

Janvier 2008

2008 Numéro 18

Spécial génétique

**Quoi de neuf ?**  
**Bulletin d'information**  
**du réseau loup**



## Editorial

*Le Réseau et la génétique : quand on déroule la pelote de la connaissance !*

Dans ce numéro :

**Les résultats du suivi des loups par la génétique**



Depuis 40 ans, la **génétique** (du grec *genno* = donner naissance) s'est divisée en plusieurs branches, la plupart associées à la biologie. Cette discipline a pris un essor considérable ces dix dernières années avec des avancées majeures dans les techniques d'investigations. Ainsi, l'étude des structures moléculaires permet aux microbiologistes de "créer" des bactéries qui fabriquent des médicaments, aux sélectionneurs de choisir les races de bétail ou de riz les plus productives, aux médecins de dépister avec des sondes les anomalies fœtales. Dans ces applications de suivi de la faune sauvage, la génétique (et notamment la génétique non invasive), est presque devenue un standard qui s'est imposé de lui-même car il a démultiplié les possibilités d'investigations pour étudier la transmission des caractères héréditaires entre des géniteurs et leur descendance, ou encore retracer les flux d'animaux grâce à l'étude de la diversité des gènes rencontrés dans les populations.

Le gène est une séquence d'éléments fondamentaux regroupés en une macro-structure appelée ADN, et se présente comme un livre, un plan architectural du vivant, qui oriente, qui dicte la construction des principaux constituants des organismes. Tous les gènes ne servent cependant pas forcément à produire quelque chose, et certaines de ces régions de l'ADN, appelées micro-satellites, propres à chaque individu, sont utilisées pour déterminer le *génotype* d'un animal, c'est-à-dire sa carte d'identité génétique (en quelque sorte son *code barre*). Les données (excréments, urines, poils...etc.) collectées par le Réseau Grands Carnivores ont alors au moins trois « vies » différentes ! Au départ, bien sûr elles servent à identifier l'espèce, la lignée génétique, le sexe, et l'individu. Mais on peut ensuite retracer l'histoire de détection de tel ou tel animal au cours du temps, ou dans l'espace : la dispersion des sub-adultes peut ainsi être documentée, de

même que les regroupements d'animaux en meutes. Enfin, et ce n'est pas là la moindre des choses, les résultats génétiques peuvent servir à reconstituer l'histoire de la re-colonisation (calculer le nombre d'individus fondateurs par exemple), ou à estimer les effectifs de la population (par application de la méthode dite de capture-recapture).

Ce numéro « *spécial génétique* » fait le tour de toutes ces questions, des aspects méthodologiques jusqu'aux applications terrain. Avant tout, il est destiné à restituer toutes les informations obtenues après mise en œuvre, au laboratoire CNRS d'Ecologie Alpine de Grenoble, de techniques spécifiques élaborées par cette équipe. Il est ensuite une illustration de ce qu'un travail collectif basé sur la collaboration entre diverses structures (le Réseau, des équipes universitaires, des chercheurs du CNRS) permet de réaliser. Toutes les petites briques de l'édifice sont nécessaires à l'obtention du résultat, et chacun peut se targuer de contribuer à la cohérence de l'ensemble. Evidemment, le processus d'élaboration du résultat est long : de la collecte sur le terrain à ce numéro spécial du QDN, plusieurs mois, voire plusieurs années selon le sujet, sont nécessaires. Mais au final, la patience est récompensée : vos données, vos efforts, contribuent à une meilleure connaissance de l'espèce en France, voire au delà.

Dans la nature tout change tout le temps ; nous devons nous adapter à l'évolution de la situation du loup et aux attentes des uns et des autres . Ce numéro, même s'il a surtout pour vocation de présenter des acquis, tente aussi de dresser des perspectives, en se posant de nouvelles questions pour sans cesse s'adapter à la diversité des situations rencontrées. N'hésitez pas à faire part de vos remarques, tous les avis méritent d'être considérés et enfin.....bonne lecture.

L'équipe du réseau loup

Sommaire	
Historique des analyses génétiques	2
Du terrain au labo, où le cheminement d'un échantillon	3
L'analyse génétique au LECA	5
De l'utilisation d'un outil pointu à l'interprétation des données	9
Etude de la colonisation du loup	9
Comment planifier la collecte des excréments	10
De l'analyse génétique à l'estimation des populations de loups	12
Les résultats du suivi moléculaire non invasif des loups par ZPP	13
Un exemple de l'utilisation de l'outil moléculaire	27



## 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 <sub>total</sub> analyses Sp	1	2	44	92	164	247	263	451	426	504	441	265	330	204	13
N <sub>A+</sub> « <i>C. lupus</i> »	1	2	13	45	90	158	104	71	106	284	240	151	175	109	4
N <sub>G+</sub> typages individuels	0	0	7	22	54	113	85	58	94	226	189	101	136	93	4
N <sub>I+</sub> Génotypes	0	0	4	11	20	29	30	24	37	68	65	45	56	39	3

## Du terrain au labo, où le cheminement d'un échantillon

Un correspondant ne saurait partir sur le terrain sans avoir dans son sac à dos le minimum nécessaire à une éventuelle récolte d'échantillon : quelques sacs de congélation, gants jetables et stylo. De sa récolte et avant d'être analysé au laboratoire, tout type d'échantillon, qu'il soit excrément, urine, sang, poils, ou tissu, va suivre plusieurs étapes qui par la rigueur de leur réalisation vont conditionner pour partie la qualité du typage génétique futur.

Que ce soit la pollution génétique, la chaîne du froid, la méthode de conditionnement ou le matériel utilisé, toutes ces étapes sont à réaliser avec le plus grand soin pour ne pas compromettre une qualité d'ADN déjà limitante par nature.

### la récolte sur le terrain

Quel que soit le type d'échantillon à prélever, différentes précautions d'ordre sanitaire doivent être respectées afin d'éviter toute contamination extérieure :

les manipulations se font avec des gants à usage unique,

l'échantillon est conditionné dans un sac de congélation type ziploc (plus pratique et hermétique). Tout autre contenant est à proscrire (du sac de grandes surfaces à la boîte de conserve et autre papier hygiénique...liste non exhaustive...)

Il est important d'éviter de respirer les émanations des excréments

Lorsqu'il s'agit d'un prélèvement d'urine, on s'attachera à recueillir la partie la plus foncée (concentration marquée)

Pour les poils, il faut veiller à ce que la plupart soient entiers avec leurs bulbes (petite forme lancéolée à la base du poil) puisque c'est à partir de ces derniers que sont réalisés les tests génétiques.

A chaque échantillon... sa fiche (à l'extérieur du sac) ! C'est l'identification standardisée du prélèvement qui va permettre le lien avec la base de données et le suivi de l'échantillon par l'attribution d'un numéro de référence. Sur le sac au stylo à marquage permanent on note :

- le nom du correspondant,
- la date de la récolte,
- le nom de la commune où il est prélevé et le numéro de département.

Si plusieurs échantillons sont prélevés, un numéro d'ordre est ajouté. Il arrive encore que des sacs d'échantillons parviennent sans identification, leur destination finale sera bien souvent, après tentative d'identification ...la poubelle.

### La chaîne du froid

L'ADN recherché dans les excréments est déjà naturellement en faible quantité (cellules de l'épithélium arraché lors de l'expulsion) et a déjà subi plusieurs cycles jour/nuit dans la nature avant sa récolte. Ne pas surajouter de contrainte est primordiale en respectant la chaîne du froid . Le dépôt au congélateur (y compris lors du transport qui doit être réfrigéré) doit permettre d'éviter surtout les phases de congélation-décongélation, qui dégradent l'ADN.

### Le référencement

Une à deux fois par an, la tournée des congélateurs est réalisée dans chaque région par l'animateur régional pour centraliser tous les échantillons et leur attribuer un code unique. Chaque excrément, poil, urine, tissu... est donc trié, vérifié quant à sa fiche, pour se voir affecter d'un numéro de référence qui va le suivre tout au long du processus jusqu'à la réception du résultat génétique.



Photo : J. Boyer

D'un point de vue sanitaire et afin d'éviter toute pollution génétique, la collecte d'un excrément doit être rigoureuse.



Photo : A. L. Plisson

C'est sans tarder que l'on identifie un échantillon.

Vient ensuite le transfert dans le point laboratoire du Rivier d'Allemont (38). Tous les échantillons y sont centralisés pour un conditionnement standardisé, afin de stabiliser l'ADN, réaliser des doubles, et offrir les meilleures garanties aux généticiens.

Les poils ne nécessitent pas de conditionnement particulier et seront extraits directement au laboratoire de génétique. Le conditionnement en piluliers vise en premier lieu à stabiliser l'ADN contenu dans les excréments et tissus via une solution d'Ethanol de fort degré. Dans des conditions sanitaires très strictes, l'opérateur manipule l'excrément avec blouse, masque et gants à usage unique sur une paillasse désinfectée à chaque échantillon et apprêtée pour éviter toute pollution entre échantillon. Trois prélèvements d'à peu près 1 cm<sup>3</sup> sont réalisés et conservés. Un seul prélèvement partira au laboratoire ; les deux autres sont stockés dans la banque de données. Cette opération, quelque peu fastidieuse mais essentielle, nécessite à peu près une journée pour traiter 50 échantillons par opérateur. L'essentiel de ce travail est réalisé par les responsables de réseau, assistés parfois de personnes extérieures.

Le traitement des échantillons de sang et d'urine est en revanche un peu plus complexe. Le sang est traité soit direc-

tement congelé (goutte de sang récoltée dans la neige par exemple), soit précipité dans une solution EDTA qui va fixer les globules contenant l'ADN (cas d'un cadavre frais par exemple). De même, l'urine nécessite une procédure particulière par précipitation de l'ADN dans une solution chimique. C'est pourquoi, par préférence, on réalise des sessions génétiques « spécial urine » pour rassembler une grande quantité d'échantillons et effectuer un conditionnement standardisé.

Une fois ces opérations réalisées, l'échantillon va pouvoir faire l'objet de la première phase d'analyse génétique proprement dite « l'extraction » par le Laboratoire d'Ecologie Alpine. Les sessions sont programmées tous les deux mois. Les correspondants qui souhaitent participer à ce processus peuvent se faire connaître auprès de l'animateur régional du réseau.

Yannick LEONARD, Jérôme BOYER et Perrine MORIS



Photo : Y. Leo-

La préparation d'un excrément avant envoi pour analyse génétique

## L'analyse génétique au Laboratoire d'Ecologie Alpine

Le Laboratoire d'Ecologie Alpine ou LECA (UMR CNRS 5553, [www-leca.ujf-grenoble.fr](http://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.

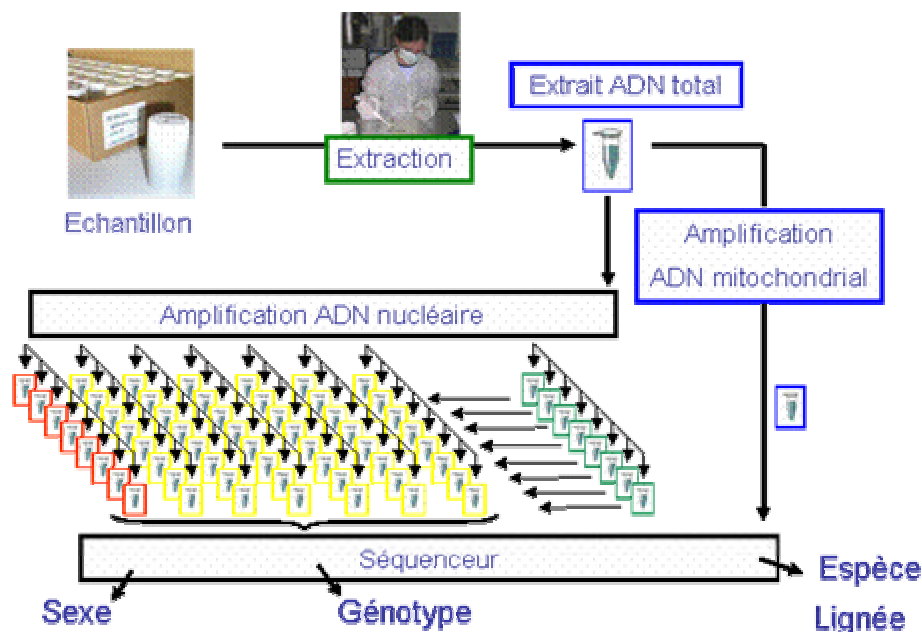
Amplifier massivement des zones courtes ne suffit pas, encore faut-il s'assurer de la qualité des copies obtenues. Pour assurer la fiabilité des résultats attendus, pour chaque échantillon, chacune des zones est amplifiée huit fois indépendamment. En terme technique, cette approche s'appelle l'approche 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.

