

CONVENTION SUR LE COMMERCE INTERNATIONAL DES ESPECES
DE FAUNE ET DE FLORE SAUVAGES MENACEES D'EXTINCTION



Cinquante-septième session du Comité permanent
Genève (Suisse), 14 – 18 juillet 2008

L'UTILISATION DES TECHNIQUES ADN POUR IDENTIFIER LE COMMERCE LICITE
ET LE COMMERCE ILLICITE DE L'IVOIRE

1. Le présent document a été soumis par le Kenya.



Department of Biology

Samuel K. Wasser. Ph.D.
P.O. Box 351800
University of Washington
Seattle WA 98195-1800
wassers@u.washington.edu
(206) 543-1669
FAX (206) 543-3041

Endowed Chair in Conservation Biology

Director, Center for Conservation Biology

Lundi 14 juillet 2008

L'utilisation des techniques ADN pour identifier le commerce licite et le commerce illicite de l'ivoire.

Commerce illicite : identifier les zones de grand braconnage pour une lutte contre la fraude préventive

La criminalité internationale impliquant les espèces sauvages augmente considérablement dans ce climat de commerce global. Nous soutenons que la façon la plus efficace de maîtriser l'approvisionnement de ce commerce illicite est de déterminer la provenance du prélèvement des espèces sauvages et de concentrer les efforts de lutte contre la fraude dans ces pays sources. Cette approche fait obstacle au commerce avant qu'il n'implique une toile de plus en plus complexe d'activités internationales criminelles qui sont extrêmement chères et difficiles à contrôler, surtout qu'un nombre peu élevé de délinquants sont poursuivis en justice. Cette approche permet aux autorités de diriger les efforts de lutte contre la fraude vers les zones de grand braconnage, empêchant aux pays de nier les problèmes de braconnage intervenant sur leur territoire et permet éventuellement de mettre fin au commerce avant que les espèces sauvages ne soient abattues.

Les outils d'investigation judiciaire sont limités dans leur capacité à déterminer l'origine du produit parce que les informations qu'ils révèlent commencent typiquement seulement au point de l'expédition. Mon institut a développé des méthodes génétiques très efficaces pour lier l'ivoire braconné à se(s) origine(s) géographique(s). Cependant ces méthodes sont applicables à la surveillance du commerce d'une grande variété de produits d'espèces sauvages. Nous travaillons en collaboration avec le Groupe de travail Interpol sur la criminalité liée aux espèces sauvages et l'Equipe Spéciale de l'Accord de Lusaka pour identifier les endroits particulièrement affectés par le braconnage en Afrique (« *poaching hotspots* »), et les stratégies utilisées par les grands syndicats de criminels impliqués dans le commerce illicite de l'ivoire.

Découvertes

Nous avons appliqué cette méthode à deux grands convois de contrebande d'ivoire d'éléphant d'Afrique saisis à Singapour/Malawi et à Hong Kong/Cameroun (Wasser et al. 2008). Bien que ces deux groupes de saisies proviennent de zones d'Afrique opposées, les deux trafiquants semblaient utiliser des stratégies similaires. Les deux syndicats de criminels visaient des populations spécifiques pour les exploiter de façon intensive. Les populations visées ont été touchées durement et rapidement, présumément pour satisfaire des commandes de vente spécifiques passées par leur(s) acheteur(s). Cela est venu contredire la conviction plus commune soutenant que les trafiquants agissent selon un plan décentralisé pour assembler des grandes quantités destinées à l'expédition en se procurant des tas d'ivoire de façon opportuniste au fur et à mesure que ceux-ci deviennent disponibles à travers l'Afrique. Cela a également signifié que la concentration des efforts de lutte contre la fraude sur les lieux identifiés comme particulièrement affectés (« *hot-spots* ») devrait constituer une stratégie de lutte contre le braconnage viable.

