

Novembre 2014

TAIS n°7

Bulletin des Mammalogistes  
de Midi-Pyrénées



Toulouse • 18, 19 et 20 octobre 2013

ACTES du  
36<sup>ème</sup>  
colloque  
francophone



S  
F  
M



*Climat, paysages, perceptions*  
**Les Mammifères sauvages face  
aux changements globaux**

## Étude génétique

# La Loutre en France et Navarre

**La loutre d'Europe (*Lutra lutra*), espèce emblématique, avait quasi disparu de France au milieu du XX<sup>e</sup> siècle à la suite de persécutions, d'une disparition des habitats, de la pollution des eaux et de la raréfaction des proies. Sa chasse fut ensuite interdite en France en 1972 et son statut de protection fut renforcé dès 1976.**

par L.-M. Pigneur, D. Marc, P. Fournier, C. Fournier-Chambrillon, J. Steinmetz, L. Rieu, G. Giralda-Carrera, F. Urrea, K. Van Doninck et J. Michaux

Des zones refuges où l'espèce se serait maintenue étaient suggérées dans le Massif Central et sur la façade atlantique (Rosoux et Bellefroid, 2006). Depuis la fin des années 1980 et le début des années 1990, la Loutre a peu à peu recolonisé différentes régions mais l'ampleur de ce retour et l'origine des populations restent relativement méconnues. L'étude de Mucci et al. (2010), basée sur un nombre limité d'échantillons (principalement issus de la façade atlantique), a suggéré une structuration génétique de la population en France. Par ailleurs, deux groupes génétiques distincts avaient été identifiés dans une étude centrée sur le Massif Central (Janssens et al., 2008). Néanmoins, la structuration globale en France et les

relations entre populations n'ont à ce jour pas été étudiées.

Comme première étape d'une étude à l'échelle de la France, notre objectif a été de mieux cerner les relations génétiques existant entre les populations de loutres du grand Sud Ouest, du massif pyrénéen et du centre de la France via l'utilisation de 14 marqueurs microsatellites hyper-variables. Nous avons cherché à déterminer s'il existait une homogénéité génétique ou bien une certaine structuration, en lien avec la présence de différentes populations refuges ayant survécu aux persécutions de l'espèce au cours du XX<sup>e</sup> siècle. Notre étude s'est également intéressée à l'état de « santé génétique » et aux flux génétiques entre les populations de loutres étudiées.

## Matériel et Méthodes

### - Échantillonnage

Cette étude a été basée sur du matériel collecté de manière non invasive; 43 échantillons d'épreintes fournis par le GMHL (Groupe Mammalogique et Hépetologique du Limousin) et 62 échantillons de tissus provenant de cadavres découverts fortuitement venant d'Aquitaine, Poitou-Charentes, Midi-Pyrénées, Languedoc-Roussillon et Basse-Normandie mais aussi de populations ibériques strictes (Navarre). Ces échantillons ont été fournis par le bureau d'étude GREGE (Groupe de Recherche et d'Étude pour la Gestion de l'Environnement), l'ONCFS, le CEN-MP (Conservatoire d'espaces naturels de Midi-Pyrénées), le Museum d'Histoire



Naturelle de Toulouse, la Fédération Aude Claire et le Gouvernement de Navarre.

Tous les échantillons ont été conservés dans de l'éthanol à 90°.

- *Extraction de l'ADN et amplification des marqueurs microsatellites*

L'ADN des échantillons d'épreintes a été extrait à l'aide du kit DNASTool (Qiagen) et celui des échantillons de tissus a été extrait via le kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen), selon les protocoles du fabricant.

Ensuite, 14 marqueurs microsatellites (Dallas et Piertney 1998 ; Dallas et al., 2002) ont été amplifiés. Les microsatellites sont des marqueurs génétiques très variables et hérités de façon biparentale, ce qui en fait de très bons marqueurs pour la génétique des populations et la biologie de la conservation.

Les 14 microsatellites amplifiés via 3 « mix multiplex » et

marqués par fluorochromes ont été génotypés au moyen d'un séquenceur automatique multicapillaire (ABI 3130XL, Applied Biosystem).

Dans le cas des épreintes, le matériel présentant parfois un ADN de mauvaise qualité, nous avons systématiquement répété les génotypages de trois à quatre fois pour chaque épreinte. Cette approche, appelée « méthode multitubes », permet en effet d'éviter au maximum le risque de fausse estimation d'excès d'homozygotes (et par là d'un faux signal de dépression de consanguinité), par présence d'allèles nuls.

