

ENTRE CHIEN ET LOUP : DE LA CROTTE A L'ADN

ÉLABORATION D'UNE METHODE DE DISTINCTION GENETIQUE DES DEUX
ESPECES DANS LE CADRE DU RETOUR DU LOUP DANS LE MASSIF
PYRENEEN ET EN FRANCE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*Présentée et soutenue publiquement en 2006
Devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

Par

Elsa, Paule, Marie, SUBERBIELLE
Née le 24 mars 1979, à Muret (31)

Directeur de thèse : M. BERTAGNOLI, Maître de Conférences

JURY

PRESIDENT :
M. Christophe PASQUIER Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
Me. Christelle CAMUS Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :
M. Alain DUCOS Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Si cet ouvrage a demandé quelques années pour que le projet dont il est la synthèse mûrisse, se concrétise puis soit traduit sur le papier, il représente à mes yeux l'aboutissement d'un cycle d'étude au cours duquel j'ai eu la chance de rencontrer ceux qui, au-delà de la transmission des savoirs, parviennent à élargir l'horizon d'esprits trop souvent cantonnés à l'idée première d'une vocation.

Je tiens d'abord à remercier Mesdames et Messieurs les membres du jury, pour avoir eu la patience de lire ma thèse, bien sûr, mais surtout d'avoir croisé un jour mon chemin sur cette boucle.

A Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER,

Professeur des Universités,

Praticien hospitalier

Virologie, qui m'honore en acceptant de présider ce jury.

A Monsieur le Docteur Stéphane BERTAGNOLI,

Maître de Conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pathologie infectieuse, sans qui ce projet n'aurait pas abouti, faute de trouver un responsable de stage assez intrépide pour soutenir une intuition d'élève obstinée, et sortir de son domaine de prédilection.

Je ne saurais jamais assez le remercier pour son enthousiasme sans limite, que ce soit pour enseigner les bases de la Virologie, ou parvenir à consacrer du temps aux autres après trois réunions, 2 heures de cours, dix projets et thèses à suivre, deux footing et une vie de famille.

A Madame le Docteur Christelle CAMUS,

Maître de Conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Biologie Cellulaire et Moléculaire, qui m'a enseigné la complexité des mécanismes cellulaires et m'a donné matière à nourrir ma curiosité pour les 100 prochaines années.

A Monsieur le Professeur Alain Ducos,

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Zootchnie, pour ses précieux conseils sur la manipulation de l'outil génétique, et l'intérêt qu'il a porté à ces travaux depuis le début.

C'est avec émotion que je rends également hommage à la mémoire de Frédérique MESSUD-PETIT, dont la vivacité et la motivation communicatives m'honoreront toujours.

La liste serait incomplète et inexacte si je ne mentionnais l'équipe de l'UMR de microbiologie de l'E.N.V.T., pour son aide technique, sa patience face aux effluves nauséabondes des extraits qu'elle a dû endurer un certain temps...

Sans oublier bien sûr toute l'équipe de la Réserve Naturelle de Nohèdes, Alain MANGEOT et Olivier SALVADOR en tête, pour leur accueil, leur altruisme et leur souci de partager sur le terrain une vision raisonnable et rare de L'Ecologie et du respect de la Nature.

Enfin, j'adresse toute mon affection à mes proches, parents et amis dont le soutien, tout au long de mon cursus, a eu raison de mes doutes, et leurs sentiments, de mon humeur lunatique. Vous serez toujours là...

« La peur de l'inconnu, c'est l'appréhension du connu défiguré par l'imagination. »

Albert Brie (Le mot du silencieux, les voies pénétrables)

TABLES DES MATIERES

I. INTRODUCTION 8

II. PARTIE 1 : LE LOUP EN FRANCE: UN RETOUR PRECOCE ET INATTENDU : 12

A.	LE CONSTAT DU RETOUR DU LOUP EN FRANCE :	12
1.	<i>Histoire d'un retour annoncé</i> :	12
2.	<i>Un retour favorisé par certains facteurs</i> :	17
B.	LA MEDIATISATION : LE CONSTAT D'UN VIDE JURIDIQUE ET LA DIFFICULTE D'ACCOMPAGNEMENT DANS LE SUIVI DE LA POPULATION :	23
1.	<i>La législation et ses dérogations</i> :	23
2.	<i>Une législation insuffisante concernant les chiens errants et leurs dommages</i> : *Ecotone .	34
C.	LES ETUDES COMPORTEMENTALES : SEULS INDICES RAPPORTES DE PRESENCE DU LOUP :	37
1.	<i>Quelques données éthologiques, bases des indices de présence du loup</i> :	37
2.	<i>Protocoles d'études et de suivi de présence du loup</i> :	42
3.	<i>Des insuffisances pour le suivi d'une population et des ses prédatons</i> :	51
D.	LA GENETIQUE APPLIQUEE AU LOUP :	53
1.	<i>L'étude phylogénique du loup</i> :	53
2.	<i>L'outil génétique dans le suivi des populations de loups</i> :	58

III. PARTIE 2 : ELABORATION D'UNE METHODE GENETIQUE DE DISTINCTION DU LOUP ET DU CHIEN A PARTIR DE MATIERES FECALES : 63

A.	METHODES EMPLOYEES :	63
1.	<i>Échantillons testés : prélèvement, quantité, mode de conservation</i> :	63
2.	<i>Protocole d'extraction de l'ADN total à partir de matières fécales</i> :	65
3.	<i>Réactions de polymérisation en chaîne et migration des amplicons sur gel d'agarose</i> :	66
4.	<i>Clonage du matériel génétique</i> :	68
5.	<i>Séquençage des échantillons obtenus par PCR nichée et alignement des séquences</i> : ...	69
6.	<i>Elargissement de la méthode à l'identification de lynx</i> :	69
B.	RESULTATS OBTENUS AU COURS DE L'EXPERIMENTATION :	70
1.	<i>Efficacité de la méthode de collecte</i> :	70
2.	<i>Extraire l'ADN des matières fécales avec un kit du commerce</i> :	70
3.	<i>Amplification par PCR nichée des extraits d'ADN : des extraits témoins aux tests</i> :	72
4.	<i>Analyse différentielle des séquences : 5 nucléotides entre chien et loup</i> :	76
5.	<i>Analyse d'échantillons imputables au lynx</i> :	80
C.	DISCUSSION : UNE PREMIERE ETAPE A POURSUIVRE POUR UNE APPLICATION DE LA METHODE EN ROUTINE :	81
1.	<i>La qualité des prélèvements est indispensable pour l'efficacité de la méthode</i> :	81

2. *Résultats et discussion concernant l'extraction d'ADN à partir des matières fécales* : 82
3. *Une première étape dans l'analyse de l'ADN fécal à poursuivre* :..... 83

IV. PARTIE 3 : PROJETS DECOULANT DE LA POURSUITE DE CETTE ETUDE, ET NOUVELLES IMPLICATIONS: 85

- A. SUR LE TERRAIN : PERSEVERER DANS LES PROSPECTIONS ET LA COLLECTE DES LAISSEES : 85
 1. *Amélioration des techniques prospectives du loup sur le massif* : 85
 2. *Objectif : une meilleure prévention des attaques sur les troupeaux du massif, pour une cohabitation harmonieuse entre hommes et loups*:..... 87
- B. NOUVELLES IMPLICATIONS ET PROJETS CONCERNANT LES ANALYSES GENETIQUES AU LABORATOIRE: 93
 1. *Poursuite de l'élaboration du diagnostic génétique* : 93
 2. *Et pourquoi ne pas trouver de nouveaux partenaires?*..... 96

TABLE DES ANNEXES: 96

ANNEXE1 : situation de la Réserve Naturelle de Nohèdes dans les Pyrénées Orientales en France.....	97
ANNEXE 2 : extrait de la Convention de Berne concernant la protection du loup, et son appartenance a l'annexe II de la Convention.....	98
ANNEXE 3 : Protocole Loup proposé par l'organisation LIFE : fiches de collecte d'indices de présence du loup sur le terrain.....	100
ANNEXE 4 : itinéraires empruntés par le loup sur le massif du Madres , résultat des prospections menées entre 1997 et 2001	103
ANNEXE 5 : protocole de collecte des matières fécales de canidés sur le terrain.....	104

TABLE DES ILLUSTRATIONS :

CARTES :

Fig.1 : Répartition actuelle des populations de loups en Europe (d'après Soreil et Westerling, 1997).....	08
Fig.2 : Repeuplement par le loup de l'Espagne et de l'Italie à la fin du XXème siècle (d'après Gruppo Lupo Italia PNM ; et de Beaufort, Blanco et al).....	11

DIAGRAMMES :

Fig.4 : Évolution de la prédation sur le troupeau ovin du massif du Madres-Coronat entre 1992 et 1999 : effets des mesures de protection. (Pérennisation de l'élevage ovin sur le site du Madres-Coronat ; dossier réalisé par l'AGRNN - janvier 2000).....	41
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

FIGURES :

Fig.3 : Représentation de la diversité de milieux rencontrés sur le massif du Madres-Coronat, un site attractant pour le loup. (<i>Photos prises lors de la prospection estivale, août 2001</i>).17	
Fig. 5: Photos de pistes et empreintes retrouvées lors de prospections (15-01-99, O. Salvador).....	44
Fig.6 : Étude phylogénétique des haplotypes de loup et de chien en Europe (d'après Vilà et al, 1997).....	51
Fig. 7: Résultat de la migration par électrophorèse en gel à 1% d'agarose des amplicons obtenus par PCR sur F1(3) avec les amorces HPRT 5' et HPRT 3'	67
Fig.8 : Résultat de la migration par électrophorèse en gel à 1% d'agarose des amplicons de la PCR nichée sur l'ADN extrait à partir de fèces de chien F1(3)	70
Fig.9: résultats des migrations en gel d'agarose 1% des amplicons POIL, V1, M3 à l'issue de la 2e étape de PCR nichée	70
Fig.10 : Alignement des séquences des échantillons testés avec les séquences de la littérature	75

TABLES :

Table 1 : Détail des échantillons de matières fécales prélevés sur le terrain	59
Table 2 : Mutations mononucléotidiques dans la séquence du gène du cytochrome b permettant une distinction entre chien et loup	72

ABREVIATIONS :

- A.D.N.: Acide DésoxyriboNucléique ;
- A.G.R.N.N. : Association Gestionnaire de la Réserve Naturelle de Nohèdes ;
- ARNm : Acide ribonucléique messenger
- C.F.G.M.: Commission Fédérale du Gibier de Montagne ;
- D.R.A.F.: Direction Régionale des Affaires Forestières ;
- Di.R.En.: Direction Régionale de l'Environnement ;
- E.N.V.T.: Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse ;
- F.D.C.: Fédération Départementale de la Chasse ;
- H.P.R.T.: Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transférase;
- L.I.F.E. : l'Instrument Financier pour l'Environnement ;
- Nb : Nota bene ;
- O.N.C.Fs.: Office Nationale de la Chasse et des Forêts, regroupement des anciens offices, l'O.N.C et de L'O.N.F. ;
- O.R.G.P. : Organisation Régionale des Groupements Pastoraux
- P.A.C.: Politique Agricole Commune ;
- P.C.R.: Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN ;
- P.N.M.: Parc Naturel du Mercantour ;
- PO : Pyrénées Orientales ;
- Rq : Remarque ;
- S.P.A.: Société Protectrice des Animaux ;

I. INTRODUCTION

Depuis la nuit des temps, le lien étroit qui unit l'homme au loup balance entre compagnonnage et adversité.

De la domestication du loup est pourtant né le meilleur ami de l'homme, le chien, qui est aussi son partenaire de chasse, de garde du territoire et du troupeau. Mais le loup est aussi un prédateur, et ces mêmes caractéristiques que l'homme a sélectionnées durant des millénaires de domestication du genre *Canis* font que ce canidé sauvage reste une menace aux yeux du genre humain.

Ainsi, le loup, considéré comme nuisible durant le siècle dernier, a été chassé dans l'Europe entière jusqu'à sa quasi-disparition. Son destin a alimenté les croyances populaires, l'élevant bientôt au statut de mythe.

En Europe, il a alors rejoint le rang des espèces protégées menacées d'extinction grâce à la signature de la convention de Berne en 1979. Dès lors, les quelques îlots d'individus ayant survécu en Europe de l'Ouest ont pu recoloniser le milieu pour constituer de nouvelles meutes. C'est ainsi que le loup est réapparu en France en 1991 dans le Mercantour, et en 1997 dans les Pyrénées avec le cas du « loup des Abruzzes », déclenchant une nouvelle polémique. En tant qu'espèce protégée son retour a fait l'objet d'un suivi dans un cadre institutionnel.

Pourtant trop souvent encore, dès l'attaque d'un troupeau, la population attribue d'emblée la responsabilité au loup sans pouvoir apporter de preuve formelle de cette intervention. En effet, les indices de présence du loup restent comportementaux et ne permettent pas d'écarter une confusion avec une attaque par des chiens en divagation. Les chiens abandonnés, de plus en plus fréquemment, retournent parfois à l'état sauvage et adoptent un comportement similaire à celui du loup. Or l'indemnisation des pertes occasionnées par ces prédatons ne relève pas du tout de la même juridiction.

C'est dans ces circonstances que j'ai pris contact avec la Réserve Naturelle de Nohèdes dans les Pyrénées-Orientales, initialement pour mon stage de D1, à la suite de l'épisode « du loup des Abruzzes » qui aurait fréquenté le massif à partir de l'année 1997. À la fin de l'année 2000 les

indices de présence et les attaques de troupeaux perduraient sur le massif du Madres-Coronat où est située la Réserve. Cette dernière cherchait de nouveaux partenaires qui puissent mettre au point une technique simple et sûre d'identification de la présence éventuelle d'un loup et de distinction avec le chien.

Or le seul outil capable de réaliser cette distinction est la génétique. Les deux espèces, interfécondes, de phénotypes très proches, du même genre *Canis*, présentent des génomes aux différences ténues.

Le défi était donc d'adapter une méthode d'analyse génétique non invasive à une source pauvre en ADN : les matières fécales.

En effet, les fèces constituent le seul indice de présence des canidés qui soit abondant dans la nature, et dont les analyses se réalisent sans déranger l'individu. Paradoxalement ces laissées contiennent peu d'ADN spécifique de l'espèce excrétrice et se prêtent théoriquement peu aux analyses génétiques.

Ainsi, l'enjeu des travaux présentés ci-après dans le cadre de ma thèse vétérinaire, a été d'élaborer une méthode de distinction génétique du loup et du chien à partir de l'ADN contenu dans les matières fécales de grands canidés qui sont collectées sur le massif du Madres-Coronat.

Au cours de cette étude, j'aborderai en un premier temps les facteurs de retour du loup, événement accompagné de polémiques dues en partie à un certain vide juridique. Quelques bases éthologiques permettront de comprendre par quels moyens le suivi des populations de loups est réalisé sur le terrain, notamment à Nohèdes, et leurs limites qui soulignent la nécessité du recours à l'outil génétique.

Je présenterai donc ensuite la méthode génétique que j'ai élaborée au laboratoire de microbiologie de l'ENVT afin de permettre une distinction entre matières fécales de loup et de chien, les premiers résultats obtenus, et enfin, les nombreuses perspectives qu'offre cette étude.

II. Partie 1 : LE LOUP EN FRANCE: UN RETOUR PRECOCE ET INATTENDU

A. Le constat du retour du loup en France

1. *Histoire d'un retour annoncé*

L'histoire du loup en France a toujours été houleuse voire douloureuse. Le loup en France était d'abord dans le rang des espèces complètement éradiquées depuis les années 1930. Le loup, considéré alors comme nuisible par les éleveurs et le monde paysan du XIXe siècle, lesquels souffraient par ailleurs de la révolution industrielle et des modifications essentielles qu'elle apportait à la société, a été chassé et traqué jusqu'à la disparition de son dernier individu en Charente (de Beaufort, 1987; Okarma, 1998). Dans les pays d'Europe de l'Ouest, le même sort a été réservé au loup ainsi qu'à l'ours et au lynx. Finalement, après la quasi-disparition de ces espèces en Europe, a été signée en 1979 la convention de Berne qui – dans son Annexe 2, place le loup dans le rang des espèces protégées car menacées d'extinction. Les pays signataires, que sont les membres de la communauté européenne, s'engagent à prendre des mesures pour réintroduire l'espèce et la protéger, ainsi que son habitat, et la faune sauvage dont dépend sa survie (Delibes, 1990). Ainsi depuis une vingtaine d'années, on assiste à un repeuplement de l'Europe de l'Ouest par le loup à partir des îlots de population où il survivait et de l'Europe de l'Est où l'espèce n'a jamais été menacée d'extinction (Okarma, 1998) **(Fig.1)**

REPARTITION ACTUELLE DES LOUPS D'EUROPE

(D'après Soreil & Westerling, 1997)



Fig.1 : Répartition actuelle des populations de loups en Europe (d'après Soreil et Westerling, 1997)

Mais l'initiative de la protection du loup remonte à quelques années auparavant en Italie (**Fig.2**). En 1970, il ne reste qu'une centaine de loups en Italie. Ces animaux vont faire l'objet du programme « Saint François d'Assise » mené par le Parc National des Abruzzes, qui visent à leur recensement et leur protection. Le loup devient espèce protégée dans ce massif en 1976. Des mesures de protection des élevages sont amorcées, même si les exploitations souvent familiales et dans un état de délabrement avancé comptent surtout sur les primes versées pour soutenir ces élevages et l'indemnisation à 100% des bêtes potentiellement tuées par le loup. D'autre part l'exploitation touristique de la présence du loup dans les massifs italiens devient un moteur économique pour ces régions souvent abandonnées, dans le passé, par les hommes. Ainsi, le loup recolonise peu à peu le milieu jusqu'à nos jours. On compte alors 500 loups dans le massif des Abruzzes (Cozza et al., 1996; Fico et al., 1993).

Des îlots dans la chaîne des Apennins (dorsale continue qui, à la hauteur de Savona, rejoint les Alpes ligures, qui est suivie des Alpes-

Maritimes) se sont d'abord constitués. Ils se sont étendus ensuite vers le nord et le sud italiens, c'est-à-dire de la pointe sud des montagnes italiennes à la Ligurie. Près de Gênes, à 120 km de la frontière, les loups continuent à coloniser le milieu se dirigeant vers les parcs frontaliers d'Alte Vialle della Pena, ainsi que vers la frontière française au niveau du Vercors et des Alpes-Maritimes. Le retour du loup en France depuis l'Italie est déjà largement amorcé. Dès 1983, la première preuve de la présence d'un loup à moins de 120 km de la frontière est apportée. La recolonisation est attestée en 1984-86 par les résultats de braconnages et de piégeages de loups. En 1987, on dénombre 450 indices de présence de loups en Ligurie et dans les régions limitrophes de haute montagne : Valle Stura Ovadese (province d'Alessandria), Valle d'Aveto (province de Gênes), province de Pavia (Lombardie), Piacenza (Emilie-Romagna). Le recensement en 1998 d'une trentaine d'individus dans le Mercantour en France n'est que la conséquence logique de cette migration. La recolonisation se poursuit maintenant par le nord des Alpes et la Suisse où le parc de la Vanoise compte déjà des indices de présence potentielle (Alleg, 1998; Forestier, 1999; Hopquin, 2000; Poulle, Mai 2000).

En 1995, l'opinion publique est informée de ce retour du loup dans le Mercantour et s'exprime en sa faveur à 70% selon un sondage SOFRES. Le sondage réalisé par région montre que cet engouement n'est pas seulement citoyen (Forestier, 1999).

Mais le front de migration des loups ne provient pas uniquement des Alpes. En effet, la population lupine en Espagne est la plus importante d'Europe de l'Ouest, et a bénéficié également de la protection de l'espèce.

Le loup a été pratiquement éradiqué d'Espagne (**Fig.2**). L'histoire de sa recolonisation de l'espace ibérique est étroitement liée à l'évolution des populations d'ongulés sauvages dans ce pays. En effet à la fin du XIXe siècle, les grands herbivores ont fait l'objet d'une chasse humaine accrue, obligeant le loup à se rabattre sur les espèces domestiques. Dans les années 70, il n'en restait que quelques centaines d'individus qui évoluaient par couples ou en solitaire dans les monts cantabriques. La protection assurée par la signature de la convention de Berne a permis une recolonisation progressive par l'espèce et l'apparition des premières meutes de plus de cinq individus dans les années 80 (Okarma, 1998; Vignon, 1995; Vignon, 1997). Ainsi en 1981, on dénombre 600 à 1000 loups sur la péninsule ibérique. Ces prédateurs profitent alors des populations croissantes de sangliers et de chevreuils, ainsi que des transhumances

ovines et caprines, puis du retour du cerf. La population de cette espèce atteint une densité de 2 animaux à l'hectare, ce qui est permis par le couvert végétal (landes de bruyères) et la bonne cohabitation avec les élevages bovins).

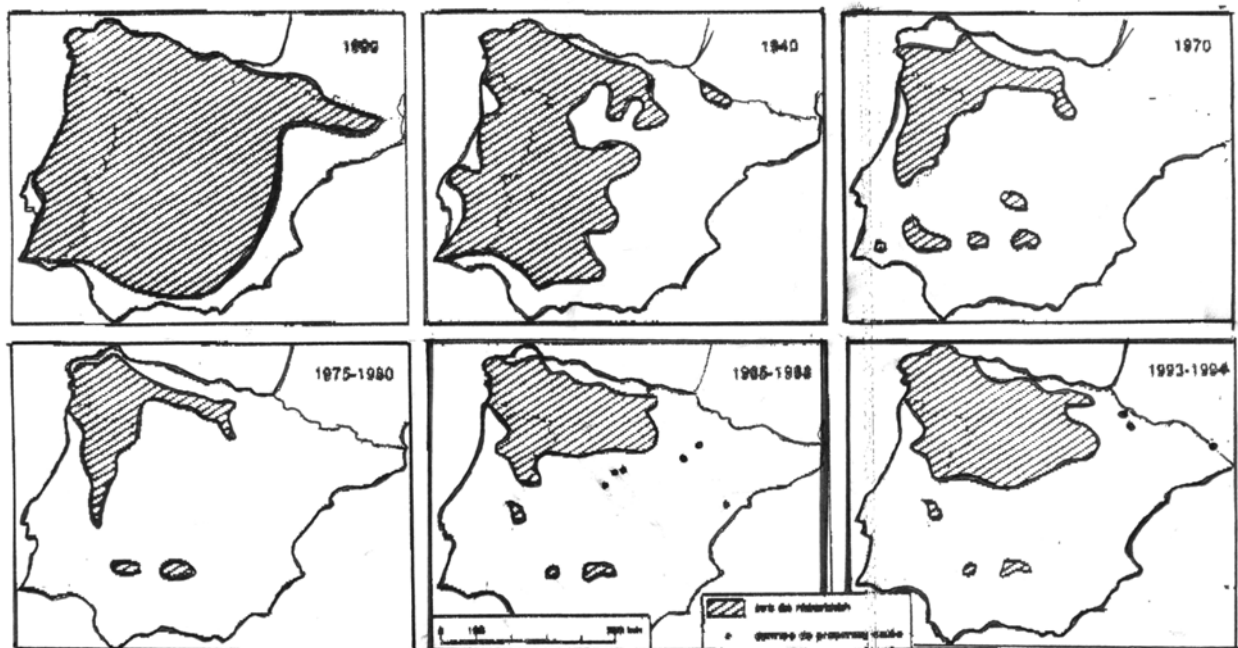
Aujourd'hui le loup est présent principalement dans les monts cantabriques avec des effectifs stables de 1500 ou 2000 individus et une densité de 1 loup par 30 km² pour une couverture de 150 km² par meute. Ce dernier chiffre reste très inférieur au besoin d'espace de l'espèce et peut expliquer les fronts de migration des loups espagnols vers le nord et la frontière française. Si la population de loups en Espagne n'a cessé de croître durant le vingtième siècle, les meutes font de plus en plus l'objet de chasses et de traques de la part des populations locales dès lors qu'elles sortent des zones de réserves naturelles. En effet, dans ces zones d'élevage extensif et aux méthodes archaïques, la présence du prédateur n'est pas tolérée(Vignon, 1997).

Ainsi le retour du loup en France peut s'expliquer par deux fronts actifs de migration : l'Espagne et l'Italie. La colonisation du Mercantour correspondrait principalement à l'arrivée de loups depuis les Alpes. En 97, les premières identifications avérées de loups dans le massif du Mercantour ont entraîné des études de populations plus poussées grâce à la mise en place du programme LIFE loup. A ce moment-là, une trentaine d'individus sont identifiés, regroupés en trois meutes environ(Alleg, 1998).

Mais si la présence de deux fronts de migrations très actifs constitue un indice évident du retour potentiel du loup en France, d'autres facteurs intrinsèques à la France supportent l'attrait que peuvent exercer ces espaces sur ce canidé.



Progression des loups en Italie et en France (source : Gruppo Lupo Italia PNM)



*Évolution de la répartition du loup dans la péninsule ibérique au cours du XXème siècle
(Beaufort, Blanco, et al.)*

Fig. 2 : Repeuplement par le loup de l'Espagne et de l'Italie à la fin du XXème siècle

2. Un retour favorisé par certains facteurs

a) Facteurs généraux de retour du loup

Ces facteurs sont nombreux, mais relativement similaires entre les différentes zones de France et d'Europe où la présence du loup a été mise en évidence récemment. Il s'agit :

- de l'évolution du couvert végétal dans ces régions. Les zones, où le pastoralisme était prépondérant et l'agriculture restait extensive, ont souvent subi une désertification importante, menant à un défaut d'entretien des espaces naturels. Ainsi il s'agit souvent de régions boisées avec une alternance de plaines et de landes de bruyère à proximité qui constituent des terrains de chasse privilégiés. Ces éléments constituent, avec la présence de reliefs montagneux et d'une altitude supérieure à 1500-2000m, un lieu de vie attractif pour le loup s'il est sous-tendu par les facteurs suivants ;

- Des populations abondantes en forte progression d'ongulés sauvages de taille moyenne (chevreuil, sanglier, isards/chamois), qui sont les proies naturelles du loup. Les épidémies mortelles pour ses espèces n'existant plus, la chasse insuffisante ainsi qu'une gestion limitée des populations a conduit à ces effectifs. Cela constitue un facteur en faveur du retour du loup depuis des zones où les densités atteintes ne permettent plus d'assurer les besoins de la meute.

- Des régions d'élevage encore extensif avec la transhumance des ovins et des troupeaux qui ne faisaient plus depuis longtemps l'objet d'un gardiennage suffisant comme c'était le cas traditionnellement.

Ces éléments peuvent résumer l'attrait qu'exerce la France sur des loups en quête de nouveaux territoires (Alleg, 1998; Poulle, Mai 2000).

L'objet de cette thèse étant la caractérisation du retour potentiel du loup dans les massifs pyrénéens, il est maintenant judicieux d'étudier les facteurs qui favorisent l'arrivée d'un loup dans le Massif du Madres-Coronat ce qui a fait l'objet de nos prospections avec la Réserve Naturelle de Nohèdes.

b) Le massif du Madres-Coronat : un pastoralisme, un milieu et une faune sauvages favorables au retour du loup

Histoire du pastoralisme sur le massif : l'exode rural :

Au XIXe siècle, Nohèdes était une zone d'élevage ovin assez étendue (**ANNEXE 1**) : elle était constituée de nombreux petits troupeaux gardés par des chiens dressés dans la tradition des bergers pyrénéens qui étaient eux-mêmes très présents sur les estives. Ils usaient d'armes à feu ainsi que de carcasses empoisonnées pour écarter les nombreux prédateurs.

Mais dans la première moitié du XXe siècle, la désertification des campagnes due au déclin de l'économie vivrière, entraîne la disparition des troupeaux ovins, et avec eux, celle de leurs prédateurs.

Parallèlement, le milieu change : autrefois modelé par les coupes à blanc, il se ferme rapidement laissant la place à l'expansion des landes à genêt purgatif et à ciste à feuille de laurier. De même l'espace forestier s'étend de plus en plus.

Ainsi, tout cet environnement se montre très favorable à la prospérité des populations d'ongulés sauvages qui se mettent même, en ce qui concerne certaines espèces, à pulluler.

La situation actuelle du pastoralisme d'élevage sur le massif (Pistolesi, 1998):

Aujourd'hui, c'est à « l'écopastoralisme » que l'on doit le repeuplement partiel du massif. Il faut noter tout d'abord le développement de plus en plus important du tourisme "vert" avec toujours plus de randonneurs et leurs chiens qui, laissés en liberté le plus souvent, peuvent provoquer des problèmes multiples aux troupeaux. En 1994, on a recensé 6000 visiteurs et plus de 1000 chiens sur le massif du Madres-Coronat.

Les bergers et les vachers sont alors trop souvent considérés par ces touristes comme des figures appartenant au paysage local, et non comme des gens qui travaillent dans des conditions de vie souvent difficiles.

Si l'élevage ovin a longtemps été dominant, il est aujourd'hui en déclin, supplanté par l'élevage bovin allaitant moins contraignant.

Tout d'abord le cheptel ovin est principalement issu de la transhumance. L'élevage hors-sol d'agneau de bergerie où seules les brebis montent en estive subit une évolution à la baisse depuis un siècle. Il s'agit, dans 70 % des cas, d'élevages spécialisés ne subsistant que grâce aux primes.

Ainsi, des troupeaux de 50 à 450 brebis sont au pâturage toute l'année. Après un agnelage d'automne, les brebis sont emmenées dans les vergers et les bois, puis passent à l'entretien sur des landes médiocres durant l'hiver. Au printemps elles accèdent aux prés de fauches, puis, en été, la chaleur méditerranéenne les pousse à rester à l'ombre des bâtiments le jour et à évoluer sous les châtaigniers la nuit.

On comprend donc que leur vulnérabilité soit maximale en été et à la fin de l'automne, car elles sont alors très exposées aux prédateurs. Le stress occasionné par ces derniers entraîne une baisse de la fertilité par les avortements qu'il provoque, sans baisse de fécondité si la mise à la reproduction a lieu au printemps lorsque les brebis sont moins exposées ; mais ce n'est pas le cas des troupeaux transhumants qui sont, à cette époque, dans des landes éloignées de l'exploitation, alors même que le gardiennage n'est que partiel.

Nous envisagerons brièvement le cas de l'élevage caprin qui est peu répandu sur le massif avec de petits troupeaux rassemblés dans des parcs de 1 Ha grillagés à clôture électrifiée loin de l'exploitation. Ce sont les chevreaux qui sont alors les plus exposés aux prédateurs, ce qui entraîne une baisse de la prolificité au printemps.

Enfin l'élevage bovin allaitant est en pleine expansion, sans doute parce qu'il est moins astreignant que l'élevage ovin. Après une stabulation hivernale, les vaches sont 8 à 9 mois au pâturage sur des estives collectives de 1000 Ha à 1000-2500 m d'altitude. Elles sont laissées entre mai et juillet dans des zones de basses altitudes, puis progressent en août en moyenne et haute montagne. En automne, le sevrage des veaux constitue une période critique pour les troupeaux, car ce sont les cibles privilégiées des grands canidés, alors que ces jeunes bovins sont les plus vulnérables sans la protection maternelle. En effet, le gardiennage est quasiment absent, se résumant le plus souvent à des contrôles de routine et à distance tous les 7 à 15 jours. Ceci s'ajoute aux intempéries et au report de prédation sur les bovins par le déclin du cheptel ovin.

