

Ecologie moléculaire et génétique des populations chez la loutre géante:

outils d'aide à la conservation d'une espèce emblématique
des cours d'eau amazoniens



photo N. Duplaix

Phase 1: mise au point des techniques

association Kwata – Mai 2005

Introduction

La loutre géante est une espèce considérée "en danger" par l'Union Mondiale pour la Nature, en raison notamment de la très forte pression de chasse au siècle passé, et à l'heure actuelle d'une très forte dégradation de la qualité de ses habitats. La survie des populations actuelles, relictuelles, souvent fragmentées, n'est pas toujours garantie. Des travaux récents en écologie tendraient en effet à montrer que la capacité de restauration des populations et de recolonisation des habitats par les loutres géantes serait très faible¹.

Ces données issues d'observations directes sur le terrain peuvent cependant être complétées par des outils modernes de génétique des populations. Selon les objectifs recherchés et les unités taxonomiques, spatiales et temporelles, considérées, plusieurs marqueurs moléculaires sont à la disposition des programmes de recherche. Pour les projets de conservation, l'*ADN microsatellite* est le plus variable et est utilisé pour travailler sur des échelles de temps et d'espace assez restreintes: on cherche par exemple à évaluer la taille d'une population bien identifiée, l'origine précise des individus, la dynamique actuelle de la population: échanges génétiques (flux de reproducteurs), ségrégations entre populations, ... Les intérêts de l'utilisation de ces outils pour la conservation de l'espèce sont à cet égard majeurs.

Résultats attendus

Appliquée en parallèle aux méthodes classiques de suivi des populations, l'approche génétique peut par exemple permettre, par l'étude de la diversité génétique et des flux de gènes au sein d'une population et entre les populations, de savoir dans quelle mesure les populations des bassins versants différents sont isolées les unes des autres, et dans quelle mesure la restauration de population peut ainsi être attendue ou pas. La démonstration de populations isolées les unes des autres, sans échanges, tendraient à indiquer une incapacité de recolonisation. Les efforts de protection forte des habitats, à une échelle écologique large, seront alors d'autant plus fondamentaux pour la survie à long terme des populations. En revanche, la mise en évidence d'une capacité de restauration des populations devrait d'accompagner de l'identification et le maintien de corridors écologiques intacts. Par ailleurs,

la diversité génétique est un indicateur majeur du statut global de l'espèce, notamment après que les populations aient subi de fortes perturbations.

Première phase: étude de la faisabilité chez la loutre géante

D'ores et déjà en place en Guyane chez le caïman noir², en cours chez la tortue olivâtre, l'étude de la diversité de l'ADN microsatellite chez la loutre géante se heurte à deux principales difficultés.

- La faiblesse des densités rend difficile l'obtention d'un échantillon de taille importante, nécessaire à l'utilisation de ces marqueurs. Dans une certaine mesure, la multiplication des marqueurs peut compenser la faiblesse de l'échantillon.
- Les loutres ne pouvant être capturées pour accéder au matériel biologique utilisé classiquement pour ce type d'études (sang, fragment de peau), le matériel biologique de base pour ce travail est constitué des déjections, qui se dégradent très vite dans le milieu extérieur.

Travail effectué lors de cette première phase

1- *Prélèvements sur le terrain*: des parcours réguliers ont été effectués sur la rivière Ekini (Approuague), sur l'Orapu, l'Iracoubo, et la crique Couy (Kourou), à la recherche d'indices de présence. Les épreintes sont recherchées sur les roches, troncs morts.



déjections ("épreintes") de loutre géante sur un tronc et sur un rocher

¹ Schenk C, Groenendijck J, Hajek F, Staib E, Frank K. 2003. Even the largest parks can be too small: giant otters in the peruvian rainforest. Island Press.

2- Mise au point de *l'extraction de l'ADN* à partir des épreintes

3- Premiers essais *d'amplification* de l'ADN microsatellite, à partir de résultats préalablement obtenus et publiés chez la loutre d'Europe et la loutre de mer, et ayant permis de progresser dans la dynamique et la conservation de ces espèces^{3, 4, 5}.

Les étapes techniques

1- *Obtention et conservation des prélèvements*

Les fécès servent de matériel de base, l'ADN de la loutre doit alors être récupéré dans les cellules desquamées de l'appareil digestif. Les contraintes sont :

- (i) la faible quantité de matériel disponible;
- (ii) la dégradation rapide;
- (iii) la présence d'inhibiteurs dans les matières fécales rend l'amplification de l'ADN difficile.

Sur le terrain, les matières fécales peuvent être conservées après dessiccation (Silicagel®)⁶ au froid, ou dans l'alcool⁷. Ces trois méthodes ont été testées, mais les deux premières ont montré des limites importantes: inconstance du froid lors de séjours de plusieurs jours en forêt, dessèchement incomplet en Silicagel. Dans les deux cas, la dégradation rapide des matières fécales n'a ainsi pas permis d'extraire l'ADN dans de bonnes conditions. Le prélèvement en alcool est le plus adapté aux contraintes de terrain en milieu tropical humide, et a finalement été privilégié.

