

UFR Sciences & Techniques Côte Basque

Université de Pau et des Pays de l'Adour

**Licence Biologie des Organismes**



---

**Elaboration de profils  
génétiques chez le loup  
d'arctique (*Canis lupus  
arctos*), et  
développement d'un  
outil génétique pour la  
filiation et le suivi en  
parcs animaliers et  
naturels.**

---

BOILEAU Aurélie

---

Stage effectué du 10 mars au 2 mai 2014 au zoo de Bordeaux-Pessac

sous la direction scientifique de Mme Nathalie KILIAN.

**ZOO DE BORDEAUX  
PESSAC**  
DÉCOUVREZ VOS VOISINS

En collaboration avec :

  
**ANIMACENE**  
ANALYSE GÉNÉTIQUE ANIMALE

« Le présent rapport constitue un exercice pédagogique qui ne peut en aucun cas engager la responsabilité de l'Entreprise ou du Laboratoire d'accueil. »

## Remerciements

Je remercie tout d'abord Raphaël Dupin, directeur du zoo de Bordeaux-Pessac, de m'avoir accueillie dans la structure. Je remercie Nathalie Kilian, responsable animalière du zoo, pour avoir accepté ma demande et surtout pour m'avoir proposé de travailler sur ce sujet de stage enrichissant et assez inédit pour un stage en parc animalier.

Je remercie également l'équipe de soigneurs animaliers, pour m'avoir fait découvrir le métier pas toujours facile de soigneur tout en m'en apprenant un peu plus sur les animaux et sur la vie en zoo, mais aussi l'ensemble des employés pour leur accueil et l'ambiance familiale qu'ils font régner dans ce petit zoo. Et mon stage n'aurait vraiment pas été le même sans la folle petite équipe de stagiaires que nous formions.

Je n'oublie bien évidemment pas de remercier Martine Beaufiles, ainsi qu'Amélie Deyres, de m'avoir accueillie plus d'une fois au laboratoire Animagene et de m'avoir tout de suite incluse dans le projet.

## Sommaire

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1) Introduction – Présentation des structures .....                                                           | 3  |
| 1.1) Le zoo de Bordeaux-Pessac .....                                                                          | 3  |
| 1.2) Le laboratoire Animagene .....                                                                           | 3  |
| 1.3) Une collaboration qui a généré plusieurs problématiques.....                                             | 4  |
| 2) L'espèce étudiée : le loup d'arctique ( <i>Canis lupus arctos</i> ) .....                                  | 4  |
| 2.1) Présentation générale de l'espèce .....                                                                  | 4  |
| 2.2) Présentation des loups d'arctique du zoo .....                                                           | 5  |
| 3) Matériels et méthodes utilisés pour l'élaboration des profils génétiques .....                             | 6  |
| 3.1) Les prélèvements de fèces au zoo .....                                                                   | 6  |
| 3.1.1) Utilisation d'une méthode non-invasive pour 2 séries d'échantillonnage.....                            | 6  |
| 3.1.2) Réalisation des prélèvements .....                                                                     | 7  |
| 3.2) L'analyse génétique au laboratoire .....                                                                 | 8  |
| 3.2.1) Extraction et purification de l'ADN.....                                                               | 8  |
| 3.2.2) Amplification par PCR .....                                                                            | 8  |
| 3.2.3) Séquençage des brins d'ADN et lecture .....                                                            | 9  |
| 4) Profils génétiques obtenus et discussion .....                                                             | 10 |
| 5) Développement d'un outil génétique pour les parcs animaliers et les parcs ou réserves<br>naturel(le)s..... | 11 |
| 5.1) Confection d'un questionnaire en ligne.....                                                              | 11 |
| 5.2) Résultats du questionnaire et discussion .....                                                           | 12 |
| 6) Conclusion générale .....                                                                                  | 14 |
| Références bibliographiques .....                                                                             | 16 |

## 1) Introduction – Présentation des structures

### 1.1) Le zoo de Bordeaux-Pessac

Mon stage s'est déroulé au zoo de Bordeaux-Pessac. Un parc animalier situé dans la ville de Pessac, à une quinzaine de kilomètres de Bordeaux en Gironde, et qui a vu le jour en 1977 grâce à la passion de Jean Ducuing pour les animaux. Le zoo connut un certain succès pendant quelques décennies, jusqu'à la mort malencontreuse de Jean Ducuing en 1999 et après laquelle le zoo déclina petit à petit. 2004 fut l'année du dépôt de bilan pour le parc, mais aussi celle de la reprise par le zoo de la Flèche.

Depuis, le zoo de Bordeaux-Pessac n'a cessé de s'améliorer. Il occupe un site d'environ 5 hectares, accueille pas moins de 100 000 visiteurs par an et surtout, abrite pas loin de 200 animaux issus d'une soixantaine d'espèces différentes. Parmi elles, des espèces rares et/ou menacées car le zoo s'est engagé dans de multiples programmes de reproduction et de conservation d'espèces en danger. Le parc est notamment membre de l'AFdPZ (l'Association Française des Parcs Zoologiques) et de nombreuses naissances au fil des années viennent conforter le rôle du zoo en matière de conservation d'espèces.

Dernièrement, le zoo de Bordeaux-Pessac s'est engagé dans un projet d'agrandissement avec l'écosite du Bourgaillh (le projet SAVE) afin de concevoir un parc de nouvelle génération alliant zoologie et botanique, toujours dans le but de mieux sensibiliser le public à la protection de l'environnement. Et le mois d'avril dernier s'est vu marqué par l'inauguration d'un concept totalement novateur pour un parc zoologique : une partie entièrement dédiée à la paléontologie, qui comprend notamment un enclos dans lequel un groupe de 3 raptors reprend vie grâce à la technologie de la réalité augmentée et via une intelligence artificielle recréant leur comportement.

### 1.2) Le laboratoire Animagene

Cependant, mon stage n'aurait pas été complet sans la présence du laboratoire Animagene. Ce laboratoire a été créé en 2011 et est un département du laboratoire d'hématologie médico-légale de Bordeaux qui réalise des analyses génétiques dans un cadre judiciaire depuis 1996. Le laboratoire Animagene, quant à lui, s'est spécialisé dans l'analyse d'empreintes génétiques à partir de l'ADN animal et plus précisément dans l'analyse du génome du chien (*Canis lupus familiaris*). En effet il propose 2 types d'analyses :

- Le programme PediGENE, qui permet de tester les filiations canines grâce à des prélèvements buccaux, et destiné aux chiens de race pouvant être inscrits au Livre des Origines Français (L.O.F.).
- Le programme HyGENE, qui permet de générer des profils génétiques à partir de déjections canines afin de pouvoir, peut-être, être utilisé par les mairies pour sanctionner les propriétaires de chiens qui ne ramasseraient pas les déjections dans la rue (avec des démarches administratives encore en cours).

### 1.3) Une collaboration qui a généré plusieurs problématiques

Le laboratoire a donc mis en place ces 2 programmes (PediGENE et HyGENE) afin de tester le génome du chien, ce qui donne des profils génétiques comme on peut le voir en **annexe 1**.

Il a souhaité prendre contact avec le zoo de Bordeaux-Pessac afin de tenter de répondre à une première problématique liée à la proximité génétique entre le chien et le loup. En effet, le test actuellement réalisé chez le chien est-il adaptable à une autre espèce de canidés tels que le loup ? Autrement dit, les marqueurs microsatellites testés actuellement par le laboratoire pour analyser le génome du chien seraient-ils les mêmes pour pouvoir analyser le génome du loup ?

Cette première interrogation en a suscité une autre de la part du zoo, mais également partagé par le laboratoire : les méthodes actuellement employées par le laboratoire pour analyser le génome canin pourraient-elles être adaptables à d'autres familles d'espèces (félidés, primates, oiseaux...) ? Ceci afin de répondre à d'éventuels soucis de filiation ou de suivi d'individus que peuvent rencontrer les parcs animaliers et les parcs ou réserves naturel(le)s. Certes, l'analyse génétique animale ainsi que la filiation ne sont pas des notions nouvelles, mais elles sont surtout omniprésentes et réglementées chez les espèces d'élevage. Or, les parcs animaliers et les parcs naturels ayant un rôle de plus en plus important en matière de conservation d'espèces, il est donc important de surveiller les filiations afin d'éviter des soucis de consanguinité, de maintenir le maximum de diversité génétique sur le long terme grâce à la gestion des accouplements ou encore de surveiller le suivi de population en liberté ou semi-liberté.