- *Analyse des données*

La taille des allèles pour chaque microsatellite et par individu a été identifiée à l'aide du programme GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystem). Une fois les typages microsatellites ef-

fectués, la matrice de données obtenue a été analysée selon les dernières approches statistiques développées dans le domaine de la génétique des populations. Afin de détecter et éventuellement corriger la présence d'allèles nuls dans le jeu de données, la première matrice reprenant la taille des allèles des 14 microsatellites testés (2 allèles/individu) a tout d'abord été soumise au programme MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004). Concernant les ADN issus de fèces, l'identification individuelle des échantillons collectés a été effectuée grâce au logiciel GIMLET (Valière, 2002).

Ensuite, les données corrigées ont été analysées et des clusters ont été définis grâce au programme STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al., 2000). Une série de « runs » indépendants ont permis de tester, par une approche bayésienne, des nombres de clusters (K) pour des valeurs allant de 1 à 10 populations et en utilisant une période de « burn-in » de 100 000 itérations suivie d'une seconde analyse de 1 000 000 itérations (MCMC). L'analyse pour chaque K a été répétée 10 fois afin de vérifier la robustesse du résultat. Les résultats ont ensuite été corrigés selon la méthode d'Evanno (Evanno et al., 2005).

Une analyse en composantes principales (ACP) basée sur les



formes alléliques trouvées chez chaque individu (2 allèles/individu) a été réalisée via le logiciel R et le package ade-4 (Chessel et al., 2004). Nous nous sommes basés sur un tableau de données dont les lignes représentent les individus diploïdes, les colonnes les loci microsatellites et les valeurs la taille (en paire de base) des fragments contenant les deux allèles rencontrés chez l'individu. Nous avons pondéré les lignes et les colonnes via la fonction « fuzzygenet ». Cette méthode permet entre autres de « cen-

trer » les individus non typés à un locus.

Enfin, nous avons utilisé différentes F-statistiques via le programme GENEPOP (Rousset, 2008) afin de déterminer notamment l'indice de fixation  $F_{st}$  et le coefficient de consanguinité,  $F_{is}$ .

### Résultats

Seuls 20 échantillons d'épreintes ont pu être exploités et ont permis d'extraire une quantité d'ADN de bonne qualité, suffisante pour effectuer nos analyses génétiques. Les autres

épreintes n'ont permis aucune amplification ou ont donné trop d'incertitudes dans les résultats de génotypage. Pour ce qui est des tissus, 59 des 62 échantillons ont donné des résultats de très bonne qualité pour l'analyse.

Les résultats préliminaires de l'analyse de clustering STRUCTURE révèlent 4 groupes génétiques bien distincts au sein de l'échantillonnage analysé. Les valeurs de vraisemblance obtenues par cette analyse sont en effet maximales pour l'hypothèse de 4 clusters.

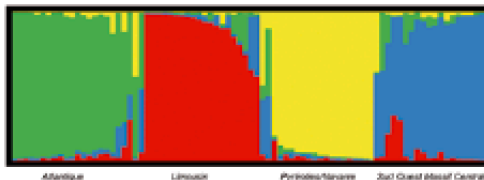


Fig. 1: Représentation des résultats de l'analyse bayésienne de clustering STRUCTURE pour un nombre de clusters  $K = 4$  ; probabilité d'assignation des individus aux 4 clusters. Chaque bâtonnet du graphique représente les valeurs pour un individu.

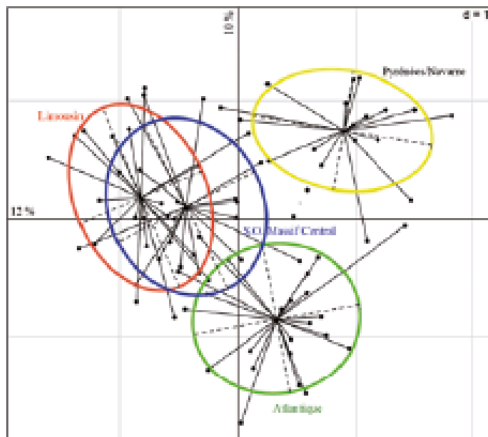


Fig. 3: Représentation des résultats de l'ACP basée sur les fréquences alléliques. Chaque individu est représenté par un point. Les ellipses de couleurs regroupent les individus appartenant à un même cluster génétique parmi les 4 définis par l'analyse Structure.

