



**Direction de la
Recherche et
de l'Expertise**

**Unité Prédateurs
et Animaux
déprédateurs
(UPAD)**

**Equipe loup lynx
(ELL)**

Auteurs :

**Christophe
Duchamp¹,
Guillaume Queney²**

Mars 2019

**NT/2019/DRE/
UPAD/04**

¹ – ONCFS
² – ANTAGENE

LE SUIVI GENETIQUE DES LOUPS EN 2018

BILAN DE LA 1^{ERE} ANNEE DE MISE EN ŒUVRE DU NOUVEAU MARCHÉ PUBLIC

Mots-clés : Rapport, Génétique, Hybridation, Loup, *Canis lupus lupus*

Le suivi des animaux sauvages par les techniques moléculaires fait aujourd'hui légion pour étudier l'évolution des populations dans leur milieu naturel. Son application au Loup n'est pas en reste. Cette technique, dite « non invasive » car ne nécessitant pas l'immobilisation de l'animal, est particulièrement intéressante pour suivre cette espèce difficilement observable. En effet, elle utilise des excréments, urines ou autres poils que les animaux laissent sur le terrain. Une nouvelle méthode du suivi génétique des loups en France a été ainsi mise au point pour à la fois contribuer à la détection de nouveaux sites de présence, mais aussi identifier les profils génétiques des loups présents en France et surveiller les taux d'hybridation avec le chien, sujet banal chez beaucoup d'espèces mais régulièrement polémique chez le Loup.

RESUME

1. Un marché public pour la conduite des analyses génétiques sur la population de loups en France a été conclu entre le laboratoire Antagene et l'ONCFS pour la période 2018-2021. Le cahier des charges requiert l'identification de l'espèce et des lignées populationnelles, l'élaboration de cartes d'identité ADN individuelles et robustes par un génotypage sur 22 marqueurs microsatellites, et la caractérisation du potentiel caractère d'hybridation entre le loup et le chien. Les analyses se basent sur l'exploitation d'échantillons d'excréments, de poils, d'urine ou de sang collectés par le Réseau Loup/Lynx de surveillance patrimoniale de l'espèce.
2. En 2018, les 6 premiers mois ont été consacrés à un lourd travail de reprofilage des loups déjà identifiés sur les 10 dernières années avec une nouvelle résolution de génotypage. Ce travail fastidieux mais néanmoins incontournable permet d'assurer la continuité d'identification des animaux actuels avec ceux déjà identifiés historiquement dans la population. Des analyses courantes sur des échantillons actuels ont complété les sessions bimestrielles pour rester réactif sur l'identification de nouveaux secteurs de présence du loup.
3. Cette étape de calibration a également permis un travail de recherche important pour affiner le pouvoir de détection des hybrides en mesurant notamment la variabilité des probabilités d'assignation « Chien » ou « Loup », pour distinguer l'hybridation récente et active d'un héritage plus ancien.
4. Sur près de 1250 analyses conduites, 763 profils génétiques différents ont pu être identifiés entre 2008 et 2018. Parmi ceux-ci, hormis les espèces non cibles, ressortent 53 chiens (*Canis lupus familiaris*) et 586 loups (*Canis lupus lupus*), tous de la

lignée italo-alpine sauf 2 individus d'une lignée « w1 » retrouvée en Europe de l'est¹. A noter que des tests réalisés sur des chiens de race « Chien-loup de Sarloos » et « Chien-loup tchèque-slovaque » montrent que ceux-ci peuvent être porteurs d'un ADN mitochondrial de Loup (lignée « Europe de l'est » ancestrale à la race) mais leur profil génétique individuel les assigne clairement au groupe « Chien ». La méthode mise en œuvre permet donc de bien différencier ces races génétiquement très proches du loup.

5. Les analyses d'hybridation menées sur les 586 profils génétiques *Canis lupus lupus*, donnent les résultats suivants :
 - 88,7% présentent un patrimoine génétique de loup, de lignée italo-alpine standard « w22 ».
 - 3,6% présentent un profil hybride de première génération F1 (tous Louve x Chien) parmi lesquels deux portées isolées, en Tinée (06) et Maurienne (73), rassemblent 13 de ces individus F1
 - 7,5% ont été identifiés comme porteurs d'un héritage « Chien » plus ancien
6. Un focus sur les données récentes (2017 et 2018) permet de mettre en évidence 4 hybrides F1 dont 2 sont morts en 2017, en Tinée (06) et en Maurienne (73). Les deux autres étaient encore détectés en 2017 au travers d'un dépôt d'urine et de fèces, respectivement en Maurienne (73) et dans le Vercors (26).
7. Un focus parmi 197 dépouilles permet d'identifier 7 hybrides F1 :
 - 2016 et avant : 2 par tirs en Tinée (06), 1 mort d'origine traumatique et 1 par tir en Maurienne (73) et 1 tir dans le Vercors (26)
 - Sur 2017 et 2018 : 1 tir en 2017 en Tinée² (06), et 1 collision en 2017 en Maurienne (73)

¹ Cf. communiqué de presse www.oncfs.gouv.fr

² Communiqué Gpe national Loup 2018

TABLE DES MATIERES

Résumé	1
Les objectifs de la surveillance génétique les loups	4
Encart : Le laboratoire Antagène	4
Matériels et méthodes.....	5
Résultats	9
Publication des données.....	15
Bibliographie.....	16
Contributions - Remerciements	17
Annexes	18
1/ Méthodologie d'ANTAGENE.....	18
2/ Liste des marqueurs	19
3/ Séquence type d'ADNm de la région de contrôle– haplotype w22	19

LES OBJECTIFS DE LA SURVEILLANCE GENETIQUE DES LOUPS

Le suivi à long terme de la population de loups a débuté en France dès 1994, peu après les premières identifications de présence de l'espèce au début des années 1990. Précurseur des techniques non invasives de pistage moléculaire, le laboratoire du CNRS-LECA a développé les premières méthodes de détection de l'espèce sur la base de l'ADN retrouvé dans les excréments, urines, poils ou en encore sur les tissus d'animaux morts (Taberlet et Luikard 1999, Duchamp et Quenette 2005). Le suivi avait initialement pour principal objectif de détecter la présence de l'espèce sur les nouveaux secteurs au travers du séquençage de l'ADN mitochondrial pour déterminer la lignée d'appartenance des premiers animaux colonisateurs (Valière et al. 2003). Très vite, le développement d'outils moléculaires a été mis en place pour individualiser les animaux au travers des échantillons non invasifs collectés par le Réseau Loup. L'ADN mitochondrial est hérité uniquement de la mère. L'ADN nucléaire est hérité des deux parents et donc un premier panel de 6 marqueurs nucléaires biparentaux dit « microsatellites » a été sélectionné parmi 42 marqueurs candidats. Cela a permis d'éditer les premières « cartes d'identité ADN », ou génotypes, ou profils génétiques, des loups présents en France (Valière et Taberlet 2000, Miquel et al. 2006) avec une résolution suffisante pour ne pas confondre 2 individus apparentés ($p_{\text{sib}} < 1/1000$). Un passage à 10 puis 13 marqueurs a pris la suite. Ce panel de marqueurs était dédié à l'identification individuelle pour assurer les mesures de dynamique des populations. Si le panel initial des 6 marqueurs permettait par l'expertise des profils obtenus, de surveiller l'apparition d'allèles rares, il n'était en revanche pas développé pour répondre spécifiquement à la question de quantification de l'hybridation, à l'époque sans actualité en France.

Avec la fin du marché public de 2012-2016, un nouveau cahier des charges a été dressé en 2017 pour 1) toujours permettre de vérifier la lignée populationnelle des loups retrouvés sur le territoire, 2) disposer d'un panel de marqueurs qui puisse permettre un haut degré de différenciation des animaux y compris les individus apparentés, et chose nouvelle 3) permettre de calculer, pour chaque échantillon, la probabilité d'une hybridation avec le chien, et de distinguer une hybridation récente d'un héritage plus ancien. Le laboratoire ANTAGENE (cf encart) a répondu à l'appel d'offre en garantissant une résolution optimale de la méthode pour atteindre ces objectifs.