Évolution de la population des ongulés sauvages sur le massif du Madres (Pistolesi, 1998):

Parallèlement à la progression de la végétation et au recul du pastoralisme, les ongulés sauvages ont connu une nette augmentation de leurs effectifs, ce qui a été favorisé par des vagues de réintroduction des espèces qui avaient pratiquement disparu, comme l'isard ou le mouflon.

Pour commencer on peut noter l'importante population d'isards qui en 1996 comptait 6246 têtes, alors qu'on parle plutôt aujourd'hui de 8000 têtes (F.D.C., 1998; C.F.G.M., 1997-98). Les individus sont concentrés essentiellement à l'est du département, dans le Bas Conflent et le Vallespir. J'ai moi-même pu observer lors de ma prospection du 1 au 3 Août 2001 cinq individus. Notons que les isards des Pyrénées-Orientales ont assez peu été touchés par les récentes épidémies de kératite sèche.

Quant au mouflon, 1200 à 1300 individus ont été dénombrés dans les Pyrénées-Orientales, sur le Carlit et le Puigmal (C.F.G.M., 1997-98; Landry, 2000) . Une vingtaine d'individus ont été réintroduits sur le Madres se répartissant aujourd'hui sur les communes de Sansa et de Nohèdes.

En outre le chevreuil se trouve essentiellement en zone subalpine et au palier de la zone alpine en été. L'aire de répartition ne cesse de s'accroître jusqu'aux limites du Roussillon, et les indices de présence porteraient à 3200 têtes, les effectifs du département, ce qui révélerait une surdensité (10 têtes/100 Ha) équivalente à celle de l'Aude (C.F.G.M., 1997-98).

Très présent dans les PO (comme dans l'Aude) mais difficile à dénombrer, le sanglier se répartirait dans les secteurs d'altitude subalpin et alpin (C.F.G.M., 1997-98). D'après les chasseurs, 8000 bêtes seraient présentes sur les communes de Vallespir, les Fenouillèdes, Corbières, et le massif des Albères.

Enfin, la population de cerfs est importante (C.F.G.M., 1997-98; Landry, 2000), comme j'ai pu le constater lors de ma prospection durant l'Été 2001, où l'on a pu compter une bonne vingtaine d'individus dans un périmètre restreint. 1000 têtes sont réparties sur le Puigmal, le Carlit, le Madres et le Coronat, alors qu'il y en a peu sur les départements limitrophes de l'Aude et de L'Ariège.

Par conséquent une telle population d'ongulés sauvages est un argument majeur en faveur de l'attrait que présente ce département pour le loup en quête de nouveaux territoires (Vignon, 1995; Vignon, 1997). En fait une telle densité de cervidés et autres ongulés sauvages n'est intéressante et exploitable que dans le cadre d'une meute. Elle reste garante néanmoins d'un nombre accru de charognes provenant d'individus morts de maladies, de faiblesse car trop jeunes ou trop vieux, ou issus de la prédation d'autres carnivores comme le renard, le lynx ou l'ours, ou bien encore de la chasse. Et cela n'est pas sans grand intérêt pour un loup solitaire.

**Un milieu accueillant pour un loup en quête d'un territoire :
(Fig.3)**

Lors de ma prospection estivale du 1 au 3 Août 2001, j'ai été impressionnée par la diversité de milieux qu'avait occupé le loup du Madres depuis 1997.

En effet, l'objet de ma visite, outre la découverte de la technique de prospection utilisée pour suivre les traces et indices laissés par ce canidé, était de comprendre dans quel environnement il avait évolué toutes ces années, et pourquoi il s'y était apparemment plu pendant ce laps de temps. Le massif du Madres-Coronat se situant au confluent des climats méditerranéen, montagneux et tempéré, présente une flore très variée et étagée avec l'altitude. En basse altitude, proche de la vallée de Nohèdes, on trouve des terres cultivées, avec des vergers, puis des forêts de feuillus. Très vite, du fait de l'abandon des terres, des landes à genêt à balai et à cistes s'étendent à perte de vue, interrompues par les forêts de conifères. Puis des zones arides se présentent, telle "la Pelade" à proximité des premiers cols. Ce sont des zones importantes d'estive pour les bovins et les ovins qui montent plus haut encore, jusqu'à des crêtes d'altitude moyenne (2400 m). Ici s'étendent de hauts plateaux avec une végétation se raréfiant ressemblant à de la toundra et des steppes. C'est là que se situent les parcs de nuits pour les brebis.

En redescendant sur la commune de Mosset, une large piste forestière où furent retrouvées dans la neige, les pistes laissées par le loup qui y passait régulièrement, nous a conduits de nouveau jusqu'au-dessus du village de Nohèdes.

On comprend mieux comment un loup solitaire a pu choisir cette zone comme territoire de chasse pendant 4 ans. Les loups, en effet, pour leurs déplacements, empruntent toujours les chemins les plus simples : pistes forestières, canaux d'irrigation, cols, et sentiers de forêts ou de landes sont toujours privilégiés (de Beaufort, 1987; Okarma, 1998). De plus, pour la chasse, ils préfèrent des zones où ils sont à couvert grâce aux buissons de genêts ou dans la forêt, mais suivent surtout les troupeaux, attendant une faille dans leurs systèmes de défense. En ce qui concerne sa tanière, on ne l'a jamais retrouvée, car elle pouvait être n'importe où dans la roche d'une falaise ou dans une zone non prospectée.



A. Anden parc de nuit où a eu lieu une attaque de nuit en 1999. Prairie d'Albude. Commune de



B. Champier où sont tombées un groupe de brebis lors d'une attaque de nuit par le loup en 1999, Rio de la Creu.



C. Piste forestière empruntée par le loup en hiver (pistes dans la neige) sur la commune d'Urbanysa.



D. Arbre de marquage, où on a retrouvé des matières fécales attribuables au loup, Col del Torn.



E. Clairière où on a trouvé des fèces de canidés; Canredó, Forêt de conifères.



F. Le Mont Coronet, vue depuis les hauteurs de Nohédies. Forêt de feuillus en face.

Fig.3 : Représentation de la diversité de milieux rencontrés sur le massif du Madres-Coronat, un site attrayant pour le loup. (Photos prises lors de la prospection estivale, août 2001)

Néanmoins, si on envisage l'éventuelle arrivée d'une meute, le territoire serait tout aussi attrayant. L'étendue de cette zone où les proies sauvages et domestiques pullulent, la diversité de milieux permettant d'établir différentes zones de refuge, de chasse, de déplacement et d'éducation des jeunes, ainsi que le marquage du territoire dans des zones de passage obligatoire que constituent les cols et la croisée de chemins, sont autant d'atouts en faveur de l'installation d'une meute.

Au vu de tout cela, il est donc tout à fait compréhensible qu'un loup ait pu élire domicile dans ce massif pendant quelques années, laissant logiquement des traces. Néanmoins, tous les indices rassemblés n'ont pas conduit à la reconnaissance officielle de cette présence, car ils ne permettaient pas une distinction formelle entre un loup et un chien entraîné à la course. Aux yeux de l'opinion publique, seule la génétique fournit, aujourd'hui, la preuve d'une identité.

Ainsi, de nombreux facteurs écologiques et humains permettent d'expliquer l'attrait que peuvent exercer les massifs français sur le loup en quête de nouveaux territoires.

Ces mêmes facteurs ont permis, en Espagne et en Italie la recolonisation de zones montagneuses par le prédateur, alors que les élevages doivent faire face à des difficultés économiques tout aussi importantes qu'en France.

Pourtant, dans ces pays limitrophes de la France, le retour du loup semble globalement bien accepté et de mieux en mieux géré. Tel n'est pas du tout le cas en France, où le retour du loup reste sujet à polémique.

B. La médiatisation : le constat d'un vide juridique et la difficulté d'accompagnement dans le suivi de la population

1. La législation et ses dérogations (Annexe 2)

Pour pouvoir mesurer l'ampleur et la difficulté de la problématique concernant la présence du loup en France, il est nécessaire d'envisager la législation concernant cette espèce. De même, la législation concernant les mesures d'indemnisation lors de l'attaque d'un troupeau par un canidé

permettra de prendre conscience de l'importance de la distinction entre loup et chien.

a) Le loup, espèce protégée en Europe (ANNEXE 2)

En 1979, la Convention de Berne a été signée par les Etats membres de l'Europe, en vue d'établir la conservation de la vie sauvage et du milieu naturel de l'Europe (Delibes, 1990).

À ce titre, le comité permanent établit la recommandation n°17 en 1989, introduisant le loup dans le rang des espèces européennes protégées.

Le loup est classé dans l'annexe 2 des espèces protégées, car menacées d'extinction.

La convention mentionne l'obligation de conserver et protéger tout l'environnement qui permette au loup d'accomplir ses habitudes, ainsi que son habitat. Toute nuisance à son alimentation, son repos, son parcours, ou sa reproduction sera sanctionnée. Et, toutes méthodes de lutte sélective et de mise à mort sont interdites, sauf dérogation accordée dans des circonstances très particulières (voir infra).

Le comité permanent incite aussi à l'encouragement public :

- pour la mise en place de méthodes de protection du pastoralisme,
- dans la réalisation de programmes de sensibilisation de l'opinion publique dans les zones rurales,
- pour le développement de la recherche biologique et génétique sur le loup,
- dans la réintroduction de l'espèce là où il a disparu,
- pour instaurer des contacts multilatéraux avec d'autres Etats.
- dans la création d'organismes de suivi et de gestion du loup.

La convention énumère ensuite des recommandations réservées, à chacun des pays membres : - F : pour le Portugal et l'Espagne, il leur est demandé d'établir une convention visant à la gestion commune de leurs populations lupines ;

- H : dans les pays où l'espèce a disparu, il faut informer l'opinion publique, en soutenant la Recherche dans les zones actuelles de distribution ; et étudier les possibilités de réintroduction, en collaboration avec les pays où le loup subsiste ;

- I : Invitation de la France à assurer une protection juridique totale du loup.

b) Dispositions juridiques prises par la France : la difficile application (Bracque, 1999; Chevallier, 1999)

L'introduction du loup comme espèce protégée dans le droit français, n'est signée que depuis le 31 Décembre 1989, selon la loi n°89-1004, publiée dans l'ordre juridique interne par le décret n°90-756 du 22 Août 1990, et modifiée par le décret n°96-728 du 8 Août 1996.

Le retour plus précoce de loups dans le Mercantour, et la dénonciation des dégâts causés par les grands carnivores ont conduit à la rédaction d'un rapport du directeur général de l'Agriculture, Monsieur Pierre Bracque, sur la cohabitation entre l'élevage et le loup (Bracque, 1999).

Ce dernier concluait son travail sur le désarroi des éleveurs en disant que: « les efforts engagés leur semblent insuffisants et, surtout temporaires. », et « qu'il est, de fait, indéniable que le retour du loup accroît la pénibilité de leurs conditions de travail ».

Ainsi, un compromis semblait nécessaire, et de celui-ci dépendrait l'acceptation du loup en France.

c) L'avis de la mission interministérielle en 1999 (Chevallier, 1999)

Les attentes exprimées par le pastoralisme :

Parallèlement, une mission interministérielle a été envoyée dans différentes régions, Alpes-de-Haute-Provence, Hautes-Alpes et Alpes-Maritimes, pour enquêter auprès des acteurs principaux du pastoralisme, sur la perception et les difficultés relatives au retour du loup en France.

Ils en rendirent compte par un rapport d'information à la séance du 20 Octobre 1999 de l'Assemblée Nationale.

La mission conclut que : « le retour du loup en France est aujourd'hui incompatible avec le maintien du pastoralisme « à la française ». »

Elle décrit le point de vue de L'Europe, de manière un peu ironique : « c'est que l'animal est « rentré en grâce », apparaissant désormais comme un être injustement pourchassé et qui, au nom du respect de la biodiversité, doit être considéré comme une espèce protégée ».

De plus elle attribue une origine naturelle à l'arrivée du loup des Abruzzes dans le Mercantour (contestée dans la région, par l'accusation de lâchers secrets). Elle dénonce, en plus, le manque de transparence de l'administration dans l'annonce de cette découverte, puisqu'elle n'a prévenu du retour du loup que 6 mois après les premiers témoignages.

Mais la mission a surtout été émue par les témoignages des hommes sur le terrain, quant aux difficultés actuelles du pastoralisme alpin, et l'aggravation

qu'engendrerait une telle cohabitation, telle qu'à l'heure actuelle, avec les loups.

Le travail 24h/24, 7j/7, la gestion des maladies contagieuses et des autres prédatons occasionnées par les chiens errants, sont déjà, selon elle, intolérables pour une profession qui essaie de subsister.

Les organisations agricoles de l'Arc Alpin en viennent à demander, le 12 mai 99 à la réunion de Gap, dans les Hautes-Alpes, la renégociation de la convention de Berne quant aux zones de pastoralisme, qu'elles jugent « inaptés à la présence du loup ».

Elles demandent aussi l'autorisation d'appliquer l'art. L 227-9 du code rural qui donne : « à tout propriétaire ou tout fermier » la possibilité de « repousser ou détruire, même avec des armes à feu, mais à l'exclusion du collet et de la fosse, les bêtes fauves qui porteraient dommage à ses propriétés. ». Et dans certains cas, elles aimeraient pouvoir avoir recours à l'art. L 2122-21 du code général des collectivités territoriales, qui autorise l'organisation de battues au loup sous la direction du maire et de ses conseillers municipaux.

Rg : Il reste encore à définir ce qu'on entend par « bête fauve », et qui constitue, une fois de plus un flou juridique.

Les mesures prises, par le programme LIFE-Loup : présentation et critique :

En 1997, devant le constat du retour du loup en France, le programme européen LIFE-Nature (L'Instrument Financier pour l'Environnement) a développé un programme pour 3 ans qui serait géré par l'ONC : LIFE-Loup (Pouille, Mai 2000).

Ainsi, 308000 euros ont été utilisés pour améliorer les connaissances sur le loup, 67000 euros pour la communication et la sensibilisation du public, 34000 euros pour la réintroduction d'ongulés sauvages et autres mesures de prévention de la prédation des troupeaux, et 695000 euros prévus pour l'indemnisation des éleveurs ovins victimes d'attaques lupines.

Puis, un deuxième programme LIFE-loup a été approuvé en juillet 1999 par la commission européenne, et a reçu un budget de 2,8 millions d'euros, financé par les Ministères de l'Aménagement du Territoire, de l'Environnement, et de l'Agriculture, ainsi que par l'Union Européenne.

Ce programme fait néanmoins l'objet de critiques quant à la mauvaise répartition des crédits : pas assez pour les éleveurs, alors que 70% des frais sont « pour le loup ».

De plus les frais d'indemnisation trop élevés, doivent être complétés par l'apport de l'Etat. Or ce ne sera pas le cas dans le deuxième programme.

Enfin, y est dénoncée l'insuffisance des mesures de protection, qui imposent trop de charges supplémentaires à l'éleveur (par la présence et l'éducation d'un chien de protection par exemple), trop de travail en plus, le développement de stress et de maladies du fait de l'enfermement des animaux, le manque de formation adéquate des aides bergers.

Vers les principes évoqués par le rapport Bracque :

Ce dernier dégagait les priorités d'action en matière de pastoralisme et de conservation du loup : - Assurance pour le risque « grands prédateurs », avec prise en charge partielle par l'Etat,

- Création d'un fond initié par les différentes associations de protection de la nature et par de grands groupes de distribution, pour l'aide financière aux éleveurs concernant les techniques de prévention,

- Versement par l'Union Européenne d'une indemnité compensatrice « grands prédateurs » dans les zones « favorables au loup » et « refuges »,

- Création d'un observatoire européen pour les grands prédateurs.

De plus, en 1997 le Comité National Consultatif Loup a été créé, composé de toutes les parties concernées par la question, et divisé en 3 sous-comités : Zonage, Indemnisation et Prévention. Il avait pour objectif de mettre au point une « stratégie nationale de conservation du loup liée à un pastoralisme durable ».

Mais il a rencontré jusqu'à présent de très importantes difficultés, confirmant la complexité d'une gestion stable de la présence de loups et du pastoralisme.

Conséquence : les orientations de la mission :

➤ Tout d'abord **l'exclusion du loup des zones de pastoralisme** leur semble indispensable par le biais de l'obtention de dérogations à la Convention de Berne. Ces dernières sont envisagées par cette convention, imposant aux parties contractantes de : « prendre les mesures nécessaires

pour maintenir ou adapter la population de la flore et de la faune sauvage à un niveau qui correspond notamment aux exigences écologiques et culturelles, tout en tenant compte des exigences économiques et récréationnelles et des besoins des sous-espèces, variétés ou formes menacées sur le plan local. » (art.2) **(voir ANNEXE 2)**

Ainsi les dérogations peuvent être accordées, selon l'art.9 : « à condition qu'il n'existe pas d'autre solution satisfaisante et que la dérogation ne nuise pas à la survie de la population concernée. »

Une dérogation peut être demandée pour plusieurs raisons, et notamment pour « prévenir de dommages importants aux cultures, au bétail, aux forêts, aux pêcheries aux eaux et autres formes de propriétés. »

Le dépôt de cette demande doit être effectué à la commission chargée du respect de la convention, lors de l'une de ses réunions biennales.

D'autre part, la directive communautaire « habitat », n°92-143 du 21/05/92, ratifiée par la France par un arrêté signé le 10/10/96 par ses Ministères de l'Environnement et de l'Agriculture va dans le même sens.

Et le ministère fait même mention du soutien des groupes et associations de protection de la nature qui, dans le cadre d'une présentation du groupe Loup France, le 1/06/98, ont dit que « les éleveurs ne devaient pas faire les frais du retour du loup en France » (ce qui constitue en soi des paroles assez floues dont le sens peut être adapté à toutes les parties).

Mais dans cette principale mesure de recours aux dérogations de Berne et de la directive européenne « habitat », la question de la désignation des acteurs de la destruction du loup reste en suspens. Ce n'est pas aux éleveurs, qui ont déjà bien assez de charges, de gérer les populations, et il faudrait dans ce cas créer des postes de garde de l'ONC ou de lieutenant de louveterie, qui sont débordés par les constats de prédation, se rajoutant à leur travail original de gestion de la faune sauvage.

➤ Le deuxième objectif est **d'améliorer les mécanismes d'indemnisation des éleveurs et de protection des troupeaux**. Il faut affiner et renforcer les compensations des dommages et les mesures de protection des troupeaux.

Pour cela, il faut confier cette tâche à des professionnels et des collectivités locales, tel que l'antenne LIFE-Loup le propose dans son 2^e programme. Des diagnostics pastoraux devront être généralisés à tout l'arc Alpin.

En outre, il est nécessaire de mieux informer les éleveurs au sujet des techniques de prévention contre la prédation qui seront mises à leur

disposition. La prévention passe par l'apprentissage de méthodes d'éducation des chiens de protection, l'installation des parcs de nuit avec balises lumineuses d'alarme au loup, la disponibilité d'aides pastoraux par la création de brigades d'aides bergers d'urgence en cas de manifestation de prédation, et l'institutionnalisation de la formation des aides berger, par la création d'emploi jeunes.

Nb : Cette dernière mesure s'est d'ores et déjà montrée inefficace, car ces aides bergers manquent cruellement de formation pour la gestion d'un troupeau de nuit, et sont insuffisamment sensibilisés à l'importance d'une veille nocturne dans ces parcs.

D'autre part, il est nécessaire d'informer le public et surtout les promeneurs de la conduite à tenir à l'approche d'un troupeau gardé par les chiens de protection.

Enfin, il est indispensable de simplifier et d'accélérer l'indemnisation. Cela, en effet, passe d'abord par la création d'un laboratoire d'analyse génétique entièrement dévolu à cet effet, pour une distinction rapide et efficace du loup et des chiens errants. Il faudrait aussi équiper les bergers de téléphones-radios. Enfin il faudrait arriver à une prise en charge financière totale par l'Etat.

➤ Enfin, il faudrait **envisager la possibilité de tolérer le loup dans des zones dites « parcs à loups »**, à cause de l'intérêt économique et touristique que présente cette faune protégée ; cela bien sûr avec l'approbation des éleveurs locaux (exemple : observatoire du loup à Saint-Martin en Vésubie).

d) Le rapport Estrosi (2 mai 2003) : des insuffisances des mesures prises à une gestion des populations de loups (Spagnou, 2003)

Au cours des années 2001 et 2002, la multiplication des attaques de troupeaux ovins dans le massif du Mercantour lors des périodes estivales, et la montée du mécontentement exprimé par les éleveurs aboutissent quelquefois à des situations extrêmes. En effet en 2002, le maire d'une commune des Alpes-Maritimes est jugé et ses décisions sont annulées par le Conseil d'état pour avoir dérogé à la directive « Habitats » et n'avoir pas respecté la convention de Berne après avoir autorisé des battues aux loups dans sa circonscription. En parallèle, les actes de braconnage et d'empoisonnement se multiplient dans les massifs Alpains.

Une commission d'expert est donc désignée et va recueillir les avis des différentes parties concernées par le retour du loup depuis l'Italie : éleveurs, chambre d'agriculture, assurances, organismes de protection de la faune sauvage, fédérations de chasses, collectivités locales, scientifiques, et acteurs locaux et européens. La mission débouche sur un nouveau rapport présidé par Monsieur Christian Estrosi en mai 2003. Il sera adopté par la commission d'enquête sur les conditions de la présence du loup en France et l'exercice du pastoralisme dans les zones de montagne puis soumis à l'Assemblée nationale afin qu'elle l'édite.

Ce rapport dénonce d'abord l'insuffisance des mesures prises jusque-là pour la protection du pastoralisme et la gestion des populations de loups, ainsi que le flou juridique concernant l'élimination de certains loups. À l'issue de l'enquête, il apparaît tout d'abord, que l'indemnisation des éleveurs victimes d'une attaque de troupeau reste très en dessous des préjudices économiques directs et indirects ainsi que psychologiques qu'ont subis éleveurs et bergers. Au-delà des pertes d'animaux, le stress généré lors d'une attaque et les interventions sur le troupeau qui s'ensuivent, entraînent des pertes de production, de fertilité, et des interventions supplémentaires énormes.

De plus, le coût du loup, jusque-là pris en charge dans le cadre des programmes LIFE 1 et 2, a été largement sous-estimé, engendrant des dépenses énormes de la part du Ministère de l'Environnement. Le but des programmes européens LIFE est d'initier la mobilisation de fonds communautaires sur une période donnée (3 ans renouvelables), ainsi que des actions de gestion, de protection ou de conservation dans les domaines de l'environnement et la nature. Ces mesures une fois initiées doivent ensuite être poursuivies par les états-membres qui les prennent ensuite à leur charge.

Le rapport insiste donc sur l'augmentation inévitable de ces dépenses dans le contexte actuel de retour du loup et sur la nécessité de faire intervenir la solidarité nationale pour les assumer.

D'autre part, le rapport évoque l'inégale efficacité des mesures de protection prises sur le territoire. Cela tient en particulier à l'absence d'une solution unique pour tout l'élevage ovin français du fait de la diversité des systèmes d'élevages, et des zones d'estive. La présence des aides bergers pour aider à la mise en place des systèmes de protection des élevages (parcs mobiles, transport de matériel d'un lieu de nuitée à l'autre...), les chiens de protection (dont l'éducation est toujours mal comprise des bergers

ce qui les rend plus dangereux souvent à l'encontre de leur troupeau ou des touristes que pour le loup, mais dont la maîtrise par des organismes spécialisés est en train de se mettre en place), la construction de parcs de contention dans les zones fréquentées lors des estives, sont autant d'idées intéressantes mais inapplicables à la même échelle entre les petits troupeaux itinérants et les immenses transhumances. De même, c'est demander un effort considérable aux éleveurs qui doivent remanier totalement leurs méthodes de travail et leur mode de production.

Au bout de compte, le rapport distingue deux types de zones :

- les zones de présence permanente du loup, où les dommages restent stables voire ont diminué par l'application efficace des mesures de protection ;
- des zones à nouveaux foyers de prédation où les dommages sont en augmentation. Les mesures de protection ne sont alors efficaces que sur les systèmes d'élevages herbassiers grands transhumants en haute montagne. Les troupeaux des Alpes-Maritimes sont les plus vulnérables car ils regroupent tous les facteurs d'élevage et géographiques en leur défaveur : durée de pâturage trop longue (12 mois) en zone de présence avérée du loup, sur des terrains de montagne secs et embrumés. Les effectifs sont très variables et trop peu mobiles et le système d'alimentation n'est pas sécurisé (pas de stock fourrager).

Enfin, les mesures d'indemnisations sont très insuffisantes, fondées sur une juridiction floue ou absente. Elle ne concerne que les animaux dont la dépouille est retrouvée et dont l'attaque de loup est avérée par les caractéristiques morphologiques seulement. Les pertes induites (indirectes) ne sont pas évaluées, et les démarches sont d'une lenteur démoralisante. Et aucun laboratoire d'analyse génétique n'est à l'heure actuelle en place pour confirmer l'implication du loup, voire la responsabilité d'un individu en particulier.

Ainsi pour remédier à ces insuffisances le rapport Estrosi, propose un certain nombre de mesures.

Il s'agit tout d'abord d'appliquer de manière plus adaptée la dérogation à la protection des grands carnivores en Europe assurée par la convention de Berne.

L'article 9 de la convention ainsi que la directive 92/43/CEE dite directive « Habitat » prévoit cette dérogation tant qu'il en est référé tous les deux ans à la Commission Européenne, et que cela ne nuise pas à la viabilité de

l'espèce et au maintien de sa diversité génétique. Si aucune autre mesure ne peut s'y substituer alors le prélèvement de quelques individus pourrait être envisagé lors d'attaques de troupeaux. De plus, comme cette démarche entre dans le cadre de la protection de « l'Habitat », cela donne une envergure internationale et permet d'envisager le problème du maintien de l'espèce à un niveau global international et non local. (Tant que la souche loup italien se maintient, qu'elle soit en France ou en Italie importe peu).

Mais parmi les différentes mesures jusque-là envisagées pour limiter les populations de loups - des corridors de circulation du loup entre parcs nationaux aux battues - toutes se sont révélées inefficaces, représentant plus un exutoire aux problèmes de l'élevage en milieu de montagne qu'un réel acte de gestion de populations. Ainsi le rapport propose tout d'abord la gestion transfrontalière, franco-italienne, des populations de loups - jugées à l'heure actuelle comme méta-population - en coordonnant les décisions, le suivi et les relations entre les parcs nationaux au niveau communautaire.

Un zonage évolutif du loup et des schémas de protection du pastoralisme seront envisagés :

- des zones de protection intégrale du loup seront choisies en fonction de critères socio-économiques de la région, d'activité humaine faible (zone à peu d'élevages ovins et forte population d'ongulés sauvages) ; le loup y sera protégé, suivi, aucun prélèvement n'y sera autorisé. Les élevages présents bénéficieront des mesures de protection et percevront une indemnité forfaitaire annuelle en fonction de l'effectif de l'élevage ;

- des zones de protection partielle du loup avec prélèvements autorisés d'un certain pourcentage d'individus de manière à assurer la viabilité de l'espèce, dès lors que des attaques seraient constatées et dépasseraient un seuil établi de déclenchement des opérations de prélèvement. Les maires comme les éleveurs dotés d'un permis de chasse, pourraient être les acteurs des prélèvements effectués après autorisation accordée conjointement par les Ministères de l'Environnement et de l'Agriculture ;

- des zones d'exclusion du loup où les élevages sont vulnérables. Le loup y serait traqué et éliminé systématiquement par la louveterie.

Le problème actuel reste d'arriver à définir et appliquer ces zones. En effet, le Mercantour au départ désigné comme zone la plus propice à la présence du loup (cf. ses préférences naturelles) est aussi une zone importante d'élevage ovin. Les caractéristiques d'activités humaines et d'habitat lui

préfèreraient des zones comme la Champagne, la Bourgogne ou la Lorraine et le Vercors qui sont pourtant pour l'instant peu colonisées par le loup.

La définition de ces zones devra s'appuyer sur des diagnostics pastoraux affinés et plus complets qui jusque-là n'ont pas été menés de manière approfondie.

Pour soutenir les efforts de protection des troupeaux et ces mutations profondes, la France devra faire davantage appel aux fonds communautaires qu'elle néglige jusqu'à maintenant, et notamment utiliser les fonds d'aides structurelles européennes pour soutenir le développement de projets en espaces ruraux allant dans la droite ligne des principes de la PAC 2 concernant la vision des agriculteurs comme aménageurs d'espace.

Enfin le rapport mentionne la nécessité absolue de créer un observatoire des grands prédateurs fondé sur un laboratoire d'analyses génétiques permettant de générer suffisamment de données pour comprendre, suivre et anticiper la colonisation des espaces français par le loup mais aussi le lynx et l'ours. En effet, à ce jour rien n'a encore été entrepris pour suivre la migration des loups en provenance d'Espagne depuis la Navarre et l'Aragon, et préparer le pastoralisme à se protéger de cette arrivée jugée inéluctable par la Commission.

Ainsi au cours de l'année 2004, les arrêtés préfectoraux seront mis en application au cours du mois d'Août et de septembre dans les Alpes du Sud, l'Isère et dans la Drôme permettant l'abattage de 4 loups au moins. Et en octobre de la même année une nouvelle preuve de présence de loup dans les Pyrénées françaises est apportée avec des analyses génétiques démontrant la présence d'un couple de loups d'origine italienne sur le massif du Carlit dans les Pyrénées-Orientales.

Ainsi le loup n'a pas très bonne réputation au ministère, qui envisage d'abord de sauver une autre espèce en voie de disparition : le pastoralisme alpin.

Mais l'ambiguïté de la place du loup en France tient aussi au fait que l'assimilation soit souvent faite entre loup et grands carnivores, terme qui pourtant englobe aussi lynx, ours et chien errant. Or l'attaque de chiens divagants (estimée à 150 000 bêtes/an selon le Ministère de l'Agriculture en 1999 (Ruffier-Reynie, Aout 1999), seulement 800 bêtes mortes dans le Mercantour suite à l'attaque lupine, soit 0,8 % du cheptel local), ressemble beaucoup à celle occasionnée par un loup. Et les chiens font l'objet d'une tout autre juridiction, hélas trop peu souvent appliquée.

2. Une législation insuffisante concernant les chiens errants et leurs dommages (Cousse, 1998)

a) Interdiction de la divagation des chiens

L'art.213-2 du code rural interdit l'errance des chiens et des chats. Il est renforcé par l'arrêté ministériel du 16/03/1955 : « Pour prévenir la destruction des oiseaux et de toute espèce et gibier, et pour favoriser leur repeuplement, il est interdit de laisser divaguer les chiens dans les terres cultivées ou non, les prés, les vignes, les vergers, les bois ainsi que les marais et sur les bords des cours d'eau, étangs et lacs.»

Cela a pour objectif de protéger la faune domestique et sauvage de leur prédation, ainsi que la dégradation de leur milieu de vie ; des dispositions pénales de répression ont été énoncées à cet effet dans le code rural, par l'art.R24-63.

b) Qu'est-ce qu'un chien errant ?

D'après l'art.213-1 du code rural, il s'agit de « tout chien qui, en dehors d'une action de chasse ou de la garde d'un troupeau, n'est plus sous la surveillance effective de son maître, se trouve hors de portée de voix de celui-ci ou de tout instrument sonore permettant son rappel, ou qui est éloigné de son propriétaire ou de la personne qui en est responsable d'une distance dépassant les 100 m. »

c) Procédure de constat et de répression du préjudice causé par un chien divagant :

Lorsqu'un éleveur est victime de la prédation d'un chien errant sur son troupeau, il doit aller le déclarer officiellement à la municipalité ; après quoi celle-ci doit mettre en place une stratégie de capture et d'abattage du chien. La mairie est aussi chargée plus généralement, de la mise en œuvre d'une stratégie de limitation de la divagation des carnivores domestiques sur sa commune.

