



**ETAT DE VAUD**

Département de la sécurité et de l'environnement  
**Service des forêts, de la faune et de la nature**  
Ch. du Marquisat 1  
CH - 1025 St-Sulpice



**Forêts  
Faune  
Nature**

Conservation de la faune  
Tél: 021/694.82.00 Fax: 021/694.82.50

**Élaboration d'un protocole de routine  
pour l'identification génétique de mammifères sauvages  
(gibier)  
à partir d'échantillons biologiques**

---

**Dr Luca Fumagalli  
Institut d'Écologie  
Laboratoire de Biologie de la Conservation, Bâtiment de Biologie,  
Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne**



**Avril 2002**

# **Élaboration d'un protocole de routine pour l'identification génétique de mammifères sauvages (gibier) à partir d'échantillons biologiques**

**Étude mandatée par la Conservation de la Faune**  
Service des forêts, de la faune et de la nature  
Département de la Sécurité et de l'Environnement de l'État de Vaud

Dr Luca Fumagalli  
Institut d'Écologie  
Laboratoire de Biologie de la Conservation, Bâtiment de Biologie,  
Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne  
Luca.Fumagalli@ie-zea.unil.ch  
<http://www.unil.ch/lbc>

## **Résumé**

L'identification spécifique d'un échantillon biologique récolté sur le terrain n'est pas toujours possible par le biais de méthodes conventionnelles. Afin de remédier à cette situation, nous avons développé un protocole rapide, rigoureux et reproductible, constitué de quatre étapes principales: (i) extraction (isolement) de l'ADN à partir d'échantillons biologiques de provenance variée; (ii) amplification par PCR d'un segment spécifique d'ADN; (iii) détermination de la séquence nucléotidique du segment d'ADN amplifié; (iv) comparaison de la séquence obtenue avec une base de données (si nécessaire, analyse phylogénétique) et détermination de l'espèce la plus proche. Cette approche nous a permis d'identifier sans ambiguïté la totalité des échantillons analysés, représentés par des tissus d'origine variée (sang, biopsies d'organe ou de tissu) d'espèces de mammifères sauvages.

## **Zusammenfassung**

Die Artbestimmung einer biologischen Probe gesammelt in der freien Wildbahn ist mittels klassischer Methoden nicht immer möglich. Um die Situation zu verbessern haben wir eine schnelle Technik entwickelt, die präzise reproduzierbar ist und vier technische Schritte umfasst: (i) Extraktion der DNS aus biologischen Proben; (ii) Amplifizieren eines DNS-Segmentes mittels PCR; (iii) Bestimmung der Basensequenz der DNS; (iv) Vergleich der Basensequenz mit einer Datenbank (falls nötig kombiniert mit phylogenetischer Analyse) und Bestimmung der nächstverwandten Art. Dieses Vorgehen hat uns ermöglicht, alle analysierten Proben zweifelsfrei zu bestimmen. Das analysierte Material stammt aus verschiedenen Geweben (Blut-, Organ- und Gewebeproben) von wildlebenden Säugetieren.

## **INTRODUCTION**

L'identification d'une espèce animale est normalement basée sur l'analyse de caractères morphologiques. Cette approche peut cependant se révéler inefficace lorsqu'un animal a été abattu, car ces indices sont souvent détruits ou effacés intentionnellement. Cette situation peut ainsi poser un problème aux agences gouvernementales (par exemple aux

