

A l'attention de

ONCFS

Unité Prédateurs - Animaux déprédateurs
Direction de la Recherche et de l'Expertise

Référence : Echantillons P4817001 / U4817001

Analyses

Dans le cadre du marché public de suivi génétique de la population de loup avec l'ONCFS, le laboratoire ANTAGENE a réceptionné un lot d'échantillon le 16 avril 2018.

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 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.

Les résultats de la session ont été délivrés à l'ONCFS le 6 juin 2018. Parmi ce lot, deux échantillons présentaient un profil génétique atypique différent de celui connu jusqu'ici dans la population française de loups :

P4817001 (582 241) poils

U4817001 (582 233) urine

Ces échantillons ont fait l'objet d'analyses complémentaires, objet du présent rapport.

Résultats

Les analyses génétiques au niveau de l'ADN mitochondrial ont permis d'obtenir des séquences d'ADN de bonne qualité pour les 2 échantillons :

Echantillon	Haplotype mitochondrial (selon la nomenclature Pilot et al. 2010)
P4817001 (582 241)	W1
U4817001 (582 233)	Proche W1

L'haplotype W1 associé à ces 2 échantillons diffère sans ambiguïté de l'haplotype caractéristique de la population italo-alpine de loups (W22) et retrouvés de façon spécifique en Italie, en Suisse et en France. Cet haplotype W1 est couramment associé aux populations de loups de l'Europe de l'Est et de Scandinavie et a été retrouvé dans les populations des pays suivants : pays baltes, Pologne, Biélorussie, Ukraine, Russie et aussi dans les pays scandinaves (Pilot et al. 2010).

Les séquences de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial sont présentées en annexe. Ces 2 échantillons présentent une séquence avec des différences au niveau de 3 nucléotides, ce qui atteste que ces 2 échantillons appartiennent à 2 individus différents.

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		P4817001 (582 241)					
AMEL	AHT103	AHT111	AHTk211	FH2096	CPH02	FH2088	C09.173
XY	098098	098108	088088	092100	116116	120124	126126
CPH05	FH2004	CFX30371	C22.279	C09.250	FH2161	FH2140	INU030
127127	243251	172172	124128	160168	245245	152152	146146
FH2137	FH2054	C27.442	Dbar1	REN162C04	PEZ17	FH2010	
161171	137149	184184	182182	201205	198198	245249	

L'empreinte génétique de l'échantillon P4817001 (582 241) est complète et d'excellente qualité (indice qualité = 1). L'individu est un mâle (XY sur le marqueur AMEL).

Echantillon		U4817001 (582 233)					
AMEL	AHT103	AHT111	AHTk211	FH2096	CPH02	FH2088	C09.173
000000	098098	000000	088094	000000	000000	000000	000000
CPH05	FH2004	CFX30371	C22.279	C09.250	FH2161	FH2140	INU030
127127	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000
FH2137	FH2054	C27.442	Dbar1	REN162C04	PEZ17	FH2010	
000000	000000	000000	000000	199205	000000	000000	

L'empreinte génétique de l'échantillon U4817001 (582 233) est de très mauvaise qualité (indice qualité = 0,089), ce qui s'explique par le fait que l'ADN nucléaire est à l'état de trace et donc difficilement exploitable dans cet échantillon d'urine. Le marqueur de sexe (Amélogénine) n'a pas pu être analysé et le sexe génétique reste donc indéterminé pour cet échantillon.

Bien que cette empreinte génétique soit très incomplète (seulement 4 marqueurs analysables sur 23), deux des marqueurs (AHTk211, REN162C04) sur les 4 analysables

diffèrent de ceux de l'échantillon P4817001 (582 241), ce qui confirme l'hypothèse de deux individus différents.

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
P4817001 (582 241)	Mâle	Animal n'appartenant pas à la population italo-alpine de loups	41,3% [22,1% - 60,9%]
U4817001 (582 233)	?	Indéterminé	Indéterminé

L'échantillon U4817001 (582 233) présente une empreinte génétique de trop mauvaise qualité pour pouvoir réaliser une assignation statistique fiable.

L'assignation statistique de l'échantillon P4817001 (582 241) donne une probabilité d'assignation de 41,3% à la population française de loup. Ce résultat pourrait laisser penser que cet individu serait un hybride entre un chien et un loup, mais signifie simplement qu'il ne peut pas être associé ni au chien domestique ni à la population française de loup. En l'absence de connaissance de sa population d'origine, la méthodologie statistique mise en œuvre ne permet pas actuellement de caractériser le niveau éventuel d'hybridation de cet animal.

Conclusions

Les 2 échantillons P4817001 (582 241) et U4817001 (582 233) correspondent sans ambiguïté à deux individus différents. Ces 2 échantillons présentent un profil atypique au niveau de l'ADN mitochondrial non encore décrit en France à notre connaissance et correspondant aux profils génétiques observés dans les populations de loups de l'Europe de l'est et de Scandinavie.

Les données obtenues sur l'ADN nucléaire et sur l'ADN mitochondrial à partir de l'échantillon P4817001 (582 241) montrent que cet animal n'est pas issu de la population française de loups. Néanmoins, les données disponibles ne permettent pas de conclure si l'échantillon P4817001 (582 241) proviendrait d'un loup de l'Europe de l'est ou de Scandinavie ou d'un hybride entre un chien et un loup.

La Tour de Salvagny, le 6 juillet 2018

Guillaume QUENEY
Docteur en Génétique



Page 3/6

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)
- 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 (longueur de burn-in de 100 000 et longueur de chaîne de Monte-Carlo de 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, Shkvryra 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.

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.

Annexe

Séquences de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial
(différences en rouge)

P4817001 (582 241) : AGCTCTTGCTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTTCTTAAACTATTCCCTGACAC
U4817001 (582 233) : AGCTCTTGCTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTTCTTAAACTATTCCCTGACAC

P4817001 (582 241) : CCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCC
U4817001 (582 233) : CCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCC

P4817001 (582 241) : TTCTTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTA
U4817001 (582 233) : TTCTTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTA

P4817001 (582 241) : CATAATATTACATTCTTACATAGGACATATTAAGTCAATCTCATAATTCACTGATCTATC
U4817001 (582 233) : CATAATATTACATTCTTACATAGGACATATTAAGTCAATCTCATAATTCACTTGATCTATC

P4817001 (582 241) : AACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGTCCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAA
U4817001 (582 233) : AACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGTCCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAA

P4817001 (582 241) : ACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATACCTAACGTGGGGG
U4817001 (582 233) : ACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATACCACTAACGTGGGGG

P4817001 (582 241) : TTAATCATGAAACTATACCTGGCATCTGGTTC
U4817001 (582 233) : TTAATCATGAAACTATACCTGGCATCTGGTTC