Afin de pouvoir répondre à tout cela, j'ai construit mon stage et donc mon rapport en 2 parties. La première partie consistera en l'élaboration des profils génétiques des loups du zoo, de manière à répondre à la toute première problématique. La deuxième partie, quant à elle, portera essentiellement sur l'éventuel développement de cet outil génétique en fonction des besoins et des attentes des parcs sur le sujet, grâce à l'aide d'un questionnaire.

## 2) L'espèce étudiée : le loup d'arctique (*Canis lupus arctos*)

### 2.1) Présentation générale de l'espèce

Le choix de l'espèce étudiée s'est porté sur le loup d'arctique car c'est la seule espèce canine présente au zoo de Bordeaux-Pessac qui pouvait permettre de répondre à la première problématique. En réalité, le loup d'arctique est plus exactement une sous-espèce de l'espèce *Canis lupus*, tout comme l'est le chien domestique (*Canis lupus familiaris*) ce qui induit une proximité phylogénétique plus qu'intéressante pour les analyses qui vont suivre. De 1982 à 2004, il a été considéré comme espèce vulnérable selon la liste rouge de l'IUCN, mais à présent il occupe le statut de préoccupation mineure et n'est donc pas une espèce en danger d'extinction.

Sur le plan morphologique, le loup d'arctique est facilement reconnaissable grâce à sa fourrure blanche, qui est un excellent moyen de camouflage pour le type d'habitat qu'il occupe à savoir le nord du Canada, l'Alaska et le Groenland. En occupant ce type d'habitat comportant un climat subpolaire à polaire, le loup d'arctique s'est parfaitement adapté à des températures extrêmement froides. En effet, c'est l'un des loups possédant les extrémités (oreilles, pattes) les plus petites afin de limiter les déperditions de chaleur au niveau de ces zones là et de concentrer cette dernière au niveau des organes vitaux. Son épaisse fourrure blanche est également un très

bon moyen de lutter contre le froid polaire. Une autre adaptation liée à l'occupation de ce type d'habitat est la capacité du loup d'arctique à jeûner de 10 à 20 jours maximum afin de pallier au manque de proies fréquent en zone polaire.

Comme tous les loups, les loups d'arctique vivent également en meute. Un mode de vie social souvent étudié de par sa hiérarchisation complexe et la communication variée qu'elle peut engendrer entre les membres. C'est le cas de L. David Mech (2000) qui, suite à de nombreuses observations sur le sujet, rassemble dans son article les différents rôles et statuts que l'on peut rencontrer au sein d'une meute de loups. On peut notamment noter l'importance du couple dominant qui règne sur l'ensemble de la meute, car il est en règle générale le seul à pouvoir se reproduire. Cette affirmation est d'autant plus vraie chez le loup d'arctique, car c'est une manière de réguler les naissances afin d'éviter la surpopulation de la meute dans un habitat où les proies ne sont pas forcément abondantes. Néanmoins chez d'autres espèces de loups, le couple dominant n'a pas toujours l'exclusivité de la reproduction car des cas de différentes femelles gestantes au sein d'une même meute ont déjà été observés, comme l'explique justement L. David Mech (2000).

Une louve peut donner naissance à 2 ou 3 petits par portée, après 2 mois de gestation, et les naissances ont généralement lieu vers mai/juin afin de ne pas confronter trop tôt les petits au climat trop rude de l'hiver. Le loup d'arctique est d'ailleurs la seule sous-espèce à avoir de petites portées, par rapport à d'autres sous-espèces de loups, pour la même raison citée ci-dessus à savoir le manque fréquent de proies dans le type d'habitat occupé. Néanmoins, d'après Daniel R. Stahler *et al.* (2013), plusieurs autres facteurs peuvent influencer la reproduction chez les loups que ce soit concernant la louve en elle-même ou bien le fait de vivre en meute. Comme le montre les **figures 1, 2 et 3**, une portée de jeunes louveteaux aura plus de chances de survivre si la mère n'est pas trop âgée et qu'elle possède un poids correct (pas moins de 40 kg environ), mais aussi si la meute possède plusieurs membres qui pourront s'occuper des petits.

## 2.2) Présentation des loups d'arctique du zoo

Au zoo de Bordeaux-Pessac, les loups d'arctique sont au nombre de 3. Auparavant, la meute comportait un quatrième membre malheureusement décédé à ce jour car les loups du zoo commencent à avoir un âge assez avancé.

Tout d'abord, nous avons Amarok. Il est le mâle dominant de la meute initiale. Il est né en captivité en 2000 au Canada et est donc âgé maintenant de 14 ans.



Figure 4. Amarok





Figure 5. Nootka

Ensuite nous avons Nootka. Elle est la femelle dominante de la meute initiale, présente dans le même enclos qu'Amarok et forme donc avec ce dernier le couple dominant. Elle est elle aussi née en captivité en 2000 au Canada et est donc elle aussi âgée de 14 ans. Signe de cette âge avancé pour un loup, elle souffre actuellement d'arthrose au niveau des pattes antérieures, ce qui la fait boiter et lui donne une démarche assez reconnaissable par rapport à celle d'Amarok.

Enfin, nous avons également Squaw. C'est une femelle qui, contrairement aux 2 autres loups, a un statut de dominée. Tout comme ses 2 congénères, elle est née en captivité en 2000 au Canada et elle est d'ailleurs sœur avec Nootka. Avant elle occupait le même enclos qu'Amarok et Nootka, mais après diverses bagarres entre dominants et dominée (dont on peut encore voir les marques sur le corps de Squaw), elle occupe à présent un enclos isolé où elle peut mener une retraite plus paisible.



Figure 6. Squaw

Comme je l'ai dit précédemment, tous les 3 sont nés à la même période et au même endroit. A vrai dire ils ont également suivi le même parcours car, du Canada ils sont passés au zoo de Vincennes le temps de quelques mois, pour ensuite se retrouver au zoo de la Flèche en mars 2001 et être finalement au zoo de Bordeaux-Pessac depuis 2010. Leur présence donne d'ailleurs lieu à une animation, que j'ai pu moi-même animer durant mon stage, et qui s'appelle le goûter des loups (tout comme il y a également le goûter des pandas roux, le goûter des guépards et le goûter des loutres). En fait durant ce genre d'animation, le public assiste au nourrissage des animaux et le soigneur en profite pour mieux faire connaître l'espèce auprès du public. D'ailleurs concernant leur alimentation, ils sont nourris une fois par jour avec un repas souvent constitué d'un poulet entier par individu, mais contrairement aux autres pensionnaires du zoo ils ont la particularité de jeûner au moins un jour dans la semaine pour respecter justement leur capacité naturelle à pouvoir jeûner.

### 3) Matériels et méthodes utilisés pour l'élaboration des profils génétiques

#### 3.1) Les prélèvements de fèces au zoo

##### 3.1.1) Utilisation d'une méthode non-invasive pour 2 séries d'échantillonnage

Les échantillons, destinés à l'analyse en laboratoire, ont été faits à partir de prélèvements de fèces retrouvés dans l'enclos d'Amarok et Nootka ainsi que dans celui de Squaw. Le laboratoire pouvant réaliser des analyses sur différents types de prélèvements contenant de l'ADN (sang, cellules buccales, poils avec bulbe et fèces), le choix s'est porté sur les types de prélèvements les moins contraignants lorsqu'il s'agit d'animaux sauvages, à savoir les poils et les fèces. On peut d'ailleurs fréquemment retrouver ce type de prélèvement dans les publications récentes qui traitent d'analyses génétiques sur des populations d'animaux sauvages,

sous l'abréviation NGS pour Noninvasive Genetic Sampling (ou littéralement « échantillonnage génétique non-invasif »). Dès 1999, Pierre Tarbelet *et al.* en font une description dans leur publication en présentant notamment les intérêts que ce type d'échantillonnage peut apporter. En effet, le NGS est souvent privilégié de nos jours car il permet de récolter de l'ADN d'animaux sauvages à partir d'éléments facilement récoltables, tels que les poils, les plumes ou les fèces par exemple, sans qu'il y ait forcément intervention direct sur l'animal en question comme ça pourrait être le cas pour une prise de sang. Les anesthésies n'étant pas des interventions anodines pour l'organisme de l'animal, il est donc préférable de les limiter au maximum. La présence de poils, pouvant être perdus par les loups dans leurs enclos, ayant été malheureusement trop faible je n'ai pu faire finalement que des prélèvements sur fèces. D'ailleurs, l'unique utilisation de fèces comme NGS pour réaliser des analyses génétiques chez le loup a déjà pu être expérimenté. Notamment par Jennifer L. Stenglein *et al.* (2011) qui a tenté de déterminer la taille de plusieurs meutes, ainsi que les liens de parenté entre leurs membres, via la récolte de déjections sur des sites bien précis.

