

## Des données génomiques révèlent que les chacals dorés Africains et Eurasiens sont des espèces distinctes

### Genome-wide Evidence Reveals that African and Eurasian Golden Jackals Are Distinct Species

Klaus-Peter Koepfli,<sup>1,2,17,\*</sup> John Pollinger,<sup>3,17</sup> Raquel Godinho,<sup>4,5</sup> Jacqueline Robinson,<sup>3</sup> Amanda Lea,<sup>6</sup> Sarah Hendricks,<sup>7</sup> Rena M. Schweizer,<sup>3</sup> Olaf Thalmann,<sup>8,9</sup> Pedro Silva,<sup>4</sup> Zhenxin Fan,<sup>10</sup> Andrey A. Yurchenko,<sup>2</sup> Pavel Dobrynin,<sup>2</sup> Alexey Makunin,<sup>2</sup> James A. Cahill,<sup>11</sup> Beth Shapiro,<sup>11</sup> Francisco Álvares,<sup>4</sup> José C. Brito,<sup>4</sup> Eli Geffen,<sup>12</sup> Jennifer A. Leonard,<sup>13</sup> Kristofer M. Helgen,<sup>14</sup> Warren E. Johnson,<sup>15</sup> Stephen J. O'Brien,<sup>2,16</sup> Blaire Van Valkenburgh,<sup>3</sup> and Robert K. Wayne<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Smithsonian Conservation Biology Institute, National Zoological Park, 3001 Connecticut Avenue NW, Washington, DC 20008, USA

<sup>2</sup>Theodosius Dobzhansky Center for Genome Bioinformatics, St. Petersburg State University, 41A Sredniy Prospekt, St. Petersburg 199034, Russia

<sup>3</sup>Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of California, Los Angeles, 610 Charles Young Drive East, Los Angeles, CA 90095-1606, USA

<sup>4</sup>CIBIO/InBIO - Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Campus Agrário de Vairão, 4485-661 Vairão, and Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre s/n, 4169-007 Porto, Portugal

<sup>5</sup>Department of Zoology, University of Johannesburg, PO Box 534, Auckland Park 2006, South Africa

<sup>6</sup>Department of Biology, Duke University, PO Box 90388, Durham, NC 27708, USA

<sup>7</sup>Institute for Bioinformatics and Evolutionary Studies, Department of Biological Sciences, University of Idaho, 875 Perimeter MS 3051, Moscow, ID 83844, USA

<sup>8</sup>Department of Biological Sciences, Division of Genetics and Physiology, University of Turku, Itäinen Pitkätatu 4, 20014 Turku, Finland

<sup>9</sup>Department of Biology, University of Oulu, PO Box 3000, 90014 Oulu, Finland

<sup>10</sup>Sichuan Key Laboratory of Conservation Biology on Endangered Wildlife, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China

<sup>11</sup>Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of California, Santa Cruz, 1156 High Street, Santa Cruz, CA 95064, USA

<sup>12</sup>Department of Zoology, Tel Aviv University, Tel Aviv 69978, Israel

<sup>13</sup>Estación Biológica de Doñana, Conservation and Evolutionary Genetics Group (EBD-CSIC), Avenida Américo Vespucio s/n, 41092 Sevilla, Spain

<sup>14</sup>Division of Mammals, National Museum of Natural History, MRC 108, Smithsonian Institution, PO Box 37012, Washington, DC 20013-7012, USA

<sup>15</sup>Smithsonian Conservation Biology Institute, National Zoological Park, 1500 Remount Road, Front Royal, VA 22630, USA

<sup>16</sup>Nova Southeastern University, Oceanographic Center, 8000 North Ocean Drive, Dania Beach, FL 33004 USA

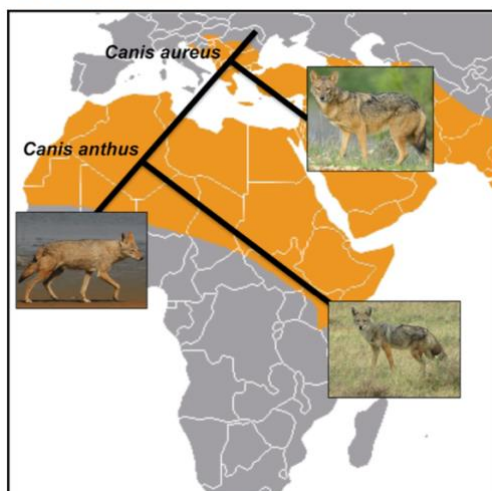
<sup>17</sup>Co-first author

\*Correspondence: koepfli@si.edu (K.-P.K.), rwayne@ucla.edu (R.K.W.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.060>

Current Biology 25, 2158–2165, August 17, 2015 ©2015 Elsevier Ltd All rights reserved

#### Graphical Abstract



#### En bref

Koepfli et al. évaluent la divergence entre les chacals dorés (*Canis aureus*) d'Afrique et d'Eurasie en utilisant les données des génomes mitochondriaux et nucléaires. Ils montrent que les chacals dorés Africains et Eurasiens sont des lignées génétiquement distinctes et indépendantes, et que les **chacals dorés Africains** représentent probablement une espèce distincte.

#### Résumé

Le chacal doré d'Afrique (*Canis aureus*) a longtemps été considéré comme un congénère des chacals distribués dans toute l'Eurasie, les populations sources les plus proches se trouvant au Moyen-Orient. Cependant, deux rapports récents ont révélé que les haplotypes mitochondriaux de certains chacals dorés Africains s'alignaient plus étroitement sur les loups gris (*Canis lupus*) [1, 2], ce qui est