inspecteurs de la faune) dont le travail consiste à identifier le type d'espèce (ou l'identité d'un tissu ou viande) afin de détecter les individus qui ont été obtenus de façon illégale (espèces protégées, chassées sans permis, en dehors de la saison de chasse ou en excédant les quotas permis par la loi). Il est donc indispensable dans cette situation de pouvoir se baser sur une méthode fiable permettant l'identification spécifique d'un échantillon biologique. Grâce aux développements récents de techniques d'analyse moléculaire puissantes (comme l'amplification génétique par PCR<sup>1</sup>), il est aujourd'hui possible d'accéder à l'information génétique de base (contenue dans le matériel héréditaire d'un organisme, l'ADN) de façon relativement aisée et rapide. En particulier, par le biais de techniques permettant l'isolement de petites quantités d'acides nucléiques à partir de différentes sources, suivi par leur amplification, il est possible de déterminer la séquence nucléotidique d'un segment d'ADN et de pouvoir ainsi savoir à quelle espèce il appartient. Par rapport à d'autres méthodes employées pour l'identification d'échantillons biologiques (électrophorèse des protéines, études chromatographiques ou immunologiques), l'analyse de l'ADN présente de nombreux avantages: (i) cette molécule est le support même du code génétique et l'information qu'elle contient est donc plus grande que celle révélée par l'analyse des protéines (qui en sont le produit); (ii) elle est présente dans toutes les cellules vivantes (indépendamment de l'origine du tissu analysé, par exemple goutte de sang, poil, os, muscle ou échantillon d'organe); (iii) c'est une molécule remarquablement stable (elle a été isolée et analysée par exemple dans des tissus d'il y a 100.000 ans<sup>2</sup>); (iv) l'échange d'informations entre les différents laboratoires travaillant avec ces techniques est virtuellement illimité.

Le but de l'étude présentée ici est de mettre au point un protocole de routine rapide et reproductible permettant une identification scientifiquement rigoureuse d'échantillons biologiques, en particulier d'espèces de gibier présentes en Suisse. Les résultats et les perspectives de l'approche envisagée sont discutés, ainsi que l'estimation du temps et du coût des analyses. En présentant une description détaillée des procédures de récolte des échantillons sur le terrain et des analyses de laboratoire, on a voulu standardiser un protocole d'identification spécifique d'un échantillon dans les situations où ceci n'est pas possible par des méthodes conventionnelles.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Échantillons

Le matériel à disposition était représenté par des échantillons de sang conservés dans des tubes capillaires héparinisés et provenant d'animaux autopsiés à l'Institut Galli-Valerio de Lausanne (Service vétérinaire, Département de l'Intérieur et de la Santé publique), et par des tissus (foie, muscle et biopsie d'oreille) conservés dans de l'éthanol 80 %, appartenant à 12 espèces de mammifères sauvages. La liste complète des espèces analysées et les informations complémentaires les concernant sont résumées dans le Tableau 1. Après avoir sélectionné les échantillons à étudier, leur origine a été volontairement occultée et ces derniers ont été analysés «à l'aveugle» jusqu'à obtention de leur séquence nucléotidique.

### Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait des tissus par l'intermédiaire du QIAamp Blood Kit et du QIAamp Tissue Kit (Qiagen), selon les recommandations du fabricant. Ces produits sont basés sur la propriété que possède la silice à se lier sélectivement à l'ADN en présence de hautes concentrations en sels chaotropiques et à un pH optimal (=7.5). Après digestion par la protéinase K, les échantillons sont centrifugés à travers les colonnes en question et les acides nucléiques sont récupérés dans un tampon adéquat (dans notre cas, le volume était de 50 µl).

### Amplification enzymatique par PCR

La totalité du gène du cytochrome *b* (*cyt b*) de l'ADN mitochondrial (ADNmt) a été amplifiée en deux fragments partiellement recouvrants avec les deux couples d'amorces L14724<sup>3</sup> + MVZ16<sup>4</sup>, et L15162 + H15915<sup>3</sup>. L'amplification par PCR a été effectuée dans un volume final de 25 µl (50-mM KCl, 10-mM Tris-HCl (pH 8.3), 2-mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2-mM de chaque dNTP, 1-µM de chaque amorce, 0.5 U de l'enzyme AmpliTaq Gold™ polymérase (Perkin Elmer/Roche), 2-µl d'extrait contenant l'ADN) en utilisant 1 cycle de pré-incubation enzymatique à 95 °C pendant 10 min, suivi par 35 cycles de dénaturation à 94 °C pendant 45 s, hybridation à 50 °C pendant 1 min et extension à 72 °C pendant 1 min. Les produits PCR ont par la suite été soit purifiés sur colonnes QIAquick (Qiagen) soit purifiés dans un gel d'agarose à 2 % à bas point de fusion et dans ce dernier cas récupérés dans 200 µl d'H<sub>2</sub>O et ré-amplifiés dans les mêmes conditions décrites plus haut, à l'exception du nombre de cycles qui a été abaissé à 25.