Si elle n'est pas en mesure de le faire, c'est au préfet de légiférer. Comme le prévoit l'art.232 du code rural, le chien va à la fourrière et, selon qu'il est tatoué ou non, en l'absence d'une réclamation de son propriétaire dans les 4 ou les 8 jours suivant sa capture, il sera emmené à la SPA pour son adoption, ou en territoire de Rage, sera euthanasié.

Ainsi en Ariège, département limitrophe des Pyrénées-Orientales au niveau du Madres-Coronat, la fourrière gardera le chien 4 j, recherchera son propriétaire s'il est tatoué, avant de l'euthanasier en l'absence de réclamation ou de récupération par la SPA pour l'adoption. 61% des communes ariégeoises ont rédigé des arrêtés interdisant la divagation des chiens.

De plus, s'ajoute à cela, la nécessité d'informer les populations locales, les fédérations de chasse, et les promeneurs sur les dispositions prises localement. Des mesures peuvent aussi interdire purement et simplement la présence de chiens dans certains lieux, ou limiter l'autorisation à leur tenue en laisse.

d) Pourquoi y a-t-il autant de chiens errants malgré cela ?

Beaucoup de raisons peuvent être évoquées ici : le manque d'un gardiennage suffisant sur les estives tout d'abord.

Mais surtout, le plus souvent la trop grande ambiguïté des textes de lois les rend souvent inapplicables. Ainsi, sur le Madres-Coronat, au sein même de la réserve, le flou juridique est très parlant puisque l'arrêté municipal stipule que tous les chiens sont interdits sur la réserve sauf :

- ceux affectés aux missions de recherche et de sécurité,
- ceux des bergers en activité pastorale,
- ceux des chasseurs,
- ceux des randonneurs,
- ou tout chien en dehors des périodes d'estives.

Enfin c'est dans l'application des lois que le bât blesse. Beaucoup de municipalités ne veulent pas faire mauvaise figure aux yeux des touristes, qui pourraient se mettre à bouder des départements où ils ne peuvent même pas être accompagnés par leur animal lors de leurs escapades dans la nature, privant ainsi la commune d'une ressource économique intéressante. Les mairies ne possèdent même pas, en général, de structure spécialisée pour accueillir ces chiens qu'ils envoient directement à la SPA la plus proche, quand il y en a une. De plus, en dehors des grands parcs nationaux, où une équipe de surveillance patrouille en permanence pour faire respecter les règles de bonne conduite, les lieux naturels manquent le plus souvent cruellement de professionnels de surveillance, de capture des animaux en divagation, et de constat de prédation.

e) Processus d'indemnisation :

Ce dernier ne fait que s'ajouter à la complexité des démarches pour lutter contre la prédation.

Il faut d'abord prouver que la prédation a bien pour origine un chien. Pour cela il faut avoir pu l'identifier, soit en le capturant, soit par le témoignage d'une tierce personne, soit en faisant reconnaître les faits à son propriétaire.

Puis, c'est la responsabilité civile du maître qui entrera en jeu, et son assurance remboursera la partie civile. Si le chien appartenait à un chasseur en exercice, son assurance chasse ne jouera pas, et c'est aussi la responsabilité civile qui interviendra.

Si le chien n'est pas identifié, seul un éleveur assuré convenablement contre ce type « d'accident » sera remboursé par son assurance en fonction du montant de sa cotisation.

Si le chien est identifié, mais que son maître nie les faits, un procès pourra être intenté contre le maître par l'assurance de l'éleveur.

Mais dans la pratique, c'est beaucoup plus compliqué que cela, et le recours à ces plaintes demeure assez rare. En effet, le constat reste souvent difficile et imprécis : la gendarmerie tarde parfois à venir, la bête attaquée a disparu, il y a des limites dans le délai entre l'attaque et la déclaration de ses conséquences sur les avortements.

D'autre part, il est peu évident de prendre un chien sur le fait : il est d'autant plus difficile à attraper suite à son attaque, qu'il est encore animé de son excitation carnassière. Il doit porter les marques de son carnage, c'est-à-dire être encore couvert de sang et de bave, ou montrer après un lavage d'estomac pratiqué par un vétérinaire, des restes de sa prédation.

Il est souvent tout aussi difficile de retrouver le maître du chien, et si c'est un voisin, on préférera un arrangement à l'amiable.

Enfin, peu d'assureurs couvrent ce genre d'incident par un manque évident de rentabilité, et peu d'éleveurs contractent ce type d'assurances qui sont souvent trop onéreuses par rapport au remboursement qu'ils en attendent. Le rapport Estrosi ainsi propose une solution d'indemnisation commune quelle que soit l'origine canine de la prédation : un système assurantiel avec une franchise de 1 euros par brebis et un contrat d'assurance prenant en charge aussi bien les dégâts occasionnés par les loups que par les chiens. Enfin il préconise aussi l'identification obligatoire des chiens par tatouage ou radiofréquence pour faire jouer l'assurance des propriétaires plus facilement.

Ainsi, malgré les orientations claires proposées par les 2 commissions des rapports de 1999 et 2003, les mesures entrées en application sont assez peu nombreuses et concernent surtout l'utilisation de la dérogation de l'article 16 de la convention de Berne. Le suivi régulier géré par un organisme spécialisé et l'analyse des données pour mieux comprendre la colonisation par le loup du territoire français et l'anticiper sont les enjeux à venir. Mais dans le chapitre qui suit nous verrons que si le relevé des indices de présence du loup est intéressant, il relève de compétences spécialisées et ne suffit pas à réaliser la distinction indispensable entre chien et loup pour intervenir en conséquence. En effet éliminer des loups pour gérer une population globale ne doit pas être négligé, mais les abattre pour rien n'est pas à souhaiter...

C. Les études comportementales : seuls indices rapportés de présence du loup

1. Quelques données éthologiques, bases des indices de présence du loup (de Beaufort, 1987; Okarma, 1998)

Pour suivre une population de loups évoluant dans son milieu naturel, il est indispensable de connaître certaines caractéristiques générales du comportement et des conditions de vie du loup. En effet, tous les protocoles de suivi de population du prédateur sont fondés sur l'éthologie de l'espèce.

a) Morphologie

- Standard.

Le loup européen seulement fera l'objet de cette description. Le loup européen, *Canis lupus lupus* est aussi appelé loup gris ou loup commun. Généralement il est caractérisé par une robe fauve à rousse sur le dos et les flancs, à nuancer par la présence plus ou moins importante de poils noirs. Sur la face antérieure des membres antérieurs, on observe souvent une bande de poils noirs sur la longueur. Le loup subit une mue progressive de sa fourrure en régions tempérées laissant des bourres de poils sur son passage.

Contrairement à l'image que l'on a souvent de lui, et qui correspond en réalité à celle du loup américain, le loup européen est de taille moyenne restant toutefois plus grand qu'un renard ou un lynx. Pour un poids de 36-39

kg pour les femelles et de 43-46 kg pour les mâles, le loup mesure de 60 à 90 cm au garrot, les mâles étant plus gros que les femelles. Les empreintes laissées par le loup permettront d'ailleurs d'en apprécier les dimensions.

- Des différences majeures avec le chien.

Les différences sont nombreuses et appréciables à plusieurs niveaux d'études. Nous n'aborderons pas les différences anatomiques comme la différence de morphologie des os de la face et des dents qui sont des paramètres utilisés pour classer et différencier les deux espèces sur le plan phylogénétique.

Le port de la queue est souvent horizontal ou légèrement pendant pour le loup alors que les chiens à morphologie lupoïde l'ont généralement recourbée.

Une des différences majeures entre chien et loup réside dans leur forme de marche. L'étroitesse d'épaule des loups, ainsi que leur adaptation aux parcours de longues distances quotidiennes sont révélées par le fait que le loup « recouvre ses pas ». En effet, au cours de la marche, le pied postérieur se pose sur l'empreinte laissée par le pied antérieur de même latéralité. Au cours d'une allure rapide, ce dernier est dépassé par le premier. D'autre part, les deux latéraux sont alignés en « coup de fusil » (sauf en montée où les antérieurs s'écartent un peu) (voir **Fig.5**). Ainsi les traces d'un loup s'enchaînent selon une ligne quasi-parfaite alors que les chiens laisseront des traces en quinconces.

D'autre part les empreintes laissées par ces deux espèces présentent des différences ténues. Contrairement au chien, les empreintes du loup possèdent un talon plus gros, large et détaché du reste de la trace, et forment 3 petites fossettes sur le sol. Le pied est plus serré. Les ongles médians sont parallèles et serrés. Enfin la face caudale du coussinet central laisse une empreinte rectiligne alors que cette dernière est bosselée pour le chien.

Hélas de manière générale, le loup a une allure souple et marque peu le sol. La reconnaissance des empreintes nécessitera donc un support boueux ou de la neige pour pouvoir être significative.

Ces différences ont néanmoins des limites car un chien errant et retourné à la vie sauvage depuis quelque temps ou entraîné à la course adoptera l'allure du loup et pourra être confondu avec ce dernier.

b) Mode de déplacement

Au sein d'une meute, les loups se déplacent les uns à la suite des autres posant leurs pas dans les empreintes laissées par le loup les précédant. La distinction d'une meute avec un animal solitaire est donc difficile de ce point de vue.

Les loups empruntent des chemins simples et faciles d'accès : les bords de fossés, le long de poteaux ou de buissons. C'est en des sites précis sur leur passage qu'ils marquent leur territoire à l'aide de crottes ou d'urine.

Leur rythme régulier de course, atteignant 8 km/h en moyenne, leur permet de parcourir plusieurs dizaines de kilomètres en une journée.

c) Milieu de vie

Les loups colonisent de nouveaux milieux principalement en fonction de l'abondance des proies. Ils s'établissent préférentiellement dans des espaces à couvert forestier pour échapper à la chasse lorsqu'ils se retrouvent à découvert. Mais à l'origine, le loup est une espèce des plaines. Les loups ne restent généralement pas dans des endroits trop ventés, où ils ne peuvent pas correctement détecter les odeurs (dans le cas le plus favorable, un loup peut ainsi reconnaître une proie à une distance de 2,5 km de celle-ci, et localiser un hurlement d'un de ses congénères à plus de 6 km à la ronde). Au sein de leur territoire, les loups choisissent leurs tanières dans des endroits difficiles d'accès et de préférence à proximité d'un cours d'eau.

Rq : en ce qui concerne le Massif du Madres-Coronat, c'est là un point négatif pour le retour du loup, car il s'agit d'un milieu très sec, où l'on ne compte que très peu de sources d'eau.

Mais l'Histoire a montré maintes fois les capacités d'adaptation extraordinaires du loup à tout type de milieux.

d) Rythme saisonnier de vie

Si le loup recherche constamment de nouveaux territoires répondant à ses besoins, il alterne entre nomadisme et sédentarité au rythme de la saison de reproduction.

Comme les chiennes, la louve dominante a généralement ses chaleurs tous les 6 mois, mais la période la plus propice à la fécondation est le printemps. Peu avant la naissance des louveteaux, la meute ralentit son rythme de déplacements pour élire domicile autour d'une zone possédant une tanière.

Aux mois de mai et juillet, les loups passent une 20 aine de jours dans un même endroit ; deux sites de séjour successifs sont en général à proximité l'un de l'autre, car les loups sont alors peu mobiles. Durant l'été, la période d'activité de chasse se réduit à l'heure du crépuscule et la nuit pour se soustraire à la chaleur des journées. Puis la durée des séjours en un même lieu se raccourcit pour atteindre une semaine avec des déplacements de plus de 3 km en aout-septembre.

En fin d'automne, les loups sont au maximum de leur mobilité et parcourent de longues distances pour découvrir et étendre leur territoire ; cette époque correspond au sevrage des louveteaux. Durant l'hiver, la meute est très active ; elle peut alors parcourir 70 km en une journée en fonction de ses besoins de chasse, de fuite et de son état général.

e) Organisations spatiale et sociale

Les loups sont généralement regroupés au sein d'une meute où la hiérarchie au sein des individus laisse peu de place à la liberté de chacun. Les ports de la tête et de la queue sont caractéristiques de la position hiérarchique de dominance.

Ainsi certains membres qui remettraient en jeu leur place pourraient être chassés et deviendraient des solitaires. Le comportement spatial et social de la meute diffère bien sûr de celui d'un seul individu.

En effet, chaque meute possède un territoire en évitant que ce dernier ne chevauche celui d'une autre. Le territoire naturel d'une meute s'étend sur quelques milliers de kilomètres, cela en fonction du nombre d'individus qui la composent, de l'abondance des proies...Un loup solitaire qui traverserait le territoire d'une meute en serait aussitôt chassé.

Le marquage du territoire d'un loup est de ce fait un comportement très important pour ce dernier afin d'être identifié, craint ou au contraire recherché par ses congénères.

Les loups marquent ainsi leur territoire par : des jets d'urines, des défécations, ou les frottements de certaines parties cutanées munies de glandes odoriférantes (glandes violette, sexuelle ou anale) contre certains arbres ou parois rocheuses situés en des points stratégiques. Ces endroits sont des lieux de passages « obligatoires » pour les autres animaux au sens de leur accessibilité. On notera déjà des différences du point de vue hiérarchique en ce qui concerne le placement du jet d'urines. Un individu dominant marquera son territoire en hauteur alors qu'un dominé laissera des

marques plus près du sol ; de la même façon un chien marquera son territoire par des jets d'urines bas.

f) Régime alimentaire et prédation

Un grand prédateur.

C'est en fait la caractéristique principale qui puisse faire penser qu'un loup est présent sur un massif, après l'attaque d'un troupeau par un grand canidé.

Le loup est avant tout carnivore avec une grande diversité de proies allant des ongulés sauvages aux batraciens. Il a besoin de 4kg de viande par jour.

Dans les crottes identifiées à la réserve de Nohèdes comme provenant des défécations d'un loup, il a été identifié des restes non digérés d'isard, de sanglier, de cerf, de lièvre et de chèvre. Il peut donc tout à fait s'attaquer aux ongulés domestiques (bovins, ovins et même équins). Ils se nourrissent aussi de petits rongeurs, d'oiseaux, ou encore de baies sauvages et de fruits. L'alternance de prédation entre ongulés sauvages et domestiques est surtout fondée sur la période de pâturage de ces derniers. Les animaux domestiques seront plutôt attaqués lors des estives et au printemps car ils sont alors les plus accessibles et les plus faibles. La forte concentration d'animaux sans surveillance suffisante, la nuit passée dans un enclôt avec juste quelques barrières, et la vulnérabilité des animaux sont des facteurs déterminants de l'attaque du loup.

Une différence majeure est alors à remarquer entre les attaques d'une meute et celle d'un animal solitaire. Une meute adoptera une stratégie de chasse bien rôdée visant à épuiser la proie et à l'éloigner de son éventuel troupeau en détournant l'attention du gardien animal ou humain qui la protège. Un loup solitaire ne s'attaquera qu'à de petites proies et peut même devenir charognard et profiter des animaux blessés au cours de la chasse, tués par d'autres prédateurs ou morts de maladie. À ce titre le loup constitue, dans la nature, un excellent élément régulateur des populations d'herbivores sauvages puisqu'il en limite la pullulation, élimine les individus porteurs de maladies potentiellement contagieuses ou les animaux vieillissants et ralentissant l'évolution du troupeau. Dans tous les cas, les loups n'entreprennent que très rarement une prédation hasardeuse ou la balance risque encouru/ bénéfice alimentaire n'est pas clairement en faveur de ce dernier critère.

Les techniques de dépeçage des proies : des marques de genre.

Le plus souvent le loup ne tue que pour s'alimenter, il n'est que rarement pris de « folies meurtrières » pouvant le conduire au massacre de plusieurs animaux sans prélèvement conséquent de viande.

Sa méthode de dépeçage est assez caractéristique de son espèce. Contrairement à l'ours ou au chien, le loup n'éventre pas sa proie et n'en consomme pas les viscères. Il laisse en général les marques d'une morsure au cou de grand diamètre démontrant un écartement de mâchoire propre à un grand prédateur, ainsi que d'autres traces sur la croupe et le dos. Il déchire en général tout un côté de l'animal en arrachant le membre antérieur dans son intégralité, les muscles dorsaux et le membre postérieur. Un chien en général est bien moins méthodique et réalisera un carnage.

La carcasse d'un animal victime d'une attaque par un canidé pourra donc servir au diagnostic d'espèce, comme d'ailleurs certains autres éléments d'éthologie du loup qui permettront la détection d'indices de sa présence.

2. Protocoles d'études et de suivi de présence du loup

a) Principes, objectif et organisation en France (ANNEXE 3)

En France, le suivi des populations de loups ne s'est organisé que depuis une dizaine d'années, en l'absence d'une base d'intervention et de surveillance réelle. Ce sont les gardes forestiers qui sont en charge de venir repérer la présence éventuelle du prédateur en cas d'actes de prédatons sur les troupeaux ou de témoignages visuels.

Sur la base de connaissances éthologiques, on comprendra que l'observation directe d'individus solitaires ou d'une meute reste un cas très rare, vu la discrétion dont peut faire preuve le loup. D'ailleurs la plupart des témoignages visuels de la présence d'un loup, que ce soit de la part de promeneurs, de bergers et même de gardes forestiers ont ensuite été contredits par les prospections faites par la suite. On peut citer le cas des prédatons répétées sur le troupeau ovin du Madres-Coronat en 98 où « deux loups » avaient été observés par la population locale, alors qu'il s'agissait de deux beaucerons abattus en 98, même si les prédatons ont continué par la suite.

De ce fait, le suivi du loup dans un massif se fonde sur deux autres axes d'orientation : la description des caractéristiques de la prédation, et le relevé d'indices de présence (pistes, empreintes, marquages). Ces axes font l'objet

d'une normalisation par le programme LIFE loup visant à objectiver le plus possible la présence du loup dans les différentes zones de colonisation.

Tout d'abord, concernant la description des prédatons, le protocole LIFE loup est appliqué dès qu'une plainte de la part de l'éleveur est déposée pour une prédation éventuelle dans son troupeau. Il s'agit alors de mesurer la probabilité de responsabilité du loup dans ces destructions pour mettre en place les démarches d'indemnisation le plus rapidement possible. Pour cela, la zone où a eu lieu la prédation, la période nyctémérale d'intervention du prédateur, son éventuelle méthode employée seront tout autant de facteurs évalués pour mesurer la vraisemblance d'une attaque par un grand prédateur.

Ainsi ce sont des agents (ONCFS, PNM) assermentés qui font le constat des dégâts sur le terrain, qu'ils envoient à la DDAF concernée qui établit ensuite un premier rapport (la fiche d'instruction de compensation des attaques) transmis à l'expert de l'ONCFS qui classera enfin l'attaque. Les agents sur le terrain qui peuvent être aidés d'un vétérinaire vont alors faire une description sans présager à aucun moment de l'origine de l'attaque. Ce constat comprend la description du cadre de la prédation, de la catégorie de la dépouille (espèce, âge, sexe), de traces de sang autour de la dépouille et de la présence de chiens aux alentours, un examen détaillé de la dépouille depuis son état général au moment de la découverte aux traces de morsures et des parties consommées.

D'autre part, l'étude d'indices de présence du loup sert souvent un autre objectif qui est la gestion des populations de loups dans les massifs français de façon à, si possible, anticiper et préparer la cohabitation des éleveurs avec le prédateur.

Outre les observations directes, et les témoignages de hurlements, qui sont relevés par les agents de l'ONCFS de manière normalisée par la procédure LIFE loup, il s'agit surtout d'effectuer des prospections hivernales ou printanières sur des zones où l'on suspecte la présence d'un ou plusieurs loups. Pour cela, les réserves naturelles organisent ces prospections assez régulièrement. Elles consistent en des randonnées de quelques jours par des équipes de gardes, couvrant des itinéraires différents et potentiellement favorables à la présence du loup. Elles sont généralement organisées peu après les chutes de neiges qui permettent de figer les traces d'un éventuel passage du prédateur. Les équipes sont munies de tout le matériel nécessaire pour relever, mesurer des empreintes, et de poches et de gants jetables pour prélever d'éventuels poils, fèces, ou urines.

La fraîcheur des empreintes est notée, les caractéristiques des pistes (plusieurs empreintes issues de la marche continue du prédateur) sont relevées permettant, aux vues des connaissances éthologiques, d'évaluer s'il peut s'agir d'un grand canidé, de spécifier l'espèce, sa taille, son sexe et son âge approximatif en fonction des tailles, formes et espacements des empreintes.

Les poils sont un indice très précieux mais extrêmement rare. En effet, ils ont souvent été laissés par des individus passés dans des endroits escarpés ou sur des arbres de marquage. Mais la neige les dissimule vite et les intempéries les dispersent. Des analyses morphologiques et surtout génétiques ont permis dans le Mercantour d'identifier le loup mais la conservation du bulbe pileux, indispensable pour ces analyses rend souvent l'entreprise difficile.

Enfin les fèces permettent surtout de connaître le régime alimentaire de leur propriétaire par l'analyse des os et d'autres éléments non digérés par le prédateur. Les excréments comme les traces d'urines sont le plus souvent laissés en des endroits stratégiques pour le marquage du territoire. Ils permettent donc de présager du statut social de l'individu qui les a laissés.

Tous ces indices sont ensuite mis en recoupement afin de tracer des zones de présence du loup sur un massif, avec ses itinéraires habituels, ce qui permet d'engager les procédures d'adaptation du pastoralisme à la colonisation des espaces par le loup, et la gestion des populations du prédateur.

Dans notre étude, nous sommes donc conduits à citer le cas de la Réserve Naturelle de Nohèdes comme un exemple d'application de la procédure LIFE loup dès la suspicion de la présence du prédateur dans le massif de Madres-Coronat à partir de 1997.

Au préalable, il me semble intéressant de noter que le massif du Madres-Coronat a toujours entretenu une étroite relation avec les grands prédateurs. Depuis les années 50, on a recensé de nombreux témoignages d'observation d'ours, de loups et même de lynx, qui ne sont pas tous dignes de foi. Pourtant en 1997, un cas litigieux survenu à Nohèdes va initier des études plus sérieuses qui vont donner la preuve d'une présence lupine sur le massif.

b) Évènements survenus à Nohèdes ayant initié l'étude prospective sur la présence d'un loup entre 1997 et 2000 (Fig.4)

La commune de Nohèdes compte un éleveur, Monsieur Gougeon, qui possède un troupeau de 470 brebis à viande. Sa bergerie, isolée, se situe à une vingtaine de minutes à pied du village, la zone qui entoure les bâtiments ne servant que de parcours d'hivernage. Le reste du temps, pendant la transhumance, les brebis se fondent dans un troupeau collectif de 750 têtes, mené par le berger sur des parcours d'estive dans la réserve de Nohèdes.

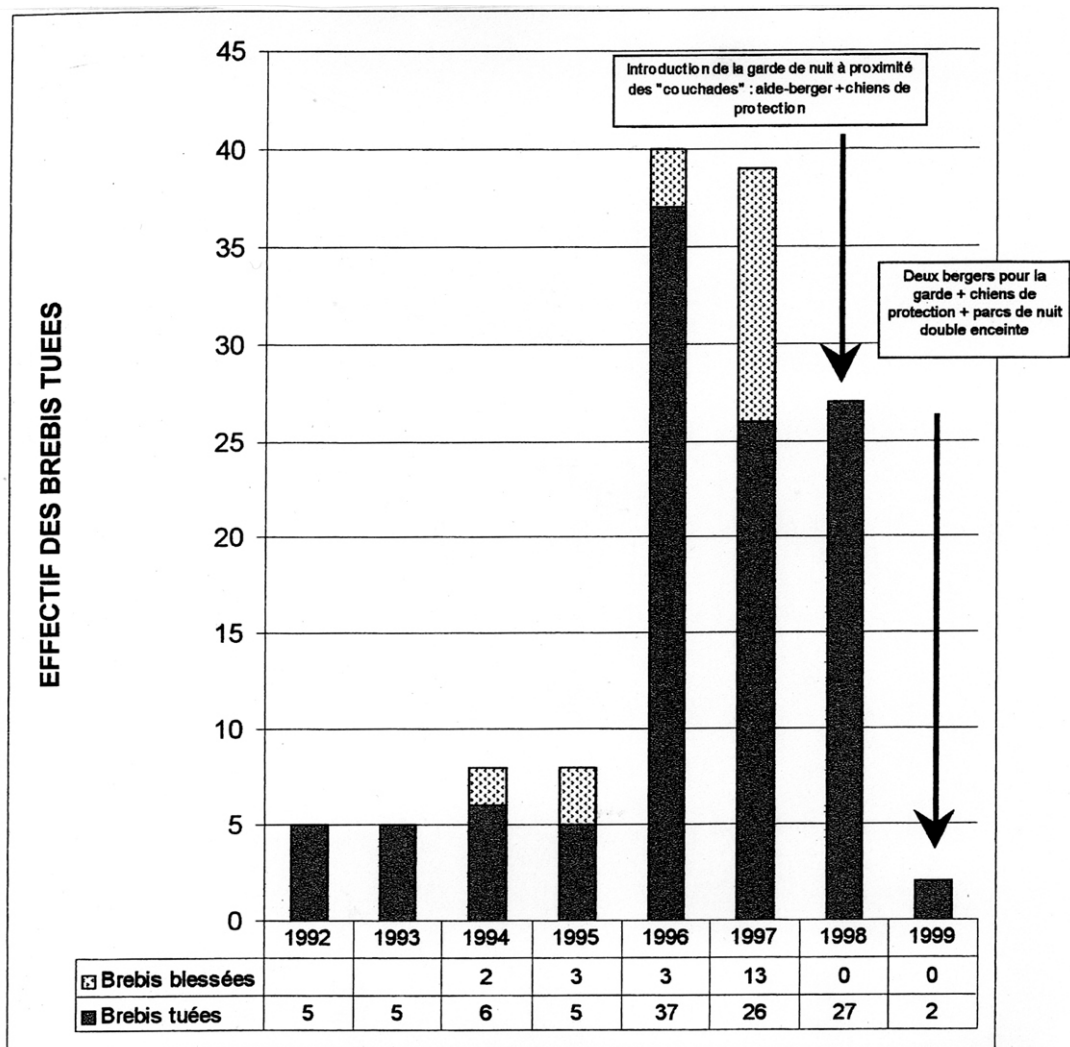
Ainsi, depuis 1993, le berger avait observé des prédatons récurrentes. Restreintes aux périodes d'estive jusqu'en 1996, elles se sont produites été comme hiver en 1997.

Or cette année-là, le berger perdit 36 brebis (égorgées ou disparues) et 8 furent blessées (Pistolesi, 1998).

La trop forte augmentation de la prédation de 1997, a conduit le berger à changer d'estive et à se doter de chiens de protection alors peu efficaces car mal éduqués. L'éleveur s'en est séparé pour adopter des Montagnes des Pyrénées, dits "patous", pour l'automne 99. De nouvelles attaques ont eu lieu, en hiver, touchant des brebis oubliées la nuit en l'absence de parcage, et sur l'estive, la nuit seulement car le berger n'était alors pas présent. En juillet 1998 une opération de piégeage est lancée par l'ONCFS sans succès. À la fin de l'été, on retrouve des cadavres de brebis égorgées, auxquelles il manque une grande partie du corps, ce qui signe plutôt une attaque de loup car l'ours éventre, et les chiens divagants ne consomment le plus souvent pas leur proie en entier. L'ONCFS se mobilise, mais devant les chiffres publiés sur la fréquentation de l'estive par les chiens (30/j/100 Ha), elle attribue cette prédation à ces derniers. Le préjudice occasionné directement ou indirectement par ces attaques s'élevait à 12000 euros, sans compter les conséquences du stress.

En outre, des expertises furent menées par Monsieur Bataille de l'ONCFS concernant : la localisation des blessures mortelles, l'identification des parties consommées, la mesure de l'écart et du diamètre des perforations occasionnées sur la peau du cou, l'attitude du troupeau pendant et après l'attaque. La différenciation entre un loup et un chien resta en suspens, d'autant que deux beaucerons divagants avaient été abattus en 98 à Nohèdes, sans mettre fin à la prédation.

.



Investissements							94 433 F
Equipements pastoraux							
Fonctionnement						63 529 F	141 550 F
Poste de gardiennage (1 plein temps sur 4 mois + 1 ¼ temps sur 8 mois)							

Fig.4 : Évolution de la prédation sur le troupeau ovin du massif du Madres-Coronat entre 1992 et 1999 : effets des mesures de protection.

(Pérennisation de l'élevage ovin sur le site du Madres-Coronat ; dossier réalisé par l'AGRNN- janvier 2000)

Parallèlement, s'était mise en place une opération de recherche d'autres indices de présence éventuelle d'un loup à partir de l'été 1998 (Mangeot, 2000).

En 1999 l'observation à faible distance faite par l'éleveur de ce qui pouvait être un loup, relance la polémique (Besset, 1999; Forestier, 1999; (Terre-net), 1999)

c) Protocole de prospection hivernale mis en place sur le massif du Madres-Coronat, et résultats

En réponse à ces événements, plusieurs organismes se sont réunis pour étudier plus profondément le problème de la présence éventuelle d'un loup sur le massif. Il fallait d'abord collecter d'autres indices de présence lupine, ce qui fut rendu possible par la participation active et méthodique d'une personne de l'ARGNN durant l'été 1998, aidée par son collègue durant l'automne 98, de 10 participants de l'ONCFS, l'ONF, et l'ARGNN pour l'automne/hiver/printemps 99, de 19 intervenants des mêmes organismes avec en plus la Confédération des Réserves Naturelles Catalanes pour les mêmes périodes en 2000, et de 10 participants des mêmes organismes durant l'automne/hiver/printemps 2001.

Le protocole de prospection appliqué a été celui déjà utilisé dans les Alpes françaises par l'ORGP Loup. Il s'agissait, en effet, un à deux jours après chaque chute de neige sur le massif, de sillonner des itinéraires décidés à l'avance en fonction de la plus grande probabilité éthologique de passage d'un loup. Les animaux se déplacent alors entre deux tempêtes de neige, et le laps de temps indiqué correspond à celui qui est nécessaire avant que la neige subisse sa transformation.

Le choix des itinéraires évolue d'année en année selon les lieux d'attaque, d'observation visuelle d'un grand canidé, d'observation de pistes déjà laissées par un grand canidé, et se porte aussi sur les pistes forestières, canaux d'irrigation, sentiers pastoraux, et les larges cols d'altitude.

(ANNEXE 4)

Ainsi, 5 à 7 heures de marche journalière étaient nécessaires pour suivre ces itinéraires, ce qui a permis de couvrir 1700 km de 1998 à 2001. À noter qu'à cette prospection collective, s'ajoutent des recherches individuelles d'indices selon la disponibilité de chacun.

Ces recherches se sont déroulées sur les communes de Nohèdes, Urbanya, Mosset, Roquefort sur Salt et Sansa.

Lors des différentes prospections, l'attention s'est principalement portée sur **(Fig.5 et ANNEXE 4)** :

- des empreintes de canidé au talon bien marqué (caractéristique du loup),
- des pistes (suite de pas dans la neige),
- des crottes signifiant le plus souvent un lieu de marquage à la croisée de chemins, ou sur un lieu de passage obligatoire pour les animaux, au pied d'arbres,
- des poils et des urines, signes aussi de marquage du territoire, indiquant la position hiérarchique de l'individu. En effet, un animal dominant ou seul marque en hauteur, alors qu'un animal soumis dans une meute marque au sol (Okarma, 1998).