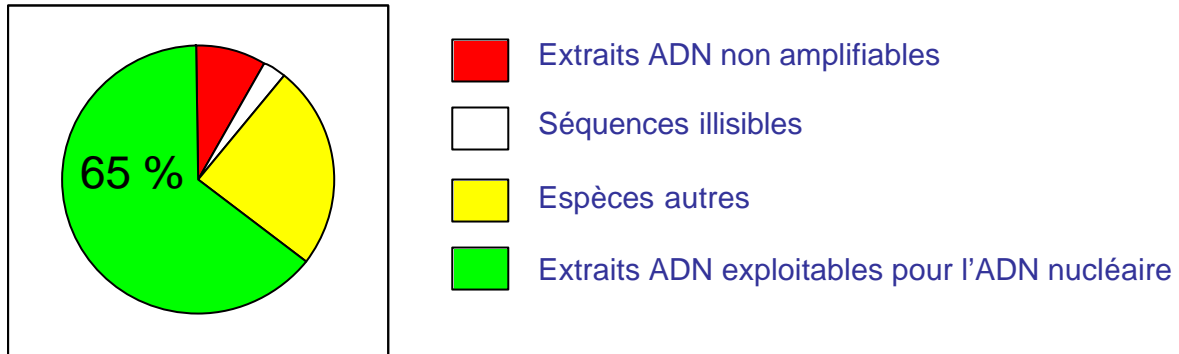
Christian Miquel—L E C A

### Chaîne de traitement d'un échantillon



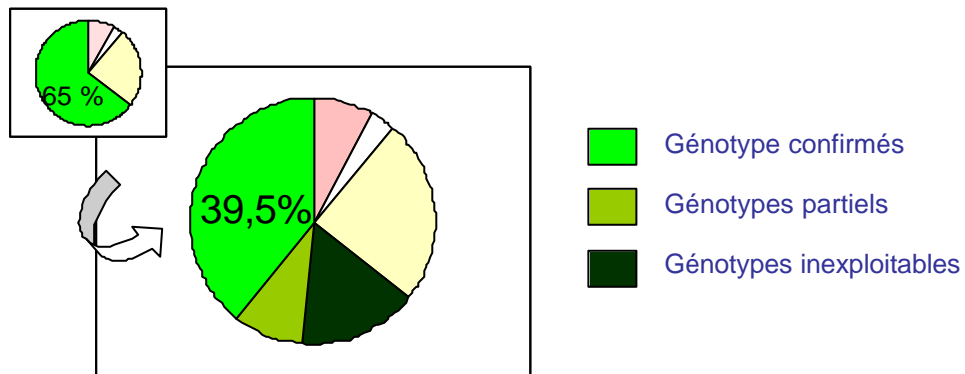
Résumé des différentes étapes nécessaires à l'analyse d'un échantillon. Plus de 2000 indices de présence « loup » ont été ainsi traités au LECA depuis 7 ans.

### 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

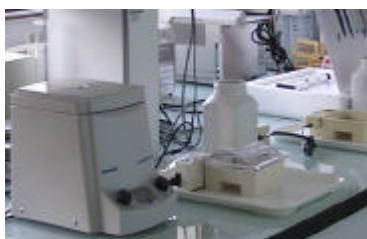
## Appareillage pour le traitement des échantillons



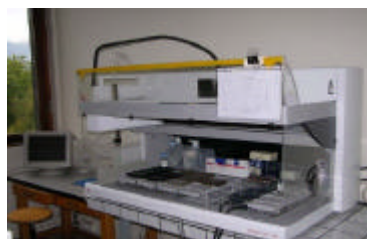
Salle extraction ADN



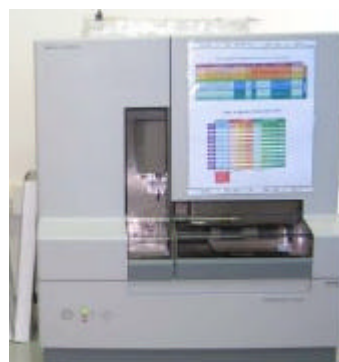
Machines PCR



Electrophorèse



Robot de pipetage



Séquenceur automatique à 16 capillaires (ABI 3130xl)



## De l'utilisation d'un outil pointu à l'interprétation des données....

**Il est difficilement envisageable de publier des données brutes, sans une phase de validation**

L'outil moléculaire non invasif, tel qu'il est utilisé pour le suivi de la population de loups, permet d'accéder à l'identification individuelle des animaux, ce que ne permet pas les autres techniques de suivi indirect. Cependant, chaque outil, aussi pointu soit-il sur le plan technologique, nécessite une part d'interprétation pour « faire parler les données brutes ». Ainsi, l'idée qu'un échantillon soit déposé dans une machine, capable de faire apparaître en sortie sur un écran le nom de l'animal, est bien sûr un peu optimiste ....

Lorsque la première étape d'amplification de l'ADN donne un résultat exploitable, la lecture d'un profil individuel se fait de façon relative en comparaison avec d'autres profils déjà identifiés auparavant. L'approche dite « multitube » (cf article précédent) permet d'assurer une répétitivité du résultat assorti d'un indice de qualité. Lorsque cet indice qualité est égal à 1, le résultat est au maximum de sa fiabilité (100 % de répétitivité). En revanche, lorsque celui-ci est moyen, il peut indiquer soit que l'échantillon était de qualité moindre pour permettre une bonne répétitivité mais que le résultat est cependant juste, soit que

l'absence de répétitivité du résultat suggère un typage erroné.

Dans ce cas, il faut alors recourir à une forme de validation croisée avec une autre source d'information indépendante du résultat génétique, cette source de donnée est la base indice du réseau GC. Cette confrontation permet ainsi de compléter le typage génétique pour interpréter un signal faible, un allèle rare, un locus particulier qui n'a pas marché.... Cette validation croisée est réalisée une fois par an entre l'ONCFS et le LECA pour le dernier jeu de données disponible.

C'est la raison pour laquelle il est difficilement envisageable de publier des résultats bruts, sans passer d'abord par cette phase de validation nécessaire à l'obtention de résultats fiables et interprétables sur le plan biologique.

C.D., Y.L., E.M., P.M.

## Des Apennins vers les Alpes : étude de la colonisation des loups

En 2001, les premières collaborations ont été initiées entre la France, l'Italie et la Suisse afin de mettre au point un système de standardisation génétique entre les différents pays pour suivre les loups avec les mêmes outils. En 2005, un travail de thèse de doctorat a débouché sur une publication dans la revue *Molecular Ecology* (Fabbri *et al*, 2007) concernant l'analyse du processus de colonisation des loups au travers des flux géniques entre les Apennins, les Alpes italiennes, françaises et suisses. L'ADN de 3068 tissus et ou fèces collectés dans les trois pays ont été génotypés à l'aide de 12 locis *µsatellites* pour mesurer :

- l'importance du goulet d'étranglement et les effets fondateurs qu'a subi la population italienne de loups au début de la colonisation,
- les intensités des flux de gènes entre les différentes entités géographiques,
- le nombre minimum d'individus colonisateurs, dont dérive en partie aujourd'hui la variabilité génétique observée dans les Alpes.

Au total, 435 loups différents ont été identifiés dans les trois entités géographiques (I, CH, F) au cours de toute la période d'étude. Les loups présents dans les Alpes ont une diversité génétique beaucoup plus faible que les loups présents dans les Apennins. Les analyses montrent également que les deux entités alpines et apennines sont génétiquement discernables. Le nombre estimé d'immigrants de première génération montre un flux quasi-unidirectionnel (avec plus de mâles que de femelles) des Apennins vers les Alpes.

Ces recherches, menées en collaboration entre les équipes italiennes, françaises et suisses, concluent donc, par la voie du suivi moléculaire indirect, que les Alpes ont été colonisées par quelques individus en dispersion depuis le nord des Apennins. Malgré un flux de gène assez modéré (de l'ordre de 2 animaux nouveaux par génération), il est estimé que 8 à 16 animaux fondateurs permettent d'expliquer la diversité génétique observée actuellement dans les Alpes.

Elena Fabbri, Christian Miquel, Vittorio Lucchini, Alberto Santini, Romolo Caniglia, Christophe Duchamp, Jean-Marc Weber, Benoît Lequette, Francesca Marucco, Luigi Boitani, Luca Fumagalli, Pierre Taberlet and Ettore Randi (2007) : **From the Apennines to the Alps : Colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Molecular Ecology* 16, 1661-1671**

## **Comment planifier la collecte des excréments ? Des stratégies différentes selon les objectifs affichés**

### *Quelques généralités ... néanmoins cruciales !*

S'il est toujours possible d'améliorer les traitements apportés à une donnée brute de terrain (statistiques, méthodes génétiques, ... etc.), sa qualité intrinsèque, ce qu'elle représente, son pouvoir informatif est par contre impossible à améliorer a posteriori, après la collecte. Toute la valeur de la donnée réside donc d'abord dans sa signification par rapport au terrain et aux questions que l'on se pose.

Prenons des exemples fictifs, frôlant la caricature pour être explicites : si on ne relevait des excréments que sur les zones de présence permanente, on n'aurait aucune information sur ... les animaux en dispersion ! Si de plus on orientait la collecte uniquement durant l'hiver, on n'aurait aucune information sur ... le régime alimentaire estival !

La façon de recueillir l'information, que ce soit dans l'espace ou au cours du temps, conditionnera notre aptitude à répondre plus ou moins correctement à telle question plutôt qu'à une autre. Il en découle donc une grande constante à toutes les études de terrain : définir les objectifs, poser les questions, doivent toujours se faire avant de partir recueillir des données. Même si cela paraît évident, il y a pléthore de situations qui démontrent au quotidien des entorses à cette règle de bon sens : combien de fois entend-on des remarques du style « récupérons déjà l'information, cela servira bien à quelque chose ensuite.... » !

### *La population de loup évolue géographiquement et numériquement : les objectifs aussi*

Qu'en est-il dans le cas du loup lors de son retour en France ? L'objectif alors affiché était d'avoir une vision à vaste échelle des bilans globaux de la dynamique de l'espèce ; pas simplement pour le plaisir de savoir, mais dans une optique de réponses apportées en terme d'utilité publique : où sont-ils, combien sont-ils, que mangent-ils ... etc. L'outil génétique était alors principalement destiné à confirmer la présence de l'espèce dans de nouveaux secteurs et à s'assurer que le régime alimentaire était bien réalisé sur des excréments de loup (ce qui n'est pas le cas dans une majorité d'études internationales engendrant des sources de biais importantes). Par ailleurs, le faible nombre de loups présents signifiait également une faible quantité d'informations disponibles : le dispositif adopté devait d'autant plus permettre de laisser « filer » le moins de données possibles à travers les « mailles du filet » ! Toutes les données disponibles étaient donc cruciales à récolter !

Le processus de colonisation aidant, d'autres questions de plus en plus précises se sont greffées sur les premiers objectifs : estimer la population par capture-marquage recapture, estimer les taux de prédateurs sur les différentes espèces de proies, estimer le régime alimentaire selon les saisons ... Il est bien sûr impossible de penser pouvoir récolter toutes les données nécessaires répondant à tous ces objectifs, à différentes échelles d'espace et de temps, sans stratégie d'échantillonnage.

### *Le prix d'une stratégie d'échantillonnage qui s'impose*

Actuellement, même si les capacités du laboratoire en charge des analyses génétiques ne cessent de s'accroître, même si les coûts sont de mieux en mieux maîtrisés, il est logique de s'interroger sur la façon de collecter les données, ne serait-ce que parce que la progression numérique et spatiale de la population de loup nous entraînerait passivement dans une quête de toujours plus de données disponibles [en gros, plus (+) de loups = plus (+) d'excréments = plus (+) d'analyses].

Il faut donc définir puis hiérarchiser les enjeux, les questions auxquelles on souhaite répondre grâce aux analyses génétiques. De même, il faut tenter d'analyser les facteurs qui pourraient influencer notre aptitude à répondre aux questions posées : supposons par exemple que les excréments recueillis dans la neige soient mieux conservés que les autres, et permettent donc de meilleures chances d'aboutir à un résultat génétique positif comme l'identification de l'animal. Il deviendrait alors tentant d'organiser la collecte en privilégiant la récolte hivernale .... mais se poserait aussi immédiatement la question de que faire lorsque des animaux vivent dans des zones jamais enneigées ? Devrait-on ignorer cette partie de la population ? Devrait-on compléter le jeu de données par une récolte effectuée durant d'autres saisons ? Définir une stratégie d'échantillonnage consiste donc à peser les avantages de tel ou tel choix d'organisation de la collecte des données en terme de capacité à répondre à telle ou telle question. Actuellement, trois « familles » de questions nécessitent des analyses génétiques comme première étape pour élaborer des réponses :

- 1) certifier la présence de l'espèce sur de nouveaux secteurs, ce qui tendrait à organiser – stratifier en jargon statisticien ! - la récolte en fonction du statut de ZPP ou non ;
- 2) étudier sa démographie - dispersion, effectifs, survie -, ce qui tendrait à stratifier la récolte par ZPP et par an voire par saison ;
- 3) analyser son régime alimentaire, ce qui tendrait à stratifier sur des schémas de communauté de proies disponibles, de type de pastoralisme, et par saison.