ENCART : LE LABORATOIRE ANTAGENE



Créé en 2002, le laboratoire ANTAGENE a construit un haut niveau d'expertise sur les pedigrees et tests ADN des canidés et félinés. Rayonnant à l'échelle internationale, celui-ci propose plus de 130 tests ADN dans une cinquantaine de pays pour plus de 100 000 clients dans le monde. ANTAGENE déploie, depuis 15 ans, une expertise très pointue dans les technologies de l'ADN et plus particulièrement dans les domaines des maladies héréditaires, de la génétique moléculaire, de la génomique animale, de la bio-informatique et de la génétique des populations. Activité essentiellement basée sur les animaux domestiques, le laboratoire a développé par ailleurs une compétence majeure en matière d'études et recherche en génétique des populations animales sauvages. Son fondateur et PDG, généticien des populations et ancien chercheur au CNRS, collabore depuis de nombreuses années sur les programmes de recherche en génétique des populations, en particulier sur les techniques de cartographie des maladies et d'hybridation génétique³.

Pour en savoir plus <https://www.antagene.com/fr>

³ https://www.researchgate.net/profile/Guillaume_Queney/publications

MATERIELS ET METHODES

1/ Provenance des échantillons génétiques

Les échantillons de fèces, poils, sang ou dépôts urinaires sont récoltés par les [correspondants du Réseau loup lynx](#) formés et déployés sur l'ensemble des départements de présence connue des loups. Une surveillance dite « sentinelle » est engagée par l'ONCFS sur le front de colonisation (départements contigus à la zone de présence connue), et une surveillance est également maintenue par l'ONCFS sur l'ensemble du territoire français, pour traiter tout nouvel échantillon potentiel qui pourrait permettre d'identifier un nouveau secteur de présence de manière réactive. L'ADN des animaux depositaires, déposé sur ce type d'échantillons, reste en quantité faible et souvent déjà dégradé. Des procédures de prélèvement et de conservation sont mises en œuvre pour préserver au maximum la qualité des prélèvements : un conditionnement sous sac ziploc, stocké à -18°C puis conditionné en piluliers sous Ethanol 96% en conservant la chaîne du froid (Miquel et al. 2006, Duchamp et al. 2012). Des protocoles spécifiques sont employés pour les urines et le sang (Valière et al. 2000). Une traçabilité par numéro de référence unique est maintenue pour chaque échantillon tout le long de la chaîne de traitement.

Les prélèvements de salive sur proie domestique, bien que potentiellement source d'adn, ne sont pas utilisés car outre leurs faibles taux de réussite en extraction ADN (Harms et al 2015, Dufresne et al, 2019), présentent des risques de contaminations croisées par le prédateur et/ou les charognards lors des prélèvements si ceux-ci ne sont pas réalisés dans des conditions optimales (potentiel de faux diagnostics).

La mise en service de la nouvelle méthodologie a commencé en janvier 2018 avec la signature du marché public conclu pour 4 ans. Le cahier des charges du marché public prévoit l'assurance de la continuité du suivi moléculaire des loups avec l'historique. L'ensemble des échantillons provenant de loups génétiquement détectés sur les 10 dernières années a donc été repris et reprofilé sous un nouveau panel de marqueurs, pour assurer la passerelle. Les animaux identifiés avant 2008 n'ont pas fait l'objet de ce « passerillage » par manque de double d'échantillons ADN et contraintes budgétaires, d'autant que ceux-ci sont pour la majorité sans doute déjà morts vu la durée de vie de l'espèce en nature.

Durant cette période de calibrage, des sessions courantes ont également été réalisées en parallèle tous les 2 mois (figure 1) pour assurer les analyses des échantillons par ordre de priorité :

- Echantillons récents sur les nouveaux secteurs de présence identifiés par le réseau Loup
- Echantillons de tissus des dépouilles prélevés ou trouvés morts
- Le rattrapage de la dernière année 2017 (année restée blanche en l'absence de marché public à l'exception d'un test méthodologique sur les diagnostics d'hybridation – cf <http://www.oncfs.gouv.fr>)

Ainsi, en 2018, 1246 échantillons ont été analysés, parmi lesquels 486 reprofilages d'animaux déjà connus (passerelles) et 760 nouveaux échantillons lors des sessions courantes (figure 1).

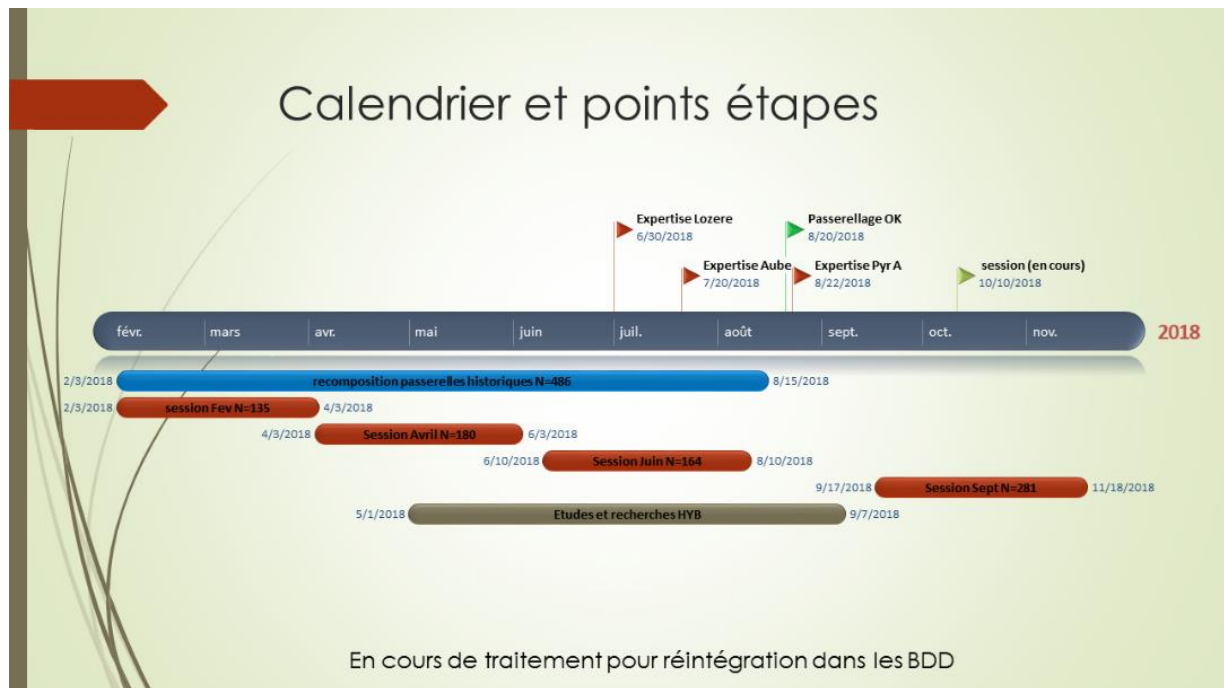


Figure 1: Calendrier de mise en œuvre des analyses génétiques pour le suivi des loups en France. Source : Réunions de restitution du Réseau Loup Lynx 2018

2/ Démarche d'analyse génétique

Le laboratoire est configuré dans son infrastructure pour analyser les échantillons collectés de façon classique ou de façon non-invasive (où souvent l'ADN est dégradé et rare, on parle d'ADN trace) afin d'éviter les risques de contamination croisée entre échantillons et de garantir la traçabilité et la qualité des résultats produits (salles dépressurisées, marche en avant). La méthode d'extraction, purification, amplification est synthétisée en annexe et détaillée [dans les rapports consultables en ligne](#). La méthode d'analyse de l'ADN est présentée en figure 2. L'analyse porte de manière systématique sur deux types de molécules : l'ADN présent dans les mitochondries des cellules, hérité uniquement de la mère, et l'ADN présent dans le noyau des cellules, hérité des deux parents, tous deux complémentaires pour assoir respectivement et pour chaque échantillon un diagnostic d'origine populationnelle des animaux et de leur génotypage individuel.

