

Vieux loups sauvages : une enquête sur l'ADN ancien dévoile la dynamique des populations dans des vestiges Italiens du Pléistocène supérieur et de l'Holocène



Submitted 26 March 2018
Accepted 7 January 2019
Published 27 March 2019

Corresponding author
Marta Maria Ciucani,
martamariaciucani@gmail.com

Academic editor
Antonio Amorim

Additional Information and
Declarations can be found on
page 16

DOI 10.7717/peerj.6424

Old wild wolves: ancient DNA survey unveils population dynamics in Late Pleistocene and Holocene Italian remains

Marta Maria Ciucani^{1,2,*}, Davide Palumbo^{3,*}, Marco Galaverni^{4,5}, Patrizia Serventi^{1,6}, Elena Fabbri⁵, Gloria Ravegnini⁷, Sabrina Angelini⁷, Elena Maini⁸, Davide Persico⁹, Romolo Caniglia⁵ and Elisabetta Cilli¹

¹ Laboratories of Physical Anthropology and Ancient DNA, Department of Cultural Heritage, University of Bologna, Ravenna, Italy

² Natural History Museum of Denmark, Copenhagen, Denmark

³ Ente di Gestione per i Parchi e la Biodiversità Emilia Orientale, Monteveglio, Italy

⁴ Conservation Unit, WWF Italia, Rome, Italy

⁵ Unit for Conservation Genetics (BIO-CGE), Italian Institute for Environmental Protection and Research (ISPRA), Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy

⁶ Department of Biological, Geological & Environmental Sciences—BiGeA, University of Bologna, Bologna, Italy

⁷ Department of Pharmacy and Biotechnology, University of Bologna, Bologna, Italy

⁸ ArcheoLaBio—Research Centre for Bioarchaeology, Department of History and Culture, University of Bologna, Ravenna, Italy

⁹ Department of Chemistry, Life Sciences and Environmental Sustainability, University of Parma, Parma, Italy

* These authors contributed equally to this work.

Résumé

Contexte : Le loup Italien contemporain (*Canis lupus italicus*) représente un cas d'unicité morphologique et génétique. Aujourd'hui, les loups Italiens sont également la seule population documentée à appartenir exclusivement à l'haplogroupe mitochondrial 2, qui était le plus répandu chez les loups d'Eurasie et d'Amérique du Nord au cours du Pléistocène tardif. Cependant, la dynamique menant à une telle spécificité est encore débattue.

Méthodes : Afin de faire la lumière sur l'ancienne variabilité génétique de cette population de loups et sur l'origine de sa diversité actuelle, nous avons collecté 19 échantillons du Pléistocène tardif-Holocène dans le nord de l'Italie, que nous avons analysés au niveau d'une courte portion de la région hypervariable 1 de l'ADN mitochondrial, hautement informative pour les analyses phylogénétiques des loups et des chiens.

Résultats : Quatre des six haplotypes détectés correspondent à ceux trouvés chez les anciens loups d'Europe du Nord et de Bérिंगie, ou chez les loups Européens et Chinois modernes, et semblent étroitement liés aux deux haplotypes actuellement trouvés chez les loups Italiens. L'haplotype de deux échantillons du Pléistocène tardif correspondait aux séquences de chiens primitifs et contemporains du clade mitochondrial canin A. Tous ces haplotypes appartenaient à l'haplogroupe 2, la seule exception étant un échantillon holocène daté de 3 250 ans, affilié à l'haplogroupe 1.

Discussion : Dans cette étude, nous décrivons la variabilité génétique des plus anciens spécimens de loups d'Italie analysés jusqu'à présent, fournissant un aperçu préliminaire de la composition génétique de la population qui a habité cette région du dernier maximum glaciaire à la période du Moyen Âge. Nos résultats confirment que la diversité génétique des loups du Pléistocène analysés ici présente une forte continuité avec d'autres spécimens de loups d'Eurasie du Nord de la même période chronologique. En revanche, les échantillons holocènes ont montré une plus grande similarité uniquement avec les séquences modernes d'Europe et d'Asie, et

l'apparition d'un haplotype de l'haplogroupe 1 a permis de dater les découvertes précédentes sur sa présence dans cette région. De plus, la découverte inattendue d'un échantillon vieux de 24 700 ans portant un haplotype qui, d'après le fragment obtenu ici, appartient au clade canin A, pourrait représenter la plus ancienne preuve en Europe de ce clade riche en chiens. Tous ces résultats suggèrent une dynamique de population complexe qui mérite d'être étudiée de manière plus approfondie sur la base du séquençage mitochondrial ou du génome entier.

INTRODUCTION

Le loup gris (*Canis lupus*) est le grand carnivore le plus répandu de la région holarctique (Mech & Boitani, 2010). Sa grande mobilité et sa capacité de dispersion lui permettent de parcourir 100 kilomètres (Fritts, 1983 ; Valière et al., 2003 ; Ciucci et al., 2009 ; Andersen et al., 2015) et favorisent le flux génétique entre les populations. Néanmoins, l'existence de populations de loups contiguës différenciées liées à des spécialisations en matière d'habitat et de proies a été bien documentée (Carmichael et al., 2001 ; Geffen, Anderson & Wayne, 2004 ; Musiani et al., 2007). En outre, au cours des deux derniers siècles, cette espèce a connu des changements démographiques complexes et dramatiques (Breitenmoser, 1998), et ce n'est qu'au cours des dernières décennies qu'elle s'est rétablie et développée avec succès grâce à la protection légale et aux changements socio-écologiques (Chapron et al., 2014). Cette combinaison de facteurs rend l'histoire phylogéographique du loup complexe et difficile à démêler des modèles génétiques contemporains (Randi, 2011 ; Ersmark et al., 2016). De plus, en Eurasie, les grands écarts spatio-temporels entre les échantillons anciens analysés jusqu'à présent nous ont fourni une image de la dynamique des populations de loups au cours des 50 000 dernières années, mais étant donné la complexité des migrations et des mélanges de populations, celle-ci était très probablement plus complexe et mérite d'être analysée avec des efforts supplémentaires d'échantillonnage et de génotypage sur des restes anciens (Pilot et al., 2010 ; Ersmark et al., 2016).

À ce jour, un certain nombre d'études ont tenté d'enquêter sur l'histoire de l'espèce en analysant l'ADN mitochondrial (ADNmt ; Pilot et al., 2010 ; Thalmann et al., 2013 ; Ersmark et al., 2016 ; Koblmüller et al., 2016) et les génomes nucléaires (vonHoldt et al., 2011 ; Skoglund et al., 2015 ; Fan et al., 2016) de spécimens anciens et modernes. En particulier, l'étude de Pilot et al. (2010) sur la région hypervariable de l'ADNmt (HVR) a suggéré l'existence de deux **haplogroupes** mitochondriaux de loups principaux et distincts (connus sous le nom de Hg1 et Hg2) dans les populations de loups Eurasiennes.

