

RAPPORT D'EXPERTISE
N°CD/2019/023

Objet : Analyse génétique sur dépouille de loup de couleur sombre, pelage bringé.	Demandeur : M. Le Préfet de département Alpes Maritimes S/c le Directeur régional ONCFS
Date : 20/11/2019	Analyse réalisée par : Christophe DUCHAMP / ONCFS Unité PAD

ECHANTILLONS REÇUS :

Dans le cadre du protocole de tir dérogatoire au statut d'espèce protégé, un loup femelle adulte est prélevé par un louvetier lors d'un tir de défense réglementaire auprès de son troupeau le 13/06/2019 sur la commune de St Vallier-de-Thiery (06) lieu-dit « La Malle ». Une photo de l'animal mort transmise au service départemental ONCFS révèle un phénotype atypique, d'un pelage sombre bringé. Comme pour l'ensemble des animaux morts et selon la procédure Réseau ONCFS de suivi biomoléculaire des loups, un échantillon de tissu codé D0619010 est prélevé puis soumis à analyse génétique dans le cadre du marché souscrit auprès du laboratoire prestataire ANTAGENE.

TYPE D'ANALYSE EFFECTUEE :

Analyse génétique permettant l'identification de l'espèce et de la lignée maternelle au travers du séquençage de l'ADN mitochondrial, et génotypage individuel sur la base de 22 marqueurs microsatellites calibrés pour distinguer des profils individuels différents et la probabilité d'hybridation chien-loup de 1ère génération ou éventuels rétrocroisements. Analyse de la photo de l'animal mort transmise au service départemental ONCFS pour mise en relation du phénotype en regard du résultat génétique obtenu.

RESULTATS

Confirmation de l'espèce et la lignée génétique

Le rapport d'analyse réalisé par le laboratoire ANTAGENE (ci-joint) confirme l'identification du cadavre sur la base de l'échantillon de tissu D0619010 comme étant un Loup **Canis lupus lupus de lignée Italo-Alpine w22** (nomenclature de Pilot et al, 2010), identique à celle habituellement observée en France depuis le retour de l'espèce.

Empreintes génétiques individuelles

Le génotypage individuel, de très bonne qualité, identifie un individu jusqu'ici non identifié par les suivis moléculaires et non référencé dans nos bases de données. Après assignation statistique de son profil ADN aux populations de références de loup et de chien, celui-ci présente un profil LOUP, avec une probabilité de 96,9% (intervalle de confiance 84,3% – 100%).

Confrontation avec les données de terrain

L'animal prélevé présentait un phénotype atypique de couleurs sombre (cf photo) comparativement aux morphotypes des loups régulièrement observés sur les clichés de pièges-photo ou sur les dépouilles collectées en France.

Son aspect « bringé » avec arrière-train plus sombre et encolure plus claire autorisait la question d'un éventuel hybride, attendu les références sur le sujet déjà documentés sur la présence à faible taux de cas d'hybridation en France ¹.

Aucune validation scientifique n'est aujourd'hui démontrée pour valider un critère morphologique (couleur, formes, onglons etc...) qui assure un diagnostic fiable du caractère hybride d'un individu. Tout au mieux permettent-ils de les suspecter. Aussi les analyses génétiques restent nécessaires. Par exemple, la couleur noire du pelage observée ponctuellement dans les populations (y compris italiennes) a été considéré comme un signal d'héritage ancestral d'hybridation chien-loup à cause de la plus grande fréquence de cette mutation chez les chiens par rapport aux loups. Les chercheurs n'exclut pas que cette mutation existait à bas bruit dans les populations de loups originelles et ait été sélectionnés ensuite chez les chiens². Ainsi un polymorphisme même rare peut s'exprimer même à bas bruit dans une population de loup.

L'analyse génétique réalisée autorise le diagnostic fiable des introgressions de gènes de chien dans le patrimoine génétique des loups et inversement au travers de l'analyse d'assignation des profils microsatellites aux pool de références préalablement constitués. Ce diagnostic réalisées sur 22 marqueurs (haut niveau de discrimination) identifie avec quasi-certitude les Hybrides F1 ainsi que les produits issus de rétrocroisement (F1xLoup ou F1xchien).