Avec ces éléments, le suivi d'un grand canidé a pu être réalisé pendant 4 ans, étayé par des observations visuelles et des attaques sur les troupeaux environnants (Salvador, 2000) **(ANNEXE 4)**.

Tout d'abord, un grand canidé décrit souvent avec précision et pouvant correspondre à un loup a été observé à cinq reprises en trois ans : en 1998 un coureur à pied sur la piste forestière l'a vu, puis un vacher sur l'estive du Caillau près du col de Jau ainsi qu'un berger sur la soulane de Nohèdes cet hiver-là. En 1999 un berger l'aurait aperçu sur la Coma Pregona , et la dernière observation directe remonte à l'année 2000 où un chasseur affirme l'avoir vu à faible distance sur la Coma de Pounteils.

De plus, lors des prospections hivernales, on a trouvé de nombreuses pistes, 17 en tout, dont 8 à l'an 2000, et en 1999, et une en 1998. Les empreintes mesuraient 10 cm sur 9 cm, avec une longueur de pas de 120 cm, ce qui relève d'un grand canidé. Les traces présentaient des griffes bien marquées, un talon rectiligne imprimé profondément dans le sol, et l'on a pu dénoter un faible écartement entre les centres des pattes droite et gauche (5 à 7 cm) **(Fig.5)**.

Les pistes ont pour particularité d'être alignées en " coup de fusil ", l'animal posant ses pattes postérieures exactement dans l'empreinte de l'antérieur ipsilatéral. Or cela est caractéristique d'un canidé très bien entraîné à la course d'endurance (de Beaufort, 1987; Okarma, 1998). L'animal semblait avoir une allure prudente (évite l'abord de cols à découvert, marche sur les pistes forestières toujours du côté du ravin), mais assuré de son itinéraire. Ces pistes servaient, sans doute, à joindre la zone de refuge ou celle d'alimentation.

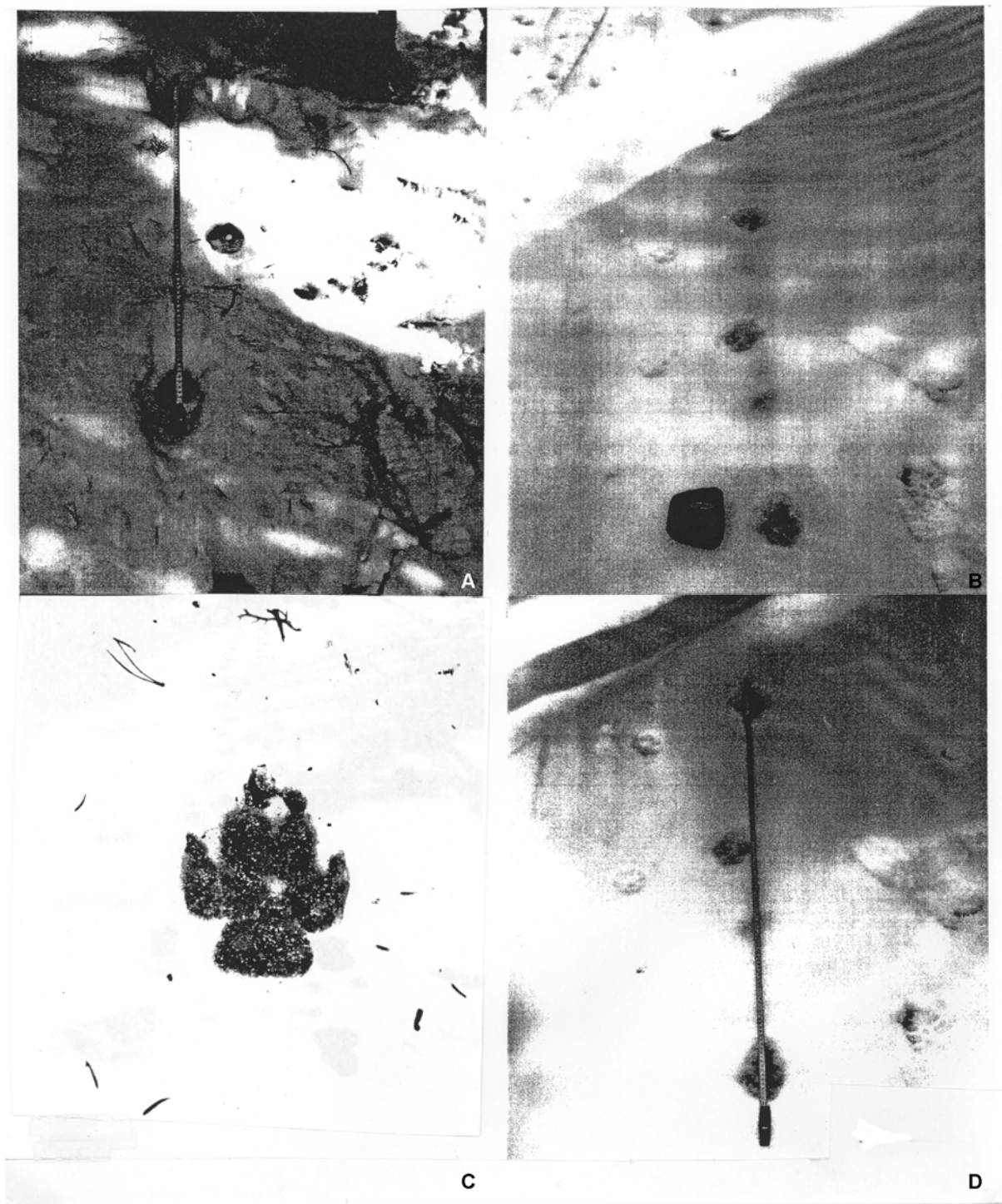


Fig. 5: Photos de pistes et empreintes retrouvées lors de prospections (15-01-99, O. Salvador) : A, B, D : piste de grand canidé dans la neige. L'alignement des pas en « coup de fusil » caractéristique des loups et la mesure de la foulée sont potentiellement attribuables à un loup mâle solitaire. L'empreinte avec les 4 doigts et leurs griffes profondes ainsi que le coussinet plantaire d'aspect convexe renforce cette hypothèse.

D'autre part les crottes retrouvées ont été elles aussi riches en enseignement. Sept ont été prélevées dont 5 en 1999, attestant de la présence d'un loup par l'analyse génétique réalisée par le Professeur Taberlet de l'université de Grenoble (Taberlet, 1996), et révélant son régime alimentaire et sa dynamique de colonisation.

La grande majorité de ces crottes étaient à dominante de poils, d'esquilles d'os et d'un diamètre supérieur à 3,5 cm. Elles contenaient du sanglier, de l'isard, du cerf, du lièvre, et de la chèvre, ce qui est compatible avec la zone d'étude.

Ces crottes ont été trouvées au niveau de cols : col de las Bigues, col del Torn, col de Portus, que j'ai pu moi-même prospecter cet été sans résultat. On remarque toutefois que ces sites sont autant de passages obligatoires car plus aisés pour tout animal en mouvement, la plupart des traces ayant été découvertes sur des pistes forestières, le reste étant hors sentier. Cela a pu être interprété comme un signe de marquage d'un loup seul, hypothèse renforcée par le fait que plusieurs fèces aient été trouvées au pied du même arbre, montrant la fréquentation régulière des lieux (l'arbre semble être privilégié pour ce rôle car on y retrouve les crottes d'autres espèces telles que blaireau ou renard).

Quant aux marques d'urines, elles ont été retrouvées toujours en hauteur. Or seuls les individus solitaires ou dominants en meute marquent ainsi. De plus, l'analyse ADN aurait montré qu'il s'agissait d'un mâle.

Enfin, en ce qui concerne les traces de prédatons, seules ont été retrouvées celles qui sont menées sur les troupeaux d'animaux domestiques (Mangeot, 2000; Salvador, 2000). Aucun cadavre avec des marques révélant sa mise à mort n'a été découvert. La prédation a concerné trois troupeaux distincts, celui de Nohèdes en 97-98, celui qui est sur la commune d'Aguatèbia en 99, et sur celle de Sansa en 2000. Cela peut être interprété comme un report de la prédation sur des troupeaux plus vulnérables alors même que ces troupeaux se dotaient l'un après l'autre de systèmes de protection (patous, parcs de nuit à double enceinte avec berger présent) (Letscher, 1999) (**Fig.4**). On a retrouvé les mêmes caractéristiques d'attaque que sont : une attaque en l'absence de gardiennage ou dans des situations de difficulté ou de vulnérabilité du troupeau, la morsure au larynx, la consommation des épaules avec leur arrachement net, et l'absence de consommation des viscères.

Enfin on a noté que la prédation s'effectuait les nuits d'été, avec un accroissement en fréquence lors de la pousse des champignons qui facilite la dispersion des brebis qui en sont friandes. Le berger et ses chiens ont alors beaucoup de mal à garder le troupeau sous contrôle. En hiver, il s'agit plutôt d'une prédation de jour suivant la chute de neige, dans des conditions de vent violent, ce qui limite le flair des patous.

En conclusion, grâce à tous ces éléments d'enquête, on a pu conclure en un premier temps que le massif du Madres-Coronat abritait un grand canidé habitué à la course, alors que les analyses génétiques menées en 1999 auraient confirmé l'hypothèse d'un loup mâle solitaire d'origine italienne (Kleiber, 1999). Celle-ci serait étayée par son marquage très voyant, ce qui n'est pas le cas lors de l'existence d'une meute à proximité, qui l'attaquerait et le tuerait.

3. Des insuffisances pour le suivi d'une population et de ses prédatons

À partir de l'exemple des études qui ont été réalisées sur le Massif du Madres-Coronat, on peut déduire les insuffisances de relevés de présence fondés sur un phénotype comportemental.

Tout d'abord le suivi des populations de loups a jusque-là souffert du manque d'investissement de l'Etat. Le rapport Estrosi souligne même le retard de la France en termes de suivi de population des grands prédateurs par rapport à l'Italie (Spagnou, 2003). En effet, nos homologues européens tout autant concernés par le retour du loup et de l'ours dans les Alpes et les Apennins, ont déjà beaucoup investi certains fonds communautaires dans la collecte et l'analyse de données considérables sur le loup permettant d'anticiper les migrations de ce dernier vers les Alpes du Sud et d'initier des mesures de gestion rationnelle des populations pour les maintenir à un niveau acceptable. En France tout reste à faire de ce point de vue-là.

Cela a pour première conséquence, le manque de spécialistes du loup, et le manque d'agents assermentés pour le suivi sur le terrain des populations. En effet, les prospections sont des opérations qui doivent être organisées longtemps à l'avance pour être mises en œuvre dès que les conditions favorables sont réunies. Dès l'averse de neige, les équipes doivent pouvoir partir rapidement avant que les traces ne soient effacées. Quand il y a eu prédation, il faut agir avant les charognards...

D'autre part, les opérations de suivi de présence consistent à concentrer beaucoup de temps et d'hommes pour pouvoir réunir assez d'éléments de réponse. On ne pourra donc pas mobiliser assez de gardes forestiers pour ces prospections s'ils sont en même temps en charge d'un site et d'autres missions. Il faut donc du personnel qualifié et réservé à ce suivi.

Pour avoir suivi une prospection estivale de 3 jours, et dans des conditions bien meilleures que celles qui sont rencontrées par une équipe en hiver sur le Madres-Coronat, je ne peux qu'insister sur le fait que la prospection et le relevé d'indices est un métier qui fait appel à des compétences de spécialiste.

D'ailleurs la découverte de poils tient plus à une profonde connaissance du comportement animal pour anticiper ses actes que de l'heureux hasard, et il faut agir très vite car le climat détériore aussi rapidement les indices. Les traces dans la neige se déforment et s'effacent, l'urine sèche, les poils se dispersent et les fèces sont vite lessivées par les pluies.

Enfin, ces études lorsqu'elles sont bien menées, ne permettent au mieux de conclure qu'à la présence de grands canidés, sous leur forme solitaire ou plurielle. On pourra évoquer la fréquentation régulière et itinérante de certaines zones du massif, du régime alimentaire global de l'animal et évaluer approximativement son âge voire son sexe. Mais en aucun cas, on ne pourra distinguer les prédatons ou la présence d'un loup de celle d'un chien. En effet, n'importe quel chien habitué à de longues courses d'endurance ou retourné à l'état sauvage adoptera le même comportement, la même démarche, et la même façon de se nourrir qu'un loup. Ici seule la génétique peut faire la différence dans la mesure où son substrat a pu être collecté à temps.

On comprend que si le relevé d'indices de présence est un préalable nécessaire à la mise en place d'une dynamique pour accompagner le retour du loup dans une zone et sa gestion, les conséquences que pourrait impliquer ce constat sont telles qu'on ne pourrait se permettre à l'avenir de prendre des mesures sans avoir au préalable confirmé et caractérisé cette présence par des analyses génétiques. Or comme le dénonce le rapport Estrosi, aucun laboratoire d'analyse génétique n'est officiellement agréé pour l'étude du loup, aucune méthode d'identification génétique de l'espèce n'a été publiée à ce jour.

D. La génétique appliquée au loup

1. L'étude phylogénique du loup

Si l'outil génétique est aujourd'hui largement utilisé dans tous les domaines du diagnostic (diagnostic d'exclusion de paternité, maladies, empreintes génétiques...), son application au suivi de populations animales est assez récente.

Concernant le loup, c'est d'abord l'étude de l'origine phylogénétique des chiens domestiques qui a permis d'élaborer des techniques d'identification de gènes d'espèces canines. Robert K. Wayne et son équipe ont, pour cela, accompli des travaux de grande envergure (Wayne, 1993). Cherchant à dater l'origine probable des premières races de chiens, de façon à montrer qu'une espèce peut naître et évoluer depuis des effets fondateurs multiples, ils proposent ainsi une phylogénie des races de chiens et d'autres canidés comme les loups gris, coyotes, renards et chacals. Ainsi des études génétiques fondées sur des techniques d'hybridation en Hétéroduplex¹ et sur le profil d'allozyme² démontrent qu'au sein de la Super-Famille des *Canoidea*, la famille des Canidés aurait émergé il y a 50-60 millions d'années, au début de la période Eocène. La séparation du phylum des loups et des coyotes daterait d'une dizaine de millions d'années d'après des études menées sur fossiles confirmées par séquençage de régions d'ADN mitochondrial. En effet, l'ADN mitochondrial d'un individu est hérité seulement de la copie maternelle au cours de la fécondation. Il ne permet donc pas de prendre en compte sur une période très courte le transfert génétique du lignage paternel, mais sa variabilité intra-genre est suffisante pour rendre compte de la phylogénie des espèces entre elles. Ainsi c'est plus particulièrement la région I de contrôle du gène du cytochrome b, située

¹ Acide nucléique bicaténaire dans lequel les deux brins ne possèdent pas uniquement des séquences rigoureusement complémentaires. Ici, il s'agit de la technique d'analyse génétique de « Heteroduplex Gel shift analysis » développée par Delwart en 1993 qui permet, à partir d'une sonde marquée créée à l'aide d'un amplicon de la séquence d'ADN qu'on veut analyser, de révéler des variations génétiques de cette séquence par rapport aux séquences de la même famille qu'on connaît, et qui sont hybridées avec cette sonde. Les hétéroduplex migrent en électrophorèse en gel d'agarose avec un retard par rapport aux homoduplex, retard dépendant du nombre de mutations qui séparent ces séquences.

² Les allozymes sont des protéines de même activité enzymatique qualitativement mais codées par des allèles différents sur un même locus. Séparables par électrophorèse, elles constituent des marqueurs génétiques codominants.

sur cet ADN qui a permis les distinctions faites au sein des espèces et des races comme suit. Les races de chiens et les loups gris présentent une variabilité de 1,8% au niveau de cette région. Les comparaisons de séquences entre les deux espèces ont permis d'affirmer que les races de chiens descendent directement du loup gris. Contrairement à une première estimation fondée sur la découverte de fossiles de chiens déjà domestiqués sur un site d'occupation de l'homme daté à 14000 ans, la séparation des lignées du loup et du chien serait plus ancienne et serait estimée à 135 000 ans avant nos jours. Mais la diversité des phénotypes morphologiques et comportementaux des chiens ne saurait s'expliquer juste par la présence d'un seul ancêtre canin commun. En se concentrant sur une région de 261 paires de base de l'ADN mitochondrial, et en étudiant les séquences obtenues à partir d'un grand nombre de chiens de races diverses et de loups issus de populations différentes, R.K. Wayne *et al* montrent que les loups et les chiens ont évolué différemment selon leur provenance du vieux ou du nouveau monde (Vila et al., 1997). En effet, les loups des Amériques présentent plusieurs génotypes regroupables en 4 classes qui sont toutes présentes au sein des meutes réparties sur tout le Nouveau Monde (Vila et al., 1999a). Cela signifie qu'une classe ne serait pas issue d'un isolement géographique mais juste d'une diversité génétique conservée. Cela peut s'expliquer par le fait que les loups en Amérique ont toujours été soumis à des flux de grande envergure à travers tous les territoires sans isolement génétique à un moment donné. De la même façon, les races de chiens ont montré 27 profils génotypiques différents, eux aussi regroupés en 4 classes. Mais au sein d'une race, on compte un certain nombre de ces classes qui ne sont donc pas déterminantes de la race. En poussant les analyses génétiques, l'équipe a pu soulever l'hypothèse que les chiens seraient issus de plusieurs lignées de loups qui ensuite auraient évolué en fonction des croisements inter-races de chien. Parfois l'apport de sang, issu d'hybridation des loups et des coyotes avec les chiens rencontrés au cours des déplacements de l'homme nomade, constituerait aussi une source de diversification des races de chiens. La sédentarisation de l'homme a conduit le chien à s'adapter à de nouvelles contraintes qui concernent notamment le régime alimentaire, ce qui a pu faire évoluer les races. De la même manière, la sélection de races a commencé très tôt dans l'histoire de l'humanité (le chien nu du Mexique faisait l'objet d'une sélection stricte de la part des civilisations précolombiennes du fait des pouvoirs sacrés qu'on lui attribuait notamment dans le soin des rhumatismes de l'homme) (Vila et al., 1999b).

Sur le vieux continent que constitue l'Europe, si l'histoire des races de chiens ressemble beaucoup à celle de ses homologues du Nouveau Monde, celle des lignées de loups diffère (Vila et al., 1997) (**Fig.6**). En effet, les 4 classes de regroupement des génotypes observés pour les loups se retrouvent mais correspondent ici à une distinction géographique. Ainsi pour une localisation géographique donnée, seulement certains haplotypes de loup sont présents, et seulement 4 haplotypes étudiés pour le loup sont communs à toutes les zones d'occupation lupine en Europe.

1111111111111111111222222222222222222

2357900125667888889999000001112222233
52549745157470345674569146890371246739

AT-CCTC-TAATTT--TTGTCCTGCCGATAATATGATT

W12C.....A.....T.....G.....A.....
W1G.....C.....A.....A.....G.....A.....
W2G.....C.....A.....T.....CA.....G.....A.....
W3C.....C.....C.....A.....CA.....C.....
W4C.....C.....C.....A.....A?.....C.....
W5G.....C.....A.....T.....CA?.....A.....
W7CA.....A.....T.....G.....A.....
W8CA.....A.....T.....A.....
W9C.....A.....A.....GC.....A.....
W10C.....C.....C.....A.....G.....A.....
W11C.....C.....T.....CA?.....A.....
W13C.....C.....T.....CAT.....A.....
W14C?.....C?.....C.....T.....CAT.....A.....
W15G.....C.....A.....A.....GG.....A.....
W16C.....A.....CA?.....A.....
W17CCA.....T.....A.....C.....
W18C.....A.....A.....A.....
W19CA.....CA.....T.....A.....
W20C.....A.....A.....G.....G.....A.....
W21C.....A.....A.....G.....A.....
W22C.....C.....ACT.....CA.....A.....
W23C.....A.....T.....?
W24G.....C.....A.....A.....G.....A.....
W25CA.....A.....T.....GG.....A.....
W26C.....CA.....A.....T.....GG.....A.....
W6/D6T.....C.....C.....A.....A.....G.....C.....
D10T.....T.....C.....C.....A.....A.....G.....C.....
D24T.....C.....C.....A.....A.....G.....C.....
D7C.....C.....A.....CA.....TA.....CGG.....
D19C.....T.....C.....C.....A.....A.....G.....
D21G.....?.....C.....C.....A.....A.....
D8G.....C.....C.....A.....A.....
D1G.....C.....C.....A.....A.....
D2G.....C.....C.....A.....A.....
D3G.....C.....C.....A.....A.....
D4G.....C.....C.....A.....AC.....
D5G.....C.....C.....A.....AC.....A.....T.....
D9G.....C.....C.....A.....A.....T.....
D11G.....C.....C.....A.....A.....G.....
D12G.....C.....G.....C.....A.....A.....
D14GC.....C.....C.....A.....A.....T.....
D15G.....C.....C.....C.....A.....CA.....T.....
D16G.....C.....C.....C.....A.....A.....T.....G.....
D17G.....C.....C.....C.....A.....A.....T.....G.....
D18G.....C.....C.....C.....A.....A.....G.....T.....
D20G.....C.....C.....C.....A.....T.....A.....C.....
D22G.....T.....C.....C.....A.....T.....A.....G.....
D23C.....C.....C.....A.....T.....A.....
D25G.....C.....C.....C.....A.....A.....T.....
D26G.....C.....C.....C.....A.....A.....T.....

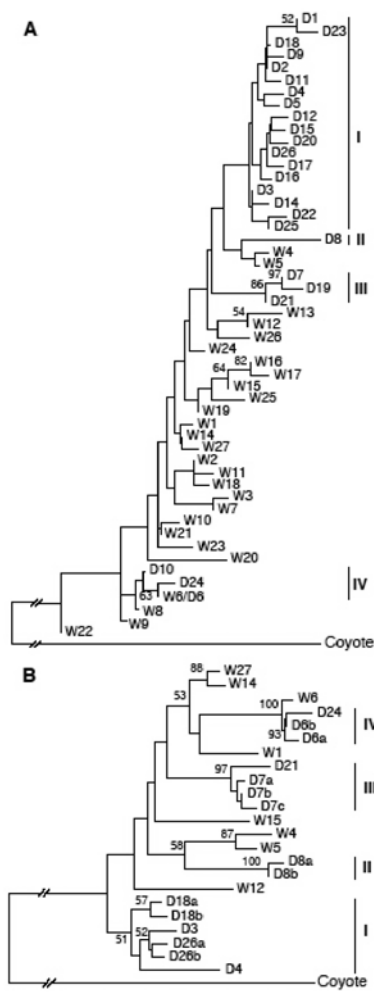


Fig.6 : Étude phylogénétique des haplotypes de loup et de chien en Europe (d’après Vila et al, 1997, (Vila et al., 1997)) : Table représentant les substitutions et les délétions (-) observées dans la région de contrôle de 261 pb d’haplotypes de loup (W) et de chien (D). La numérotation I II III IV correspond aux 4 classes de séquences de chiens. Les haplotypes de loup comportent des individus d’origine européenne (dont l’Italie, et la France : W4 ; la Grèce W2, W5, W8 et W9 ; l’Espagne et le Portugal : W1, W2, W3 ; et d’Europe de l’Est : W6 à W10), mais aussi orientale et de l’Alaska. Les haplotypes de chiens proviennent d’individus à pedigree pour des races très variées du monde entier. L’arbre A est une représentation de la table, fondé sur l’analyse de la région de 261 pb. L’arbre B est fondé sur une séquence de 1030 pb de la région de contrôle étudiée pour 8 loups et 15 chiens. Les suffixes a, b, c, correspondent aux haplotypes de même séquence de 261 pb mais de séquence à 1030 pb différentes.

Cela pourrait être expliqué par un isolement plus marqué des populations de loups en Europe les unes des autres. De plus, si aucune des classes retrouvées pour les lignées de chien n'est spécifique et déterminante de la race, les chiens appartenant à une même classe se retrouvent très proches phylogénétiquement parlant des haplotypes de loups spécifiques d'une certaine zone géographique. Ainsi la classe 2 de chiens est très proche des loups d'Italie, de France, de Roumanie et de Grèce. La classe 4 de chiens (races Siberian Husky, et Berger allemand notamment) serait plutôt associée à des loups de Roumanie et de Russie. Cela suggère des croisements récents entre ces loups et les chiens dans cette zone, ce qui a engendré ce regroupement.

R.K. Wayne *et al*, au vue de ces résultats, concluent que le maintien en captivité de loups et autres espèces de canidés sauvages dans le but de conserver la lignée génétique est privé de sens dans la théorie de l'évolution conjointe des loups et des chiens par croisement et flux de populations. Le seul moyen de garder une diversité génétique nécessaire à l'évolution normale des espèces sera de conserver ces dernières à des effectifs suffisants dans la Nature.

D'autre part, une étude originale a été menée par Peter Saetre *et al* de manière à déterminer si les changements comportementaux sélectionnés par l'homme pour transformer un chien ou un loup sauvage en une race adaptée à un besoin précis, correspondaient à des mutations au niveau de gènes spécifiques du cerveau, et si ces dernières pourraient être impliquées dans la gestion des émotions et du comportement canin (Saetre et al., 2004). Pour cela, l'équipe a effectué des analyses par microarrays (ou analyse d'éléments du transcriptome par hybridation sur des puces à ADNc d'échantillons d'ARNm extraits) sur des échantillons d'ARNm de cerveaux de loups de chiens et de coyotes, comparés à la carte d'ARNm du cerveau humain. Ils démontrent ici, que la forte sélection, suite à la domestication des loups et coyotes a conduit à une variabilité d'expression des gènes spécifiques de l'hypothalamus. Celle-ci concerne peu de gènes et de nombreuses fonctions. La comparaison préalable entre espèces montre que la plus grande quantité de gènes différentiellement exprimés (>70% dans cette région) se trouve au sein de l'hypothalamus. Ces gènes sont préférentiellement impliqués dans la signalisation inter-neuronale et le transport de l'influx nerveux. Enfin pour une région donnée, on compte 114 gènes différentiellement exprimés entre espèces. C'est dans l'amygdala et le lobe frontal qu'on retrouve le plus de variations, alors que l'hypothalamus

présente un plus haut niveau de conservation entre le loup et le coyote mais avec une grande divergence envers le chien. Huit gènes sont seulement exprimés par le chien à ce niveau. Cette étude a aussi mis en évidence que certains marqueurs d'expression génique pourraient servir de marqueurs d'espèce. Ainsi l'hypothalamus, organe principal de gestion neuroendocrinienne des émotions et du comportement, présente une morphologie et une ontogenèse conservées entre ces espèces canines. La variabilité d'expression génétique entre le loup et le chien au sein de cet organe ne peut faire intervenir que deux types de pressions : des changements génétiques mais aussi environnementaux (alimentation, climat...) qui permettront de mieux comprendre l'adaptation comportementale dont témoigne le chien.

2. L'outil génétique dans le suivi des populations de loups

L'adaptation de l'outil génétique au suivi des populations sauvages a permis de mieux comprendre l'évolution de l'espèce et les effets d'un déclin sur la diversité génétique. Ces données permettent de plus en plus de justifier de nouvelles stratégies de conservation d'espèces en réel danger bien que cet état ne soit pas toujours très apparent.

On peut citer comme applications à ces projets deux études sur deux espèces mammifères appartenant à la même superfamille que le loup. Tout d'abord, R.K.Wayne *et al* ont caractérisé deux populations de lions de mer de Californie (*Zalophus californianus californianus*) à l'aide d'un séquençage de l'ADN mitochondrial en deux sites particuliers (Maldonado *et al.*, 1995) : une région du gène codant pour le cytochrome b, et une autre correspondant à la région de contrôle de cet ADN. L'ADN a été extrait des muscles et de la peau de cadavres ou de juvéniles vivants. L'équipe a ainsi pu montrer que deux populations qui peuplent respectivement la baie de Californie et le Golfe de Californie sont distinctes génétiquement et que cette séparation correspond à la séparation du golfe de Californie du reste du continent, il y a 4,5 millions d'années. Le caractère patriphile des femelles lions de mer, en comparaison des mâles, pourrait expliquer le maintien de cet isolement génétique par l'absence de migration des femelles d'une côte à l'autre. De plus, l'équipe fournit la preuve génétique de l'importance désastreuse de la chasse sur la destruction de ces populations dont la

diversité génétique s'est appauvrie ces dernières années. L'effectif génétique réel serait seulement de 7 dans une zone isolée comme celle-ci.

Une autre étude menée par Taberlet *et al*, sur des échantillons de poils et de fèces d'ours, montre la nécessité d'un choix judicieux de la méthode de PCR multi-tube afin de génotyper des séquences microsatellites d'ADN nucléaire extraits en faible quantité dans ce genre d'échantillons (Taberlet *et al.*, 1996). En effet, ce genre de séquençage semble donner lieu à des erreurs du fait du faible nombre de copies d'ADN qui peuvent ne pas rendre compte du caractère homozygote ou hétérozygote pour le génotype observé. Il peut même générer de faux génotypes par des erreurs lors des PCR effectuées avant séquençage (ajout d'une ou n copies supplémentaires de la répétition du microsatellite par glissement de la polymérase sur la copie en cours de polymérisation). Ainsi pour analyser quelques picogrammes d'ADN, 10 PCR sont menées avec des dilutions différentes de l'extrait (lui-même issu d'un pool d'extractions concomitantes du même échantillon) et donnent une bonne significativité aux allèles ainsi mis en évidence. Ces études permettent de dresser les arbres de parenté d'une population d'ursidés fréquentant une même zone géographique, mais elles peuvent être appliquées à tout autre espèce sauvage.

Concernant le loup et surtout sa population italienne, V. Loeschcke *et al* ont voulu comprendre l'évolution de la diversité génétique d'une population décimée par le passé et isolée du reste de la population d'Europe de l'Est (Randi E., 2000). En effet, au début du vingtième siècle, il ne restait plus qu'une dizaine de loups dans les Apennins. Ces animaux étaient isolés des populations bulgares puisqu'il n'y avait pas, jusqu'à très récemment, de loup en Slovénie, Croatie, et dans les Alpes de l'Est. Aujourd'hui, on compte plus de 500 loups en Italie mais ces derniers peuvent entrer en compétition pour la nourriture et l'espace avec les chiens retournés à l'état sauvage. De plus, des hybridations entre les deux espèces sont possibles conduisant irrémédiablement à l'épuisement du fond génétique du loup. Mais l'étude de cet évènement et la quantification de la variabilité génétique au sein de la population italienne n'était pas connue jusque-là. L'analyse de séquences courtes et du profil allozymique ne permettait de montrer qu'un seul haplotype pour le loup italien (cf. Vila *et al*), mais restait trop restrictive pour pouvoir l'affirmer. L'équipe a comparé les séquences d'une partie plus grande de la région de contrôle d'ADN mitochondrial d'une centaine d'échantillons de sang et de tissus de loup italien - ou ce qui semble en être - avec celles de loups de Bulgarie ou de chiens sauvages ou domestiques

de la région. Elle démontre l'existence d'un seul haplotype en Italie sur une 20 aine d'haplotypes au total pour le loup. Les haplotypes divergent d'un facteur de 0,5 ce qui correspond surtout à des mutations d'un nucléotide par transition. Les autres haplotypes sont aussi spécifiques d'une localisation géographique et correspondent à des haplotypes de chiens domestiques pour 3 d'entre eux, révélant une hybridation louve-chien dans ces régions de l'est de l'Europe. La construction d'arbres phylogénétiques fondés sur la « maximum likelihood », permet de regrouper les haplotypes en 5 lignées alors qu'on peut regrouper les haplotypes de chien en 4 classes. Ces classes et lignées ne peuvent pas vraiment être associées. Certains haplotypes de loups sont proches d'haplotypes de chiens et d'autres s'en éloignent sans vraiment pouvoir appliquer une séparation claire au sein de la totalité des haplotypes. Au vue de ces résultats, la population de loups italiens est monomorphe avec un effectif génétique très faible, résultat sans doute du déclin de l'espèce plus que de la conséquence d'un saut génétique au hasard. Ceci contraste avec le polymorphisme apparent des populations de loups bulgares qui concentrent la plupart de la diversité génétique. Le fait qu'on retrouve des haplotypes de base et leurs dérivés dans différentes régions de Bulgarie, témoigne de l'ancien flux génétique en Europe pour l'espèce, comme pour les populations américaines. Mais le déclin de la population et la fragmentation des groupes l'ont interrompu, conduisant à la fixation de l'haplotype le plus fréquent dans une région, et à une taille effective de population très réduite.

