018/eccc/CW69-14-754-2017-eng.pdf)
- Couturier, S., Dale, A., Mitchell Foley, J., Snook, J., & Wood, B. (2015). *First scientific data on herd size and population dynamics of the Torngat Mountains caribou herd*. Torngat Wildlife, Plants and Fisheries Secretariat. [https://www.cclmportal.ca/sites/default/files/2021-01/2014-first\\_scientific\\_data\\_on\\_herd\\_size\\_and\\_population\\_dynamics\\_of\\_the\\_torngat\\_mountains\\_caribou\\_herd.pdf](https://www.cclmportal.ca/sites/default/files/2021-01/2014-first_scientific_data_on_herd_size_and_population_dynamics_of_the_torngat_mountains_caribou_herd.pdf)
- Couturier, S., Dale, A., Wood, B., & Snook, J. (2018). *Results of a spring 2017 aerial survey of the Torngat Mountains Caribou Herd*. Torngat Wildlife, Plants and Fisheries Secretariat. [https://www.cclmportal.ca/sites/default/files/2021-01/Couturier%20et%20al.%202018\\_TMCH\\_2017SURVEY.pdf](https://www.cclmportal.ca/sites/default/files/2021-01/Couturier%20et%20al.%202018_TMCH_2017SURVEY.pdf)
- Cronin, Røed M. A., Patton, J. C., Balmysheva, N., & MacNeil, M. D. (2003). Genetic variation in caribou and reindeer (*Rangifer tarandus*). *Animal Genetics*, 34(1), 33–41. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2003.00927.x>
- Cronn, R. C., Finch, K. N., Hauck, L. L., Parker-Forney, M., Milligan, B. G., Dowling, J., & Scientists, A. (2021). Range-wide assessment of a SNP panel for individualization and geolocalization of bigleaf maple (*Acer macrophyllum* Pursh).

- Forensic Science International: Animals and Environments*, 1, 100033. <https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100033>
- Curik, I., Ferenčaković, M., & Sölkner, J. (2014). Inbreeding and runs of homozygosity : A possible solution to an old problem. *Livestock Science*, 166, 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.05.034>
- Dagnall, C. L., Morton, L. M., Hicks, B. D., Li, S., Zhou, W., Karlins, E., Teshome, K., Chowdhury, S., Lashley, K. S., Sampson, J. N., Robison, L. L., Armstrong, G. T., Bhatia, S., Radloff, G. A., Davies, S. M., Tucker, M. A., Yeager, M., & Chanock, S. J. (2018). Successful use of whole genome amplified DNA from multiple source types for high-density Illumina SNP microarrays. *BMC Genomics*, 19(1), 182. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4572-6>
- Dedato, M., Robert, C., Taillon, J., Shafer, A., & Cote, S. (2022). *Demographic history and conservation genomics of caribou (Rangifer tarandus) in Québec* [Preprint]. Preprints. <https://doi.org/10.22541/au.164165840.02956352/v1>
- Environnement et Changement climatique Canada. (2018a). *Approche pancanadienne pour la transformation de la conservation des espèces en péril au Canada* (Centre de renseignements à la population). <https://www.canada.ca/content/dam/eccc/documents/pdf/species-risk/approche-pancanadienne-transformation-conservation-especes-peril-canada.pdf>
- Environnement et Changement climatique Canada. (2018b). *Plan d'action pour le caribou des bois (Rangifer tarandus caribou), population boréale, au Canada – Mesures fédérales* (Environnement et Changement climatique Canada).
- Équipe de rétablissement du caribou de la Gaspésie. (2018a). *Plan de rétablissement de la population de caribous (Rangifer tarandus caribou) de la Gaspésie—2019-2029* (Direction générale de la gestion de la faune et des habitats). [https://mffp.gouv.qc.ca/documents/faune/especes/PL\\_retablissement\\_caribou\\_Gaspesie\\_MFFP.pdf](https://mffp.gouv.qc.ca/documents/faune/especes/PL_retablissement_caribou_Gaspesie_MFFP.pdf)
- Équipe de rétablissement du caribou forestier au Québec. (2013). *Plan de rétablissement du caribou forestier (Rangifer tarandus caribou) au Québec—2013-2023. Produit pour le compte du ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs du Québec, Faune Québec*, 110.