Ce qui s'avère également intéressant dans les deux affaires est le fait que l'ivoire ait été passé en contrebande à l'intérieur du pays par le biais d'expéditions multiples en passant par un pays intermédiaire (le Malawi pour l'ivoire provenant de Zambie et le Cameroun pour l'ivoire provenant du Gabon) avant d'être envoyé vers l'Asie. Il s'agit ici d'une stratégie de diminution des risques ; cette stratégie minimise la durée pendant laquelle l'ivoire est en la possession du négociant, et diminue les chances pour qu'un

braconnier attrapé dans un pays puisse identifier un acheteur dans un autre pays. Ces caractéristiques auraient été littéralement impossibles à découvrir en utilisant des outils d'investigation judiciaire non-génétiques où l'information disponible commence normalement au moment de l'exportation internationale. En fait, le fait de concentrer l'attention sur le pays exportateur pourrait en fait distraire les autorités en les empêchant de localiser le pays où l'ivoire est réellement braconné.

Nous sommes actuellement confrontés à une infrastructure sophistiquée mise en place par des syndicats de criminalité sur les espèces sauvages qui font la liaison entre l'offre et une demande quasi-illimitée. Bien que toute solution long terme devra comprendre la sensibilisation du public pour mettre fin à la demande, les analyses de traçage ADN offrent l'un des premiers outils fiables permettant de concentrer la lutte contre la fraude sur les pays source pour aider à empêcher ce commerce au niveau de l'offre où la nécessité de contrôle est la plus urgente.

MÉTHODES:

Obtenir l'ADN

Nous avons recouru à nos collègues et aux administrations gouvernementales pour nous aider à collecter des échantillons d'excrément d'éléphants à travers le continent africain. En utilisant l'ADN extrait des cellules muqueuses intestinales de l'éléphant, présentes par millions dans chaque gramme d'excrément, nous avons compilé une carte géographiquement spécifique des fréquences alléliques d'éléphants pour 16 loci de séquences microsatellites d'ADN (ou ADN microsatellite) séparées à travers l'Afrique (Wasser et al 2004, 2007). Les allèles se réfèrent typiquement à des formes alternatives d'un gène, qui constituent une séquence fonctionnelle d'ADN à un endroit spécifique (locus) sur un chromosome donné. L'ADN microsatellite est, d'après nos connaissances, non-fonctionnel (c'est-à-dire qu'il n'y a pas de transcription de l'ADN pour les protéines) et se trouve tout le long du génome de l'organisme. Ses allèles sont constituées de séquences répétitives de brins de nucléotides (chaque répétition est typiquement longue de 2-4 paires) ayant un taux de mutation élevé. La plupart de cette variation des allèles résultant est retenue parce que les mutants ne semblent pas affecter la survie de l'organisme. Plus les mutations s'accumulent dans des populations séparées dans l'espace et dans le temps, plus ces populations deviennent distinctes entre elles sur le plan génétique. Cela rend l'ADN microsatellite très variable idéal pour différencier des populations disparates surtout quand cette information est combinée le long de 16 loci différents.

L'ADN se trouve également dans les défenses d'éléphants. Il est présent partout sur la défense mais il est particulièrement concentré sur les couches qui se trouvent juste en dessous de la surface. Mon laboratoire a été le premier à extraire l'ADN de l'ivoire en utilisant une technique de pulvérisation utilisée dans les méthodes d'analyse médico-légales des dents. On place un morceau d'ADN de la taille de la phalange du bout du petit doigt de quelqu'un dans une éprouvette en polycarbonate avec un aimant. Des bouchons en acier inoxydable sont placés à chaque extrémité de l'éprouvette qui est alors mise dans du nitrogène liquide et enfermée hermétiquement dans une machine appelée un « *freezer mill*. » Le nitrogène liquide congèle l'ivoire à une température extrême de -240°C et le « *freezer mill* » exerce un champ magnétique sur l'éprouvette en va et vient, ce qui fait que l'aimant projette l'ivoire contre les bouchons en acier ce qui le pulvérise en une poudre fine. La température en dessous de zéro $^{\circ}\text{C}$ conserve l'intégrité de l'ADN lors de ce processus et peut ensuite être facilement extrait de la poudre d'ivoire. L'étape suivante consiste à comparer les allèles des échantillons d'ivoire aux allèles de la carte de fréquence des allèles basée sur les excréments à travers les 16 loci différentes ce qui donne l'information nécessaire pour attribuer une origine géographique à l'ivoire. Nous avons utilisé des statistiques sophistiquées pour procéder à cette identification de la localisation.