L'hybridation avec les populations de chiens qui cohabitent avec les loups en Italie n'a pas été observée mais on ne tient compte là que du croisement entre une louve et un chien, donc elle ne peut être complètement exclue et reste une menace pour la variabilité génétique du loup. L'équipe conclut que l'expansion contrôlée de la population italienne est une nécessité pour conserver le patrimoine génétique de l'espèce, et l'éradication en parallèle des chiens dans les zones de colonisation, une mesure complémentaire.

Une autre étude plus récemment menée par Vilà *et al*, montre enfin la possibilité, à l'aide de trois types de marqueurs, de mettre en évidence une hybridation entre les deux espèces et d'en apprécier la direction (Vila et al., 2003). Considérant que les loups et les chiens sont des espèces phylogénétiquement très proches, il est assez facile de comprendre que la présence conjointe des deux espèces où le loup est minoritaire et le chien largement excédentaire puisse conduire au processus d'hybridation. En effet, cette étude a été menée sur les populations de loups scandinaves. Les

populations étaient décimées au début des années 80, puis ont fait l'objet d'un repeuplement progressif, jusqu'à ce qu'en 1999, un juvénile d'une morphologie non totalement lupine soit abattu. L'hypothèse que ce jeune provenait de la portée de 5 louveteaux observés auparavant auprès d'une louve, a été rapidement émise. Cette dernière, dont les urines récoltées révélaient des chaleurs récentes, avait été observée ensuite avec sa portée. Il s'agissait de la première portée d'hybrides observée dans la population Norvégienne. L'analyse des ADN extraits à partir de muscles, de sang ou d'urines de ces deux individus ainsi que d'un vaste échantillonnage de loups scandinaves de diverses origines et de chiens de pures races locales, a permis de déduire le lien de parenté entre les deux animaux et un croisement dans le sens femelle loup x mâle chien dont serait issu le juvénile. En effet, la comparaison des ADN mitochondriaux a d'abord révélé que le jeune était un loup d'haplotype scandinave H1, le plus commun dans ces régions. Ceci ne signifiait néanmoins pas qu'il puisse être l'hybride d'un loup femelle. L'analyse du polymorphisme allélique d'un microsatellite situé sur le chromosome Y a déterminé le sexe femelle du propriétaire des urines étudiées, ainsi que l'origine du père du juvénile. Ce dernier était soit un loup d'une autre région scandinave soit un chien local. Le complément apporté par l'analyse du polymorphisme allélique et la génération de génotypes synthétiques a permis de vérifier l'origine hybride du jeune dans le sens père chien et mère louve, et de confirmer sa parenté avec la louve dont on a identifié les urines, malgré les limites imposées par l'étude de l'échantillon très pauvre en ADN. La conséquence de ces études, outre le fait d'évaluer l'introgession des gènes de chiens au sein des populations de loups en danger, est qu'elle pourrait permettre une meilleure gestion de ces populations. En effet, suite à cette étude, les autres jeunes hybrides de la même portée ont été retrouvés et éliminés pour éviter la propagation des gènes de chien aux loups scandinaves. Cette étude montre aussi que l'hybridation reste un cas de figure peu fréquent et donc gérable.

A partir de ces études à visée phylogénétique visant à décrypter le processus de spéciation du loup et du chien, les différentes applications de l'outil génétique ont permis d'identifier des marqueurs de l'espèce et la mise en place de nouvelles études avec une orientation plus marquée vers la gestion des populations en danger. Mais toutes ces études nécessitent l'emploi de méthodes souvent invasives pour obtenir la matière adaptée à l'extraction d'ADN en quantité suffisante. Dans le cadre d'un suivi et d'une

gestion des éventuelles populations qui pourraient peupler les massifs pyrénéens, il était donc nécessaire d'adapter l'outil génétique à des prélèvements ne nécessitant pas une intervention directe sur l'animal.

III.Partie 2 : ELABORATION D'UNE METHODE GENETIQUE DE DISTINCTION DU LOUP ET DU CHIEN A PARTIR DE MATIERES FECALES

Il est maintenant clair que si les méthodes de suivi et de détection de présence de loup fondées sur les caractéristiques de son comportement font référence dans le domaine, elles ne suffisent pas à apporter la preuve irréfutable de la fréquentation d'un site par le loup, ni de sa responsabilité dans les attaques de troupeau.

Aujourd'hui, l'outil génétique semble être devenu la seule solution valable aux yeux de l'opinion et des autorités publiques pour fournir cette preuve. Les méthodes utilisant la génétique pour le suivi de population restent néanmoins pour le moment souvent trop invasives et peu adaptées à la détection d'une présence nouvelle d'un individu.

C'est dans ce contexte que la Réserve Naturelle de Nohèdes nous a contactés, afin que nous mettions au point une technique de distinction génétique simple et sûre entre le loup et le chien, à partir des matières fécales retrouvées sur le massif et imputables à un grand canidé.

A. Méthodes employées

1. Échantillons testés : prélèvement, quantité, mode de conservation

Pour mener à bien les analyses génétiques attendues, il a fallu tout d'abord extraire l'ADN à partir de matières fécales. Ces dernières ont été d'abord prélevées sur les différents sites de suspicion de présence de loup, ou dans des endroits où leur concentration est avérée et importante, comme les monts cantabriques, le massif du Madres-Coronat, et le massif du Vercors. Le détail des participants est porté ci-dessous (**Table 1**). De plus,

nous avons besoin d'échantillons témoins loup et chien. Des prélèvements de fèces de chien ont été effectués sur le site de l'ENVT, ainsi que des fèces de loups européens dans le parc de la Maison des Loups d'Orlu. Un poil de loup nous a été gracieusement fourni par « la ferme aux loups du Gévaudan » à Sainte Lucie. D'autre part, pour le témoin positif chien nous nous sommes servis d'un échantillon sanguin de chien, prélevé hépariné à l'unité pédagogique de Physiologie de L'ENVT, puis congelé.

Table 1 : Détail des échantillons de matières fécales prélevés sur le terrain :

Lieu du prélèvement	Type de prélèvement	État du prélèvement à la réception	Participant ayant prélevé l'échantillon	Témoin /Test	Code
E.N.V.T. (physiologie)	Sang total hépariné	Congelé, bonne conservation	E.N.V.T.(Physiologie).	Témoin	CNS
E.N.V.T.	crotte	Fraîche , mise à sécher (cf. protocole)	E.N.V.T.	Témoin	F1(3)
Ferme aux loups du Gévaudan (Sainte Lucie)	Poil avec bulbe	Échantillon individuel	Ferme aux loups du Gévaudan	Témoin	Poil
Maison des loups d'Orlu	Crotte dans le parc des loups européens	Fraîche séchée selon protocole	Elsa Suberbielle	Témoin	O1
Maison des loups d'Orlu	Crotte dans le parc des loups européens	Fraîche séchée selon protocole	Elsa Suberbielle	Témoin	O2
Maison des loups d'Orlu	Crotte dans le parc des loups européens	Fraîche séchée selon protocole	Elsa Suberbielle	Témoin	O3
Madres-Coronat (66) : Col del Torn	crotte	Séchée (cf. protocole), entière	Réserve Naturelle de Nohèdes	Test	M1
Madres-Coronat (66) : Canrech	crotte	Séchée (cf. protocole), entière	Réserve Naturelle de Nohèdes	Test	M2
Madres-Coronat (66) : Col de la Sivina	crotte	Séchée (cf. protocole), entière	Réserve Naturelle de Nohèdes	Test	M3
Madres-	Crotte	Séchée sur	Banque	Test	M4

Coronat (66):	(quelques mg)	billes absorbantes	d'échantillons		
Vercors ()	Crotte	Séchée lessivée	Parc national du Vercors	Test	V1
Vercors	Crotte	Séchée lessivée	Parc national du Vercors	Test	V2
Vercors	Crotte	Séchée lessivée	Parc national du Vercors	Test	V3
Monts Cantabriques : Chagariecho	Crotte	Humide terreuse disloquée	V. Vignon	Test	E1
Monts Cantabriques : El Param	Crotte	Humide terreuse disloquée	V.Vignon	Test	E2
Monts Cantabriques : Fuente Prieta	Crotte	Humide terreuse disloquée	V.Vignon	Test	E3
Monts Cantabriques : Sena del Cadi	Crotte	Séchée entière	Olivier Salvador	Test	C1

Tous ces prélèvements ont été effectués selon un protocole de collecte préalablement établi de façon à éviter toute contamination génétique entre échantillons, ou avec tout tissu, poil et autres issues de chien venant de l'environnement du collecteur (voir **Annexe 5**).

Puis les crottes ont été mises à sécher dans des récipients individuels, à l'air et à l'abri des intempéries et du soleil pendant une quinzaine de jours. Une fois parfaitement sèches, les fèces sont gardées et référencées individuellement dans des pots à analyse fermés par un bouchon hermétique, mis au réfrigérateur à 4 °C.

Il s'agit ensuite d'extraire l'ADN total de la crotte afin de sélectionner une séquence d'ADN mitochondrial propre au loup et au chien par une amplification par PCR, avant d'en évaluer les différences grâce à un séquençage génétique.

2. Protocole d'extraction de l'ADN total à partir de matières fécales

Après avoir pris connaissance du protocole proposé par les professeurs *P.Taberlet, S.Griffin et al.* (Taberlet et al., 1996) sur des matières fécales d'ours, nous avons préféré adapter un protocole à partir de

celui qui est proposé dans le *High Pure Template Preparation Kit*® des laboratoires Roche concernant les tissus fixés dans du formol et piégés dans de la paraffine, et utiliser les réactifs tels qu'ils se trouvent dans le kit. Ce dernier est fondé sur une digestion des tissus par de la protéinase K à 90 mg, des réactifs à base de guanidine, urée Tris-Hcl et isopropanol, une purification par rétention d'affinité de l'ADN sur filtre fixe, et une élution dans du Tris à 10 mM de pH 8,5.

Cinq échantillons de 50 mg chacun, provenant des mêmes fèces sont incubés avec 40µL de protéinase K et 200 µL de tampon de lyse la nuit à 37 °C, et agités au préalable. Le lendemain 20 µL de Protéinase K sont ajoutés par échantillon, et le mélange est laissé 2 h à 55°C.

Puis les cinq échantillons sont centrifugés à 5000 rpm pendant 10 minutes. Le maximum de surnageant de chaque échantillon est alors recueilli pour chacun d'eux dans un nouveau tube eppendorf de 1,5 mL. Le reste est centrifugé à nouveau à 5000 rpm 5 minutes. De la même façon, le surnageant est prélevé et ajouté au précédent, en respectant chaque échantillon. Les nouveaux échantillons obtenus sont ensuite centrifugés à 5000 rpm durant 10 min, les surnageants étant recueillis de la même manière, séparément dans de nouveaux tubes de 1,5 mL.

Puis, sont ajoutés 200 µL de tampon de liaison par échantillon, et la solution est vortexée et laissée à incuber 10 minutes à 72°C. 100 µL d'isopropanol /échantillon sont versés et le tout est vortexé .

Enfin, les 5 préparations sont transférées dans un même tube à filtre, en procédant par centrifugations successives à 8000 rpm 1 minute à chaque fois que le tube est rempli, et en éliminant le liquide passé dans le tube réservoir couplé au tube filtre.

Ainsi, l'échantillon est concentré cinq fois, avant d'entamer les étapes de fixation et de purification. Pour les dernières étapes, on suivra scrupuleusement la notice du kit indiquée pour un échantillon.

On obtient ainsi une solution d'ADN élué qui est conservée après archivage à - 20°C.

D'autre part, le témoin ADN de chien a été obtenu en extrayant l'ADN du sang total d'un chien selon le protocole proposé dans *le High Pure PCR Template Preparation Kit*® (Roche).

3. Réactions de polymérisation en chaîne et migration des amplicons sur gel d'agarose

L'ADN extrait précédemment est ensuite amplifié par PCR nichée. Pour cela, est utilisé un mélange contenant: un tampon PCR des laboratoires *GibcoBRL*® à raison de 1X par réaction, qui contient 200mM de Tris-HCl (pH:8,4) et 500mM de KCl; du chlorure de magnésium venant du même laboratoire à 1,5mM par réaction ; une solution de DNTP des laboratoires *SIGMA*, diluée à 200 µM par réaction ; de la Taq DNA Polymérase recombinante (*GibcoBRL*®) à 1 U par réaction ; et de l'eau nanopure du laboratoire.

Les deux couples d'amorces utilisés ont été commandés à *ISOPRIM Toulouse* après désignation, sous forme dessalée et lyophilisée à 40 nmol. Chaque amorce est présente dans le mélange à une concentration de 0,5 µM- réaction. Le premier couple d'amorces a permis d'amplifier une portion de la région de contrôle 1 de l'ADN mitochondrial de 466 pb, spécifique du chien et du loup.

D'après les travaux de *C.Vila, P Savolainen et al.* (Vila et al., 1997), ce sont les amorces L15910 : 5' GAATTCCTCCGGTCTTGTAAC 3', et H16498 : 5' CCTGGACTAGGAACAGATG 3', qui nous ont servi à cette première étape de PCR (11).

Cette région amplifiée à partir d'ADN de chien a été clonée dans le pGEM®-T (cf. infra), puis séquencée par *Genome Express (Grenoble)*, pour déterminer un second couple d'amorces commandé ensuite de la même façon à *ISOPRIM*.

Ces amorces sont : ELA6 : 5'GAGAGTAACCGCCCTCCCTAAG 3', ET ELA7 : 5' CCAGGTATAGTTTCATGATAGTAAC 3'. Elles ont été désignées de façon à permettre l'amplification d'échantillons de chien comme de loup tout en couvrant une région de séquence variant entre les deux espèces d'après l'analyse des haplotypes identifiés *par Vila et al* (Vila et al., 1997). Cette première séquence est alors réamplifiée par PCR en ajoutant avec la pointe d'un cône stérile une colonie bactérienne blanche (qui a donc intégré et exprimé le vecteur pGEM-T® porteur de la séquence clonée) au mélange de PCR décrit précédemment contenant les amorces précédemment citées. Les amorces ELA6 et ELA7 seront ensuite utilisées pour la deuxième étape d'amplification par PCR nichée des échantillons testés.

Les PCR ont été réalisées par l'appareil *GeneAmp PCR System 2400 de PERKIN ELMER* dans les conditions suivantes: pour la première PCR, 35 cycles sont effectués, 30 s à 94 °C, 30 s à 61°C et 30 S à 72 °C sur un volume total de 50 µL comprenant : 1µL d'échantillon ou de témoin positif ou d'eau, et 49 µL de mélange. Pour la deuxième PCR menée sur 1µL de

chaque amplicon issu de la première et 49 μL de nouveau mélange, sont réalisés 40 cycles, 30 s à 94 °C, 30 s à 52 °C, 30 s à 72 °C.

Ensuite le résultat des deux PCR a été déposé sur un gel composé de 1 % d'agarose standard des laboratoires *EUROBIO* dissous dans du Tris Borate EDTA (TBE), auquel a été ajouté du bromure d'éthidium à 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Chaque puits a alors été rempli par 15 μL d'échantillon ou de témoin amplifiés avec 2 μL de bleu de charge, ainsi qu'un puit avec 8 μL de témoin de poids moléculaire à 1 kb. La migration a été réalisée dans une cuve par électrophorèse dans du TBE à 80 Volts et 40 mA pendant 45 minutes afin de vérifier la présence d'une bande spécifique attendue à 417pb et l'absence de contamination à une des étapes de l'amplification.

4. Clonage du matériel génétique

Lors de l'obtention de bandes spécifiques suite à la PCR, il a été nécessaire de réaliser un clonage de l'amplicon issu de la première étape de PCR, dans un plasmide bactérien pour obtenir des quantités suffisantes de matériel en vue de son séquençage et de la détermination d'un second couple d'amorces.

Pour cela, un plasmide de type pGEM® -T a été utilisé (France, 1996). Nous avons ensuite suivi un protocole de ligation puis de transformation bactérienne standard disponible dans le guide des protocoles et applications (*Promega*). Pour la ligation, pour un volume final de 10 μL , 50ng de vecteur, 3U de ligase, 5 μL de tampon et 3 μL d'insert ont permis de répondre au ratio recommandé par le fabricant. Tous ces réactifs proviennent du kit Cloning PCR Fragments Using the pGEM®-T Vector (*Promega*). Pour la transformation bactérienne, les bactéries compétentes DH5 α du TA Cloning® kit ont été utilisées pour 5 μL de produit de ligation. Une gélose a été réalisée contenant : 18 mL d'agar, de l'ampicilline à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de volume final, 40 μL de X-Gal à 2%, et 7 μL d'IPTG à 20%. La suspension bactérienne y a été déposée, et a poussé pendant 12 h, avant la sélection des clones recombinants.

5. Séquençage des échantillons obtenus par PCR nichée et alignement des séquences

Après contrôle de la quantité d'ADN échantillon ainsi amplifiée, par spectrophotométrie (absorption à 260nm et 280nm pour évaluer aussi la pureté de l'amplicon), 800ng d'ADN amplifié est envoyé à ABIprim ou à *Génome express* pour y être séquençé.

Les séquences obtenues sont alignées avec les séquences de l'haplotype de loup W12 (Vila et al., 1997) et du chien dont on s'est servi comme contrôle. Le logiciel BLAST two sequences (Basic Local Alignment Search Tool), logiciel fondé sur un algorithme heuristique disponible sur le site internet NCBI, a été utilisé pour l'alignement de ces séquences alors que DNA Strider® a permis la comparaison de ces alignements et la mise en évidence des variations nucléotidiques.

6. Élargissement de la méthode à l'identification de lynx

6 échantillons provenant potentiellement de lynx ont été prélevés en Espagne sur les sites de Panyas pour 4 d'entre eux (L1 à L4), de la Sena del Cadi (L5) et de Eyxens (L6). Un témoin a été réalisé à partir d'une crotte de chat domestique. Les extraits d'ADN ont été réalisés selon la même méthode décrite précédemment. Ils ont été amplifiés par PCR simple avec les amorces spécifiques du Cytochrome b du lynx et des félidés en général: 5'Cytblynx : 5'-TCAGCATGATGGAAGCTTCG-3', 3'CytbLynx : 5'-AGCCGTAATATATTCCTCGTC-3'. La PCR a été réalisée selon 30 cycles avec 30 s à 94 °C, 30 s à 46°C, 30 s à 72 °C. Les amplicons ont été déposés sur gel d'agarose à 1% et la migration réalisée comme précédemment décrit.

B. Résultats obtenus au cours de l'expérimentation

1. Efficacité de la méthode de collecte

Au cours de ma période de stage en Avril 2001, j'ai dû me mettre en relation avec de nombreux acteurs de la conservation du loup en France et en Espagne afin d'établir un partenariat stable et durable et d'obtenir des échantillons témoins ou à tester.

Il s'est donc avéré nécessaire de définir un protocole de collecte des fèces de canidés visant à une homogénéité des résultats (**Annexe 5**). Le protocole de collecte des laissées de canidés a été mis en place avec succès, et nos essais préalables sur les fèces de chien ont vite montré leur efficacité, ce qui a permis la poursuite des étapes suivantes.

2. Extraire l'ADN des matières fécales avec un kit du commerce

Jusqu'à présent, les analyses génétiques réalisées sur les grands canidés ont toujours utilisé des échantillons riches et assez purs en ADN. Que ce soit du sang, du tissu musculaire, cutané ou des poils, le but de ces recherches n'étaient pas le suivi de populations vivantes, mais plutôt l'analyse d'une population et la validation de la méthode génétique pour comprendre la spéciation des grands canidés sauvages et domestiques. Ces méthodes très demandeuses en ADN, étaient de plus souvent invasives, ce qui n'aurait pas permis un suivi des populations « à distance » et à visé conservatoire.

D'autre part, les méthodes d'extraction de l'ADN utilisées jusqu'alors reposaient sur des protocoles lourds et longs souvent assez peu reproductibles d'un laboratoire à l'autre car nécessitant de nombreuses préparations extemporanées de réactifs (Taberlet et al., 1996).

Pour mon projet, le défi a été d'adapter une méthode d'extraction de l'ADN utilisable en routine et suffisamment standardisée pour garantir une relevance technique. Cette méthode devait aussi permettre un suivi de présence des loups sans intervention sur les populations. Nous avons donc

adapté un protocole commercial, le *High Pure Template Preparation Kit*® (Roche) à l'extraction d'ADN à partir de fèces séchées avec succès.

En appliquant d'abord exactement la notice des laboratoires Roche concernant les tissus de mammifères, nous nous retrouvions avec beaucoup trop de déchets dans le tube, avant de transférer la solution dans le tube à filtre qui vraisemblablement se colmatait. Ceci ne laissait que peu de place pour l'ADN purifié.

Nous avons alors tenté de réduire ces impuretés en laissant digérer l'échantillon par la protéinase K pendant une durée plus importante, c'est-à-dire en le préparant la veille et en le laissant toute la nuit, mais sans résultat probant. L'échantillon était malgré tout bien désépaissi.

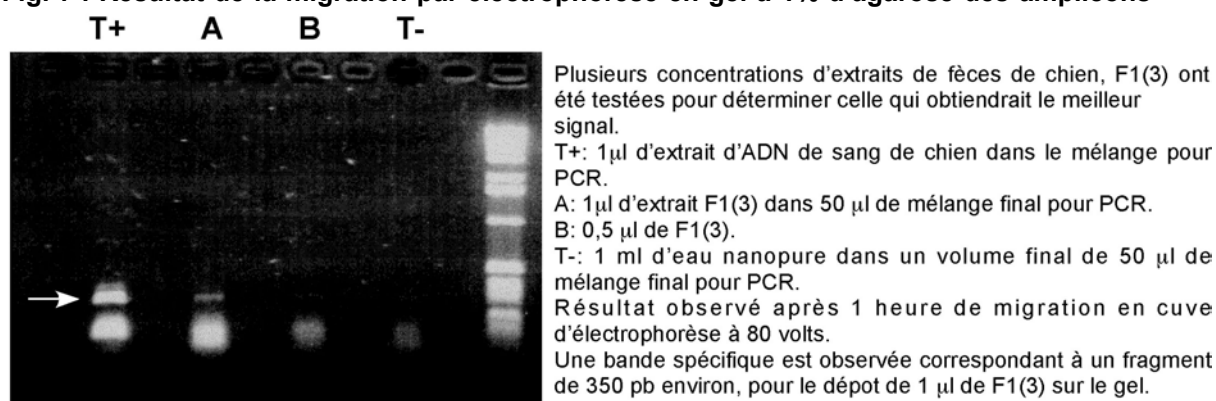
Nous avons pensé, tout en gardant ce temps de digestion, à purifier l'échantillon par centrifugation. Ainsi, après avoir laissé agir la protéinase K toute la nuit, nous avons réalisé deux séries de centrifugations de l'échantillon digéré pour éliminer toute impureté gênant la suite du protocole habituel. Nous n'obtenions toujours pas de signal par migration du résultat de la PCR en gel d'agarose à 1 %. Pourtant, les résultats de la PCR pour le témoin positif à partir de sang de chien étaient concluants, écartant l'hypothèse du non-fonctionnement de l'amplification. C'était bien l'extraction qui posait problème. On pouvait peut-être imputer cela à une étape de digestion insuffisante, ce qui faisait que de trop nombreuses impuretés se fixaient sur le filtre, empêchant la fixation du peu d'ADN libéré.

D'autre part, la difficulté résidait vraisemblablement aussi dans la présence d'une trop petite quantité d'ADN dans un échantillon constitué essentiellement d'impuretés indigestes. Pour cela, nous avons, en un premier temps, tenté d'enrichir le milieu en cellules, cela en réalisant une technique d'enrichissement par flottation dans une solution de NaCl saturée utilisée fréquemment en parasitologie pour mettre en évidence les protozoaires dans les matières fécales. Cela n'a pas fonctionné, probablement à cause de l'état de dénaturation déjà avancé dans lequel étaient les cellules conservées au sec, qui n'ont pas supporté le traitement par un milieu agressif tel que l'est la solution de NaCl hypertonique.

Nous avons enfin pensé à suivre un autre protocole indiqué dans le kit, celui concernant les tissus fixés au formol et enfermés dans de la paraffine. Comme ce traitement ne facilitait pas la conservation de l'ADN, il semblait plus proche de notre cas de figure. Dans ce protocole, l'étape de digestion était plus poussée : 40 µL de protéinase K mise en contact avec l'échantillon pendant toute une nuit à 37 °C, avec ajout le lendemain de 20

μ L de protéinase K pour deux heures de digestion supplémentaires à 55°C. Nous avons, en même temps, essayé de concentrer l'échantillon avant sa fixation sur le filtre, en réalisant les opérations précédentes séparément sur un plus grand nombre d'aliqots de 50 mg chacun du même échantillon, et en ne réunissant les produits des réactions qu'au moment de les transférer dans un seul et même tube à filtre. Ainsi en utilisant 5 échantillons, nous multiplions par 5 la concentration en ADN et nous augmentons nos chances de l'extraire. Cette technique nous a permis d'obtenir une bande spécifique du fragment amplifié, après migration sur gel d'agarose à 1 % .(voir fig.7).

Fig. 7 : Résultat de la migration par électrophorèse en gel à 1% d'agarose des amplicons



obtenus par PCR sur F1(3) avec les amorces HPRT 5' et HPRT 3'.

3. Amplification par PCR nichée des extraits d'ADN : des extraits témoins aux tests :

Si l'extraction nous a posé problème quant à la mise en place de son protocole, les PCR ont souvent été révélatrices de ces défauts. Ainsi la difficulté essentielle de la PCR était d'en trouver les conditions optimales mais restant simples à réaliser avec le matériel dont nous disposions.

Tout d'abord, nous avons cherché à obtenir un signal stable et reproductible d'un témoin positif -de l'ADN de chien- qui soit révélateur du bon fonctionnement de la PCR. Nous avons d'abord travaillé sur l'ADN extrait de tissus mammaire de chien. Nous avons pour cela utilisé un couple d'amorces, HPRT-5'et HPRT-3'pour amplifier un gène de ménage banal chez le chien en prenant comme température d'hybridation un intermédiaire

en deçà de chacune des T_m des amorces soit 50°C, cela durant 30 s. Le but était de trouver la bonne concentration d'échantillon témoin pour avoir une bande de bon poids moléculaire ; nous avons donc testé plusieurs concentrations, 5,1 puis 0,5 μL dans 50 μL final. La spécificité de bande n'étant pas satisfaisante, nous avons réitéré nos essais à 52 puis à 53°C, ce qui convenait mieux pour une quantité de 0,5 μL . Nous avons essayé ensuite de comparer ces résultats à ceux obtenus sur les échantillons de fèces de chien. Le résultat n'était pas satisfaisant à cause de l'inefficacité des extractions. Très vite notre témoin positif s'est révélé inutilisable par l'apparition d'une bande parasite reproductible.

Nous avons ainsi décidé de constituer un nouveau témoin, à partir de sang de chien qui nous a tout à fait satisfait. Nous obtenions une bande spécifique et nette pour 1 μL de témoin à 61°C comme température d'hybridation modifiée par rapport à la stringence ainsi améliorée pour obtenir la bande correspondant à l'ADN de fèces de Chien. Nous avons enfin pu vérifier, grâce à ces PCR, l'efficacité du protocole retenu ensuite pour l'extraction d'ADN.

La deuxième étape consistait à trouver la séquence d'ADN mitochondrial à amplifier où l'on trouverait des différences de séquences suffisantes pour distinguer ADN de loup / chien. Les travaux publiés sur la phylogénie du chien de *Vilà, R.K Wayne et al.* (Vila et al., 1997) définissaient un couple d'amorces, qui cernaient la région de contrôle de cet ADN et dont la nature était précisée dans les travaux de *R DeSalle, A.K Williams et al.* (DeSalle et al., 1993). Il s'agissait des amorces H 16798 et L15910. L'amorce L15774 était d'autre part présentée comme une alternative à H16798 dans le couple précédent. Nous avons testé ces deux couples sur notre échantillon d'ADN de fèces de chien. Ces amorces sont propres aux vertébrés mammifères. En essayant de concilier les T_m assez disparates, nous avons opté pour une température d'hybridation de 60 °C. Les résultats de la migration n'étant probant que pour le premier couple H 16798 et L15910, avec un signal faible, nous avons fait varier les conditions d'hybridation et la quantité d'échantillon dans le mélange pour en améliorer le signal. Nous avons obtenu le meilleur résultat avec 1 μL d'ADN et une température d'hybridation de 61 °C.

La bande obtenue comprenant les 394 pb séquencées dans la littérature (Vila et al., 1997) faisait 466 pb après séquençage.

À ce stade, nous pouvions constater deux choses. Si la bande obtenue nous paraissait ainsi spécifique, le signal restait néanmoins faible,

ce que l'on a jugé normal compte tenu du peu d'ADN mitochondrial de chien que l'on devait avoir dans la totalité de l'ADN extrait à partir de crotte. De plus il fallait être sûr que la séquence amplifiée était bien celle de la région de contrôle d'ADN mitochondrial de chien, et pas le résultat d'une amplification parasite d'une tout autre séquence d'un autre génome où les bases se seraient appariées.

Pour renforcer nos convictions, nous avons envisagé d'effectuer une PCR nichée, et avons cherché un second couple d'amorces à l'intérieur de la séquence déjà amplifiée. Cette dernière n'étant pas disponible facilement dans la littérature, nous avons cloné l'amplicon issu de la PCR décrite précédemment dans un plasmide pGEM®-T par transformation bactérienne, puis sélectionné, parmi 5 clones recombinants, un seul par amplification par PCR directe avec les amorces H 16798 et L 15910. Enfin, nous avons envoyé le clone au séquençage. Le but de cette manœuvre était d'augmenter la quantité de matrice pour en faciliter le séquençage. Le choix d'un plasmide de type pGEM® -T pour cette opération repose sur le fait qu'il possède une base T au niveau des sites de ligation répondant parfaitement à l'ajout habituel par la Taq polymérase d'un A aux extrémités 3' des amplicons.

Le résultat du séquençage comprenait de la 1ère à la 52ème base le pGEM® -T, de la 54^{ème} à la 75^{ème}, l'amorce L15910, et de la 520ème à la 501ème l'amorce H16498. Ainsi la séquence amplifiée faisait 466 paires de bases dans lesquelles nous avons défini un second couple d'amorces utilisables : les amorces ELA6 et ELA7 s'étendent respectivement de la 82 à la 104ème base et de la 500^{ème} à la 475^{ème} base séquencée.

L'alignement de notre séquence sur le logiciel BLAST, a confirmé qu'il s'agissait d'une portion allant de la 15339 à la 15805^{ème} base du génome mitochondrial du genre *Canis familiaris* ou *C.lupus*, couvrant la région de contrôle 1.