Evidemment, en théorie, on devrait définir trois stratégies de collecte de données permettant chacune de répondre avec le maximum d'efficacité à chaque « famille » de questions... vaste programme, certainement tout sauf simple à mettre en œuvre sur le terrain ! Comment donc procéder pour ne pas « courir » derrière la population de loups toujours changeante et être toujours « en retard » (rappelez-vous, dans le roman de Lewis Carroll, Alice découvre auprès de la Reine Rouge « ...qu'ici, il faut courir le plus vite possible pour rester sur place ... ») ?

### *Utiliser l'existant pour mieux anticiper sur l'avenir*

Nous avons la chance de disposer déjà d'une importante base de données constituée de toutes les analyses génétiques effectuées – avec les résultats obtenus – ainsi que de plusieurs « variables d'environnement » au sens large, associées à ces analyses : la date de récolte, le lieu exact de récolte, les conditions de stockage, la date d'analyse ...etc.

C'est ce jeu de données dit « exhaustif » (au prorata des données et moyens disponibles) qui va servir de base pour étudier la perte potentielle à échantillonner à tel ou tel taux, à tel ou tel endroit, sur tel ou tel échantillon... L'objectif étant bien entendu de perdre le moins pour expliquer le plus ! Et ces études-test, que nous avons déjà débutées, doivent concerner l'ensemble des objectifs précités. On peut donc effectuer, a posteriori, une étude de l'influence, par exemple, de la durée de stockage, de la saison de récolte, du fait d'être en ZPP ou pas, ...etc., sur les chances d'obtenir un génotypage positif. Par la suite, on pourrait envisager d'étudier l'impact de sélectionner telle ou telle catégorie d'échantillons (déterminée selon les résultats de l'étape précédente) sur l'effectif total estimé par la méthode Capture Marquage Recapture, ou bien sur l'imprécision autour de la valeur moyenne de cet effectif, ou bien sur l'estimation du taux de croissance. En bref, il s'agit d'organiser ce qui existe pour faire parler les données !

La deuxième étape serait donc ensuite de .... s'organiser pour à l'avenir augmenter les chances de recueillir de l'information permettant de répondre au mieux aux questions posées. Evidemment, n'ayant pas encore réalisé la première phase, il est difficile de prévoir la seconde dès à présent ! De plus, cette première phase (« faire parler les données existantes ») devra aussi être réalisée sur les indices plus classiques (observations visuelles, proies, empreintes...etc.) de façon « à peser » le poids de chaque catégorie d'indice sur les produits finis, comme les indicateurs de croissance spatiale de la population, et leur variation annuelle. On sait par exemple, hélas, que le premier indicateur de la présence du loup est souvent l'attaque sur troupeaux domestiques. Si le loup arrive dans une zone avec un mode d'élevage qui, structurellement, conduit à soustraire les ovins à la prédation (ce dont on ne se plaindra évidemment pas), comme par exemple une zone de production laitière, il y a de fortes chances que l'on mette plus de temps à documenter sa présence.

Il nous faut donc utiliser l'existant (nos bases de données constituées grâce au travail de terrain des correspondants et de leur informateurs) pour mieux anticiper sur l'avenir. Pour l'instant donc, pas question de changer les bonnes habitudes de collecte « à tout va », puisque cela contribue à abonder la base d'information qui nous permettra de mieux s'organiser plus tard. Ce vaste travail méthodologique d'exploration des liens entre nature et structure de l'information recueillie par le Réseau, et productions élaborées qui en dérivent (en gros, les indicateurs de suivi de population) fera très probablement l'objet d'une prochaine thèse co-encadrée par l'ONCFS et les équipes du CNRS maîtrisant les derniers développements en la matière. Par ailleurs, la mise en place d'une structure encore mieux adaptée, en terme de logistique et de pérennité des compétences, en matière d'analyses génétiques est en bonne voie d'aboutissement (au sein du laboratoire de P. Taberlet), ce qui permettra d'absorber un flux conséquent d'échantillons à la hauteur des objectifs à venir.

Eric Marboutin, Christophe Duchamp



## De l'analyse génétique à..... l'estimation des populations de loups

Les informations issues du génotypage des crottes peuvent connaître une seconde vie en nous renseignant sur la dynamique des populations, en particulier sur l'évolution des effectifs dans le temps. En effet, si l'on peut faire correspondre une crotte à un individu, le total des crottes collectées une année nous donne une idée de la taille de population cette même année. Une idée seulement, car ce que l'on observe n'est pas forcément ce qui est réellement présent : par exemple, si l'on récolte 50 crottes et que la probabilité de détecter une crotte est de 80 %, alors le nombre réel d'individus est évidemment supérieur à 50, très exactement  $50 / 0.8$  c'est-à-dire 62.5 individus.

Cette simple démonstration incite à s'intéresser au fait qu'on ne peut détecter dans la nature tous les individus à tout moment. Il s'agit clairement d'un problème de détection des animaux qui trouve une solution efficace dans les protocoles de capture-recapture (CR). Grâce à un suivi dans le temps d'un échantillon des individus d'une population, on peut estimer la probabilité de capture ou de détection. On peut alors corriger le nombre d'individus observés pour estimer les effectifs réels de la population, comme dans l'exemple simple qui précède. Pour estimer ces probabilités, des modèles statistiques existent (Lebreton et al. 1992) ainsi que des logiciels pour les mettre en œuvre (Choquet et al. 2004).

Malgré tout, l'utilisation des protocoles classiques de CR est particulièrement difficile pour des espèces dites discrètes (difficilement observables) telles que le loup puisqu'elle requiert, en théorie, la capture physique des individus pour leur marquage initial. L'utilisation de l'outil moléculaire permet alors un « marquage indirect », en caractérisant les signatures génétiques individuelles à partir d'échantillons d'excréments, de poils ou d'urine desquels on peut extraire l'ADN (Taberlet et al. 1999). Cette approche dite non-invasive ou non-intrusive (pas de capture effective des individus) permet d'appliquer les modèles de CR pour l'estimation des effectifs. Elle permet en outre de traiter l'ensemble de l'aire de répartition de l'espèce (Lukacs and Burnham 2005).

Toutefois, les modèles de CR reposent sur plusieurs hypothèses fortes dont une hypothèse clef pour l'estimation des effectifs d'une population, celle d'homogénéité de la probabilité de détection : cela signifie que dans les modèles classiques de CR, on suppose que chaque animal a les mêmes chances d'être recapturé. Or plusieurs éléments montrent que, dans le cas du loup, cette hypothèse n'est clairement pas remplie, et qu'il y a un mélange d'individus peu capturables et d'individus fortement capturables. Peut-être, par exemple, que les individus dominants d'un groupe utilisent plus fréquemment que les dominés leurs excréments et urines pour marquer le territoire. On les détecterait ainsi plus souvent. Une telle forme d'hétérogénéité de détection provoquant une erreur conséquente dans l'estimation de l'effectif

(Carothers 1973), il convient donc d'utiliser des modèles de CR qui en tiennent compte. Les problématiques de gestion rejoignent alors celles de la recherche fondamentale, et des collaborations entre des organismes tels que l'ONCFS et le CNRS s'avèrent fructueuses, puisque de tels modèles de CR n'ont été que très récemment développés (Pradel 2005).

Quand on applique de telles approches au cas du Loup en France, les modèles classiques donnent des effectifs parfois deux fois plus faibles que ceux issus des modèles tenant compte du fait que tous les animaux n'ont pas les mêmes chances d'être détectés !.

En conclusion, il est impératif de corriger l'estimation des effectifs en tenant compte de la détectabilité (i.e. on ne détecte qu'une partie des loups présents) mais aussi de l'hétérogénéité de détection sous peine d'une estimation fautive de la taille de population. Ces difficultés levées, les méthodes de CR appliquées à des données obtenues grâce à l'outil moléculaire sont un moyen rapide et efficace de valoriser et rentabiliser ces données. Elles permettent d'estimer les effectifs d'une population et d'évaluer des tendances au cours du temps, et ainsi d'établir des indices liés au statut de conservation d'une population.

Olivier Gimenez—C N R S

Carothers, A. D. (1973). The effect of unequal catchability on Jolly-Seber estimates. *Biometrics* 29 : 79-100.

Choquet R., Reboulet A.M., Pradel R., Gimenez O., Lebreton J. D. (2004). MSURGE : new software specifically designed for multistate capture-recapture models. *Animal Biodiversity and Conservation* 27(1) : 207-215.

Lebreton, J. D., et al. (1992). Modeling Survival and Testing Biological Hypotheses Using Marked Animals - a Unified Approach with Case-Studies. *Ecological Monographs*, 1992. 62 : 67-118.

Lukacs P.M. and Burnham K.P. (2005). Review of capture-recapture methods applicable to noninvasive genetic sampling. *Molecular Ecology*. 14 : 3909-3919.

Pradel, R., Multievent: An extension of multistate capture-recapture models to uncertain states. *Biometrics*, 2005. 61(2) : p. 442-447.

Taberlet, P., Waits L. P., et Luikart G., Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology & Evolution*, 1999. 14 : 323-327.

## Les résultats du suivi moléculaire non invasif des loups par zone de présence permanente

Suite au changement de séquenceur du laboratoire de génétique (LECA), tous les anciens profils individuels ont fait l'objet d'une relecture afin de pouvoir les comparer aux nouveaux génotypes obtenus. Les génotypes sont dorénavant nommés « Si-j » et correspondent à une codification de la carte d'identité génétique individuelle d'un animal (le génotype). En parallèle, le développement de l'indice qualité IQ (cf. article précédent) a permis d'affecter à chaque typage un degré de « confiance » dans le résultat (lié à sa stabilité observée lors des 8 répétitions effectuées), afin de limiter au maximum le risque de fausse identification (*c.a.d.* considérer, à tort, un nouveau génotype). Aussi, nous n'avons conservé pour l'analyse que les typages dit « de bonne qualité », consi-

dérés comme tel dès que l' IQ > 0,6 . En effet en dessous de cette valeur, le typage génétique est de « piètre » qualité et son interprétation reste délicate. Le QDN N°14 présentait un état partiel d'avancement des résultats pour la période 2002 à 2004. Cette synthèse reprend donc la suite et présente les résultats obtenus sur les échantillons récoltés postérieurement à 2002.

Chaque génotype a été ventilé dans les différents massifs où les échantillons ont été récoltés. Les tableaux récapitulent donc tous les génotypes (correspondant à des individus passés/ou restés dans chacune des 23 ZPP) (figure 1). Lorsque cela est possible les mouvements de dispersion d'individus sont représentés sur les cartes.

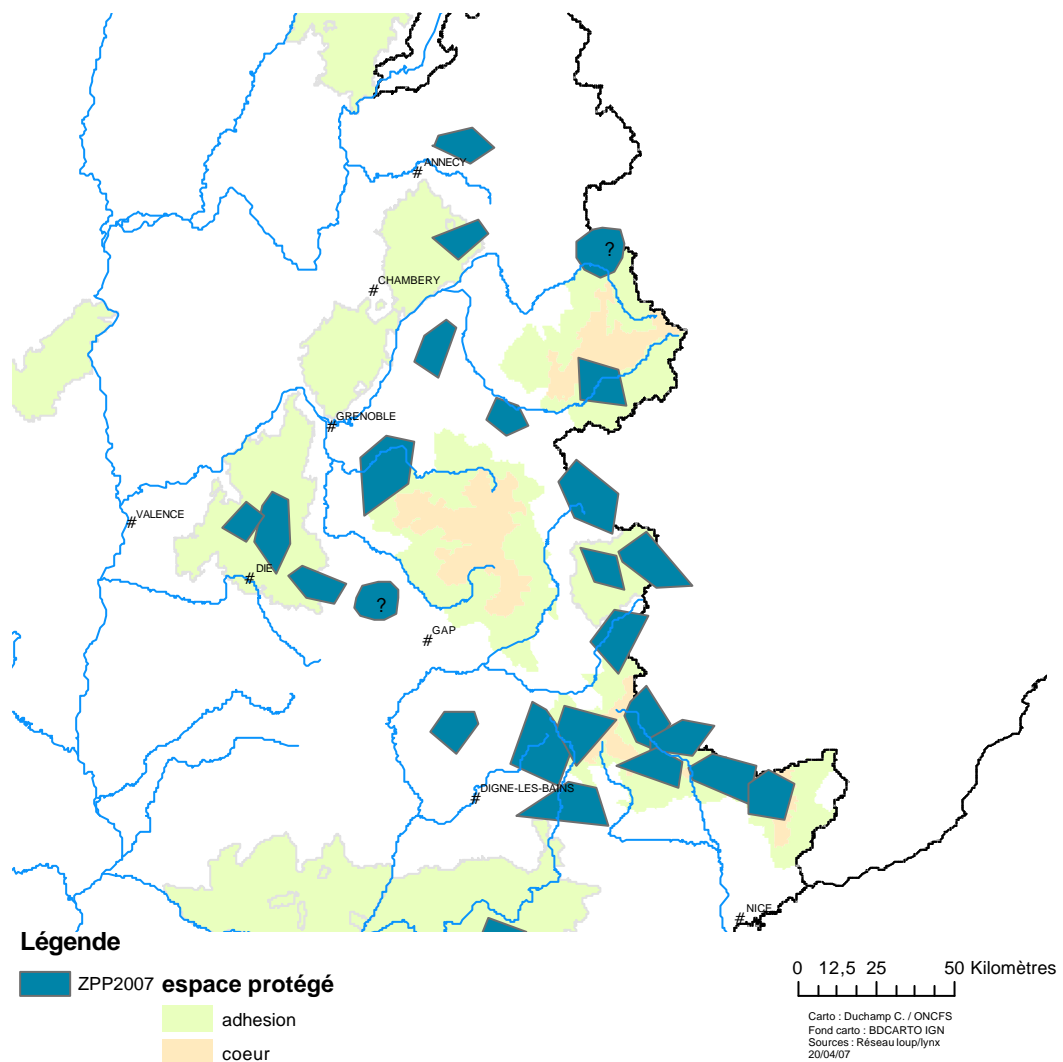


Figure 1 : Localisation des 23 ZPP établies sur la base du suivi moléculaire non invasif des loups de 2003 à 2006.