- Ewart, K. M., Lightson, A. L., Sitam, F. T., Rovie-Ryan, J., Nguyen, S. G., Morgan, K. I., Luczon, A., Anadon, E. M. S., De Bruyn, M., Bourgeois, S., Ouitavon, K., Kotze, A., Bakar, M. S. A., Salgado-Lynn, M., & McEwing, R. (2021). DNA analyses of large pangolin scale seizures: Species identification validation and case studies. *Forensic Science International: Animals and Environments*, 1, 100014. <https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100014>
- Festa-Bianchet, M., Ray, J. C., Boutin, S., Côté, S. D., & Gunn, A. (2011). Conservation of caribou (Rangifer tarandus) in Canada: An uncertain future. *Canadian Journal of Zoology*, 89(5), 419–434. <https://doi.org/10.1139/z11-025>
- Flagstad, Øy., & Røed, K. H. (2003). Refugial Origins of Reindeer (rangifer Tarandus L.) Inferred from Mitochondrial Dna Sequences. *Evolution*, 57(3), 658–670. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb01557.x>
- Flasko, A., Manseau, M., Mastro Monaco, G., Bradley, M., Neufeld, L., & Wilson, P. (2017). Fecal DNA, hormones, and pellet morphometrics as a noninvasive method to estimate age class: An application to wild populations of Central Mountain and

- Boreal woodland caribou (*Rangifer tarandus caribou*). *Canadian Journal of Zoology*, 95(5), 311–321. <https://doi.org/10.1139/cjz-2016-0070>
- Fontana, F., & Rubini, M. (1990). Chromosomal evolution in cervidae. *Biosystems*, 24(2), 157–174. [https://doi.org/10.1016/0303-2647\(90\)90008-O](https://doi.org/10.1016/0303-2647(90)90008-O)
- Forbes, B. C., & Kumpula, T. (2009). The Ecological Role and Geography of Reindeer (*Rangifer tarandus*) in Northern Eurasia. *Geography Compass*, 3(4), 1356–1380. <https://doi.org/10.1111/j.1749-8198.2009.00250.x>
- Fries, R., & Durstewitz, G. (2001). Digital DNA signatures for animal tagging. *Nature Biotechnology*, 19(6), 508–508. <https://doi.org/10.1038/89213>
- Gittelsohn, S., Berger, C. E. H., Jackson, G., Evett, I. W., Champod, C., Robertson, B., Curran, J. M., Taylor, D., Weir, B. S., Coble, M. D., & Buckleton, J. S. (2018). A response to “Likelihood ratio as weight of evidence: A closer look” by Lund and Iyer. *Forensic Science International*, 288, e15–e19. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.05.025>
- Gouvernement du Canada. (2020a). *Caribou au Canada*. Gouvernement du Canada. <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/especes-peril-centre-education/caribou.html>
- Gouvernement du Canada. (2020b). *Programme de rétablissement modifié du caribou des bois (*Rangifer tarandus caribou*), population boréale, au Canada [Proposition] 2019*. Gouvernement du Canada. <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/registre-public-especes-peril/programmes-retablissement/boreal-caribou-des-bois-2019.html>
- Gouvernement du Canada. (2022, February 3). *Lois codifiées Règlements codifiés*. Gouvernement du Canada. <https://laws.justice.gc.ca/fra/lois/S-15.3/page-2.html#h-424423>
- Gouvernement du Québec. (2002). *Loi sur la conservation et la mise en valeur de la faune*. Publications Québec. <https://www.legisquebec.gouv.qc.ca/fr/document/lc/c-61.1>
- Howard, C., Gilmore, S., Robertson, J., & Peakall, R. (2008). *Application of new DNA markers for forensic examination of Cannabis sativa seizures—Developmental validation of protocols and a genetic database*. *Monograph Series*(29), 73.
- Hummel, M., & Ray, J. C. (2008). *Caribou and the North: A Shared Future* (Dundurn Press).