² de Thoisy B, Lavergne A. Population status, structure and dynamics in Black caimans (*Melanosuchus niger*) in French Guiana. En préparation

³ Larson S, Jameson R, Bodkin J, Staedler M, Bentzen P. 2002. Microsatellite DNA and mitochondrial DNA variation in remnant and translocated sea otter (*Enhydra lutris*) populations. *J. Mammal.* 83: 893-906.

⁴ Larson S, Jameson R, Etnier M, Fleming M, Bentzen P. 2002. Loss of genetic diversity in sea otters (*Enhydra lutris*) associated with fur-trade of the 18th and 19th century. *Mol. Ecol.* 11: 1899-1903.

⁵ Dallas JF, Piertney SB. 1998. Microsatellite primers for the eurasian otter. *Mol. Ecol.* 7: 1247-1251.

⁶ Dalen L, Götherström A, Angerbjörn A. 2004. Identifying species from pieces of faeces. *Cons. Genetics* 5: 109-111.

⁷ Dallas JF, Carss DN, Marshall F, Koepfli PK, Kruuk K, Piertney SB, Bacon PJ. 2000. Sex identification of the eurasian otter *Lutra lutra* by PCR typing of spraints *Cons Genetics* 1: 181-183

2- Extraction et amplification de l'ADN

Plusieurs méthodes existent pour extraire l'ADN, localisé dans le noyau de la cellule. Une lyse préalable des cellules est nécessaire, plusieurs produits sont utilisables à cet effet. Puis, parmi les méthodes les plus classiques, celle utilisant le phénol et le chloroforme a l'avantage d'être économique. Des kits d'extraction rapide sont également disponibles, mais sont très onéreux. Après l'extraction, la purification de l'ADN peut s'avérer nécessaire si des inhibiteurs sont présents.

Le dosage de l'ADN par photométrie, après extraction, permet de mesurer la quantité présente. Dans le cas d'un travail à partir des matières fécales, cette phase est inutile, les matières fécales étant constituées essentiellement de tissus digérées des proies (crabes, poissons): une importante quantité d'ADN est en effet extraite, mais cet ADN n'est pas uniquement celui des loutres. Afin d'évaluer la qualité de l'extraction, il a donc été choisi de rechercher directement la présence de l'ADN cible, par amplification génique (amplification d'un fragment de la molécule d'ADN spécifique de la loutre). Sur la base des travaux effectués, deux couples de nucléotides ont été identifiés comme permettant d'amplifier une zone de la molécule d'ADN obtenue après extraction qui soit spécifique de la loutre géante⁸. De l'ADN de loutre géante extrait à partir de follicule pileux (prélevé sur un animal en captivité) a servi de témoin afin d'optimiser les conditions d'amplification, ceux proposés dans les travaux précédents ne permettant pas une amplification de qualité suffisante.

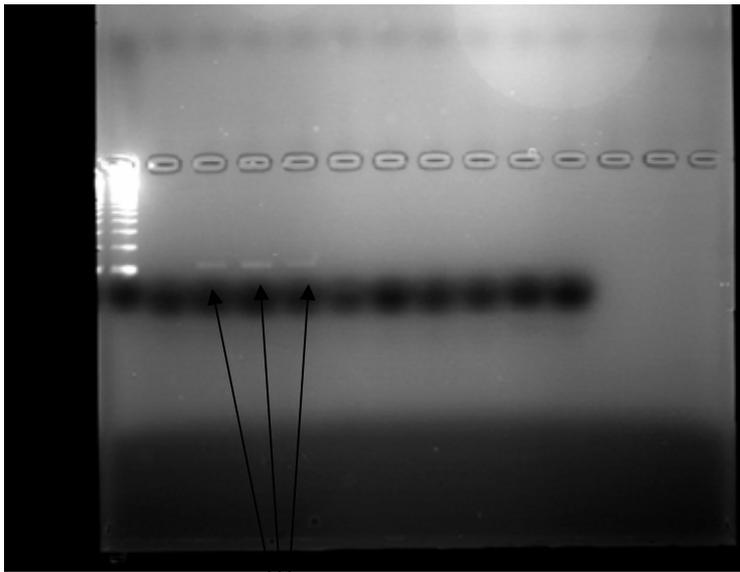
Résultats

Plusieurs échantillons de matières fécales en suspension dans l'alcool à 98° ont été utilisés. Sur la base de la plus récente étude publiée en génétique de la loutre⁹, la lyse des cellules a été effectuée avec du tampon CTAB, et l'ADN extrait avec du chloroforme. Les essais d'amplification génique ont été effectués à ce stade (cf. partie suivante), mais les résultats n'ont pas été probants. L'ADN extrait a alors été purifié par un kit de purification (DNeasy Tissue Kit, Qiagen®).

⁸ Dallas JF, Piertney SB. 1998. Microsatellite primers for the Eurasian otter. *Mol. Ecol.* 7: 1248-1251.

