

L'analyse génétique au Laboratoire d'Ecologie Alpine

Le Laboratoire d'Ecologie Alpine ou LECA (UMR CNRS 5553, www-leca.ujf-grenoble.fr) situé à Grenoble, regroupe une soixantaine de chercheurs et personnels de recherche. Parmi ceux-ci, un Ingénieur d'Etudes et une Assistante Ingénieure sont chargés de réaliser les expertises génétiques du Réseau Loup tout au long de l'année. Seule la fermeture administrative du mois d'août interrompt cette activité faite d'expertises ordinaires (97% des échantillons) ou d'expertises d'urgence (3% des échantillons). Une session d'expertises ordinaires correspond à l'analyse conjointe d'un lot d'une centaine d'échantillons dans un délai de réalisation de 60 jours. Le délai d'exécution des expertises en urgence est, pour sa part, réduit à 15 jours. Une condition qui justifie le fait que le nombre d'échantillons expertisés selon cette procédure ne puisse excéder la quinzaine. L'ONCFS est souverain dans le choix des échantillons analysés et les délais d'expertise choisis pour chacun d'eux.

Dans tous les cas, les objectifs à atteindre sont identiques et clairement identifiés, à savoir :

- 1- déterminer l'espèce à l'origine de l'échantillon,
- 2- caractériser l'individu à l'origine de l'indice (sexe et profil génétique) dès lors qu'il s'agit d'un indice de loup.

Pour répondre à ces objectifs, le LECA adopte une stratégie centrée sur l'extraction et l'exploitation de l'information génétique contenue dans les indices collectés. Cette information est concentrée dans chacune des cellules provenant de l'animal à l'origine de l'indice, sous la forme de molécules d'ADN (acide désoxyribonucléique). Tout le savoir-faire de l'expertise repose sur la capacité à sélectionner et décrypter des zones uniques et indépendantes de l'ADN qui puissent, à la fois, confirmer par leur similitude l'appartenance d'un individu à une espèce, et caractériser par leur variabilité au sein de l'espèce l'individu comme étant unique. Pour répondre à cette double exigence et en fonction de ses besoins, le généticien va cibler deux des composantes de l'ADN présent dans la cellule, à savoir l'ADN mitochondrial (contenu dans les mitochondries) ou l'ADN nucléaire (contenu dans le noyau de la cellule). Dans notre cas, la détermination de l'espèce est réalisée par lecture et comparaison d'une région de l'ADN mitochondrial alors que différentes zones de l'ADN nucléaire sont mises à profit pour dresser l'empreinte génétique de chaque individu (sexe et génotype).

Tout commence par l'extraction de l'ADN contenu dans l'échantillon. Le mode d'extraction est différent et adapté à chaque type d'échantillon analysé (tissu musculaire, os, sang, poil, urine, crotte). Les indices de présence transmis à l'analyse sont à 98% des crottes. Lors de l'extraction ADN de fèces de loup, l'objectif est de collecter l'ADN issu des cellules épithéliales de l'intestin entraînées lors du tractus intestinal de l'animal qui a déféqué. Dans la pratique le processus d'extraction est beaucoup plus absolu, les ADN des bactéries de la flore intestinale, des proies ingérées, des bactéries et champignons du sol, éventuellement des collecteurs et des manipulateurs successifs sont extraits simultanément. Toutes ces molécules d'ADN « parasites » peuvent rentrer en compétition avec les molécules d'intérêt lors des étapes d'analyse ultérieures, d'autant plus que les molécules

d'ADN de loup extraites sont en faible quantité.

L'autre caractéristique de l'ADN extrait des crottes est relative à sa qualité qui peut être très variable. Cette variabilité est la résultante de l'action conjuguée de divers paramètres environnementaux (UV, lessivage, dégradation par les bactéries et les champignons du sol, etc.) et expérimentaux (délai avant collecte, conditions et délais de conservation, manipulations successives, etc.) qui peuvent précipiter la dégradation de l'ADN par fragmentation. Cette dégradation peut hypothéquer l'ensemble des efforts successifs investis pour parvenir à exploiter l'information génétique.