- Jäger, A. C., Alvarez, M. L., Davis, C. P., Guzmán, E., Han, Y., Way, L., Walichiewicz, P., Silva, D., Pham, N., Caves, G., Bruand, J., Schlesinger, F., Pond, S. J. K., Varlaro, J., Stephens, K. M., & Holt, C. L. (2017). Developmental validation of the MiSeq FGx Forensic Genomics System for Targeted Next Generation Sequencing in Forensic DNA Casework and Database Laboratories. *Forensic Science International. Genetics*, 28, 52–70. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.01.011>
- Jaquet-Chiffelle, D.-O., & Casey, E. (2021). A formalized model of the Trace. *Forensic Science International*, 327, 110941. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110941>
- Jeffries, D. L., Copp, G. H., Lawson Handley, L., Olsén, K. H., Sayer, C. D., & Hänfling, B. (2016). Comparing RADseq and microsatellites to infer complex phylogeographic patterns, an empirical perspective in the Crucian carp, *Carassius carassius*, L. *Molecular Ecology*, 25(13), 2997–3018. <https://doi.org/10.1111/mec.13613>

- Kendrick, A., & Manseau, M. (2008). Representing Traditional Knowledge: Resource Management and Inuit Knowledge of Barren-Ground Caribou. *Society & Natural Resources*, 21(5), 404–418. <https://doi.org/10.1080/08941920801898341>
- Klein, D. R. (1980). *Conflicts Between Domestic Reindeer and Their Wild Counterparts: A Review of Eurasian and North American Experience*. 33(4), 18.
- Klein, D. R., Meldgaard, M., & Fancy, S. G. (1987). Factors Determining Leg Length in Rangifer tarandus. *Journal of Mammalogy*, 68(3), 642–655. <https://doi.org/10.2307/1381597>
- Kvie, K. S., Heggenes, J., & Røed, K. H. (2016). Merging and comparing three mitochondrial markers for phylogenetic studies of Eurasian reindeer (Rangifer tarandus). *Ecology and Evolution*, 6(13), 4347–4358. <https://doi.org/10.1002/ece3.2199>
- Li, Z., Lin, Z., Ba, H., Chen, L., Yang, Y., Wang, K., Qiu, Q., Wang, W., & Li, G. (2017). Draft genome of the reindeer (Rangifer tarandus). *GigaScience*, 6(gix102). <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix102>
- Linacre, A., & Tobe, S. S. (2011). An overview to the investigative approach to species testing in wildlife forensic science. *Investigative Genetics*, 2(1), 2. <https://doi.org/10.1186/2041-2223-2-2>
- Luikart, G., Kardos, M., Hand, B. K., Rajora, O. P., Aitken, S. N., & Hohenlohe, P. A. (2019). Population Genomics: Advancing Understanding of Nature. In O. P. Rajora (Ed.), *Population Genomics: Concepts, Approaches and Applications* (pp. 3–79). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/13836\\_2018\\_60](https://doi.org/10.1007/13836_2018_60)
- Mallory, C. D., & Boyce, M. S. (2017). Observed and predicted effects of climate change on Arctic caribou and reindeer. *Environmental Reviews*. <https://doi.org/10.1139/er-2017-0032>
- Manel, S., Gaggiotti, O., & Waples, R. (2005). Assignment methods: Matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(3), 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.12.004>
- Marquis, R., Biedermann, A., Cadola, L., Champod, C., Gueissaz, L., Massonnet, G., Mazzella, W. D., Taroni, F., & Hicks, T. (2016). Discussion on how to implement a verbal scale in a forensic laboratory: Benefits, pitfalls and suggestions to avoid misunderstandings. *Science & Justice: Journal of the Forensic Science Society*, 56(5), 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2016.05.009>
- Martínez-Arias, R., Calafell, F., Mateu, E., Comas, D., Andrés, A., & Bertranpetit, J. (2001). Sequence Variability of a Human Pseudogene. *Genome Research*, 11(6), 1071–1085. <https://doi.org/10.1101/gr.167701>
