

Analyses génétiques sur des échantillons de Loutre (*Lutra lutra*) en Pays de Loire et Poitou-Charentes

Dr Lise-Marie Pigneur & Dr Johan Michaux
Laboratoire de génétique de la Conservation – GeCoLAB
Université de Liège

Echantillons

Un total de 38 échantillons issus de loutres nous a été fourni par Alain Texier du PNR Marais Poitevin (Tableau 1). Ces échantillons ont été comparés à plus de 200 échantillons provenant d'autres régions françaises.

Tableau 1. Origines et codes des échantillons fournis par Alain Texier

Code Labo	Code collecte	Pays	Zone/région	Localité	Date
106	LLU-2015/08/16-852334-7	France	Pays de la Loire	St Jean de Monts	16/08/15
107	2014 01 31/17349/1	France	Poitou-Charentes	Saint Jean de Liversay	31/01/14
108	2014 LF 14-1	France	Poitou-Charentes	Marans	27/01/14
109	LLU-2014/4/01-85600-2	France	Pays de la Loire	Saint Georges de Montaigu	1/04/14
110	LLU-85184-	France	Pays de la Loire	Sables d'Olonne	
111	LLU-2012 LM4-1-	France	Poitou-Charentes	Cerigay	1/01/12
112	LLU-2012 LM3-2	France	Poitou-Charentes	Marans	22/02/12
113	LLU-2013 LF13-1	France	Poitou-Charentes	Villedoux	13/11/13
114	LLU-2013-05-6-85630-6-	France	Pays de la Loire	Barbâtre (Ile de Noirmoutier)	6/05/13
115	LLU-2012 LM6-1	France	Poitou-Charentes	Taugon	15/10/12
116	LLU-2012-4-85630-1	France	Pays de la Loire	Barbâtre (Ile de Noirmoutier)	1/04/12
117	LLU-2015/01/25-85680-7-1	France	Pays de la Loire	La Guérinière (Ile de Noirmoutier)	25/01/15
118	LLU-20150224-17153-2	France	Poitou-Charentes	Esnandes	24/02/15
119	LLU-2012 LM-5-2	France	Poitou-Charentes	Niort - Gelucher	2012
120	LLU-2013 2F11-1	France	Poitou-Charentes	Marans	15/10/13
121	LLU-2013 LF8-2	France	Pays de la Loire	Boissière des Landes	5/02/13
122	LLU-2012-LM7-1	France	Poitou-Charentes	La Ronde	13/11/12

123	LLU-2011 LF1-1	France	Pays de la Loire	La Roche Sur Yon	17/01/11
124	LLU-2013-LM-12-1	France	Pays de la Loire	Moreilles	14/11/13
125	LLU-2013 LM9-1	France	Poitou-Charentes	Marans	20/06/13
126	2014 02 19/17439/1-2	France	Poitou-Charentes	Taugon	19/02/14
127	2015 06 12/85303/1	France	Pays de la Loire	Vix	12/06/15
128	2011 L? 2-1	France	Pays de la Loire	Les Essorts	9/09/11
129	2014 11 28/85042/1	France	Pays de la Loire	Chaillé les Marais	28/11/14
130	2015 01 28/17267/1	France	Poitou-Charentes	Nuaillé d'Aunis	28/01/15
131	2015 02 27/17218/1	France	Poitou-Charentes	Marans	27/02/15
132	LLU-2015-05-03-85117-7	France	Poitou-Charentes	Lairoux - Canal Marguerite - Le Russet	3/05/15
133	LLU-2015-03-12-85166-4	France	Pays de la Loire	Olonne sur Mer	12/03/15
134	LLU-20150112-85042-2	France	Pays de la Loire	Chaillé les Marais	12/01/15
135	LLU-2012 LM-5-1	France	Poitou-Charentes	Niort - Gelucher	2012
136	LLU-2013 LM10-2	France	Pays de la Loire	Vix	27/08/13
137	LLU-2014825-85430-1	France	Pays de la Loire	Boissière des Landes	25/08/14
138	LLU-2015101085630	France	Pays de la Loire	Barbâtre (Ile de Noirmoutier)	10/10/15
139	LLU-062015-85172	France	Pays de la Loire	Le Perrier	juin-15
140	LLU-2011-11-25-85680-5	France	Pays de la Loire	La Guérinière (Ile de Noirmoutier)	25/11/11
141	2015 01 22/17218/1-2	France	Poitou-Charentes	Marans	22/01/15
142	2014 02 25/85132/1-1	France	Poitou-Charentes	Maillé	25/02/14
143	LLU-20141215-85128-1	France	Pays de la Loire	Luçon	15/12/14