## Mercantour

Depuis 2003, nous retrouvons les 4 ZPP historiques du Mercantour. Du Sud vers le nord, le positionnement des individus génotypés sur la carte (figure 2) montre que la zone de confrontation entre la meute de **Vésubie Roya** (VR) et de **Vésubie Tinée** (VT) se situe sur la montagne séparant les vallées de la Gordolasque et de la Madone de Fenestre. Un point particulier concerne l'âge d'un mâle et d'une femelle qui sont toujours présents dans la meute VR depuis respectivement au moins 8 et 10 ans. Quatre individus dispersés (tableau 1) sont identifiés, et se sont établis par la suite à Canjuers (83), dans le **Haut Verdon** (04), les **Monges** (04) ou encore plus au nord dans le **Jocou** (26).

La meute de Vésubie Tinée fréquente la rive gauche de la Tinée. Dans cette meute historique ont été détectés 35 individus différents : certains sont nés et/ou restés à un moment ou un autre depuis 1992, d'autres n'ont fait qu'y passer (tableau 2). Bon nombre d'entre eux sont retrouvés dans d'autres massifs au gré de la dispersion, notamment dans le **Queyras** en 1998, les **Monges** en 1999, **les Pyrénées Orientales** en 2000, les **Trois Evêchés** en 2003 ou encore le **Taillefer** en 2004 (mâle prélevé).

La rivière Tinée marque toujours la séparation avec la meute de

**Moyenne Tinée** dont le territoire s'étend jusque dans la vallée du **Haut Var**. Une femelle d'au moins 9 ans était encore présente dans cette meute en 2006.

La meute de **Haute Tinée** fréquente le versant français jusqu'au vallon de Douans (limite sud est). Deux femelles et deux mâles étaient régulièrement détectés jusqu'en 2003 puis la composition de la meute change à partir de cette date. Notons encore qu'une des femelles (S0-2) est présente depuis au moins 9 ans dans cette meute. Une femelle et un mâle ont dispersé respectivement vers le **Grand Coyer** (04, peut-être les individus fondateurs ?) et les **Trois Evêchés Ubaye** en 2004.

En revanche, la situation est moins claire concernant la ZPP de **Basse Stura** identifiée côté italien et qui déborde sur le versant français de la Tinée. En effet, tous les animaux décelés dans cette zone tampon ne sont pas résidents : l'un est parti dans les **Bauges** (tué en 2005), un nouvel animal identifié en 2005 est retrouvé dans les **Pyrénées Orientales** en 2006 ; enfin 2 femelles ne sont plus retrouvées depuis 2003 (tableau 4). N'ayant pas connaissance des résultats italiens, les données françaises ne permettent pas de conclure à la présence permanente d'animaux résidents dans une ZPP séparée des autres. Les échantillons récoltés en zone périphérique du PNM sont trop peu nombreux pour permettre d'interpréter plus avant les limites des territoires de meutes, notamment à l'ouest.

Tableau 1 : Histoire des génotypes identifiés dans la ZPP de Vésubie Roya

Genotype trans	Massif	Sexe	N contacts	Années												Rq		
				1995/96	1996/97	1997/98	1998/99	1999/00	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06				
S0-14	Merc Vésubie-Roya	F	2			X												
S0-15	Merc Vésubie-Roya	F	1				X											
S0-17	Merc Vésubie-Roya	F	1					X										Louve blessée VT
S0-20	Merc Vésubie-Roya	M	3					X										
S0-24	Merc Vésubie-Roya	M	1			X												
S0-28	Merc Vésubie-Roya	M	1					X										
S0-3	Merc Vésubie-Roya	F	2					X										
S0-30	Merc Vésubie-Roya	M	1				X		X									
S0-33	Merc Vésubie-Roya	M	1	X														
S0-39	Merc Vésubie-Roya	M	1	X														
S0-8	Merc Vésubie-Roya	F	1						X									
S10-11	Merc Vésubie-Roya	M	19			X	X	X	X	X				X	X			
S10-5	Merc Vésubie-Roya	M	1						X									
S16-7	Merc Vésubie-Roya	F	2													X		
S3-8	Merc Vésubie-Roya	M	1				X											Vers Canjuers 2001
S4-12	Merc Vésubie-Roya	M	2							X								Vers Haut Verdon
S5-17	Merc Vésubie-Roya	M	1							X								Vers Jocou 2003
S5-20	Merc Vésubie-Roya	M	1						X									Vers Monges 2002
S5-7	Merc Vésubie-Roya	F	1							X								
S6-2	Merc Vésubie-Roya	F	2							X								
S6-3	Merc Vésubie-Roya	F	12	X		X	X	X			X				X			
S6-5	Merc Vésubie-Roya	M	2							X								
S6-6	Merc Vésubie-Roya	M	1							X								
S8-9	Merc Vésubie-Roya	M	1				X											

(Toute utilisation des données est soumise à autorisation de l'animateur du Réseau loup)

Tableau 2 : Histoire des génotypes identifiés dans la ZPP de Vésubie Tinée

Genotype trans	Massif	Sexe	N contacts	1994/95	1995/96	1996/97	1997/98	1998/99	1999/00	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	Rq
S0-13	Merc Vésubie-Tinée	F	2			X											
S0-17	Merc Vésubie-Tinée	F	7												X	S	Louve blessée
S0-19	Merc Vésubie-Tinée	M	6			X	X										
S0-21	Merc Vésubie-Tinée	M	3			X	X										
S0-22	Merc Vésubie-Tinée	M	2				X	X									
S0-23	Merc Vésubie-Tinée	M	23	X	X	X	X	D									Explore HT en 1998 - braconné
S0-24	Merc Vésubie-Tinée	M	4			X	X										
S0-25	Merc Vésubie-Tinée	M	6			X	X										Vers Pyrénées 2000
S0-26	Merc Vésubie-Tinée	M	5				X			X							
S0-27	Merc Vésubie-Tinée	M	4		X												
S0-35	Merc Vésubie-Tinée	M	6				X										
S0-36	Merc Vésubie-Tinée	M	1		X												
S0-37	Merc Vésubie-Tinée	M	4		X	X	X										
S0-5	Merc Vésubie-Tinée	F	2				X										Vers Béal-T 2001
S0-6	Merc Vésubie-Tinée	F	1					X									
S0-7	Merc Vésubie-Tinée	F	23			X	X	X									
S10-3	Merc Vésubie-Tinée	F	6									X					
S10-8	Merc Vésubie-Tinée	M	13									X					Vers Parpaillon 2005
S1-2	Merc Vésubie-Tinée	M	64					X	X	X	X	X	X	X	X		
S12-9	Merc Vésubie-Tinée	F	1									D					Louvetteau empoisonné
S1-4	Merc Vésubie-Tinée	F	1				X										Vers Monges 1999
S16-11	Merc Vésubie-Tinée	M	1											X			
S16-4	Merc Vésubie-Tinée	F	1											X			
S16-5	Merc Vésubie-Tinée	F	1											X			Vers HT et Grd Cover 2006
S1-9	Merc Vésubie-Tinée	F	1			X											Vers Queyras 1998
S2-2	Merc Vésubie-Tinée	F	16				X	X	X								Vers Basse Stura 2002
S2-8	Merc Vésubie-Tinée	M	2		X		X										Vers HT 1998
S3-4	Merc Vésubie-Tinée	F	2			X											Vers Belledonne 1999
S5-19	Merc Vésubie-Tinée	M	6										X				Vers Taillefer 2004 (tué)
S6-1	Merc Vésubie-Tinée	F	2								X	X					Vers Trois Evêchés 2003
S7-3	Merc Vésubie-Tinée	F	2								X						
S7-4	Merc Vésubie-Tinée	F	21					X	X	X	X	X					
S7-7	Merc Vésubie-Tinée	M	1								X						
S8-6	Merc Vésubie-Tinée	M	1										X				
S8-9	Merc Vésubie-Tinée	M	1									X					

Tableau 3 : Histoire des génotypes identifiés dans la ZPP Moyenne Tinée – Haut Var

Genotype trans	Massif	Sexe	N contacts	1995/96	1996/97	1997/98	1998/99	1999/00	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2005/06	Rq
S0-16	Merc Moy Tinée	F	1				X							
S0-29	Merc Moy Tinée	M	2			X		X						
S0-34	Merc Moy Tinée	M	1					X						
S1-1	Merc Moy Tinée	F	31		X	X	X	X	X	X	X		X	
S1-10	Merc Moy Tinée	M	17							X	X	X	X	Depuis BéalT 2001
S12-14	Merc Moy Tinée	M	1	D										Tué par balle
S16-8	Merc Moy Tinée	F	4										X	
S5-7	Merc Moy Tinée	F	6					X	X	X	X			Vers Ht Verdon B
S8-3	Merc Moy Tinée	F	1								X			

Tableau 4 : Histoire des génotypes identifiés dans la ZPP de Haute Tinée

Genotype_trans	Massif	Sexe	N contacts	Années											Rq
				1997/98	1998/99	1999/00	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06			
S0-2	Merc Hte Tinée	F	15	X	X	X					X	X	X		
S10-2	Merc Hte Tinée	F	3							X				Vers Grd Coyer 2004	
S10-7	Merc Hte Tinée	M	2							X					
S11-6	Merc Hte Tinée	M	1							X				Vers Trois Evêchés 2004	
S16-1	Merc Hte Tinée	F	5									X	X		
S16-12	Merc Hte Tinée	M	1									X			
S16-2	Merc Hte Tinée	F	1									X			
S16-9	Merc Hte Tinée	M	2										X		
S2-8	Merc Hte Tinée	M	71	X	X	X	X	X	X					Depuis VT 1996	
S5-6	Merc Hte Tinée	F	19		X	X	X	X	X						
S7-10	Merc Hte Tinée	M	3				X	X	X						
S7-12	Merc Hte Tinée	M	2						X						
S8-10	Merc Hte Tinée	M	2							X					
S8-4	Merc Hte Tinée	F	2							X					
S9-13	Merc Hte Tinée	M	1									X		Vers Bauges 2005	

## Ubaye et Haute Provence

C'est à partir de 2004 que s'est formée la meute du **Haut Verdon Bachelard**. Par reconstitution de l'historique de recapture génétique, les 2 individus fondateurs proviennent selon toute vraisemblance de la Moyenne Tinée pour la femelle et de la Vésubie Roya pour le mâle (tableau 7). La rivière Verdon marque clairement la limite avec le territoire de la meute des **Trois Evêchés Ubaye** qui fréquente la rive gauche. Pour la saison 2005-2006, 6 animaux différents étaient détectés par la génétique dans la meute (le suivi hivernal relevait entre 5 et 7 loups pour cette même saison).

Depuis 2005, des loups fréquentent le massif du **Grand Coyer** mais le suivi hivernal ne permettait pas de différencier cette zone de la ZPP du Haut Verdon-Bachelard et/ou de celle des Trois Evêchés Ubaye. La complémentarité du suivi estival (cf. article dans le supplément à ce numéro) et des typages génétiques permet aujourd'hui de montrer qu'il s'agit d'un groupe de loups indépendant tenant un territoire, composé d'au moins un mâle et une femelle en 2006 (tableau 8).