Alors que les spécimens pléistocènes de Béringie, décrits comme un **écomorphe** de loup hypercarnivore sur la base d'enregistrements morphologiques exhaustifs, ne portaient que des haplotypes Hg2 (Leonard et al., 2007), **en Europe, l'haplogroupe (Hg2), autrefois dominant et observé depuis 40 000 ans, a été largement remplacé par Hg1 au cours de l'Holocène**. Cela a entraîné la présence des deux haplogroupes à des fréquences variables dans les populations modernes, mais avec des haplotypes Hg1 atteignant une fréquence moyenne de 76% (Pilot et al., 2010). Cependant, une exception à ce schéma est représentée par la population de loups Italiens (*Canis lupus italicus*, Giuseppe Altobello, 1921 ; Montana et al., 2017a), tous appartenant exclusivement à Hg2 (Pilot et al., 2010).

En particulier, les loups Italiens présentent actuellement une nette singularité morphologique (Nowak & Federoff, 2002) et génétique au niveau mondial. Plus de 1 000 spécimens de loups

Italiens étudiés (base de données de l'Institut Italien pour la protection et la recherche environnementales -ISPRA-) au cours des 20 dernières années se sont révélés caractérisés par la présence de seulement deux haplotypes d'ADNmt distincts (Randi et al., 2000 ; Boggiano et al., 2013 ; Montana et al., 2017a). Des études supplémentaires ont montré que cette population est phylogénétiquement proche des loups du Pléistocène tardif (en se basant à la fois sur 582 paires de bases (pb) de la région d-loop, Ersmark et al., 2016 ; et sur l'ADNmt complet, Thalmann et al., 2013), et présente des fréquences d'allèles nucléaires distinctes (Pilot et al., 2010 ; vonHoldt et al., 2011 ; Montana et al., 2017a).

Les premières études sur les loups Italiens modernes ont émis l'hypothèse que leur spécificité pourrait être attribuée à l'isolement et à la dérive génétiques récents liés au **goulot d'étranglement** extrême provoqué par l'homme au milieu des années 1900 (Cagnolaro et al., 1974 ; Randi, Lucchini & Francisci, 1993), qui a entraîné la survie de seulement 100 à 200 individus dans les Apennins centraux et méridionaux (Zimen & Boitani, 1975 ; Mech & Boitani, 2010). A l'inverse, des travaux ultérieurs ont suggéré que leur déclin démographique aurait plutôt commencé à la fin du dernier maximum glaciaire (LGM), avec une réduction progressive à travers le temps similaire aux autres populations Eurasiennes (Fan et al., 2016), et seulement exacerbée par le **goulot d'étranglement** historique plus extrême de la population Italienne (Lucchini, Galov & Randi, 2004 ; vonHoldt et al., 2011 ; Boggiano et al., 2013 ; Pilot et al., 2014 ; Montana et al., 2017a, 2017b).

Malgré un nombre assez important d'études sur les loups Italiens modernes, une seule étude à ce jour a tenté d'enquêter sur la variabilité génétique des anciens *Canis lupus* de cette péninsule (Verginelli et al., 2005). Néanmoins, leurs analyses de quelques échantillons datés de 15 000 à 3 000 ans ont montré, pour la plupart d'entre eux, une attribution incertaine aux chiens ou aux loups, soit morphologiquement, soit génétiquement, soit les deux.

Par conséquent, dans cette étude, nous avons analysé 19 échantillons de canidés anciens collectés dans le nord des Apennins et dans la vallée du Pô (Italie), datés entre 25 000 et 890 ans, que nous avons séquencés au niveau du HVR1 de l'ADN mitochondrial, dans le but de : (1) étudier la variabilité génétique de l'ancienne population de loups Italiens ; et (2) retracer les origines de l'unicité génétique actuelle des loups Italiens.

MATÉRIAUX ET MÉTHODES

Collecte des échantillons et datation

Les restes squelettiques (os et dents) de 19 canidés Italiens du Pléistocène supérieur, de l'âge du bronze et du Moyen Âge (Tableau 1) ont été collectés sur trois sites différents situés dans le nord de l'Italie (voir Fig. S2 dans l'article supplémentaire S1 pour la carte des sites archéologiques). Deux d'entre eux, le site de Cava Filo (San Lazzaro di Savena, Bologne) et le site de Monterenzio Vecchio (Monterenzio, Bologne), sont situés dans le nord des Apennins, tandis que le troisième site se trouve sur la barre alluviale du Pô (province de Crémone). Les échantillons ont été fournis, respectivement, par le Musée préhistorique « Luigi Donini » (San Lazzaro di Savena, Bologne), par le Musée Archéologique « Luigi Fantini » (Monterenzio, Bologne) et par l'Université de Parme. Parmi les collections recueillies sur le site de Cava Filo, nous avons sélectionné 16 échantillons, attribuables à une fourchette chronologique comprise entre 25.000 et 17.220 ans (Tableau 1). Nous avons également sélectionné deux échantillons provenant du site archéologique de Monterenzio Vecchio, datés du début de l'âge du bronze tardif, il y a environ 3 250 ans (Guerra et al., 2010 ;

Maini, 2012). Le dernier échantillon analysé était un crâne de loup émergé d'une terrasse alluviale du fleuve Pô et daté par radiocarbone à 890 ans. Deux de nos échantillons, OWW9 et OWW19, ont été directement datés au radiocarbone, tandis que tous les autres ont été datés sur la base de la stratigraphie et de la culture matérielle du site archéologique où ils ont été trouvés ou sur la disponibilité de la datation au C14 d'autres échantillons dans la même unité stratigraphique ou à proximité (voir l'article supplémentaire S1, le Tableau 1 et le Tableau S1 pour des informations sur les spécimens, les dates et les sites d'échantillonnage).

