

A l'attention de

**Christophe DUCHAMP**  
**OFB**

Unité Prédateurs - Animaux déprédateurs  
Direction de la Recherche et de l'Expertise  
5 allée de Bethléem  
ZI de Mayencin  
38000 Gières

**Référence** : Echantillons D2619004

## Analyses

Le laboratoire ANTAGENE a traité un lot d'échantillons dans le cadre du marché public de suivi génétique de la population de loup avec l'ONCFS.

Le présent rapport précise les résultats obtenus pour un échantillon de ce lot :  
**D2619004 (652224) fragment de tissu (dépouille)**

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
- la probabilité d'assignation aux deux populations de référence de loups français de type italo-alpin (*Canis lupus lupus*) et de chien (*Canis lupus familiaris*) ainsi que l'intervalle de confiance de cette probabilité.

## Résultats

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

Echantillon	Qualité des séquences d'ADN	Haplotype mitochondrial (selon la nomenclature Pilot et al. 2010)
D2619004 (652224)	+++	<i>Canis lupus lupus</i> w22 (lignée italo-alpine)

L'haplotype w22 est caractéristique de la population italo-alpine de Loup gris (*Canis lupus lupus*) et est retrouvé de façon spécifique en Italie, en Suisse et en France (Randi et al. 2000, Pilot et al. 2010).

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 :

<b>Echantillon</b>	D2619004 (652224)
--------------------	-------------------

<b>AMEL</b>	<b>AHT103</b>	<b>AHT111</b>	<b>AHTk211</b>	<b>FH2096</b>	<b>CPH02</b>	<b>FH2088</b>	<b>C09.173</b>
XY	098098	100100	086086	092100	120120	096096	124124

<b>CPH05</b>	<b>FH2004</b>	<b>CFX30371</b>	<b>C22.279</b>	<b>C09.250</b>	<b>FH2161</b>	<b>FH2140</b>	<b>INU030</b>
129141	239243	172172	118118	162166	271271	130130	144150

<b>FH2137</b>	<b>FH2054</b>	<b>C27.442</b>	<b>Dbar1</b>	<b>REN162C04</b>	<b>PEZ17</b>	<b>FH2010</b>
157157	145162	184184	226226	199201	194198	253253

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

Les assignations statistiques, conduites à partir des empreintes génétiques, permettent d'obtenir les résultats suivants :

Echantillon	Sexe génétique	Origine génétique	Probabilité d'assignation à la population française de loup
D2619004 (652224)	Mâle	Hybride back-cross (BC)	74,2% [55,4% - 89,4%]

### Conclusions

Les données obtenues sur l'ADN mitochondrial et sur l'ADN nucléaire à partir de l'échantillon **D2619004 (652224)** montrent que cet animal est un hybride de 2<sup>ème</sup> génération (backcross) entre chien et loup, c'est-à-dire qu'un des parents est un hybride croisé avec un loup :

- soit le père est un loup et la mère est un hybride de 1<sup>ère</sup> génération (F1) avec un haplotype mitochondrial w22 et donc issu du croisement d'une louve d'origine italo-alpine et d'un chien
- soit le père est un hybride de 1<sup>ère</sup> génération (F1) et la mère une louve d'origine italo-alpine

La Tour de Salvagny, le 17 janvier 2020,

**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 connues pour les populations de loups en Europe (Pilot et al. 2010)
- Caractérisation de 23 marqueurs nucléaires, soit 22 marqueurs microsatellites et 1 marqueur de sexe, dont 11 marqueurs microsatellites spécifiquement sélectionnés pour la détection de l'hybridation entre le chien et le loup (Godinho et al. 2011, 2014)
- Les marqueurs nucléaires sont amplifiés et analysés un minimum de 4 fois de façon indépendante pour compenser les phénomènes de pertes alléliques ou de faux allèles inhérents à l'analyse d'ADN dégradé (extrait à partir de fèces)
- Lecture et analyse des marqueurs et des séquences d'ADN
- Analyses statistiques et calcul des probabilités d'assignation

Les profils génétiques obtenus à partir des 22 marqueurs microsatellites sont analysés et comparés à deux populations de référence : des loups appartenant à la population française et des chiens appartenant à une grande variété de races.

La totalité des individus a été analysée statistiquement avec le logiciel d'inférence bayésienne STRUCTURE (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003) en utilisant le modèle avec hybridation et fréquences alléliques corrélées. Les analyses (burn-in 100 000, longueur de chaîne de Monte-Carlo 500 000) ont été répétées 20 fois chacune et un résultat consensus a été obtenu grâce au logiciel CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg 2007).

## 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.

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

Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567-1587.

Godinho R, Llaneza L, Blanco JC, Lopes, Álvares F, García EJ, Palacios V, Cortés Y, Talegón 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.

Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23, 1801-6.

Pilot M, Branicki W, Jedrzejewski W, Goszczyński J, Jedrzejewska B, Dykyy I, Shkvyrya M, Tsingarska E. (2010) Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Evol Biol.* 2010 Apr 21;10:104

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155, 945-959.

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

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.