3/ Espèce et lignée génétique populationnelle

L'ADN mitochondrial permet d'évincer les espèces non cibles et porte l'information de la lignée populationnelle. Facilement exploitable par séquençage d'une portion dite « région de contrôle -ou Dloop », celui-ci est amplifié et séquençé dans les deux sens (forward et reverse, Vila 1999, Randi 2000, Pires 2006). Ces séquences ADN_m sont ensuite comparées aux séquences types d'ADN mitochondrial de référence disponibles dans les bases de données internationales (NCBI – Genbank cf Benson et al 2005) et dans les articles scientifiques de référence. Ce traitement informatique de comparaison de séquence permet de déterminer avec une fiabilité supérieure à 99% l'espèce et la lignée génétique héritée de la mère. Potentiellement tous les haplotypes de loups recensés de par le monde sont identifiables, et nous pouvons notamment confirmer si l'échantillon provient d'un loup de la lignée dite italo-alpine, présente en France, cette lignée présentant des caractéristiques uniques (haplotype unique – cf annexe et Lucchini et al, 2004). Ce séquençage mitochondrial ne présage pas en revanche du diagnostic d'un éventuel caractère d'hybridation, ce dernier relevant de l'analyse des marqueurs microsatellites nucléaires bi-parentaux (cf après).

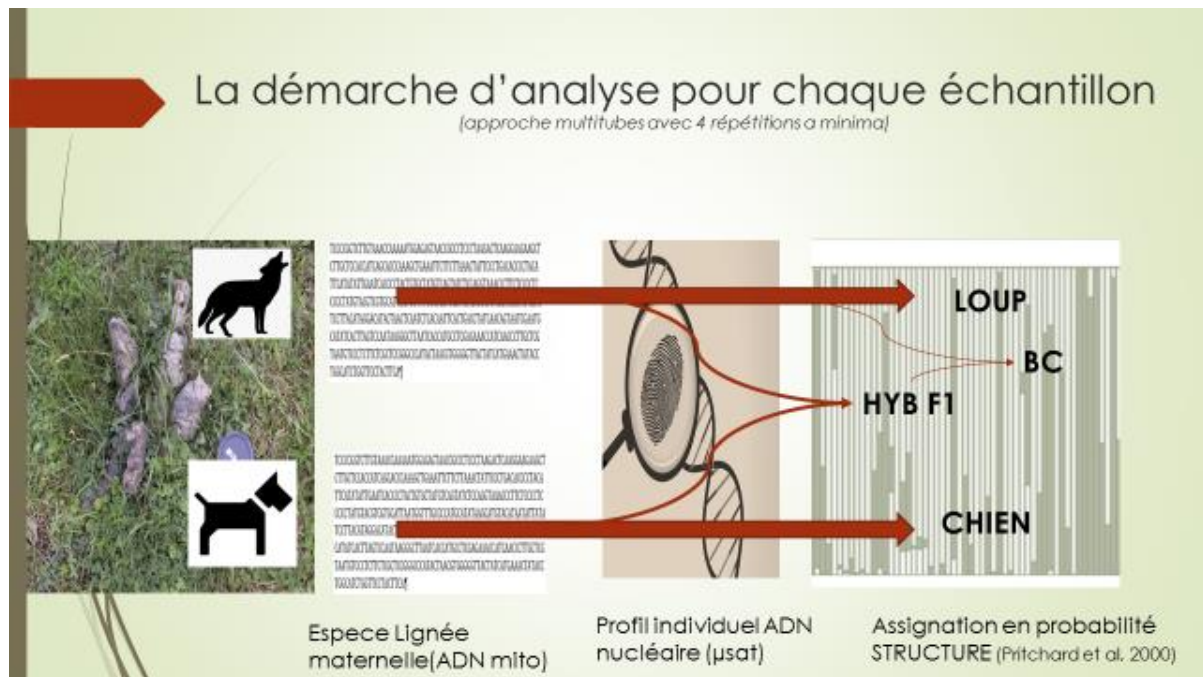


Figure 2 : Démarche d'analyse des échantillons sous l'approche multitube : chaque échantillon fait l'objet d'un séquençage de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial, permettant une première identification de l'espèce, suivi du génotypage des marqueurs microsatellites sur l'ADN nucléaire pour obtenir le profil génétique individuel. Cette étape est répétée 4 fois pour assurer la qualité du génotypage. Seuls les profils génétiques présentant un indice qualité suffisant (bonne répétabilité) et un nombre suffisant de marqueurs génotypés sont interprétables. Le croisement d'un loup et d'un chien donne un hybride de première génération (HYBF1). Si celui-ci survit et se recroise avec un loup, le descendant est classé « BC » (pour backcross ou rétrocroisement). Ces catégories sont identifiables par l'analyse bio-informatique des profils génétiques.

4/Génotypage individuel

Les ADN nucléaires biparentaux sont amplifiés et analysés au niveau du panel de marqueurs microsatellites spécifiquement mis au point pour le Loup (Godinho 2011, Godinho 2014, Randi 2014) et d'un marqueur de sexe (Amélogénine). Pour assurer la continuité avec l'historique, le génotypage a repris les 6 marqueurs historiques (LECA) assortis des 4 marqueurs communs avec les autres pays alpins, auxquels 12 marqueurs supplémentaires ont été ajoutés pour permettre une résolution accrue des profils individuels et des analyses d'hybridation chien-loup. Chaque profil génétique est donc constitué des allèles ayant été séquencés sur 24 marqueurs (22 microsatellites et le marqueur de sexe en double – cf annexe). Onze d'entre eux sont spécifiquement dédiés à l'analyse d'hybridation. Chaque génotypage est répété 4 fois (approche multitube) en 2 multiplexes pour pallier les potentielles pertes d'allèles inhérentes à l'amplification de l'ADN dégradé. Une étude préalable de la performance du jeu de marqueurs a été réalisée pour éviter toute fausse identification ou au contraire confusion de deux individus en cas de profil génétique partiel ou non répétable. Un indice qualité (IQ) mesure la répétabilité du génotypage. Seuls sont retenus les génotypes avec $IQ > 0.5$ (échelle 0 à 1) et avec un profil présentant au moins 14 marqueurs, minimum requis pour ce panel pour assurer les analyses d'hybridation. Après tests, deux profils génétiques similaires mais présentant plus de 2 allèles différents sont considérés comme distincts, règle au préalable testée par mise en concurrence avec un autre jeu de marqueurs. Un contrôle visuel des potentiels artefacts issus du génotypage permet de prendre en compte les potentielles pertes alléliques et/ou faux allèles inhérents aux analyses génétiques sur échantillons dégradés (Miller et al. 2002, Pompanon et al. 2005, Wang 2017).

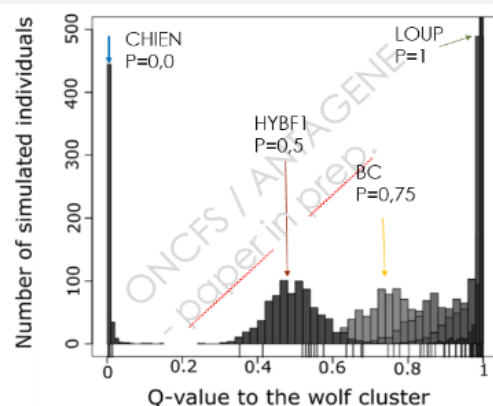
5/ Hybridation récente et héritage ancestral

L'identification de la lignée d'origine ne conclut en rien sur le caractère hybride ou non des animaux, vu la transmission monoparentale de l'ADN mitochondrial. Le caractère hybride ne peut se mesurer qu'en analysant le profil génétique individuel dressé sur l'ADN hérité des 2 parents, l'ADN nucléaire (cf infra). La proximité génétique entre *C. l. familiaris* et *C. l. lupus* est telle qu'aucun allèle diagnostic n'est connu pour être exclusif de l'une ou l'autre sous-espèce. Aussi, l'identification du caractère hybride doit reposer sur une démarche probabiliste à savoir la probabilité qu'un profil génétique donné appartienne à un groupe d'échantillons de référence « Loup » ou « Chien » préalablement constitué. Le groupe d'échantillons de référence « Loup » a été constitué au sein de la population italo-alpine, celui de « Chien » à partir de 40 races différentes de manière à intégrer la diversité allélique potentielle. Le groupe de référence « Loup » n'est volontairement pas étendu aux autres lignées pour éviter les effets de dilution, qui en retour restreindraient le pouvoir de diagnostic des hybrides au sein de la population d'intérêt. Le scan préalable et systématique de l'ADN_m reste disponible pour identifier une origine populationnelle autre que Italo-alpine. Chacun de ces deux groupes de référence présente une diversité de combinaisons alléliques qui, après analyse, les sépare parfaitement. Si un animal est issu du croisement entre un loup et un chien, alors celui-ci présente un profil génétique individuel qui le classe entre les 2, c'est-à-dire qu'il présente une probabilité autour de 50% de chance d'appartenir à l'un ou à l'autre des 2 groupes (hybride de première génération F1). Le sens de l'hybridation est connu grâce à l'héritage maternel de l'ADN mitochondrial.