Néanmoins, l'un des inconvénients de ce type de prélèvements c'est que l'on ne sait pas forcément quelle déjection a été faite par quel individu. Ici, c'est le cas dans l'enclos d'Amarok et Nootka, mais à l'inverse l'isolement de Squaw va pouvoir régler ce problème. Il a donc été convenu avec madame Kilian d'en profiter pour faire 2 séries d'échantillons. Chaque série comportera 3 échantillons, dans l'espoir d'avoir à chaque fois les profils génétiques des 3 loups. La première série d'échantillons consistera à aller faire un prélèvement dans l'enclos de Squaw ainsi que 2 prélèvements « à l'aveugle » dans l'enclos d'Amarok et Nootka, afin de déjà voir si dans un premier temps des profils génétiques sont générés. La deuxième série quant à elle consistera à aller faire à nouveau un prélèvement chez Squaw, puis à nouveaux 2 prélèvements chez Amarok et Nootka, mais en ayant préalablement mis un colorant alimentaire dans la nourriture de l'un des 2 afin de pouvoir ensuite identifier la déjection. Si la première série d'échantillons permettra de voir d'abord si des profils sont générés, la deuxième permettra de voir si les profils reviennent à nouveau et de confirmer du coup la fiabilité du test et des analyses.

### 3.1.2) Réalisation des prélèvements

Grâce aux soigneurs, qui m'ont en appris un peu plus sur l'alimentation et la digestion chez le loup, j'ai pu établir une marche à suivre concernant la récolte des échantillons. En effet si à J0 on nourrit les loups, ce qu'ils auront mangé se retrouvera sous forme de fèces le lendemain et on sera assuré de trouver dans l'enclos des déjections assez fraîches pour pouvoir réaliser les prélèvements. Petit plus pour la deuxième série d'échantillon : afin de pouvoir identifier au moins une déjection dans l'enclos d'Amarok et Nootka, j'ai utilisé un colorant alimentaire vert. J'en ai pris 10mL que j'ai mélangé à du steak haché, et mon choix s'est porté sur Nootka pour qu'elle en fasse son repas.

Ensuite, pour les 2 séries d'échantillons j'ai procédé de la même manière : à J0 tous les loups ont eu leur repas respectifs et à J+1 j'ai pu réaliser les prélèvements grâce à l'aide de certains soigneurs qui sont allés récupérer les déjections dans les enclos. Pour les prélèvements j'ai utilisé le matériel adéquat que le laboratoire m'avait fourni, à savoir pour chaque échantillon 2 cytobrosses et un tube contenant un tampon de lyse.





Figure 7. Matériel nécessaire pour le prélèvement d'ADN sur fèces, avec cytobrosse à gauche et tube + pochette avec étiquette d'identification à droite

Pour réaliser un échantillon, il suffit de frotter l'extrémité en brosse de chacune des 2 cytobrosses directement contre la déjection. Une fois cela fait, il faut faire tomber les extrémités en brosse dans le tube en poussant avec le pouce contre l'autre extrémité des cytobrosses. Enfin, il ne faut pas oublier d'identifier l'échantillon grâce à l'étiquette.

Le tampon de lyse, contenu dans chacun des tubes où vont se retrouver les 2 extrémités en brosse qui ont été frottées contre les déjections, est en partie constitué d'une protéase qui va permettre de commencer le travail fait en laboratoire en dénaturant les différents éléments que peuvent contenir les matières fécales. Une première étape qui a pour but de commencer à séparer les molécules d'ADN du reste. Les échantillons sont donc au nombre total de 6, récapitulés dans le **tableau 1**.

### 3.2) L'analyse génétique au laboratoire

#### 3.2.1) Extraction et purification de l'ADN

Une fois les prélèvements faits au zoo, je les ai apportés au laboratoire Animagene et j'ai pu participer à quelques manipulations avec l'aide de la technicienne du laboratoire.

L'une des toutes premières étapes est l'extraction de l'ADN. Comme dit dans la partie précédente, le tampon de lyse présent dans les tubes utilisés au zoo a permis de déjà commencer cette étape. Pour la finaliser, j'ai placé les tubes à 56°C pendant 15 minutes dans un appareil à thermolyse qui va accentuer l'action du tampon de lyse grâce à la chaleur. Une fois les tubes récupérés, j'ai également récupéré les petites brosses ainsi que le liquide restant au fond des tubes pour les placer dans des microtubes avant de procéder à une étape de centrifugation. S'en est suivie ensuite l'étape de purification, pour laquelle j'ai d'abord récupéré tout l'extrait obtenu après centrifugation afin de le placer dans d'autres microtubes. Puis on a utilisé un kit de purification et le tout a été placé dans une machine qui s'est chargée de purifier l'ADN contenu dans l'extrait.

#### 3.2.2) Amplification par PCR

L'étape qui suit la purification de la molécule d'ADN est l'amplification de cette dernière par la technique de la PCR. Durant cette étape, on utilise plusieurs cycles utilisant différentes températures et qui vont permettre d'amplifier la quantité d'ADN initialement présente dans l'extrait. Mais cela ne peut pas se faire si on n'ajoute pas 2 éléments essentiels : un mélange d'amorces et la TAQ polymérase.

Pour générer les profils génétiques à partir du génome des loups récoltés, on va tester ce dernier sur différents marqueurs microsatellites. Ces derniers permettent en effet d'identifier un individu car les marqueurs microsatellites diffèrent pour chacun et représentent donc

l’empreinte génétique propre à un individu, mais ils sont aussi utiles pour connaître la diversité génétique au sein d’une population comme l’indiquent Philippe Jarne et Pierre J. L. Lagoda (1996). Ici, les marqueurs microsatellites testés sont ceux habituellement testés sur les déjections de chiens dans le cadre du programme HyGENE élaboré par le laboratoire, et ils sont au nombre de 12. Il faut donc utiliser le mélange d’amorces (aussi appelé « Primer Mix ») qui correspond à ces 12 marqueurs microsatellites et qui va permettre la synthèse de nouveaux brins d’ADN lors de la PCR. Mais la synthèse de nouveaux brins nécessite également la présence d’une TAQ polymérase, une ADN polymérase régulièrement utilisée lors des PCR. Elle va permettre de synthétiser les nouveaux brins d’ADN une fois l’amorce accrochée au marqueur microsatellite qui lui correspond.

La PCR se déroule en 3 étapes majeures : une dénaturation qui va faire passer l’ADN double brins de l’extrait en simple brin, plusieurs cycles où élongation et dénaturation vont se succéder afin de synthétiser de nouveaux brins d’ADN à partir de brins initiaux, puis une élongation finale pour avoir à nouveau des molécules d’ADN double brins. K. Mullis *et al.* (1986) ont fait une description et schématisé ces différentes étapes, illustrées ici dans la **figure 8**.

Pour chaque extrait il faut 6µL de mélange d’amorces et 7,5µL de TAQ polymérase. Le tout est mis dans des puits, contenus sur une plaque, puis le programme et les températures utilisés dans le cadre de notre étude sont présentés dans le tableau ci-dessous :

| Dénaturation                | 30 cycles    |                  |              | Elongation finale |
|-----------------------------|--------------|------------------|--------------|-------------------|
| <b>95°C</b><br><b>5 min</b> | 95°C<br>30 s | 60°C<br>1 min 30 | 72°C<br>30 s | 60°C<br>30 min    |

### 3.2.3) Séquençage des brins d’ADN et lecture

Après l’amplification, les amplifiats correspondant à chaque échantillon sont récupérés pour être placés dans une autre plaque de puits. Ils vont subir une dernière dénaturation car le séquençage nécessite d’avoir l’ADN en simple brin. Pour cela il faut ajouter 14,7µL de formamide qui va permettre à la molécule de rester justement sous cette forme de simple brin, et pour la lecture du séquençage par le séquenceur il est nécessaire d’ajouter également un « ladder » (spécifique au kit d’Animagene) et un standard de taille. Ils vont respectivement permettre la détection et l’identification par fluorescence des nucléotides, ainsi que connaître la taille des piques qu’on obtiendra en résultat. Pour cela, il faut ajouter 2µL de ladder et 0,3µL du standard de taille, ou aussi appelé Genscan.

Le séquençage est réalisé par un séquenceur capillaire de la marque Applied Biosystems. Les capillaires vont permettre de réaliser la séparation des nucléotides par électrophorèse. Chacun des nucléotides (adénine, guanine, thymine et cytosine) est marqué par une couleur grâce au ladder, ce qui va permettre au séquenceur de pouvoir les identifier par fluorescence lorsqu’ils vont migrer dans le capillaire. La lecture se fait ensuite grâce au logiciel GeneMapper.