Extraction de l'ADN

L'ADN de chaque échantillon a été extrait via le kit DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) ou le kit DNA Stool extraction kit (Qiagen) pour les fèces.

Amplification des marqueurs étudiés

Suivant les travaux de Dallas et al. (2000 ; 2002), Dallas et Piertney (1998) et Janssens et al. (2008), nous avons développé nos analyses sur base de 15 marqueurs microsatellites

récemment utilisés avec succès dans une série d'autres études sur des problématiques similaires. Les amorces (primers) permettant l'amplification de ces différents marqueurs sont présentées au tableau 2.

Les analyses ont été réalisées en utilisant trois mix multiplex, permettant d'analyser les échantillons de loutres selon les 15 microsatellites par trois passages en séquenceur automatique (au lieu de 15 si les marqueurs devaient être analysés individuellement). Ce type de stratégie permet de gagner un temps non négligeable en terme d'analyse sur séquenceur automatique. Pour cela, un des primers de chaque microsatellite a été marqué par un fluorochrome particulier. Dans le cas de notre étude, quatre types de fluorochromes ont été choisis (VIC, FAM, PET et NED) (Tableau 2). Le type de fluorochrome choisi pour chaque microsatellite a été basé sur la taille de fragments de chacun de ceux-ci. Vu la variabilité en taille des marqueurs utilisés, nous avons ainsi choisi de ne pas dépasser 5 microsatellites par run, ce qui permet de les analyser tous en trois passages seulement.

Tableau 2. Liste des marqueurs microsatellites utilisés dans le cadre de cette étude et choix des fluorochromes sélectionnés pour chacun de ces marqueurs.

Nom du marqueur	Fluorochrome sélectionné	Séquence
Lut435F	PET	TGAAGCCCAGCTTGGTACTTC
Lut435R		ACAGACAGTATCCAAGGGACCTG
Lut453F	PET	AGTGCTTTGTACTTGGTAATGG
Lut453R		AGACTGAAAGCTCTGTGAGGTC
Lut457F	VIC	CAGGTTTATGGCTTTATGGCTTTC
Lut457R		CAGGGTTTGATTTCTGGTGAGG
Lut604F	FAM	TATGATCCTGGTAGATTAACCTTTGTG
Lut604R		TTTCAACAATTCATGCTGGAAC
Lut701F	FAM	GGAAACTGTTAAAGGAGCTCACC
Lut701R		CAGTGTTTCATAAGGATGCTCCTAC
Lut715F	VIC	TTCACAATAGCCAAGATATGGAC
Lut715R		TGGCATAATATCCTTTCTCATGG
Lut717F	FAM	TGTTGCCTTCAGAGTCCTGTG_
Lut717R		GTCAGGCATTGTAACATATTCTCAG
Lut733F	PET	GATCTCATTTTTAAATGTTCTTACCAC
Lut733R		TGGTTCTCTTGCAGGATCTG
Lut782F	FAM	GAGATATCACTAAGCAATACACGATG
Lut782R		ACAAAGACTGAGCAAAAACAAGC
Lut818F	NED	AAGGATGTGAAACAGCATTG_
Lut818R		CCATTTTATACACATAAATCGGAT
Lut832F	NED	TGATACTTTCTACCCAGGTGTC
Lut832R		TCCTTAGCATTATCTTATTTACCAC
Lut833F	VIC	CAAATATCCTTTGGACAGTCAG
Lut833R		GAAGTTATCTAATTTGGCAGTGG
Lut902F	NED	CAGGAGTGAATGTAAGAGTTGG
Lut902R		CTTCACACCATTTGCAGACC
Lut914F	VIC	GAAACTCTGAAGTCAAAGAACATG
Lut914R		AGGCTCTGTAAGTGTGGAG
LutSRY-F	FAM	GAATCCCCAAATGCAAACTC
LutSRY-R		GGCTTCTGTAAGCATTTTCCAC