Le niveau d'hybridation pour chaque échantillon est donné par une probabilité d'assignation à la classe « Loup ». Les profils génétiques sont analysés informatiquement à l'aide du logiciel d'inférence bayésienne STRUCTURE (Pritchard 2000, Falush 2003) en utilisant le paramétrage du modèle « avec hybridation » et « fréquences alléliques corrélées ». Le nombre de classes n'est pas fixé au préalable mais mesuré par le processus statistique (K=2), afin de ne pas brider les analyses sur ce paramètre (cf annexe pour le détail). Les analyses informatiques consistent en un très grand nombre de simulations (longueur de burn-in de 100 000 et longueur de chaîne de Monte-Carlo de 100 000), chaque simulation étant répétée 20 fois. Ces analyses statistiques permettent de déterminer la probabilité d'assignation aux deux sous-espèces de référence, le chien et le loup, et l'intervalle de crédibilité à 95% de cette probabilité. Dès lors que l'intervalle de crédibilité ne recouvre ni la borne 0 (probabilité 0%) ni la borne 1 (probabilité 100%) alors l'échantillon est considéré comme hybride (Bohling 2011). Cette méthode permet de détecter avec fiabilité des hybrides de première génération (F1) et les hybrides de deuxième génération (back-cross ou rétrocroisement, c'est-à-dire croisement d'un loup ou d'un chien avec un F1). Comme l'ensemble de la littérature internationale sur le sujet, l'identification de rétrocroisement au-delà de la 2^{ème} génération (dans le sens chien ou dans le sens loup) présente trop de risque d'erreur pour apporter une conclusion fiable.

Encart : Etudes et Recherche sur les hybrides

En marge du travail d'analyse dans le cadre du marché public, une phase d'études et recherche sur les hybrides a été menée sur 5 mois en 2018, entre autres pour s'assurer de la bonne résolution de notre méthode de détection des hybrides. Ce travail a permis de mesurer la variance des probabilités d'assignation, notamment au travers de simulations sur le jeu de données français (croisements virtuels d'animaux connus et vérification de l'assignation de leurs produits). Les intervalles de crédibilité de la probabilité d'assignation, mesurés sur chaque échantillon, permettent de classer les échantillons en « HYBF1 » si $p=0.5$ est inclus dans l'intervalle, dans le groupe « Loup » si la borne supérieure de l'intervalle contient $p=1$, et « back-cross » (BC) si les bornes de l'intervalle excluent 0.5 et 1. L'échantillon est assigné au groupe « Chien » lorsque l'intervalle de crédibilité contient $p=0$. NB : sur le graphique ci-contre, la probabilité d'assignation est représentée par la « Q-value ». Cette phase d'études et recherche a confirmé la robustesse de notre méthode et du jeu de marqueurs pour identifier les F1 sans risque, ainsi que les rétrocroisements de 2^{ème} génération avec un risque modéré de 6% d'erreur. Les potentiels rétrocroisements de générations antérieures sont trop dilués pour être détectés avec une robustesse suffisante (Beugin et al. en préparation).



RESULTATS

1/ Séquençage de l'ADN mitochondrial : tous les *Canis lupus lupus* sont de la lignée italo-alpine originelle, sauf deux

Sur les 1246 échantillons analysés, les séquences d'ADN mitochondrial proviennent pour 7% de renards, 6% (n=75) de *C. l. familiaris* et pour 76% (n=947) de *C. l. lupus* (figure 3). Tous les *C. l. lupus* sont de la lignée italo-alpine w22 (sensus nomenclature internationale de Pilot et al. 2010) sauf 4 échantillons appartenant à 2 individus différents provenant de Lozère. Ces derniers sont identifiés comme appartenant à une lignée proche de « w1 » (sensus Pilot et al. 2010) non encore recensée en France. Cette lignée - faussement dénommée « balte » par association géographique - est retrouvée dans de nombreux pays d'Europe de l'est incluant l'Allemagne, les pays baltes mais aussi en Pologne, Russie ou encore en Finlande. L'origine de ces deux animaux reste inconnue. Depuis la collecte des échantillons en 2017, aucune nouvelle donnée ne vient pour l'instant documenter leur présence, malgré les recherches intensives menées sur site ([Cf communiqué de presse](#)).

Un reliquat de 10% présente des séquences impossibles à examiner et/ou n'identifie que le genre sans possibilité de préciser l'espèce (i.e. *Canis* sp., n=25). Malgré leur ADN_m de faible qualité, une partie d'entre eux (n=19) est « repêchée » par l'analyse concluante de leur ADN nucléaire permettant leur assignation à la sous espèce loup ou chien.

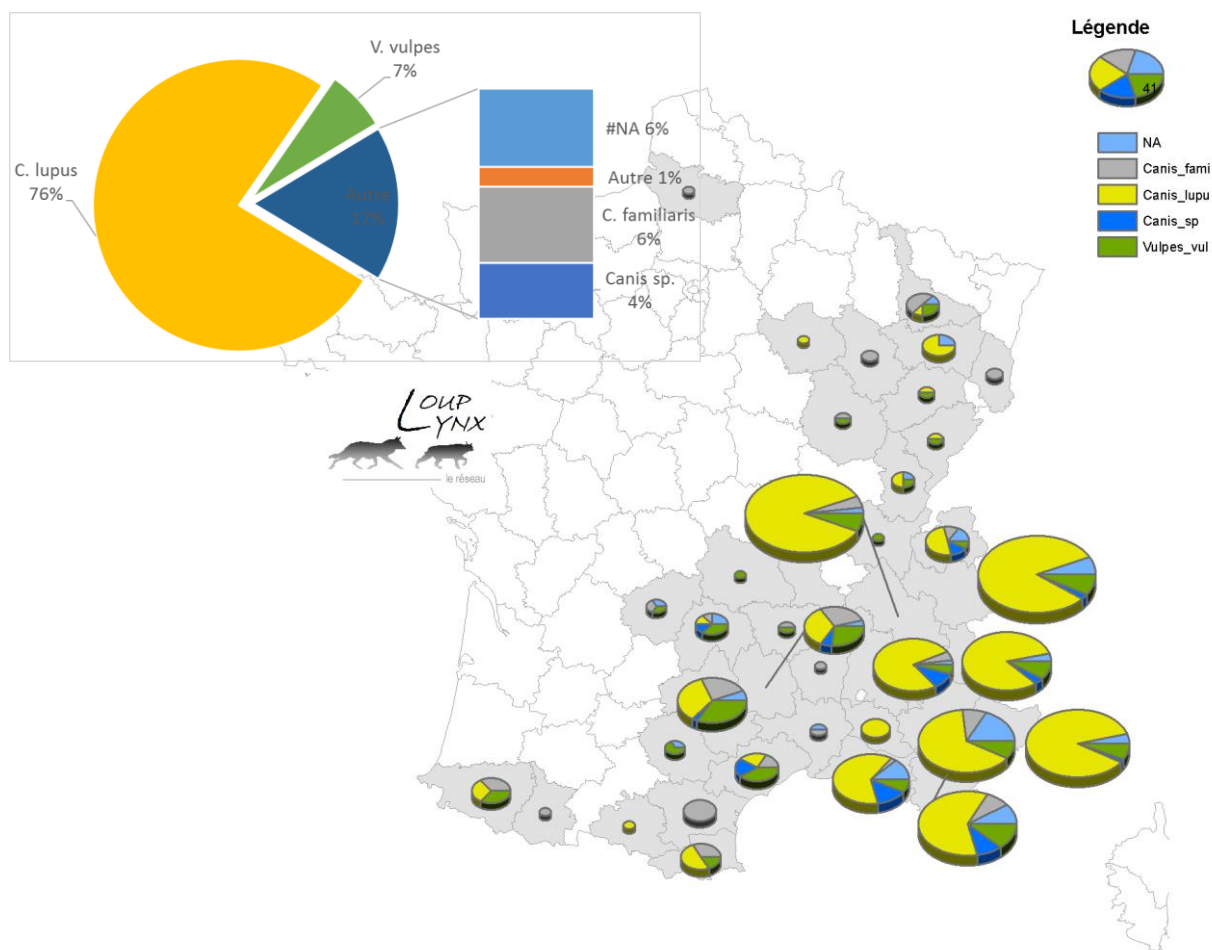


Figure 1 : Répartition géographique des résultats des analyses d'ADN mitochondrial. Le pourcentage de *C. l. lupus* est plus important dans le massif alpin, où le volume disponible d'échantillons permet aux correspondants du réseau Loup de sélectionner les plus caractéristiques. Les consignes de récolte des échantillons sur le front de colonisation sont volontairement moins sélectives en regard de leur faible nombre, dans l'objectif de détecter toute nouvelle présence potentielle de l'espèce.

