

Historique des analyses génétiques réalisées sur les loups

De la recherche à l'application de la recherche

Dès les premières années suivant le retour de l'espèce en France, le suivi par collecte d'indices de présence a été mis en place, notamment avec le pistage hivernal. A l'origine, les excréments étaient récoltés surtout dans l'objectif de déterminer le régime alimentaire. Le recours à l'utilisation de technique d'analyse de l'ADN visait en premier lieu, à identifier la présence de l'espèce dans de nouveaux secteurs, par le biais des excréments, ou autres échantillons biologiques, plus faciles à trouver que l'animal lui-même. Des séquences d'ADN étant déjà déposées par les généticiens dans des banques de données mondiales, par espèce et sous-espèces, l'ADN mitochondrial caractéristique de la sous-espèce italienne était déjà connu. Par contre, dans les années 1990, le travail à partir d'une source d'ADN extraite des excréments, poils, ou urines... était dans une phase de mise au point. Dès 1994, le LECA (Laboratoire d'Ecologie Alpine - CNRS Grenoble) a initié plusieurs recherches sur cette thématique, dont les avantages pour application aux espèces élusives telles que l'ours ou le loup étaient évidents, une source de données plus abondante, pas de nécessité de capturer physiquement les animaux, etc... En revanche, la qualité dégradée et la quantité très faible de matière première (l'ADN) dans les excréments ou les poils, étaient des conditions très limitantes à la réalisation de l'exercice (voir Faune sauvage n° 263 pour plus de détail).

En 1997, les premiers tests ont été réalisés sur l'espèce loup, grâce à des excréments ramassés essentiellement dans les Alpes du sud. Par la suite, une thèse de doctorat a permis d'investir le champ des typages individuels des animaux, toujours à partir des excréments ou poils qu'ils laissaient sur le terrain (Cf Valière, 2002). 42 portions d'ADN (dit *marqueurs microsatellites*) ont été testées pour définir quelle combinaison de marqueurs était la plus à même de bien discerner deux animaux différents, tout en tenant compte de la faible quantité et qualité de la matière première issue des excréments.

Après plusieurs phases de mise au point, d'échanges entre équipes françaises et italiennes, 6 marqueurs microsatellites, couplés avec un marqueur sexuel, ont été finalement retenus, donnant une probabilité de confondre 2 individus < à 1/1000 s'ils sont non apparentés et <1/200 s'ils sont frère ou soeur. Diverses sources d'erreur peuvent résulter de la nature même de l'ADN (faible quantité et qualité). C'est pourquoi la réplication de chaque analyse (8 fois) a également été optimisée pour assurer la qualité du résultat (Cf Taberlet *et al*, 1999).

Après plusieurs étapes de calibrage des séquenceurs, un jeu de données complet couvrant la période de 1994 à 2001 a permis la réalisation des premiers essais de modélisation par capture-marquage-recapture (CMR, Cf Réseau loup, 2003 - QDN N°10) donnant ainsi les estimations de la taille réelle de la population de loup dans les Alpes françaises. Les articles des QDN n° 11 et 13 (Cf Réseau loup 2004, 2005) montrent aussi la répartition en meute de la population dans l'arc alpin français et documentent également plusieurs mouvements de dispersion qui illustrent la colonisation du territoire par le loup.

En juin 2004, l'acquisition d'un nouveau séquenceur (plus performant) par le LECA, ainsi que la fin du programme LIFE, a induit une révision du plan de fonctionnement aussi bien logistique que technique. Ainsi, afin de bénéficier de la nouvelle technologie de ce séquenceur, l'intégralité de l'ancien jeu de données a fait l'objet d'une nouvelle lecture pour standardiser les anciens résultats avec les nouveaux. Cette étape fastidieuse où un peu plus de 8000 profils génétiques ont été relus et affectés d'un indice qualité, s'est achevée en début d'année 2007. Ce sont aujourd'hui ces résultats qui vous sont présentés par massifs.

Le jeu de données

Depuis 1994, un nombre croissant d'analyses est réalisé, pour atteindre environ 400-450 par an aujourd'hui (nombre plafonné pour des raisons logistiques et budgétaires). Au total, ce sont un peu plus de 2700 échantillons qui ont fait l'objet d'une analyse ADN. 96 % d'entre elles sont réalisées sur des excréments (2 % sur des tissus ou cadavres, 1 % sur des poils et moins de 1% sur des urines ou du sang). En moyenne, 11 % des échantillons ne sont pas exploitables dès la première étape d'identification de l'espèce pour cause d'ADN trop dégradé ou en trop faible quantité pour la réalisation des amplifications par la méthode PCR (conf. article C. Miquel). Une fois enlevé les renards, chiens ou autres espèces, les excréments identifiés « *Canis lupus* » (70 %) font l'objet d'un typage individuel à partir de l'ADN du noyau des cellules. Lors de cette étape, on observe encore une autre forme de « perte en ligne » d'informations, tous les échantillons ne permettant pas d'aboutir à la détermination d'un génotype (i.e. carte d'identité génétique) interprétable (cf. article dans ce numéro).

En 2007, nous dénombrons ainsi au minimum 207 loups différents qui ont été détectés à un moment ou à un autre sur le territoire français au cours de ces 15 dernières années.

C. Duchamp, Y. Leonard, E. Marboutin, P. Moris

Tableau 1 : nombre d'analyses génétiques réalisées sur les excréments, urines, sang, poils ou tissus selon leur année de récolte.

NB/ Une année et demi de décalage est au minimum nécessaire pour assurer la logistique de ramassage sur toute la France, le conditionnement des prélèvements, la réalisation des analyses, la confrontation des résultats et enfin l'interprétation biologique.

Total	1992	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
N _{total} analyses Sp	1	2	44	92	164	247	263	451	426	504	441	265	330	204	13
N _{A+} « <i>C. lupus</i> »	1	2	13	45	90	158	104	71	106	284	240	151	175	109	4
N _{G+} typages individuels	0	0	7	22	54	113	85	58	94	226	189	101	136	93	4
N _{I+} Génotypes	0	0	4	11	20	29	30	24	37	68	65	45	56	39	3