Génotypage et analyse des données

Les microsatellites amplifiés et marqués par fluorochromes ont été génotypés au moyen d'un séquenceur automatique multicapillaire *Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyser*. Les résultats du génotypage sont informatisés sous forme d'électrophérogrammes qui permettent de mesurer la taille en paire de bases des différents allèles des microsatellites. La taille des allèles dépend du nombre de répétitions qu'ils contiennent. La taille de ces allèles pour chaque microsatellite et par individus a été identifiée à l'aide du programme GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystem).

Dans le cas du matériel collecté de manière non invasive (fèces) et présentant un ADN de mauvaise qualité, nous avons systématiquement répété les génotypages de 3 à 5 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.

Analyses statistiques

Une fois les typages microsatellites effectués, la matrice de données a été analysée selon les dernières approches statistiques développées dans le domaine de la génétique des populations.

Premièrement, l'identification individuelle des échantillons d'épreintes a été effectuée grâce au logiciel GIMLET (Valière, 2002). Cette méthode permet de détecter si plusieurs épreintes proviennent en fait d'un même individu.

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 15 microsatellites testés (2 allèles/individus) a été soumise au programme MICROCHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004).

Les données ont ensuite été corrigées puis analysées. Pour identifier la structure populationnelle, nous avons utilisé le logiciel STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Ce logiciel permet de déterminer s'il existe une structure populationnelle quelconque et d'identifier le nombre de populations (K) en assignant chaque individu à un des clusters sur base de son génotype (méthode du *clustering* bayésien). Pour STRUCTURE, aucune affiliation géographique *a priori* n'est fournie au logiciel. Il est également supposé que les fréquences alléliques sont corrélées entre les populations sur base du modèle d'admixture. Une série de « runs » indépendants a permis de tester des nombres de clusters K allant de 1 à 10 populations et en utilisant un « burn-in » de 100 000 itérations suivi 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. Après correction selon Evanno, les probabilités d'assignation des individus au nombre de clusters choisi ont été synthétisées et représentées graphiquement via la plateforme CLUMPAK (Kopelman et al. 2015).

Résultats

L'analyse de clustering STRUCTURE a permis de mettre en évidence 5 clusters génétiques au sein des populations de l'Ouest de la France que nous avons étudiées (Figure 1 ; voir Pigneur et al., soumis).

L'assignation des différents échantillons à ces 5 groupes génétiques montre que ces groupes génétiques sont globalement (mais pas strictement) associés à 5 régions particulières : la façade Atlantique (bleu), le Sud Ouest du Massif Central (rose), le Limousin (vert), la région des Pyrénées et de la Navarre (violet) et enfin la Bretagne (orange).

Néanmoins, il est intéressant de remarquer que certains individus d'un cluster associé à une région géographique se retrouvent dans une autre zone géographique. Ce résultat suggère des mouvements de loutres à longue distance et des contacts de plus en plus marqués entre les différentes populations étudiées. Ce phénomène pourrait être lié à un phénomène de recolonisation des rivières françaises à partir de différentes régions refuges. Par ailleurs, un certain nombre d'individus présente un profil génétique « mixte », visiblement issu d'un mélange entre diverses lignées génétiques.