Pour limiter ces effets néfastes, il convient de maintenir l'effort qui porte sur la qualité de l'échantillonnage et sur les bonnes pratiques d'échantillonnage. La perte de qualité est toujours irrémédiable.

De son côté, le LECA a élaboré et mis en application un protocole adapté à l'analyse d'ADN en conditions limites (faible quantité et qualité aléatoire) afin d'obtenir des résultats fiables à partir de l'ADN recueilli.

Le principe de base, qui fait suite à l'extraction, consiste à réaliser une photocopie massive (plusieurs millions de copies) de certaines zones précises de l'ADN afin de pouvoir les lire et les comparer d'une espèce à une autre ou d'un individu à un autre. On parle alors d'amplification par la technique PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) et de séquençage à l'aide d'un séquenceur automatique à lecture laser.

Dans le cadre de l'analyse de l'ADN issu des crottes de loup, nous avons sélectionné une seule zone de l'ADN mitochondrial afin de savoir si nous avons affaire effectivement à une crotte de loup ou à celle d'une autre espèce (chien, renard, blaireau, etc.). Cette région a été sélectionnée pour une particularité rencontrée uniquement dans la population de loups ayant pour origine le secteur des Apennins en Italie. Nous avons ainsi la possibilité de discriminer les loups des autres espèces et parmi les loups potentiels ceux issus de la lignée italienne.

Dans un deuxième temps et sur les échantillons confirmés par l'ADN mitochondrial comme étant issu d'un loup, nous avons sélectionné 7 zones d'ADN nucléaire en raison de leur variabilité observée au sein de la population de loup (polymorphisme). La combinaison de ces sept zones permet de différencier les individus entre eux (sexe et génotype) avec une chance sur mille de confondre deux individus extrêmement proches comme deux frères ou deux sœurs issus d'une même fratrie. En raison de l'effectif actuel de la population de loups en France, ce risque de confusion est particulièrement infime.

L'adaptation du protocole d'amplification aux conditions limites imposées par l'ADN provenant de crottes, consiste à sélectionner l'amplification de zones de l'ADN nucléaire très courtes qui sont moins affectées par la fragmentation résultant de la dégradation de l'ADN. Le choix de zones polymorphes très courtes permet ainsi de contourner pour partie certains effets de la dégradation.

De son côté, le LECA a élaboré et mis en application un protocole adapté à l'analyse d'ADN en conditions limites (faible quantité et qualité aléatoire) afin d'obtenir des résultats fiables à partir de l'ADN recueilli.

Le principe de base, qui fait suite à l'extraction, consiste à réaliser une photocopie massive (plusieurs millions de copies) de certaines zones précises de l'ADN afin de pouvoir les lire et les comparer d'une espèce à une autre ou d'un individu à un autre. On parle alors d'amplification par la technique PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) et de séquençage à l'aide d'un séquenceur automatique à lecture laser.

Dans le cadre de l'analyse de l'ADN issu des crottes de loup, nous avons sélectionné une seule zone de l'ADN mitochondrial afin de savoir si nous avons affaire effectivement à une crotte de loup ou à celle d'une autre espèce (chien, renard, blaireau, etc.). Cette région a été sélectionnée pour une particularité rencontrée uniquement dans la population de loups ayant pour origine le secteur des Apennins en Italie. Nous avons ainsi la possibilité de discriminer les loups des autres espèces et parmi les loups potentiels ceux issus de la lignée italienne.

Dans un deuxième temps et sur les échantillons confirmés par l'ADN mitochondrial comme étant issu d'un loup, nous avons sélectionné 7 zones d'ADN nucléaire en raison de leur variabilité observée au sein de la population de loup (polymorphisme). La combinaison de ces sept zones permet de différencier les individus entre eux (sexe et génotype) avec une chance sur mille de confondre deux individus extrêmement proches comme deux frères ou deux sœurs issus d'une même fratrie. En raison de l'effectif actuel de la population de loups en France, ce risque de confusion est particulièrement infime.