Tableau 1. Liste des spécimens analysés dans cette étude avec les informations pertinentes

Museum ID	Sample ID	Site	Museum	Sample type	Age (BP)	Dating Reference
124	OWW1	Cava Filo	Prehistoric Museum "Luigi Donini"	tooth (molar)	22,285–17,869	<i>Pasini (1970), Paronuzzi et al. (2018)</i>
547	OWW2	Cava Filo	Prehistoric Museum "Luigi Donini"	tooth (molar)	22,285–17,869	<i>Pasini (1970), Paronuzzi et al. (2018)</i>
556	OWW3	Cava Filo	Prehistoric Museum "Luigi Donini"	tooth (canine)	22,285–17,869	<i>Pasini (1970), Paronuzzi et al. (2018)</i>
557	OWW4	Cava Filo	Prehistoric Museum "Luigi Donini"	radius (distal part)	22,285–17,869	<i>Pasini (1970), Paronuzzi et al. (2018)</i>
06–027	OWW5	Cava Filo	Prehistoric Museum "Luigi Donini"	ulna	23,940	<i>Paronuzzi et al. (2018)</i>
07–201	OWW6	Cava Filo	Prehistoric Museum "Luigi Donini"	metatarsal	17,550	<i>Paronuzzi et al. (2018)</i>
08–057	OWW7	Cava Filo	Prehistoric Museum "Luigi Donini"	front tooth	17,550	<i>Paronuzzi et al. (2018)</i>
09–049	OWW8	Cava Filo	Prehistoric Museum "Luigi Donini"	metapodium	23,940	<i>Paronuzzi et al. (2018)</i>
09–050	OWW9	Cava Filo	Prehistoric Museum "Luigi Donini"	radius	24,700	This study
09–072	OWW10	Cava Filo	Prehistoric Museum "Luigi Donini"	phalanx	23,940	<i>Paronuzzi et al. (2018)</i>
11–018	OWW11	Cava Filo	Prehistoric Museum "Luigi Donini"	metapodium	23,940	<i>Paronuzzi et al. (2018)</i>
11–035	OWW12	Cava Filo	Prehistoric Museum "Luigi Donini"	metapodium	17,550	<i>Paronuzzi et al. (2018)</i>
11–055	OWW13	Cava Filo	Prehistoric Museum "Luigi Donini"	metapodium	23,940	<i>Paronuzzi et al. (2018)</i>
11–083	OWW14	Cava Filo	Prehistoric Museum "Luigi Donini"	humerus (distal part)	23,940	<i>Paronuzzi et al. (2018)</i>
11–089	OWW15	Cava Filo	Prehistoric Museum "Luigi Donini"	metapodium (distal part)	23,940	<i>Paronuzzi et al. (2018)</i>
11–108	OWW16	Cava Filo	Prehistoric Museum "Luigi Donini"	metapodium	17,550	<i>Paronuzzi et al. (2018)</i>
MV 07	OWW17	Monterenzio Vecchio	Archaeological Museum "Luigi Fantini"	tooth (molar)	3,250	<i>Guerra et al. (2010)</i>
MV 2005	OWW18	Monterenzio Vecchio	Archaeological Museum "Luigi Fantini"	metatarsal	3,250	<i>Guerra et al. (2010)</i>
MSDP 348	OWW19	Po River	University of Parma	skull	890	This study

Note : Pour chaque échantillon, les identifiants sont indiqués ainsi que le site archéologique, les musées, le type de spécimen, l'âge et la référence de datation. Pour faciliter le placement temporel des échantillons dans le texte et dans les analyses, l'âge indiqué ici représente la moyenne de la gamme de données fournies par la datation C14 (pour Cava Filo et Po River) ou par la stratigraphie et la culture matérielle (pour Monterenzio Vecchio) (voir le tableau S1 pour des informations détaillées sur les analyses radiocarbone et l'estimation de l'âge)

Normes d'ADN ancien et extraction d'ADN...

Amplification et séquençage de l'ADN...

Identification des haplotypes et analyses phylogénétiques...

RÉSULTATS

Authenticité des résultats et taux de réussite des analyses d'ADN ancien

Les procédures effectuées et les critères stricts choisis pour cette étude afin d'estimer la fiabilité des résultats de l'ADN ancien (voir « Matériaux et Méthodes ») nous rendent confiants quant à l'authenticité des séquences extraites présentées ci-dessous (Gilbert et al., 2005). De plus, la validité a été soutenue par les preuves suivantes : (i) aucune contamination n'a été observée dans les extractions vierges ou les contrôles PCR négatifs inclus dans chaque réaction et (ii) tous les haplotypes consensus ont été déterminés à la fois par les séquences avant et arrière et également en utilisant des répliques multiples (c'est-à-dire des échantillons provenant d'extractions indépendantes et des amplifications effectuées à des moments différents).

En ce qui concerne le fragment de 57 pb, nous avons obtenu avec succès les séquences consensus de 11 des 19 échantillons qui étaient entièrement conformes aux critères d'authentification sélectionnés et ont donc été utilisés pour les analyses en aval. En ce qui concerne les huit échantillons restants, il n'a pas été possible d'obtenir une amplification réussie pour trois d'entre eux, tandis que les séquences des cinq autres échantillons ont été écartées en raison de divergences entre les électrophérogrammes obtenus. Bien que cela puisse être dû à des dommages post mortem, nous avons prudemment choisi de les exclure pour assurer la fidélité de l'ensemble de données. De plus, en raison de la fragmentation élevée de l'ADN, pour un seul échantillon (OWW9, daté de 24 700 ans) nous avons pu obtenir l'amplification des trois fragments (148 bp, 205 bp et 211 bp) pour la région la plus longue de 361 bp (voir Matériaux et Méthodes). Nos résultats et le taux d'échec élevé dans l'amplification de fragments plus longs confirment et soutiennent la diagenèse de l'ADN, en accord avec l'âge des échantillons.

Variabilité des haplotypes

Les 11 séquences fiables obtenues pour le fragment de 57 pb ont été regroupées en six haplotypes différents, tous ayant déjà été rapportés dans la littérature (Tableau 2).

L'haplotype de cinq échantillons (OWW8, OWW11, OWW13, OWW15, OWW16- appartenant à deux U.S. différentes, datées de 23 940 à 17 550 ans) correspond à celui rapporté d'un loup pléistocène trouvé en Belgique et daté de 26 200 ans (Stiller et al., 2006), et n'a été rapporté à ce jour dans aucun échantillon moderne. L'échantillon OWW9, vieux de 24 700 ans, ainsi que OWW4, correspondent à l'haplotype trouvé dans un spécimen holocène d'Allemagne (Stiller et al., 2006) daté de 2 000 ans, et dans un coprolithe de chien de 8 500 ans BP provenant de Russie (Zhilin et al., 2014). La même séquence a également été retrouvée chez 97 chiens modernes répartis dans le monde entier, chez un hybride moderne de chien-loup Iranien (Aghbolaghi et al., 2014) et chez un *Canis lupus* moderne de Chine (Ersmark et al., 2016). Le fragment plus long récupéré sur OWW9 a confirmé les corrélations mentionnées ci-dessus avec des échantillons modernes, mais il n'a pas été possible de le comparer avec des spécimens anciens en raison de leurs fragments plus courts disponibles. Compte tenu des résultats obtenus, les analyses sur cet échantillon visaient néanmoins à approfondir la relation phylogénétique avec les chiens, ce qui a mis en évidence que cet haplotype se situe dans le clade A canin (Thai, Chung & Tran, 2017). L'échantillon OWW12, vieux de 17 550 ans, partageait l'haplotype de plusieurs loups anciens d'Alaska, de Russie et de République Tchèque, âgés de 15 000 à 47 000 ans (Stiller et al., 2006 ; Leonard et al., 2007 ; Thalmann et al., 2013) et d'un chien des rues moderne de Bali (Irion et al., 2005) (voir Tableau 2). Les trois échantillons

holocènes de Monterenzio Vecchio et de la rivière Po ne présentaient aucune similitude avec les échantillons anciens rapportés dans la littérature : OWW17 avait le même haplotype qu'un loup Hongrois moderne (détenu dans un zoo et d'origine inconnue ; numéro d'accèsion GenBank : KP665919) et qu'un chien Chinois (numéro d'accèsion GenBank : KJ139080), tandis que OWW18 présentait le même haplotype que certains loups Ibériques existants et OWW19 correspondait à l'haplotype de loup Grec W15 (Montana et al., 2017b).