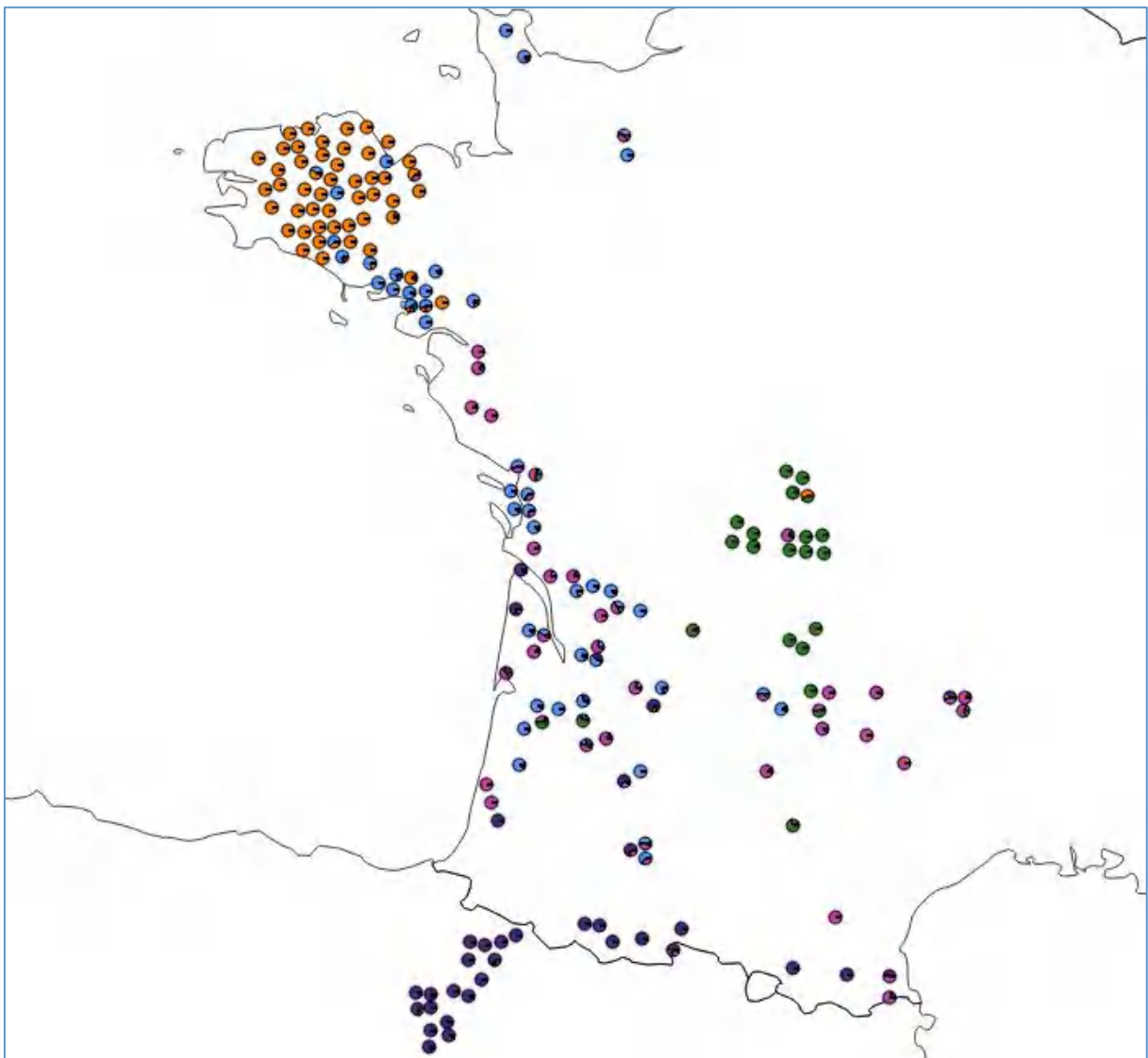


Figure 1. Représentation géographique des 5 grands groupes génétiques mis en évidence dans les populations du Sud Ouest de la France par le programme STRUCTURE (d'après Pigneur et al., soumis). Les diagrammes représentent la probabilité d'appartenance des individus à chacun des 5 clusters définis par le programme STRUCTURE. Certains échantillons ne sont pas visibles pour cause de recouvrement.

