

## Des pelages noirs dans une meute métisse de loups et de chiens : le mélanisme est-il un indicateur d'hybridation chez les loups ?

Eur J Wildl Res (2013) 59:543–555  
DOI 10.1007/s10344-013-0703-1

ORIGINAL PAPER

### Black coats in an admixed wolf × dog pack is melanism an indicator of hybridization in wolves?

Romolo Caniglia · Elena Fabbri · Claudia Greco · Marco Galaverni · Lorenzo Manghi · Luigi Boitani · Andrea Sforzi · Ettore Randi

R. Caniglia (✉) · E. Fabbri · C. Greco · M. Galaverni · E. Randi  
Laboratorio di Genetica, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Via Cà Fornacetta 9, 40064 Ozzano dell'Emilia, BO, Italy  
e-mail: romolo.caniglia@isprambiente.it

A. Sforzi  
Museo di Storia Naturale della Maremma, Strada Corsini 5, 58100 Grosseto, Italy

L. Manghi · L. Boitani  
Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo, Università di Roma "La Sapienza", Viale dell'Università 32, 00185 Rome, Italy

#### Résumé

L'utilisation de mutations fonctionnelles, en plus des marqueurs moléculaires non codants standard, peut aider à détecter l'**hybridation** et l'**introgression** de gènes dans les populations de canidés sauvages. Nous avons analysé l'**ascendance** d'une meute de canidés se reproduisant dans le centre de l'Italie et présentant un pelage noir et d'autres traits morphologiques inhabituels suggérant des origines hybrides loup × chien. Les individus ont été identifiés par génotypage de l'ADN excrémental sur 13 microsatellites autosomiques, des séquences de la région de contrôle de l'ADNmt, un site de restriction spécifique aux mâles sur le gène ZFX/Y pour déterminer le sexe des individus, quatre microsatellites liés à l'axe Y pour déterminer les haplotypes masculins, et deux mutations mélaniques : un SNP à l'exon 4 du locus *Agouti* et une délétion de 3 pb à un gène de la  $\beta$ -*Defensine*, le locus *K*. Les résultats ont montré que : (1) la meute a été fondée par un seul couple reproducteur d'individus apparentés, probablement frère et sœur, et aucun immigrant n'a été détecté ; (2) les parents et la progéniture présentaient des signaux de mélange au niveau des microsatellites autosomiques ; et (3) la délétion mélanique du locus *K* était présente chez le parent femelle au pelage noir et chez 8/14 descendants, mais elle était absente chez le parent mâle de type sauvage. Cette délétion a également été trouvée chez 17/40 chiens de village échantillonnés au hasard dans des zones proches, mais elle était absente dans un échantillon aléatoire de 40 loups Italiens. Ces résultats suggèrent que la meute a reçu la délétion du locus *K* des chiens. Les analyses de métagénomes des génotypes empiriques et simulés indiquent que les parents de la meute sont issus d'un seul événement d'hybridation remontant à au moins deux générations. Les évaluations génétiques et phénotypiques des mutations de la couleur du pelage peuvent contribuer à l'étude de l'origine et de la dynamique des polymorphismes fonctionnels dans les populations de loups en voie d'hybridation et à l'élaboration de directives appropriées pour contraster l'hybridation avec leurs parents domestiqués.

## INTRODUCTION

Les loups gris (*Canis lupus*) sont largement répandus dans l'Ancien et le Nouveau Monde, montrant des adaptations remarquables à une variété d'habitats, des forêts et plaines tempérées à la toundra arctique et aux déserts. Leurs variations morphologiques sont cependant modestes, à l'exception de la taille du corps, qui est grossièrement corrélée à la latitude, et des polymorphismes de couleur du pelage (Mech et Boitani 2003). Le pelage des loups présente généralement différentes nuances de gris, les populations du sud et du désert étant plus brunes et rougeâtres. Les loups complètement blancs sont communs dans les régions arctiques, tandis que les loups noirs sont présents à une fréquence élevée dans certaines populations de l'ouest de l'Amérique du Nord (Musiani et al. 2007). Les déterminants génétiques des couleurs de pelage et leur dynamique dans les populations de loups sauvages (par exemple, diffusion stochastique et/ou sélection naturelle adaptative) sont mal connus, à l'exception partielle de la mutation mélanique récemment découverte au niveau d'un gène codant pour la  $\beta$ -Defensine, qui pourrait être originaire des chiens et introduite chez les loups par hybridation **introgressive** (Anderson et al. 2009). Des épisodes d'hybridation ont été documentés chez différentes espèces de *Canis* : le loup Ethiopien (*Canis simensis* ; Gottelli et al. 1994) et le coyote (*Canis latrans* ; vonHoldt et al. 2011). L'hybridation loup gris  $\times$  chien a été signalée en Amérique du Nord (Muñoz-Fuentes et al. 2010) et en Europe (Anderson et al. 2002 ; Godinho et al. 2011 ; Hindrikson et al. 2012 ; Randi et Lucchini 2002 ; Verardi et al. 2006 ; Vilà et al. 2003), et l'origine de certains traits morphologiques anormaux chez le loup a été attribuée à une introgression génétique (Ciucci et al. 2003). **Des pelages noirs chez les loups ou les hybrides ont été rarement rapportés en Europe (J.C. Blanco pers. comm. ; Godinho et al. 2011), sauf en Italie, où des canidés sauvages noirs ont été observés à plusieurs reprises depuis 1976 (Boitani 1983).** Les pelages noirs chez les mammifères proviennent généralement de mutations au niveau de deux gènes en interaction, *l'Agouti* et le *récepteur de la mélanocortine 1* (Mc1r ; Barsh 2006), mais les espèces de *Canis* font exception. Kerns et al. (2004) ont décrit un polymorphisme nucléotidique unique (SNP) au niveau de *l'Agouti*, qui était corrélé aux pelages noirs mais qui n'est apparu que chez les bergers allemands. Candille et al. (2007) et Kerns et al. (2007) ont découvert que le mélanisme chez le chien est principalement contrôlé par le gène *CBD103* (correspondant au locus *K*), qui est cartographié sur le chromosome 16 et code pour une protéine  $\beta$ -Defensine qui agit comme un ligand alternatif pour le Mc1r dans la voie de la mélanocortine. La mutation mélanique du locus *K* est une délétion de trois nucléotides (l'allèle  $K^B$ ), qui a été détectée dans 50 races différentes de chiens noirs, et qui est répandue chez les loups de l'Arctique Canadien et du parc national de Yellowstone (YNP) et chez les coyotes (Anderson et al. 2009). **Les analyses moléculaires ont suggéré que cette délétion mélanique chez les loups provenait d'une introgression de chiens domestiques (Anderson et al. 2009), bien que cette interprétation ait été remise en question (Hedrick 2009), et qu'elle aurait pu atteindre une fréquence élevée apparemment par sélection positive (Coulson et al. 2011).**