## **Séquençage de l'ADN**

Les produits amplifiés et purifiés ont été séquencés à l'aide du ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI/Perkin Elmer). Les amorces utilisées lors du séquençage ont été respectivement L14724 pour le premier fragment et H15915 pour le deuxième, le recouvrement minimal obtenu étant ainsi pour un même échantillon de 250 paires de bases (pb). Les fluorochromes en excès ont par la suite été éliminés par une précipitation à l'éthanol et les réactions de séquence ont été chargées sur un ABI PRISM™ 373XL DNA Sequencer (Perkin/Elmer). La migration a duré 15 heures sur un gel de polyacrylamide à 6 % (LongRanger™ gel (FMC)).

L'alignement des séquences a été effectué visuellement; ensuite, les séquences obtenues ont été comparées aux séquences disponibles dans les banques de données publiques d'ADN, dans le but d'effectuer une recherche par degré de similarité. Une fois cette recherche effectuée (et l'échantillon déterminé) on a comparé l'identification obtenue avec le libellé original de chaque tube et vérifié ainsi nos résultats.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'extraction d'ADN, l'amplification et le séquençage du gène mitochondrial du *cyt b* a été obtenue pour la totalité des échantillons à disposition, quel qu'en soit la source (sang, muscle, etc.). Pour 10 espèces on a pu obtenir la séquence nucléotidique complète du gène codant pour le *cyt b* (1140 pb); dans le cas du blaireau (*Meles meles*) et du putois (*Mustela putorius*), l'amplification a été obtenue uniquement avec le couple d'amorces L15162/H15915, et la longueur du fragment séquencé est de respectivement 609 pb et 714 pb. Comme causes les plus probables on peut invoquer un mauvais état de conservation des échantillons de sang et/ou le mauvais fonctionnement des amorces L14724 et/ou MVZ16 chez ces deux espèces. L'alignement avec des séquences nucléotidiques récupérées dans des banques de données d'ADN a confirmé l'identification spécifique de nos échantillons dans le 100 % des cas. La Figure 1 est une illustration schématique de la technique utilisée.

### Récolte des échantillons sur le terrain

Pour une analyse du type de celle effectuée dans ce travail (ou en tout cas dans toute étude prévoyant l'amplification par PCR d'une séquence génomique), la source d'ADN potentiellement utilisable comprend tout tissu préservé structurellement et dont la quantité peut être infinitésimale (de l'ordre du ng ou même du pg). L'échantillon à prélever sur le terrain peut donc être une très petite quantité d'organe ou de tissu (de l'ordre de 1 à 5 mm<sup>3</sup>), tel qu'une biopsie (par exemple biopsie d'oreille, ou également d'un organe interne si l'animal a été abattu), des poils ou des plumes (obligatoirement avec la racine), etc. Il est également possible d'utiliser les crottes de l'animal que l'on veut identifier (l'ADN analysé sera dans ce cas celui des cellules intestinales expulsées avec la crotte). L'échantillon sera dans la mesure du possible prélevé dans des conditions de stérilité maximale (ciseaux ou lame propres, à usage unique si possible, et exempts de traces biologiques appartenant à un autre animal; pas de contact avec les doigts du manipulateur) et déposé individuellement:

- (i) dans le cas d'un tissu ou d'une biopsie, dans un tube étiqueté et contenant de l'alcool 80% ou un autre tampon (par ex., 20%-DMSO saturé en NaCl) le recouvrant complètement;
- (ii) dans le cas du sang, dilué dans du tampon<sup>5</sup> ou recueilli sur du papier buvard adéquats;
- (iii) dans le cas de poils ou de plumes, dans une simple enveloppe en papier;
- (iv) dans le cas de crottes, dans un sachet après avoir été séchées à l'air, ou dans de l'alcool 80%.