À partir de là, nous avons d'abord testé ce nouveau couple d'amorces, en prenant les conditions décrites dans le **A (Fig.7)**, sur le clone recombinant afin de vérifier la spécificité et les conditions de stringence de ces amorces. Puis, nous avons réalisé l'ensemble du protocole de PCR nichée sur l'ADN extrait de fèces de chien (F1 (3)), et nous avons obtenu une bande nette et intense vers 417 pb, taille du fragment escomptée après la deuxième PCR, en dessous d'une bande plus faible obtenue après la première amplification (**Fig.8**).

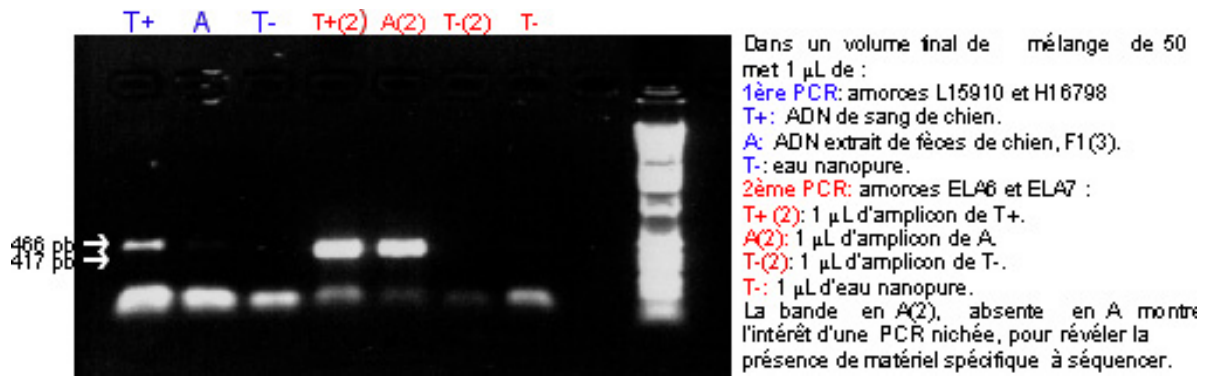


Fig.8 : Résultat de la migration par électrophorèse en gel à 1% d'agarose des amplicons de la PCR nichée sur l'ADN extrait à partir de fèces de chien F1(3).

Nous pouvons donc dire que notre technique d'amplification par PCR nichée nous a fourni toute satisfaction sur des extraits d'ADN à partir de fèces de chien, pour maintenant passer à son application sur des échantillons extraits de fèces à identifier.

Nous avons procédé à l'extraction et l'amplification de la séquence d'ADN d'intérêt pour tous les échantillons tests et les contrôles que nous avons réussis à collecter. Seuls les échantillons M3 (récolté sur le massif du Madres-Coronat), V1 (Vercors), POIL (poil de loup de la ferme aux loups de Sainte Lucie) ont abouti à un résultat concluant. Les échantillons d'Orlu n'ont pas été traités pour le moment (**Fig.9**).

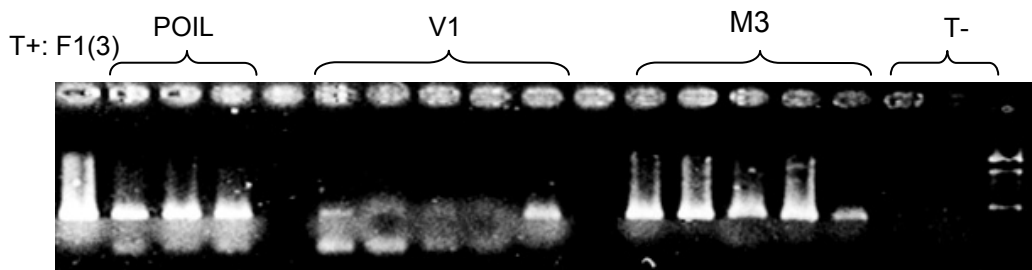


Fig.9: résultats des migrations en gel d'agarose 1% des amplicons POIL, V1, M3 à l'issue de la 2e étape de PCR nichée : 3 sous échantillons de POIL et 5 de V1 et M3 ont été amplifiés par PCR nichée avec les amorces ELA6 et ELA7. La bande attendue à 417 pb est observée dans chacun des puits en quantité suffisante pour l'envoi des amplicons au séquençage.

4. Analyse différentielle des séquences : 5 nucléotides entre chien et loup

À partir des séquences obtenues après amplification de l'ADN extrait de chien CN1 et F1(3), nous avons réalisé les alignements avec la séquence de l'haplotype W12 de *Vilà et al* grâce au logiciel BLAST afin de trouver la correspondance des deux séquences. Nous avons d'abord constaté que le nucléotide 5 qui était indiqué était en fait le n°9 de leur séquence, car les différents alignements que nous avons pu réaliser à partir de leurs séquences ou de nos témoins ne pouvaient concorder qu'ainsi. Nous avons ensuite déduit que le nucléotide n°9 de leur séquençage correspondait au 68^e nucléotide de notre séquence en partant du premier nucléotide de l'amorce ELA6. Le 226^e nucléotide pour eux était donc le 285^e pour nous (**Table 2**).

En observant la table des alignements et d'après les origines des haplotypes canins indiqués dans la légende, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle certaines mutations devaient être spécifiques du loup ou du chien. Ainsi, en position 9 (68 dans notre numérotation), on pouvait observer une mutation par transition entre les haplotypes loups et chiens. Les haplotypes de loups possédaient un A, alors que les chiens avaient un G. De même une mutation par transition en position 226 (285 pour nous) entre A et G semblait différencier les loups des chiens à l'exception de l'haplotype W12 qui avait un G et de l'haplotype de chien D18 qui possédait un A. Nous avons testé cette première hypothèse sur nos échantillons témoins de chiens CN1 et F1(3) et sur le poil de loup, et avons ainsi pu confirmer que ces deux positions constituaient des mutations

Nous avons donc appliqué, à l'aide du logiciel en ligne CLUSTAL W, des alignements de séquences clefs pour différencier le chien du loup aux échantillons à tester V1 et M3, en réalisant systématiquement une comparaison avec W12, POIL et CN1 (nommé PCR chien) (**Fig.10**). Nous avons ainsi pu montrer que M3 était un chien. En effet, en position 68 le nucléotide était un G et en 285 il s'agissait aussi d'un G. Les autres mutations sur la séquence restaient en accord avec ce résultat ou n'étaient pas décrites dans la littérature. L'exemple de V1 nous a donné plus de difficultés car en position 68 de notre séquence nous obtenions un A, donc ce qui était plutôt en faveur d'une séquence loup alors qu'en position 285 il s'agissait d'un G ce qui était plutôt en faveur d'un haplotype chien.

		68	156	164	244	269	276	285	
		9							
		↑	1111111111111111111111112222222222222222222						
			23579001256678888899990000011122222233						
			52549745157470345674569146890371246739						
			AT-CCTC-TAATTT--TTGTCTTGCCGATAATATGATT						
W12									
W1									
W2									
W3									
W4									
W5									
W7									
W8									
W9									
W10									
W11									
W13									
W14									
W15									
W16									
W17									
W18									
W19									
W20									
W21									
W22									
W23									
W24									
W25									
W26									
W27									
W6/D6									
D10									
D24									
D7									
D19									
D21									
D8									
D1									
D2									
D3									
D4									
D5									
D9									
D11									
D12									
D14									
D15									
D16									
D17									
D18									
D20									
D22									
D23									
D25									
D26									

Table 2: Mutations mono-nucléotidiques dans la séquence du gène du cytochrome b permettant une distinction entre chien et loup:

- Distinction chien/ loup grâce aux nucléotides en position 68 et 285 de notre séquence;
- Mutations caractéristiques d'une origine espagnole (ou grecque) du loup;
- Mutations caractéristiques d'une origine italienne du loup.

Néanmoins, dans la table de *Vilà et al*, notre attention s'est portée sur deux haplotypes de chien, D7 et D19 (berger allemand) dont le nucléotide en position 9 était aussi un A. En comparant les séquences de V1

et D19 et D7, il est apparu que V1 ne possédait pas d'autres similarités avec D19 ou D7 qui puissent attester d'une appartenance à une origine chien. Par ailleurs, les haplotypes de loup W4 et W5, loup d'origine italienne, ont la particularité d'avoir ce G en position 285. De plus, en positions 244 et 269, le nucléotide diffère de W12 et est un C ce qui est caractéristique des haplotypes W4 et W5. La séquence de V1 provenait donc vraisemblablement d'un loup d'haplotype W4 ou W5 (que sont les loups italiens et du Mercantour).

Nous avons ensuite voulu poursuivre nos hypothèses concernant les données de la table sur la distinction éventuelle entre haplotypes de loups italiens/ Mercantour et de loups d'haplotypes W1, W2, ou W3 qui sont polonais espagnols ou portugais. Une fois entendus sur la nature loup d'une séquence nous avons observé dans la table des différences qui pourraient permettre ce distinguo. En effet, en position 97, 105, 184 et 210 des séquences de la table (positions 156, 164, 244 et 269 de nos séquences), les cytosines semblaient assez caractéristiques d'haplotypes espagnols et associés, correspondant à un T pour les haplotypes italiens. Au contraire en positions 125 et 217 de la table (184 et 276 de nos séquences), la présence d'une guanine pour les haplotypes italiens semblait différencier ces derniers d'haplotypes ibériques. En appliquant ces hypothèses aux séquences POIL et V1 nous avons pu montrer dans les deux cas qu'il s'agissait alors d'ADN de loup italien. Pour POIL, nous avons eu confirmation de l'origine du loup qui était en captivité à la ferme aux loups du Gévaudan ce qui a renforcé notre présomption sur l'origine de V1. De plus cette origine italienne restait compatible avec le lieu de prélèvement de la crotte sur le massif du Vercors proche de l'Italie.

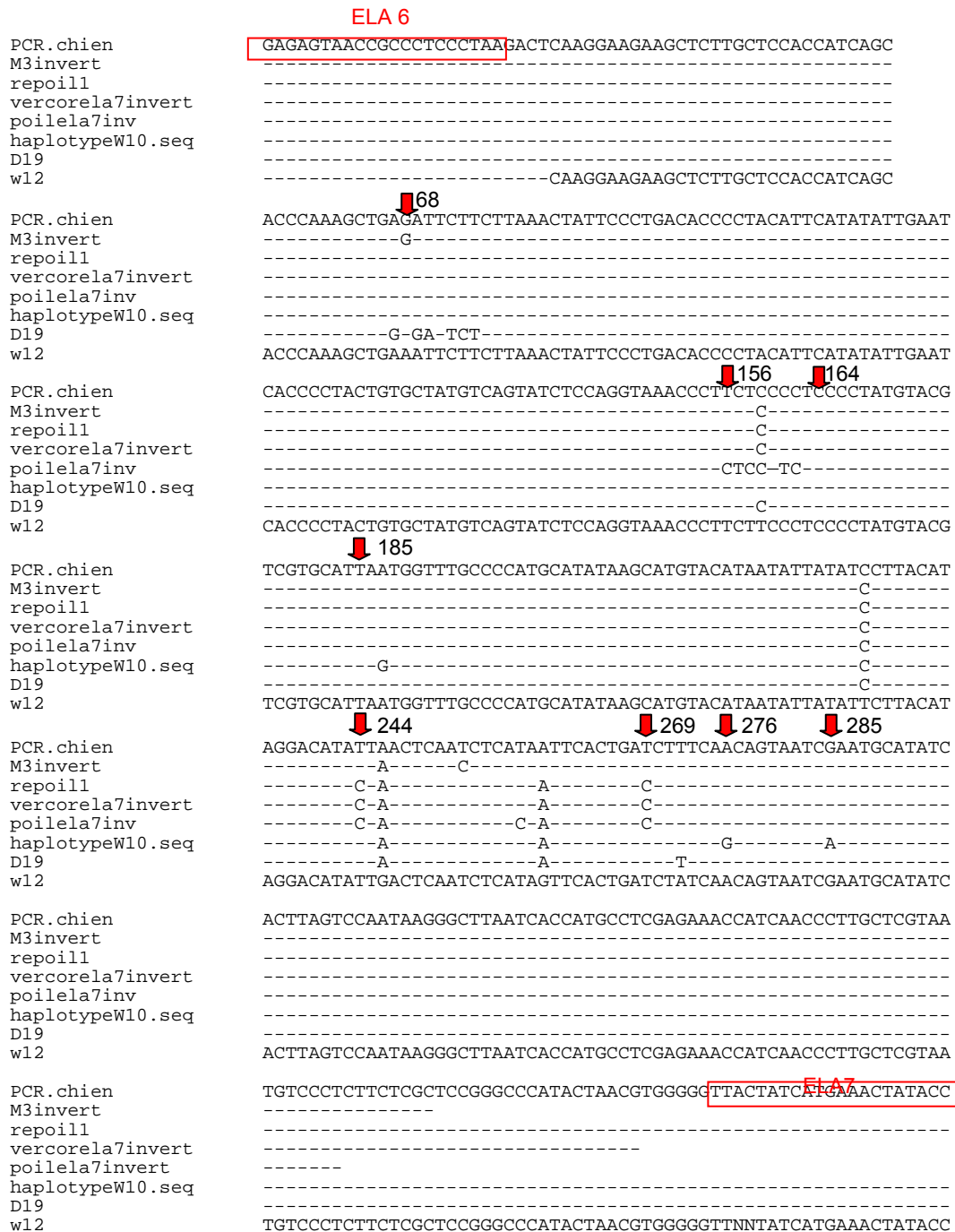


Fig.10 : Alignement des séquences des échantillons testés avec les séquences de la littérature : Repoil1 et Poilela7inv proviennent du même amplicon séquencé 2 fois pour obtenir la séquence entière. PCR chien est la séquence de F1(3). Les séquences désignées par invert ont dû être inversées pour obtenir la séquence du brin complémentaire de l'ADN, et la comparer à la littérature. W12, D19 et W10 sont les séquences décrites par Vilà et al. Les nucléotides permettant le diagnostic d'espèce sont désignés par le N° de leur position dans notre système de numérotation. Les alignements sont réalisés avec le logiciel en ligne CLUSTAL W (1.83).

5. Analyse d'échantillons imputables au lynx

Au cours de nos analyses génétiques, la Réserve Naturelle de Nohèdes nous a sollicité pour identifier l'origine de laissées imputables au lynx. Nous avons donc tenté d'étendre notre méthode d'extraction et d'amplification d'ADN à partir de fèces à ces échantillons. Dans cet objectif, nous avons désigné des amorces spécifiques de la séquence du cytochrome b des Félidés afin de pouvoir amplifier l'ADN de lynx, de chat et de chat sauvage. Malgré la vérification de la présence d'ADN en quantité importante dans les extraits ainsi réalisés, nous n'avons pas réussi à amplifier de manière spécifique une séquence de félidé. Le contrôle positif - de l'ADN extrait à partir d'une crotte de chat domestique - qui avait été amplifié attestait pourtant de la spécificité des amorces, et de l'efficacité d'amplification. De la même façon, ces échantillons ont été aussi amplifiés à l'aide des amorces spécifiques du loup et du chien sans fournir de résultat. Les résultats du témoin félin attestent néanmoins de l'élargissement réussi de la méthode d'extraction et d'analyse de l'ADN à partir de crottes, mise au point au laboratoire.

Ces travaux montrent ainsi la possibilité d'analyser génétiquement l'ADN à partir d'une source –les fèces- qui pourtant semblait peu se prêter à ce genre d'application. Nous avons mis au point au laboratoire, une méthode d'extraction de l'ADN total à partir de crottes séchées, simple et rapide qui permet, après amplification d'une séquence d'intérêt par des amorces spécifiques de cette dernière, la différenciation du loup et du chien grâce à des mutations nucléotidiques stables entre les deux espèces. Cette méthode est efficace mais sous certaines conditions seulement, dont il convient maintenant de discuter.

C. Discussion : une première étape à poursuivre pour une application de la méthode en routine

1. La qualité des prélèvements est indispensable pour l'efficacité de la méthode

Comme les résultats à l'issue de l'amplification par PCR de l'ADN extrait l'ont vite montré, la qualité des échantillons prélevés sur le terrain est déterminante pour les étapes ultérieures.

C'est dans cette optique que nous avons rédigé un protocole de collecte (**Annexe 5**), où chaque fèces, provenant d'un individu distinct, devait être prélevé le plus frais possible avec une paire de gants à usage unique. Pour leur transport jusqu'au laboratoire, un simple colis contenant des sacs à congélation ou tout autre emballage plastique a suffi.

Durant ma période de stage en Avril 2001, un important travail de mise en relation avec d'éventuels partenaires pouvant nous fournir des échantillons à tester m'a été confié. Il a été alors de première importance d'établir un partenariat stable afin d'obtenir l'entière observance de la méthode de collecte ainsi établie.

À ce jour, il nous manque encore un certain nombre d'échantillons contrôles pour valider totalement notre méthode. Avant son utilisation en routine, il conviendrait d'appliquer notre méthode sur des crottes avérées, de lynx, de chat sauvage, de renard pour pouvoir écarter totalement l'hypothèse d'une absence d'amplification des extraits par les amorces spécifiques loup/chien du fait d'une extraction qui n'aurait pas fonctionné ou dont la quantité d'ADN spécifique de mammifère est trop modeste pour en permettre l'analyse ultérieure. En effet, ce contrôle permettrait aussi de confirmer que la collecte a été effectuée dans de bonnes conditions, et que l'échantillon est de qualité suffisante pour autoriser les analyses ultérieures. Ainsi nous pourrions parfaire aussi ce protocole de collecte.

D'autre part, nous avons opté pour une conservation des échantillons à 4°C une fois qu'ils étaient secs. En effet, c'était pour nous le mode de stockage le plus pratique afin d'éviter un éclatement des cellules piégées dans les matières fécales, qu'aurait occasionné une conservation par congélation, à cause de l'eau qu'elles contenaient, tout en évitant une trop grosse prolifération bactérienne.

Enfin, il semble peut-être un peu abscons de vouloir prélever l'ADN total d'un individu à partir de ses matières fécales qui contiennent surtout des déchets et beaucoup de bactéries donc d'ADN étranger. Il ne faut cependant pas oublier que le chien comme le loup étant des carnivores, ils possèdent un tube digestif relativement court et leurs cellules intestinales soumises à des traitements pHmétriques et enzymatiques abrasifs desquament en grande quantité et se retrouvent ainsi abondamment dans les matières fécales.

2. Concernant l'extraction d'ADN à partir des matières fécales

Les matières fécales, tissus déjà digérés et contenant très peu d'ADN de canidés, noyé dans des matières étrangères, se prêtent, on le comprend bien, assez difficilement à l'extraction d'ADN. Cette dernière repose elle-même sur une digestion par la protéinase K, ce qui n'est pas évident à réaliser. C'est sans doute, l'étape la plus complexe à élaborer, avec beaucoup d'échecs. Nous nous sommes donc heurtés à bon nombre de difficultés quant au protocole à suivre. Tout d'abord, celui qu'avaient employé *P. Taberlet, S. Griffin et al.* (Taberlet et al., 1996) n'était pas à notre portée, compte tenu des nombreuses préparations extemporanées de réactifs qu'il nécessitait. Nous avons donc choisi le *High Pure Template Preparation Kit ® (Roche)* qui offrait une plus grande simplicité dans l'utilisation en routine des solutions vendues dans le kit tout en permettant certaines adaptations. Comme l'allongement de la durée de digestion de l'échantillon par la protéinase K ne suffisait pas pour extraire suffisamment d'ADN, l'idée de multiplier les lyses de plusieurs sous quantités d'un même échantillon que l'on réunirait par la suite nous est venue, en accord avec les principes posés par *Taberlet et al* concernant les analyses génétiques à partir de faibles quantités d'ADN. De plus le succès obtenu lors des étapes ultérieures d'amplification conforte nos choix dans ces adaptations.

3. Une première étape dans l'analyse de l'ADN fécal à poursuivre

Au cours de ces travaux, nous avons réussi à analyser avec succès deux extraits parmi ceux que nos partenaires nous avaient envoyés. M3 qui correspondait à une crotte de chien, et V1 qui était issu d'un loup italien. Face au grand nombre d'échantillons que nous avons reçus, ce résultat peut paraître un peu insuffisant. Pourtant plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'échec de l'amplification par PCR avec les amorces que nous avons définies pour les chiens et loups, dans les autres cas.

Tout d'abord, la qualité des échantillons reçus a été un facteur important de réussite dans les analyses ultérieures. En effet, ce qui nous autorise à avancer cet argument est que les échantillons contrôles de crottes de chiens, comme de chats nous ont donné entière satisfaction. Or nous avons veillé lors des prélèvements sur le campus de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse à nous placer dans des conditions se rapprochant de celles que l'on rencontre lors des prospections en montagne. Nous n'avons pas prélevé des crottes tout juste formées, mais nous avons systématiquement appliqué le protocole de collecte et de séchage de ces fèces. En ce qui concerne les échantillons provenant du Vercors, il s'agissait de prélèvements effectués au printemps suite à de fortes pluies. Les crottes étaient très lessivées d'aspect blanchâtre sauf V1, ce qui a pu expliquer que les quantités de matériel génétique étaient insuffisantes pour l'amplification par PCR. De même, pour les échantillons provenant d'Espagne, ceux-ci ont été envoyés sous forme fraîche sans séchage préalable. Leur aspect très terreux nous a fait émettre quelque doute sur la nature fécale de ces prélèvements, et la très forte prolifération bactérienne qui en a découlé permet de comprendre l'absence de résultats lors des étapes suivantes d'analyse.

D'autre part, l'absence d'amplification de l'ADN par les amorces spécifiques loup/chien peut aussi être due à l'origine spécifique des échantillons. Les crottes prélevées dans les massifs étaient de taille et de forme caractéristiques des canidés. Mais cela signifie qu'elles peuvent être attribuées au loup, au chien, mais aussi au renard. De la même façon, nos crottes potentiellement attribuées au lynx pouvaient aussi provenir de renards. Or nos amorces loup/chien et félidés ne permettent pas en théorie une amplification d'une séquence renard comme nous l'avons conclu d'après les alignements de séquences renard de la littérature. Afin de rejeter

l'hypothèse d'une origine renard de ces crottes nous avons désigné des amorces spécifiques du renard et l'amplification des séquences avec cette spécificité pourrait faire l'objet d'une étude ultérieure.

Cette première étude sur la mise au point d'une technique génétique de différenciation entre le loup et le chien n'est donc qu'un préliminaire à l'élaboration d'une méthode validée qui permettrait en routine cette distinction. Nous devons donc confirmer nos résultats en nous dotant d'un plus grand panel d'échantillons contrôles :

- de loups d'origines italienne mais aussi espagnole et d'Europe de l'Est, pour confirmer la relevance les différences nucléotidiques utilisées pour la distinction des origines de ces populations ;

- de renard, de chat sauvage, et de lynx pour permettre un diagnostic différentiel significatif, en cas d'absence de résultat avec les amorces spécifiques loup/chien.

Ainsi l'élaboration d'une technique de diagnostic génétique permettant la distinction loup/chien et au-delà, la localisation de la population d'origine des loups, à partir de prélèvements dans l'environnement de fèces, a fait l'objet de ces travaux pour répondre à la demande de la réserve de Nohèdes. Et cela n'est pas sans avoir ouvert de nouvelles perspectives de recherches aussi bien sur le terrain qu'au laboratoire.

IV. Partie 3 : PROJETS DECOULANT DE LA POURSUITE DE CETTE ETUDE, ET NOUVELLES IMPLICATIONS

Compte tenu de l'ampleur du projet, il est bien évident que ce dernier est loin d'être terminé, et que la poursuite de cette étude est nécessaire afin de pouvoir donner une réponse pour chacun des échantillons testés qui nous a été envoyé. En effet nous n'avons pas pu conclure à la fréquentation du Massif du Madres-Coronat par un loup. Un seul des échantillons néanmoins a pu être complètement analysé, et il conviendrait d'en étudier d'autres pour pouvoir conclure vraiment. Mais il s'agissait aussi de créer un protocole aux résultats reproductibles, pouvant être par la suite appliqué à de nouvelles analyses, ce qui ouvre de nombreuses perspectives.

D'autre part, le travail qui a déjà été réalisé à la Réserve a été énorme, et a fait naître de nouvelles idées qui pourraient permettre d'améliorer la collecte de laissées de loups et de les étendre à de nouveaux tissus.

Ce stage a ouvert un grand nombre de voies nouvelles nées des suggestions de partenaires de plus en plus nombreux, qui méritent d'être envisagées.

A. Sur le terrain : persévérer dans les prospections et la collecte des laissées

1. Amélioration des techniques prospectives du loup sur le massif

Ce premier point dépendra fortement du résultat de la prédation sur les estives du massif lors des étés suivant l'année 2001, dernière année du relevé d'indices de présence attribuables à un loup sur le Massif pyrénéen.

En effet, la mobilisation de personnel pour aller prospecter durant l'hiver est sous la direction des autorités publiques, qui n'accepteront de s'impliquer que si de nouvelles attaques ont eu lieu en reconnaissant alors la présence d'un grand canidé.

Lorsque de nouveaux signes de présence d'un tel prédateur apparaîtront, de nouvelles recherches hivernales auront lieu, cela avec une plus grande participation. L'idée serait, cette fois, de pouvoir couvrir une plus grande surface de parcours, pour essayer de trouver davantage d'indices : cadavres de proies sauvages, un lieu de chasse, et pourquoi pas un lieu de refuge.

Un relevé plus méthodique, plus régulier voire systématique, des laissées de grands canidés serait important, pour peut-être déceler de nouvelles caractéristiques éthologiques de l'animal, quant à l'arbre de marquage, la fréquence... Ces relevés seraient ainsi éclairés par le diagnostic génétique permettant de ne pas perdre de temps dans de fausses pistes et, en contrepartie, d'en approfondir les vraies. D'autre part, la répétition des collectes d'excréments et leur analyse permettrait une sorte de suivi ou de veille prospective sur le passage de tels canidés et peut-être de détecter la présence du loup un jour.

Les réflexions éveillées par les échanges avec nos différents partenaires ont, en outre, permis d'ouvrir de nouvelles voies de prospection. Ainsi on nous a proposé de réaliser une repasse sur le massif au début de l'hiver. Cela consiste à diffuser, à l'aide d'un émetteur, des hurlements d'appel de loups enregistrés, pour faire réagir un éventuel individu, à des kilomètres à la ronde.

De plus, à la maison des loups d'Orlu, M. Berthelon nous a parlé d'un élément particulier qu'il avait constaté: l'attraction que semble exercer l'acacia faux robinier sur les loups du parc. En effet, lors de la récente coupe d'arbres dans le parc, les loups ont manifesté un comportement étrange vis-à-vis des bûches d'acacia: ils s'y frottaient intensément, les mordillaient, se couchaient contre. Cet étrange intérêt pour cet arbre nous a donné une idée : installer, comme pour l'ours, des stations odorantes. Il s'agit de faire une décoction d'essence d'acacia dont on badigeonnerait certains arbres bien en vue sur le massif, pourvus d'un fin carré de grillage. L'animal, s'il se frotte contre l'arbre, y laissera quelques poils, qui pourraient ensuite être analysés. Nous avons ainsi décidé de tester cela au parc d'Orlu au début de l'hiver 2002, ainsi qu'ailleurs, pour voir si ce comportement perdure, et est commun à tous les loups. Les premiers tests réalisés à Orlu durant l'hiver 2002 n'ont pas été très concluants, mais nos précautions dans le parc n'étaient peut-

être pas suffisantes pour que les loups ne se sentent pas observés et s'approchent de bûches d'acacias. Ces derniers étaient en outre très fortement imprégnés de l'odeur d'hommes inconnus. Ces tests devraient être améliorés et réitérés par la suite.

Ainsi, une analyse régulière des indices de présence éthologiques et génétiques du loup mais aussi des chiens sur le massif pourrait favoriser la prise de mesures de protection et de suivi du loup sur le massif s'il venait un jour à y réapparaître, et donc de mieux préparer le pastoralisme local à ce retour. Il serait important de l'accompagner des aménagements nécessaires à une cohabitation rationnelle du prédateur avec les troupeaux en place.

2. Objectif : une meilleure prévention des attaques sur les troupeaux du massif, pour une cohabitation harmonieuse entre hommes et loups

a) Un contexte législatif difficile

Jusqu'à présent, l'existence de loups dans les Pyrénées n'a pas été reconnue. Pourtant, lorsqu'un berger voit son troupeau décimé par un canidé, la faute est trop souvent reportée sur le loup, de façon à pouvoir recevoir des indemnités versées seulement lorsque la prédation est imputée à ce prédateur. Le fait est que la fréquentation du massif par des chiens errants ou en divagation étant bien plus importante que celle des loups, les pertes occasionnées par les uns et les autres devraient être proportionnelles. D'autant plus que les loups sont beaucoup plus craintifs que les chiens vis-à-vis de l'occupation humaine et n'attaquent un troupeau que lorsqu'ils en ont saisi la faille au niveau du système de protection, si le risque de s'y blesser n'est pas trop important (Okarma, 1998) (un loup a un instinct de survie très poussé et ne tente aucune action qui pourrait menacer son intégrité physique).

Or, la juridiction concernant ces deux espèces n'est pas du tout la même.

Le loup fait partie des espèces protégées par l'annexe 2 de la convention de Berne (Delibes, 1990). Son commerce, sa destruction, sa chasse et la perturbation de son milieu de vie, de quelque manière que ce soit, sont interdits. Malgré cela, les autorités au vu d'un rapport interministériel d'experts paru en 2003 ont autorisé l'application des dérogations jusque-là refusées par les accords européens (Bracque, 1999; Chevallier, 1999). Ces mesures d'abattage spécifique d'un individu lorsque

des dégâts ont été constatés sur des troupeaux et ont été attribués au loup ont été mises en application dès l'été 2004 mais aussi au printemps 2005. En outre, dans les régions où la présence du loup est reconnue, les indemnités et l'aide à la mise en place de moyens de protection des troupeaux sont appliquées en suivant les directives du programme LIFE-loup.

Le chien, quant à lui, répond à une toute autre juridiction (Cousse, 1998; Fico et al., 1993). D'après les articles 213-1 et 2 du code Rural, un chien qui n'est plus à portée de vue et de voix de son maître est hors la loi, il doit être capturé, mis à la fourrière, transféré à la SPA dans les 4 à 8 jours s'il est tatoué, et euthanasié en l'absence de réclamation.

De plus, dans certaines réserves naturelles, les chiens doivent être tenus en laisse ou sont totalement interdits. Ils peuvent être directement abattus s'ils entrent sur une propriété privée ou s'ils constituent une menace pour un troupeau. Au berger d'en juger.

Dans les faits, il est extrêmement difficile de faire respecter la loi sur le terrain. Sur la plupart des sites de réserves naturelles, l'effectif des gardes forestiers est trop faible face à la surface à couvrir et à la fréquentation touristique. Les moyens débloqués ne permettent pas de faire respecter la loi, et il serait de mauvais ton d'empêcher les promeneurs de se balader avec leurs chiens comme ils l'entendent, car ils trouveraient un nouveau lieu de promenade et cela constituerait un heurt au tourisme dans la localité.

De la même façon, peu de communes peuvent et veulent se doter d'une fourrière, qui est considérée comme un fardeau, car elle est mal vue, se remplira vite, et est difficile à gérer.