Un dépistage préliminaire a détecté la délétion mélanique *K* chez 10 loups noirs Italiens (Anderson et al. 2009), renforçant l'hypothèse d'une association causale avec les phénotypes à robe noire également dans les populations de loups Européens. La population Italienne de loups s'est récemment étendue dans les Apennins après des siècles de contraction démographique et de l'aire de répartition, souvent en raison d'un nombre écrasant de chiens en liberté (Genovesi et Dupré 2000). Des études génétiques antérieures réalisées à l'aide de l'ADNmt et de 18-20 marqueurs microsatellites ont détecté la présence d'au moins 5% d'hybrides ou de rétro-croisements récents chez les loups Italiens (Randi et Lucchini 2002 ; Verardi et al. 2006). La présence de canidés vivant à l'état sauvage, apparemment des loups, avec un pelage noir, a été signalée dans des régions d'Italie

centrale (Apollonio et al. 2004 ; Randi et Lucchini 2002). Un « loup noir » a été clairement identifié comme un hybride à l'aide d'un panel de 18 microsatellites et d'analyses bayésiennes de métissage et d'assignation. Cependant, les mêmes méthodes n'ont pas permis de détecter l'hybridation chez d'autres individus noirs qui ont été entièrement assignés à la population de loups Italiens (Randi et Lucchini 2002). Ces résultats ne sont pas concluants car un nombre limité de marqueurs moléculaires neutres n'est pas assez puissant pour identifier les génotypes métisses provenant des dernières générations de rétrocroisements (Randi 2008 ; Vähä et Primmer 2006).

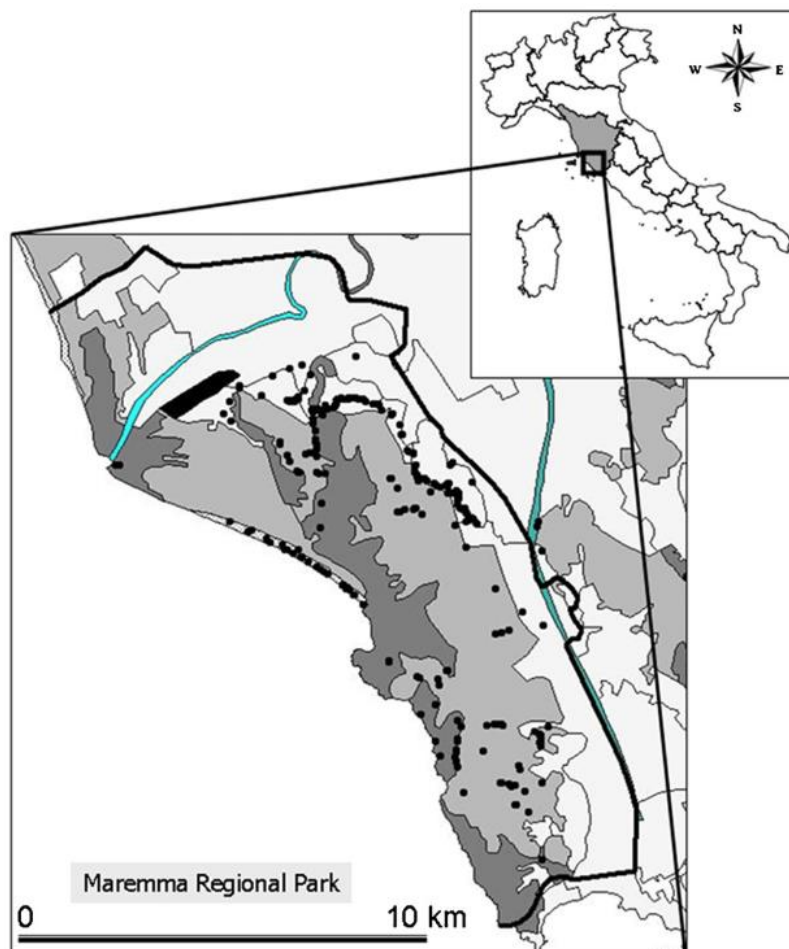
Dans le but d'apporter une première contribution à la compréhension de l'origine du pelage noir chez les loups sauvages Italiens, nous décrivons ici la structure génétique d'une meute qui a récemment (probablement en 2003) colonisé une zone côtière protégée du sud de la Toscane (province de Grosseto) : le Parc Régional de la Maremme (MRP ; Fig. 1). La couleur anormale du pelage noir avec des taches blanches sur les pattes et la poitrine, l'absence ou la réduction du masque facial blanc (Ressource en ligne 1) chez la plupart de ses membres suggéraient que la meute du PRM pouvait avoir des origines hybrides. Un projet de surveillance dans le PRM, basé sur des observations de terrain, le hurlement des loups, le suivi du sable et un échantillonnage génétique non invasif, a débuté en 2006. Des échantillons d'ADN excrémental ont été génotypés au niveau des séquences nucléaires et mitochondriales, non codantes et fonctionnelles. De cette façon, nous avons cherché à : (1) compter le nombre minimum d'individus dans la meute ; (2) reconstruire leurs relations familiales, en identifiant les individus reproducteurs, leur progéniture et la présence d'immigrants ; (3) déterminer leur ascendance, s'il s'agit de loups ou de métisse par hybridation avec des chiens ; et (4) évaluer la présence de mutations mélaniques au niveau des gènes *Agouti* et *CBD103*. En Italie, les loups vivent généralement dans des zones montagneuses boisées, où l'échantillonnage et les observations directes sont difficiles. Cette étude de cas offre une opportunité unique d'étudier une meute vivant dans une zone isolée depuis le début de la colonisation, où les individus peuvent être fréquemment observés sans être capturés, et où la collecte d'échantillons biologiques non invasifs est facile. Le couple reproducteur a été identifié, et la femelle était noire, tandis que le mâle était de type sauvage, selon les identifications génétiques. L'occurrence de mutations mélaniques pourrait offrir un moyen de clarifier l'origine et la dynamique écologique des polymorphismes de couleur de robe dans la nature et, en cas d'hybridation, d'évaluer les implications appropriées en matière de conservation.