surprenant étant donné l'absence de loups gris en Afrique et la divergence phénotypique entre les deux espèces. De plus, ces résultats impliquent l'existence d'une espèce phylogénétiquement distincte jusqu'alors non reconnue, malgré une longue histoire de travaux taxonomiques sur les canidés Africains. Pour tester l'hypothèse d'une espèce distincte et comprendre l'histoire de l'évolution qui expliquerait ce résultat déroutant, nous avons analysé de nombreuses données génomiques, notamment les séquences du génome mitochondrial, les séquences de 20 loci autosomiques (17 introns et 3 segments d'exon), les loci microsatellites, les séquences du gène de la protéine à doigts de zinc liée à l'X et à l'Y (*ZFX* et *ZFY*) et les séquences nucléaires du génome entier chez le chacal doré et le loup gris d'Afrique et d'Eurasie. Nos résultats fournissent des preuves cohérentes et solides que les populations de chacals dorés d'Afrique et d'Eurasie représentent des lignées monophylétiques distinctes séparées depuis plus d'un million d'années, ce qui est suffisant pour mériter une reconnaissance formelle en tant qu'espèces différentes : *C. anthus* (loup doré Africain) et *C. aureus* (chacal doré Eurasien). En utilisant des données morphologiques, nous démontrons une similarité morphologique frappante entre les chacals dorés d'Afrique de l'Est et d'Eurasie, suggérant un parallélisme, qui a pu induire en erreur les taxonomistes et qui reflète probablement une compétition interspécifique unique et intense dans la guildes des carnivores d'Afrique de l'Est. Notre étude montre comment l'écologie peut confondre la taxonomie si la compétition interspécifique limite la diversification des tailles.

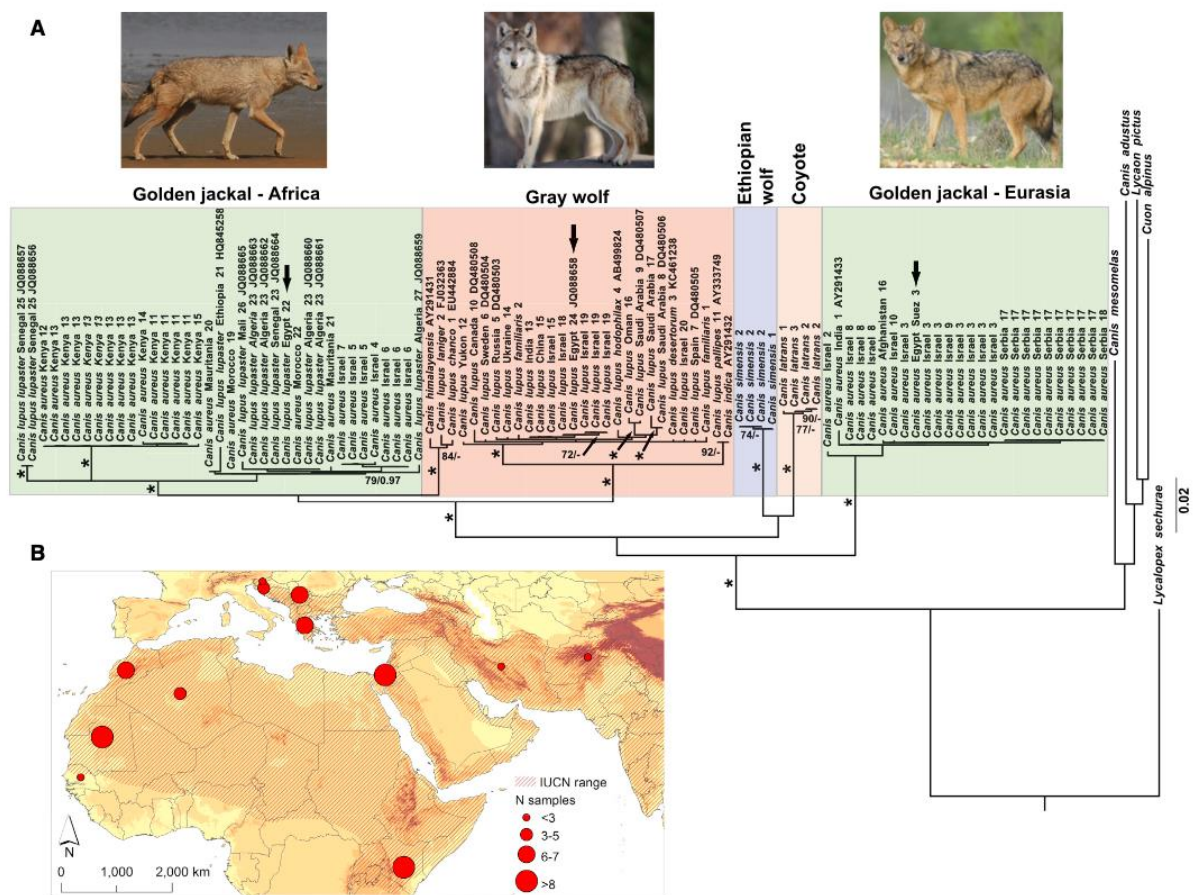
## RÉSULTATS

Deux études récentes basées sur l'ADNmt ont rapporté que les chacals dorés de grande taille d'Éthiopie et d'Afrique du Nord et de l'Ouest étaient plus étroitement apparentés aux loups gris qu'aux autres populations de chacals dorés, ce qui suggère que certaines populations de chacals dorés Africains représentent une sous-espèce cryptique de loup gris, appelée *Canis lupus lupaster*, le loup Africain [1, 2]. Ces résultats sont cohérents avec des résultats antérieurs basés sur des preuves morphologiques et zoogéographiques qui avaient suggéré que les grands chacals d'Égypte (*C. aureus lupaster*) étaient en fait une sous-espèce de petite taille du loup gris [3]. Cependant, cette conclusion laisse la position des populations de chacals dorés en Afrique de l'Est problématique, car ils n'ont jamais été considérés comme distincts de leurs congénères en Eurasie. Par conséquent, soit le chacal doré et le loup Africain sont tous deux présents en Afrique, comme cela a été suggéré [2, 3], soit ils représentent une seule espèce polytypique. Le premier scénario suggère des invasions séparées de formes semblables au loup et au chacal en Afrique du Nord et de l'Est, tandis que le second scénario suggère une coexistence stable de morphes distincts au sein de la même espèce qui a évolué in situ.