Tableau 2. Haplotypes et haplogroupes attribués aux échantillons sur la base des séquences courtes (57bp) obtenues dans le cadre de cette étude et des concordances avec les séquences disponibles dans GenBank

ID sample	Age (BP)	mtDNA Haplogroup	Match—ancient samples from GenBank	Match—modern samples from GenBank	Haplotype ID (modern samples)
OWW4; OWW9	24,700–17,869	2	<i>C. lupus</i> —Germany 2.000— <i>Stiller et al. (2006)</i> (DQ852651) <i>C. lupus</i> —Russia 8.500*— <i>Zhilin et al. (2014)</i> (LM993795)	97 modern sequences <i>C. l. familiaris</i> hybrid <i>C. lupus</i> —Iran (KC540925) <i>C. lupus</i> —China (KX898354)	D5–D6
OWW8; OWW11; OWW13; OWW15; OWW16	23,940–17,550	2	<i>C. lupus</i> —Belgium 26.200— <i>Stiller et al. (2006)</i> (DQ852650)	/	/
OWW12	17,550	2	<i>C. lupus</i> —Alaska 20.800— <i>Thalmann et al. (2013)</i> (KF661090) <i>C. lupus</i> —Russia 33.500— <i>Thalmann et al. (2013)</i> (KF661092) <i>C. lupus</i> —Alaska 17.300*— <i>Leonard et al. (2007)</i> <i>C. lupus</i> —Alaska 15.800*— <i>Leonard et al. (2007)</i> <i>C. lupus</i> —Czech Republic 47.700— <i>Stiller et al. (2006)</i> (DQ852635)	<i>C. l. familiaris</i> —Bali street dog (HQ287728)	D104
OWW17	3,250	2	/	<i>C. lupus</i> —Hungary (KP665919) <i>C. l. familiaris</i> —China (KJ139080)	W39–D103
OWW18	3,250	1	/	11 modern sequences <i>C. lupus</i> —Iberian Peninsula	W20–W21
OWW19	890	2	/	<i>C. l. lupus</i> —Greece (AF115700)	W15

Note : Les correspondances avec les haplotypes modernes de loup (W) et de chien (D) suivent la nomenclature basée sur Montana et al. (2017b). Pour plus d'informations, voir le Tableau S2. Les dates de radiocarbone non calibrées sont indiquées par un astérisque

Analyses phylogénétiques

Les deux réseaux MJ, bien que créés à partir des alignements d'ADNmt de 57 pb (A et B), ont confirmé la distinction entre les deux haplogroupes mitochondriaux Hg1 et Hg2 (Fig. 1 et Fig. 2, respectivement) proposés sur le fragment le plus long de la région de contrôle par Pilot et al. (2010). Tous nos échantillons, à la seule exception de l'échantillon OWW18, vieux de 3 250 ans, appartenant au groupe Hg1, se sont regroupés dans le groupe Hg2, mais aucun de leurs haplotypes ne correspondait à ceux trouvés chez les loups Italiens modernes. A l'exception de OWW9 et OWW4, dont l'haplotype était plus proche d'un haplotype de loup moderne d'Arabie Saoudite et d'Europe du Nord, tous les haplotypes de nos échantillons du Pléistocène sont placés à un pas de mutation seulement des haplotypes Italiens actuels (W14 et W16) et de l'haplotype Grec W15, que nous avons documenté en Italie il y a environ 890 ans et qui est actuellement absent (Fig. 1). Néanmoins, la plupart des échantillons analysés ne partageaient pas d'haplotypes avec les

populations actuelles de loups utilisées pour la comparaison (Fig. 1), ce qui montre qu'une partie de la variabilité observée dans les échantillons anciens a été perdue au fil du temps.

