

Arnaud CHARTRAIN

ONCFS
SD Savoie
Le Maillet
73220 Aiton
sd73@oncfs.gouv.fr

Référence : F271

Analyses

Le laboratoire ANTAGENE a réceptionné le 19 novembre 2018 l'échantillon suivant :

Echantillon	N° Antagene	Type prélèvement
P73-18003	607 500	Poils

Le laboratoire ANTAGENE a procédé à l'extraction/purification d'ADN, a évalué la qualité de l'ADN et a réalisé l'amplification et l'analyse de l'ADN mitochondrial (région de contrôle) et de 23 marqueurs génétiques nucléaires (22 marqueurs microsatellites et un marqueur de sexe, l'amélogénine).

Des analyses bioinformatiques et statistiques ont été conduites à partir des profils génétiques obtenus pour déterminer:

- l'espèce et l'origine génétique populationnelle
- le profil individuel de l'animal

Résultats

Les analyses génétiques au niveau de l'ADN mitochondrial ont permis d'obtenir les résultats suivants :

Echantillon	N° Antagene	Qualité des séquences d'ADN	Espèce génétique (haplotype mitochondrial)
P73-18003	607 500	+++	<i>Canis anthus</i> (Loup doré africain)

La séquence d'ADN mitochondrial obtenue est fournie en Annexe A.

Le réseau phylogénétique fourni en Annexe B montre que l'échantillon analysé (607500) se classe parmi les séquences de référence d'ADN de Loup doré africain (*Canis anthus* ou *Canis lupus lupaster*).

L'haplotype mitochondrial correspond à l'espèce *Canis Anthus* (Loup Doré Africain).

La phylogénie du Chacal doré européen et africain n'était pas clairement résolue avant des travaux scientifiques récents (Koepfli et al. 2015) qui séparent clairement les deux espèces suivantes :

- Chacal doré (*Canis aureus*) aussi désigné comme Chacal doré européen
- Loup doré africain (*Canis anthus*) initialement dénommé Chacal doré africain ou également désigné comme une sous-espèce de loup *Canis lupus lupaster*

A noter que l'espèce *Canis anthus* (Loup doré africain) est génétiquement plus proche du loup gris (*Canis lupus lupus*) que du Chacal doré (*Canis aureus*).

Les analyses génétiques au niveau de l'ADN nucléaire permettent d'établir une empreinte génétique individuelle constituée de 22 marqueurs microsatellites et un marqueur de sexe :

Echantillon		P73-18003		607 500			
AMEL	AHT103	AHT111	AHTk211	FH2096	CPH02	FH2088	C09.173
XY	092092	106106	088090	092105	112122	116120	128140
CPH05	FH2004	CFX30371	C22.279	C09.250	FH2161	FH2140	INU030
139141	253297	172172	110130	156168	237245	130135	146146
FH2137	FH2054	C27.442	Dbar1	REN162C04	PEZ17	FH2010	
173173	153157	180198	215227	191199	202206	245245	

L'empreinte génétique de cet échantillon est complète et d'excellente qualité (indice qualité = 1,00). L'individu est un mâle (XY sur le marqueur AMEL).

Sur 10 marqueurs microsatellites, cette empreinte génétique montre 12 allèles spécifiques non observés sur la population de loup en France, ce qui confirme une signature génétique différente du loup de lignée italo-alpine.

Conclusions

Les données obtenues sur l'ADN nucléaire et sur l'ADN mitochondrial à partir de l'échantillon n° P73-18003 (607500) montrent que cet animal ne peut absolument pas être un loup de la lignée italo-alpine (*Canis lupus lupus* W22) et que l'échantillon de poils analysé est issu d'un animal correspondant à un Loup doré africain (*Canis anthus*).

La Tour de Salvagny, le 14 décembre 2018,

Guillaume QUENEY
Docteur en Génétique



Méthodologie

Les étapes des analyses génétiques et statistiques :

- Traitement des échantillons
- Extraction et purification des ADN
- Caractérisation de l'ADN mitochondrial par séquençage de la région de contrôle
- La séquence mitochondriale obtenue est comparée aux séquences de référence dans les bases de données internationales
- Caractérisation de 23 marqueurs nucléaires, soit 22 marqueurs microsatellites et 1 marqueur de sexe
- Lecture et analyse des marqueurs et des séquences d'ADN
- Analyses bioinformatiques et statistiques.

Description du laboratoire ANTAGENE

Le laboratoire dispose d'installations modernes et d'équipements à la pointe de la technologie pour réaliser tout type d'analyses génétiques chez les animaux, avec une forte expertise dans le domaine des marqueurs microsatellites, des marqueurs SNP et de l'ADN mitochondrial.

Le laboratoire est configuré pour analyser les échantillons collectés de façon classique ou de façon non-invasive (ADN trace) afin d'éviter les risques de contamination croisée entre échantillons et de garantir la traçabilité et la qualité des résultats produits.