## MATERIEL ET METHODES

### Collecte des échantillons et génotypage

L'ADN a été extrait de 358 échantillons d'excréments collectés en 2006, 2007 et 2008 dans le MRP (Fig. 1), une zone côtière protégée d'environ 100 km<sup>2</sup>, couverte par une végétation méditerranéenne typique, qui accueille une riche communauté d'ongulés sauvages (*Capreolus capreolus*, *Sus scrofa* et *Dama dama*). Pour évaluer l'ascendance des canidés du PRM, nous avons génotypé : (1) 40 loups sélectionnés au hasard (29 mâles et 11 femelles, appelés « **loups de référence** » dans cet article) qui ont été tués accidentellement ou illégalement dans des régions d'Italie centrale, distantes de 50 à 300 km du PRM, et comprenant 20 individus collectés du côté Tyrrhénien de la distribution des loups en Italie et (2) 40 échantillons de sang collectés sur des chiens de village sélectionnés au hasard (30 mâles et 10 femelles, appelés « **chiens de référence** ») vivant à domicile ou en liberté dans des zones rurales, à moins de 50 km du PRM. Tous les loups de référence, qui ont été analysés dans des études publiées précédemment et réanalysés ici, présentaient le motif de couleur du pelage typique du loup Italien et ne présentaient aucun signal morphologique ou génétique détectable d'hybridation (Randi et Lucchini 2002 ; Verardi et al. 2006). La population de loups des Apennins

ne présente pas de signes de substructuration locale lorsque les échantillons sont typés avec des microsattellites (Fabbri et al. 2007). Nous n'avons trouvé aucune preuve de substructuration de la population dans les loups de référence utilisés dans cette étude, et nous n'avons pu détecter aucun effet du choix des échantillons de référence dans l'attribution des génotypes MRP (données non montrées). Les chiens de référence, collectés et analysés à l'origine pour cette étude, ont été échantillonnés de manière aléatoire et n'ont pas été sélectionnés en fonction de la couleur du pelage ou de la taille du corps. À des fins de comparaison, nous avons inclus trois loups mâles × chiens femelles F1 élevés en captivité (appelés « hybrides connus ») et 16 canidés sauvages ressemblant à des loups, appelés « individus d'origine incertaine », qui ont été identifiés soit dans des échantillons non invasifs présentant de faibles scores d'assignation bayésienne à la population Italienne de loups, soit à partir de carcasses de loups présumés précédemment analysées et présentant des traits phénotypiques anormaux tels que des pelages noirs, des formes de crâne atypiques et des ongles ou ergots blancs (Ciucci et al. 2003 ; Randi et Lucchini 2002 ; Verardi et al. 2006). Ces 16 échantillons ont été collectés dans les mêmes zones de l'Apennin central où les loups de référence ont été échantillonnés (Ressource en ligne 2). Les tissus et les excréments ont été conservés à -20°C dans 10 volumes d'éthanol à 95%. Le sang a été conservé à -20°C dans deux volumes d'un tampon tris/SDS (Longmire et al. 1997). Les échantillons d'ADN ont été extraits automatiquement à l'aide du système robotisé de manipulation de liquides MultiPROBE IIEX (PerkinElmer) et des kits d'extraction d'ADN QIAmp ou de tissus Qiagen Dneasy (Qiagen Inc., Hilden, Allemagne).



**Fig. 1** Zone d'échantillonnage. La frontière du parc régional de la Maremma dans la région de la Toscane (en gris sur la carte d'Italie) est délimitée par une ligne sombre épaisse. Les points indiquent les emplacements approximatifs de l'échantillonnage

**Marqueurs moléculaires, amplifications PCR et identifications de génotypes**  
**Variabilité génétique**  
**Structure de la population et analyses des mélanges**

**RESULTATS**

**Génotypes, variabilité génétique et parenté dans le pack MRP**

Après quatre à huit répétitions PCR par échantillon et par locus du protocole à tubes multiples, 176 (49%) des 358 échantillons d'excréments collectés dans le MRP ont obtenu des scores de fiabilité  $R > 0,95$  et ont été définitivement acceptés avec  $ADO = 15,20\%$  et  $FA = 3,10\%$ , en moyenne parmi les loci. Ces échantillons comprenaient 16 génotypes distincts : six femelles et 10 mâles (Ressource en ligne 3), identifiés avec un  $PIDSibs = 0,00056$ , et un nombre attendu d'individus partageant le même génotype  $PID \times$  taille de la population = 0,009, ce qui signifie qu'un « effet d'ombre » est très peu probable.

Les loups de référence ont présenté des valeurs d'hétérozygotie ( $H_O$  et  $H_E$ ) et de nombre d'allèles ( $N_A$  et  $N_E$ ) de 30% à 50% inférieures, mais un nombre d'allèles privés plus élevé (53 contre 4) que chez les chiens (Tableau 1 ; voir également Lucchini et al. 2004). Les individus d'origine incertaine et la meute du MRP étaient intermédiaires entre les loups et les chiens en termes de variabilité génétique. La meute MRP ne présentait pas plus de quatre allèles à chaque locus et l'absence d'allèles privés ; nous pouvons donc exclure l'éventualité que leurs attributions ultérieures soient biaisées par la composition allélique des échantillons de référence de chiens et de loups.

**Tableau 1.** Variabilité génétique au niveau des microsatellites autosomiques et liés à l'axe Y, de la région de contrôle de l'ADNmt, du locus *K* et du locus *Agouti* dans la meute du Parc régional de la Maremma (PRM) et chez les loups Italiens de référence, les chiens, les hybrides connus et les individus d'origine incertaine

Groups	$n^a$	$H_o^b$	$H_e^c$	$F_{is}^d$	$N_A^e$	$N_E^e$	W14 <sup>h</sup>	$Y_C^i$	$Y_I^j$	$Y_S^k$	$K^{B1}$	$A^m$
Reference wolves	40	0.50 (0.08)	0.51 (0.07)	0.02 (0.03)	3.64 (0.52)	2.51 (0.28)	40	U (87 %) I (13 %)	H1 – H2 Q	–	0	a <sup>1</sup> /a <sup>1</sup> (100 %)
Reference dogs	40	0.67 (0.04)	0.70 (0.04)	0.03 (0.04)	7.86 (1.45)	4.46 (0.93)	0	L (50 %) D (27 %) O (11 %) C (3 %) E (3 %) N (3 %) K (3 %)	H3 – – – – H – – – – – – – –	L	0.24 (17)	a <sup>1</sup> /a <sup>1</sup> (100 %)
Known hybrids	3	0.79 (0.10)	0.44 (0.06)	n.c. <sup>c</sup>	2.14 (0.21)	2.03 (0.19)	0	U (100 %)	H1	–	0	a <sup>1</sup> /a <sup>1</sup> (100 %)
Uncertain origin individuals	16	0.58 (0.05)	0.61 (0.05)	n.c. <sup>c</sup>	5.00 (0.60)	2.99 (0.28)	16	U (90 %) I (10 %)	H1 – H2 Q	–	0.29	a <sup>1</sup> /a <sup>1</sup> (100 %)
MRP pack	16	0.66 (0.09)	0.48 (0.06)	–0.37 (0.05)	2.43 (0.23)	2.22 (0.22)	16	U (100 %)	H1	–	0.28 (9)	a <sup>1</sup> /a <sup>1</sup> (100 %)