Il est à noter que l'échantillon ne devrait en principe pas provenir d'un animal mort depuis plusieurs jours et dans un état de décomposition avancée, mais peut par contre avoir été congelé pendant plusieurs mois, voire années. Une fois collectés, les échantillons devraient être déposés au frais (frigo, en particulier ceux conservés dans l'alcool) ou conge-

lés (cadavre entier, sang dans microcapillaires, etc.) jusqu'à la prise en charge par le laboratoire spécialisé. La récolte des échantillons est donc très simple à réaliser, ne demande aucune infrastructure complexe ni de personnel spécialisé, et n'est généralement pas destructive du moment qu'elle ne nécessite pas le sacrifice de l'animal.

### **Extraction de l'ADN**

Bien que le procédé le plus couramment utilisé pour l'isolement de l'ADN soit celui de la digestion par une protéase suivie par une extraction organique (phénol/chloroforme), la méthode choisie dans cette étude présente de nombreux avantages, notamment: (i) sa rapidité; (ii) son efficacité avec des tissus plus ou moins dégradés (ce qui est fréquent quand on travaille avec des échantillons biologiques provenant des spécimens morts depuis un certain temps ou avec des morceaux de viande); (iii) son risque très réduit de contamination entre les échantillons lors de la manipulation.

### **Choix de la séquence à analyser**

Le gène mitochondrial du *cyt b* nous a semblé être la région du génome de choix pour répondre à notre problématique, et ceci pour différentes raisons. Tout d'abord, il faut que la région du génome étudiée accepte des mutations en nombre suffisamment élevé pour que des organismes proches présentent des séquences différentes, mais pas si rapidement au point d'engendrer une variation intraspécifique trop importante. Ce critère est satisfait de façon optimale avec le gène du *cyt b*, qui est particulièrement étudié pour éclaircir les relations phylogénétiques au niveau de l'espèce ou de la sous-espèce (par ex., <sup>3,6</sup>). En étudiant une région codante il est possible de détecter plus aisément des erreurs d'amplification/séquençage en traduisant la séquence obtenue et en la comparant avec les séquences des acides aminés connues du même gène. Le pattern de mutation de ce gène est relativement bien connu, ainsi que la structure et la fonction de la protéine correspondante<sup>3,7</sup>. De plus, il existe actuellement une banque de données très importante concernant ce gène, un grand nombre d'organismes appartenant aux principaux groupes des Vertébrés ayant été séquencés, et cette situation devrait encore évoluer. Ce dernier point est important, car une séquence unique de *cyt b* n'est en soi diagnostique d'aucune espèce (à cause de la nature des mutations dans le génome mitochondrial et de la variation intraspécifique). Au contraire, il est nécessaire d'avoir à disposition une banque de données aussi vaste que possible pour pouvoir comparer la séquence obtenue avec des séquences dont l'appartenance spécifique est certaine, et éventuellement pour effectuer une analyse phylogénétique (en particulier quand la problématique consiste à identifier une lignée génétique à l'intérieur d'une espèce).

## Temps et coût des analyses

L'estimation approximative du temps nécessaire à effectuer l'analyse et la détermination de(s) l'échantillon(s) et du coût des produits a été effectuée d'après les techniques à disposition et le prix des produits lors de la rédaction de ce rapport, et n'est donc pas définitive. Pour la détermination d'un échantillon biologique le prix est de l'ordre de 300 à 500 FS tous frais couverts. En l'absence de problèmes techniques, les délais pour effectuer la détermination spécifique de(s) l'échantillon(s) sont de l'ordre de 3-4 jours (délai minimum).