Les précautions prises :

- Les échantillons sont préparés dans une pièce spéciale.
- L'extraction et purification d'ADN est réalisée en présence de témoins négatifs d'extraction afin de confirmer l'absence de toute contamination lors de la préparation des échantillons et de l'extraction d'ADN.
- Les réactifs (enzymes, amorces d'ADN...) utilisés pour l'amplification des marqueurs génétiques sont préparés dans une zone ultra-propre en surpression accessible par un sas, pour éviter toute contamination ambiante par d'éventuels ADN volatils (pre-PCR).
- Les étapes d'amplification et de migration sur séquenceur automatique d'ADN sont conduites dans une zone en dépression accessible par deux sas et avec un recyclage permanent de l'air ambiant, afin d'éviter la contamination du reste du laboratoire par des ADN amplifiés naturellement présents en grande quantité et très volatils (post-PCR).
- Les données sont pré-interprétées par un logiciel et interprétées par deux analystes de façon indépendante et en aveugle ; la confrontation des deux lectures permet de résoudre les éventuelles données douteuses liés à des artefacts.

Références bibliographiques

Gaubert P, Bloch C, Benyacoub S, Abdelhamid A, Pagani P, Adéyemi C, Djagoun MS, Couloux A, Dufour S (2012)

Reviving the African Wolf *Canis lupus lupaster* in North and West Africa: A Mitochondrial Lineage Ranging More than 6,000 km Wide, PLoS ONE 7(8)

Godinho R, Llaneza L, Blanco JC, Lopes, Álvares F, García EJ, Palacios V, Cortés Y, Tategón J, Ferrand N (2011). Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*, 20, 5154-5166.

Godinho R, López-Bao JV, Castro D, Llaneza L, Lopes S, Silva P, Ferrand N. (2014). Real-time assessment of hybridization between wolves and dogs: combining non-invasive samples with ancestry. *Molecular Ecology Resources*, 15, 317-328.

Koepfli KP, Pollinger J, Godinho R, Robinson J, Lea A, Hendricks S, Schweizer RM, Thalmann O, Silva P, Fan Z, Yurchenko AA, Dobrynin P, Makunin A, Cahill JA, Shapiro B, Alvares F, Brito JC, Geffen E, Leonard JA, Helgen KM, Johnson WE, O'Brien SJ, Van Valkenburgh B, Wayne RK (2015)

Genome-wide Evidence Reveals that African and Eurasian Golden Jackals Are Distinct Species Volume 25, Issue 16, Pages 2158-2165

Pilot M, Branicki W, Jedrzejewski W, Goszczyński J, Jedrzejewska B, Dykyy I, Shkvryya M, Tsingarska E. (2010)

Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Evol Biol.* 2010 Apr 21;10:104

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(2): 464-473.

Thalmann, O., Shapiro, B., Cui, P., et al. (2013). Complete mitochondrial genomes of ancient canids suggest a European origin of domestic dogs. *Science* 342 (6160), 871-874

Urios V, Donat-Torres MP, Ramirez C, Monroy-Vilchis Octavio, Rgribi Idrissi H (2015)

El análisis del genoma mitocondrial del cánido estudiado en Marruecos manifiesta que no es ni lobo (*Canis lupus*) ni chacal euroasiático (*Canis aureus*), *Altoter0*, nº3, 15 de agosto 2015

Vilà C, Amorim IR, Leonard JA, Posada D, Castro-Viejo J, Petrucci-Fonseca F, Crandall KA, Ellegren H, Wayne RK (1999) Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf. *Canis lupus*. *Molecular Ecology*, 8, 2089-2103.

Waters, S., El Harrad, A., El Harrad, K. and Senn, H.V. (2014)

Confirmed presence of the African wolf (*Canis lupus lupaster*) in Bouhachem forest, Northern Morocco

Annexe A

Séquences de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial

Echantillon n° P73-18003 (607500)

```
TCAATCCCCGGTCTTGTAACCAAAAATGGAGAGTAATCGCCCTCCCTAAGACTCAAGGAAG
AAGCTCTTGCTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTTCTTAAACTATTCCCTGACACCCC
CTACATTCATATATTGAATCACCTCTACTGTGCTATGCCAGTATCTCCAAAAATCTTCCTCCCC
TATGTACGTCGTGCATTAATGGCTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATATTATTACATTCTTA
CATAAGACATATTGACTCAATCTCACAGTTCATTGATCTCCAACAGTAACCGAATGCATATCAC
TTAGTCCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCC
TCTTCTCGCTCCGGGCCATACTAACGTGGGGGTTACTATCATGAAACTATACTGGCATCTG
GTTCTACTTCAGGA
```

Annexe B

Réseau phylogénétique des séquences de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial (références GenBank)

Chacal doré européen (*Canis aureus*)

Loup doré africain (*Canis anthus* ou *Canis lupus lupaster*)

Loup gris européen (*Canis lupus lupus*) : nomenclature Pilot et al. (2010)

Loup lignée italo-alpine : W22 ; loups analysés en France (C_lupus_France)