- MFFP. (2020). *Nord-du-Québec—Inventaire du troupeau de caribous migrants de la rivière George*. Gouvernement du Québec. <https://www.quebec.ca/nouvelles/actualites/details/nord-du-quebec-inventaire-du-troupeau-de-caribous-migrants-de-la-riviere-george>
- MFFP. (2021a). *Espèces fauniques menacées ou vulnérables au Québec—Caribou des bois, écotype forestier*. <https://www3.mffp.gouv.qc.ca/faune/especes/menacees/fiche.asp?noEsp=53>
- MFFP. (2021b). *Le caribou au Québec* [Québec - Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs]. Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs. <https://mffp.gouv.qc.ca/la-faune/especes/caribou-quebec/>

- MFFP. (2021c). *MFFP - Espèces fauniques menacées ou vulnérables au Québec—Caribou des bois, écotype montagnard, population de la Gaspésie*. Québec - Liste Des Espèces Fauniques Menacées Ou Vulnérables Au Québec. [https://www3.mffp.gouv.qc.ca/faune/especes/menacees/fiche.asp?noEsp=1&\\_ga=2.162283452.1259643957.1646664072-1138185013.1601913816&\\_gl=1\\*x2r90g\\*\\_ga\\*MTEzODE4NTAxMy4xNjAxOT EzODE2\\*\\_ga\\_7KG0CGH2EY\\*MTY0NjY2NDA3MS43LjEuMTY0NjY2NDI0OC4w](https://www3.mffp.gouv.qc.ca/faune/especes/menacees/fiche.asp?noEsp=1&_ga=2.162283452.1259643957.1646664072-1138185013.1601913816&_gl=1*x2r90g*_ga*MTEzODE4NTAxMy4xNjAxOT EzODE2*_ga_7KG0CGH2EY*MTY0NjY2NDA3MS43LjEuMTY0NjY2NDI0OC4w)
- MFFP. (2021d). *MFFP - Gibiers du Québec—Caribou*. Forêts, Faune et Parcs - Québec. <https://mffp.gouv.qc.ca/faune/chasse/gibiers/caribou.jsp>
- Moore, M. K., Baker, B. W., Bauman, T. L., Burnham-Curtis, M. K., Espinoza, E. O., Ferrell, C. S., Frankham, G. J., Frazier, K., Giles, J. L., Hawk, D., Rovie-Ryan, J. J., Johnson, R. N., Knott, T., Kornfield, I. L., Lindquist, C., Lord, W. D., Morgan, K. L., O'Brien, R. C., Ogden, R., ... Webster, L. M. I. (2021). The Society for Wildlife Forensic Science standards and guidelines. *Forensic Science International: Animals and Environments*, 1, 100015. <https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100015>
- Morin, M., & Lesmerises, F. (2020). Inventaire de la population de caribous montagnards (*Rangifer tarandus caribou*) de la Gaspésie à l'automne 2019 et à l'hiver 2020. *Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs*, 13 pp.
- Morin, P. A., Luikart, G., Wayne, R. K., & the SNP workshop group. (2004). SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(4), 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.01.009>
- Morin, P. A., & McCarthy, M. (2007). Highly accurate SNP genotyping from historical and low-quality samples. *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 937–946. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01804.x>
- Morneau, C., & Payette, S. (2000). Long-term fluctuations of a caribou population revealed by tree-ring data. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie - CAN J ZOOL*, 78, 1784–1790. <https://doi.org/10.1139/cjz-78-10-1784>
- Ogden, R., & Linacre, A. (2015). Wildlife forensic science: A review of genetic geographic origin assignment. *Forensic Science International: Genetics*, 18, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.02.008>
- Okitsu, C. Y., Van Den Berg, D. J., Lieber, M. R., & Hsieh, C.-L. (2013). Reproducibility and reliability of SNP analysis using human cellular DNA at or near nanogram levels. *BMC Research Notes*, 6, 515. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-515>
- Palmer, C., Diehn, M., Alizadeh, A. A., & Brown, P. O. (2006). Cell-type specific gene expression profiles of leukocytes in human peripheral blood. *BMC Genomics*, 7(1), 115. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-115>