Utiliser l'ADN pour localiser l'origine des échantillons

La méthode statistique utilise la technique appelée *Smoothed Continuous Assignment Technique* (Wasser et al. 2004, 2007) qui a été développée par mon collègue Matthew Stephens de l'université de Chicago et qui s'applique dans le logiciel SCAT (<http://stephenslab.uchicago.edu/software.html>) Se basant sur le fait que les populations proches l'une de l'autre ont tendance à être génétiquement plus similaires que les populations plus éloignées entre elles, le logiciel SCAT utilise une technique d'harmonisation pour générer des fréquences d'allèles continues à travers la totalité de l'aire de répartition de l'éléphant (y compris les zones impliquées ne bénéficiant pas d'échantillons de référence) à partir des fréquences d'allèles de

référence que nous avons acquis sur la base des échantillons d'excréments recueillis à travers l'Afrique. Nous procédons ainsi séparément pour les éléphants de forêt et pour les éléphants de savane du fait des différences génétiques importantes entre ces deux espèces récemment reconnues. Cela nous permet de déterminer l'aire des localisations possibles pour chaque échantillon d'ivoire en comparant ses allèles observées avec la carte géographique des fréquences d'allèles continues de l'habitat respectif de cet échantillon (que l'on déterminera comme étant la forêt ou la savane à partir de son ADN avant de commencer l'analyse plus globale). Le caractère innovateur de cette approche est le fait qu'elle nous permet pour la première fois d'attribuer une localisation à une défense partout en Afrique. Les techniques autrefois utilisées pour déterminer la localisation se limitaient seulement aux zones où les échantillons avaient été prélevés.

Commerce licite: potentielle utilisation du prélèvement d'échantillons ADN

Comme le prélèvement de l'ADN, ou l'identification d'un génotype, permettent d'obtenir une empreinte unique de la défense, cela peut constituer un outil très fiable pour la surveillance du commerce licite. Pour y parvenir, les pays devront simplement prélever des échantillons sur les défenses de leurs tas d'ivoire en coupant un petit morceau d'ivoire (environ 16 cm²) à la base de chaque défense (voir Annexe). Ces échantillons pourront alors être analysés pour en obtenir le génotype et une liste de références ADN pourra être créée, ou ceux-ci pourront être analysés ultérieurement pour déterminer leur génotype si la nécessité se présente. (Mettre les défenses de côté pour déterminer leur génotype dans le futur serait moins onéreux. Cependant, il serait important que celles-ci soient emmagasinées dans un endroit commun qui ne serait pas compromis et qu'il est facile d'accéder quand nécessaire. Le retardement de l'identification du génotype viendrait également ajouter un temps considérable au processus de vérification d'un échantillon d'ivoire quand cette vérification est nécessaire. Si l'identification des génotypes des tas d'ivoire était déjà réalisée, il serait relativement simple et facile de déterminer le génotype de l'ivoire au moment de la vente et de vérifier les génotypes obtenus en les comparant à la liste de références ADN.)

L'identification du génotype des défenses en stocks pourrait être utilisée pour:

1. Vérifier que l'ivoire vendu légalement fait bien partie de l'ivoire en stock initial (et pas d'ivoire introduit de façon illicite pour remplacer l'ivoire précédemment stocké qui avait été vendu illégalement). Cette méthode pourrait également être utilisée pour déterminer la source de l'ivoire en stock vendu illégalement. Ces conclusions exigeraient d'obtenir que tout échantillon d'ivoire donné soit reconnu comme ayant un génotype identifié qui soit parfaitement identique au génotype du moindre échantillon figurant déjà dans la base de données de référence (*1 :1 genotype match*).
2. Le traçage des chaînes de contrôle dans les transactions légales.
3. Déterminer l'origine de l'ivoire en stock pour voir si tout l'ivoire provient bien du pays hôte et, si ce n'est pas le cas, pour déterminer l'origine de l'ivoire qui ne provient pas du pays hôte. (Cette analyse serait analogue à l'analyse réalisée dans notre laboratoire pour déterminer l'origine d'une saisie. Elle serait cependant teintée d'une marge d'erreur pour les populations sources qui ont historiquement expérimenté un grand degré d'immigration et d'émigration.)