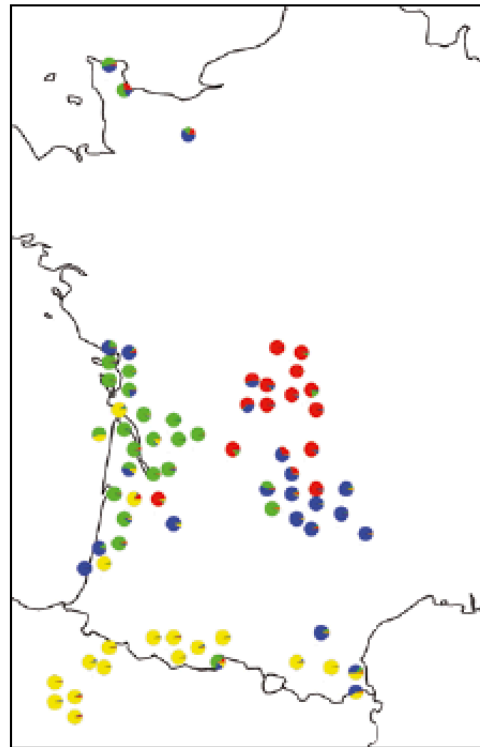


Fig. 2: Représentation géographique des quatre grands groupes génétiques mis en évidence avec le programme STRUCTURE. Les diagrammes présentent l'assignation des individus à chacun des 4 clusters définis par le programme Structure.

L'assignation des différents échantillons étudiés au sein de ces quatre groupes génétiques est représentée à la Fig. 1. Cette analyse montre une structuration géographique importante de ces groupes génétiques avec un cluster dit Ibérique (Pyrénées + Navarre) (en jaune), un cluster « Atlantique » (en bleu) empiétant sur le Massif-central, un cluster centré sur le Limousin (en rouge) et un dernier groupe centré sur le Sud-Ouest du Massif-central (en vert). Lorsque ces informations sont replacées sur une carte géographique, cette structuration géographique apparaît encore plus clairement, (Fig. 2).

Les résultats de l'ACP, basée sur les données microsatellites, sont présentés à la figure 3. Les 2 premiers axes totalisent 22 % de la variance, ce qui est une valeur relativement faible mais habituelle pour des données génétiques. Sur le nuage de points représentant les individus dans le plan défini par les 2 premières composantes principales, nous avons identifié

les 4 clusters génétiques obtenus avec STRUCTURE. Cette figure montre également que les 4 groupes semblent différenciés avec néanmoins une plus grande proximité entre les populations du Limousin et du Massif Central. La répartition des individus dans ces groupes homogènes bien marqués suggère des voies de colonisation inter-bassins versants, qu'il conviendra de vérifier.

Les valeurs de  $F_{st}$  indiquent des flux de gènes entre les 4 clusters mais la population dite ibérique semble la plus isolée bien qu'il semble exister des contacts avec les autres populations. Les résultats indiquent aussi l'existence d'un mixage progressif s'installant entre les populations. En effet, les indices de fixation (Tab. 1) pris entre les groupes 2 à 2 indiquent des échanges génétiques, les plus marqués étant entre le groupe du Limousin et celui du Sud Ouest du Massif Central (valeur la plus faible pour l'indice de fixation). Les échanges de

plus faible intensité sont ceux qui concernent le groupe de Pyrénées/Navarre, en particulier avec celui du Limousin. De plus, l'indice de fixation est le plus important pour la population des Pyrénées et de Navarre, indiquant un plus grand isolement de celle-ci (Tab. 2).

### Discussion

Notre étude génétique des populations de loutres a concerné principalement le grand Sud Ouest, le massif pyrénéen et le centre de la France. Bien qu'étant préliminaire, l'analyse des données tend à montrer l'existence de 4 clusters génétiques distincts dans l'échantillonnage étudié. Néanmoins, des flux génétiques semblent exister entre ces clusters avec, toutefois, la population dite ibérique (Pyrénées et Navarre) qui semble être la plus isolée des autres. L'analyse de clustering a également montré que certains individus du groupe génétique d'une région donnée se retrouvaient dans d'autres régions. Ce résultat suggère des mouvements

	Limousin	Atlantique	SO Massif Central
Limousin	-	-	-
Atlantique	0.1343	-	-
SO Massif Central	0.0848	0.1075	-
Pyrénées / Navarre	0.1919	0.1503	0.1433

Tab. 1 : Estimation des flux génétiques via l'indice de fixation  $F_{st}$  pour les 4 clusters génétiques pris 2 à 2. Plus la valeur est proche de 0, plus le flux génétique est intense.