Ainsi, lorsqu'il y a une attaque sur un troupeau, le berger doit déclarer le fait à la municipalité qui devra trouver une stratégie de capture et d'abattage de l'animal. Pour être indemnisé, c'est son assurance, s'il en a contracté une pour ce type de sinistre, qui peut le rembourser. Or bien souvent l'assurance n'est pas intéressante comparée au préjudice encouru. L'éleveur doit avoir la preuve que c'est bien un chien qui est la cause des pertes, un témoignage oculaire, la destruction du chien, l'expertise des victimes difficile et trop lente à obtenir, ou l'aveu du propriétaire du chien quant à sa divagation, pour que son assurance de responsabilité civile rembourse les dégâts. On comprend qu'il soit plus intéressant de crier au loup, ce qui est aussi beaucoup plus médiatique.

Mais, depuis que le retour du loup dans les massifs frontaliers de la France est amorcé, un programme de recherche et d'aide à la cohabitation

entre chien et loup a été instauré, sous le nom de l'antenne LIFE-loup (Pouille, Mai 2000). Cette section a été créée en 1997 à partir de l'organisme européen LIFE-Nature, et est gérée par l'ONC. Des fonds ont été débloqués par les Ministères de l'Environnement, de l'Aménagement du Territoire, et de l'Agriculture ainsi que par l'Europe pour :

- le suivi et les recherches sur la venue de loups dans le massif du Mercantour,
- l'information du public, des autorités publiques, et des éleveurs sur le loup et ce qu'implique son retour et son statut,
- l'aide à la mise en place de moyens de protection contre les prédateurs de type grand canidé et à la vulgarisation de diagnostics pastoraux pour orienter ces décisions.

Un deuxième programme LIFE-loup en 2000 visait à poursuivre ces grandes orientations tout en poussant les gouvernements européens à s'impliquer davantage dans cette dynamique tant sur le plan financier que législatif. Mais la commission interministérielle réunie pour la constitution du rapport Estrosi en 2003 souligne les insuffisances du programme, le coût trop élevé des mesures prises dans son cadre et témoigne son refus de poursuivre les efforts dans cette voie.

b) Les mesures prises sur le massif du Madres

En 1999, suite à la confirmation de la présence d'un loup sur le massif, des mesures ont été adoptées de façon à répondre à certains objectifs (Letscher, 1999; Pistolesi, 1998):

- informer les représentants des professions de l'Environnement, de la Nature, de l'Agriculture, de la Chasse, des phénomènes,
- suivre les populations de grands prédateurs,
- lancer des procédures d'indemnisations des attaques,
- référencer les moyens de protection des troupeaux,
- financer les équipements et moyens humains nécessaires à cette protection.
- réduire la divagation des chiens par un meilleur encadrement des promeneurs.

Ainsi, le gardiennage des troupeaux a été renforcé : d'un seul poste, on est passé à deux postes et demi. La présence du berger, même si elle n'empêchera pas toutes les attaques, permet de limiter la casse et non plus de n'en faire que le triste constat le lendemain. Le berger assure aussi une conduite plus serrée du troupeau, accompagné par ses deux chiens de

conduite : un berger des Pyrénées, et un border-collie. Les manipulations en sont plus aisées, permettant de le mener d'un site de couchade à un autre. La création de ce poste et demi a permis en outre d'améliorer les conditions de vie du berger, lui autorisant des quarts de surveillance, de prendre quelques congés, et d'être aidé pour la pose des clôtures, le ravitaillement.

De plus, des parcs de nuit ont été mis en place sur le modèle simplifié du Mercantour. Ces derniers sont au nombre de 5, répartis en différents sites de l'estive. Ils sont dotés de clôtures électriques déplaçables, avec une double enceinte électrifiée. L'intérêt de la première enceinte est de dissuader le prédateur, car c'est un obstacle de plus à franchir. Cela laisse aussi le temps aux chiens de protection et aux brebis de donner l'alerte. D'autre part, il est important que le berger soit présent la nuit, ce qui a été rendu possible par son campement sous tente ces dernières années, et l'été 2001 par la mise en place d'un bloc ALGECO.

En outre, l'introduction de chiens de protection efficaces en nombre suffisant (Rousselot, 1999; Wick, 1998) semble indispensable. Un Montagne des Pyrénées appelé "patous" peut garder 500 brebis. Sur l'estive du Gorg d'Estelat, il en faut donc 3. L'éleveur, après avoir eu un patous peu efficace car trop attaché à l'homme, s'est maintenant doté de deux nouveaux chiens dont un semble bien réagir au sein du troupeau, et l'autre est encore un peu jeune mais promet en efficacité. Un troisième vient d'un autre troupeau qui transhume avec celui de Nohèdes, et est très actif.

Les problèmes rencontrés avec ces chiens sont de plusieurs sortes, mais jamais insolubles.

En effet, la première difficulté concerne leur alimentation : il faut monter de grosses quantités de croquettes sur l'estive et ce n'est pas sans difficulté ; et cela impose au berger de regagner un nombre restreint de sites de couchade s'il ne veut pas porter ces aliments toute la journée. De plus, ces chiens doivent être soumis au troupeau, et avoir peu de contacts avec le berger (2 ou 3 caresses par jour et le nourrissage). Or, souvent les bergers se trompent en les élevant comme des chiens de conduite : ils sont alors trop attachés à l'homme et peuvent se montrer agressifs envers les bêtes. Ensuite, il faut comprendre que ces chiens doivent être dissuasifs, et décourager les prédateurs par leur attitude non agressive mais démonstrative. La difficulté est de ne pas en faire des chiens de garde qui risqueraient d'attaquer un promeneur, mais aussi, à l'inverse, de faire comprendre aux randonneurs les quelques règles de conduite à l'approche d'un troupeau. Ainsi, une plaquette informative a été éditée à leur intention

et est disponible dans les refuges de la Réserve et à l'entrée des parcours. Néanmoins, le respect en est encore limité.

En revanche, le problème des chiens errants est loin d'être résolu : chiens de chasse, de randonneurs et de bergers fréquentent la Réserve de Nohèdes, alors que leur présence est légalement interdite. Il reste donc un gros travail de sensibilisation à accomplir surtout auprès des randonneurs qui perdent trop souvent de vue leur compagnon de route.

Au vu de l'importance des mesures mises en place, on comprend que tout cela ait un coût : 15400 euros pour les parcs de nuit, auxquels s'ajoutent 18500 euros pour les 2 abris pastoraux nouvellement construits et 92000 euros de restauration des deux habitations préexistantes (Letscher, 1999). Les deux chiens de protection supplémentaires ont coûté 1500 euros et le financement des pertes s'élève à 19000 euros. Avant l'officialisation de la présence du loup sur le massif, les aides ont été à la charge du Groupe Pastoral sans possibilité de rétroactivité. Depuis, le Ministère de l'Environnement a consenti à payer l'équipement pastoral mais sans débloquer l'argent depuis le Fond Loup. Cette non reconnaissance officielle du loup sur le massif a ainsi empêché l'intervention d'un fond LIFE.

Malgré cela, les résultats prouvent qu'on est sur la bonne voie. Après le pic de prédation de 97, la prédation a chuté en 98 avec l'arrivée d'un aide berger supplémentaire et d'un chien de protection pourtant peu efficace. Et en 99 les nouvelles dispositions prises ont permis la perte de seulement 10 brebis (**Fig.4**). On a, en fait, constaté des reports de prédation sur les troupeaux voisins moins bien gardés. Mais il reste encore beaucoup à faire et cela nécessitera la reconnaissance de la prédation par un loup.

c) De nouveaux projets à élaborer, fondés sur le programme LIFE-LOUP dans le Mercantour

Tout d'abord, on peut attendre quelques améliorations dans les moyens de protection. Les conditions de vie du berger n'étant déjà pas simples, il faut éviter d'ajouter des contraintes en plus. Il est question pour cela d'améliorer les parcs de protection, en les sécurisant davantage grâce à des alarmes. Mais surtout, le berger devrait pouvoir avoir un lieu plus agréable pour passer la nuit. Durant la période d'estive, la cabane algeco reste un logement précaire. L'idée serait de construire des refuges destinés uniquement au berger, avec une source à proximité (actuellement, il charrie

l'eau lui-même), facile d'accès, mais à proximité des brebis pour qu'il puisse les rejoindre rapidement en cas d'alerte.

D'autre part, il est urgent de rationaliser l'élevage et l'éducation des Montagnes des Pyrénées, de façon à en optimiser l'efficacité et en justifier le coût et l'intérêt. Le nombre d'élevage de patous est insuffisant, et il est important de gérer la valeur génétique de ces chiens si on veut éviter une dérive. Il faut en favoriser la prise en charge par les bergers, en trouvant une solution pour les réserves de nourriture sur l'estive et le coût d'entretien. Enfin, il est nécessaire de stimuler la motivation de l'éleveur pour lui faire accepter les contraintes que représentent ces chiens quant à leur éducation notamment. Cela passera par le conseil, mais aussi par des fascicules et pourquoi pas des stages de formation, ou des manifestations, telles que s'est tenue la journée du chien de protection au mois de juillet 2001 dans les Pyrénées (Wick, 1998).

Jusqu'à maintenant, l'accent n'a pas été assez porté sur la discussion et la concertation. Or il semble indispensable d'établir un dialogue continu avec les différentes parties concernées par le retour éventuel du loup dans le massif, pour éviter une crise équivalente à celle du Mercantour, qui réside plus dans le manque de concertation et d'information que dans une réelle incompatibilité entre pastoralisme et loup. Ainsi, cela devra passer par un meilleur encadrement local, grâce à l'intervention de techniciens en tant que "relais stables et continus de concertation". En effet, les éleveurs sont trop souvent ballottés d'un interlocuteur à un autre, ce qui ne permet pas un climat de confiance, nécessaire à une communication ouverte sur les nouvelles techniques pastorales par exemple. Ils seront aussi très importants pour le suivi de l'éducation des patous et les conseils à donner aux maîtres à ce propos. Mais cela implique aussi de créer une formation adéquate pour garantir la compétence de ces techniciens.

En outre, la concertation doit aussi concerner les différents partenaires locaux : FDC, ONCFS, les gestionnaires d'espaces protégés, syndicats agricoles, associations de protection de la nature, représentants de l'Etat, DRAF et DIREN, représentants élus des collectivités territoriales. Le dialogue devra être engagé dans un plus grand souci de transparence.

Mais la réserve est d'avis de ne pas se restreindre au niveau local, et viser notamment une coordination nationale faisant intervenir l'Institut de L'Elevage avec l'Association pour la Promotion des Animaux de Protection, et les ministères qui restent jusque-là plutôt réticents à la diffusion d'informations concernant le retour du loup en France.

Enfin l'établissement d'un partenariat et d'une relation suivie entre les différentes réserves naturelles de France, de plus en plus nombreuses à être concernées par la présence du loup, semble indispensable. La mise en commun d'un travail d'édition de plaquettes informatives, d'idées sur la gestion des conséquences des manifestations du loup, son suivi, et son diagnostic de différenciation avec le chien, devient indispensable ne serait-ce que pour l'étude comportementale et statistique de cet animal. Au cours de mon stage, j'ai pu entrer en contact avec un certain nombre de ces organismes, alors que d'autres m'ont d'eux-mêmes contactée, intéressés par mon projet dont ils avaient entendu parler.

Ce partenariat pourrait même s'étendre au-delà des frontières, pour donner une plus grande échelle aux études scientifiques sur le loup. Les connaissances et l'expérience acquises par des pays comme l'Italie ou l'Espagne où le loup n'a jamais disparu et a toujours cohabité avec l'homme, nous seraient d'un grand intérêt. Ainsi, il pourrait être intéressant d'établir une convention entre le professeur Jordi Ruiz Olmo de l'université de Barcelone, et spécialiste du loup en Catalogne, et la réserve naturelle de Nohèdes en vue d'un suivi du loup en continuité d'un côté de la frontière à l'autre.

Si les projets d'avenir pour la Réserve sont nombreux, nés des résultats des études précédentes et de mon stage, cela n'est pas sans avoir aussi ouvert de nouvelles perspectives d'études génétiques en laboratoire.

B. Nouvelles implications et projets concernant les analyses génétiques au laboratoire

1. Poursuite de l'élaboration du diagnostic génétique

L'objectif initial était de mettre en place une méthode de distinction génétique Loup/Chien. Dépendant de la mise au point de la technique, d'un protocole d'extraction d'ADN qui prend beaucoup de temps, ainsi que des difficultés quant à son élaboration, il est normal que tout cela ait nécessité ces mois de stage.

Ainsi si l'extraction d'ADN, et son traitement par PCR nichée sont au point pour les échantillons de chien, V1 et M3, il reste à ce jour à traiter l'ensemble des échantillons gracieusement envoyés par les différents participants, pour leur fournir une réponse. Cela impliquera la réalisation d'une vingtaine de diagnostics avec un envoi systématique et groupé au séquençage. De plus, il sera nécessaire, pour fournir une réponse correcte à chaque demande, de réaliser des amplifications des séquences avec des amorces spécifiques aussi du renard ou des félidés. Nous pourrions alors assurer qu'une absence de résultat avec les amorces loup/chien tient à l'exclusion de l'hypothèse origine chien ou loup des fèces et non pas à une erreur technique de prélèvement ou d'extraction de l'ADN. Nous devrions donc à l'avenir nous munir de ces couples d'amorces et optimiser l'amplification des séquences par PCR.

Ensuite, afin de valider notre méthode de diagnostic génétique d'espèce loup/chien, il serait indispensable de constituer une banque d'échantillons témoins fécaux de différentes populations de loups d'Europe de l'Ouest, de provenance italienne et espagnole. Ainsi nous pourrions valider les différences nucléotidiques sur lesquelles nous sommes fondées pour faire le distinguo loup *versus* chien ainsi que confirmer l'origine géographique de l'individu identifié. En effet, il sera nécessaire de pouvoir suivre les fronts de migration des loups en France avec précision, afin de pouvoir fournir des réponses précises et utiles à nos partenaires dans le but de prendre les mesures adéquates pour encadrer ce retour du loup sur les massifs français.

Nous devons encore envisager un certain nombre de mesures pour optimiser ce diagnostic génétique. À l'heure actuelle, ce diagnostic n'est qu'un essai réussi mais qui n'est pas adapté à une application en routine et à échelle suffisante pour la gestion de population sauvage. En effet s'il est simple et très peu onéreux, la contrainte de temps qu'il impose est une limite majeure à son emploi. Actuellement, il faut compter environ deux semaines de traitement : l'extraction d'ADN suivi de l'amplification et de la migration du résultat prennent deux journées à temps plein. Le clonage suivi de la transformation bactérienne et la purification de l'ADN plasmidique nécessitent 48 heures. Enfin entre l'envoi au séquençage et la réception de la séquence par email, il peut s'écouler un temps variable, ce qui permet de donner une réponse une semaine plus tard.

À cela s'ajoute une question de disponibilité, car pour l'instant je suis seule à manipuler. Si la demande est réitérée dans le futur, il faudrait envisager de

pouvoir confier cette technique à une personne compétente au sein d'une UMR de l'ENVT ou bien à un organisme qui en dépende.

Enfin, les travaux récemment menés sur la phylogénie du loup soulignent le risque croissant de rencontrer des individus hybrides de loup et de chien au sein de zones où ces deux espèces se côtoient (Randi et al., 2000; Sundqvist et al., 2001). La méthode élaborée au cours de mes travaux ne permet que de détecter un loup, ou un hybride de femelle loup, comme la séquence analysée est d'origine mitochondriale donc héritée du génome maternel. Si, dans l'avenir, nous sommes amenés à un emploi de routine de cette méthode dans le cadre de suivi de population, nous devons envisager de la compléter par d'autres techniques pour répondre à ce risque d'hybridation des espèces. L'analyse du polymorphisme allélique de microsatellites sur le chromosome Y pourrait constituer un bon complément à cette méthode sans pouvoir la remplacer, compte tenu de la limite en quantité de matériel génétique qui est à notre disposition dans les fèces. L'élargissement de la méthode ainsi proposé permettrait en outre de moduler la décision à prendre quant à la colonisation de nouveaux territoires par le loup. Dans un souci de conservation du patrimoine génétique du loup, la présence d'hybride sur un massif n'est pas souhaitée.

En un dernier point, il serait aussi d'un grand intérêt dans le cadre de l'imputabilité de la responsabilité du loup dans l'attaque de troupeau, de pouvoir étendre ce genre d'analyse à un autre substrat qu'est la salive laissée par le canidé sur les morsures infligées à leur proie. En effet dans le cadre d'un suivi régulier des troupeaux et des attaques de ces derniers lors des estives, une action rapide de prélèvements de chair sur les cadavres et d'analyse génétique sur l'ADN extrait et amplifié spécifiquement par les amorces chien/loup permettrait sans doute l'application de mesures précoces, adéquates et sans polémique possible sur la fréquentation alentour par des loups et l'indemnisation des bergers. Si, en une semaine, on peut diagnostiquer la responsabilité du loup ou du chien dans une attaque de troupeau, sans équivoque, les autorités locales pourront agir en conséquence sans faire intervenir une surenchère médiatique comme c'est le cas aujourd'hui. En Italie et en Espagne, où le loup est aussi présent et toléré en nombre pourtant beaucoup plus conséquent qu'en France, les attaques de troupeaux ne suscitent pas de polémique comme c'est le cas en France. Pourquoi l'exemple français serait-il une exception et la présence du loup intolérable ? Peut-être qu'en offrant une possibilité de rendre au loup sa

vraie part de responsabilité dans les dégâts sur les troupeaux, ce dernier perdra son image séculaire de « grand méchant loup ».

2. Et pourquoi ne pas trouver de nouveaux partenaires?

En effet, au tout début de mon stage, nous étions trois impliqués dans ce projet: la Réserve de Nohèdes, le laboratoire de microbiologie moléculaire de l'ENVT, et moi. Or au fur et à mesure que le projet avançait, il a commencé à intéresser d'autres réserves naturelles et organismes de gestion de l'environnement en France et à l'étranger.

Pour l'instant nous n'avons signé une convention de stage qu'avec l'AGRNN. Mais si la demande de service perdure, il serait peut-être possible d'établir d'autres conventions avec ces partenaires, en passant peut-être aussi par l'ONC, ou L'ONF.

Une convention entre l'AGRNN et le professeur J.R. Olmo spécialiste du loup de l'Université de Barcelone est déjà en bonne voie d'être signée, ce qui nous permettrait d'avoir des échantillons de loup d'une autre origine. Nous pourrions aussi tester notre diagnostic sur des fèces trouvées en Espagne, et trouver ainsi, en l'Université de Barcelone, un interlocuteur de choix dans le cadre d'un partenariat interuniversitaire.

Il serait aussi d'un grand intérêt de trouver des partenaires en Italie afin de pouvoir constituer un réseau de plus grande ampleur couvrant l'Europe de l'Ouest. En effet, la migration du loup, comme le rapport Estrosi l'a souvent souligné, ne saurait se réaliser en regard des frontières. Dans des milieux très favorables au retour du loup que constituent les massifs alpins et pyrénéens, le problème se pose déjà, dans ces régions frontalières. Or pour l'instant chaque pays agit indépendamment de l'autre même si la constitution d'une Europe plus unie pourrait favoriser un traitement plus global de la question.

Mais sans aller aussi loin, il serait intéressant au sein même de l'école de faire participer d'autres unités pédagogiques dans ce projet. La clinique de la faune sauvage pourrait ainsi s'intéresser à la gestion de population, et l'éthologie du loup. Quant à l'unité de recherche de cytogénétique, elle nous serait d'une aide précieuse dans la poursuite du projet de différenciation génétique.

De toute façon, il serait dommage d'abandonner tout cela alors même que la gestion de population sauvage au niveau génétique, et le retour de

grands canidés sauvages sont de plus en plus à l'ordre du jour, et que les initiatives autour de ces thèmes manquent encore. Comme le souligne le rapport Estrosi, il manque à la France un laboratoire d'analyse génétique public servant d'observatoire pour le suivi génétique des populations sauvages autochtones.

Ainsi les nombreuses perspectives qui viennent d'être développées nous montrent l'étendue de nouvelles voies d'étude génétique ouvertes par ce projet. Et si celles-ci sont le fruit d'une réflexion initiée par les différentes étapes de mon stage, ce dernier m'a surtout fait découvrir deux aspects distincts et pourtant si complémentaires de la Recherche : l'étude de terrain et l'analyse en laboratoire.

V. CONCLUSION :

Le retour inattendu, mais prévisible du loup en France – du fait de nombreux facteurs attrayant pour le grand canidé et de l'existence de deux fronts de migrations depuis l'Italie et l'Espagne – n'est donc pas sans poser le problème de son suivi et de sa gestion. Face à l'absence de cadre législatif bien défini, et au manque de méthode efficace pour mesurer la fréquentation nouvelle d'un site par un loup comme tel a été le cas à la Réserve Naturelle de Nohèdes, il était indispensable de mettre au point une méthode de distinction génétique du loup et du chien à partir de l'ADN extrait de matières fécales, afin de suivre ce potentiel retour dans les Pyrénées.

Cette technique s'est avérée non seulement efficace au vue des premiers résultats qu'elle a fournis mais elle a surtout ouvert le champ de nouvelles investigations puisqu'elle permet non seulement de distinguer les deux espèces de canidés mais pourrait aussi donner des informations supplémentaires sur l'origine éventuelle du loup et permettre son suivi à distance de manière non invasive. À l'avenir, cette méthode, après quelques optimisations, pourrait constituer un outil sûr et indiscutable d'apport de preuve et de suivi de présence du loup sur les sites de France et aussi d'Europe. En effet, alors qu'on protège le loup partout en Europe, faisant de lui parfois même un attrait touristique régional, c'est seulement en France que le loup reste sujet à polémique et souvent tabou. La reconnaissance du loup en France est difficile, comme le démontrent les réticences du gouvernement à légiférer à son égard, alors qu'il est souvent utilisé à tort ou à raison par les éleveurs dès lors que des pertes sont constatées lors des estives. Un suivi raisonné des populations de loups en France et en Europe est donc nécessaire pour rendre au loup sa part de responsabilité réelle en tant que prédateur et peut-être lui rendre une juste place dans l'écosystème en équilibre avec les activités humaines. L'outil génétique, car il reste jusque-là le seul à respecter la neutralité et à être approuvé de tous, ne permettrait-il pas de retrouver l'équilibre qui unissait jadis deux prédateurs : hommes et loups ?

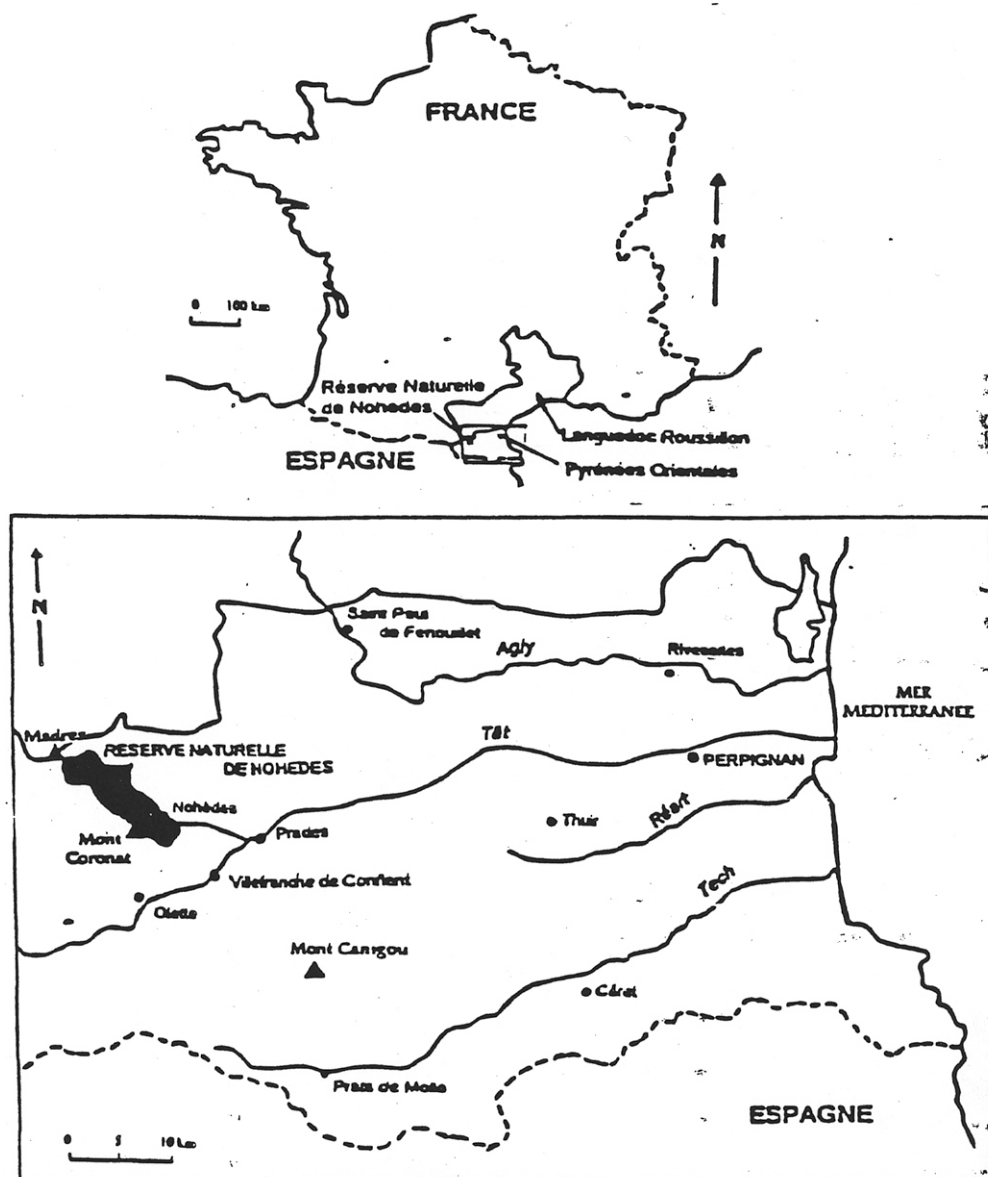
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alleg C., F.E., Vehturini C. (1998) Le retour du loup en France. Ecole Nationale de l'Eau et de l'Environnement de Strasbourg, 40p.
- de Beaufort, F. (1987) Le loup en France: éléments d'écologie historique, 32p. Encyclopédie des carnivores de France, Société Française pour l'Etude et la Protection des Mammifères, vol.1.
- Besset, J.P. (1999) Le loup est réapparu dans les Pyrénées. Le monde, Régions(Aout), 1p.
- Bracque, P. (1999) Rapport de mission interministérielle sur la cohabitation entre l'élevage et le loup. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (Inspection Générale de l'Agriculture), 75p.
- Chevallier, D. (1999) Rapport d'information sur la présence du loup en France. Assemblée Nationale(commission de la production et des échanges),vol.1875, 49p.
- Commission Fédérale du Gibier de Montagne, C.F.G.M. (1997-98) Réalisation des plans de chasse:Isards, Mouflons, cerfs/biches, chevreuils. F.D.C 66, 28p.
- Cousse, S., Magnac-Winterton, M.P. (1998) Evaluation de l'impact des chiens errants sur la faune domestique en Ariège: mesures existantes et procédures d'indemnisation. Rapport final ECOTONE, Recherche et Environnement, INRA/IRGM, 22-34.
- Cozza, K., Fico, R., Battistini, M.L. and Rogers, R. (1996) The damage-conservation interface illustrated by predation on domestic livestock in central Italy. *Biological Conservation* 78(3), 329-336.
- Delibes, M. (1990) Statut de conservation du loup (*Canis lupus*) dans les Etats membres du Conseil de l'Europe. Convention relative à la conservation de la vie sauvage et du milieu naturel de l'Europe, Strasbourg, 45p.
- DeSalle, R., Williams, A.K. and George, M. (1993) Isolation and characterization of animal mitochondrial DNA. *Methods Enzymol* 224, 176-204.
- Fédération Départementale des Chasseurs (1998) Isard, Rescencement général (Pyrénées Orientales). ONF, 28p.
- Fico, R., Morosetti, G. and Giovannini, A. (1993) The impact of predators on livestock in the Abruzzo region of Italy. *Rev Sci Tech* 12(1), 39-50.
- Forestier, P. (1999) Qui a peur du grand méchant loup? *Paris-Match*, 52-55.
- Hopquin, B. (2000) Le loup, rédempteur au delà des Alpes, intrus en deçà. *Le Monde, régions*, p.8.
- Kleiber, M.A. (1999) Nous avons suivi la piste du loup. *Mon quotidien*, p.3.
- Landry, P., Migot, P (2000) Enquête nationale sur les tableaux de chasse à tir, saison 1998-1999. *Faune Sauvage: cahiers techniques* 251, 215 p.
- Letscher, R. (1999) Schéma de prévention des prédateurs sur l'estive de Gorg Estelat-Nohèdes. Dossier de synthèse, 10 p.
- Maldonado, J.E., Orta Davila, F., Stewart, B.S., Geffen, E. and Wayne, R.K. (1995) Intraspecific genetic differentiation in Californian sealions (*Zalophus californianus*) from southern California and the Gulf of California. *Marine Mammal Research* 11, 46-58.
- Mangeot, A. (2000) Prédation et élevage dans les Pyrénées-Orientales: une situation explosive. *Dossier les grands prédateurs* 13, 7-12.
- Okarma, H. (1998) Le loup en Europe, 189 p, edited by E.G. *Espaces*.

- Pistolesi, J. (1998) La prédation des troupeaux domestiques dans les Pyrénées méditerranéennes françaises: dégâts de chiens en divagation et réflexion préalable au retour du loup (*Canis lupus*), E.N.S.A.M.
- Pouille, M.L., Dahier, T., De Beaufort, R., Durand, C. (Mai 2000) Le loup en France: rapport final 1997-1998. *Projet Life-Nature*, 90 p.
- Promega (1996) Protocols and applications guide. The source for Discovery, 49-51.
- Randi, E., Lucchini, V., Christensen, M.F., Mucci, N., Funk, S.M., Dolf, G., Loeschcke, V. (2000) Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conservation Biology* 14, 1-11.
- Rousselot, M.C., Pitt, J. (1999) Les chiens de protection. In Institut de l'élevage (Ed), Guide pratique, 66p.
- Saetre, P., Lindberg, J., Leonard, J.A., Olsson, K., Pettersson, U., Ellegren, H., Bergstrom, T.F., Vila, C. and Jazin, E. (2004) From wild wolf to domestic dog: gene expression changes in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 126(2), 198-206.
- Salvador, O. (2000) Le retour du loup sur le Massif du Madres-Coronat. Dossier les grands prédateurs 13, 21-29.
- Spagnou, D. (2003) Commission d'enquête sur la présence du loup en France et l'exercice du pastoralisme en montagne, Tomes 1 et 2.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L.P. and Bouvet, J. (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res* 24(16), 3189-94.
- Taberlet, P., Grielly, L., Bouvet, J. (1996) Etude génétique sur les loups du Mercantour. Rapport pour la Direction de la Nature et des Paysages, Ministère de l'Environnement, Convention n°T/47-96, 8 p.
- (Terre-net), A.F.P. (1999), 1 p.
- Vignon, V. (1995) Analyse de la prédation des ongulés par les loups (*Canis lupus*) dans un massif des Monts Cantabriques (Asturie, Espagne). *Cahiers d'Ethologie* 15(1), 81-92.
- Vignon, V. (1997) Sélection des ongulés sauvages et du cheptel par les loups en phase de recolonisation dans les Monts Cantabriques. *Bulletin de la société neuchâteloise des sciences naturelles* 120(2), 71-84.
- Vila, C., Amorim, I.R., Leonard, J.A., Posada, D., Castroviejo, J., Petrucci-Fonseca, F., Crandall, K.A., Ellegren, H. and Wayne, R.K. (1999a) Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Mol Ecol* 8(12), 2089-103.
- Vila, C., Maldonado, J.E. and Wayne, R.K. (1999b) Phylogenetic relationships, evolution, and genetic diversity of the domestic dog. *J Hered* 90(1), 71-7.
- Vila, C., Savolainen, P., Maldonado, J.E., Amorim, I.R., Rice, J.E., Honeycutt, R.L., Crandall, K.A., Lundeberg, J. and Wayne, R.K. (1997) Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science* 276(5319), 1687-9.
- Vila, C., Walker, C., Sundqvist, A.K., Flagstad, O., Andersone, Z., Casulli, A., Kojola, I., Valdmann, H., Halverson, J. and Ellegren, H. (2003) Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity* 90(1), 17-24.
- Wayne, R.K. (1993) Molecular evolution of the dog family. *Trends Genet* 9(6), 218-24.
- Wick, P. (1998) Le chien de protection sur troupeau ovin: utilisation et méthode de mise en place, 31 p. pp, edited by E. ARTUS.