Références

- Wasser, S.K., W.J. Clark, O. Drori, E.S. Kisamo, C. Mailand, B. Mutayoba, et M. Stephens. 2008. Combating the illegal African elephants ivory trade using DNA forensics. [Combattre le commerce illicite de l'ivoire d'éléphant d'Afrique en utilisant des méthodes d'investigation ADN] *Conservation Biology*, in press.
- Wasser S.K., C. Mailand, R. Booth, B. Mutayoba, E. Kisamo, B. Clark and M. Stephens. 2007. Using ivory to track the origin of the largest ivory seizure since the 1989 trade ban. [Utiliser l'ivoire pour déterminer l'origine de la plus grande saisie d'ivoire depuis l'interdiction du commerce de l'ivoire de 1989] *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **104**: 4228-4233.
- Wasser S.K., A.M. Shedlock, K. Comstock, E.A. Ostrander, B. Mutayoba et M. Stephens. 2004. Assigning elephant DNA to geographic region of origin: Applications to the ivory trade [Attribuer l'ADN

des éléphants à la région géographique d'origine: applications au commerce de l'ivoire]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States **101**: 14847-14852.

Annexe

Protocole de Prélèvement d'Échantillons

1. Toute personne manipulant les défenses devrait porter des gants en caoutchouc ou en latex à tout moment et s'assurer que toutes les précautions nécessaires sont prises durant l'ensemble de la procédure.
2. Mettez si possible toutes les défenses qui ont été acquises ensembles (par exemple lors du même braconnage, de la même saisie ou de toute autre activité) dans un seul groupe. Faites un inventaire de tout l'ivoire et mettez des marques d'identification permanentes sur chaque pièce – ces marques devraient correspondre à tous les échantillons prélevés. Étiquetez chaque pièce consécutivement par groupe et par nombre dans le groupe. Par conséquent, le deuxième échantillon du groupe 1 devrait être étiqueté : 1-2. Le quatrième échantillon du groupe 8 devrait être étiqueté 8-4.
- 3 Essayez d'assortir chaque défense à l'autre défense de la même paire (en utilisant la forme, la taille et la couleur des défenses)
4. Sélectionnez seulement une défense par paire (bien que certaines défenses ne fassent pas forcément partie d'une paire) et sciez un morceau de dimensions environ égales à 4 cm par 4 cm à partir de la base de chaque défense (à l'endroit où la défense est connectée au crâne), en utilisant si possible une lame de scie à dents très fines. Mettez s'il vous plaît des gants de caoutchouc et changez-les pour chaque échantillon. Si vous souhaitez utiliser la même lame de scie pour plusieurs échantillons, essuyez s'il vous plaît la lame jusqu'à ce qu'elle soit propre entre chaque échantillon en utilisant une solution javellisée à 10% (une mesure d'eau de javel pour 9 mesures d'eau). Si la défense est aussi peu épaisse que du papier à l'extrémité, commencez s'il vous plaît à couper la défense un peu plus haut où l'ivoire fait au moins 2 à 3 mm d'épaisseur à l'endroit le moins épais. Si vous n'avez pas de scie, vous pouvez essayer de détacher un morceau d'ivoire avec un marteau, une pince ou un autre outil. Cependant, n'oubliez pas de nettoyer l'outil entre chaque défense.
5. Placez s'il vous plaît l'échantillon de 4 cm par 4 cm dans son propre sac en plastique en utilisant un sac qui se ferme hermétiquement (sac plastique Ziploc). En utilisant un stylo résistant à l'eau, écrivez clairement le numéro d'identification permanent à l'extérieur du sac – celui que vous avez inscrit sur la surface extérieure de la défense avant de commencer la procédure. Assurez-vous de préparer une liste finale des échantillons envoyés et incluez une COPIE de cette liste dans le paquet expédié.