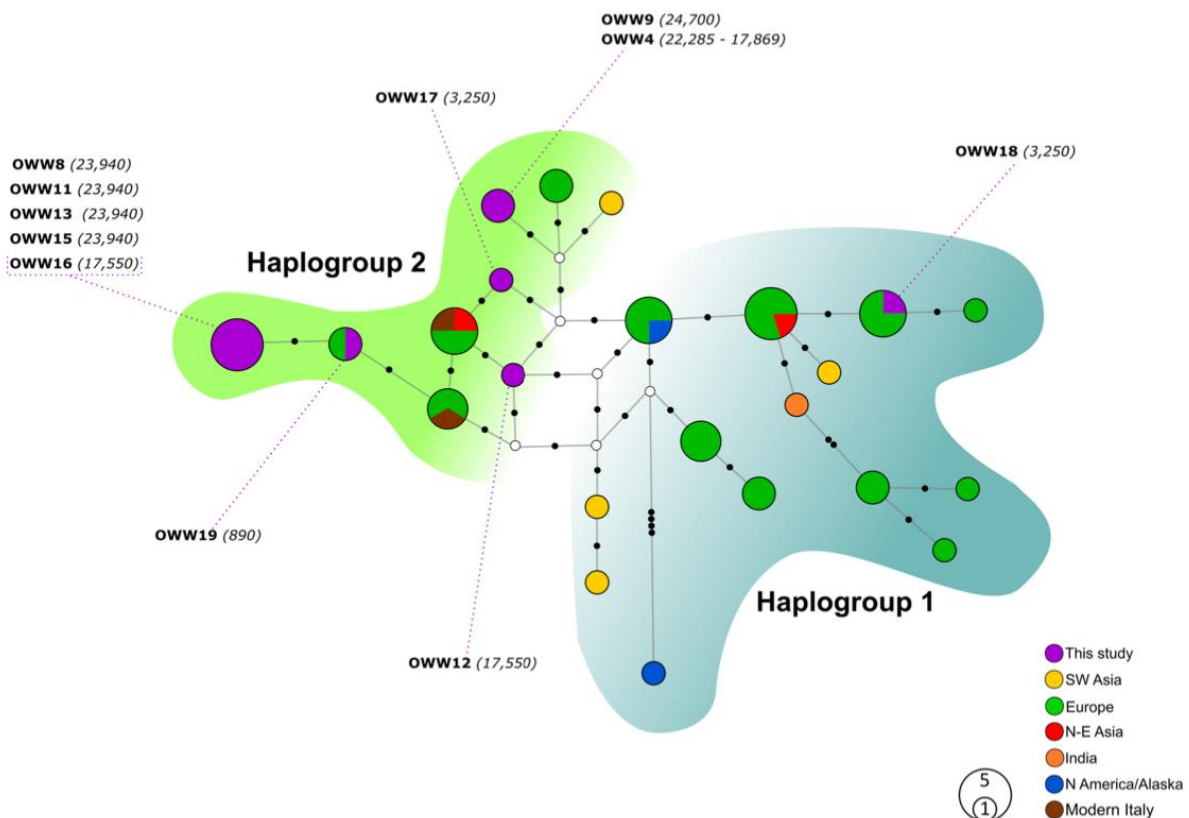


Figure 1. Réseau de jonction médian basé sur l'alignement A (séquences de 57 pb obtenues dans cette étude et populations modernes de loups Eurasiens). Les cercles blancs représentent les vecteurs médians ; les cercles noirs correspondent aux mutations nucléotidiques. Les haplotypes (cercles) sont colorés en fonction de leur provenance géographique, tandis que les haplotypes Italiens (anciens et modernes) sont représentés par deux couleurs différentes pour les distinguer des autres haplotypes Européens. Hg2 est représenté par la zone verte à gauche, tandis que Hg1 est englobé par la zone cyan ombrée à droite. La date de chaque échantillon est indiquée entre parenthèses et est prévue en années avant le présent (BP)

Si l'on examine la relation avec les autres échantillons anciens disponibles, le tableau devient plus riche, confirmant à nouveau la partition en deux haplogroupes mais aussi l'absence de correspondance claire avec les origines géographiques des échantillons (Fig. 2). Comme prévu, la plupart de nos échantillons (huit sur 11) portent des haplotypes partagés avec d'autres échantillons anciens de canidés (Fig. 2). Les trois échantillons les plus récents OWW17, OWW18 et OWW19 ont été associés uniquement à des haplotypes modernes non Italiens (Fig. 1), ce qui a entraîné un décalage avec les échantillons anciens du réseau (Fig. 2). OWW17 et OWW19 (âgés de 3 250 et 890 ans, respectivement) appartenaient à Hg2 alors que OWW18 (3 250 ans) était le seul à appartenir à Hg1 et à correspondre aux haplotypes Ibériques modernes (W20-W21).

L'arbre phylogénétique ML (Fig. 3) obtenu à partir de l'alignement C, qui incluait l'unique échantillon de cette étude (OWW9) séquencé avec succès au niveau du fragment d'ADNmt le plus long, présentait une topologie à peu près similaire aux arbres précédemment publiés pour le clade qui inclut la population de loups Italiens (Thalmann et al., 2013 ; Montana et al., 2017*b*). Bien que le support pour les nœuds soit très faible en raison de la taille limitée de l'alignement, on peut noter que les loups Italiens contemporains, référencés aux haplotypes W14 et W16, appartenaient à un clade comprenant également les haplotypes W15 (de Grèce), W17 (de Croatie et de Slovénie) et

W18 (de Pologne), et étaient étroitement liés à un autre clade comprenant un échantillon de loups vieux de 14 500 ans provenant de Suisse (Thalmann et al., 2013) et des chiens anciens. Il est intéressant de noter que l'échantillon OWW9 qui, comme nous l'avons déjà noté, partageait le même haplotype que de nombreuses races de chiens modernes, se situait complètement en dehors de la lignée mtDNA (HVR1) du loup Italien moderne, proche des chiens qui appartiennent au clade canin A.

Lorsque nous avons également considéré les analyses bayésiennes effectuées sur l'alignement D (Fig. S1), dans lequel nous avons inclus les cinq anciens échantillons de canidés de Verginelli et al. (2005), ainsi que le réseau NJ (Fig. 2), il a été possible d'observer une variabilité génétique encore plus élevée des anciens échantillons Italiens, distribuée le long de l'arbre entier ou éparse dans le réseau. Un total de 11 haplotypes différents a été détecté dans les deux études, cinq de Verginelli et six de cette étude, mais dans aucun d'entre eux n'ont été trouvés les deux haplotypes Italiens actuels. Cependant, en raison de l'affinité morphologique et génétique avec les chiens de deux échantillons (PIC4 et PIC5) de Verginelli et al. (2005) - qui portaient deux haplotypes différents -, le nombre total d'haplotypes de loups retrouvés dans les deux études est de neuf.