L'histoire de l'évolution est mieux vérifiée par la concordance entre différents marqueurs moléculaires, qui peuvent fournir une histoire de la divergence à l'échelle du génome, et avec les données écologiques et morphologiques peuvent être utilisées pour comprendre le contexte de la divergence évolutive [4-7]. Nous présentons ici des analyses détaillées de l'histoire du génome du chacal doré en utilisant un ensemble complet de marqueurs moléculaires comprenant (1) des séquences du génome mitochondrial, (2) 20 segments d'ADN autosomal, (3) des microsatellites, (4) des séquences du gène de la protéine à doigt de zinc liée à l'X et à l'Y (*ZFX* et *ZFY*), et (5) 7,6 millions de SNP dérivés des séquences du génome entier. Nous comparons les données générées par les chacals dorés à celles des loups gris et d'autres canidés ressemblant à des loups (voir Procédures expérimentales supplémentaires).

## Analyses phylogénétiques des séquences mitochondriales et nucléaires

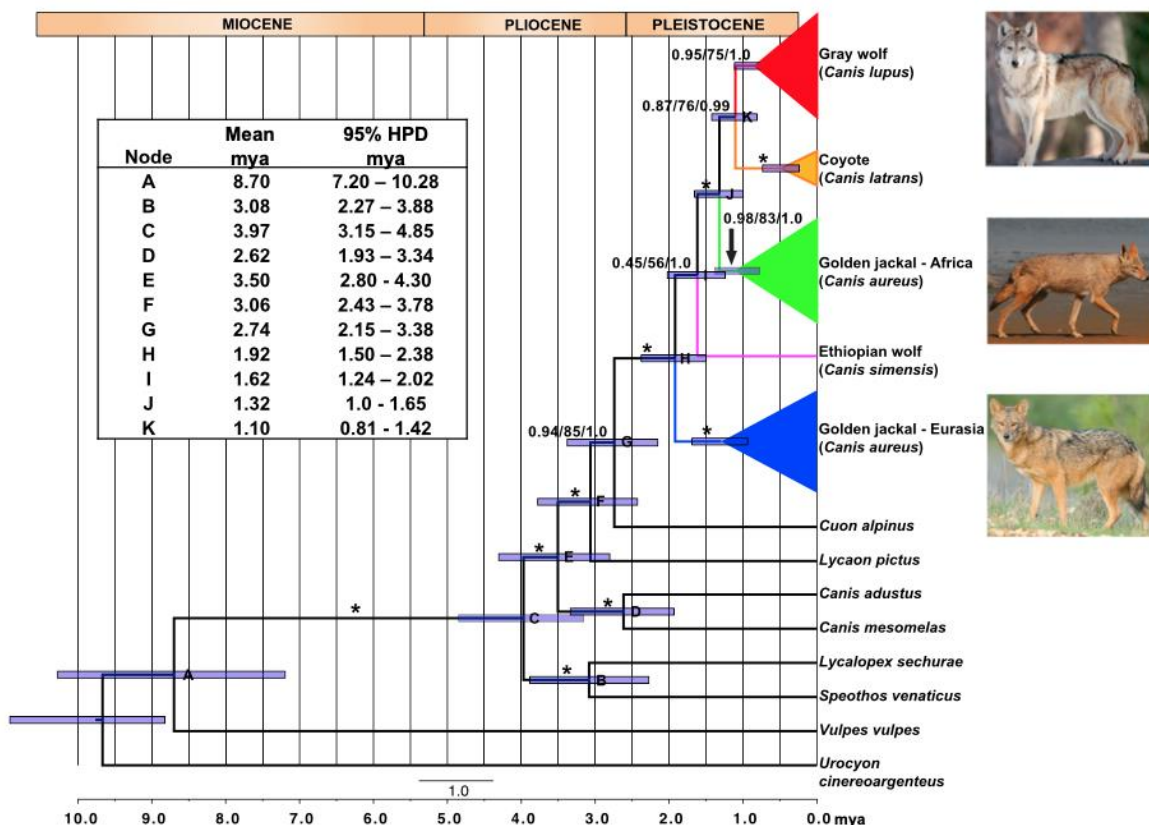
Les phylogénies estimées à partir des séquences du gène mitochondrial du cytochrome *b*, de 13 gènes codant pour des protéines et de deux gènes d'ARNr provenant de génomes mitochondriaux complets (13 890 pb), et de 17 segments d'intron plus 3 segments d'exon (13 727 pb) étaient toutes cohérentes et montraient que les chacals dorés sont séparés en deux clades bien soutenus. La phylogénie du cytochrome *b* (Figure 1A) comprend à la fois des séquences publiées et de nouvelles séquences provenant de chacals dorés échantillonnés en Afrique et en Eurasie (Figure 1B), qui sont réparties en deux clades. Les haplotypes de chacals dorés du Kenya, de la Mauritanie et du Maroc sont inclus dans un clade contenant des haplotypes de canidés d'Algérie, d'Égypte, du Mali et du Sénégal désignés sous le nom de *C. lupus lupaster* [1, 2]. Ce clade de chacal doré Africain est étroitement lié aux loups gris d'Eurasie avec un fort soutien nodal et jusqu'à 6,7% de divergence avec les chacals d'Eurasie. Les seules exceptions à ce schéma géographique sont les haplotypes des chacals dorés d'Israël, qui sont regroupés dans les clades Eurasiens et Africain, et trois canidés originaires d'Égypte qui sont classés comme loup Africain, loup gris et chacal doré (ces derniers sont indiqués par des flèches sur la Figure 1B). La phylogénie des séquences dérivées des génomes mitochondriaux complets montre également que les chacals dorés Africains du Kenya se regroupent fortement avec les loups gris, et non avec un chacal doré Eurasiens d'Israël (Figure S1).