## Limites et perspectives

Le protocole présenté consiste à amplifier et séquencer deux fragments distincts d'environ 800 pb (se chevauchant donc sur plus de 400 pb si l'on considère la séquence du *cyt b* qui est de 1140 pb chez la quasi-totalité des Mammifères) de façon à pouvoir lire la totalité de la séquence nucléotidique de ce gène. Toutefois, afin d'obtenir une résolution similaire à celle requise dans notre étude (distinction entre espèces bien différenciées, avec deux seules espèces appartenant au même genre) il serait envisageable de séquencer un fragment d'ADN plus court. Par exemple, Kocher et collaborateurs<sup>8</sup> ont publié des amorces qui amplifient un segment de 307 pb du *cyt b* et qui fonctionnent chez une grande quantité d'espèces de Vertébrés. Cette option, plus rapide d'ailleurs, est d'autant plus justifiée quand l'ADN qui doit être analysé est plutôt dégradé (tissus décomposés, vieux tissus mal conservés, spécimens de musée, etc.), car dans ce cas il est uniquement possible d'amplifier des fragments d'ADN relativement courts (de l'ordre de <500 pb). Parmi nos échantillons, ça pourrait être le cas du blaireau (*Meles meles*) et du putois (*Mustela putorius*), dont il n'a pas été possible d'amplifier la totalité du *cyt b* avec les deux amorces L14724 et H15915 (~ 1200 pb), tandis que l'amplification de la deuxième moitié de ce gène (~ 750 pb) n'a pas posé de problèmes. La raison pour laquelle nous avons choisi de séquencer la totalité du gène du *cyt b* est celle de fournir la possibilité d'établir à moyen ou long terme une banque de données informatisée pouvant servir de référence pour l'identification d'espèces de gibier de Suisse, ou plus en général d'espèces animales posant un problème d'identification ou de protection, et ainsi de pouvoir plus facilement l'intégrer dans les banques de données déjà existantes (si les scientifiques déposaient dans les banques uniquement des séquences très partielles il serait beaucoup moins facile d'échanger et d'utiliser les résultats obtenus dans différents laboratoires).

Une autre question est de savoir s'il est nécessaire ou pas d'établir une banque de séquences de référence provenant de Suisse ou s'il ne serait pas envisageable plus simplement de comparer l'échantillon que l'on veut déterminer avec des séquences déjà déposées dans les banques et provenant d'échantillons originaires d'autres régions géographiques. Ce problème dépend en fait de la variabilité intraspécifique de l'ADN. Bien que dans le cas du *cyt b* la variabilité intraspécifique de l'ADN ne dépasse en principe jamais celle interspécifique, la différence génétique entre deux individus conspécifiques provenant de deux régions isolées et/ou éloignées géographiquement peut être importante, et par conséquent peut engendrer un élément d'ambiguïté supplémentaire dans notre déter

mination qu'il est souhaitable d'éviter.

Pour terminer, on peut se poser la question s'il existe d'autres techniques plus rapides et/ou moins coûteuses qui pourraient remplacer le séquençage de l'ADN. Bien que d'autres approches moléculaires puissent théoriquement établir un diagnostic d'identification (par ex., digestion par enzymes de restriction d'un segment amplifié et comparaison du pattern de restriction, ou test d'amplification avec des amorces spécifiques), nous pensons que dans une situation telle qu'elle nous a été présentée (détermination d'un échantillon qui pourrait potentiellement appartenir à de nombreuses espèces bien différenciées entre elles) l'obtention de la séquence nucléotidique requiert une mise au point moins complexe et fournit un résultat totalement exempt d'ambiguïtés.