<sup>a</sup> Number of distinct genotypes detected in the four groups

<sup>b</sup> and <sup>c</sup> Observed and expected heterozygosity at 13 STR loci and the *K* locus

<sup>d</sup> Inbreeding coefficient

<sup>e</sup> Not computed (n.c.)  $F_{IS}$  in the artificial groups of known hybrids and individuals of uncertain origin

<sup>f</sup> and <sup>g</sup> Average observed and expected number of alleles per locus (standard errors are indicated in parentheses)

<sup>h</sup> Number of Italian wolf mtDNA control region haplotypes in each group

<sup>i</sup> Frequency of Y-STR (four loci) haplotypes as named by Caniglia et al. (2010)

<sup>j</sup> and <sup>k</sup> Corresponding Y-STR haplotypes as named by Iacolina et al. (2010) and Sundqvist et al. (2001)

<sup>l</sup> Frequency of the  $K^{B1}$  allele (the number of individuals sharing the 3-bp melanistic deletion is indicated in parentheses)

<sup>m</sup> Frequency (%) of the wild type genotype (a<sup>1</sup>/a<sup>1</sup>) at the *Agouti*-locus

Les loups et les chiens de référence étaient dans HWE et LE. La meute MRP n'était pas en HWE, montrant un excès significatif d'hétérozygotes observés ( $F_{IS}$  significativement négatif ;  $P < 0,01$ ) probablement dû à des effets stochastiques dans cette meute fondée par un seul couple

reproducteur (voir ci-dessous). Le HWE et le LE n'ont pas été estimés chez les hybrides connus, issus de la captivité, et dans le groupe artificiel d'individus d'origine incertaine.

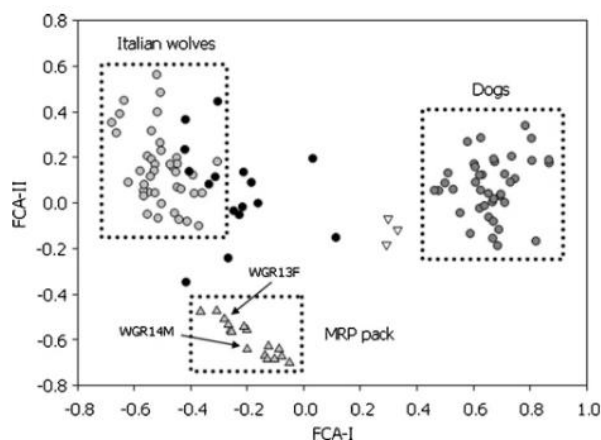
L'haplotype diagnostique **W14** de la région de contrôle de l'ADNmt (Randi et al. 2000) a été détecté chez tous les loups de référence et chez les 16 individus d'origine incertaine, mais il était totalement absent chez les chiens de référence et chez les trois hybrides connus, qui provenaient de chiens femelles (Tableau 1). Les 16 génotypes de la meute MRP présentaient tous l'haplotype **W14** indiquant une ascendance de loup Italien femelle. Deux haplotypes Y-STR nommés U et I (Caniglia et al. 2010) ont été détectés chez les loups de référence et chez les individus d'origine incertaine ainsi que chez d'autres loups Italiens (voir également Iacolina et al. 2010), mais ils étaient totalement absents chez les chiens de référence (Tableau 1). Les 10 mâles de la meute MRP présentaient le même haplotype Y-STR U indiquant une ascendance de loup mâle. L'allèle  $K^B$  mélanique était absent chez les loups de référence en raison de la sélection de la couleur du pelage, mais il était présent chez 17 chiens de référence, chez huit individus d'origine incertaine et chez neuf composants de la meute MRP. Les phénotypes noirs n'étaient cependant pas associés de manière univoque à l'allèle  $K^B$  mélanique. En effet, deux hybrides présumés au pelage noir (W334 et W357) parmi les individus d'origine incertaine ne présentaient pas l'allèle  $K^B$  (Ressource en ligne 2). La meute du MRP a fait l'objet d'un échantillonnage non invasif ; il n'a donc pas été possible de décrire les associations génotype-phénotype. **La mutation *Agouti* mélanique n'a été détectée dans aucun des quatre groupes** (Tableau 1 ; Ressource en ligne 3).

Les analyses de **filiation** ont permis d'identifier la femelle WGR13F (hétérozygotes  $ky/K^B$  au locus  $K$ ) et le mâle WGR14M (homozygotes  $k^y/k^y$  au locus  $K$ ) comme les individus reproducteurs les plus probables ( $P > 0,99$ ) ayant généré tous les autres génotypes (la progéniture de la meute ; Tableau 2) dans le MRP. WGR13F et WGR14M ont toujours été échantillonnés de 2005 à 2008 et sont apparentés au premier ordre (probablement frère et sœur ;  $P > 0,90$ ). La composition allélique de la progéniture putative à tous les marqueurs analysés était entièrement compatible avec celle du couple reproducteur (Ressource en ligne 3), ce qui suggère que cette meute est issue d'un seul couple reproducteur et que des événements d'immigration supplémentaires sont très peu probables.