## 4) Profils génétiques obtenus et discussion

Les 6 échantillons ont donc donné 6 profils génétiques. Je les ai mis en figure dans le corps du rapport, mais pour des soucis de lisibilité je les ai mis en taille réelle en annexe. Comme il est indiqué dans le tableau ci-dessous, les **figures 9, 10 et 11** (ou **annexes 2, 3 et 4**) correspondent à la première série d'échantillons et les **figures 12, 13 et 14** (ou **annexes 5, 6 et 7**) correspondent à la deuxième série d'échantillons.

| 1 <sup>ère</sup> série d'échantillons                                                                                                                                                                  | 2 <sup>ème</sup> série d'échantillons                                                                                                                                                                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Figure 9 et 10 (ou Annexes 2 et 3) : profils n°22 et 23 « Amarok ou Nootka »</b></li><li>• <b>Figure 11 (ou Annexe 4) : profil n°21 « Squaw »</b></li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Figure 12 (ou Annexe 5) : profil n°25 « Nootka »</li><li>• Figure 13 (ou Annexe 6) : profil n°26 « Amarok ou Nootka »</li><li>• Figure 14 (ou Annexe 7) : profil n°24 « Squaw »</li></ul> |

Pour chacun des profils, on peut voir dans les encadrés en gris les 12 marqueurs microsatellites qui ont été testés. Entre autre 6 microsatellites de type FH, 5 microsatellites de type PEZ mais également le gène de l'amélogénine qui va permettre de déterminer le sexe de l'individu (pour un mâle le Y va apparaître alors que pour une femelle rien n'apparaîtra). Les lettres, qui apparaissent en dessous des pics, correspondent à un allèle et les chiffres indiqués correspondent à la longueur de ce dernier. On peut donc voir si l'individu est hétérozygote ou homozygote pour un allèle.

Est-ce que des profils génétiques sont générés ? Pour les 2 séries d'échantillons, on peut voir que des profils apparaissent. Certains allèles semblent bien identifiés et on distingue parfaitement les pics qui leur correspondent. Néanmoins on peut également voir que dans plusieurs cas, les pics sont peu élevés, voir ne se distinguent pas du bruit de fond. Comme par exemple l'allèle Y du profil n°21 de Squaw, ou encore certains allèles non identifiés marqués d'un « ? » au lieu d'une lettre. Certaines amorces semblent donc ne pas avoir complètement bien fonctionné. Là où cela paraît évident, c'est sur les profils n°21 qui correspond à celui de Squaw, ainsi que sur le profil n°25 qui correspond à celui de Nootka. En effet sur ces 2 profils, même si les pics sont de petite taille, des Y semblent apparaître alors qu'il s'agit de 2 profils génétiques de femelles. Signe d'un éventuel manque de fidélité entre l'amorce utilisée et l'ADN testé.

Est-ce que des profils génétiques sont identiques ? L'idée de réaliser 2 séries d'échantillons était de voir si les mêmes profils génétiques seraient apparus afin de confirmer, ou non, la fiabilité et la fidélité des amorces sur le génome du loup comme c'est déjà le cas sur le génome du chien. Les profils clairement identifiés pour les 2 séries d'échantillons, et pouvant répondre à cette question, sont ceux de Squaw à savoir les profils n°21 et 24. Malheureusement sur le n°21, très peu de pics apparaissent contrairement au n°24. Ce problème peut venir de l'échantillon, tout comme du test génétique en lui-même. Mais sur les 2 profils on voit tout même une homozygotie commune des allèles A et B. Pour les autres profils, il n'y a pas de ressemblance entre les profils des 2 séries d'échantillons mais plutôt sur les profils d'une même série. Les profils n°22 et 23 sont identiques entre eux mais différents des autres, avec des longueurs d'allèles de mêmes ordres de grandeurs et surtout des pics Y bien marqués, ce qui peut laisser supposer que ces profils correspondent à ceux d'Amarok. Sauf qu'en réalité, après observation plus détaillée de ces profils par les employés du laboratoire, ils se sont finalement rendu compte que ces 2 échantillons avaient été contaminés par des échantillons provenant de

chien et non de loup. Ces 2 résultats sont donc complètement faussés et ne seront pas pris en compte pour la discussion. Quant au profil n°26, il semble semblable à celui de Nootka (n°25) mais avec tout de même quelques différences. Autre détail intéressant lié au lien de parenté entre Nootka et Squaw : si l'on prend leur profil respectif (de préférence le n°24 pour Squaw) on peut voir qu'ils se ressemblent concernant l'homozygotie ou l'hétérozygotie de certains allèles partagés par les 2 louves. Leur lien de parenté arriverait donc à ressortir sur les profils.

Dans l'ensemble, l'avis sur les résultats est plutôt partagé. Les analyses en elles même ne sont pas complètement réfutables car des résultats apparaissent sur les différents profils, avec à certains endroits des piques qui apparaissent, signe que les amorces ont quand même réussi à plus ou moins s'adapter au génome des loups. Mais parmi ces résultats, plusieurs profils comportent des pics non identifiés ou inexistant, voir des pics qui ne devraient pas être présents comme les pics Y chez les femelles. Plusieurs signes qui mettent le doute finalement quant à la fidélité des amorces utilisés vis-à-vis des marqueurs microsatellites qu'on a voulu tester sur l'ADN des loups. Le loup d'arctique et le chien domestique sont 2 sous-espèces de l'espèce *Canis lupus*, ce qui sous-entend une proximité génétique non négligeable. Néanmoins cette proximité ne semble pas assez importante, aux vus des résultats obtenus, pour comporter des marqueurs microsatellites assez similaires qui fidéliseraient le travail des amorces utilisées.

Le test actuellement utilisé par le laboratoire pour analyser le génome du chien n'est pas utilisable dès aujourd'hui pour le génome d'un autre canidé, même s'il appartient également à l'espèce *Canis lupus*. Néanmoins il semblerait que le test utilisé ne soit pas pour autant complètement inutilisable. C'est pour ça qu'on a décidé de lancer une campagne d'échantillonnage auprès de différents parcs à loups, afin que le laboratoire puisse obtenir bien plus d'échantillons à analyser pour améliorer et tenter d'adapter le test au loup. J'ai notamment contacté le parc Alpha du Mercantour et le parc des loups de Chabrières, qui ont accepté de participer à cette campagne, et ai participé à l'élaboration des kits de prélèvements qui ont été envoyé aux 2 parcs vers la fin de mon stage.

## 5) Développement d'un outil génétique pour les parcs animaliers et les parcs ou réserves naturel(le)s

### 5.1) Confection d'un questionnaire en ligne

Le fait d'avoir voulu adapté un test, initialement utilisé pour tester les filiations et élaborer des profils génétiques grâce à l'ADN du chien, à l'ADN du loup a entraîné une autre problématique que les parcs animaliers et naturels sont peut être amenés à rencontrer. L'un des rôles majeurs de ces parcs est leur engagement dans la conservation d'espèces en danger, mais afin de mener à bien ce rôle, il leur est nécessaire de conserver également une certaine diversité génétique au sein des populations afin d'assurer leur pérennité. Si cela semble facilement imaginable pour des populations vivant en liberté dans des parcs ou réserves naturel(le)s, ça l'est moins pour des animaux vivant en captivité en petit groupe dans les parcs zoologiques. C'est pour cela qu'un réseau entre parcs zoologiques s'est formé, afin de créer des échanges d'animaux et de tenter de limiter des risques de consanguinité lors des reproductions. C'est dans ce cadre que l'utilisation de données génétiques précises concernant les animaux peut se révéler plus qu'utiles. Mais, outre les soucis concernant la reproduction, l'élaboration de profils génétiques comme il a été fait avec les loups du zoo peut également avoir son intérêt dans le cadre de suivis de populations et d'individus vivant en liberté. En effet, avec l'utilisation de méthodes d'échantillonnage non-invasives pour la récolte de matériel génétique, il est plus

facile d'envisager des analyses génétiques sur des animaux sauvages et de pouvoir identifier un individu grâce à son profil génétique.