L'adaptation du protocole d'amplification aux conditions limites imposées par l'ADN provenant de crottes, consiste à sélectionner l'amplification de zones de l'ADN nu-

cléaire très courtes qui sont moins affectées par la fragmentation résultant de la dégradation de l'ADN. Le choix de zones polymorphes très courtes permet ainsi de contourner pour partie certains effets de la dégradation.

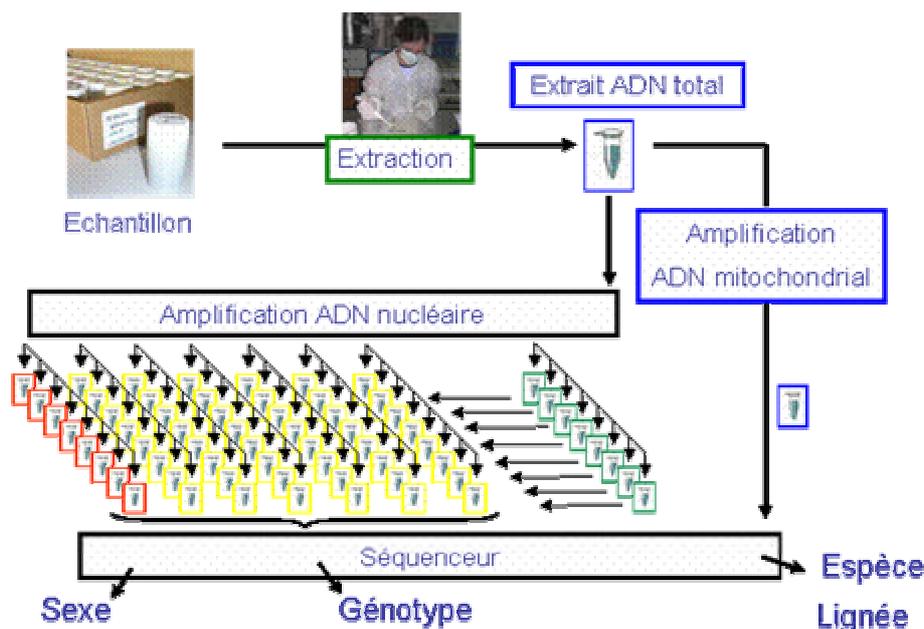
Amplifier massivement des zones courtes ne suffit pas, encore faut-il s'assurer de la qualité des copies obtenues. Pour assurer la fiabilité des résultats attendus, pour chaque échantillon, chacune des zones est amplifiée huit fois indépendamment. En terme technique, cette approche s'appelle l'approche multi-tubes. Cette méthode permet de tester la robustesse et la reproductibilité des réponses analysées, de traquer les fausses informations (faux allèle) ou l'information aléatoire (perte d'allèle). L'approche multi-tubes nécessite évidemment huit fois plus de temps et de moyens.

Associé à cette technique d'amplification multiple, le LECA a développé un indice qualité (QI) qui intègre pour chaque échantillon la valeur intrinsèque de l'information transmise, avec une valeur comprise entre 0 et 1. Cet indice permet à ce jour de classer les échantillons par ordre de fiabilité. Ainsi pour un même génotype détecté plusieurs fois, c'est-à-dire des échantillons qui proviennent d'un même loup, il est possible d'affirmer avec une certitude plus ou moins forte la présence de cet animal dans des lieux et des périodes différentes.

Cet indice de qualité qui fait la synthèse de l'état de fraîcheur de l'ADN, pourrait permettre de détecter au travers de l'analyse des traits de vie de chaque échantillon, s'il existe ou pas des caractéristiques environnementales plus favorables à la conservation et à l'expression de l'information génétique. Le cas échéant, cet indice pourrait favoriser certaines pistes qui permettraient au réseau loup de collecter préférentiellement des indices de présence à plus forte valeur ajoutée du point de vue de l'expertise génétique.