### **Analyses de métissage et ascendance de la meute MRP**

Le graphique FCA montre une distinction nette entre les loups et les chiens de référence, tandis que les trois hybrides connus, les 10 individus d'origine incertaine et la meute MRP sont assez proches du groupe de loups de référence (Fig. 2). Les résultats des analyses de structure ( $K = 1-10$  ; *usepopinfo* non actif) ont montré qu'un regroupement optimal a été obtenu avec  $K = 2$  ( $\text{LnP(D)}$  moyen = -39 460,32 ; avec  $K = 1$ , le  $\text{LnP(D)}$  moyen était = - 1 380,86 et avec  $K > 2$  les valeurs du  $\text{LnP(D)}$  moyen étaient < -39 456,44). Les analyses de métissage avec  $K = 2$  (*usepopinfo* non actif) ont montré que tous les chiens de référence ont été assignés à un cluster avec un  $Q_d$  moyen = 0,98 (90% CI : 0,92-1,00), et tous les loups de référence ont été assignés à l'autre cluster avec un  $Q_w$  moyen = 0,99 (90 % CI : 0,95-1,00). Les valeurs d'assignation individuelles étaient 0,96 (90% CI : 0,81- 1,00) <  $q_d$  < 0,99 (90% CI : 0,97-1,00) chez les chiens et 0,99 (90 % CI : 0,93-1,00) <  $q_w$  < 1,00 (90% CI : 0,97-1,00) chez les loups. Tous les chiens et les loups ont été affectés à leurs clusters respectifs avec  $q_i > 0,95$ . Ces résultats ont été confirmés par des analyses de structure de génotypes simulés générés par HYBRIDLAB (données non présentées), et le seuil  $q_i = 0,95$  a été utilisé dans les procédures d'assignation. Les trois hybrides connus et 15/16 (93,75%) individus d'origine incertaine ont été partiellement assignés aux deux clusters avec une appartenance dans la gamme

de  $0,35$  (IC à 90% :  $0,11-0,62$ )  $< q_w < 0,94$  (IC à 90% :  $0,80-1,00$ ), confirmant leur origine métisse. Seul le génotype W357 a été attribué au cluster des loups avec  $q_w = 0,95$  (Ressource en ligne 2). Les résultats avec les modèles  $I$  ou  $F$  étaient presque identiques, et ils ont été confirmés en utilisant Structure avec l'option *usepopinfo* activée (Ressource en ligne 2).

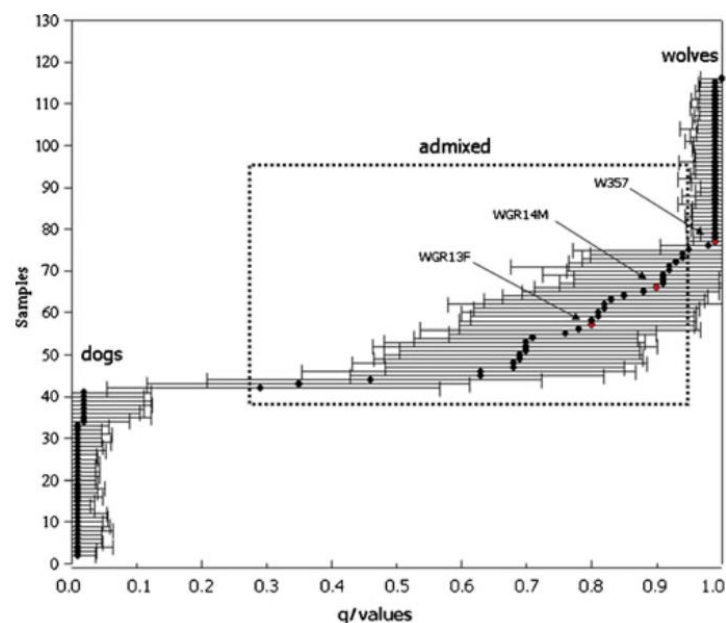


**Fig. 2.** FCA des génotypes multilocus déterminés chez les chiens de référence (points gris foncé), les loups Italiens de référence (points gris clair), les individus d'origine incertaine (points noirs), trois hybrides connus (triangles blancs vers le bas), et dans la meute du Parc Naturel de la Maremme (MRP ; triangles gris foncé). Les individus reproducteurs dans le MRP (WGR13F et WGR14M) sont indiqués par des flèches noires

Tous les génotypes MRP présentait des valeurs d'assignation individuelles  $q_i < 0,95$  au cluster loup, comprises entre  $0,69$  (IC à 90% :  $0,47-0,89$ )  $< q_w < 0,94$  (IC à 90% :  $0,77-1,00$ ) et des valeurs d'IC larges (Fig. 3). Leurs valeurs de  $q_i$  n'étaient pas intermédiaires entre les loups et les chiens, comme on pouvait s'y attendre chez les hybrides F1 ou F2, mais se déplaçaient nettement vers le cluster des loups (Tableau 2). De plus, les deux parents putatifs présentait des valeurs inférieures au seuil, c'est-à-dire  $q_w = 0,84$  (90% CI :  $0,84-0,99$ ) chez la femelle reproductrice et  $q_i = 0,90$  (90% CI :  $0,72-1,00$ ) chez le mâle reproducteur (Tableau 2). Dans le test d'assignation réalisé à l'aide de Structure avec l'option *usepopinfo* active (*popflag* actif pour les loups et les chiens de référence ; *updatepfrompopflagonly* actif), les génotypes de la meute MRP présentait des valeurs individuelles  $0,66$  (IC à 90% :  $0,46-0,86$ )  $< q_w < 0,85$  (IC à 90% :  $0,67-0,98$ ), à nouveau inférieures au seuil  $q_w=0,95$  (Tableau 2). Les chiens et les loups de référence présentait des valeurs d'IC à 90% étroites et ne se chevauchant pas (Figure 3), tandis que les hybrides connus, les individus d'origine incertaine (à la seule exception de l'échantillon W357) et les génotypes MRP présentait des IC à 90% plus larges et se chevauchant partiellement (Figure 3). Les affectations de structure calculées sans le locus  $K$  ont confirmé ces résultats. Tous les individus du groupe MRP présentait des valeurs inférieures au seuil  $q_w < 0,95$ , à l'exception des descendants WGR25M et WGR27M (Tableau 2).