**Figure 1. Arbre phylogénétique basé sur les séquences de cytochrome *b* mitochondrial et les lieux d'échantillonnage des chacals dorés utilisés dans cette étude (A) Phylogramme de maximum de vraisemblance de 104 séquences de cytochrome *b* (1 140 pb). Le numéro d'haplotype est indiqué à côté du nom du taxon et de la localité. Les numéros d'accès indiquent les séquences téléchargées de GenBank. Les haplotypes sans numéro d'accès sont de nouvelles séquences générées pour la présente étude. Les astérisques aux nœuds indiquent un support bootstrap  $\geq 80\%$  basé sur des analyses de maximum de vraisemblance (500 pseudo-répliquats) et une probabilité postérieure  $\geq 0.95$  de l'inférence bayésienne. Les *Canis* spp. d'Égypte sont indiqués par des flèches épaisses. Les haplotypes étiquetés comme *Canis lupus lupaster* font référence au loup Africain. L'arbre a été enraciné en utilisant le**

renard de Sechuran (*Lycalopex sechurae*) comme outgroupe. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site. Crédits photos : à gauche, chacal doré du Sénégal (© CIBIO/Monia Nakamura) ; au centre, loup gris du Mexique (© Tom et Pat Leeson) ; à droite, chacal doré d'Israël (© Eyal Cohen). (B) Carte des localités géographiques montrant où les chacals dorés ont été échantillonnés. Le nombre relatif d'animaux échantillonnés dans chaque localité est indiqué. Les lignes hachurées indiquent l'aire de répartition géographique du chacal doré selon la distribution de l'UICN (<http://www.iucnredlist.org/details/3744/0>)

Les **phylogénies** estimées à partir des données nucléaires suggèrent également une relation étroite entre les chacals dorés Africains représentatifs et les loups gris, mais dans ces analyses, le clade des loups gris est frère des coyotes comme cela a été constaté précédemment [8], **ce qui suggère que la divergence entre les chacals dorés et les loups gris a précédé celle des loups gris et des coyotes** (Figure 2). Les phylogénies estimées à l'aide des approches de **concaténation** et de **coalescence** multi-espèces étaient identiques, sauf pour le placement relatif du loup Ethiope (*C. simensis*) (Figure S2). Les temps de divergence estimés à l'aide de l'ensemble des données nucléaires concaténées montrent que le loup gris, le coyote, le loup d'Éthiopie et les deux lignées de chacals dorés se sont diversifiés au cours du Pléistocène, en commençant il y a environ 1,9 million d'années (mya) (densité postérieure la plus élevée à 95% [HPD] = 1,5-2,4 mya) avec la divergence de la lignée Eurasienne de chacals dorés (Figure 2). La divergence entre la lignée Africaine de chacals dorés et le clade loup gris + coyote a été estimée à 1,3 mya (95% HPD = 1,0-1,7 mya). Ces estimations sont légèrement antérieures aux valeurs correspondantes de l'analyse du génome mitochondrial (Figure S1).



**Figure 2. Chronogramme estimé à partir de l'analyse concaténée de vingt segments de gènes nucléaires utilisant une horloge moléculaire relaxée.**

L'arbre est basé sur l'analyse de 13 727 pb de séquence recueillie dans 17 segments contenant des introns et 3 segments contenant des exons. Les valeurs indiquées aux nœuds sont, respectivement : Test du rapport de vraisemblance approximatif de Shimodaira-Hasegawa (SH-aLRT, PhyML), support bootstrap avec 1 000 pseudo-réplicats (BS, RAxML), et probabilité postérieure de l'inférence bayésienne (PP, BEAST). Les astérisques indiquent SH-aLRT = 100%, BS = 100%, et PP = 1.0. Les barres de nœuds montrent la densité postérieure la plus élevée (HPD) de 95% pour les temps de divergence. Quatre individus ont été utilisés pour le loup gris, le chacal doré (Afrique) et le chacal

doré (Eurasie), et deux individus ont été utilisés pour le coyote. Les lettres correspondent à la liste des temps de divergence estimés et à la DHP à 95% pour les internoeuds (encart). L'arbre a été enraciné en utilisant le renard roux (*Vulpes vulpes*) et le renard gris (*Urocyon cinereoargenteus*) comme outgroupes. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site. L'échelle de temps en bas est exprimée en millions d'années (mya), et l'échelle de temps géologique (époques) est indiquée en haut. Crédits photos : en haut, loup gris du Mexique (© Tom et Pat Leeson) ; au milieu, chacal doré du Sénégal (© CIBIO/Monia Nakamura) ; en bas, chacal doré d'Israël (© Eyal Cohen). Voir également le Tableau S1 et la Figure S2

Les arbres des gènes mitochondriaux et les arbres des espèces nucléaires présentent des différences **topologiques** importantes, qui peuvent être dues à des différences dans le tri des lignées (voir Procédures expérimentales supplémentaires). Néanmoins, les **topologies** dans lesquelles les deux lignées de chacals étaient contraintes d'être monophylétiques étaient moins significativement supportées par rapport à leurs topologies optimales (Tableau S1).