Les échantillons analysés semblent se répartir essentiellement entre le cluster dit « atlantique » (bleu) et celui du Massif Central (rose) (Figure 2). Ces résultats sont à interpréter avec prudence vu le faible échantillonnage et la non amplification de certains marqueurs (chez certains individus), probablement en raison d'une certaine dégradation de l'ADN issu des épreintes.

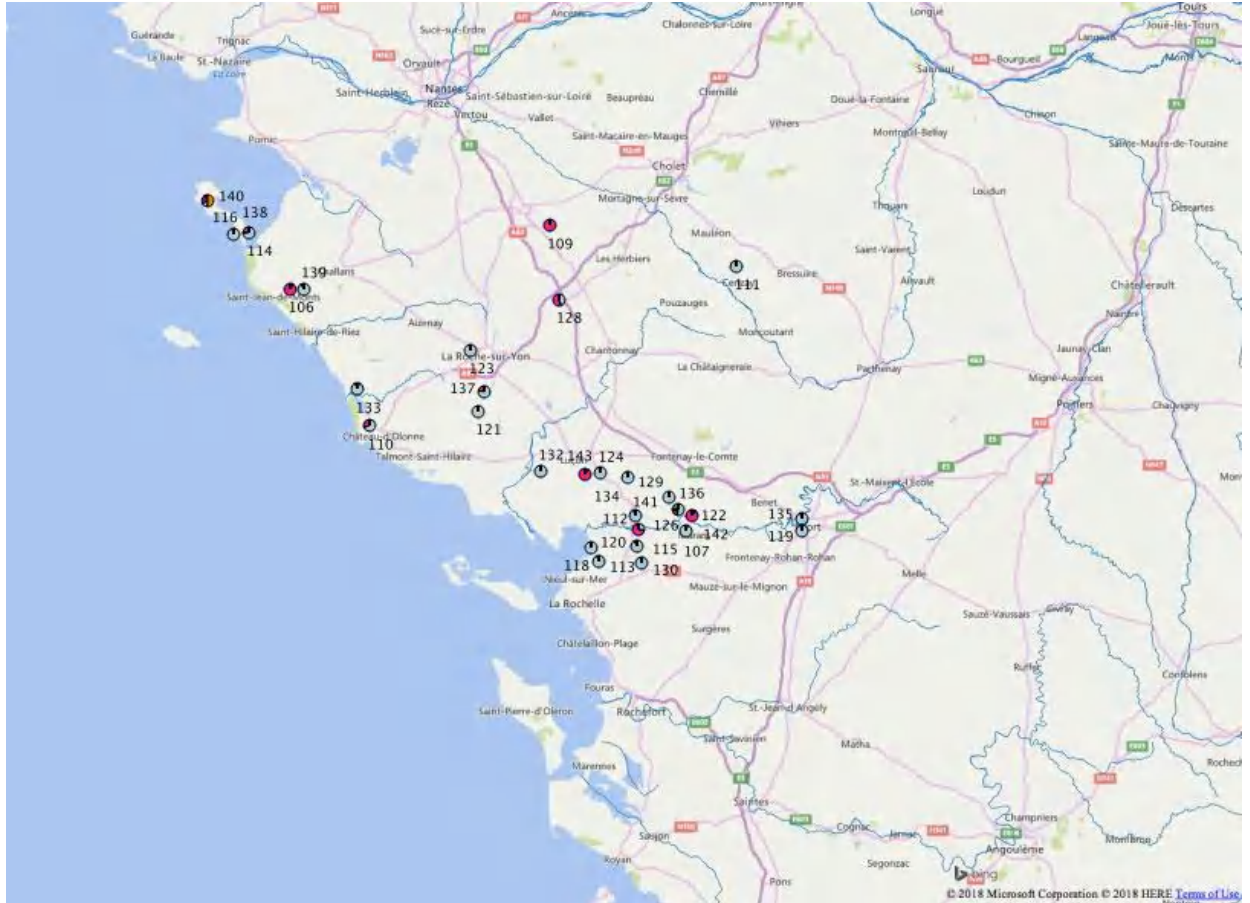


Figure 2. Représentation géographique des résultats de l'analyse de clustering pour les échantillons de Poitou-Charentes et du Pays de la Loire (codes voir Tableau 1).

Quoiqu'il en soit, ces résultats tendent à suggérer que les loutres présentes dans la zone d'étude correspondent à un mélange d'au moins deux populations de loutres différentes (principalement Massif Central et région Atlantique). Ces résultats rejoignent ceux précédemment obtenus dans diverses régions françaises (Pigneur et al. 2014a, b). Il semble en effet que différentes zones géographiques aient été recolonisées par des loutres ayant des origines différentes, probablement à partir de lignées issues des différents refuges où l'espèce a survécu durant les siècles précédents.

Conclusions

Cette étude a permis d'obtenir une série d'informations inédites concernant les loutres de la zone étudiée : Pays de la Loire et Poitou-Charentes. Ce travail a permis de montrer que cette population résulterait d'une recolonisation à partir de plusieurs refuges, situés principalement en région Atlantique et/ou dans le Massif Central.

Avant toute conclusion définitive à ce propos, il conviendra cependant de développer une recherche plus approfondie effectuée sur un échantillonnage nettement plus important. Dans le cas de matériel non invasif (épreintes), celui-ci devra être collecté de préférence en période hivernale pour maximiser la qualité de l'ADN au sein des épreintes.