La présence d'haplotypes mtDNA **W14** et Y-STR U de loup, les valeurs de la proportion individuelle d'appartenance, plus proche du loup mais toujours inférieure au seuil  $q_w = 0,95$  et la largeur de leurs IC à 90%, indiquent que les parents de la meute MRP ne sont pas des loups purs ni des hybrides de première génération. En accord avec ces résultats, les parents et tous les membres de la meute MRP ont été identifiés par NewHybrids comme des **rétro-croisements** avec une probabilité postérieure d'appartenir à la classe B2 allant de  $P = 0,70$  à  $0,99$ . Les parents ont été identifiés comme des **rétro-croisements** avec  $P = 0,98$ , pour la femelle reproductrice, et  $P = 0,99$ , pour le mâle reproducteur (Tableau 2). Les analyses de métissage incluant les génotypes observés et simulés générés par HYBRIDLAB (Structure avec  $K = 2$ , *usepopinfo* activé ou non) ont appuyé

ces résultats confirmant l'origine métisse des génotypes MRP (Tableau 2). Si nous supposons que l'allèle  $K^B$  est entré dans la meute du PRM par hybridation, un génotype hybride ou une famille full-sib générée par un loup mâle  $\times$  un chien (noir) femelle aurait généré des génotypes F1 portant un haplotype U de loup, un haplotype ADNmt de chien et un locus  $K$  polymorphe. Le premier **rétro-croisement** des mâles F1 avec des femelles de loup aurait généré les génotypes rétro-croisés suivants : haplotype U de loup, haplotype **W14** d'ADNmt de loup Italien, et un locus  $K$  polymorphe, correspondant exactement aux génotypes observés dans la meute MRP (Ressource en ligne 3). Ce schéma d'accouplement est entièrement compatible avec les génotypes observés du couple reproducteur, qui, étant des frères et sœurs à part entière, auraient nécessairement dû être générés par un seul événement de rétrocroisement. Un accouplement initial alternatif entre un loup femelle et un chien mâle, suivi d'un premier rétrocroisement des femelles F1 avec des loups mâles, aurait également produit les génotypes observés à partir de la première génération de rétrocroisement.



**Fig. 3** Valeurs de la proportion individuelle d'appartenance à un cluster de loups (valeurs  $q_w$ ) et leurs intervalles de crédibilité à 90% CI, telles que déterminées par Structure avec  $K = 2$  chez les chiens de référence et les loups italiens, les hybrides connus, les individus d'origine incertaine et la meute du Parc Régional de la Maremme (MRP) (voir « Résultats »). Les valeurs de  $q_w$  des hybrides connus, des individus d'origine incertaine et de la meute MRP sont incluses dans le rectangle (lignes interrompues ; mélangées). Les individus reproducteurs WGR13F et WGR14M dans le MRP et le génotype W357 (le seul individu d'origine incertaine qui a été assigné au cluster de loups avec  $q_w > 0,95$ ) sont indiqués

## DISCUSSION

### Ce que la meute MRP nous apprend sur l'occurrence de la délétion mélanique $K^B$ dans la population de loups Italiens

Depuis la découverte récente de mutations génétiques corrélées à des polymorphismes de couleur de pelage chez les chiens domestiques, la présence de canidés noirs sauvages ressemblant à des loups en Europe a été signalée sur la base d'observations de terrain ou d'animaux trouvés morts de génotypes inconnus (Apollonio et al. 2004 ; Boitani 1983). La découverte de la délétion mélanique  $CBD103$   $\beta$ -*Defensin* et l'utilisation de méthodes génétiques non invasives offrent désormais la possibilité de **cribler** des populations naturelles étendues et d'investiguer la génétique des polymorphismes fonctionnels chez les loups (Beja-Pereira et al. 2009 ; Marucco et al. 2011). Dans cette étude, nous avons exploité une opportunité unique de reconstruire la composition génétique



et la généalogie complète d'une meute nouvellement fondée, qui a été observée et échantillonnée de manière non invasive pendant des années, et qui a montré la délétion  $\beta$ -*Defensine* mélanique chez les animaux à pelage noir avec des génotypes microsatellites métisses. Ces animaux ont vécu pendant au moins 7 ans dans la nature, s'attaquant aux ongulés sauvages et se comportant apparemment comme des loups, mais ils présentent une suite de traits phénotypiques anormaux (pelage noir variable, taches blanches sur les pattes et la poitrine, et absence ou réduction du masque facial blanc), qui ne sont pas typiques de la population Italienne de loups. Les analyses de métissage des génotypes microsatellites ont confirmé l'origine **hybride** de la meute, montrant que les parents sont probablement apparentés au premier ordre (frère et sœur). L'ascendance canine remontait à au moins deux générations pour les parents et trois pour la progéniture, même si une estimation précise des niveaux de **rétro-croisement** nécessiterait beaucoup plus de marqueurs génétiques (Randi 2008). Le métissage dans la meute MRP a été identifiée par leurs génotypes microsatellites, indépendamment de la présence de la délétion du locus *K* mélanique. Cependant, la délétion mélanique, due à la sélection de la couleur du pelage, était absente chez les loups Italiens de référence, dont 50% ont été collectés dans la partie Tyrrhénienne de leur distribution en Italie, mais était très fréquente chez les chiens de référence. Ainsi, l'inclusion des génotypes du locus *K* a augmenté la puissance des procédures d'assignation. Ces résultats indiquent une relation étroite apparente entre les génotypes métisses loup-chien de MRP et l'occurrence de la délétion mélanique du locus *K*, bien qu'ils ne puissent pas prouver définitivement que l'allèle  $K^B$  est entré dans la population Italienne de loups par hybridation.

Il est très intéressant de souligner que, si les parents sont frères, la meute MRP est le résultat d'un seul événement d'hybridation. Nous n'avons pas trouvé de génotype de grand-parent approprié dans une base de données génétique de loups Italiens (Caniglia et al. 2010). Ainsi, les parents des fondateurs de la meute MRP restent inconnus, leurs génotypes ne peuvent être évalués et leur zone d'origine putative ne peut être identifiée. Apparemment, la femelle reproductrice WGR13F pourrait être une F1 (chien mâle  $\times$  loup femelle), mais les résultats de structure et de NewHybrids indiquent qu'elle est très probablement, ainsi que le mâle reproducteur, un **rétro-croisé**. Dans cette perspective, nous pouvons déduire que les deux frères hybrides se sont déplacés ensemble depuis leur région natale inconnue, sont entrés dans le PRM où ils ont établi leur territoire, se sont accouplés et se sont reproduits. L'occurrence d'accouplements incestueux a été rarement rapportée chez les loups (Smith et al. 1997), mais ils ne peuvent être exclus, en particulier dans les zones de colonisation récente et de très faible densité de loups (Liberg et al. 2005). La femelle reproductrice (génotype  $k^y/K^B$ ) a transféré la délétion mélanique à sa descendance. Selon la génétique et les observations de terrain, le couple reproducteur a donné naissance à un minimum de deux à six petits par an (Tableau 2). Aucun immigrant n'a été détecté pendant la période d'étude. Une recherche dans une base de données génétique de loups Italiens (Caniglia et al. 2010) a montré que l'individu WGR19M a disparu en dehors de l'aire du PRM. Ce génotype a été échantillonné en 2006 et 2007 dans la PRM mais a apparemment disparu en 2008 de la zone d'étude. Des échantillons de crottes prélevés à la fin du printemps 2008, à environ 40 km du PRM, près de restes de prédation d'ongulés, ont été identifiés génétiquement dans notre laboratoire avec le même panel de marqueurs moléculaires que celui utilisé dans cette étude et ont produit le même génotype WGR19M. Cet individu, et peut-être d'autres individus du PRM non détectés, se sont dispersés dans des zones où d'autres loups et chiens en liberté présentant une fréquence élevée de l'allèle  $K^B$  sont présents, ce qui indique que la mutation mélanique peut circuler entre les pools génétiques des loups et des chiens, et que la sélection pourrait favoriser la propagation des phénotypes sombres