Dans le cas ici expertisé, cet animal au pelage bringé présente un patron génétique conforme au patrimoine de la population **Canis lupus lupus de la lignée italienne**. La valeur de l'assignation de 96,9%, même si non significativement différente de la moyenne de 99%, montre cependant un possible héritage ancestral (> 3^{eme} génération) à savoir un grand-père ou une grand-mère possiblement issu d'une hybridation entre une louve et un chien de la génération précédente. La dilution au fil des générations dans le patrimoine génétique de ce loup n'est aujourd'hui plus décelable par l'analyse génétique de 22 marqueurs.

Comme pourrait le faire d'autres signaux ponctuels qui peuvent s'exprimer à bas bruit, le caractère de pelage bringé s'est donc exprimé en retour chez cet animal après plusieurs

¹ <https://www.loupfrance.fr/faible-taux-hybridation-retrospective-10-ans/>
http://www.loupfrance.fr/pdf/Bulletin-Reseau-Loup-2016-N34_hybridation;reglementation;Italie.pdf

²https://www.maxisciences.com/loup/d-ou-vient-la-couleur-noire-de-certains-loups_art863.html

générations sans pour autant constituer un signal d'implantation. Les gènes impliqués dans la coloration du pelage ont des taux de mutation important. Aussi L'hypothèse d'une mutation spontanée reste également une alternative possible.

Ce cas d'espèce confirme donc que le jugement des caractères phénotypiques portés par chaque individu pour qualifier un hybride reste subjectif. L'observation d'un caractère morphologique qui diverge des observations habituellement faites dans la population, autorise une démarche de suspicion. En revanche, les variations phénotypiques inter individuelles sont suffisamment importantes pour ne pas s'autoriser de démarche conclusive sans analyse génétique poussée en suivant.

Fait à Gap, le 20/11/2019



Figure : Photographie de l'animal prélevé en tir de défense réglementaire le 13 Juin 2019 sur la commune de St Vallier de Thiey. *Crédit photo : ONCFS SD06*

PJ. Rapport ANTAGENE du typage génétique de l'échantillon D0619010

A l'attention de

**Christophe DUCHAMP
ONCFS**

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

Référence : Echantillons D0619010

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 :
D0619010 (642129) fragment de tissu

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 des séquences d'ADN de bonne qualité pour cet échantillon

Echantillon	Haplotype mitochondrial (selon la nomenclature Pilot et al. 2010)
D0619010 (642129)	w22

L'haplotype w22 est caractéristique de la population italo-alpine 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 :

Echantillon	D0619010 (642129)						
AMEL	AHT103	AHT111	AHTk211	FH2096	CPH02	FH2088	C09.173
XX	098098	100106	088088	092092	120120	120128	124126
CPH05	FH2004	CFX30371	C22.279	C09.250	FH2161	FH2140	INU030
129129	297309	172172	116122	160162	000000	130152	144144
FH2137	FH2054	C27.442	Dbar1	REN162C04	PEZ17	FH2010	
171177	149153	184184	182182	201201	194198	245245	

L'empreinte génétique de cet échantillon est presque complète et d'excellente qualité (indice qualité = 0,96). L'individu est une femelle (XX 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
D0619010 (642129)	Femelle	Loup d'origine italo-alpine	96,9% [84,3% - 100%]

L'assignation statistique de l'échantillon D0619010 (642129) donne une probabilité d'assignation de 96,9% à la population française de loup. Cette probabilité est inférieure à 99% mais n'est pas significativement différente de 100%.

Conclusions

Les données obtenues sur l'ADN nucléaire et sur l'ADN mitochondrial à partir de l'échantillon D0619010 (642129) montrent que cet animal est issu de la population française de loups et qu'il ne présente pas de signes statistiquement significatifs d'hybridation avec le chien.

La Tour de Salvagny, le 22 novembre 2019,

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, 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.

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.