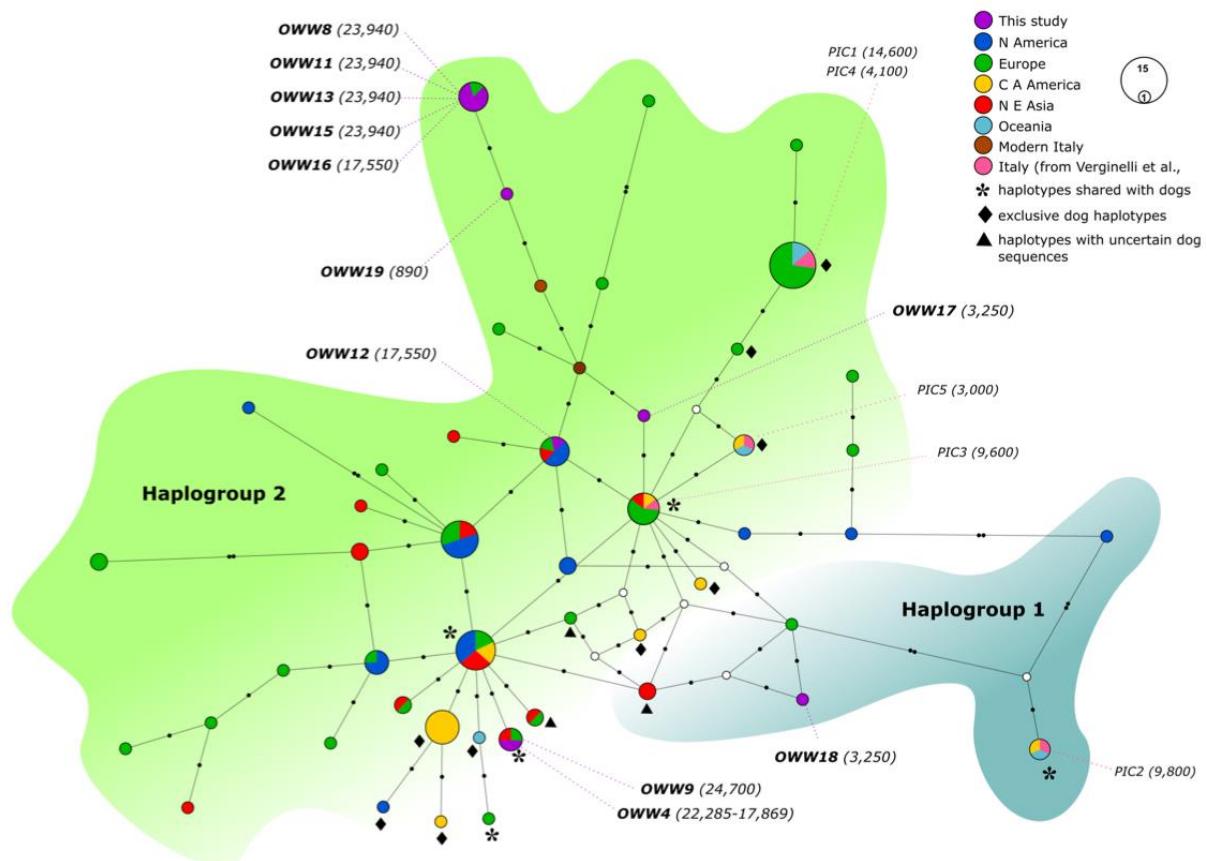


Figure 2. Réseau de jonction médian basé sur l'alignement B (57 pb) comprenant les anciens haplotypes de loups et de chiens ainsi que les deux haplotypes de loups Italiens existants. Lorsque cela n'est pas spécifié, les haplotypes représentés se rapportent aux loups. Les diamants mettent en évidence les haplotypes exclusifs du chien ; les astérisques indiquent les haplotypes partagés entre le chien et le loup et les triangles désignent les trois haplotypes qui présentent des séquences dont l'attribution au chien ou au loup est incertaine. Les cercles blancs représentent les vecteurs médians, les cercles noirs correspondent aux mutations nucléotidiques. Les échantillons Italiens analysés par Verginelli et al. (2005) sont également représentés dans la figure par la couleur rose. Les haplotypes (cercles) sont colorés en fonction de leur provenance géographique. Hg1 est représenté par la zone à droite tandis que Hg2 est représenté par la zone verte en haut à gauche. La date de chaque échantillon est indiquée entre parenthèses et est prévue en années avant le présent (BP)

En outre, la plupart des échantillons analysés dans cette étude sont placés à proximité des haplotypes Italiens modernes (Fig. 2), à la seule exception des échantillons OWW18 (associé à l'haplogroupe 1), OWW4 et OWW9 (qui portent un haplotype de chien). A partir de l'arbre bayésien, il a également été possible d'observer que l'échantillon OWW9 et ceux analysés par Verginelli et al. (2005) sont dispersés dans l'arbre, tombant également dans les trois clades de chiens A, B et C (Fig. S1).

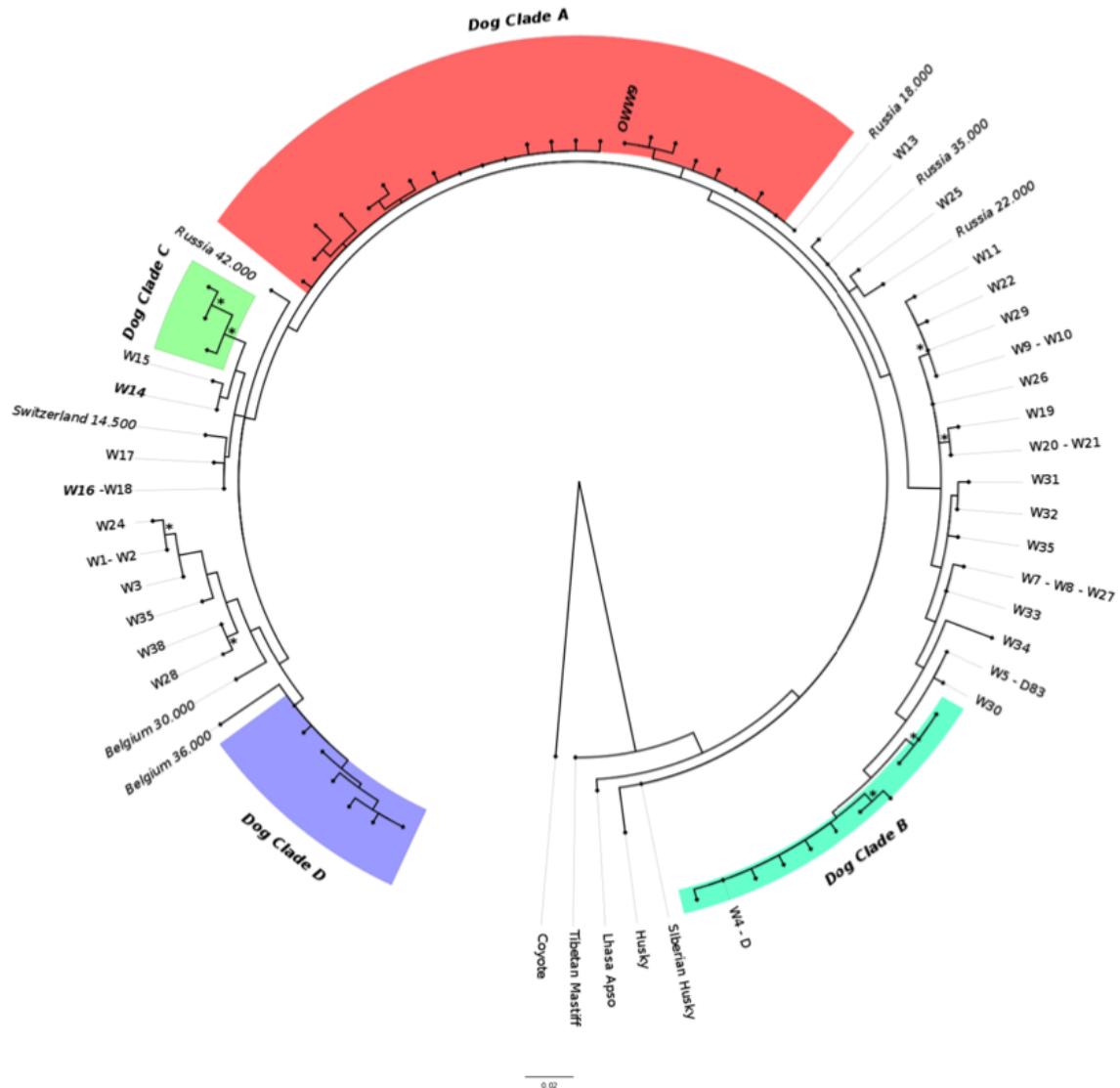


Figure 3. Arbre de maximum de vraisemblance basé sur l'alignement C (330 pb). Les haplotypes de loups modernes sont représentés par la lettre W suivie d'un nombre et, dans certains cas, la lettre D est placée à côté du W pour représenter un nœud terminal où il existe un haplotype partagé entre chiens et loups. Les échantillons de loups anciens sont représentés dans la figure par leur pays de provenance et l'âge rapporté (en italique, BP). Les clades de chiens sont mis en évidence comme suit : Clade A (rouge) ; Clade B (turquoise) ; Clade C (vert) ; Clade D (violet). Les astérisques soulignent le soutien statistique lorsque les valeurs bootstrap sont trouvées dans >50% des 1 000 répliques. Voir les tableaux S2 et S3 pour la liste des échantillons