dans les habitats proches (Musiani et al. 2007). Cependant, à l'heure actuelle, la dynamique de l'**introgression** du  $K^B$  dans la population Italienne de loups reste à analyser.

Après des siècles de déclin démographique et de contraction de l'aire de répartition, les loups sont en pleine expansion, augmentant leur nombre et la taille de leur aire de répartition. Des facteurs démographiques comme l'isolement géographique temporaire, la faible densité des populations de loups en voie de recolonisation et la dispersion des jeunes pourraient favoriser les croisements et l'hybridation introgressive avec les chiens en liberté, qui sont beaucoup plus nombreux que les loups dans certaines parties de leur aire de répartition en Italie (Genovesi et Dupré 2000). L'hybridation loup × chien a été décrite dans plusieurs pays d'Europe et d'Amérique du Nord à l'aide de marqueurs ADNmt et microsattélites : dans tous ces cas, cependant, les loups et les chiens échantillonnés restent génétiquement bien différenciés (Anderson et al. 2002 ; Godinho et al. 2011 ; Muñoz-Fuentes et al. 2010 ; Randi et Lucchini 2002 ; Verardi et al. 2006 ; Vilà et al. 2003). Ainsi, en l'état actuel des connaissances, l'hybridation pourrait ne pas compromettre l'intégrité génétique des populations de loups, indiquant que l'introgression de gènes **non fonctionnels** est faible ou limitée par des mécanismes génétiques et/ou comportementaux (Vilà et Wayne 1999). Cependant, des études sur l'origine et la diffusion de la mutation mélanique  $K^B$  chez les loups d'Amérique du Nord suggèrent que les résultats des croisements entre les espèces sauvages et leurs formes domestiquées pourraient être plus complexes qu'on ne l'imaginait jusqu'à présent, car des mutations fonctionnelles spécifiques pourraient se propager dans la nature par le biais d'une hybridation initiale suivie d'une sélection naturelle positive (Anderson et al. 2009).

### **La génétique du mélanisme et pourquoi l'allèle $K^B$ pourrait se répandre dans la population de loups Italiens**

Les gènes de la couleur du pelage sont à la fois **pléiotropes** et **épistatiques**, et les phénotypes remplissent de multiples fonctions (par exemple, protection du corps contre les rayons ultraviolets, thermorégulation, immunité innée et signaux de communication sociale ; Rees 2003). Chez certaines espèces animales, les couleurs polymorphes du pelage sont maintenues par la sélection naturelle et les réponses adaptatives aux variables de l'habitat (Hoekstra et al. 2005), alors que dans d'autres cas, leur génétique écologique est totalement inconnue (par exemple, dans la famille des chats ; Eizirik et al. 2003). Le mélanisme chez les chiens et les loups est une exception au mécanisme habituel *Agouti*/*Mc1r* car il est contrôlé par le gène *CBD103  $\beta$ -Defensin* (Candille et al. 2007). **Il est à noter que le SNP mélanique du gène *Agouti* n'a été détecté ni dans la meute MRP, ni dans les échantillons de loups Italiens de référence ou métisses**, confirmant que cette mutation pourrait être spécifiquement associée aux pelages noirs uniquement chez les bergers allemands (Kerns et al. 2004). De plus, deux loups au pelage noir (W334 et W357) collectés en Italie centrale ne présentaient pas la délétion du locus *K* mélanique ni le SNP *Agouti*, ce qui suggère que le pelage noir est contrôlé par des systèmes génétiques multiples (et encore non décrits) également chez les loups. L'un d'entre eux (W357) a été entièrement assigné à la population de loups « purs ». **Cela signifie que la présence de la délétion mélanique  *$\beta$ -Defensin* ou d'un phénotype noir n'est pas suffisante pour identifier tous les cas d'ascendance **introgressée** chez les loups et que, bien que les loups et les chiens Italiens soient suffisamment différenciés ( $F_{ST}=0,20$  ; Randi 2008), un faible nombre de microsattélites limite le pouvoir d'identification des métisses** (Barilani et al. 2007 ; Vähä et Primmer 2006).

Anderson et al. (2009) ont affirmé que la délétion  *$\beta$ -Defensin* pourrait avoir été impliquée dans l'adaptation à des types d'habitats hétérogènes chez les loups nord-Américains, étant plus favorisée

dans les forêts fermées et sombres où les phénotypes noirs sont plus fréquents (Musiani et al. 2007). Cette interprétation a toutefois été récemment remise en question par Hedrick (2009). Le modèle d'Anderson et al. (2009) a été proposé pour expliquer un processus d'hybridation et d'introgession qui pourrait remonter à 12 000 ans et qui est significatif en termes d'évolution. Leur hypothèse n'est peut-être pas bien adaptée pour expliquer l'apparition de manteaux noirs en Italie, qui ne remonte apparemment qu'au milieu des années 1970. Cependant, Coulson et al. (2011), en appliquant des modèles de projection intégrale (IPM ; Easterling et al. 2000) aux loups du PNY récemment réintroduits (1995-1996), ont découvert que les hétérozygotes noirs  $k^y/K^B$  pourraient présenter des caractéristiques de *fitness* supérieures (taux de survie et taux de reproduction annuels plus élevés, temps de génération plus long et succès de reproduction à vie plus important) que les deux homozygotes au locus *K*. Coulson et al. (2011) affirment que, bien que la couleur du pelage ne puisse pas expliquer directement l'avantage des hétérozygotes, les rôles des  $\beta$ -*Defensines* dans l'immunité cellulaire (Erles et Brownlie 2010 ; Pazgier et al. 2006) pourraient peut-être conférer des différences de *fitness*, confirmant que la propagation de mutations bénéfiques par auto-stop ou par balayage sélectif peut être rapide (Kim et Maruki 2011, et leurs références).