2/ L'obtention de l'ensemble des profils génétiques individuels collectés depuis 2008

Parmi les 1246 échantillons analysés, 763 profils individuels différents ont pu être dressés, certains étant identifiés à plusieurs reprises. Sur ces 763 empreintes, 124 possédaient un indice qualité et/ou un nombre de marqueurs insuffisants pour être interprétés. Ainsi 53 empreintes individuelles de chiens, et 586 empreintes individuelles de loups ont pu faire l'objet d'analyses pour caractériser le degré d'hybridation (cf. ci-après).

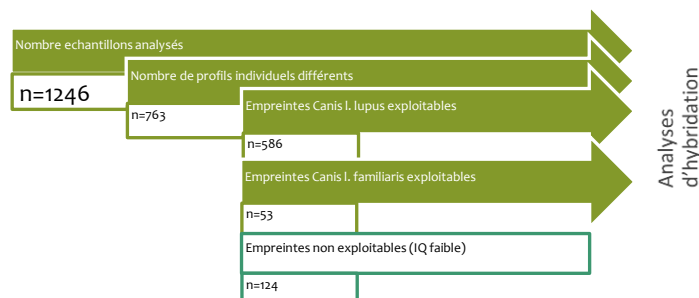


Figure 2 : Nombres d'échantillons analysés en 2018 et décomposition des résultats.

Il faut bien comprendre que ces profils génétiques ne proviennent pas tous d'animaux encore vivants mais bien d'échantillons récoltés lors des dix dernières années. A ce titre ils ne représentent pas l'effectif contemporain. En revanche, c'est sur ce panel d'animaux connus, dont la signature génétique sera retrouvée (ou pas) d'une année sur l'autre au travers de leurs fèces, urines ou poils laissées sur le terrain, que l'on va pouvoir établir des historiques de suivi de chaque animal pré-identifié. Ces historiques vont être utilisés pour calculer le risque statistique de « rater » un animal alors que celui-ci est bien vivant. C'est précisément cette mesure de la probabilité de détection qui va servir, grâce à des modèles mathématiques dédiés de « capture – marquage (génétique) – recapture », de facteur de correction à l'estimation de l'effectif de la population, mise à jour annuellement à la fin de chaque hiver (cf. [Bulletin Loup hiver 2017-2018](#)).

3/ Quid des Chiens-loup et races de chiens issues d'une hybridation ?

Issus du croisement récent d'une louve et d'un berger allemand au milieu des années 30 et 50 respectivement, les chiens de race « Chien-loup de Sarloss » (louve d'origine sibérienne) et « Chien-Loup tchèque » (louve d'origine des Carpates) ont hérité, de fait, de nombreuses caractéristiques lupines. La ressemblance morphologique reflète la forte proximité génétique. La question se posait donc de savoir si le panel de marqueurs utilisés permettait de distinguer ces races de chien-loup.

Deux échantillons provenant d'animaux de ces races ont été analysés en aveugle. Les résultats confirment le portage d'un ADN mitochondrial de loup d'« Europe de l'est » (en général w7, w23 ou w14, sensus Pilot et al. 2010). L'assignation de leur profil génétique les classe en revanche sans ambiguïté dans la classe « Chien » (cf tableau 1 - probabilité d'être assigné à la classe « Loup » comprise entre 0% et 17%). Ainsi, bien que ces races de chiens soient porteurs potentiels d'un haplotype de loup, notre méthode permet, à l'instar d'autres études sur le sujet (Smetanova et al. 2015), de les différencier clairement des profils génétiques de loups purs, quelle que soit leur lignée. Une dépouille retrouvée dans les Alpes maritimes en 2015 appartient également à cette catégorie de chien.

Série	N_Antagene	Nu_ONCFS	Genotype_trans	Type	Tri	IQ	mtDNA	mitotype	DNA_ext	Sexe	Hybridat	Proba_Loup	CI95_bot	CI95_up	
2018-S4	584277	D7017001	CHS55-31	D	2-Chien		1 Canis lupus	Saarloos (w14)		XY	Chien	0,006	0,000	0,062	
2018-S4	584262	D1216001	CHS55-29	P	2-Chien		0,99 Canis lupus	Saarloos (w7)		XX	Chien	0,003	0,000	0,039	
2017-S1	543620	D0615014	CHS52-19	D	2-Chien		1 Canis lupus	Saarloss (w23)		XY	Chien	0,025	0,000	0,172	
					01-AHT103	02-AHT111	03-AHTk211	04-FH2096	05-CPH02	06-FH2088	07-C09173	08-CPH05	09-FH2004	10-CFX3037	11-CXX279
	584277	D7017001			096102	098104	092092	092096	114114	132132	124132	127131	239301	172172	118118
	584262	D1216001			098098	104104	086088	096100	114114	132132	124124	131131	235239	168172	124124
	543620	D0615014			100102	102102	088090	096096	114118	120128	124126	127131	301301	176176	122124
					12-C09250	13-FH2161	14-FH2140	15-INU030	16-FH2137	17-FH2054	18-C27442	19-Dbar1	20-REN162C04	21-PEZ17	22-FH2010
	584277	D7017001			166176	237241	127131	150152	181181	172172	186188	219246	201203	206210	245253
	584262	D1216001			166166	237237	126126	150150	165181	141149	186186	243246	205215	206214	241245
	543620	D0615014			166166	229251	131131	146146	169183	141157	186190	182182	191201	193193	249249

Tableau 1 : Profils génétiques de 3 chiens-loups porteurs d'un ADN mitochondrial hérité de loup (lignées « Europe de l'Est ») et leurs allèles sur les 22 marqueurs. L'assignation statistique de leur profil génétique les classe sans ambiguïté dans la classe « Chien » (La borne inférieure de l'intervalle de crédibilité CI95_bot inclut zéro). La borne supérieure de l'intervalle de crédibilité de la probabilité d'appartenir à la classe « Loup » (CI95_up) ne dépasse pas 17%.

4/ Des expertises hors marché public, commanditées par les préfets

En marge du marché public contracté par l'ONCFS pour les analyses courantes, les préfets peuvent recourir à des analyses en urgence pour diagnostiquer une situation particulière, généralement dans les nouveaux départements concernés par une possible présence de loups. Des échantillons de Dordogne (n=3), Pyrénées atlantiques (n=11), Aube (n=1) ont utilisé cette procédure. La majorité des analyses sont restées infructueuses, en identifiant des espèces non cibles (notamment renard). Deux ont permis l'identification d'un loup respectivement dans l'Aube et dans les Pyrénées atlantiques, tous deux de lignée italo-alpine. L'animal identifié dans les Pyrénées atlantiques présentait des caractéristiques d'hybridation d'héritage ancien (cf [communiqué presse](#) préf 64⁴)

5/ Surveillance des taux d'hybridation : bilan rétrospectif

Les analyses d'hybridation ont été réalisées sur les 586 profils génétiques exploitables de loup et les 53 profils génétiques exploitables de chiens. L'analyse montre que tous les échantillons classés « loups » par l'analyse présentent des probabilités d'assignation à la population de référence en moyenne égales à 99% (variant de 94% à 100%). Des valeurs de probabilité d'assignation entre 36 et 77% caractérise les hybrides F1, tandis que les animaux porteur d'un potentiel héritage ancestral par rétrocroisements « BC » présente des probabilités d'assignation intermédiaires variant de 59% et 92% (cf. figure 5). Compte tenu de cette variance, quelques individus peuvent alors présenter des probabilités en limite de classe (par exemple un intervalle de confiance supérieur égal à 0.997 très proche de 1) dont la classification est soldée par expertise approfondie du génotypage concerné et de ses répétitions.