Limousin	0.15418
Atlantique	0.18489
SO Massif Central	0.08028
Pyrénées / Navarre	0.22451

Tab. 2 : Valeur du coefficient de consanguinité  $F_{is}$  pour chacun des clusters génétiques.

de loutres à longue distance et des contacts de plus en plus marqués entre les différentes populations du Sud Ouest de la France notamment, et pourrait être lié à un phénomène de recolonisation des rivières françaises à partir de différentes régions refuges.

Nos analyses montrent l'existence d'un mixage progressif entre ces « lignées ». Ce mixage semble plus marqué en Basse-Normandie, mais le nombre d'individus étudié dans

cette région est cependant encore trop faible que pour en tirer des conclusions. À l'avenir, il sera essentiel de compléter notre échantillonnage, en étendant notre étude vers la Bretagne et la Normandie, entre autres. Nous pourrions ensuite utiliser d'autres approches dont des méthodes démographiques bayésiennes de type ABC (Approximate Bayesian Computation) (Cornuet et al., 2008). Celles-ci permettront de mieux comprendre l'histoire de la reco-

lonisation de la Loutre en France, d'évaluer les flux d'individus migrants et la présence d'éventuels étranglements génétiques. L'étude génétique fine des populations permettra d'évaluer l'état de santé génétique de ces populations et de déterminer si elles présentent une diversité génétique suffisante pour une survie à long terme ou bien si elles ont subi un étranglement génétique, risquant de conduire à des phénomènes de dépression de consanguinité.

## Contacts

Pigneur L.-M. #, Marc D.1, Fournier P.2, Fournier-Chambrillon C.2, Steinmetz J.3, Rieu L.4, Giralda-Carrera G.5, Urrea F.6, Van Doninck K.#, Michaux J.\*7

# Unité de Recherche en Biologie Environnementale et Évolutive Université de Namur

\* Laboratoire de Génétique des micro-organismes, Université de Liège

1 Conservatoire d'espaces naturels de Midi-Pyrénées

2 Groupe de Recherche et d'Étude pour la Gestion de l'Environnement

3 Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage

4 Parc National des Pyrénées

5 Servicio de Conservación de la Biodiversidad, Gobierno de Navarra

6 Equipo de Biodiversidad, Gestión Ambiental de Navarra

7 Centre de Biologie et de Gestion des Populations, INRA/IRD/CIRAD/SupAgro

lise-marie.pigneur@unamur.be



## Remerciements

Nous remercions toutes les personnes ayant collaboré à la collecte des échantillons, en particulier les organismes suivants : CEN, GREGE, ONCFS (dont Délégation Interrégionale Nord Ouest

et Cellule Technique Sud Ouest), GMHL, Museum de Toulouse (MHNT), Fédération Aude Claire et Gouvernement de Navarre via le GANASA.

## Bibliographie

- Chessel D., Dufour A.-B., Thioulouse J., 2004, The ade4 package-I- One-table methods. *R News*, 4, 5-10.
- Cornuet J.-M., Santos F., Beaumont M.A. et al., 2008, Inferring population history with DIYABC : a user-friendly approach to approximate bayesian computation. *Bioinformatics*, 24, 2713-2719.
- Dallas J. F. Piertney S.B., 1998, Microsatellite primers for the Eurasian otter. *Molecular Ecology*, 9, 1248-1251.
- Dallas, J. F. et al. 1999. Genetic diversity in the Eurasian otter, *Lutra lutra*, in Scotland. Evidence from microsatellite polymorphism. *Biol. J. Linn. Soc.* 68, 73-86.
- Dallas, J. F. et al., 2000, Sex identification of the Eurasian otter *Lutra lutra* by PCR typing of spraints. *Conservation Genetics*, 1, 181-183.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J., 2005, Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE : a simulation study, *Molecular Ecology*, 14, 2611 – 2620.
- Janssens X., Michaux J.R., Fontaine M.C., Libois R., de Kermabon J., Defourmy P., Baret P.V., 2008, Non-invasive genetics at basin scale reveals barriers to the present otter recovery in Southern France. *Ecography*, 31, 176-186.
- Mucci N., Arrendal J., Ansoerge H., Bailey M., Bodner M., Delibes M., Ferrando A., Fournier P., Fournier C., Godoy J.A., 2010, Genetic diversity and landscape genetic structure of otter (*Lutra lutra*) populations in Europe. *Conservation Genetics*, 11, 583 – 599.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- Rosoux R., Bellefroid M.N. De, 2006, Le retour de la loutre en France. *Symbiose* 16 : 60-62.
- Rousset F., 2008, GENEPOP'007 : a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103 – 106.
- Valière N., 2002, GIMLET : a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*, 10, 1471-1478.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P., 2004, Micro-Checker: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535 – 538.