La délétion mélanique est répandue chez les chiens collectés à proximité des zones d'étude du MRP et dans un échantillon de canidés sauvages métisses de type loup, alors qu'elle est totalement absente dans un échantillon de loups Italiens non métisses. Bien que ces résultats indiquent apparemment une relation étroite entre les génotypes métisses loup  $\times$  chien et la présence de l'allèle  $K^B$ , deux facteurs pourraient avoir biaisé nos résultats : (1) nous avons comparé l'occurrence de l'allèle  $K^B$  dans deux groupes de taille relativement réduite qui avaient été précédemment classés comme métisses ( $n = 16$ ) ou loups ( $n = 40$ ), sur la base de données indépendantes (génotypes microsatellites multilocus et/ou traits phénotypiques anormaux) ; à l'heure actuelle, on ne connaît pas la diffusion de l'allèle  $K^B$  dans l'ensemble de la population Italienne de loups et (2) dans cette étude, les génotypes ont été assignés à un cluster de loups purs ou de chiens purs, ou ont été classés comme métisses, sur la base d'un nombre limité de microsatellites. Il est bien connu que l'identification précise des rétro-croisements passés et des individus introgressés ne serait possible qu'en utilisant un très grand nombre de marqueurs (Vähä et Primmer 2006). Ainsi, à l'heure actuelle, nous ne savons pas si et dans quelle mesure l'introgession génétique chez les loups Italiens a été sous-estimée. Ces deux inconvénients peuvent être évités grâce à : (1) un génotypage extensif d'échantillons non invasifs, actuellement collectés et génotypés dans de grandes parties de la population de loups Italiens (Caniglia et al. 2012), indépendamment de toute identification phénotypique préalable et (2) l'utilisation de centaines de milliers de SNP qui sont obtenus par des techniques de génotypage de nouvelle génération (vonHoldt et al. 2011) et qui peuvent être typés par des plateformes à haut débit assurant un bon succès de génotypage même dans des échantillons d'ADN de mauvaise qualité (Fabbri et al. 2012). Les données génomiques, associées aux observations phénotypiques, comportementales et épidémiologiques des meutes d'élevage, pourraient permettre de déterminer comment ce polymorphisme de couleur de robe se maintient dans les populations de loups (Coulson et al. 2011).

### Leçons pour la conservation des loups

Les biologistes de la conservation ont toujours des avis négatifs sur les conséquences de l'hybridation à médiation anthropique (Allendorf et al. 2011 ; Barilani et al. 2007 ; Oliveira et al. 2008). L'introgession de variantes génétiques sélectionnées au cours des processus de domestication peut détruire les adaptations locales et altérer des fonctions physiologiques essentielles, telles que les calendriers des cycles de reproduction, la résistance immunitaire aux

maladies infectieuses et les modules comportementaux prédateurs et autres, déprimant ainsi la *fitness* des individus métisses et conduisant finalement à l'extinction génétique de populations entières (Allendorf et al. 2001 ; Rhymer et Simberloff 1996, et de nombreux autres articles). Cependant, des résultats moins négatifs ont été décrits dans les populations naturelles de certains taxons hybrides (Arnold et Martin 2010). Les conséquences de l'hybridation en relation avec une densité de population variable (par exemple, populations **denses** *vs.* populations **éparses**), une structuration démographique variable (populations **centrales** *vs.* populations géographiquement **périphériques**) et la dynamique d'expansion du loup en Italie sont presque totalement inconnues. L'hybridation pourrait être initialement plus fréquente dans les populations éparses et périphériques (Godinho et al. 2011), et les taux **d'introgression** de gènes dans les populations en expansion pourraient être accélérés par « **l'effet surf** » (Excoffier et al. 2009). Dans tous les cas, la présence d'un nombre écrasant de chiens en liberté dans les zones d'expansion du loup reste la principale menace pour l'intégrité du pool génétique du loup, et toute stratégie de conservation du loup devrait inclure des actions prioritaires pour contrôler et limiter leur nombre.

Les mutations génétiques et les polymorphismes au niveau des gènes de la couleur du pelage ont été manifestement impliqués dans l'origine des races de chiens (Candille et al. 2007 ; Kerns et al. 2004). **Théoriquement, les croisements entre loups et chiens devraient produire une variété de motifs de couleur de robe différents chez les hybrides.** Cependant, pour autant que nous le sachions, à l'exception de petites anomalies morphologiques (ongles blancs, ergots et anomalies dentaires ; Ciucci et al. 2003), la couleur noire du pelage est le seul trait polymorphe visible qui a été observé à plusieurs reprises dans les populations de loups Italiennes et Européennes (Godinho et al. 2011). Des études moléculaires plus détaillées feront la lumière sur l'origine de la région chromosomique portant la délétion  $K^B$  (si elle est similaire ou différente des haplotypes nord-Américains) et permettront probablement de déterminer l'âge d'origine et le taux de propagation des mutations mélaniques dans les populations de loups. La diffusion simple par **introgression** et **dérive** dans les populations en expansion, ou des hypothèses alternatives (par exemple, que la diffusion du pelage noir pourrait être expliquée par une forte sélection positive et des adaptations très rapides à des habitats plus sombres, la valeur de camouflage des pelages plus sombres dans la prédation, ou une hypothétique préférence des femelles pour les partenaires noirs) sont actuellement légitimes, mais elles restent non documentées.

Répondre à ces questions est pertinent pour la conservation des loups Italiens. Du point de vue de la conservation, l'hybridation est un problème sérieux qui devrait nécessiter une réponse bien pensée et efficace. **L'introgression** de gènes de chien dans les populations de loups sauvages pose des questions difficiles sur plusieurs aspects avec des réponses spécifiques au cas par cas en fonction des circonstances locales, telles que : (1) l'évaluation précise de l'étendue de **l'introgression**, (2) l'utilisation de marqueurs phénotypiques pour identifier les hybrides putatifs et les traces **d'introgression** passées, (3) les conséquences du statut taxonomique incertain des hybrides sur la mise en œuvre de la législation de gestion, (4) la faisabilité technique et l'acceptabilité sociale d'éventuels plans d'élimination des hybrides, et (5) la responsabilité des autorités nationales dans la préservation de l'identité génétique des espèces protégées. Les résultats de cette étude appellent à des plans de conservation visant à fournir des directives conceptuelles et éthiques solides pour gérer l'hybridation à grande échelle.