Ce sont tous ces éléments qui laissent penser qu'un outil génétique, au service des parcs animaliers et naturels et fonctionnant sur diverses espèces, pourrait se révéler plus qu'intéressant. Néanmoins il est nécessaire de connaître les besoins, les attentes et l'avis des parcs à ce sujet et c'est pour cela que l'élaboration d'un questionnaire s'est révélée indispensable. Plus précisément, un questionnaire sur internet pour sa facilité d'utilisation et de diffusion. J'ai pu donc participer à son élaboration et ai réalisé sa mise en page ainsi que sa mise en ligne. Ensuite, grâce à l'aide de madame Kilian et de ses contacts, le questionnaire a pu être diffusé par mail à l'ensemble des 70 membres de l'AFdPZ. J'ai également envoyé le questionnaire sur le site des Réserves Naturelles de France afin qu'il soit diffusé aux différentes réserves naturelles.

Les parcs ont donc été interrogés sur l'usage qu'ils pourraient faire, ou qu'ils font déjà, des données génétiques concernant leurs animaux ou les populations suivies. Notre intérêt s'est également porté sur les types d'échantillons qu'ils pensent pouvoir facilement réaliser pour obtenir des données génétiques, ainsi que sur les familles d'espèces dont ils aimeraient avoir ce genre de données. Une dimension commerciale a forcément été abordée. En effet, le laboratoire propose actuellement leurs tests génétiques pour un prix de 40€, avec éventuel renégociation du prix suivant le nombre de tests à réaliser. L'avis des parcs à ce sujet est également intéressant si le développement de cet outil génétique venait à se faire plus régulièrement. Pour voir plus précisément les questions qui ont été posées, le questionnaire est présent en **annexe 8**.

## 5.2) Résultats du questionnaire et discussion

L'avantage d'un questionnaire sur internet (via Google Drive) est que les réponses apparaissent au fur et à mesure sur une feuille Excel. Il est donc facile de suivre l'avancée des réponses données par les parcs interrogés et de se faire une idée des résultats. Malheureusement, malgré le nombre important de parcs interrogés entre les 70 membres de l'AFdPZ et les Réserves Naturelles de France, très peu de réponses ont été finalement obtenues. Seulement 5 parcs animaliers ont répondu en un peu plus d'un mois. D'autres réponses arriveront peut-être après la rédaction de ce rapport et il faut donc interpréter les résultats avec prudence, néanmoins certaines tendances commencent à se détacher.

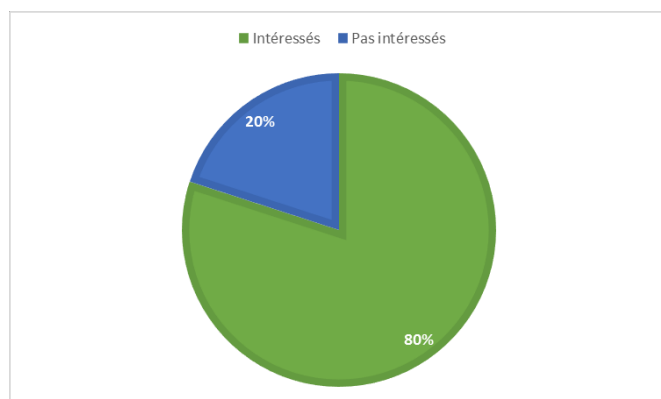


Figure 15. Diagramme circulaire concernant les parcs intéressés, ou non, par les données génétiques de leurs animaux

L'une des premières questions est bien évidemment de savoir si, dans un premier temps, les parcs sont intéressés par le fait d'avoir des données génétiques sur leurs animaux. Malgré le nombre faible de réponses au questionnaire, on peut nettement voir qu'une bonne partie des parcs sont intéressés par cela. L'utilisation de données génétiques éveillerait donc l'intérêt chez les parcs animaliers pour le bien-être de leurs animaux.

Maintenant qu'on sait que certains parcs seraient intéressés par l'obtention de données génétiques sur leurs animaux, il est nécessaire de savoir dans quel but ils auraient besoin de ces données. Le laboratoire Animagene proposant essentiellement des tests de filiation, les données génétiques peuvent également servir dans d'autres domaines comme la maladie, le sexage ou encore le suivi d'individus.

On peut voir ici que l'intérêt des parcs sur les données génétiques se porte surtout sur d'autres utilisations que la filiation et la maladie. Mais ces dernières viennent tout de même après, signe que l'analyse génétique aurait bien diverses utilités concernant les animaux vivant en parcs animaliers.

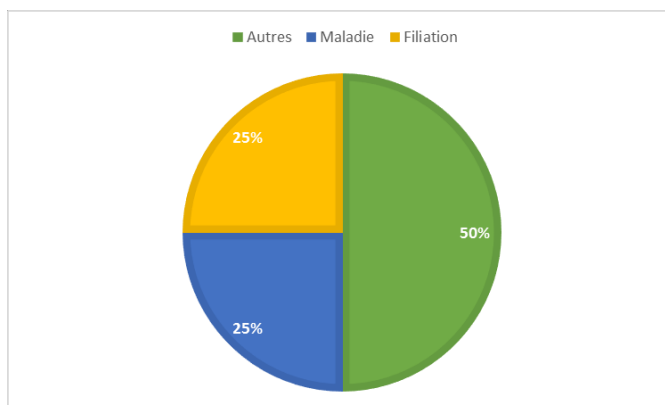


Figure 16. Diagramme circulaire concernant l'utilisation que feraient les parcs des données génétiques

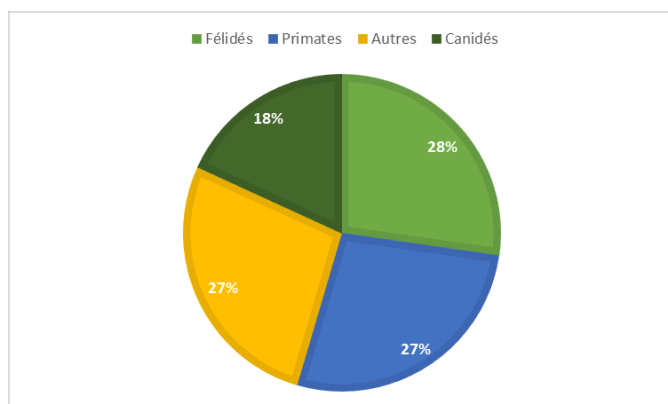


Figure 17. Diagramme circulaire concernant les familles d'espèces dont les parcs aimeraient avoir des données génétiques

Jusqu'à maintenant, le laboratoire s'est surtout intéressé à l'analyse chez le chien, voir les canidés en générale si on prend en compte les analyses présentes dans ce rapport. Mais, vu la diversité des espèces pouvant être présentes dans les parcs animaliers, le laboratoire a besoin de savoir vers quelles espèces il serait intéressant d'adapter leurs tests. Pour cette question, pas de réponse se distingue vraiment des autres. Les parcs sont tout aussi intéressés par les félidés, les primates, les canidés, que pour d'autres familles d'espèces que l'on peut

trouver en parc animalier. En fait à ce niveau-là, il serait peut-être plus utile de demander directement vers quels familles ou types d'animaux les parcs auraient besoins de données génétiques en priorités.



Enfin, l'un des derniers points importants qu'il était nécessaire d'aborder été le type de prélèvement que les parcs pouvaient réaliser, et surtout le degré de facilité pour chacun d'entre eux. Ici, on peut nettement voir que le prélèvement de fèces est jugé comme celui étant le plus facile à réaliser, suivi du prélèvement de poils avec bulbe puis viennent en dernier les prélèvements de sang et de cellules buccales. En effet quand on sait que pour les animaux sauvages, les prélèvements de sang et de cellules buccales nécessitent très souvent une anesthésie peu anodine pour l'organisme de l'animal, on peut facilement comprendre que récolter des fèces ou des poils perdus se révèle bien plus pratique et facile.

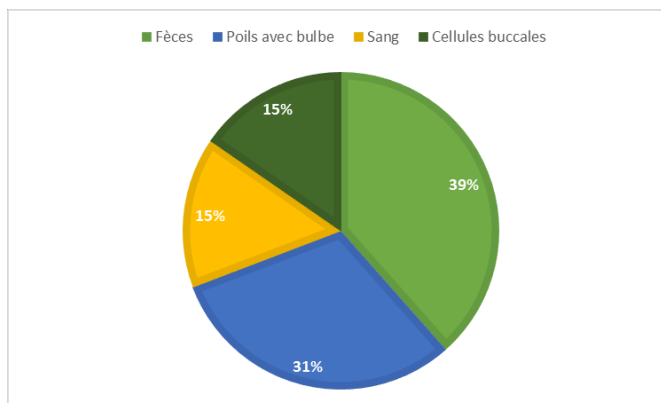


Figure 18. Diagramme circulaire concernant le type de prélèvements que les parcs jugent facile à récolter

Dans l'ensemble, concernant les points importants qu'aborde le questionnaire, les parcs semblent assez intéressés par l'utilisation de données génétiques sur leurs animaux, que ce soit sur la filiation, les maladies ou d'autres informations génétiques. Si la détermination des familles d'espèces reste encore à faire, plusieurs parcs s'entendent sur le fait que les prélèvements de fèces et de cellules buccales sont ceux les plus faciles à réaliser. Il est vrai que le peu de questions obtenues, sur le nombre total de parcs interrogés, est relativement faible et que cela ne représente peut être pas l'avis de l'ensemble des interrogés. Mais parmi les parcs ayant répondu, 2 d'entre eux sont vraiment intéressés pour participer au projet et à sont évolution tout comme le zoo de Bordeaux-Pessac, ce qui donne finalement un aspect plutôt positif pour l'avancé de ce projet de développement d'un outil génétique pour les parcs.