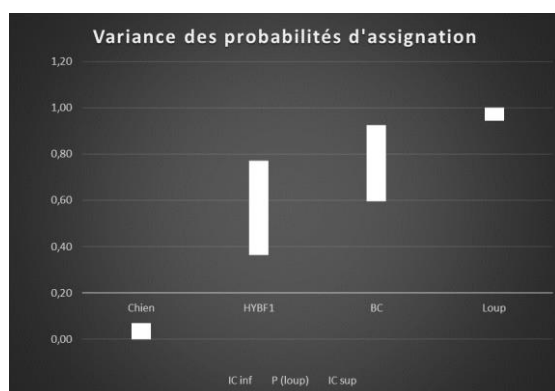


Figure 3 : Etendue des valeurs de probabilité d'assignation aux classes Loup, Chien, Hybride F1 (HYBF1) et rétrocroisement (Backcross BC). Un profil est classé Loup si l'intervalle de confiance de sa probabilité d'assignation contient 1 (100% de chance d'appartenir à la classe Loup), Chien si l'intervalle de confiance contient p=0, HybF1 si l'intervalle de confiance comprend p=0.5, ou BC si les bornes de son intervalle de confiance sont >0.5 et <1. (Voir encart 2)

⁴ <https://france3-regions.francetvinfo.fr/nouvelle-aquitaine/pyrenees-atlantiques/bearn/bearn-tirs-defense-autorises-apres-confirmation-du-loup-hybride-vallee-ossau-1528654.html>

Les 53 profils porteurs de l'Adn mitochondrial de *C. l. familiaris* sont tous assignés sans ambiguïté à la classe « Chien » par l'analyse microsatellite sans signe d'hybridation avec le loup.

Les résultats sur les 586 profils *C. l. lupus* montrent que :

- 88,7% (n=520) sont assignés sans ambiguïté à la classe « Loup », lignée italo-alpine). Dix profils dont la borne supérieure de l'IC de probabilité était non égale mais très proche de 100% ont été rattachés à cette catégorie, après expertise fine des génotypes.
- 3,6% (n=21) présentent un profil hybride de première génération dans le sens Louve x Chien (tableau 2). Parmi ces hybrides F1, 7 individus sont potentiellement issus d'une seule et même portée détectée en 2011 en Tinée (06) et 6 individus d'une même portée en 2015 en Maurienne (73).
- 7,5% (n=44) ont été identifiés comme porteurs de gènes de chiens hérités par rétrocroisements, héritage de leur ascendance plus ou moins lointaine. A noter que la fiabilité de ce diagnostic présente un risque non négligeable de 6% de faux diagnostic pour un héritage de 2^{ème} génération et de plus de 45% de risque de faux diagnostic pour les héritages plus anciens.
- 0.2% (n=1) représente le profil w1 (parmi les deux individus, un seul présente un génotype exploitable) dont l'analyse d'hybridation est sans objet car non assignable à une population de référence potentielle en l'absence de connaissance complémentaire de son origine naturelle ou captive.

Sur les deux dernières années écoulées, la situation contemporaine se résume donc à 4 individus hybrides F1 détectés en 2017 et 2018 :

- une louve morte lors d'une collision en Maurienne (73) en 2017
- une louve tuée en Tinée (06) en 2017 (annoncé au Groupe national Loup de 2018)
- une louve encore présente en Maurienne en 2018 retrouvée au travers d'un dépôt d'urine,
- un loup mâle identifié par une fèces récoltée en 2017 dans le Vercors (26) non retrouvé depuis.

La cartographie par périodes (figure 6) montre que l'occurrence des hybrides de première génération ne persiste pas au fil des années. En 2011 en revanche, plusieurs animaux hybrides détectés au même endroit en Tinée (06) a conduit à la comparaison de ces empreintes localisées à un instant donné : après analyse comparative deux à deux, ces profils présentent tous les points communs pour identifier une portée unique issue d'un accouplement louve x chien dont les 7 descendants (HYB F1) ne sont pas retrouvés depuis 2014 dans les échantillons jusqu'ici analysés. De même en Savoie (73), la comparaison deux à deux des individus F1 sur le même secteur de moyenne Maurienne montre que 6 individus sont apparentés, et issus d'une portée hybrides en 2015, localisée en bordure des deux meutes connues de Haute-Maurienne et du Thabor-Galibier. Si la présence d'animaux était bien documentée sur ce secteur par le Réseau, l'analyse génétique confirme ici une reproduction.

Depuis, trois de ces animaux sont déjà morts, deux autres non retrouvés depuis 2016. Une femelle encore vivante est retrouvée par la génétique au travers d'un dépôt d'urine en 2018. La collecte des crottes et autres échantillons biologiques opérée par le Réseau assure la continuité annuelle du suivi moléculaire de la population de loups pour, le cas échéant, détecter ces animaux si ceux-ci sont encore vivants.

Le suivi génétique des loups en 2018

Tableau 2 : Liste des 21 Hybrides F1 identifiés en primo-détection entre 2008 et 2018. F=Fèces ; D=Dépourille. IQ=indice qualité. Identification des mitotypes initialement réalisé par le LECA et ensuite sur la base de la nomenclature de Pilot 2010, les deux étant identiques sur la séquence type de la région de contrôle.

Type	N° Dp t	Année_ primo_ détection	N°Ref	Massif	Nom commune	Genot ype_n om	DNA _{mt}	mitotype (Pilot 2010)	Hybrida tion	IQ	Statut actuel
F	06	2011	1109190	Hte Tinée	ST ETIENNE DE T.	S36-H3	C. l. lupus	italo-alpine (w22)	HYBF1	0,843	disparu depuis 2013
F	06	2011	1112261	Hte Tinée	ISOLA	S36-H4	C. l. lupus	italo-alpine (LECA)	HYBF1	0,993	disparu depuis 2012
F	06	2011	111216	Hte Tinée	ST ETIENNE DE T.	S36-H6	C. l. lupus	italo-alpine (LECA)	HYBF1	0,8504	disparu depuis 2011
F	06	2011	111204	Hte Tinée	ST ETIENNE DE T.	S36-H7	C. l. lupus	italo-alpine (w22)	HYBF1	0,958	disparu depuis 2014
F	06	2011	111219	Hte Tinée	ST ETIENNE DE T.	S36-H1	C. l. lupus	italo-alpine (w22)	HYBF1	0,932	disparu depuis 2012
F	06	2012	1201064	Hte Tinée	ENTRAUNES	S36-H2	C. l. lupus	italo-alpine (LECA)	HYBF1	0,791	disparu depuis 2012
F	06	2012	1203186	Hte Tinée	GUILLAUMES	S36-H8	C. l. lupus	italo-alpine (w22)	HYBF1	0,718	disparu depuis 2012
F	06	2013	1312034	Hte Tinée	CHATEAUNEUF D E.	S38-19	C. l. lupus	italo-alpine (LECA)	HYBF1	0,972	disparu depuis 2013
F	73	2013	F7313017	Hte Maurienne	VILLARODIN BOUR.	S33-7	C. l. lupus	italo-alpine (w22)	HYBF1	0,677	Vivant en 2018
F	06	2014	1401049	Hte Tinée	ST ETIENNE DE T.	S55-08	C. l. lupus	Italo-alpine (w22)	HYBF1	0,71	disparu depuis 2014
D	73	2015	D7315006	Hte Maurienne	ST ANDRE	S46-8	C. l. lupus	italo-alpine (w22)	HYBF1	0,916	Mort (tir)
D	06	2015	D0615010	Moy Tinée	ISOLA	S49-13	C. l. lupus	italo-alpine (w22)	HYBF1	1	Mort (tir)
D	06	2015	D0615009	Moy Tinée	ISOLA	S49-12	C. l. lupus	italo-alpine (w22)	HYBF1	1	Mort (tir)
D	73	2015	D7315008	Hte Maurienne	MODANE	S54-13	C. l. lupus	italo-alpine (w22)	HYBF1	1	Mort (chute)
F	73	2015	F7315050	Hte Maurienne	VILLARODIN BOUR.	S56-28	C. l. lupus	Italo-alpine (w22)	HYBF1	0,625	disparu depuis 2015
F	04	2015	F0415061	Coulomp Daluis	THORAME HAUTE	S56-25	C. l. lupus	Italo-alpine (w22)	HYBF1	0,79	disparu depuis 2015
D	26	2016	D2616004	Roanne	VOLVENT	S54-07	C. l. lupus	italo-alpine (w22)	HYBF1	1	Mort (tir)
F	73	2016	F7316016	Hte Maurienne	MODANE	S56-01	C. l. lupus	Italo-alpine (w22)	HYBF1	1	disparu depuis 2016
D	73	2017	D7317013	Galibier Thabor	FRENEY	S56-29	C. l. lupus	Italo-alpine (w22)	HYBF1	1	Mort (collision)
F	26	2017	F2617035	Vercors HP	LA CHAPELLE EN V.	S55-13	C. l. lupus	Italo-alpine (w22)	HYBF1	0,880	Vivant en 2017
D	06	2017	D0617015	Moy Tinée	ROUBION	S55-42	C. l. lupus	Italo-alpine (w22)	HYBF1	1	Mort (tir)