⁹ Hung CM, Li SH, Ling-Ling L. 2004. Faecal DNA typing to determine the abundance and spatial organization of otters (*Lutra lutra*) along two stream systems in Kinmen. *Animal Cons* 7: 301-311.

Pour tous ces essais (mise en évidence des microsatellites, optimisation des conditions d'amplification génique: température, quantité d'ADN initiale), le produit d'amplification est mis à migrer par électrophorèse sur un gel d'agarose, avec un marqueur permettant de visualiser la présence, le cas échéant, du fragment recherché: si ce fragment était présent dans l'échantillon d'ADN à tester, il a normalement été répliqué, et est donc visualisé lors d'une exposition aux rayons ultraviolets. Cette première étape a permis de voir que le microsatellite spécifique de la loutre a été amplifié dans de bonnes conditions.



révélation en lumière ultraviolette de fragments d'ADN amplifiés avec succès.

Ce protocole a permis d'extraire de l'ADN de loutre géante chez 5 des 6 échantillons frais (déposés par l'animal depuis moins de quelques heures) prélevés dans de l'éthanol. La précédente étude⁹ rapportait un rendement de 65%. Il apparaît donc que les procédures et protocoles développées dans le présent travail sont encore bien optimisés, et devraient permettre d'initier un travail à plus grande échelle, avec davantage d'échantillons, l'amplification de plusieurs fragments d'ADN microsatellite, Le rendement d'extraction est en revanche très faible dès que les épreintes ne sont pas très récentes.

Perspectives

La résolution en gel d'agarose de l'étape précédente est satisfaisante pour mettre en évidence l'ADN, mais ne permettra cependant pas d'avoir une sensibilité suffisante nécessaire pour étudier le polymorphisme de l'ADN microsatellite. Les différences attendues entre les fragments de gène amplifiés chez les différents individus sont en effet minimales (une paire de bases en plus ou en moins), il sera nécessaire d'augmenter la sensibilité de discrimination. Pour cela, avant l'amplification, l'une des amorces est marquée par un élément radioactif (^{33}P), et le produit migre sur un gel de polyacrylamide révélé sur film photographique. La sensibilité de la lecture est augmentée et peut mettre en évidence de très légères variations de poids moléculaire, les fragments les plus lourds migrants moins vite. Tous les individus sont alors criblés, par microsatellite. Dès lors que de nombreux prélèvements pourront être étudiés, ainsi que de nombreux ADN microsatellites situés sur diverses régions du génome, c'est l'étude de cette variabilité qui renseigne sur la dynamique de la population: fraction d'individus consanguins, répartition plus ou moins homogène des variations observées au sein des populations présentes sur différents bassins versants, diversité génétique, flux de reproducteurs, ...

Protocole détaillé complet

Prélèvements

1 cc de matière fécale fraîche, mise en suspension dans 10 ml d'éthanol absolu

Extraction et purification

- reprise de 4 ml de la suspension, centrifugation à 1 300 tours / min pendant 10 minutes
- récupération du culot cellulaire, à l'interface entre l'éthanol et les matières grossières
- ajout de 2 ml de tampon CTAB, mixage
- centrifugation à 13 000 tours / min, pendant 10 min.
- récupération du surnageant
- ajout de 0,5 ml de chloroforme, mixage, centrifugation à 10 000 tours / min pendant 10 min
- récupération du surnageant
- ajout de 0,5 ml de chloroforme, mixage, centrifugation à 10 000 tours / min. pendant 10 min
- récupération du surnageant
- ajout de 0,7 ml d'isopropanol, précipitation de l'ADN au froid (15-45 min)
- centrifugation et rinçage à l'éthanol 70°,
- séchage et suspension dans 25 microlitres d'eau.
- purification avec le kit Qiagen

Amplification génique

Mix d'amplification, par échantillon:

2 µl d'ADN + 1,5 µl Tampon + 1,5 µl MgCl₂ + 1,2 µl amorce 1 + 1,2 µl amorce 2 + 0,75 µl dNTP + 0,1 µl Taq + 4,95 µl eau

Séquences des oligonucléotides utilisés pour l'amplification génique:

microsatellite Lut 453⁸ amorce 1 (5'-3', s): AGTGCTTTGTA CTTGGTAATGG
amorce 2 (5'-3', as) : AGACTGAAAGCTCTGTGAGGTC

microsatellite Lut701⁸

amorce 1 (5'-3', s): GGAAACTGTTAAAGGAGCTCACC

amorce 2 (5'-3', as): CAGTG TTCATAAGGATGCTCCTAC

Programme d'amplification optimisé (valable pour les deux microsatellites)

1 : 94°C, 4 min

2 : 91°C, 40 sec

3 : 64°C, 30 sec

4 : retour à l'étape 2, 2 fois

5 : 90°C, 40 sec

6 : 59°C, 30 sec

7 : retour à l'étape 5, 2 fois

8 : 89°C, 40 sec

9 : 55°C, 30 sec

10 : retour à l'étape 8, 2 fois

11 : 89°C, 40 sec

12 : 50°C, 30 sec

13 : retour à l'étape 5, 35 fois

14 : 72°C, 10min