



Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

PREFET DES PYRENEES-ATLANTIQUES

Sous-préfecture d'Oloron-Sainte-Marie
Affaire suivie par : Loïc PETIT
☎ 05 40 17 28 84
✉ loic.petit@pyrenees-atlantiques.gouv.fr

Oloron-Sainte-Marie, le **08 JUIL. 2019**

Monsieur le président,

Par courrier du 11 juin dernier, le directeur général de l'office national de la chasse et de la faune sauvage (ONCFS) m'a transmis votre demande de communication des analyses génétiques ayant avéré à l'été 2018 la présence en vallée d'Ossau d'un loup hybride déterminé comme un individu issu d'un rétrocroisement entre un loup d'origine italo-alpine et un chien.

Conformément à l'avis n° 20184452 de la commission d'accès aux documents administratifs, en date du 18 avril 2019, je vous transmets en pièce jointe le rapport d'expertise correspondant, établi le 9 août 2018 par le laboratoire Antagène.

Je vous prie d'agréer, Monsieur le Président, l'expression de ma considération distinguée.

Le sous-préfet
d'Oloron-Sainte-Marie

Christophe PECATE

Monsieur Jacques RUTTEN,
Président de l'association Causses-Cévennes
d'action citoyenne (ACCAC)
Avenue du Devois
Le Devois
30750 SAINT SAUVEUR CAMPRIEU

Copie à :
- M. le directeur général de l'ONCFS

ONCFS-SD Pyrénées Atlantiques
2 rue Maréchal Joffre
64021 Pau Cedex

Référence : F242 – F6418001 à 006

Analyses

Le laboratoire ANTAGENE a réceptionné le 18 juillet 2018 les échantillons suivants :

Echantillon	N° Antagene	Type prélèvement
F6418001	596 457	Fèces
F6418002	596 458	Fèces
F6418003	596 459	Fèces
F6418004	596 460	Fèces
F6418005	596 461	Fèces
F6418006	596 462	Fèces

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 (*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 ces échantillons :

Echantillon	N° Antagene	Haplotype mitochondrial (pour le loup, nomenclature Pilot et al. 2010)
F6418001	596 457	<i>Vulpes vulpes</i> (Renard)
F6418002	596 458	<i>Vulpes vulpes</i> (Renard)
F6418003	596 459	<i>Vulpes vulpes</i> (Renard)
F6418004	596 460	<i>Canis lupus lupus</i> (Loup) w22 (italo-alpin)
F6418005	596 461	<i>Canis lupus lupus</i> (Loup) w22 (italo-alpin)
F6418006	596 462	<i>Canis lupus familiaris</i> (Chien)

L'haplotype w22 est caractéristique de la population italo-alpine de loups 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	596 462						
AMEL	AHT103	AHT111	AHTk211	FH2096	CPH02	FH2088	C09.173
XX	096098	104104	092092	100100	124124	124132	120122
CPH05	FH2004	CFX30371	C22.279	C09.250	FH2161	FH2140	INU030
131131	243243	168172	114122	162166	000000	131142	146150
FH2137	FH2054	C27.442	Dbar1	REN162C04	PEZ17	FH2010	
161161	149157	180186	000000	205205	202206	000000	

L'empreinte génétique de cet échantillon est de qualité moyenne (indice qualité = 0,77). L'individu est une femelle (XX sur le marqueur AMEL).

Les assignations statistiques, conduites à partir de cette empreinte génétique permettent d'obtenir les résultats suivants :

Echantillon	Sexe génétique	Origine génétique	Probabilité d'assignation au chien domestique	
596 462	Femelle	Chien	99,8% [97,1% - 100%]	Probabilité d'assignation à la population française de loup : 0,25% [0,00% - 2,93%]

Echantillon		596 460					
AMEL	AHT103	AHT111	AHTk211	FH2096	CPH02	FH2088	C09.173
XY	098100	100102	084084	092096	120120	120120	126126
CPH05	FH2004	CFX30371	C22.279	C09.250	FH2161	FH2140	INU030
129129	297309	176176	118124	160162	237241	131138	144144
FH2137	FH2054	C27.442	Dbar1	REN162C04	PEZ17	FH2010	
163177	141145	184186	182182	191201	193194	245245	

L'empreinte génétique de cet échantillon est complète et de très bonne qualité (indice qualité = 0,97). L'individu est un mâle (XY sur le marqueur AMEL).

Echantillon		596 461					
AMEL	AHT103	AHT111	AHTk211	FH2096	CPH02	FH2088	C09.173
XY	098100	100102	084084	092096	120120	120120	126126
CPH05	FH2004	CFX30371	C22.279	C09.250	FH2161	FH2140	INU030
129129	297309	176176	118124	160162	237241	131138	144144
FH2137	FH2054	C27.442	Dbar1	REN162C04	PEZ17	FH2010	
163177	141145	184186	182182	191201	193194	245245	

L'empreinte génétique de cet échantillon est complète et de très bonne qualité (indice qualité = 0,98). L'individu est un mâle (XY sur le marqueur AMEL).

Les 2 échantillons n° 596 460 et n° 596 461 présentent 2 empreintes génétiques totalement identiques sur les 22 marqueurs. Ces 2 échantillons correspondent donc à un même individu.

Les assignations statistiques, conduites à partir de cette empreinte génétique commune, permettent d'obtenir les résultats suivants :

Echantillon	Sexe génétique	Origine génétique	Probabilité d'assignation à la population française de loup
596 460 & 596 461	Mâle	Hybride entre un loup d'origine italo-alpine et un chien	74,2% [56,1% - 88,9%]

Conclusions

Les données obtenues sur l'ADN nucléaire et/ou sur l'ADN mitochondrial à partir des 6 échantillons montrent que :

- 3 échantillons proviennent d'un renard
- 1 échantillon provient d'un chien femelle
- 2 échantillons proviennent d'un même individu hybride entre un loup d'origine italo-alpine et un chien

La Tour de Salvagny, le 9 août 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 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 pour produire un résultat consensus.

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.