Chaque année sont également identifiées des empreintes présentant un degré d'introgression plus ancien par héritage de la génération précédente. Ces 44 empreintes reflétant des rétrocroisements ou « backcross » entre un F1 et un loup (cf. supra) apparaissent ponctuellement dans tous les départements alpins selon les années et de façon anecdotique sur un cas dans les Pyrénées ou encore l'animal mort dans le Doubs. Par effet de dilution, l'influence de ces profils sur le patrimoine génétique des espèces s'efface, pour autant que les accouplements hybrides chien/loup à l'origine des F1 ne soit pas récurrents en amont. Une récurrence plus marquée de profils « BC » apparait en Maurienne (73) sur la période récente. La possibilité d'une reproduction d'un des F1 précédemment identifiée sur ce site est possible, que seules des analyses plus poussées des liens de parenté sur plusieurs années pourront éclairer. Le nombre de BC est plus important sur la dernière biennale mais l'échantillonnage concerne majoritairement les animaux morts analysés en priorité. L'échantillonnage sur ces années reste encore incomplet (rattrapage en cours) pour l'ensemble des échantillons récoltés par le Réseau pour pouvoir analyser une évolution temporelle des fréquences d'apparition. Contrairement aux hybrides de 1^{ère} génération identifiables quasiment sans faille, il faut noter que le risque de faux diagnostic est non négligeable (6% en 2^{ème} génération) pour l'identification d'un rétrocroisement (BC) : un génotypage incomplet sur certains marqueurs, une perte allélique ou encore un faux allèle peuvent en effet également créer du biais dans le diagnostic. Des recherches complémentaires sont en cours à l'échelle internationale sur ces points pour mesurer la robustesse d'identification de ces cas d'introgression héritée des générations précédentes.

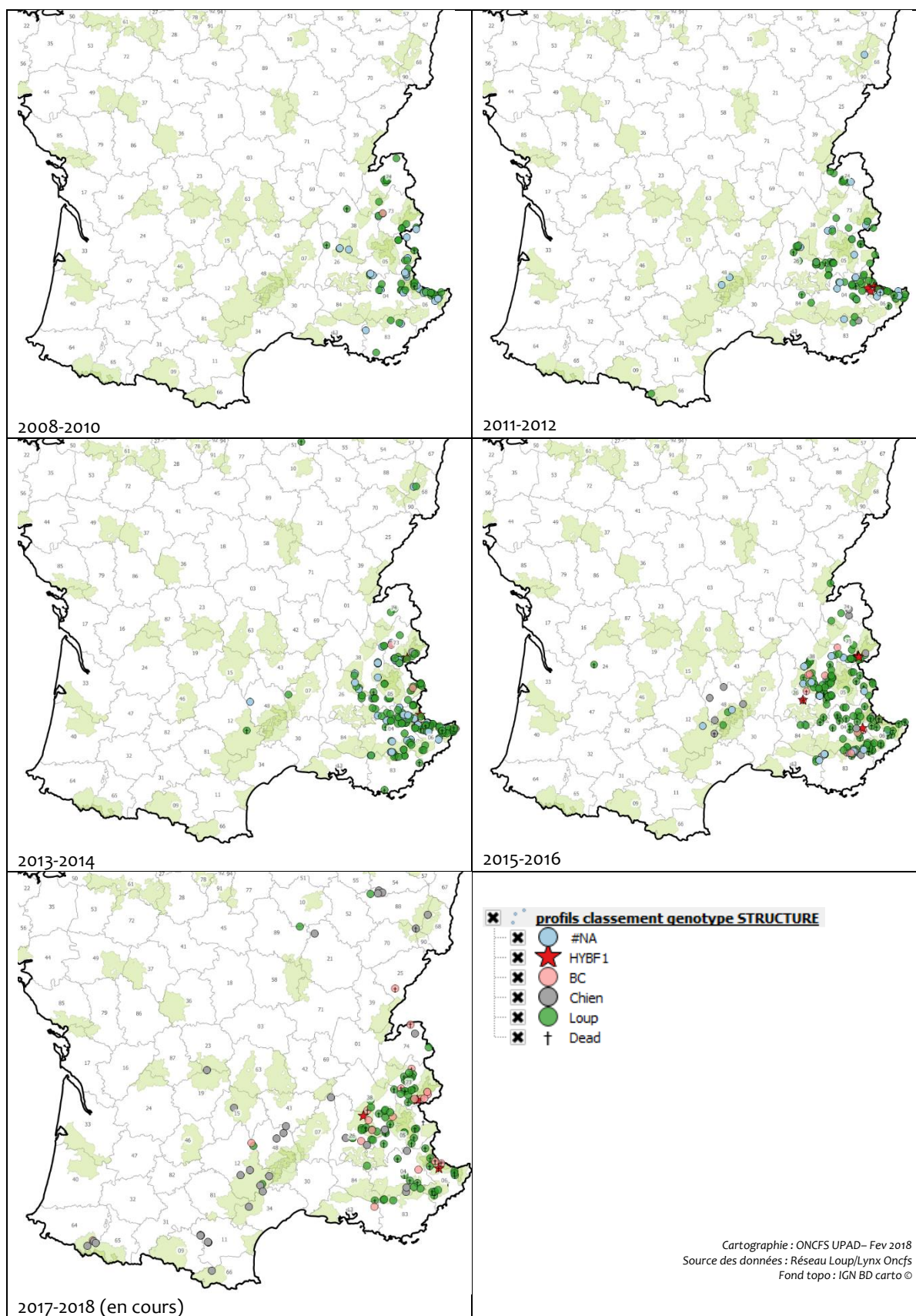


Figure 4 : Répartition géographique des profils génétiques des différents loups et chiens échantillonnés depuis 2008 par période de 2 années. HYBF1 identifie les hybrides de première génération, BC les « backcross » (i.e. animaux dont le profil présente un héritage chien plus ancien). Les croix identifient les individus morts.

PUBLICATION DES DONNEES

Les données brutes sont communiquées en P.J.* de ce rapport. Celles-ci ne sont utilisables qu'avec l'accord préalable des auteurs et ne peuvent être détachées de leur contexte d'analyse et de production, détaillé ici. Les indices qualité associés aux génotypages sont notamment des clés de lecture importantes pour asseoir les interprétations.