Le massif des **Monges** est fréquenté par les loups depuis 1998. Les premières analyses montraient un fort renouvellement d'animaux sur ce massif au fil des saisons. Après 2002, les dernières analyses montrent que le même mâle, malgré une absence de détection en 2003 et 2004, est toujours présent sur le massif en 2006, accompagné d'une

femelle (tableau 9). Le suivi estival de cette année n'a pas permis d'identifier si la reproduction a été effective cet été (cf. article dans le supplément à ce numéro)

Enfin la meute du **Parpaillon-Ubaye** est constituée depuis 2004, elle était composée d'au moins 4 mâles et 3 femelles en 2005/2006 (le suivi hivernal relevait un EMR de 5 à 8 loups). Les individus fondateurs du groupe sont, selon toute vraisemblance, un mâle du Béal-Traversier et une femelle du Queyras. La présence d'un individu relevé souvent seul en marge du groupe par les correspondants est ici identifié : ce mâle (S10-8), génotypé à 2 reprises, est un disperseur issu de la meute de Vésubie Tinée en 2003. Son appartenance à la meute ou son statut solitaire ne sont pas encore interprétables vu le faible nombre de typage le concernant.

## Var

Depuis 1998, des indices de présence de loups sont identifiés dans le massif de **Canjuers**. Ce n'est qu'en 2001, que le premier typage individuel montre la présence d'un mâle apparemment seul. Les dernières analyses (tableau 5) montrent en effet qu'entre 2001 et 2004, le même mâle (S3-8), par ailleurs originaire de Vésubie Roya, était identifié à chaque typage. Depuis 2004, ce mâle n'est plus détecté. En revanche c'est un autre mâle (S4-9) qui est identifié à plusieurs reprises et encore présent en 2006.

Tableau 5 : Histoire des génotypes identifiés dans la ZPP de Canjuers

Genotype_trans	Massif	Sexe	N contacts	Années					Rq
				2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	
S3-8	Canjuers	M	4	X	X	X			Depuis VR 1999
S4-9	Canjuers	M	2				X	X	



Tableau 6 : Histoire des génotypes identifiés dans la ZPP de Trois Evêchés Ubaye

Genotype trans	Massif	Sexe	N contacts	Rq					
				2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	
S12-12	3évêché-Ubaye	M	1				X		Depuis Ht Var
S14-9	3évêché-Ubaye	M	2				X		Vers Bauges 2006
S15-3	3évêché-Ubaye	M	2				X		
S15-4	3évêché-Ubaye	M	2			X			
S15-8	3évêché-Ubaye	F	2				X		
S17-4	3évêché-Ubaye	F	1					X	
S4-1	3évêché-Ubaye	F	8	X	X	X			
S5-21	3évêché-Ubaye	M	3	X			X		
S6-1	3évêché-Ubaye	F	4			X	X		Depuis VT 2002

Tableau 7 : Histoire des génotypes identifiés dans la ZPP de Haut Verdon-Bachelard

Genotype trans	Massif	Sexe	N contacts	Rq					
				2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	
S13-6	Haut Verdon-Bachelard	F	2		X				
S17-6	Haut Verdon-Bachelard	F	1					D	
S4-12	Haut Verdon-Bachelard	M	8	X	X	X			Depuis VR 2002
S4-13	Haut Verdon-Bachelard	M	1		X				
S4-6	Haut Verdon-Bachelard	F	1	X					
S5-7	Haut Verdon-Bachelard	F	3		X				Depuis MT 2002

Tableau 8 : Histoire des génotypes identifiés dans la ZPP du Grand Coyer

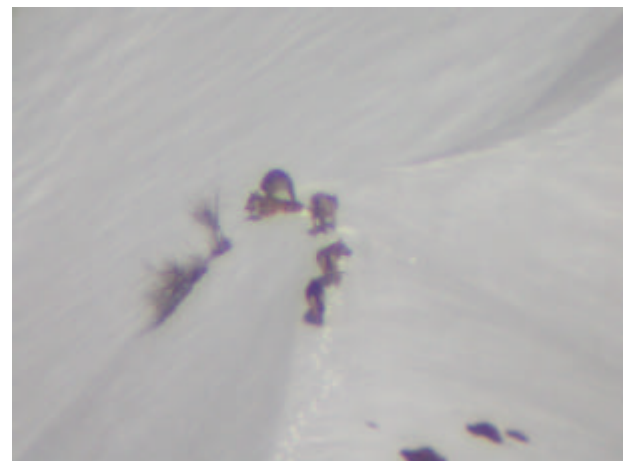
Genotype trans	Massif	Sexe	N contacts	Rq			
				2004/05	2005/06	2006/07	
S10-2	Grand Coyer	F	1	X			Depuis HT 2003
S12-3	Grand Coyer	M	2		X	X	
S16-5	Grand Coyer	F	1		X		Depuis HT 2004
S4-7	Grand Coyer	M	1	X			

Tableau 9 : Histoire des génotypes identifiés dans la ZPP des Monges

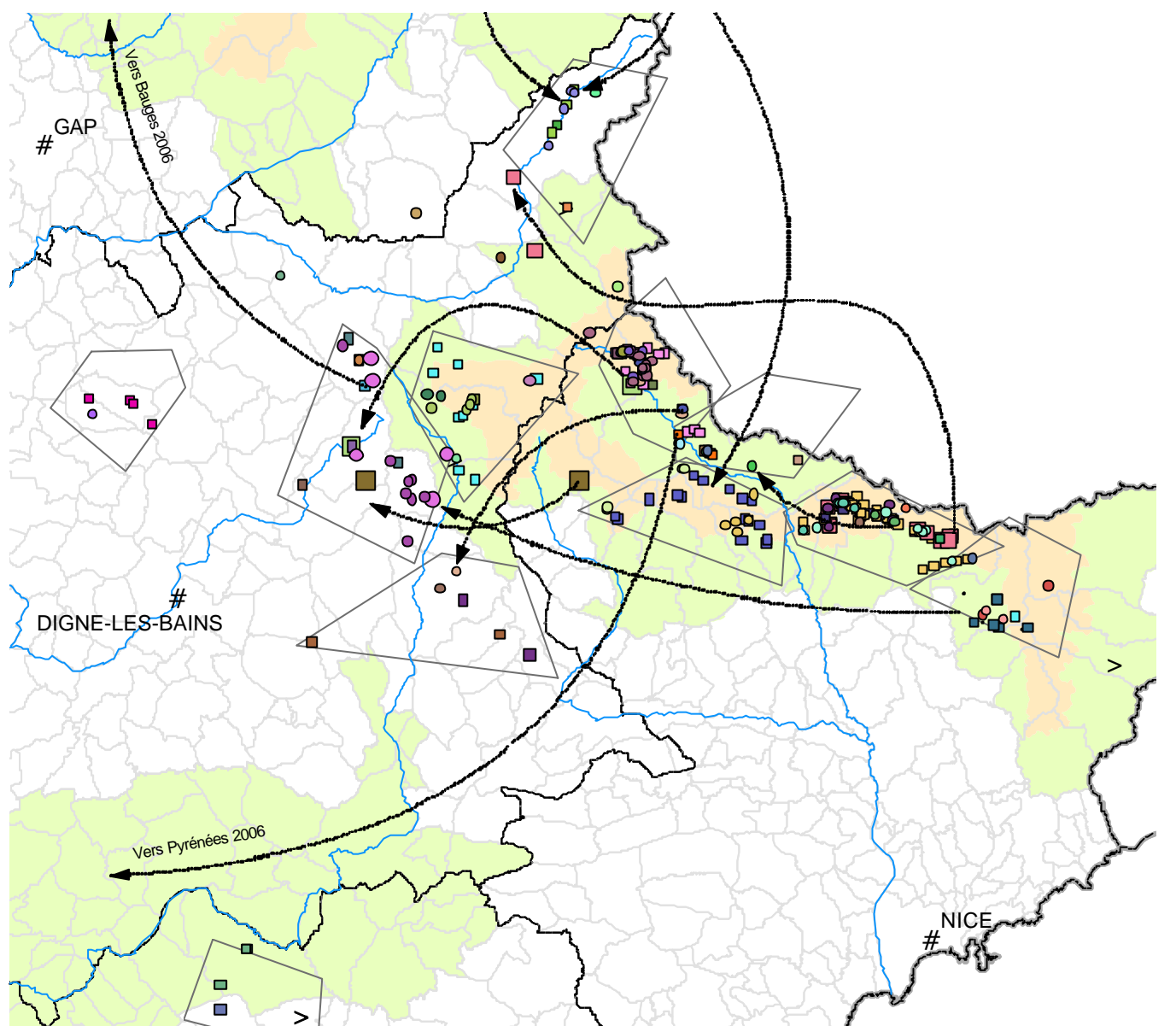
Genotype trans	Massif	Sexe	N contacts	Rq									
				1998/99	1999/00	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06		
S1-4	Monges	F	3	X	X								Depuis VT 1998
S14-4	Monges	F	1									U	
S1-5	Monges	M	2		X								
S1-6	Monges	F	1		X								
S1-8	Monges	M	2				X						
S5-20	Monges	M	4				X				U	U	Depuis VR 2001

Tableau 10 : Histoire des génotypes identifiés dans la ZPP Parpaillon-Ubaye

Genotype trans	Massif	Sexe	N contacts	Rq				
				1996/97	...	2003/04	2004/05	2005/06
S10-8	Parpaillon Ubaye	M	2				X	Depuis VT 2003
S11-2	Parpaillon Ubaye	F	1			X		Depuis Queyras 2002
S11-4	Parpaillon Ubaye	F	1	D				Tué par balle
S11-5	Parpaillon Ubaye	M	1				D	Louveteau accidenté
S12-1	Parpaillon Ubaye	F	1				X	
S13-4	Parpaillon Ubaye	F	4				X	Depuis Queyras 2004
S14-8	Parpaillon Ubaye	F	1				X	
S15-1	Parpaillon Ubaye	M	1				X	
S15-5	Parpaillon Ubaye	M	3				X	Depuis Béal 2005
S7-6	Parpaillon Ubaye	F	1			S		Tir par balle



Meute de loups de la Haute Tinée (06) photographiée en digiscopie par T. Coulée agent du SD de l'ONCFS des Alpes-Maritimes



**Légende**

- > Evénements MORT **espace protégé**
- ZPP2007
- limite communale
- adhesion
- coeur

0 5 10 20 Kilomètres

Carto : Duchamp C. / ONCFS  
 Fond carto : BDCARTO IGN  
 Sources : Réseau loup/lynx  
 2004/07

Figure 2 : Répartition des différents loups identifiés depuis 2003 dans les Alpes Maritimes et les Alpes de Haute-Provence. Chaque symbole représente un génotype différent (carré pour les mâles et cercle pour les femelles). Cf tableaux pour détail des génotypes.