Schémas: de Wasser et al 2008.
Schéma 1

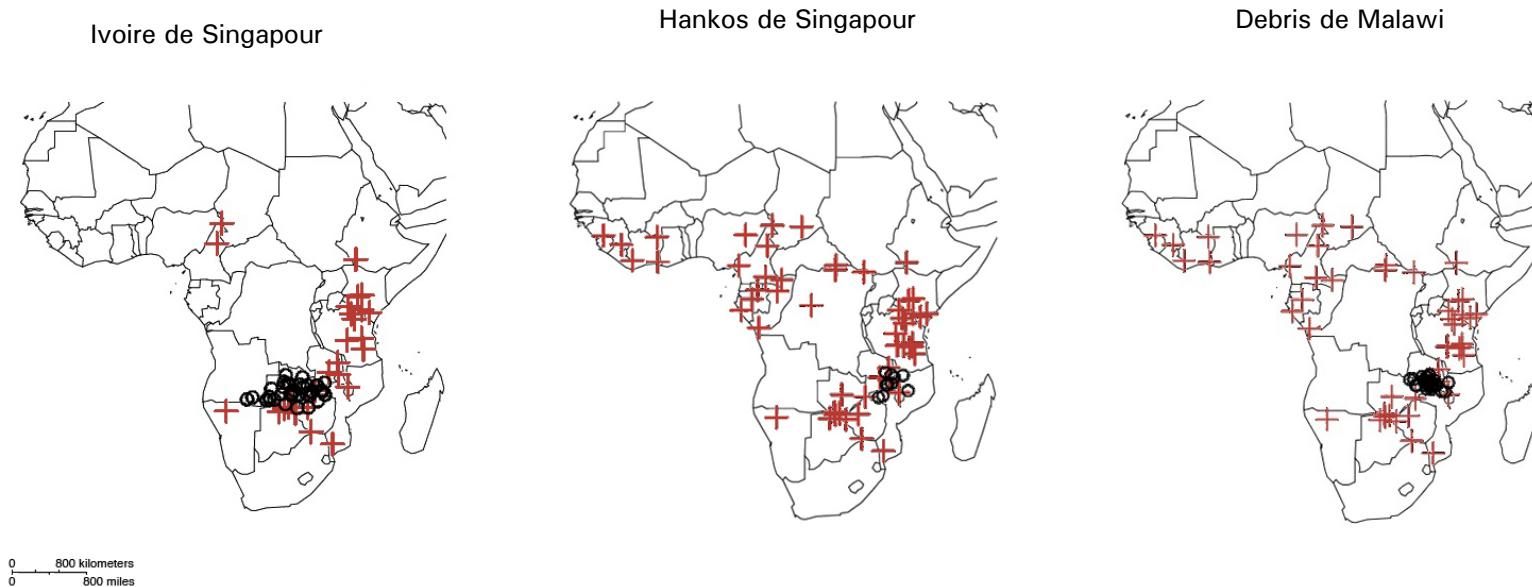


Schéma 1. Résultats de la Localisation de l'Origine de: (a) 37 défenses, (b) 12 hankos, et (c) 40 cartouches d'hankos issus des saisies intervenues à Singapour et au Malawi. Les cercles représentent les origines estimées des échantillons individuels. Les croix indiquent la localisation des échantillons de référence utilisés pour procéder à la détermination des points d'origine. Les croix du Schéma 1a montrent seulement les localisations de référence dans la savane utilisées pour désigner l'origine de ces défenses. (Wasser et al 2007.) Les schémas restants montrent toutes les localisations de référence de forêt et de savane utilisées pour déterminer l'origine des éléphants de savane et de forêt respectivement (voir Méthodes). Les preuves génétiques et issues des investigations judiciaires suggèrent fortement que les défenses, les hankos et les cartouches de hankos ont tous des origines similaires. Ces résultats soutiennent également l'hypothèse disant que les hankos ont été sculptés à partir de défenses de petite à moyenne taille (vraisemblablement obtenues à partir d'éléphants jeunes au sein de la population braconnée) qui auraient autrement valu un prix peu élevé sur le marché international de l'ivoire.