### Séquences du chromosome sexuel

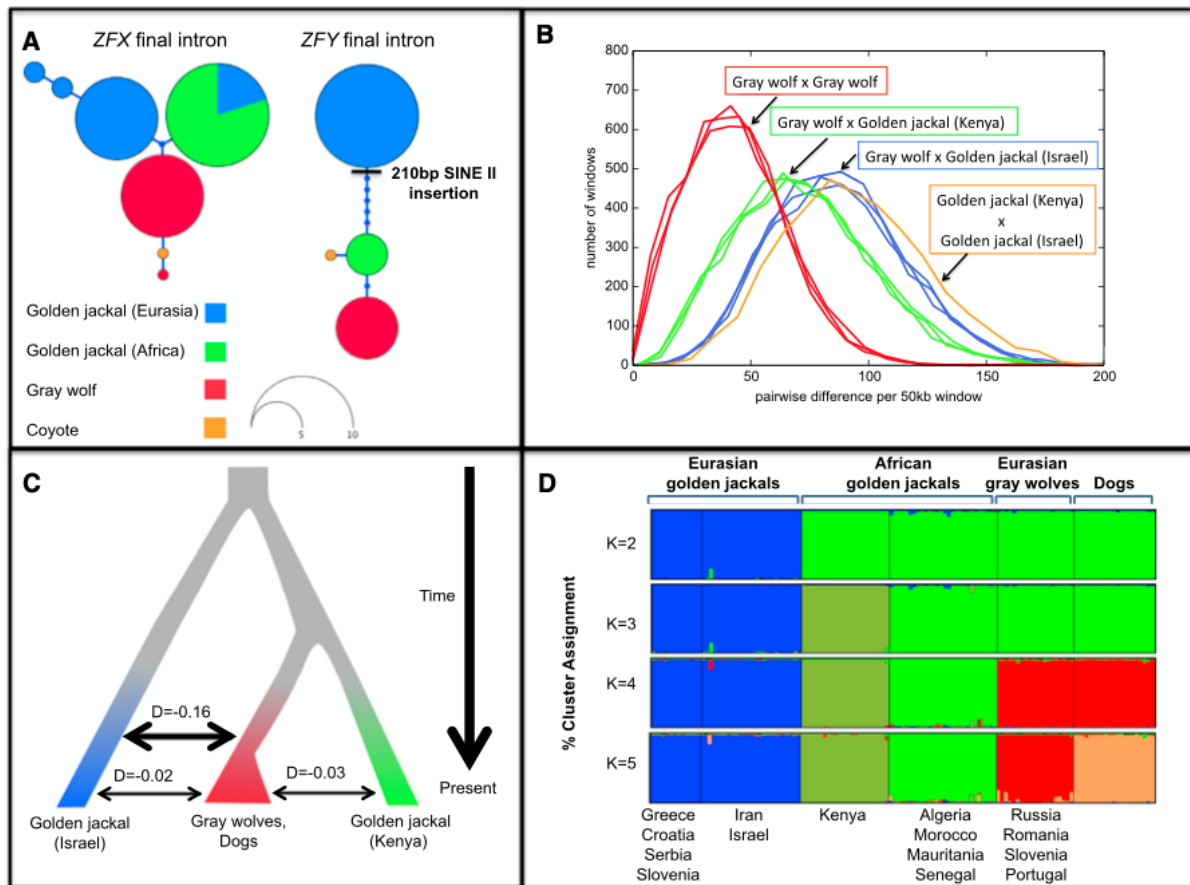
La distinction génétique entre les chacals dorés d'Afrique et d'Eurasie est également soutenue par les analyses des séquences de l'intron final des gènes à doigts de zinc du chromosome X (*ZFX*) et du chromosome Y (*ZFY*). Les chacals dorés Eurasiens, y compris la plupart des individus d'Israël, portent des haplotypes *ZFX* ou *ZFY* distincts de ceux observés chez les loups gris, les coyotes et les chacals dorés Africains (Figure 3A ; Tableau S2). Notamment, les chacals dorés Africains sont dépourvus d'une insertion SINE II de 210 pb, d'une insertion de 9 pb et d'une insertion de 2 pb observée chez les chacals dorés Eurasiens (Tableau S2) [9]. Un test PCR sur un panel plus large de 31 chacals dorés mâles d'Eurasie et d'Afrique a confirmé qu'à deux exceptions près (toutes deux originaires d'Israël), tous les chacals dorés mâles d'Eurasie présentaient l'insertion de l'élément SINE II de *ZFY*, bien que cet insert soit absent chez les chacals dorés Africains (Tableau S3).

### Séquences du génome entier et métissage de populations

L'analyse des séquences du génome entier de trois loups Eurasiens et d'un chacal doré Africain (Kenya) et d'un chacal doré Eurasiens (Israël) a donné 7 675 363 SNP, et les comparaisons par paires entre ces taxons confirment leur caractère distinct à travers le génome (Figure 3B). Nous avons trouvé une diversité relativement faible parmi les séquences du loup gris ( $\sim 42\text{-}45 \pm 22$  sites dans 50 000 pb) bien que les loups échantillonnés soient originaires de populations géographiquement éloignées à travers l'Eurasie. Le chacal doré Africain présentait une divergence égale par rapport aux trois loups gris, avec une différence de  $\sim 72 \pm 30$  sites sur 50 000 pb. **Le chacal doré d'Eurasie a montré un niveau de divergence plus élevé par rapport aux loups gris, de  $\sim 87 \pm 29$  sites en 50 000 pb. De manière plus frappante, les chacals dorés d'Afrique et d'Eurasie étaient les plus divergents, différant de  $\sim 94 \pm 31$  sites en 50 000 pb.** L'analyse en composantes principales (ACP) et les trajectoires historiques de la taille effective des populations à partir des cinq génomes de canidés renforcent encore la distinction entre les deux chacals dorés par rapport aux loups gris (Figure S3).

Nous avons trouvé des preuves confirmant le flux génétique historique entre les lignées de canidés dans les analyses statistiques *D* des données SNP à l'échelle du génome (Figure 3C ; Tableau S4) [10]. **Les faibles valeurs de *D* ( $D = 0,0$  à  $0,04$ ) indiquent un flux génétique peu fréquent entre les lignées du chacal doré du Kenya et du loup gris, comparable aux comparaisons entre les humains anatomiquement modernes et les Néandertaliens** [10]. En revanche, des valeurs plus élevées de la statistique *D* ( $0,16$  à  $0,18$ ) suggèrent qu'un flux génétique significatif s'est produit entre les chacals

dorés Eurasiens et le groupe loup gris/chien après la divergence de ce dernier avec la lignée de chacal doré Africain (Figure 3C ; Tableau S4).



**Figure 3. Modèles de différenciation génétique et de mélange des chacals dorés d'Afrique et d'Eurasie basés sur les séquences du chromosome sexuel, les données SNP à l'échelle du génome et les génotypes multilocus des microsatellites.**

(A) Réseaux d'haplotypes montrant les relations entre les séquences d'intron final *ZFX* et *ZFY* chez les chacals dorés d'Afrique et d'Eurasie, les loups gris et les coyotes. La taille des cercles est proportionnelle à la fréquence des haplotypes (voir échelle). Les petits points sur les entre-nœuds indiquent le nombre d'indels et de substitutions nucléotidiques entre les haplotypes. Les internodes sans points indiquent des substitutions uniques entre les haplotypes. L'insertion SINE II de 210 pb dans les séquences *ZFY* séparant les chacals dorés eurasiens des chacals dorés africains, des loups gris et des coyotes est indiquée. Voir le tableau S2 pour les caractéristiques spécifiques des séquences de chaque haplotype. Voir également le Tableau S3.