## **CONCLUSION**

Le protocole présenté dans ce travail nous a permis d'identifier rapidement, sans ambiguïté et de façon reproductible la totalité des échantillons à disposition, ceci en employant des techniques bien établies. Ce protocole peut être effectué dans tout laboratoire équipé pour des analyses de base de biologie moléculaire et n'est pas sujet à un biais engendré par le manipulateur. Il peut donc être utilisé pour toute expertise en génétique moléculaire de fragments biologiques variés (peaux, poils, plumes, fèces, sang, tissus, viandes de chasse, etc.) appartenant à des espèces protégées ou dont l'identification par des méthodes conventionnelles est impossible. Par conséquent, ce protocole devrait être acceptable lors d'une procédure légale concernant l'identification d'échantillons d'origine inconnue ou douteuse.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Saiki, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491 (1988).
2. Krings, M. *et al.* Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* **90**, 19-30 (1997).
3. Irwin, D. M., Kocher, T. D. & Wilson, A. C. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* **32**, 128-144 (1991).
4. da Silva, M. N. & Patton, J. L. Amazonian phylogeography: mtDNA sequence variation in arboreal echimyid rodents (Caviomorpha). *Mol Phylogenet Evol* **2**, 243-255 (1993).
5. Seutin, G., White, B. N. & Boag, P. T. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* **69**, 82-90 (1991).
6. Groves, P. & Shields, G. F. Phylogenetics of the Caprinae based on cytochrome *b* sequence. *MPE* **5**, 467-476 (1996).
7. Howell, N. Evolutionary conservation of protein regions in the protonmotive cytochrome *b* and their possible roles in redox catalysis. *J. Mol. Evol.* **29**, 157-169 (1989).
8. Kocher, T. D. *et al.* Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals : amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6196-6200 (1989).

## REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont aux surveillants permanents de la faune du canton de Vaud, notamment M. Conti (Yverdon) et J.-C. Roch (Les Diablerets), et au Dr P. Boujon (Institut Galli-Valerio, Lausanne).

**Tableau 1:** Liste et nombre d'échantillons analysés (GV: codes des échantillons en provenance de l'Institut Galli-Valerio)

Échantillons	N	Tissu	Origine géographique et autres renseignements
<i>Capreolus capreolus</i> (chevreuil)	2	sang	Froideville (VD), GV0027-15.08.96 Chavannes-de-Bogis (VD), GV0012-30.09.96
<i>Cervus elaphus</i> (cerf)	1	sang	Baye de Montreux (VD), GV 0023-11.10.96
<i>Ibex ibex</i> (bouquetin)	1	foie	Les Diablerets (VD)
<i>Lepus europaeus</i> (lièvre commun)	1	foie, oreille	Method (VD), tir de chasse
<i>Lepus timidus</i> (lièvre variable)	1	foie, muscle	Plans-sur-Bex (VD), tir de chasse
<i>Lynx lynx</i> (lynx)	1	sang	GV 0026-05.11.96
<i>Martes foina</i> (fouine)	1	sang	Orbe (VD), GV 0018-14.08.96
<i>Meles meles</i> (blaireau)	2	sang	Bonvillars (VD), GV0035-14.08.96 Suscévaz (VD), GV0002-12.09.96
<i>Mustela putorius</i> (putois)	1	sang	Paudex (VD), GV0009-02.11.96
<i>Rupicapra rupicapra</i> (chamois)	2	sang	Vallorbe (VD), GV0021-06.11.96 l'Etivaz (VD), GV0027-02.10.96
<i>Sus scrofa</i> (sanglier)	2	sang	Vallorbe (VD), GV0003-28.08.96 St-George (VD), GV0007-04.11.96
<i>Vulpes vulpes</i> (renard)	2	sang	Orbe (VD), GV0017-14.08.96 Champvent (VD), GV0014-19.09.96