ANNEXES

ANNEXE1 : SITUATION DE LA RESERVE NATURELLE DE NOHEDES DANS LES PYRENEES ORIENTALES EN FRANCE



ANNEXE 2 : EXTRAIT DE LA CONVENTION DE BERNE CONCERNANT LA PROTECTION DU LOUP, ET SON APPARTENANCE A L'ANNEXE II DE LA CONVENTION

CONVENTION RELATIVE À LA CONSERVATION DE LA VIE SAUVAGE ET DU MILIEU NATUREL DE L'EUROPE

PRÉAMBULE

Les Etats membres du Conseil de l'Europe et les autres signataires de la présente Convention,
Considérant que le but du Conseil de l'Europe est de réaliser une union plus étroite entre ses membres ;

Considérant la volonté du Conseil de l'Europe de coopérer avec d'autres Etats dans le domaine de la conservation de la nature ;

Reconnaissant que la flore et la faune sauvages constituent un patrimoine naturel d'une valeur esthétique, scientifique, culturelle, récréative, économique et intrinsèque qu'il importe de préserver et de transmettre aux générations futures ;

Reconnaissant le rôle essentiel de la flore et de la faune sauvages dans le maintien des équilibres biologiques ;

Constatant la raréfaction de nombreuses espèces de la flore et de la faune sauvages et la menace d'extinction qui pèse sur certaines d'entre elles ;

Conscients de ce que la conservation des habitats naturels est l'un des éléments essentiels de la protection et de la préservation de la flore et de la faune sauvages ;

Reconnaissant que la conservation de la flore et de la faune sauvages devrait être prise en considération par les gouvernements dans leurs objectifs et programmes nationaux, et qu'une coopération internationale devrait s'instaurer pour préserver en particulier les espèces migratrices ;

Conscients des nombreuses demandes d'action commune émanant des gouvernements ou des instances internationales, notamment celles exprimées par la Conférence des Nations Unies sur l'environnement de 1972, et l'Assemblée consultative du Conseil de l'Europe ;

Désireux en particulier de suivre, dans le domaine de la conservation de la vie sauvage, les recommandations de la Résolution n°2 de la deuxième Conférence ministérielle européenne sur l'environnement,

sont convenus de ce qui suit :

CHAPITRE 1er

Dispositions générales

Article 1er

1. La présente Convention a pour objet d'assurer la conservation de la flore et de la faune sauvages et de leurs habitats naturels, notamment des espèces et des habitats dont la conservation nécessite la coopération de plusieurs Etats, et de promouvoir une telle coopération.

2. Une attention particulière est accordée aux espèces, y compris les espèces migratrices, menacées d'extinction et vulnérables.

Article 2

Les Parties contractantes prennent les mesures nécessaires pour maintenir ou adapter la population de la flore et de la faune sauvages à un niveau qui correspond notamment aux exigences écologiques, scientifiques et culturelles, tout en tenant compte des exigences économiques et récréationnelles et des besoins des sous-espèces, variétés ou formes menacées sur le plan local.

Article 3

1. Chaque Partie contractante prend les mesures nécessaires pour que soient mises en oeuvre des politiques nationales de conservation de la flore et de la faune sauvages et des habitats naturels, en accordant une attention particulière aux espèces menacées d'extinction et vulnérables, surtout aux espèces endémiques et aux habitats menacés, conformément aux dispositions de la présente Convention.

2. Chaque Partie contractante s'engage, dans sa politique d'aménagement et de développement et dans ses mesures de lutte contre la pollution, à prendre en considération la conservation de la flore et de la faune sauvages.

c) La réglementation, s'il y a lieu, de la vente, de la détention, du transport ou de l'offre aux fins de vente des animaux sauvages, vivants ou morts.

Article 8

S'agissant de la capture ou de la mise à mort des espèces de faune sauvage énumérées dans l'Annexe I et dans les cas où des dérogations conformes à l'article 9 sont faites en ce qui concerne les espèces énumérées dans l'Annexe II, les Parties contractantes interdisent l'utilisation de tous les moyens non sélectifs de capture et de mise à mort et des moyens susceptibles d'entraîner localement la disparition ou de troubler gravement la tranquillité des populations d'une espèce, en particulier des moyens énumérés dans l'Annexe IV.

Article 9

1. A condition qu'il n'existe pas une autre solution satisfaisante et que la dérogation ne nuise pas à la survie de la population concernée, chaque Partie contractante peut déroger aux dispositions des articles 4, 5, 6, 7 et à l'interdiction de l'utilisation des moyens visés à l'article 8 :

- dans l'intérêt de la protection de la flore et de la faune
- pour prévenir des dommages importants aux cultures, au bétail, aux forêts, aux pêcheries, aux eaux et aux autres formes de propriété ;
- dans l'intérêt de la santé et de la sécurité publiques, de la sécurité aérienne ou d'autres intérêts publics prioritaires ;
- à des fins de recherche et d'éducation, de repeuplement, de réintroduction ainsi que pour l'élevage
- pour permettre, dans des conditions strictement contrôlées, sur une base sélective et dans une certaine mesure, la prise, la détention ou toute autre exploitation judicieuse de certains animaux et plantes sauvages en petites quantités.

2. Les Parties contractantes soumettent au Comité permanent un rapport biennal sur les dérogations faites en vertu du paragraphe précédent. Ces rapports devront mentionner :

- les populations qui font l'objet ou ont fait l'objet des dérogations et, si possible, le nombre des spécimens impliqués
- les moyens de mise à mort ou de capture autorisés
- les conditions de risque, les circonstances de temps et de lieu dans lesquelles ces dérogations sont intervenues ;
- l'autorité habilitée à déclarer que ces conditions ont été réalisées, et habilitée à prendre les décisions relatives aux moyens qui peuvent être mis en oeuvre, à leurs limites et aux personnes chargées de l'exécution ;
- les contrôles opérés.

CHAPITRE IV

Dispositions particulières concernant les espèces migratrices

Article 10

1. En plus des mesures indiquées aux articles 4, 6, 7 et 8, les Parties contractantes s'engagent à coordonner leurs efforts pour la conservation des espèces migratrices énumérées dans les Annexes II et III et dont l'aire de répartition s'étend sur leurs territoires.

2. Les Parties contractantes prennent des mesures en vue de s'assurer que les périodes de fermeture et/ou d'autres mesures réglementaires d'exploitation instituées en vertu du paragraphe 3, al de l'article 7 correspondent bien aux besoins des espèces migratrices énumérées dans l'Annexe III.

CHAPITRE V

Dispositions complémentaires

Article 11

1. Dans l'exécution des dispositions de la présente Convention, les Parties contractantes s'engagent à :

- a) Coopérer chaque fois qu'il sera utile de le faire, notamment lorsque cette coopération pourrait renforcer l'efficacité des mesures prises conformément aux autres articles de la présente Convention ;
- b) Encourager et coordonner les travaux de recherche en rapport avec les finalités de la présente Convention.

2. Chaque Partie contractante s'engage

- a) A encourager la réintroduction des espèces indigènes de la flore et de la faune sauvages lorsque cette mesure contribuerait à la conservation d'une espèce menacée d'extinction, à condition de



BURLEMENT DE LOUP

Situer le lieu de l'écoute et le lieu estimé d'ouïssion des hurlements sur une copie de carte au 1/25000e.

REFERENCES

Observation réalisée le jour mois année heure

par correspondant: Mme, M: Adresse: Tél.:

par observateur: Mme, M: Adresse: Tél.:

visite du correspondant réalisée le jour mois année

LOCALISATION DE L'OBSERVATION Lieu dit: Altitude:

Commune: Description

1- Nombre d'animaux différents entendus: O un seul O plus d'un

2- Durée pendant laquelle des hurlements ont été entendus: m

3- Distance estimée: m

4- Présence de chiens dans le même rayon (village, ferme...):

O OXPRIME O POSSIBLE Distance approximative: m

5- Autres remarques et descriptions faites par l'observateur (circonstances de l'observation: affût, promenade, pourcentage de troupeau, sans entendus...):

CONCLUSION DU CORRESPONDANT (cocher l'une des cinq réponses possibles et compléter éventuellement)

1- Indice de présence O certain O probable O douteux d'un loup.

2- Indice de présence O non attribué à un loup.

préciser si possible l'espèce:

3- Indice de présence O non identifiable.

préciser pourquoi:



OBSERVATION DIRECTE (page 1)

Situer l'observation sur une copie de carte au 1/25000e

REFERENCES

Observation réalisée le jour mois année heure

par correspondant: Mme, M: Adresse: Tél.:

par observateur: Mme, M: Adresse: Tél.:

visite du correspondant réalisée le jour mois année

LOCALISATION DE L'OBSERVATION Lieu dit: Altitude:

Commune: CONTEXTE DE L'OBSERVATION

1- Conditions météorologiques:

O temps clair O brouillard O pluie O chutes de neige

2- Distance minimale de l'animal durant l'observation: m

3- Observation faite à: O œil nu O jumelles O longue vue

4- Durée de l'observation: min

5- L'observateur a-t-il vu récemment (moins de cinq ans) un loup vivant (captif):

O oui O non

DESCRIPTION

1- Nombre d'animaux différents: 1

2- Taille du (des) individu(s) observé(s) (par rapport à une race de chien connue de l'observateur, à la moulin, chevreuil ou chamois):

3- Couleur du (des) individu(s) observé(s):



FICHE EMPREINTES ET PISTES

Protocole loup

Situer les empreintes ou pistes (séries d'empreintes) relevées sur une carte au 1/25000 en indiquant d'un trait, le trajet suivi par l'animal (ou les animaux) et, d'une flèche, le sens de son (leurs) déplacement(s)

Relevé effectué le _____ Lieu dit _____ Altitude _____
 Commune:.....

Nom de l'observateur..... Tel:
 Nom du correspondant..... Tel:

DESCRIPTION

1. NOMBRE D'ANIMAUX IDENTIFIÉS SUR LES PISTES:.....

2. Les pistes datent de : < 12h < 24h < 48h 2-3j > 3j

3. Les empreintes sont : sur neige sur boue autre, préciser :
 nettes floues très déformées

ALLURE DES PISTES



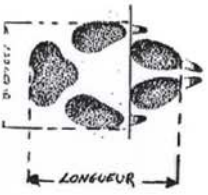
Les pistes relevées ont cette allure

Les pistes relevées ont cette allure

Les pistes peuvent être schématisées en détail au dos de cette fiche

MESURE DES EMPREINTES

Si possible, effectuer les mesures sur plusieurs empreintes (dont la plus petite et la plus grande)



	Longueur	Largeur
1 ^{er} empreinte
2 nd empreinte
3 ^{ème} empreinte
4 ^{ème} empreinte



FOUILLE

Situer l'observation sur une copie de carte au 1/25000e.

REFERENCES

Observation réalisée le _____ jour _____ mois _____ année

par correspondant: M. M. : Adresse: Tél:

par observateur: M. M. : Adresse: Tél:

LOCALISATION DE L'OBSERVATION _____ Lieu dit: Altitude:

Commune:

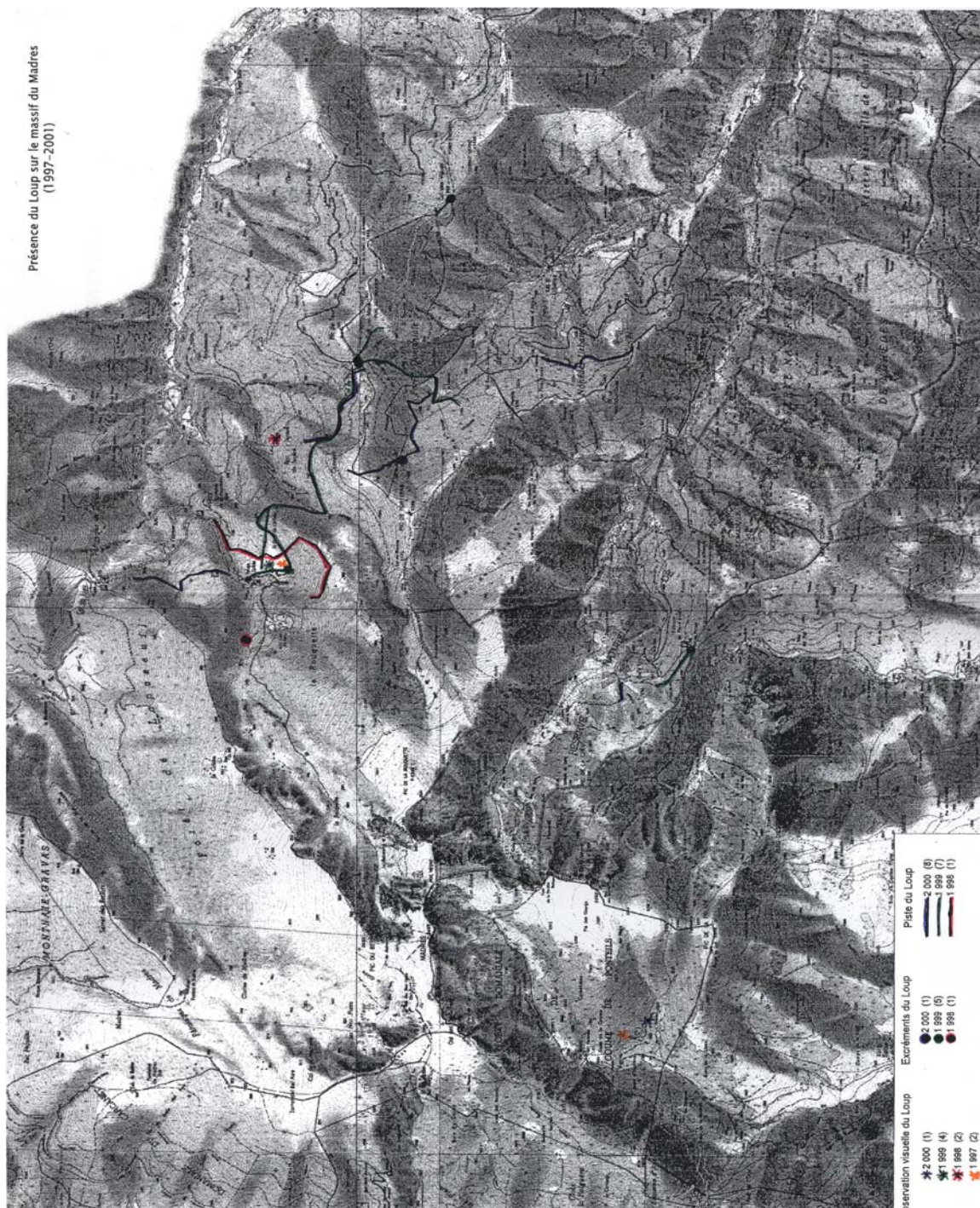
DESCRIPTION _____

-1- Lieu de découverte (bord de chemin, clôture, autour d'une proie, coulée...) et milieu (bois, alpage, falaise...):

-2- Circonstances de la découverte (prospéction de terrain, suivi piste dans la neige...):

REMARQUES DU CORRESPONDANT - CONCLUSION _____

ANNEXE 4 : ITINERAIRES EMPRUNTES PAR LE LOUP SUR LE MASSIF DU MADRES , RESULTAT DES PROSPECTIONS MENEES ENTRE 1997 ET 2001 .



ANNEXE 5 : PROTOCOLE DE COLLECTE DES MATIERES FECALES DE CANIDES SUR LE TERRAIN

Elsa Suberbielle,
stagiaire de l'ENVT,
à la réserve naturelle de Nohèdes
email : esuberbielle@Yahoo.fr

Objet :METHODE DE COLLECTE DES LAISSEES DE LOUPS

Madame, Monsieur,

Ici vous est présenté un protocole de collecte des laissées de loups, en vue d'en effectuer l'analyse génétique.
Pour éviter toute contamination d'ADN exogène, je vous saurai gré de bien vouloir respecter consciencieusement ces quelques indications.

PRE-REQUIS : - Seules les crottes bien identifiées seront prélevées,
- L'ancienneté des crottes n'a pas d'importance, tant qu'elles n'ont pas été lessivées par les pluies, et qu'elles restent bien individualisées .
- Ne jamais mélanger des crottes provenant de plusieurs individus dans le même sac.
- Soustraire l'échantillon à toute éventuelle contamination notamment par le chien (poils, salive...)

TECHNIQUE DE COLLECTE :

- ◆ Après repérage d'une laissée provenant d'un seul individu,
- ◆ Avec un gant de type latex à usage unique, qui ne servira qu'à 1 seul prélèvement sur une seule crotte,
- ◆ Prélever la plus grande quantité possible de la laissée en évitant au maximum de la souiller avec de la terre, de l'herbe, d'autres laissées voisines...
- ◆ La déposer dans un sac à congélation ou équivalent , à usage unique et n'ayant jamais contenu quoi que ce soit avant,
- ◆ Refermer hermétiquement le sac, en cas d'envoi immédiat à l'ENVT ou à la réserve naturelle de Nohèdes.

INSCRIPTONS DEVANT FIGURER SUR LE SAC :

- * Date du prélèvement,
- * Circonstances de collecte : RAS ou préciser si intempéries,
- * Lieu de collecte, (nom de la structure ayant effectué le prélèvement, lieu de collecte...tout renseignement jugé utile),

- * Dans le cas de parcs animaliers, préciser quelques renseignements sur l'individu à l'origine de la laissée (sous-espèce, origine géographique, sexe, régime alimentaire (si connu)),
- * N° du prélèvement si plusieurs ont été effectués sur le même lieu, ou à partir du même individu, préciser le nombre total de prélèvements (ex : 1/x sur loup A).

Nb : Pour les prélèvements qui ne seraient pas immédiatement envoyés à la réserve de Nohèdes ou à l'ENVT, veuillez bien les conserver : à l'air, à l'abris des intempéries (pluies, vents),

dans un endroit le plus sec possible,
 en respectant une séparation physique
 et efficace des crottes : si possible dans des pièces ou endroits différents, ou dans des boîtes différentes, ou séparés par des cloisons assez hautes pour éviter toute contamination par l'air d'échantillon à échantillon. Bien sûr, ne les manipuler qu'avec des gants propres à chaque échantillon,

en évitant, si possible, de les congeler;
 sinon le préciser.

Veuillez nous les faire parvenir dans les plus brefs délais à l'une des adresses suivantes :

soit :

ou

Elsa Suberbielle, S.Bertagnoli
 Laboratoire de microbiologie moléculaire de
 L'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
 23, chemin des Capelles
 31076 TOULOUSE CEDEX
 Tel :05-61-19-38-78

Elsa Suberbielle
 Maison de la réserve
 naturelle de Nohèdes
 66500 NOHEDES
 Tel : 04-68-05-22-42

Vous remerciant d'avance de votre précieuse coopération,
 je vous prie Madame, Monsieur, d'agréer l'expression de mes salutations distinguées.

Elsa Suberbielle :

Toulouse, 2006

NOM : SUBERBIELLE

PRENOM : Elsa

Entre chien et loup : de la crotte à l'ADN.

Elaboration d'une méthode de distinction génétique des deux espèces dans le cadre du retour du loup dans le massif pyrénéen et en France.

RÉSUMÉ :

Par le passé, Le loup a été quasiment éradiqué en Europe avant d'être protégé. Aujourd'hui, son retour est amorcé depuis l'Italie et une recolonisation des Pyrénées est imminente. Les attaques de troupeaux sont souvent imputées au loup malgré leur faible effectifs comparé aux chiens. Une distinction efficace de ces espèces est nécessaire du fait des conséquences légales différentes de leur prédation. La distinction morphologique a des limites alors que les approches de génétique sont objectives et irréfutables. La Réserve Naturelle de Nohèdes, souhaitait la mise au point d'une méthode de différenciation génétique entre chien et loup à partir des matières fécales, indice de présence très couramment trouvé sur les sites potentiels d'occupation. J'ai donc élaboré une méthode d'extraction de l'ADN mitochondrial à partir des fèces de canidés, et d'analyse des différences nucléotidiques, permettant de distinguer les deux espèces et l'origine géographique du loup.

MOTS-CLES : Chien, loup, France, Fèces, méthode, spéciation, ADN mitochondrial, séquençage, phylogénie.

Wolves and dogs: from faeces to DNA.

Elaborating a new method based on genetics to distinguish both species, in a context of return of wolves to Pyrenean massif and in France

ABSTRACT:

In the past, Grey wolves were almost completely eradicated in Europe, until they reached a legal status of conservation. Nowadays, wolves are returning to France from the Italian Alps, thus their recolonization of the Pyrenees is imminent. Attacks on cattle are often attributed to wolves in spite of their fewer number than dogs. It is therefore necessary to discriminate efficiently attacks from wolves and dogs, as the legal consequences are different. Morphology-based diagnostic has its limits whereas Genetics is the only objective and relevant method. In this context, our partners of the Nohèdes reserve, wanted to elaborate a new genetics method allowing to distinguish wolves from dogs, based on the use of faeces, a commonly found clue for presence in their putative habitat. Thus, I developed procedures for the extraction of mitochondrial DNA contained into canids faeces and for the analysis of nucleotidic differences, in order to discriminate both species and their geographic origin.

KEY WORDS: Dog, wolf, France, faeces, methods, speciation, mitochondrial DNA, sequencing, phylogeny.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alleg C., F.E., Vebturini C. (1998) Le retour du loup en France. Ecole Nationale de l'Eau et de l'Environnement de Strasbourg, 40p.
- Beaufort, F.D. (1987) Le loup en France: éléments d'écologie historique, 32p pp. Encyclopédie des carnivores de France, Société Française pour l'Etude et la Protection des Mammifères, 1.
- Besset, J.P. (1999) Le loup est réapparu dans les Pyrénées. Le monde, Régions(Aout), 1p.
- Bracque, P. (1999) Rapport de mission interministérielle sur la cohabitation entre l'élevage et le loup. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (Inspection Générale de l'Agriculture), 75p.
- Chasseurs, F.D.d. (1998) Isard, Rescencement général (Pyrénées Orientales). ONF, 28p.
- Chevallier, D. (1999) Rapport d'information sur la présence du loup en France. Assemblée Nationale(commission de la production et des échanges) 1875, 49p.
- Cousse S., M.-W.M.P. (1998) Evaluation de l'impact des chiens errants sur la faune domestique en Ariège: mesures existantes et procédures d'indemnisation. Rapport final ECOTONE, Recherche et Environnement, INRA/IRGM, 22-34.
- Cozza, K., Fico, R., Battistini, M.L. and Rogers, R. (1996) The damage-conservation interface illustrated by predation on domestic livestock in central Italy. *Biological Conservation* 78(3), 329-336.
- Delibes, M. (1990) Statut de conservation du loup (*Canis lupus*) dans les Etats membres du Conseil de l'Europe. Convention relative à la conservation de la vie sauvage et du milieu naturel de l'Europe, Strasbourg, 45p.
- DeSalle, R., Williams, A.K. and George, M. (1993) Isolation and characterization of animal mitochondrial DNA. *Methods Enzymol* 224, 176-204.
- Fico, R., Morosetti, G. and Giovannini, A. (1993) The impact of predators on livestock in the Abruzzo region of Italy. *Rev Sci Tech* 12(1), 39-50.
- Forestier, P. (1999) Qui a peur du grand méchant loup? *Paris-Match*, 52-55.
- France, P. (1996) Protocols and applications guide. The source for Discovery, 49-51.
- Hopquin, B. (2000) Le loup, rédempteur au delà des Alpes, intrus en deçà. *Le Monde, régions*, p.8.
- Kleiber, M.A. (1999) Nous avons suivi la piste du loup. *Mon quotidien*, p.3.
- Letscher, R. (1999) Schéma de prévention des prédateurs sur l'estive de Gorg Estelat-Nohèdes. Dossier de synthèse, 10 p.
- Maldonado, J.E., Orta Davila, F., Stewart, B.S., Geffen, E. and Wayne, R.K. (1995) Intraspecific genetic differentiation in Californian sealions (*Zalophus californianus*) from southern California and the Gulf of California. *Marine Mammal Research* 11, 46-58.
- Mangeot, A. (2000) Prédation et élevage dans les Pyrénées-Orientales: une situation explosive. *Dossier les grands prédateurs* 13, 7-12.
- montagne, C.F.G.d. (1997-98) Réalisation des plans de chasse:Isards, Mouflons, cerfs/biches, chevreuils. F.D.C 66, 28p.
- Okarma, H. (1998) Le loup en Europe, 189 p pp, edited by E.G. Espaces.
- (2000) Enquête nationale sur les tableaux de chasse à tir saison 1998-1999. P.Landry, P.M.

- Pistolesi, J. (1998) La prédation des troupeaux domestiques dans les Pyrénées méditerranéennes françaises: dégâts de chiens en divagation et réflexion préalable au retour du loup (*Canis lupus*), E.N.S.A.M.
- Projet Life-Nature. (Mai 2000) Le loup en France: rapport final 1997-1998. Poulle M.L., D.T., De Beaufort R., Durand C.
- Randi, E., Lucchini, V., Christensen, M.F., Mucci, N., Funk, S.M., Dolf, G. and Loeschcke, V. (2000) Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conservation Biology* 14, 1-11.
- Randi E., L.V., Christensen M.F., Mucci N., Funk S.M., Dolf G., Loeschcke V. (2000) Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conservation Biology* 14, 1-11.
- Rousselot M.C., P.J. (1999) Les chiens de protection. In: E.I.d. l'élevage (Ed), Guide pratique, pp. 66p.
- Ruffier-Reynie, C. (Aout 1999) Carnages ovins: responsables et bouc-émissaires. *Combat Nature* 126, p35.
- Saetre, P., Lindberg, J., Leonard, J.A., Olsson, K., Pettersson, U., Ellegren, H., Bergstrom, T.F., Vila, C. and Jazin, E. (2004) From wild wolf to domestic dog: gene expression changes in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 126(2), 198-206.
- Salvador, O. (2000) Le retour du loup sur le Massif du Madres-Coronat. Dossier les grands prédateurs 13, 21-29.
- Spagnou, D. (2003) Commission d'enquête sur la présence du loup en France et l'exercice du pastoralisme en montagne., Tomes 1 et 2.
- Sundqvist, A.K., Ellegren, H., Olivier, M. and Vila, C. (2001) Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Mol Ecol* 10(8), 1959-66.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L.P. and Bouvet, J. (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res* 24(16), 3189-94.
- Taberlet P., G.L., Bouvet J. Etude génétique sur les loups du Mercantour 1996. (Terre-net), A.F.P. (1999), pp. 1p.
- Vignon, V. (1995) Analyse de la prédation des ongulés par les loups (*Canis lupus*) dans un massif des Monts Cantabriques (Asturie, Espagne). *Cahiers d'Ethologie* 15(1), 81-92.
- Vignon, V. (1997) Sélection des ongulés sauvages et du cheptel par les loups en phase de recolonisation dans les Monts Cantabriques. *Bulletin de la société neuchâteloise des sciences naturelles* 120(2), 71-84.
- Vila, C., Amorim, I.R., Leonard, J.A., Posada, D., Castroviejo, J., Petrucci-Fonseca, F., Crandall, K.A., Ellegren, H. and Wayne, R.K. (1999a) Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *canis lupus*. *Mol Ecol* 8(12), 2089-103.
- Vila, C., Maldonado, J.E. and Wayne, R.K. (1999b) Phylogenetic relationships, evolution, and genetic diversity of the domestic dog. *J Hered* 90(1), 71-7.
- Vila, C., Savolainen, P., Maldonado, J.E., Amorim, I.R., Rice, J.E., Honeycutt, R.L., Crandall, K.A., Lundeberg, J. and Wayne, R.K. (1997) Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science* 276(5319), 1687-9.
- Vila, C., Walker, C., Sundqvist, A.K., Flagstad, O., Andersone, Z., Casulli, A., Kojola, I., Valdmann, H., Halverson, J. and Ellegren, H. (2003) Combined use of

- maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity* 90(1), 17-24.
- Wayne, R.K. (1993) Molecular evolution of the dog family. *Trends Genet* 9(6), 218-24.
- Wick, P. (1998) Le chien de protection sur troupeau ovin: utilisation et méthode de mise en place, 31 p. pp, edited by E. ARTUS.

Toulouse, 2006

NOM : SUBERBIELLE

PRENOM : Elsa

Entre chien et loup : de la crotte à l'ADN.

Elaboration d'une méthode de distinction génétique des deux espèces dans le cadre du retour du loup dans le massif pyrénéen et en France.

RÉSUMÉ :

Par le passé, Le loup a été quasiment éradiqué en Europe avant d'être protégé. Aujourd'hui, son retour est amorcé depuis l'Italie et une recolonisation des Pyrénées est imminente. Les attaques de troupeaux sont souvent imputées au loup malgré leur faible effectifs comparé aux chiens. Une distinction efficace de ces espèces est nécessaire du fait des conséquences légales différentes de leur prédation. La distinction morphologique a des limites alors que les approches de génétique sont objectives et irréfutables. La Réserve Naturelle de Nohèdes, souhaitait la mise au point d'une méthode de différenciation génétique entre chien et loup à partir des matières fécales, indice de présence très couramment trouvé sur les sites potentiels d'occupation. J'ai donc élaboré une méthode d'extraction de l'ADN mitochondrial à partir des fèces de canidés, et d'analyse des différences nucléotidiques, permettant de distinguer les deux espèces et l'origine géographique du loup.

MOTS-CLES : Chien, loup, France, Fèces, méthode, spéciation, ADN mitochondrial, séquençage, phylogénie.

Wolves and dogs: from faeces to DNA.

Elaborating a new method based on genetics to distinguish both species, in a context of return of wolves to Pyrenean massif and in France

ABSTRACT:

In the past, Grey wolves were almost completely eradicated in Europe, until they reached a legal status of conservation. Nowadays, wolves are returning to France from the Italian Alps, thus their recolonization of the Pyrenees is imminent. Attacks on cattle are often attributed to wolves in spite of their fewer number than dogs. It is therefore necessary to discriminate efficiently attacks from wolves and dogs, as the legal consequences are different. Morphology-based diagnostic has its limits whereas Genetics is the only objective and relevant method. In this context, our partners of the Nohèdes reserve, wanted to elaborate a new genetics method allowing to distinguish wolves from dogs, based on the use of faeces, a commonly found clue for presence in their putative habitat. Thus, I developed procedures for the extraction of mitochondrial DNA contained into canids faeces and for the analysis of nucleotidic differences, in order to discriminate both species and their geographic origin.

KEY WORDS: Dog, wolf, France, faeces, methods, speciation, mitochondrial DNA, sequencing, phylogeny.