- Parlee, B., Manseau, M., & Nation, L. K. D. F. (2005). Using Traditional Knowledge to Adapt to Ecological Change: Denésoliné Monitoring of Caribou Movements. *ARCTIC*, 58(1), 26–37. <https://doi.org/10.14430/arctic386>
- Prunier, J., Carrier, A., Gilbert, I., Poisson, W., Albert, V., Taillon, J., Bourret, V., Côté, S. D., Droit, A., & Robert, C. (2021). Copy number variations with adaptive potential in caribou (*Rangifer tarandus*): Genome architecture and new annotated genome assembly. *Live Science Alliance*, 5(3), <https://doi.org/10.1101/2021.07.22.453386>

- Puckett, E. E. (2017). Variability in total project and per sample genotyping costs under varying study designs including with microsatellites or SNPs to answer conservation genetic questions. *Conservation Genetics Resources*, 9(2), 289–304. <https://doi.org/10.1007/s12686-016-0643-7>
- Puckett, E. E., & Eggert, L. S. (2016). Comparison of SNP and microsatellite genotyping panels for spatial assignment of individuals to natal range: A case study using the American black bear (*Ursus americanus*). *Biological Conservation*, 193, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.11.020>
- Rajora, O. P. (Ed.). (2019). *Population Genomics: Concepts, Approaches and Applications*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-04589-0>
- Ramos, A. M., Crooijmans, R. P. M. A., Affara, N. A., Amaral, A. J., Archibald, A. L., Beever, J. E., Bendixen, C., Churcher, C., Clark, R., Dehais, P., Hansen, M. S., Hedegaard, J., Hu, Z.-L., Kerstens, H. H., Law, A. S., Megens, H.-J., Milan, D., Nonneman, D. J., Rohrer, G. A., ... Groenen, M. A. M. (2009). Design of a High Density SNP Genotyping Assay in the Pig Using SNPs Identified and Characterized by Next Generation Sequencing Technology. *PLOS ONE*, 4(8), 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006524>
- Rašić, G., Filipović, I., Weeks, A. R., & Hoffmann, A. A. (2014). Genome-wide SNPs lead to strong signals of geographic structure and relatedness patterns in the major arbovirus vector, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics*, 15(1), 275. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-275>
- Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers—Just a matter of fashion? *Nature Reviews. Genetics*, 5(1), 63–69. <https://doi.org/10.1038/nrg1249>
- Seidel, G. E. (2010). Brief introduction to whole-genome selection in cattle using single nucleotide polymorphisms. *Reproduction, Fertility, and Development*, 22(1), 138–144. <https://doi.org/10.1071/RD09220>
- Sharma, S., Couturier, S., & Côté, S. D. (2009). Impacts of climate change on the seasonal distribution of migratory caribou. *Global Change Biology*, 15(10), 2549–2562. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01945.x>
- Stemers, F. J., & Gunderson, K. L. (2007). Whole genome genotyping technologies on the BeadArray™ platform. *Biotechnology Journal*, 2(1), 41–49. <https://doi.org/10.1002/biot.200600213>
- SWGDAM. (2016). *SWGDAM Validation Guidelines for DNA Analysis Methods*. [https://1ecb9588-ea6f-4feb-971a-73265dbf079c.filesusr.com/ugd/4344b0\\_813b241e8944497e99b9c45b163b76bd.pdf](https://1ecb9588-ea6f-4feb-971a-73265dbf079c.filesusr.com/ugd/4344b0_813b241e8944497e99b9c45b163b76bd.pdf)
- Table ronde autochtone du caribou de la péninsule d’Ungava. (2017). *IL YA LONGTEMPS DANS L’AVENIR: LE CARIBOU ET LES PEUPLES AUTOCHTONES D’UNGAVA - 2017 à 2117*. <https://www.dropbox.com/sh/bzoz38i3e4uwwjp/AACg5Hrp5cYuCG48VoN5XHwma?dl=0&preview=UPCART-STRATEGY-2017-11-07-FRE-signed-sm.pdf>
- Taillon, J., Brodeur, V., & Rivard, S. (2016). État de la situation biologique du caribou migrateur, troupeau de la rivière aux Feuilles. Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs, Québec. 69 p.