### Queyras et Clarée

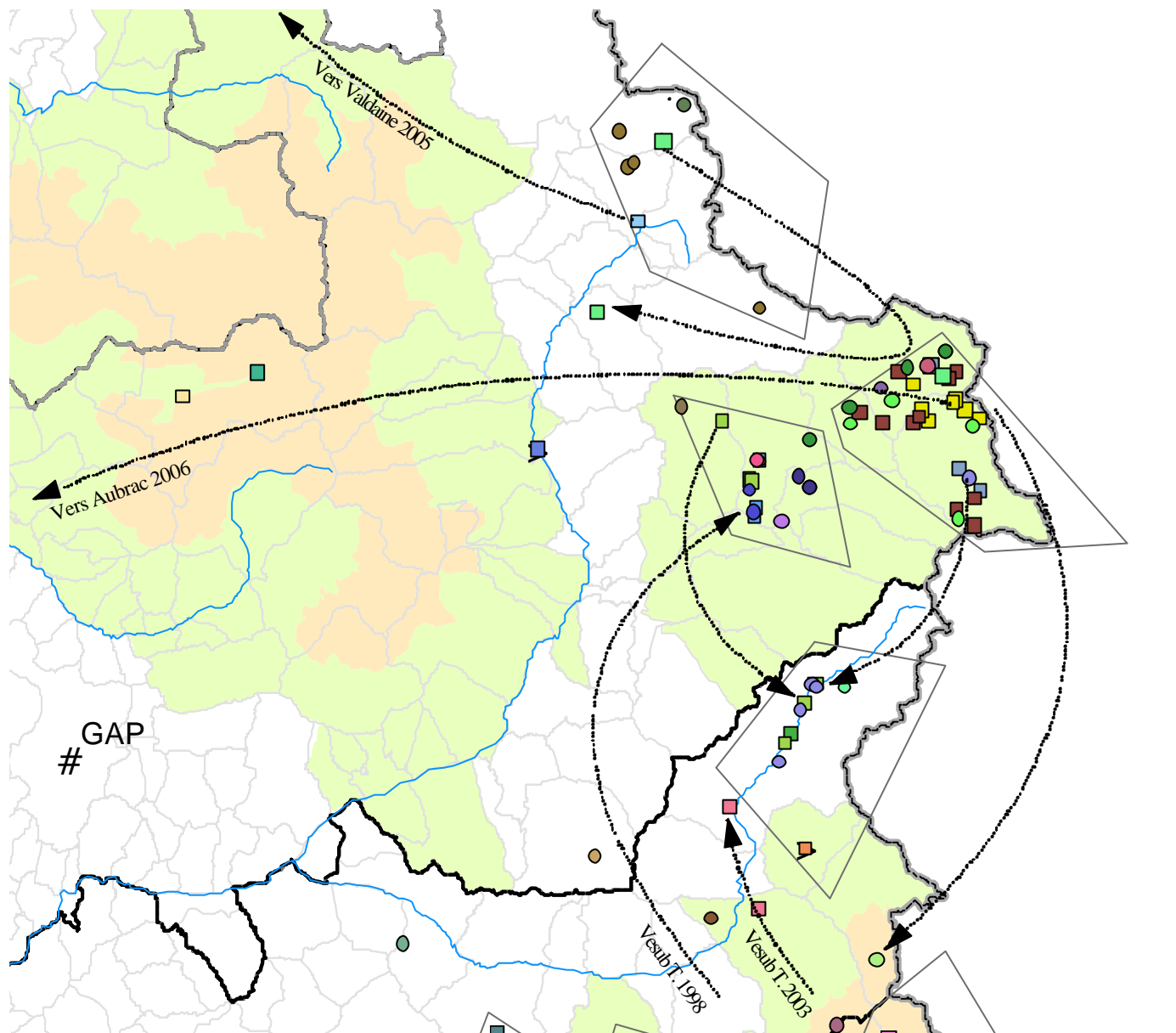
Avant 2001, plusieurs génotypes étaient retrouvés indifféremment dans les 2 secteurs, ce qui laissait à penser qu'un seul et même groupe d'animaux était présent (tableau 11). Ce n'est que depuis 2001 que les ZPP du **Queyras** et **Béal-Traversier** se sont différenciées en deux meutes distinctes, avec des individus localisés soit dans le haut Guil (meute du Queyras), soit dans le bas Guil (meute du Béal-Traversier) (Figure 3). Bien entendu, les limites des territoires des meutes sont fluctuantes chaque année au gré des confrontations entre meutes. L'exemple de la meute du Béal-Traversier est caractéristique, car celle-ci a gagné du terrain vers l'est repoussant celle du Queyras un peu plus vers la frontière italienne. Cette interprétation issue des données génétiques est confortée de façon croisée par la quasi-absence d'attaques dans la vallée du haut Guil, constituant sans doute la zone tampon entre les 2 meutes.

La dispersion de deux femelles depuis la Vésubie-Tinée en 1997 et 1998 semble être à l'origine de la constitution en meute. Ainsi 29 génotypes différents ont été détectés dans ces deux ZPP sur les 10 dernières années. Notons qu'un mâle (S1-13) est présent dans la meute du Queyras depuis 1998 (au moins 8 ans). De ces deux ZPP sont issus plusieurs mouvements de dispersion (vers le Parpaillon -Ubaye, Taillefer...), et notamment quelques mouvements de dispersion longue distance vers les Pyrénées en 2003 (S1-19) et vers le Massif Central en 2006 (S1-17).

Dans la ZPP de **Clarée-Bardonecchia**, 3 M et 2 F étaient identifiés en 2002-2003 (tableau 12). Les années suivantes, seul un ou deux génotypes ont été détectés. Le faible nombre d'échantillons disponibles, ajouté au caractère transfrontalier de cette meute ne permet pas d'interpréter plus avant les données. Notons simplement que cette meute utilise tout le versant français derrière la frontière franco-italienne des communes de Cervières à Névache. Concernant les mouvements de dispersion, le mâle prélevé en Valdaine (38) en 2005 est issu de cette meute.

Tableau 11 : Histoire des génotypes identifiés dans la ZPP du Queyras et Béal Traversier

Genotype trans	Massif	Sexe	N contacts	Années											Rq		
				1997/98	1998/99	1999/00	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06					
S0-42	Béal-Traversier	M	1				X										
S0-5	Béal-Traversier	F	4				X	X		X	X						Depuis VT 1988
S1-10	Béal-Traversier	M	6				X										Vers MT 2001
S1-13	Béal-Traversier	M	1	X													
S12-13	Béal-Traversier	M	2						X		X						
S13-5	Béal-Traversier	F	1							X							
S14-6	Béal-Traversier	F	2											X			
S14-7	Béal-Traversier	F	1											X			
S15-5	Béal-Traversier	M	3										X				Vers Parpaillon 2005
S17-2	Béal-Traversier	F	1											X			
S1-9	Béal-Traversier	F	1				X										Vers Queyras 2001
S7-9	Béal-Traversier	M	1								D						Collision
S8-7	Béal-Traversier	M	1		X												
S11-2	Queyras	F	1						X								Vers Parpaillon 2003
S1-13	Queyras	M	10	X			X	X	X	X	X	X	X	X			
S1-15	Queyras	F	10				X	X						X			
S1-17	Queyras	M	6				X	X									Vers Aubrac 2006
S1-18	Queyras	F	2				X										Vers Taillefer 2003
S1-19	Queyras	F	3				X										Vers Pyrénées 2003
S1-20	Queyras	F	6				X										
S1-24	Queyras	F	1				X										
S12-8	Queyras	F	1				D										collision
S13-3	Queyras	F	5							X	X						
S17-1	Queyras	F	1											X			
S17-3	Queyras	NI	1										X				
S1-9	Queyras	F	12	X	X		X	X									Depuis VT 1997
S2-5	Queyras	F	2						X								
S4-8	Queyras	M	3						X	X							
S5-15	Queyras	M	1							X							Transit depuis Clarée



**Légende**

- > Evénements MORT **espace protégé**
- ZPP2007
- limite communale
- adhesion
- coeur

0 3,5 7 14 Kilomètres

Carto : Duchamp C. / ONCFS  
 Fond carto : BDCARTO IGN  
 Sources : Réseau loup/lynx  
 20/04/07

Figure 3 : Répartition des différents loups identifiés depuis 2003 dans les Hautes Alpes et limitrophes. Chaque symbole représente un génotype différents (carré pour les mâles et cercle pour les femelles). Cf tableaux pour détail des génotypes.

Tableau 12 : Histoire des génotypes identifiés dans la ZPP de la Clarée

Genotype trans Massif		Sexe	N contacts	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	Rq
S1-14	Clarée	F	3	X	X				
S4-5	Clarée	F	4			X	X	X	
S5-10	Clarée	M	1		X				
S5-15	Clarée	M	2		X	X			
S5-16	Clarée	M	1		X				
S5-2	Clarée	F	1			X			
S5-4	Clarée	F	1		X				
S9-12	Clarée	M	1				X		Vers Valdaine 2005

### Dévoluy et Jocou

La présence du loup est permanente dans le massif du Dévoluy depuis 2005, avec cependant aucun signe de constitution en meute. Un seul individu a toujours été détecté par le suivi des traces jusqu'en 2006. Le génotype de cet animal a pu être déterminé (S9-11). Après reconstitution de son parcours, il s'agit d'un mâle déjà identifié en Haute Maurienne (73) en 2005, détecté ensuite dans le Valgaudemard (05) et enfin dans le Dévoluy (figure 4). Depuis 2007, deux loups sont présents sur le site en

limite avec la ZPP du Jocou. Les typages de ces animaux ne sont pas encore établis. En effet, ceux-ci pourraient être mis en relation avec la ZPP voisine du Jocou (26) dans laquelle un mâle (S5-17, dispersant de la meute de Vésubie-Roya) est présent de façon indépendante aux autres ZPP depuis 2003. Celui-ci a de plus réalisé quelques déplacements similaires au premier, dans le Valgaudemard. S5-17 et S9-11 étaient présents dans ce secteur en 2004-2005, rejoignant ainsi les impressions de terrain de la présence de 2 animaux différents de part leur divergence sur la façon d'attaquer les troupeaux domestiques.

Tableau 13 : Histoire des génotypes identifiés dans la ZPP du Dévoluy-Fareau-Durbon et du Jocou

Genotype trans	Massif	Sexe	N contacts				Rq
			2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	
S9-11	Ecrins Sud	M	1		X		
S9-11	Dévoluy-Fareau-Durbon	M	1			X	Depuis Hte Maurienne 2005
S5-17	Jocou	M	6	X	X		Depuis VR 2001
S5-17	Ecrins Sud	M	1	X			

### Vercors Belledonne Maurienne

C'est en 1998 sur la partie iséroise des **hauts plateaux du Vercors** que la présence du loup a été confirmée pour la première fois et s'est rapidement étendue sur l'ensemble du massif. Une femelle (S2-4) est présente depuis au moins 9 ans dans la meute et accompagnée de près par un mâle (S2-6). Cinq individus mâles différents n'ont été contactés qu'une seule fois sur cette ZPP.

En 2003, les impressions de terrain des correspondants laissent à penser qu'un autre groupe prospecte plus à l'ouest. Cette différenciation sera effective a posteriori avec l'identification des individus par la génétique, notamment une femelle (S5-3) contactée à plusieurs reprises, et apparentée à une zone géographique distincte: le **Vercors Ouest**. Le suivi estival de cette année (cf. article dans le supplément à ce numéro) confirme la présence de cette meute sur le même territoire avec une reproduction identifiée. Des échantillons récoltés en 2006 sont en attente de résultats et permettront sans doute d'interpréter plus avant la composition de cette meute pour l'année en cours.

Tableau 14 : Histoire des génotypes identifiés dans les ZPP du Vercors hauts plateaux et Vercors Ouest

Genotype trans	Massif	Sexe	N contacts	Années							Rq	
				1998/99	1999/00	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05		2005/06
S10-4	Vercors Ht plateau	M	2						X	X		
S2-4	Vercors Ht plateau	F	33	X	X	X	X	X	X	X	X	
S2-6	Vercors Ht plateau	M	31		X	X	X	X	X	X		
S2-9	Vercors Ht plateau	M	1			X						
S3-6	Vercors Ht plateau	M	1				X					
S3-9	Vercors Ht plateau	M	1				X					
S5-13	Vercors Ht plateau	M	1					X				
S5-1	Vercors Ouest	F	1							D		Tir de prélèvement
S5-12	Vercors Ouest	M	4					X				
S5-3	Vercors Ouest	F	6					X	X	X		

### Belledonne, Taillefer et Maurienne

La meute de **Belledonne** fréquente la partie nord de cette chaîne trans-départementale entre l'Isère et la Savoie. Quinze individus différents sont passés et/ou restés sur le massif ces 10 dernières années, abritant pendant plusieurs hivers consécutifs, la plus grosse meute détectée dans les Alpes du Nord (effectif minimum de 7 loups en 2003-2004). Une femelle (S3-4), originaire de la Vésubie-Tinée et contactée également en Haute-Maurienne, avait été identifiée par un premier excrément en 1998 et, malgré une absence de détection entre 1999-2000, est présente sur le secteur jusqu'à fin 2003. Le mâle adulte (S3-5) qui a été tué en 2006 dans le cadre des dispositions réglementaires était présent depuis 2001. Depuis 2005, le nombre d'indices de présence récoltés est à la baisse, malgré une reproduction confirmée l'été 2006, ce qui limite l'interprétation dans la fréquentation récente du territoire. Un déplacement des animaux en dehors des zones habituelles est probable.

Depuis 2002, des indices épars de présence de l'espèce sont relevés sur le massif du **Taillefer**. Une femelle (contactée auparavant dans le Queyras) et deux mâles fréquentent le territoire. En 2004, quatre individus avaient même pu être observés lors

des affûts réalisés dans le cadre du protocole de tir de prélèvement. Suite au prélèvement du mâle adulte (S5-19, venu de Vésubie-Tinée), la structure du groupe semble avoir éclaté car on dénote une quasi-absence de détection sur le secteur. Un nouvel individu mâle est identifié en 2006 avec un nombre croissant d'indices relevés sur le massif de Chamrousse. Ce déplacement de fréquentation en rive droite de la Romanche lui vaut la dénomination actuelle de ZPP du Taillefer-Luitel.