DISCUSSION

Variabilité génétique passée des loups Italiens

La population de loups Italiens représente un cas d'unicité génétique mis en évidence par plusieurs études tant sur l'ADN mitochondrial (Thalmann et al., 2013 ; Ersmark et al., 2016 ; Montana et al., 2017a) que nucléaire (vonHoldt et al., 2011). Au niveau de l'ADNmt, cette population est la

seule population de loups restante en Europe appartenant exclusivement à un haplogroupe qui était répandu à la fois en Europe centrale et occidentale pendant plus de 40 000 ans (Pilot et al., 2010) et en Amérique du Nord jusqu'au LGM (Leonard et al., 2007).

Dans cette étude, en analysant avec succès la région de contrôle de l'ADNmt de 11 échantillons de loups anciens, nous avons contribué à décrire la composition génétique de la population de loups du Pléistocène Italien. Nos résultats soulignent que la variabilité ancienne des loups Italiens était plus élevée qu'aujourd'hui, un scénario qui pourrait être compatible avec la réduction bien connue de la population qui a commencé pendant le LGM et s'est accentuée au cours des derniers siècles (Lucchini, Galov & Randi, 2004 ; vonHoldt et al., 2011 ; Boggiano et al., 2013 ; Pilot et al., 2014 ; Montana et al., 2017a, 2017b). En outre, en comparant les résultats de cette étude et ceux de Verginelli et al. (2005), nous n'avons trouvé aucune correspondance entre les haplotypes détectés dans chaque étude. Sur un total de 14 échantillons Italiens anciens analysés (à l'exclusion de PIC4 et PIC5 de Verginelli, car morphologiquement et génétiquement attribués à des chiens), neuf haplotypes de loups différents ont été retrouvés dans les deux études.

Tous les haplotypes des spécimens du Pléistocène supérieur analysés ici appartiennent à l'haplogroupe Hg2, et tous, sauf un, correspondent aux haplotypes trouvés dans d'autres échantillons de loups anciens d'Amérique du Nord et d'Eurasie datant d'il y a entre 47 700 et 16 000 ans. De plus, la plupart des échantillons du Pléistocène que nous avons analysés sont placés à proximité des haplotypes Italiens actuels, à la seule exception de celui porté par OWW4 et OWW9 qui se situe dans la variabilité du chien.

En passant des spécimens du Pléistocène à ceux de l'Holocène, un changement dans l'occurrence des haplotypes est notable : les trois échantillons analysés ici ne correspondent qu'à des haplotypes récents ou existants. Nos résultats pourraient suggérer une perte progressive de diversité autour de la transition Pléistocène-Holocène, comme en témoigne la seule présence d'haplotypes modernes dans les échantillons de l'Holocène, ce qui est compatible avec la tendance générale de contraction démographique amorcée dans les populations de *Canis lupus* du Pléistocène tardif (Vila et al., 1999 ; Verginelli et al., 2005) et confirmée également par des inférences démographiques génomiques (Freedman et al., 2014 ; Fan et al., 2016).

Dans notre étude, un seul spécimen holocène, daté de 3 250 ans, appartenait à l'haplogroupe Hg1. Par conséquent, l'absence de tout haplotype Hg1 dans les échantillons pléistocènes, ce qui est très peu probable d'être observé seulement par hasard dans l'ensemble des échantillons analysés, confirme que les loups avec cet haplogroupe pourraient être arrivés dans le sud de l'Europe plus récemment, confirmant des résultats précédents (Pilot et al., 2010). Bien entendu, il ne peut être exclu que les loups appartenant à Hg1 aient habité certaines zones géographiques d'Europe au cours du Pléistocène, qui n'ont pas encore fait l'objet d'investigations. Quoi qu'il en soit, nos résultats repoussent les conclusions précédentes, qui attestaient de la présence de loups Hg1 en Europe seulement au cours des 1 400 dernières années (Pilot et al., 2010), à l'exception d'un échantillon plus ancien provenant d'Italie et daté de 9 800 ans (PIC2) qui s'est révélé porteur d'un haplotype Hg1 également présent dans deux anciens échantillons de chiens (Fig. 2) (Leonard et al., 2002 ; Frantz et al., 2016) et qui était précédemment inclus dans un clade dominé par les chiens (Verginelli et al., 2005). Il est intéressant de noter que l'haplotype Hg1 porté par OWW18 correspond à celui que l'on trouve dans la population Ibérique existante de loups, représentant peut-être la même vague migratoire qui aurait largement remplacé les loups Hg2 dans toute

l'Europe (Pilot et al., 2010). La présence plus faible de loups Hg1 est peut-être due à un isolement géographique plus important de la péninsule Italienne par rapport à d'autres anciens **refuges**, ce qui, combiné à une **dérive génétique** et à un **goulot d'étranglement** historique peut-être plus importants, pourrait contribuer à expliquer la plus grande différenciation génétique des loups Italiens par rapport à d'autres populations (vonHoldt et al., 2010 ; Pilot et al., 2014 ; Galaverni et al., 2016 ; Montana et al., 2017a).

Les deux haplotypes du loup Italien, uniques et existants, n'ont pas été trouvés parmi l'ensemble des échantillons anciens analysés en Eurasie jusqu'à présent. **Compte tenu de la plus grande variabilité retrouvée dans cette région par le passé, il est possible que les haplotypes Italiens actuels aient pu être déjà présents dans le pool génétique de la population de loups du Pléistocène, mais probablement à des fréquences trop faibles pour être échantillonnés dans l'ensemble et la zone géographique limités des échantillons anciens analysés,** qui couvrent également un large éventail chronologique. Une deuxième option pourrait être que les loups Hg2 isolés dans les **refuges glaciaires** Italiens ont connu un renouvellement au sein de leur haplogroupe, à la suite de mutations in situ, puisqu'ils ne diffèrent que par une ou deux mutations de tous les haplotypes Hg2 trouvés dans nos échantillons anciens. Inversement, nous sommes enclins à exclure l'hypothèse supplémentaire d'un remplacement complet des haplotypes dans la population Italienne, en raison de la forte similitude génétique entre les haplotypes Italiens anciens et actuels mise en évidence dans notre analyse de réseau (Fig. 1 et Fig. 2) et dans des études récentes basées sur l'ADNmt (Thalmann et al., 2013 ; Skoglund et al., 2015 ; Montana et al., 2017a). Par conséquent, nous expliquerions ce scénario par la combinaison d'un échantillonnage limité et de mutations in situ, mais d'autres études seront nécessaires pour discriminer avec certitude entre ces hypothèses.