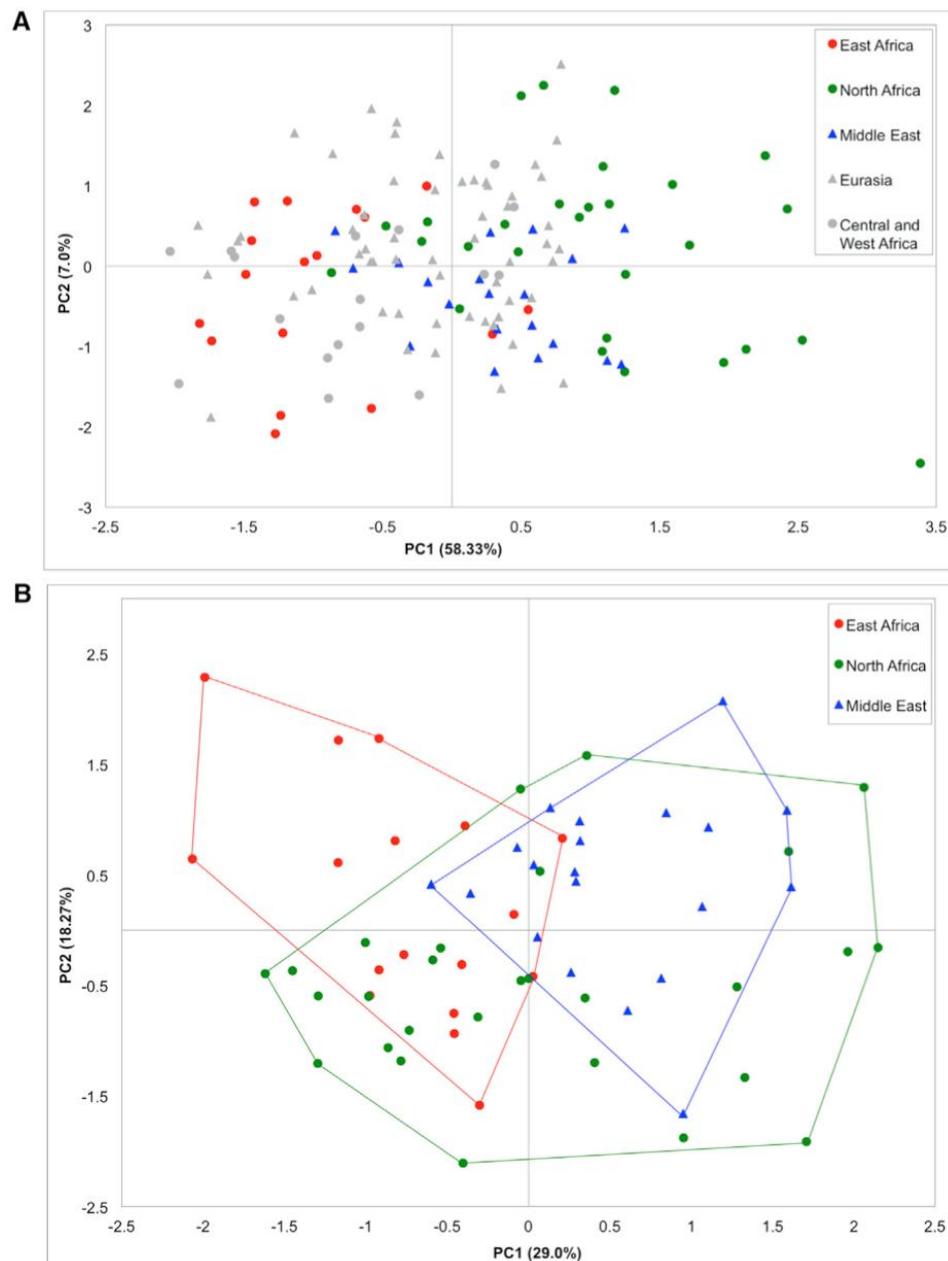
(B) Comparaison de la divergence à l'échelle du génome entre le chacal doré et le loup gris. Les histogrammes des estimations de la distance par paire à l'échelle du génome ont été calculés à partir de fenêtres non chevauchantes de 50 kb (41 999 fenêtres au total) pour les dix comparaisons par paire possibles entre les trois génomes de loups gris et les deux génomes de chacals dorés. Les loups gris sont originaires de Chine, de Croatie et d'Israël. Les différences par paires correspondent au nombre de différences par 50 kb. Voir également la Figure S3.

(C) Diagramme montrant les relations phylogénétiques entre les chiens, les loups gris, les chacals dorés d'Afrique (Kenya) et les chacals dorés d'Eurasie (Israël) utilisés dans les comparaisons de la statistique *D*. La phylogénie a été enracinée dans le génome des chiens. La phylogénie a été enracinée en utilisant le renard de l'île de la Manche (non montré). Les valeurs de la statistique *D* au-dessus des flèches à double tête indiquent un mélange détectable (flux génétique) entre les lignées. Les loups gris proviennent de Chine, de Croatie et d'Israël, et les chiens domestiques représentent les races dingo et basenji. Voir également le Tableau S4.

(D) Structure estimée de la population de 128 individus génotypés pour 38 loci microsatellites. L'analyse et les affectations de probabilité postérieure à chaque cluster en supposant deux ( $K = 2$ ) à cinq ( $K = 5$ ) clusters génétiques ont été estimées à l'aide de STRUCTURE (voir Procédures expérimentales supplémentaires). La vraisemblance  $\Delta K$  était la plus élevée pour  $K = 3$  (voir Informations supplémentaires). L'origine des individus dans chaque cluster est indiquée au bas de la figure.