La **Haute Maurienne**, au sud du massif de la Vanoise, a été ponctuellement fréquentée en 1997 par une femelle (S3-4) et en 1999 par un mâle (S0-43), individus en dispersion vers Belledonne. Après une absence de détection de plusieurs années, une meute est identifiée en 2004-2005, et composée d'au moins 1 femelle et 2 mâles. S8-5 est mâle qui appartient la meute du Thabor Galibier (mouvement exploratoire en Haute Maurienne)

Depuis 2004, la meute du Thabor-Galibier s'est installée dans la vallée de la Maurienne, limitrophe avec le département des Hautes-Alpes. Huit typages individuels différents ont pu être identifiés dont ceux de deux louveteaux. En 2005-2006, l'effectif minimum retenu était de 8 individus. En 2006, deux femelles (S14-1 et S14-5) et un mâle (S14-11) ont été identifiés par des excré-

Tableau 15 : Histoire des génotypes identifiés dans la ZPP Belledonne

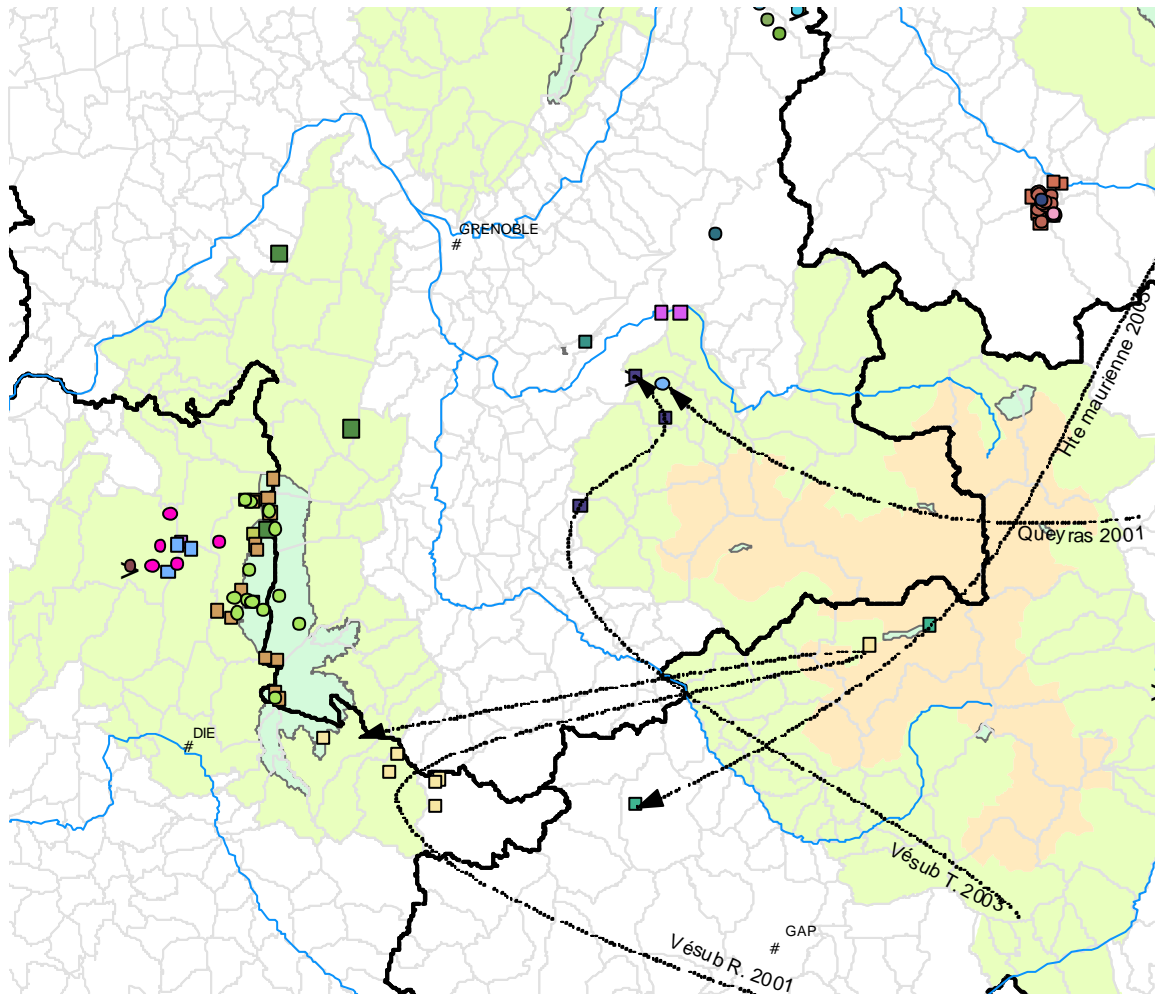
Genotype trans		Massif										Rq	
		Sexe	N contacts	1998/99	1999/00	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06		2006/07
S0-40	Belledonne	F	3		X	X							
S0-43	Belledonne	M	1			D							Depuis hte Maurienne, tué par balle
S13-4	Belledonne	F	1							X			
S13-7	Belledonne	F	1							X			
S14-2	Belledonne	F	1									D	Louve de l'année, tir de prélèvement
S15-7	Belledonne	F	3							X	X		
S3-4	Belledonne	F	8	X		X	X	X	X				Depuis VT 1997
S3-5	Belledonne	M	15				X	X	X			D	Tir de prélèvement
S4-10	Belledonne	M	4						X				
S5-11	Belledonne	M	1					X					
S5-14	Belledonne	M	1					X					
S5-8	Belledonne	M	1					X					
S9-3	Belledonne	F	1					X					
S9-7	Belledonne	F	1						X				
S9-9	Belledonne	M	2						X				

Tableau 16 : Histoire des génotypes identifiés dans la ZPP du Taillefer

Genotype trans		Massif					Rq	
		Sexe	N contacts	2003/04	2004/05	2005/06		2006/07
S1-18	Taillefer-Gd Serre	F	1	X				Depuis Queyras 2001
S13-2	Taillefer-Gd Serre	M	2		P			
S14-10	Taillefer-Gd Serre	M	1				X	
S5-19	Taillefer-Gd Serre	M	3	U	D			Depuis VT 2003, tir de prélèvement

Tableau 17 : Histoire des génotypes identifiés dans les ZPP du Thabor-Galibier et celle de Haute Maurienne

Genotype trans	Massif	Sexe	N contacts	1997/98	1998/99	...	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	Rq
S10-1	Galibier-Thabor	F	1						X		Louveteau
S10-6	Galibier-Thabor	M	2						X		Louveteau
S14-1	Galibier-Thabor	F	1							X	
S14-11	Galibier-Thabor	M	1							X	
S14-5	Galibier-Thabor	F	2							X	
S15-6	Galibier-Thabor	F	10				X	X			
S8-2	Galibier-Thabor	F	1				X				
S8-5	Galibier-Thabor	M	12				X	X			Depuis Hte Maurienne
S0-43	Hte Maurienne	M	1	X							Vers Belledonne 2000
S13-1	Hte Maurienne	M	6				X	X			
S3-4	Hte Maurienne	F	1	X							Vers Belledonne 1998
S8-5	Hte Maurienne	M	1				X				En transit depuis Thabor
S9-11	Hte Maurienne	M	1				X				
S9-5	Hte Maurienne	F	6				X	X			



**Légende**

- > Evénements MORT **espace protégé**
- limite communale      ■ adhesion
- coeur

0 4 8 16 Kilomètres

Carto : Duchamp C. / ONCFS  
Fond carto : BDCARTO IGN  
Sources : Réseau loup/lynx  
2004/07

Figure 4 : Répartition des différents loups identifiés depuis 2003 dans la Drôme et l'Isère. Chaque symbole représente un génotype différent (carré pour les mâles et cercle pour les femelles). cf. tableaux pour détail des génotypes.

### Bornes, Tarentaise et Bauges

Depuis 2004, le massif des **Bornes**, localisé au nord du Lac d'Annecy, est fréquenté par la même femelle (S7-2) a priori seule. Suite aux premières suspicions renseignées par des observations visuelles de plus ou moins bonne qualité, la présence de l'espèce sur le Massif des **Bauges** n'est confirmée qu'en juillet 2005 par la découverte d'un cadavre de loup braconné. Ce mâle adulte (S9-13), en dispersion, avait été détecté

en début d'année en Haute-Tinée. D'autres indices relevés par la suite ont permis la détection et l'identification génétique d'un nouvel individu mâle (S14-9) sur le massif.

La ZPP de **Tarentaise**, récemment identifiée au nord de la Vanoise, n'est fréquentée que par un seul individu, au vu des indices relevés lors du dernier suivi hivernal et des observations visuelles. Le manque d'échantillons récoltés sur la zone ne permet cependant pas de savoir s'il s'agit du même individu mâle (S9-10) détecté une seule fois en 2004 sur le territoire.

Tableau 18 : Histoire des génotypes identifiés dans la ZPP des Bornes

Genotype trans	Massif	Sexe	N contacts		
			2004/05	2005/06	2006/07
S7-2	Les Bornes	F	6	X+U	X

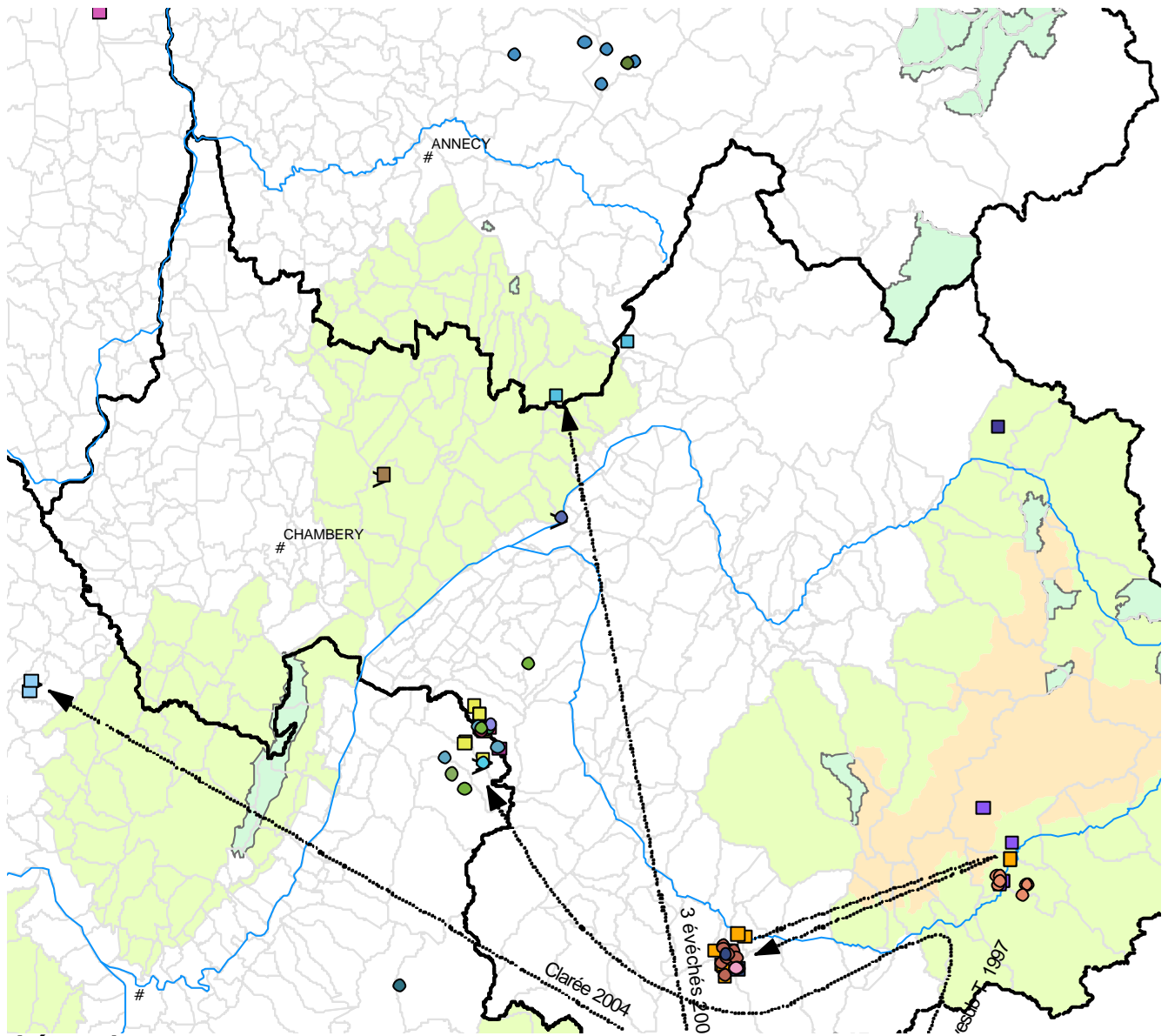
Tableau 19 : Histoire des génotypes identifiés dans la ZPP de Tarentaise

Genotype_trans	Massif	Sexe	N contacts	
			2003/04	
S9-10	Tarentaise	M	1	X

Tableau 20 : Histoire des génotypes identifiés dans la ZPP des Bauges

Genotype trans	Massif	Sexe	N contacts		Rq
			2005/06	2006/07	
S14-9	Bauges	M	2	X	
S9-13	Bauges	M	1	D	Depuis HT 2005- Tué par balle





**Légende**

- > Evénements MORT **espace protégé**
- limite communale      ■ adhesion
- coeur

0 4 8 16 Kilomètres

Carto : Duchamp C. / ONCFS  
Fond carto : BDCARTO IGN  
Sources : Réseau loup/lynx  
20/04/07

Figure 5 : Répartition des différents loups identifiés depuis 2003 en Savoie et limitrophe. Chaque symbole représente un génotype différent (carré pour les mâles et cercle pour les femelles). Cf tableaux pour détail des génotypes.