## Questions / Réponses

### L'hypothèse de la colonisation dans le Sud-Ouest a-t-elle été envisagée?

- 1** D. Marc: Non, car les données génétiques sont trop éparées et homogènes en datation (trop récentes). De plus, les 4 souches (Pyrénées et Navarre, Atlantique, Sud-Ouest et Massif central, et enfin Limousin) sont très fortement isolées. Mais le taux de colonisation de cette espèce est important.

### S. Aulagnier: Les mêmes microsatellites que ceux étudiés par Dallas et Piertney en 1998 ont-ils été utilisés?

- 2** D. Marc: Oui, il s'agit de microsatellites pour lesquels les fréquences alléliques sont faciles à établir.

Rapporteurs : Clément Chauve et Flavien Abbate



## Techniques actuelles pour l'identification et/ou la confirmation d'espèces

Il existe deux types d'ADN dans la quasi-totalité des cellules eucaryotes, l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial. L'étude de l'un ou de l'autre dépend de l'objectif visé, de la question posée. **L'ADN nucléaire** est condensé dans le noyau de la cellule et transmis de la même façon par les deux parents. Le noyau résultant contient deux séries de chromosomes homologues, l'un d'origine maternelle, l'autre d'origine paternelle. Le patrimoine chromosomique ainsi constitué est unique pour chaque individu. Cet ADN est utilisé lorsqu'il s'agit d'**identifier** (définir la composition génétique) ou de **sexer l'individu**.

Contrairement à l'ADN nucléaire, l'ADN mitochondrial est localisé dans toutes les mitochondries de la cellule et n'est transmis que par la mère. Il est dupliqué dans chaque mitochondrie 1 000 fois en moyenne par cellule, ce qui permet de l'utiliser même s'il est en partie dégradé. L'ADN mitochondrial permet quant à lui d'**identifier l'espèce** et éventuellement la **lignée de l'individu**.

Les objectifs poursuivis sont généralement **l'estimation de l'effectif d'une population**, lorsque des individus sont identifiés à plusieurs reprises (résultats analogues à la Capture Marquage Recapture) et **sa structuration**; exemple du Loup avec la cartographie des zones de présence et le suivi des fronts de colonisation. La génétique est également abordée pour la **conservation des populations relictuelles** (comme celle de l'Ours dans les Pyrénées) et notamment le **taux de consanguinité**. Les prélèvements sont récoltés sur le terrain (fèces, poils, urines, pertes sanguines et cadavres) afin de minimiser le coût d'un suivi par captures (stress de l'animal, moyens humains), tout en assurant une large répartition des échantillons.

Les analyses génétiques permettent également de **déterminer de nouvelles espèces** par comparaison avec des séquences connues, ou d'**identifier des hybridations** par comparaison avec l'ADN mitochondrial (maternelle).

### Une technique 100 % fiable ?

Les résultats obtenus ont une reproductibilité variable, due à la nature même des échantillons collectés. L'ADN peut en effet se dégrader partiellement sous l'effet de facteurs biotiques (bactéries, champignons) et abiotiques (soleil, gel, humidité...). Le traitement en laboratoire de l'ADN peut également engendrer des erreurs de diagnostics. C'est pourquoi des répétitions sont effectuées pour chaque analyse, en attribuant un Indice de Qualité (IQ) à chaque traitement d'un même extrait d'ADN. La note de cet indice est plus ou moins élevée en fonction de sa similitude avec le génotype de référence.

## Protocole de récolte d'épreintes pour analyse génétique

- Collecter les épreintes sans les toucher (gants, bout de bois à remplacer à chaque fois pour éviter les contaminations).
- Déposer dans des flacons hermétiques remplis d'éthanol (non dénaturé) 90°.
- Inclure une inscription au crayon de façon lisible (coordonnées, nom collecteur et date).

Dans l'idéal, les épreintes doivent être les plus fraîches possibles car l'ADN se dégrade très vite en conditions humides. Les épreintes collectées en conditions hivernales sont encore meilleures car le froid conserve mieux l'ADN.

Les échantillons doivent être envoyés avec la copie des autorisations ad hoc.