Il est intéressant de noter que le signal de flux génétique est plus important entre le chacal doré Eurasiens et le basenji et le dingo. La proximité des races de chiens et des chacals dorés peut indiquer

un mélange récent. Par ailleurs, certains composants du génome canin pourraient provenir d'un mélange avec des loups gris qui se sont mélangés avec des chiens dans le passé. Cependant, des analyses génomiques antérieures suggèrent que la composante chien chez les loups gris du Moyen-Orient est inférieure à 9% [11]. Des preuves supplémentaires de mélange génétique chez les chacals dorés Israéliens proviennent des comparaisons de nos résultats de séquences de cytochrome *b*, d'ADN nucléaire, de microsatellites et de *ZFX/ZFY* (voir ci-dessus et Procédures expérimentales supplémentaires).



**Figure 4. Analyses en composantes principales des données morphométriques des chacals dorés d'Afrique et d'Eurasie**

(A) Tracé de la composante principale 2 (PC2) par rapport à la PC1, basé sur 45 mesures linéaires de dents et de crânes de 140 chacals dorés africains et eurasiens provenant de cinq régions géographiques différentes. Voir [12] pour les détails de l'échantillonnage géographique des chacals dorés.

(B) Tracé de la PC2 par rapport à la PC1 basé sur neuf variables de ratio qui décrivent la forme des dents et du crâne pour trois populations : Afrique du Nord (Égypte, Libye, Tunisie, Algérie, Maroc, Sénégal, Sahara occidental), Afrique de l'Est (Kenya, Éthiopie) et Moyen-Orient (Iran, Turquie, Jordanie, Israël, Grèce). Les nombres entre parenthèses indiquent le pourcentage de variance expliquée sur chaque axe. Voir également la Figure S4.

### **Analyse microsatellite de la structure de la population**

L'analyse de regroupement bayésienne de 128 individus génotypés à 38 loci microsatellites corrobore nos conclusions ci-dessus (Figure 3D). Nos résultats montrent que  $K = 3$  présente la probabilité la plus élevée (voir Procédures expérimentales supplémentaires), les chacals dorés d'Eurasie, les chacals dorés du Kenya et un groupe contenant des chacals dorés d'Afrique du Nord, des loups gris et des chiens étant résolus comme des groupes génétiques distincts. Notamment, à  $K = 2$ , tous les chacals dorés Africains sont regroupés avec les loups gris et les chiens dans une seule grappe, tandis qu'à  $K = 4$ , les chacals dorés nord-Africains sont résolus comme une grappe distincte des loups gris et des chiens (Figure 3D). **D'un point de vue critique, nos résultats suggèrent que la présence de deux clades d'ADNmt chez les chacals dorés d'Israël (voir les résultats du cytochrome *b* ci-dessus) ne reflète pas l'existence de deux entités reproductivement distinctes dans cette région, car les résultats des microsatellites suggèrent que les haplogroupes ne forment pas de clusters génétiques distincts** (Figure 3D).

### **Parallélisme de taille et de morphologie**

Nous avons testé si les modèles révélés par les données génétiques et génomiques se manifestaient également dans la morphologie. L'ACP de 45 mesures crâniennes et dentaires prises sur 140 chacals dorés échantillonnés dans toute l'aire de répartition de l'espèce [12] a révélé que les chacals dorés d'Afrique du Nord sont distincts des chacals dorés d'Eurasie et d'Afrique de l'Est sur le PC1 (58,3% de variation expliquée), ce qui reflète la plus grande taille corporelle des chacals dorés d'Afrique du Nord et est cohérent avec la charge égale entre les mesures sur ce PC (Figure 4A). Le PC2 (7,0% de variation expliquée) ne permet pas de séparer davantage ces trois populations, mais le PC3 (4,4% de variation expliquée) suggère qu'il existe des différences dans la taille relative des dents et la forme du crâne entre les chacals dorés d'Eurasie et du Moyen-Orient et tous les autres chacals dorés d'Afrique (Nord, Est, Ouest et Centre) (Figure S4). Pour approfondir cette question, nous avons effectué une ACP sur les valeurs de neuf rapports de forme pour trois groupes : Les chacals dorés d'Afrique du Nord, d'Afrique de l'Est et du Moyen-Orient (voir les procédures expérimentales supplémentaires). Le premier PC représentait 33% de la variance et séparait les chacals dorés d'Afrique de l'Est de ceux du Moyen-Orient (Figure 4B). Par rapport aux chacals dorés d'Afrique de l'Est, les chacals dorés d'Eurasie présentaient des valeurs élevées sur cet axe, reflétant leurs museaux plus larges, leurs molaires plus courtes et les sections transversales plus rondes de leurs prémolaires et de leurs canines supérieures (voir Procédures expérimentales supplémentaires). Les chacals dorés nord-Africains se chevauchent avec les deux autres populations sur le premier PC, peut-être parce que cet échantillon comprend à la fois des individus plus grands, dits « loups Africains », et d'autres qui sont plus étroitement liés aux chacals dorés du Moyen-Orient. Notamment, les chacals dorés d'Afrique du Nord ont plus de valeurs négatives ou proches de zéro sur le premier PC et sont donc plus similaires aux chacals dorés d'Afrique de l'Est qu'à ceux du Moyen-Orient en termes de forme. Les chacals dorés d'Afrique du Nord et d'Afrique de l'Est sont similaires en ce qu'ils ont des canines supérieures plus étroites et en forme de lame, ainsi que des prémolaires et des museaux plus minces, qui sont tous des caractéristiques semblables à celles des loups gris. Ces résultats suggèrent que le parallélisme de taille et de conformation corporelle entre les chacals d'Eurasie et d'Afrique de l'Est est accompagné de différences plus subtiles qui soutiennent une ascendance commune de ces derniers avec les chacals d'Afrique du Nord.