Références bibliographiques

- 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.
- Janssens X., Michaux J.R., Fontaine M.C., Libois R., de Kermabon J., Defourny P. and Baret P.V. 2008. Non-invasive genetics at basin scale reveals barriers to the present otter recovery in Southern France. *Ecography*, **31**, 176-186.
- Kopelman N.M., Mayzel J., Jakobsson M., Rosenberg N.A., Mayrose I. 2015. CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol Ecol Res*, in press.
- Pigneur L-M. , Michaux J., Caublot G., Fournier-Chambrillon C., Fournier P. (2014a) Sur les traces de la Loutre dans le Limousin... In: *L'Echo du PNA Loutre : Bulletin de liaison du Plan National d'Actions en faveur de la Loutre d'Europe*. 7 , 5-7.
- Pigneur L.-M., Marc D., Fournier P., Fournier-Chambrillon C., Steinmetz J., Rieu L., Giralda-Carrera G., Urrea F., Van Doninck K., Michaux J. (2014b) La Loutre en France et Navarre. *Actes du 36ème colloque francophone de mammalogie. Climat, paysages, perceptions. Les Mammifères sauvages face aux changements globaux: TAIS. Bulletin des Mammalogistes de Midi-Pyrénées*, **7**, 117-122.
- Pigneur L.-M., Caublot G., Fournier-Chambrillon C., Fournier P., Giralda-Carrera G., Grémillet X., Marc D., Simonnet F., Sourp E., Steinmetz J. Urrea-Maya F., Michaux J. Génétique de la conservation de la Loutre d'Europe en France. Actes des 11e Rencontres Bourgogne-Nature. Les Mammifères sauvages - Recolonisation et réémergence. *In press*.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- 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