Résultat d'un long et minutieux travail pour vérifier les profils, homogénéiser les nomenclatures anciennes, actuelles et passées, résoudre les incohérences, etc., la table de correspondance des profils génétiques ainsi finalisée permet d'assurer la continuité du suivi des animaux au travers des années. Chaque nouveau profil génétique (c'est-à-dire chaque nouvel individu) vient alimenter cette table. Il faut cependant noter que cet exercice difficile et chronophage est susceptible de faire l'objet de mises à jours rétroactives par exemple au fur et à mesure de la capitalisation de nouvelles données. Il convient de signaler deux principaux écueils dans lesquels il ne faudrait pas tomber à la lecture de ces résultats :

- Les différents niveaux de résultats (échantillons, génotypes répétés, profils, animaux individualisés) font l'objet de consolidations, *a posteriori*, soit par correction des données, consolidation des empreintes partielles, vérification de la cohérence avec les données de terrain, etc. Il faut avoir conscience que ces résultats **sont dynamiques et non pas garantis fixe une fois pour toutes**. A titre d'exemple, le génotype partiel d'un animal peut être amené à être complété (ou infirmé) lors d'une recapture ADN, mettant à jour en cascade le profil consolidé, son indice qualité, l'animal identifié, ses recaptures, et éventuellement le niveau d'hybridation qui se basera sur une empreinte de meilleure qualité que la précédente.
- Par souci de transparence, nous présentons ici les résultats pour chaque échantillon (identifiés par leur numéro unique assurant la traçabilité). Un même individu peut donc présenter une empreinte qui diffère légèrement (notamment pour les empreintes de qualité suffisante mais incomplètes sur les 22 marqueurs) demandant une expertise consensus pour son identification. Si notre expertise conclue à un même individu, son profil génétique est amendé.

Les résultats des analyses génétiques étaient jusqu'ici publiés dans les bulletins Loup du Réseau disponibles en ligne sur le site de l'ONCFS. Ils étaient associés à la liste exhaustive des indices de présence. L'objectif visait avant tout à effectuer un retour vers les correspondants du Réseau Loup Lynx et collecteurs de terrain, pour vérifier que l'ensemble des indices soient bien pris en compte. Cela permettait également un retour vers les acteurs locaux. La stratégie de publication de l'ONCFS sur le loup évolue par le biais du nouveau site internet ONCFS spécialement dédié au Loup (<https://www.loupfrance.fr>). Cet outil vise une meilleure réactivité par la publication d'actualités mensuelles et la mise en ligne des bilans périodiques du suivi patrimonial du loup. Les productions basées sur nos études et recherches tel que ce rapport, alimenteront au fur et à mesure l'onglet [Boîte à outils](#). De plus, à la manière des rubriques « Zoom sur » des bulletins du réseau, l'ONCFS s'attachera à la production d'analyses plus fines qui correspondent mieux à la visualisation des animaux dans leurs territoires, pour faciliter l'interprétation biologique locale.

* Pour pouvoir afficher les pièces jointes, vérifiez dans la barre du lecteur PDF que l'option Afficher > Afficher / Masquer > Volets du navigateur > Pièces jointes est cochée puis cliquez dans la barre à gauche du document PDF sur le symbole en forme de trombone.

BIBLIOGRAPHIE

- Benson DA, Ilene Karsch-Mizrachi, David J. Lipman, James Ostell and David L. Wheeler (2015) GenBank. *Nucleic Acids Research*, 33 doi:10.1093/nar/gkio63
- Bohling JH, Waits LP (2011) Assessing the prevalence of hybridization between sympatric *Canis* species surrounding the red wolf (*Canis rufus*) recovery area in North Carolina, *Molecular Ecology*, 20-10, 2142-2156
- Duchamp C, Quenette PY (2005) La génétique non-invasive au service de l'étude des espèces protégées : le cas du loup et de l'ours brun. *Faune Sauvage* 265 : 47-54. ONCFS (ed)
- Duchamp C, et al. (2012) A dual frame survey to assess time and space – related changes of the colonizing wolf population in France. *Hystrix, It. J. of Mammalogy*, 23(1) : 14 -28
- Fabbri E, et al. (2014) Genetic structure of expanding wolf (*Canis lupus*) populations in Italy and Croatia, and the early steps of the recolonization of the Eastern Alps, *Mammalian Biology*, 79-2, 138-148
- Falush D, et al. (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567-1587
- Godinho R, et al. (2011) Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*, 20, 5154-5166
- Godinho R, et al. (2014) Real-time assessment of hybridization between wolves and dogs: combining non-invasive samples with ancestry. *Molecular Ecology Resources*, 15, 317-328
- Harms V, et al. (2015) Experimental evaluation of genetic predator identification from saliva traces on wildlife kills. *Journal of Mammalogy*, 96(1):138–143, 2015
- Dufresnes, C, et al. (2019) Two decades of non-invasive genetic monitoring of the grey wolves recolonizing the Alps support very limited dog introgression. *Scientific Reports* 9:148 | DOI:10.1038/s41598-018-37331
- 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
- Lucchini V, et al. (2004). Evidence of genetic distinction and long-term population decline in wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines. *Mol. Ecol.* 13(3):523-36.
- Miquel C, et al. (2006) Quality indexes to assess the reliability of genotypes in studies using noninvasive sampling and multiple-tube approach. *Molecular Ecology*, 6-4, 985-988
- Pilot M, et al (2010) Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Evolutionary Biology* 2010, 10:104
- Pires AE, et al (2006) Mitochondrial DNA sequence variation in Portuguese native dog breeds: diversity and phylogenetic affinities, *Journal of Heredity*, 4, 318-330
- Pritchard JK, et al (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155, 945–959
- Randi E, et al. (2000) Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization, *Conservation Biology*, 14, 464-473

Taberlet P & Luikart G (1999) Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society* 68:41–55.

Valière N & Taberlet P (2000) Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. *Molecular Ecology* 9, 2149–2154

Vila et al. (1999) Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the gray wolf *Canis lupus*. *Mol Ecol* 8: 2089–2103.

CONTRIBUTIONS - REMERCIEMENTS

Ce travail est le fruit de l'investissement initial de l'ensemble des correspondants du Réseau Loup Lynx qui contribuent tout au long des années à l'échantillonnage de terrain et à la collecte des échantillons. Les animateurs régionaux du Réseau constituent la plaque tournante essentielle de coordination, consolidation, traçabilité et interprétation biologique de l'ensemble des données. Enfin les équipes d'ANTAGENE ont œuvré durant l'année en complément des prestations pour élaborer les protocoles toujours plus optimisés dans un cadre de recherche et développement scientifique.

Ce travail est financé sur la base d'un appel d'offre à marché public N°2017-01 sur ressources propres ONCFS et subventions ministérielles dédiées. La DREAL AURA a contribué à un financement complémentaire pour l'étude de l'hybridation.

ANNEXES

1/ METHODOLOGIE D'ANTAGENE

La méthodologie détaillée est disponible dans le rapport Antagene en ligne

<http://www.oncfs.gouv.fr/IMG/pdf/ANTAGENE-Rapport-ONCFS-Loup310817.pdf>



Rapport d'Expertise

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.

2/ LISTE DES MARQUEURS



Analyses génétiques chez le Loup (*Canis lupus*)

Rapport

Annexe A

Liste des 24 marqueurs (dont 22 marqueurs microsatellites)

Marqueur (ordre empreinte)	Origine
AMEL-A	Sexe
AMEL-B	Sexe
AHT103	Hybridation
AHT111	Hybridation
AHTk211	Hybridation
FH2096	ONCFS
CPH02	Europe
FH2088	Europe
C09.173	Hybridation
CPH05	Europe
FH2004	Europe
CFX30371	Hybridation
C22.279	Hybridation
C09.250	Europe
FH2161	ONCFS
FH2140	ONCFS
INU030	Hybridation
FH2137	ONCFS
FH2054	ONCFS
C27.442	Hybridation
Dbar1	Hybridation
REN162C04	Hybridation
PEZ17	ONCFS
FH2010	Hybridation

3/ SEQUENCE TYPE D'ADNM DE LA REGION DE CONTROLE– HAPLOTYPES W22

(sensus Pilot et al2010) caractéristique de la lignée populationnelle italo-alpine retrouvé en Italie, France, et Suisse.

>582208

```
TCCCCGGTCTTGTAACCAAAAATGGAGAGTAACCGCCCTCCCTAAGACTCAAGGAAGAAGCTCTTGCTCCACCATCAGCACC  
CAAAGCTGAAATTCCTTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTC  
CAGGTAAACCCCTTCTCCCTCCCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGTTTGCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTATA  
TCCTTACATAGGACATACTAACTCAATCTCACAATTCAGTACCTATCAACAGTAATCGAATGCATATCACTTAGTCCAATAA  
GGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCCTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCCCATACTAACGTGGG  
GGTACTATCATGAACTATACCTGGCATCTGGTTCCTACTTCA
```