Schéma 2

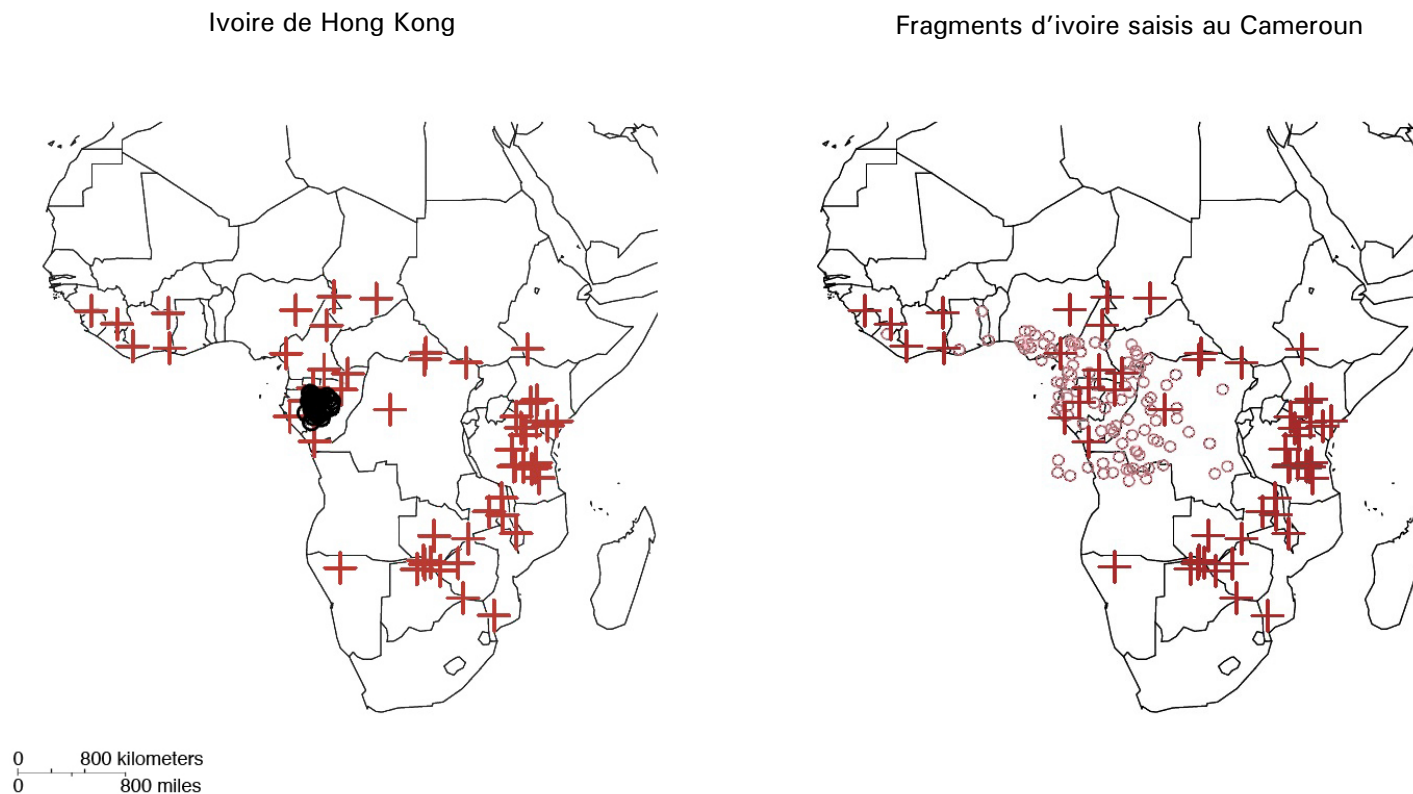


Schéma 2. Résultats de la Localisation de l'Origine de: (a) 40 défenses provenant de la saisie à Hong Kong, et (b) les fragments d'ivoire restant d'une seule défense saisie dans un container analogue à son retour au Cameroun à partir de Hong Kong. Chaque cercle du schéma 2A représente l'origine estimée d'une défense individuelle. Par contraste, chaque cercle dans le Schéma 2B représente l'un des 100 choix possibles de la série de toutes les destinations possibles, choisi au hasard pour seulement un seul échantillon – le fragment d'ivoire unique, évalués en fonction de leurs probabilités en utilisant un a priori uniforme (Wasser et al. 2004). L'étendue de ces 100 choix au hasard révèle le caractère fiable de la localisation pour ce seul échantillon de fragment d'ivoire. Les croix sont décrites dans le Schéma 1.