## 6) Conclusion générale

Pour conclure sur l'ensemble de ce qui a été abordé lors de mon stage et de ce rapport, les analyses génétiques sur les loups ont prouvé le rôle important des amorces utilisées en fonction du génome étudié. Même en étudiant 2 sous-espèces proches phylogénétiquement parlant car appartenant à la même espèce, cela n'empêchera pas les régions microsatellites de l'ADN d'être vraiment spécifiques à chacune de ces sous-espèces. Pour pouvoir donc étudier ces génomes, et créer les profils génétiques de différents individus grâce à différents marqueurs microsatellites comme ça a été le cas ici, il est donc primordial d'avoir le bon mélange d'amorces qui sera spécifique à l'ADN analysé. Le développement de tests bien adaptés et spécifiques pour chaque espèce se montre donc ici indispensable si le laboratoire cherche à développer son activité auprès des parcs animaliers et naturels. D'autant que les quelques réponses, obtenus grâce au questionnaire, montre que les parcs seraient intéressés par l'utilisation de données génétiques pour diverses raisons touchant au bien-être et à la pérennité de leurs animaux.

En effet, lorsqu'il s'agit de protection d'espèce en danger d'extinction, les parcs animaliers et naturels se doivent d'éviter des soucis majeurs en termes de reproduction comme celui de la consanguinité. C'est d'autant plus le cas en parc animalier où les

animaux sont en petits groupes dans les enclos. C'est pour cela qu'un réseau s'est formé entre parcs, pour permettre des échanges d'animaux et tenter de conserver une diversité génétique au sein de ces populations d'animaux en captivité. Le suivi de ces animaux se montre donc indispensable et c'est dans ce but là qu'une base de données informatique du nom d'ISIS (International Species Information System) a été créée. Elle permet de rassembler des informations indispensables à connaître sur un animal se trouvant en zoo, tel que son identifiant, son âge, les différents parcs où il a pu être ou encore les identifiants de ses parents (car de nos jours, tous les animaux se trouvant en zoo sont nés en captivité de parents ayant été également en captivité). Comme l'indique Jeffrey P. Cohn (2006) dans sa publication, depuis sa création en 1973, ISIS n'a cessé de se développer pour améliorer sa prestation auprès des parcs animaliers. On pourrait donc facilement imaginer que l'utilisation de données génétiques pourrait se montrer utile dans ce genre de bases de données tel qu'ISIS. En effet, avoir accès par exemple aux profils génétique de plusieurs animaux pourrait permettre un meilleur suivi des filiations au sein des espèces et permettre de voir quels individus seraient les mieux enclins à la reproduction, afin d'obtenir une diversité génétique convenable au sein des populations maintenues en captivité.

Mais, en dehors des soucis de reproduction ou de filiation pour les animaux en captivité, l'utilisation de données génétiques peut également avoir un intérêt non négligeable pour les populations vivant en liberté ou même en semi-liberté. En effet, cet intérêt pourrait se porter cette fois sur du suivi de populations ou d'individus, d'autant plus s'il s'agit d'espèces menacées d'extinction ou d'individus réintroduit en milieu naturel par exemple. Dans ces cas-là, l'identification d'individus via des profils génétiques pourrait se montrer tout aussi utile que d'autres méthodes d'identification, comme le capture-marquage-recapture par exemple. En tout cas, Guillermo Velo-Antón *et al.* (2014) ainsi qu'Emily W. Ruell et Kevin R. Crooks (2010) montrent qu'un suivi de population de diverses espèces en utilisant préférentiellement des données génétiques peut se faire et devient de plus en plus d'actualité. Mais l'utilisation de données génétiques, lorsqu'il s'agit de populations d'animaux sauvages, est d'autant plus pratique et intéressante si l'on utilise des méthodes d'échantillonnage non-invasives. Comme réalisé ici avec les loups du zoo, les méthodes d'échantillonnages non-invasives tels que les prélèvements de fèces ou de poils ont en effet un intérêt pratique plus qu'intéressant quand on cherche à limiter le plus possible les interventions de l'homme, comme les anesthésies, sur des populations ou des individus sauvages.

En utilisant donc les bonnes pratiques d'échantillonnages, ainsi que des tests adaptés aux espèces étudiées, le domaine de la génétique peut avoir un grand intérêt dans le milieu des parcs animaliers et naturels, que ce soit en terme de reproduction ou de suivi afin d'améliorer par exemple la conservation d'espèces menacées.

## Références bibliographiques

Daniel R. Stahler, Daniel R. MacNulty, Robert K. Wayne, Bridgett vonHoldt and Douglas W. Smith, 2013. The adaptive value of morphological, behavioural and life-history traits in reproductive female wolves. *Journal of Animal Ecology* 2013, **82**, 222–234.

Emily W. Ruell and Kevin R. Crooks, 2010. Evaluation of Noninvasive Genetic Sampling Methods for Felid and Canid Populations. Article first published online: 13 dec 2010

Guillermo Velo-Antón, Raquel Godinho, João Carlos Campos, José Carlos Brito, 2014. Should I stay or should I go? Dispersal and population structure in small, isolated desert populations of West African crocodiles. *Plos One* april 2014, **9** (4)

Jeffrey P. Cohn, 2006. New at the Zoo: ZIMS. *BioScience* July 2006, **56** (7)

Jennifer L. Stenglein, Lisette P. Waits, David E. Ausband, Peter Zager, and Curt M. Mack, 2011. Estimating gray wolf pack size and family relationships using noninvasive genetic sampling at rendezvous sites. *Journal of Mammalogy* 2011, **92** (4) : 784-795.

K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich, 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1986 **Volume L1**.

L. David Mech, 2000. Leadership in Wolf, *Canis lupus*, packs. *Canadian Field-Naturalist* 2000, **114** (2) : 259-263.

Philippe Jarne and Pierre J.L. Lagoda, 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *TREE* october 1996, **11** (10)

Pierre Tarbelet, Lisette P. Waits and Gordon Luikart, 1999. Noninvasive genetic sampling : look before you leap. *TREE* august 1999, **14** (8)

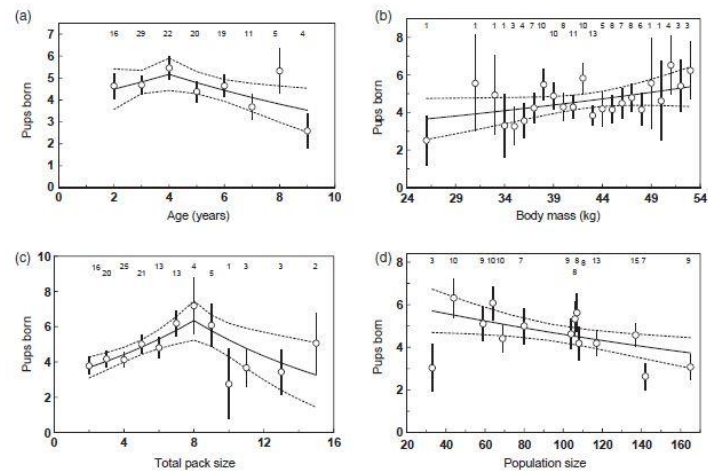


Figure 1. Influence de l'âge et du poids de la louve, ainsi que de la taille de la meute et de la population, sur la naissance de louveteaux d'après Daniel R. Stahler et al. (2013)