- Taylor, R. S., Horn, R. L., Zhang, X., Golding, G. B., Manseau, M., & Wilson, P. J. (2019). The caribou (*Rangifer tarandus*) genome. *Genes*, *10*(7), 540. <https://doi.org/10.3390/genes10070540>
- Taylor, R. S., Manseau, M., Redquest, B., Keobouasone, S., Gagné, P., Martineau, C., & Wilson, P. J. (2021). Whole genome sequences from non-invasively collected caribou faecal samples. *Conservation Genetics Resources*, *14*, 53-68. <https://doi.org/10.1007/s12686-021-01235-2>
- Thaden, A., Cocchiararo, B., Jarausch, A., Jüngling, H., Karamanlidis, A. A., Tiesmeyer, A., Nowak, C., & Muñoz-Fuentes, V. (2017). Assessing SNP genotyping of noninvasively collected wildlife samples using microfluidic arrays. *Scientific Reports*, *7*(1), 10768. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10647-w>
- Ubani, A., Horstkotte, T., Kaarlejärvi, E., Sévêque, A., Stammler, F., Olofsson, J., Forbes, B. C., & Moen, J. (2016). Long-Term Trends and Role of Climate in the Population Dynamics of Eurasian Reindeer. *PLOS ONE*, *11*(6), 20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158359>
- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., & Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, *34*(3), 275. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-34-3-275>
- Vors, L. S., & Boyce, M. S. (2009). Global declines of caribou and reindeer. *Global Change Biology*, *15*(11), 2626–2633. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01974.x>
- Weckworth, B. V., Musiani, M., McDevitt, A., Hebblewhite, M., & Mariani, S. (2012). Reconstruction of caribou evolutionary history in Western North America and its implications for conservation. *Molecular ecology*, *21*(14), <https://onlinelibrary-wiley-com.acces.bibl.ulaval.ca/doi/full/10.1111/j.1365-294X.2012.05621.x?sid=worldcat.org>
- Weladji, R. B., & Forbes, B. C. (2002). Disturbance Effects of Human Activities on Rangifer Tarandus Habitat: Implications for Life History and Population Dynamics. *Polar Geography*, *26*(3), 171–186. <https://doi.org/10.1080/789610191>
- Westen, A. A., Matai, A. S., Laros, J. F. J., Meiland, H. C., Jasper, M., de Leeuw, W. J. F., de Knijff, P., & Sijen, T. (2009). Tri-allelic SNP markers enable analysis of mixed and degraded DNA samples. *Forensic Science International. Genetics*, *3*(4), 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.02.003>
- Yannic, G., Pellissier, L., Ortego, J., Lecomte, N., Couturier, S., Cuyler, C., Dussault, C., Hundertmark, K., Irvine, R., Jenkins, D., Kolpashikov, L., Mager, K., Musiani, M., Parker, K., Røed, K., Sipko, T., Pórisson, S., Weckworth, B., Guisan, A., & Côté, S. D. (2014). Genetic diversity in caribou linked to past and future climate change. *Nature Climate Change*, *4*, 132–137. <https://doi.org/10.1038/nclimate2074>
- Yannic, G., St-Laurent, M.-H., Ortego, J., Taillon, J., Beauchemin, A., Bernatchez, L., Dussault, C., & Côté, S. D. (2016). Integrating ecological and genetic structure to define management units for caribou in Eastern Canada. *Conservation Genetics*, *17*(2), 437–453. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0795-0>
- Yannic, G., Ortego, J., Pellissier, L., Lecomte, N., Bernatchez, L., & Côté, S. D. (2018). Linking genetic and ecological differentiation in an ungulate with a circumpolar distribution. *Ecography*, *41*(6), 922–937. <https://doi.org/10.1111/ecog.02995>

- Yıldız, B., Megens, H.-J., Hvilsom, C., & Bosse, M. (2022). Genomic consequences of a century of inbreeding and isolation in the Danish wild boar population. *Evolutionary Applications*, 15(6), 954-966. <https://doi.org/10.1111/eva.13385>
- Zemanova, M. A. (2020). Towards more compassionate wildlife research through the 3Rs principles: Moving from invasive to non-invasive methods. *Wildlife Biology*, 2020(1). <https://doi.org/10.2981/wlb.00607>