## DISCUSSION

Nos résultats concernant l'ADNmt, les loci nucléaires et les génomes entiers fournissent des preuves cohérentes et convaincantes que les chacals dorés d'Afrique et d'Eurasie constituent des pools génétiques largement distincts avec des histoires évolutives indépendantes. Nous estimons que la lignée Africaine a suivi une trajectoire indépendante depuis au moins un million d'années. Nos résultats **prolongent** et **contrastent** avec les conclusions d'études génétiques antérieures, basées exclusivement sur l'ADN mitochondrial, qui suggéraient que certaines populations de chacals dorés en Afrique constituaient une sous-espèce de loup gris [1, 2]. **Plus précisément, nous montrons que, compte tenu de notre échantillonnage actuel, il n'y a pas de chacals dorés d'affinité Eurasienne en Afrique.** Au contraire, les chacals dorés Africains définissent une lignée distincte, qui inclut ceux d'Afrique de l'Est **présentant une similarité phénotypique avec les chacals dorés Eurasiens.** Les chacals dorés Africains sont distincts par toutes les mesures génétiques de cette étude, montrant des différences de diagnostic à travers une gamme de marqueurs et avec des niveaux de divergence du génome similaires en magnitude à ceux trouvés entre d'autres espèces reconnues. **Ainsi, nos résultats suggèrent que les chacals dorés Africains méritent d'être reconnus comme une espèce à part entière, car ils répondent au critère principal de définition d'une lignée de métapopulation distincte et évoluant de manière indépendante selon le concept d'espèce unifiée** [13]. En conséquence, nous proposons que les chacals dorés Africains soient désignés sous le nom de *Canis anthus* (Cuvier, 1820) sur la base de la plus ancienne description de chacals dorés du Sénégal [14] (voir Procédures expérimentales supplémentaires). En outre, nous suggérons que les noms communs « **loup doré Africain** » (*C. anthus*) et « **chacal doré Eurasien** » (*C. aureus*) soient appliqués pour distinguer ces taxons, et pour distinguer le premier du loup éthiopien (*C. simensis*). Nous proposons que le **loup doré Africain** soit distribué dans toute l'Afrique et qu'il comprenne des individus qui ont été désignés comme *C. lupus lupaster* [1-3] ou *C. aureus*, sensu lato. Le parallélisme morphologique du loup doré Africain et du chacal doré Eurasien peut avoir entraîné leur attribution erronée à une seule espèce dans la plupart des traitements taxonomiques depuis que *C. aureus* a été décrit formellement par Linnaeus [15]. *C. anthus* mérite d'être conservé et évalué indépendamment de *Canis aureus*, car il représente un héritage unique d'adaptation et de divergence au sein des Canidae existants.

Nos analyses d'ADN nucléaire indiquent que la lignée du **loup doré Africain** s'est séparée du clade loup gris + coyote vers 1,0-1,7 mya au cours du Pléistocène. **Plus largement, nos analyses phylogénétiques suggèrent que les canidés existants de type loup ont colonisé l'Afrique à partir de l'Eurasie au moins cinq fois au cours du Pliocène et du Pléistocène, ce qui est cohérent avec les preuves scientifiques suggérant qu'une grande partie de la diversité de la faune canidae Africaine résulte de l'immigration d'ancêtres Eurasiens [16, 17], coïncidant probablement avec les oscillations climatiques du Pliocène-Pléistocène entre des conditions arides et humides** [18, 19].

Nos analyses des données SNP à l'échelle du génome ont révélé des preuves de **métissage** dans l'histoire des chacals dorés Eurasiens et des loups dorés Africains. Les chacals dorés Eurasiens d'Israël présentent des signes d'hybridation avec des loups gris, des chiens et des loups dorés Africains, d'après les analyses statistiques *D* et les comparaisons des résultats des séquences de cytochrome *b*, de microsatellite et de *ZFX/ZFY*. La proximité géographique et la connectivité entre le Levant et le nord-Est de l'Afrique (par exemple, l'Égypte) peuvent avoir facilité le métissage et la capture mitochondriale des haplotypes du loup doré Africain par les chacals dorés Eurasiens. En outre, les chacals dorés d'Eurasie n'ont que récemment recolonisé certaines parties d'Israël après

un programme d'éradication à grande échelle lancé dans les années 1960 pour lutter contre la rage [20], et la plus grande quantité d'hybridation détectée chez les chacals dorés d'Eurasie d'Israël peut être liée à la colonisation de migrants venus d'ailleurs. Il est intéressant de noter que les microsatellites n'ont révélé aucune preuve de métissage, ce qui suggère que le métissage que nous avons détecté dans les données SNP du génome entier était relativement ancien. Une analyse précédente des séquences complètes du génome de loups gris et de chacals dorés Israéliens a également confirmé l'existence d'une hybridation ancienne entre les deux espèces, suggérant que jusqu'à 15% du génome actuel du loup Israélien est issu d'un métissage ancien avec des chacals dorés [11]. Nos résultats suggèrent une histoire génétique dynamique parmi ces canidés du Moyen-Orient et d'Afrique du Nord, similaire à celle observée chez les canidés nord-Américains de type loup et d'autres taxons carnivores tels que les ours bruns et polaires [21-23]. Un échantillonnage plus important de loups gris, de loups dorés Africains et de chacals dorés Eurasiens dans l'ensemble du Moyen-Orient et de l'Afrique du Nord sera nécessaire pour élucider les détails de cette histoire.

Malgré leurs ancêtres génétiques distincts, les loups dorés Africains et les chacals dorés d'Eurasie sont phénotypiquement similaires en termes d'anatomie craniodentale, et les loups dorés Africains d'Afrique de l'Est et les chacals dorés d'Eurasie sont similaires en termes de taille corporelle. Cet exemple frappant **d'évolution parallèle** souligne l'importance de la sélection naturelle pour limiter la divergence morphologique chez les carnivores sympatriques [24-26]. Cependant, il existe des similitudes subtiles dans la forme du crâne qui unissent les loups dorés Africains et les distinguent des chacals dorés d'Eurasie. Les affinités phylogénétiques des loups dorés Africains avec les loups gris ou les loups gris + coyotes, les archives fossiles canines et la dynamique macro-évolutive de l'évolution de la taille du corps canin suggèrent qu'ils sont issus d'ancêtres de plus grande taille [16, 27]. L'évolution convergente d'une forme plus petite, plus omnivore, semblable au chacal, en particulier en Afrique de l'Est, à partir de formes plus grandes, plus carnivores, semblables au loup, n'est pas courante chez les canidés [28, 29] et peut avoir été facilitée par la concurrence intense d'une communauté de carnivores d'une diversité unique comprenant des espèces plus grandes et plus petites que les chacals, inhibant ainsi la divergence de taille [12].