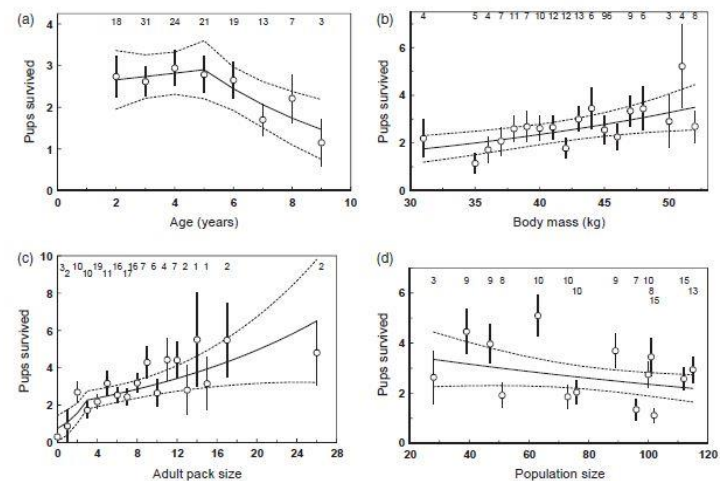


Figure 2. Influence de l'âge et du poids de la louve, ainsi que de la taille de la meute et de la population, sur la survie des louveteaux d'après Daniel R. Stahler et al. (2013)

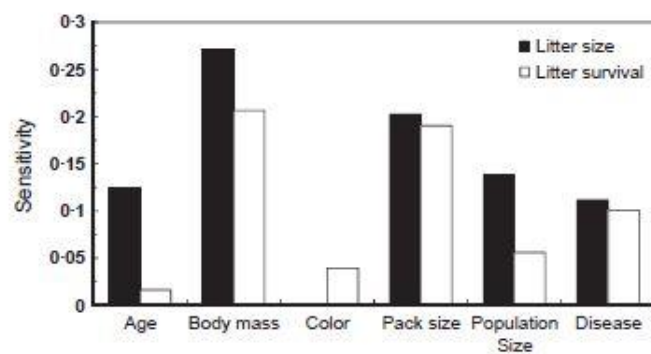


Figure 3. L'impact plus ou moins important (sensitivity) que peut avoir chaque facteur vu précédemment sur la naissance et la survie des louveteaux, d'après Daniel R. Stahler et al. (2013)

| <b>1<sup>ère</sup> série d'échantillons</b>                                                                                | <b>2<sup>ème</sup> série d'échantillons</b>                                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 échantillon « Squaw »</li> <li>• 2 échantillons « Amarok ou Nootka »</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 échantillon « Squaw »</li> <li>• 1 échantillon « Nootka » (coloré)</li> <li>• 1 échantillon « Amarok ou Nootka »</li> </ul> |

*Tableau 1. Récapitulatif des échantillons réalisés*

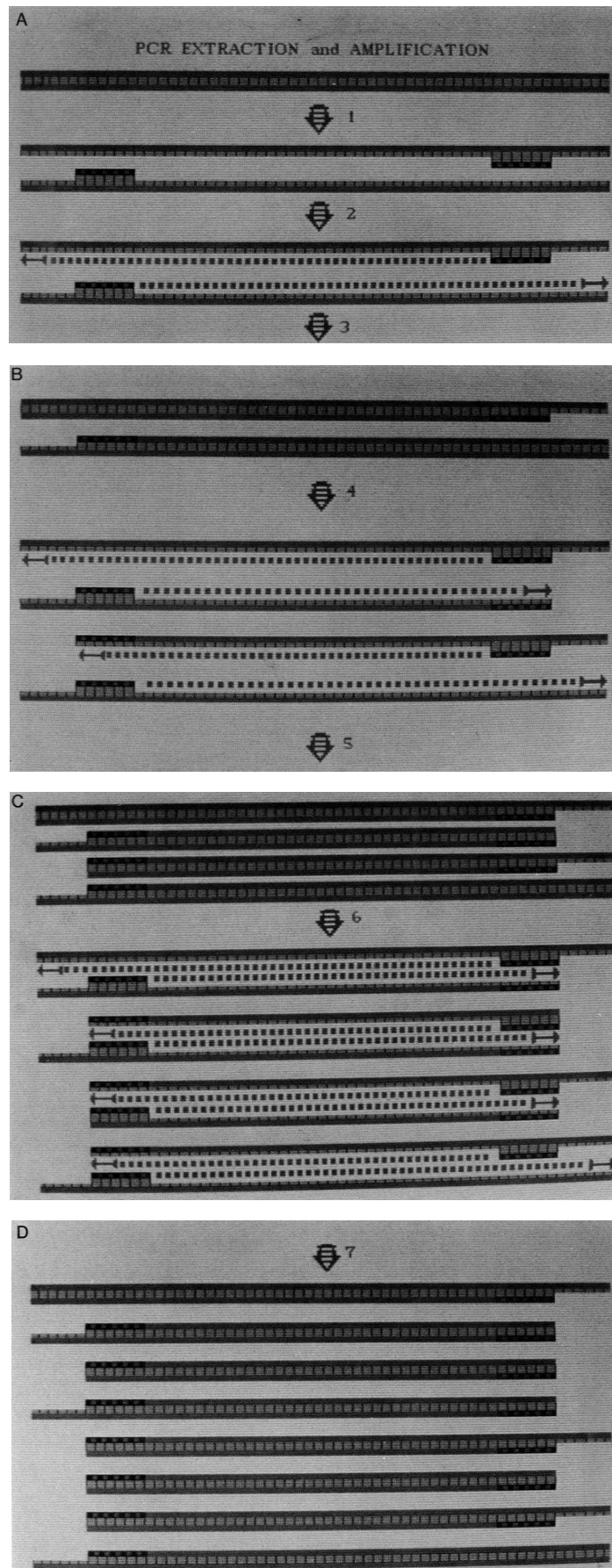


Figure 8. Les différentes étapes d'une PCR, d'après K. Mullis et al. (1986)



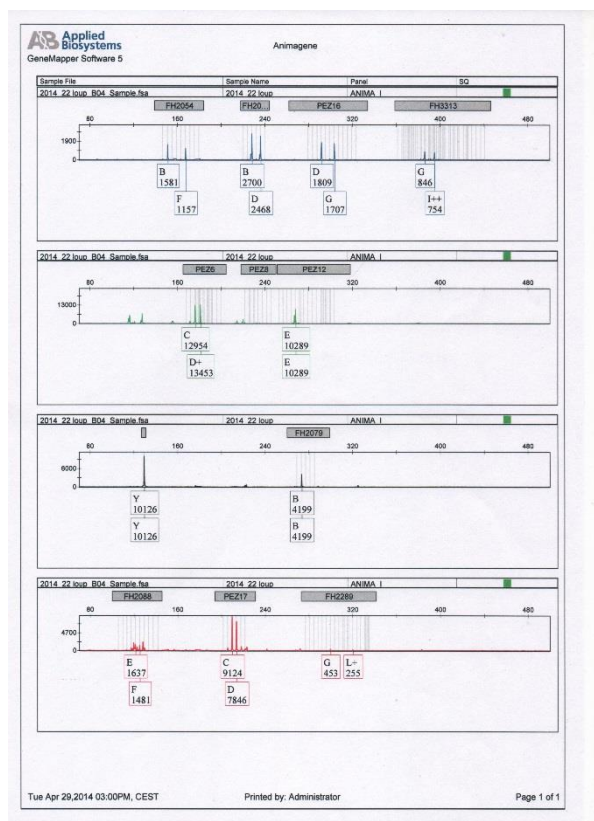


Figure 9. Profil génétique « Amarok ou Nootka »

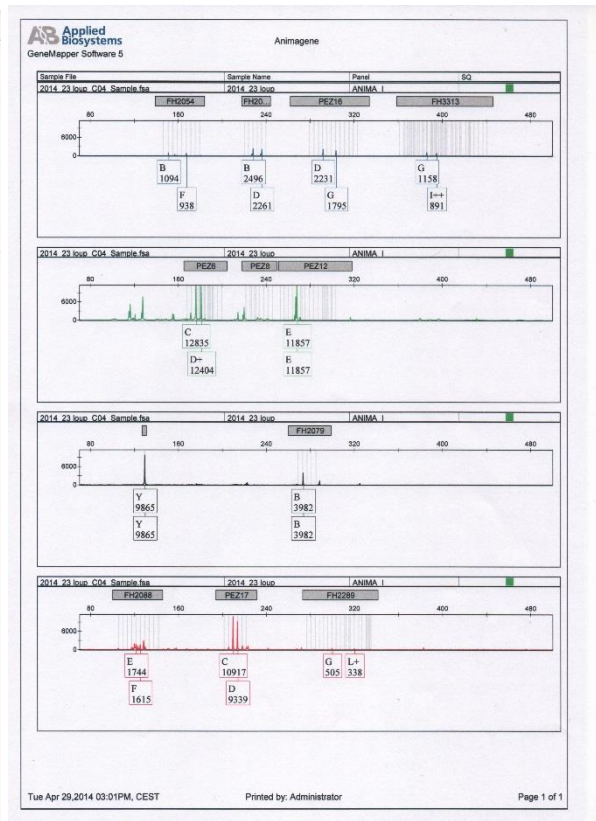


Figure 10. Profil génétique « Amarok ou Nootka »