### Pyrénées

Mise en évidence depuis 1999, la présence du loup dans la partie orientale du massif pyrénéen est toujours d'actualité. L'article du QDN 14 fait le point sur l'historique et la succession des indices de présence qui sont toujours très ponctuels. Les années 2002 et 2003 marquent une quasi-absence de données.

Cependant, les analyses génétiques réalisées sur les excréments et quelques poils récoltés dans un premier temps dans le massif de Madre (66), puis dans le massif du Carlit confirment la présence d'au moins un mâle et une femelle en 2003/2004. Plusieurs échanges ont été réalisés avec les biologistes espagnols pour procéder au suivi sur les deux versants à partir de base commune. Côté espagnol des Pyrénées orientales, un mâle est identifié depuis 2001 (S0-25), comme dispersant depuis de la meute de Vésubie-

Tinée. Ce fait a été connu rétrospectivement grâce aux analyses françaises nouvellement calibrées. Il n'est pas le seul cas de dispersion vers les Pyrénées puisque parmi les 4 individus identifiés dans ce massif, deux autres viennent respectivement du Queyras (2000) et plus récemment de la Haute Tinée (2006).

Bien entendu, de longues périodes (de 2 à 3 ans) séparent leur dernière détection de leur massif d'origine et leur détection dans les Pyrénées. L'absence de formalisation du réseau, associée à la ponctualité de la présence d'un animal en dispersion fait que celui-ci peut passer facilement inaperçu. De nouvelles collaborations avec les généticiens et les équipes de terrain espagnols devraient permettre de progresser dans la connaissance des loups sur ce massif.

C.D., Y.L., E.M., P.M.

Tableau 21 : Histoire des génotypes identifiés dans les Pyrénées

Genotype trans	Massif	Sexe	N contacts	2005/06	2006/07	Rq
S14-9	Bauges	M	2	X		
S9-13	Bauges	M	1	D		Depuis HT 2005- Tué par balle

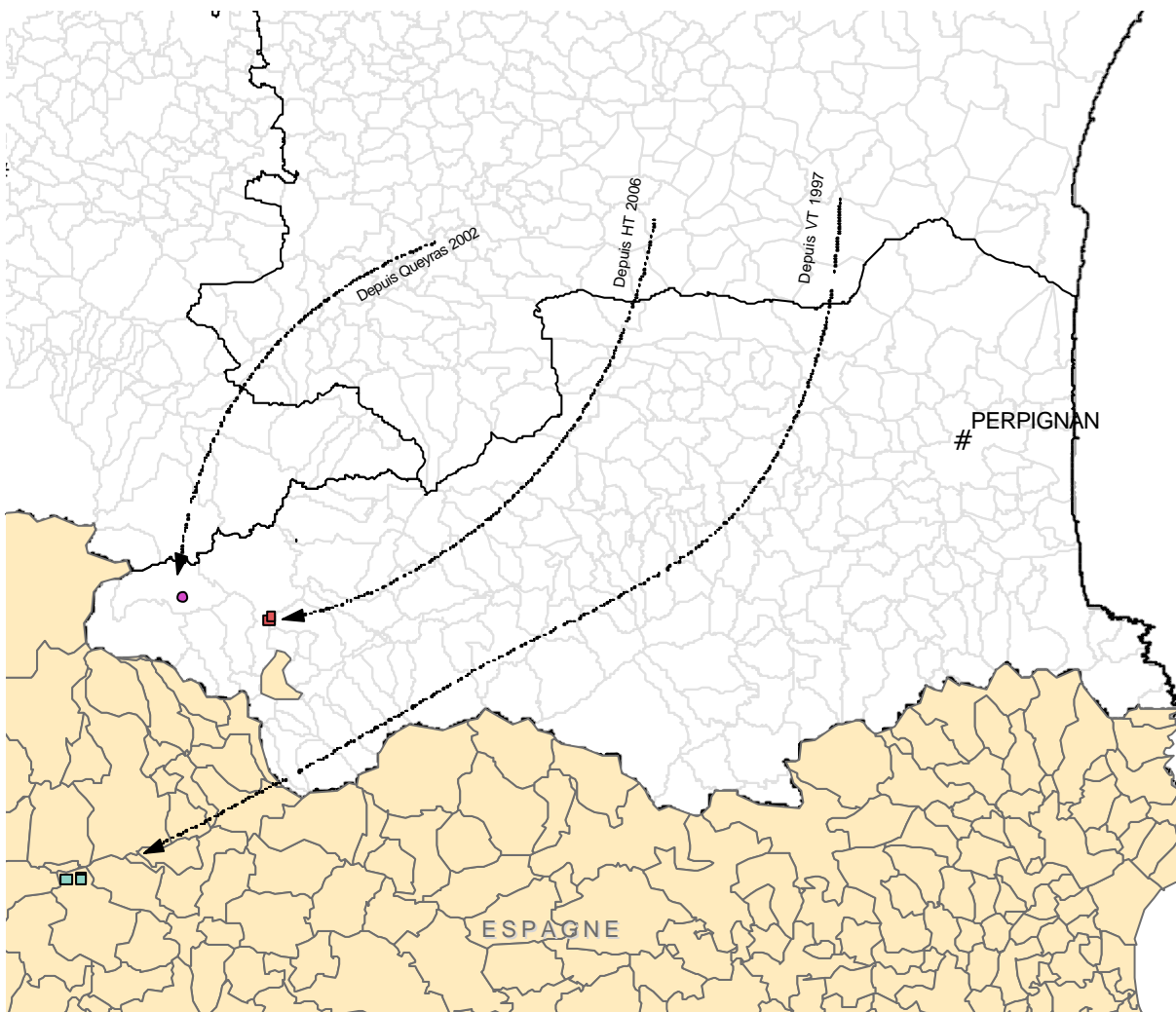


Figure 6 : Répartition des différents loups identifiés depuis 2003 dans les Pyrénées Orientales. Chaque symbole représente un génotype différent (carré pour les mâles et cercle pour les femelles). Cf tableaux pour détail des génotypes.

## Un exemple de l'utilisation de l'outil moléculaire : reconstitution de l'histoire de la louve blessée en vallée de la Vésubie (06)

### Contexte

Le 11/06/2007, dans le Parc National du Mercantour, un loup visiblement blessé est aperçu à proximité des habitations par les résidents du hameau de Mollières (Valdeblore, 06). Sur sollicitation du Parc National du Mercantour, la Direction de la Nature et des Paysages (MEDAD) demande que cet animal soit capturé. Le Service départemental de l'ONCFS des Alpes-Maritimes est dépêché sur place et la capture par télé-anesthésie est réalisée. L'animal, gravement blessé, est transporté au centre Alpha (parc de loups) afin d'y être soigné. Le vétérinaire relève des coups de crocs sévères ainsi que des blessures antérieures. Un prélèvement de sang est réalisé à la demande de l'ONCFS afin de disposer d'un échantillon analysable en génétique.

Le 13 juillet 2007, la DNP demande une analyse génétique sous la procédure d'urgence de cet échantillon pour identification de la lignée d'appartenance et de l'individu.

### Reconstitution de l'histoire de vie de l'animal à partir de la base de données génétiques.

L'analyse de l'échantillon de sang a permis de montrer que cet animal était bien un loup de lignée génétique dite italienne, (comme tous ceux détectés par ailleurs). Son profil génétique

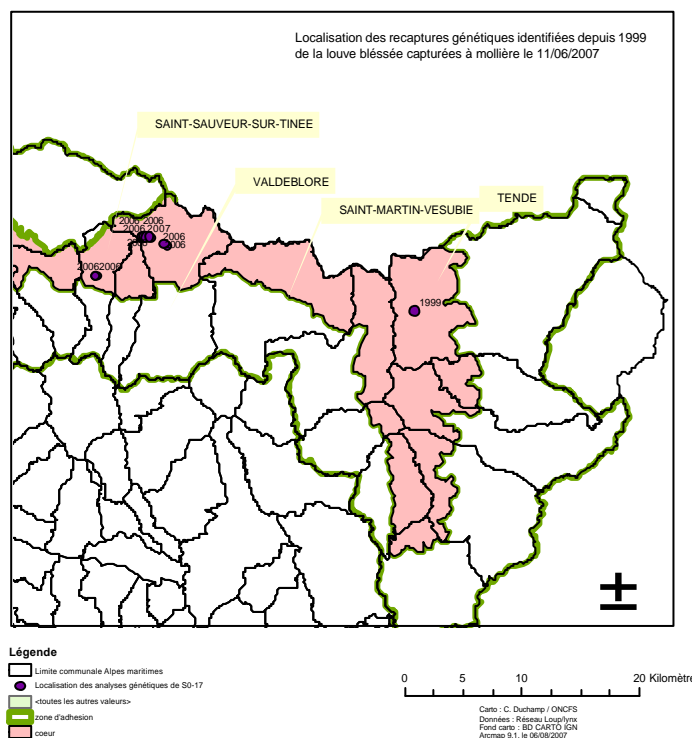
individuel, codé **S0-17** a également pu être établi.

A partir de la base de données des typages ADN effectués depuis 1995, on observe que cette louve identifiée sous le nom « S0-17 » avait déjà été détectée en France dans le Mercantour à 9 reprises les années précédentes (tableau 1) par le biais d'analyses d'excréments.

La première détection, en Vésubie-Roya, date de 1999, et permet donc d'estimer son âge à au moins 8 ans. Le vétérinaire ayant estimé un âge de 7-8 ans à partir de l'analyse de la dentition, nous pouvons penser que sa meute d'origine est celle de Vésubie-Roya située dans la partie sud du P N Mercantour. Par la suite, sa trace a été perdue pendant 7 ans jusqu'en janvier 2006 où son profil génétique est relevé à 8 reprises en Vésubie-Tinée pendant les mois de janvier, février, mars et avril jusqu'à sa capture en juin 2007. L'hypothèse d'un loup en errance depuis toutes ces années (vraisemblablement côté italien) est très probable. Ses blessures durant cette période antérieure pourraient être expliquées par ses passages dans les meutes voisines à la recherche d'un territoire. De même, on peut supposer que l'animal est ensuite revenu côté français, et a essayé de s'intégrer dans la meute de Vésubie-Tinée, apparemment sans succès vu les blessures infligées probablement par ses congénères.

C.D., Y.L., E.M., P.M

type	AncienN°	Année	Date obs	Nom commune	Massif	G_sp	Sexe	Genotype	In-dex_qualité
F	9908156	1999	15/08/1999	TENDE	Merc Vésubie-Roya	C lupus	F	S0-17	1
F	2601009	2006	06/01/2006	VALDEBLORE	Merc Vésubie-Tinée	C lupus	F	S0-17	0.77
F	2601014	2006	07/01/2006	ST SAUVEUR SUR TINEE	Merc Vésubie-Tinée	C lupus	F	S0-17	0.75
F	2601013	2006	07/01/2006	ST SAUVEUR SUR TINEE	Merc Vésubie-Tinée	C lupus	F	S0-17	0.98
F	2602037	2006	25/02/2006	VALDEBLORE	Merc Vésubie-Tinée	C lupus	F	S0-17	0.42
F	2602039	2006	25/02/2006	VALDEBLORE	Merc Vésubie-Tinée	C lupus	F	S0-17	1
F	2603071	2006	26/03/2006	VALDEBLORE	Merc Vésubie-Tinée	C lupus	F	S0-17	0.65
F	2603072	2006	26/03/2006	VALDEBLORE	Merc Vésubie-Tinée	C lupus	F	S0-17	0.58
F	2604111	2006	16/04/2006	VALDEBLORE	Merc Vésubie-Tinée	C lupus	F	S0-17	1
S	S060701	2007	11/06/2007	VALDEBLORE	Merc Vésubie Tinée	C. Lupus	F	S0-17	1





Micropolis, La Bérardie  
F-05000 Gap France  
Téléphone : 04 92 51 34 44  
Fax : 04 92 51 49 72  
Messagerie :  
rezoloup@oncfs.gouv.fr



Rédaction : Y. LEONARD, C. DUCHAMP,  
E. MARBOUTIN, P. MORIS

Conception et diffusion : ONCFS

**Ce bulletin est destiné aux membres du réseau Loup. Toute utilisation des données publiées dans ce bulletin est soumise à autorisation de la part de l'animateur du réseau loup.**

RETROUVEZ LES INFORMATIONS CONCERNANT LE  
LOUP SUR LE WEB :

WWW.ONCFS.GOUV.FR



Photo : Y. Leonard

La collecte des poils de loups (indice susceptible de faire l'objet d'analyse génétique) nécessite de suivre avec attention la piste des animaux.