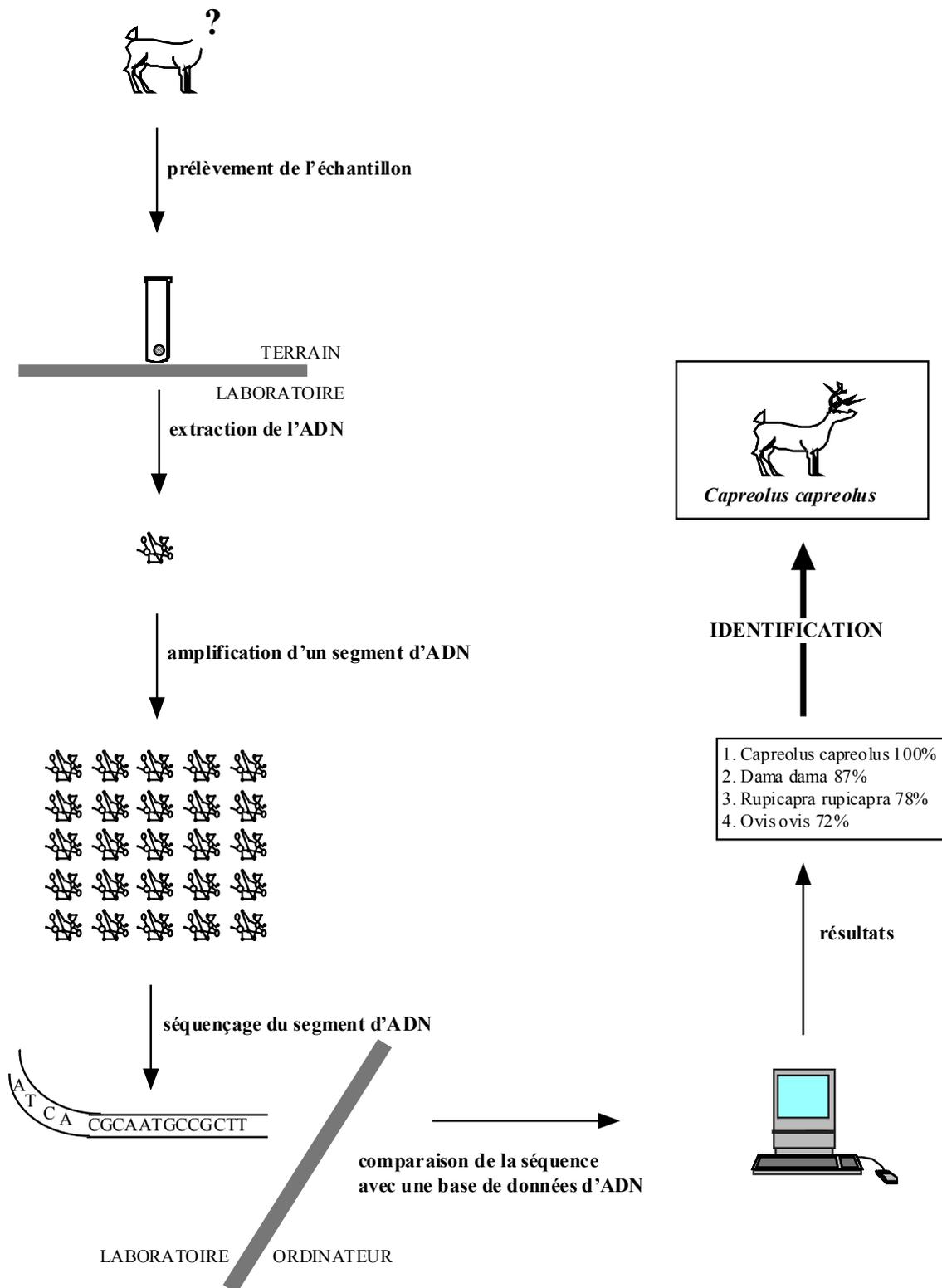


Fig. 1: Schéma des techniques employées pour l'identification d'un échantillon biologique