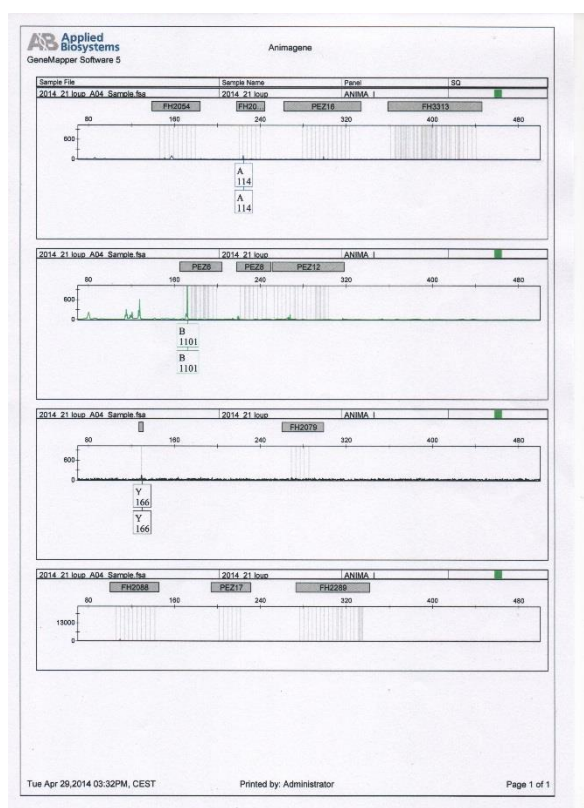


Figure 11. Profil génétique « Squaw »

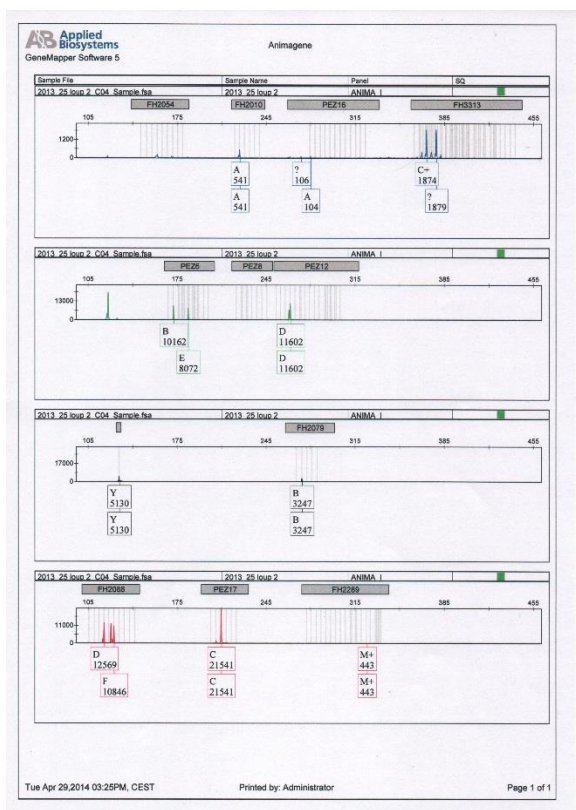


Figure 12. Profil génétique « Nootka »

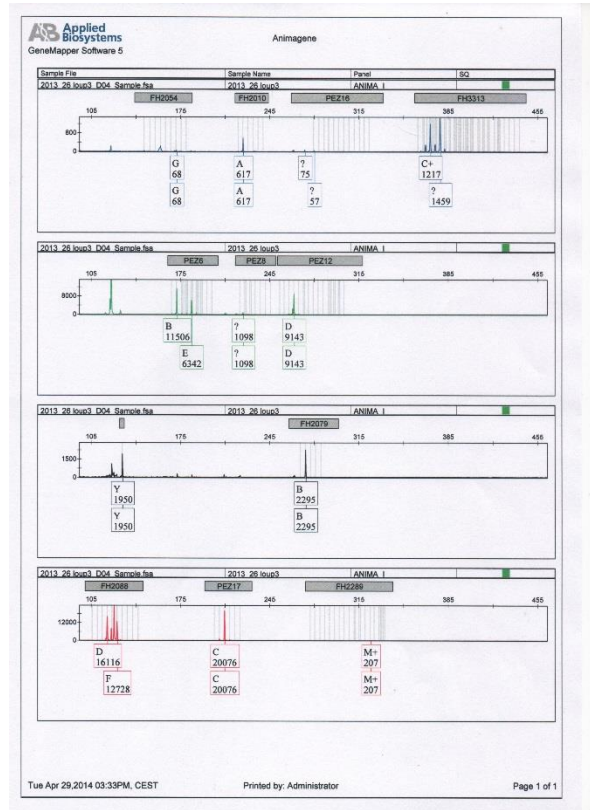


Figure 13. Profil génétique « Amarok ou Nootka »

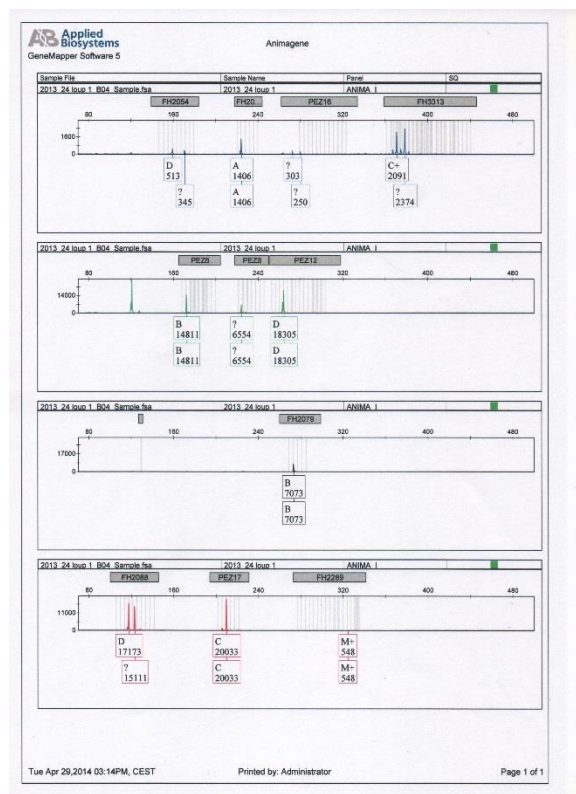


Figure 14. Profil génétique « Squaw »

## Résumé :

La collaboration entre le zoo de Bordeaux-Pessac et le laboratoire Animagene a permis de répondre à plusieurs problématiques posées par les 2 structures. La première fut de savoir si le test génétique, actuellement utilisé par le laboratoire pour analyser le génome du chien, pouvait être adaptable à une autre sous-espèce canine. Les analyses ont donc consisté en l'élaboration des profils génétiques des loups d'arctique du zoo afin de tester le mélange d'amorces qu'utilisent actuellement le laboratoire. Les résultats sont finalement assez mitigés, montrant que le mélange d'amorces est assez fidèle au génome du chien, mais pas complètement inadaptable pour autant au génome du loup. L'utilisation de données génétiques en général par les parcs animaliers et naturels peut, par ailleurs, se montrer très utile afin de pallier à d'éventuels soucis de filiation ou encore de suivi de populations et d'individus. Surtout lorsqu'on sait que ce type de structures participent de plus en plus à la conservation d'espèce menacées d'extinction.

Mots clefs : *Canis lupus*, méthodes d'échantillonnages non-invasives, PCR, séquençage, marqueurs microsatellites, conservation, ISIS

## Summary:

Collaboration between Bordeaux-Pessac Zoo and Animagene laboratory has to answer several issues raised by the two structures. The first was the genetic test, currently used by the laboratory to analyze the genome of the dog, could be adaptable to another canine subspecies. Analysis, therefore, was the development of the genetic profiles of Arctic wolves' zoo to test the mixture of primers currently used by the laboratory. The results are actually quite mitigated, showing that the primer mix is quite faithful to the dog genome, but not completely inadaptable to the wolf genome. The use of genetic data in general by zoos and parks can also be very useful, in order, to overcome possible problems of filiation or monitoring of populations and individuals. Especially when we know that this type of structures involved increasingly in the conservation of endangered species.

Keywords: *Canis lupus*, noninvasive genetic sampling, PCR, sequencing, microsatellites markers, conservation, ISIS