L'haplotype canin de deux échantillons de canidés du Pléistocène supérieur

De manière surprenante, l'haplotype d'ADNmt de deux échantillons (OWW4 et OWW9) provenant du site archéologique de Cava Filo correspondait à des chiens anciens (Stiller et al., 2006 ; Zhilin et al., 2014) et modernes. En particulier, OWW9 est le seul échantillon pour lequel nous avons obtenu un fragment d'ADNmt plus long et que nous avons directement radiocarbonné dans cette étude, obtenant un intervalle compris entre 25 008 et 24 409 ans (cal 2σ). Il convient de mentionner que OWW9, dont l'haplotype se situe en dehors de la variabilité actuelle et ancienne des loups Italiens, **provient d'un niveau stratigraphique où des preuves de fréquentation par des chasseurs-cueilleurs paléolithiques ont été récemment décrites** (Nenzioni, Marchesini & Marvelli, 2018 ; Paronuzzi et al., 2018) (voir également l'article supplémentaire S1). Les communautés de chasseurs-cueilleurs humains sont connues pour être impliquées dans le processus de domestication des chiens, **qui a probablement débuté à partir d'une population de loups aujourd'hui éteinte il y a au moins 12 500 ans** (Thalmann et al., 2013 ; Freedman et al., 2014 ; Skoglund et al., 2015 ; Frantz et al., 2016). Cependant, le nombre d'événements de domestication indépendant, ainsi que leur localisation géographique et leur chronologie, restent très controversés (Frantz et al., 2016 ; Botigué et al., 2017). La domestication du chien a été revendiquée il y a environ 30 000 ans (Germonpré, Lázníčková-Galetová & Sablin, 2012) **mais les plus anciens restes archéologiques de canidés confirmés positivement comme étant des chiens sont datés de 15 000 ans en Europe et de 12 500 ans en Asie de l'Est** (Larson et al., 2012 ; Pionnier-Capitan et al., 2011).

Actuellement, les variantes de séquences des chiens modernes et anciens sont réparties dans le monde entier en quatre groupes phylogénétiques principaux (à savoir A, B, C et D) (Savolainen et

al., 1997) et la présence d'un loup du Pléistocène supérieur portant un haplotype appartenant à l'ancien clade canin A (Thai, Chung & Tran, 2017) **pourrait apporter des informations précieuses sur l'origine temporelle et spatiale des haplotypes qui pourraient avoir été l'une des populations de loups « sources » à l'origine des chiens.** Compte tenu de cela, OWW9 pourrait représenter l'un des plus anciens spécimens avec un tel haplotype. Si cela est confirmé par l'analyse de son ADNmt complet, **il pourrait représenter l'une des plus anciennes preuves de la présence du clade A dans un échantillon de canidé puisque, pour autant que nous le sachions, la présence de cette lignée en Europe et au Proche-Orient a été précédemment attestée il y a seulement 13 250 ans en Israël** (Pionnier-Capitan, 2010) et 9 670 ans en Italie (Verginelli et al., 2005 ; Deguilloux et al., 2009). En outre, la présence d'un haplotype du clade A dans un échantillon de canidé vieux de 24 700 ans, plus de 10 000 ans avant le plus ancien spécimen du clade A attesté en Israël, représente un cas intéressant étant donné que, bien que la plupart des chiens Européens modernes appartiennent au clade A ou B (avec une prédominance du premier, attesté à des fréquences de 64% et 22%, respectivement), la majorité des chiens Européens anciens analysés jusqu'à présent appartenaient aux clades C ou D (63% et 20%, respectivement) (Frantz et al., 2016).

Nous devons également reconnaître que l'haplotype porté par OWW9 a été trouvé également dans deux échantillons modernes, un hybride loup × chien attesté d'Iran (Aghbolaghi et al., 2014) et un loup de Chine (Ersmark et al., 2016), analysé pour 686 pb de la région mitochondriale d-loop dont nous ne pouvons exclure, sans analyses supplémentaires, qu'il soit lui-même un hybride.

Évidemment, il est absolument nécessaire d'investiguer des fragments d'ADNmt plus longs et des marqueurs d'ADN autosomique sur l'échantillon OWW9, pour vérifier ou non toutes ces hypothèses spéculatives dans le contexte de la domestication du chien (Pires et al., 2017).

CONCLUSIONS

En conclusion, notre étude contribue à jeter une lumière plus claire sur l'origine et la variabilité génétique passée de la population de loups Italiens. De plus, elle permet également de mieux déduire les schémas de variabilité et de flux génétique à travers les populations de loups Eurasiennes passées et modernes, et de mieux expliquer leurs relations avec les loups Italiens modernes. Nous mettons en évidence que, conformément à la réduction de population bien connue, commune à plusieurs espèces, qui a commencé pendant le LGM et s'est accentuée au cours des derniers siècles en raison de la pression anthropique plus élevée, **la variabilité génétique ancienne des loups Italiens a drastiquement diminué jusqu'à aujourd'hui.** Nous avons également détecté la présence d'un haplotype de chien très intéressant dans un échantillon vieux de 24 700 ans qui mérite d'être analysé plus en détail avec des approches génomiques. De plus, nos résultats ont montré qu'un seul spécimen holocène, daté de 3 250 ans, appartenait au groupe Hg1, ce qui nous permet d'émettre l'hypothèse que les loups avec cet haplogroupe pourraient être arrivés plus récemment en Europe du Sud, antdatant une théorie précédente sur l'ancienne dynamique de population du loup Eurasiens (Pilot et al., 2010). Cependant, l'échantillonnage spatio-temporel limité combiné aux courts fragments que nous avons analysés à partir d'un seul marqueur **uniparental**, l'ADN mitochondrial, n'a pas permis à nos données de refléter toute la complexité de cette dynamique. De plus, nous reconnaissons également que la fourchette chronologique étudiée ici était très large, s'étendant de 25 000 à 1 000 ans.

Par conséquent, nous préconisons qu'un plus grand nombre d'échantillons de canidés anciens, ainsi que des informations génomiques plus approfondies, telles que celles dérivées de **mitogénomes** complets, de réseaux de SNP nucléaires ou de génomes nucléaires entiers, afin de mieux comprendre l'histoire de l'évolution du loup Européen.