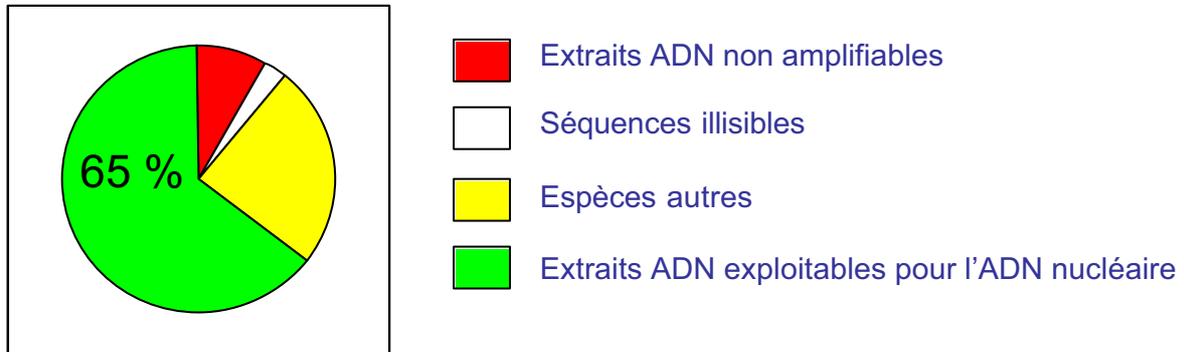
Christian Miquel—L E C A

Chaîne de traitement d'un échantillon



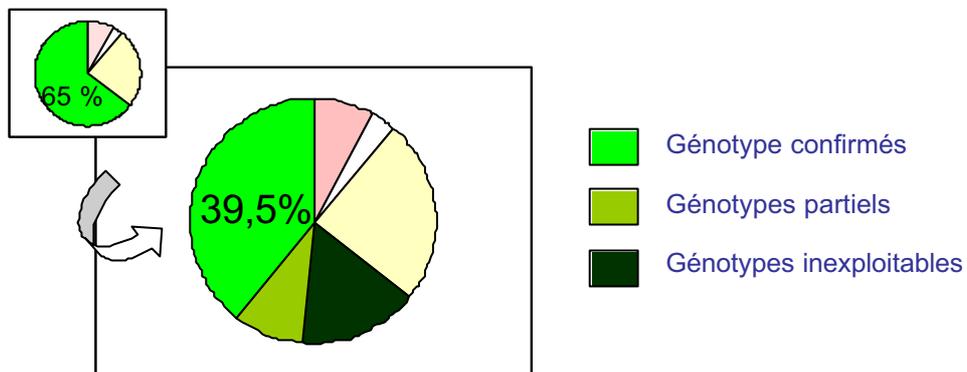
Résumé des différentes étapes nécessaires à l'analyse d'un échantillon. Plus de 2000 indices de présence « loup » ont été ainsi traités au LECA depuis 7 ans.

Résultats obtenus par amplification de l'ADN mitochondrial



Proportion des différentes fractions obtenues après amplification de l'ADN mitochondrial : Extraits non amplifiables **8 %**, Séquences illisibles **3%**, Autres espèces (chien, renard, etc.) **24%**, Extraits ADN exploitables pour l'ADN nucléaire (loup) **65%**. Pourcentages calculés sur 2000 indi-

Résultats obtenus par amplification de l'ADN nucléaire



Proportion des différentes fractions obtenues après amplification de l'ADN nucléaire sur échantillons certifiés de loup et valeurs de QI associées :
 Génotypes confirmés 39,5 % (0,75<QI?1)
 Génotypes partiels 9,5 % (0,55<QI?75)
 Génotypes inexploitable 16 % (0<QI?0,55)
 Pourcentages calculés sur 2000 indices de présence. QI : Indice Qualité

Appareillage pour le traitement des échantillons



Salle extraction ADN



Machines PCR



Robot de pipetage



Electrophorèse



Séquenceur automatique à 16 capillaires (ABI 3130xl)