

Nouvelles connaissances sur la composition génétique et la relation phylogénétique des loups et des chiens dans la péninsule Ibérique

Received: 20 May 2016 | Revised: 17 February 2017 | Accepted: 5 March 2017

DOI: 10.1002/ece3.2949

ORIGINAL RESEARCH

WILEY Ecology and Evolution Open Access

New insights into the genetic composition and phylogenetic relationship of wolves and dogs in the Iberian Peninsula

Ana Elisabete Pires^{1,2,*}  | Isabel R. Amorim^{3,*} | Carla Borges¹ | Fernanda Simões¹ | Tatiana Teixeira¹ | Andreia Quaresma² | Francisco Petrucci-Fonseca² | José Matos^{1,2}

¹Biotechnology and Genetic Resources Unit, National Institute of Agrarian and Veterinary Research, I.P. (INIAV), Oeiras, Portugal

²Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes (cE3c), Faculty of Sciences, University of Lisbon, Lisbon, Portugal

³Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes/Azorean Biodiversity Group and Universidade dos Açores, Faculdade de Ciências Agrárias e do Ambiente, Açores, Portugal

Correspondence

Ana Elisabete Pires, Biotechnology and Genetic Resources Unit, National Institute of Agrarian and Veterinary Research, I.P. (INIAV), Oeiras, Portugal.

Email: ana.elisabete.pires@gmail.com

and

Isabel R. Amorim, Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes/Azorean Biodiversity Group and Universidade dos Açores - Faculdade de Ciências Agrárias e do Ambiente, Açores, Portugal.

Email: isabel.ma.rosario@uac.pt

Résumé

Cette étude examine le patrimoine génétique des races de chiens autochtones Portugais et de leur homologue sauvage, la sous-espèce de loup Ibérique (*Canis lupus signatus*), en utilisant des marqueurs moléculaires standard. Une combinaison de **marqueurs moléculaires paternels** et **maternels** a été utilisée pour étudier la composition génétique, la différenciation génétique et la relation génétique des chiens Portugais autochtones et du loup Ibérique. Un total de 196 chiens non apparentés, y compris des chiens de race et de village du Portugal, et d'autres chiens d'Espagne et d'Afrique du Nord, et 56 loups Ibériques (sauvages et captifs) ont été analysés pour les marqueurs nucléaires, à savoir les SNP du chromosome Y, les loci STR du chromosome Y, les loci STR autosomiques, et un fragment mitochondrial de la région de contrôle I. **Nos données révèlent de nouveaux variants pour les marqueurs moléculaires et confirment une différenciation génétique significative entre le loup Ibérique et les chiens domestiques indigènes du Portugal.** Sur la base de notre échantillonnage, aucun signe d'introggression récente entre les deux sous-espèces n'a été détecté. Les données du chromosome Y ne révèlent pas de différenciation génétique entre les races de chiens analysées, ce qui suggère qu'elles partagent la même origine patrilinéaire. En outre, la distinction génétique du loup Ibérique par rapport aux autres populations de loups est confirmée par la description de nouveaux variants d'ADNmt pour cet endémisme. Nos recherches révèlent également de nouveaux marqueurs moléculaires pour l'assignation des sous-espèces de loups et de chiens, qui pourraient devenir particulièrement pertinents dans le cas d'études génétiques médico-légales ou non invasives. Le loup Ibérique représente une relique de la population de loups autrefois répandue en Europe et notre étude révèle qu'il est un réservoir de diversité génétique unique du loup gris, *Canis lupus*. Ces résultats soulignent la nécessité de plans de conservation qui garantiront la pérennité de ce prédateur supérieur menacé en Ibérie.

INTRODUCTION

La sous-espèce de loup gris Ibérique, *Canis lupus signatus* (Cabrera, 1907) et le chien domestique, *Canis lupus familiaris*, coexistent dans la péninsule Ibérique. Le chien domestique existe sur ce territoire au moins depuis le Paléolithique supérieur (Detry & Cardoso, 2010 ; Pionnier-Capitan et al., 2011), et les races de chiens originaires d'Ibérie présentent une grande variété de formes et de fonctions.

En ce qui concerne le loup Ibérique, les dernières estimations suggèrent qu'environ 2 400 loups existent à l'état sauvage en Ibérie, suite à l'expansion de la population après un minimum de population dû aux activités humaines au début du XX^{ème} siècle (Álvares, 2011). Bien que la gestion et le statut d'unité de conservation soient reconnus pour cette sous-espèce de loup (Chapron et al., 2014 ; Pimenta et al., 2005), différentes politiques sont en place au Portugal et en Espagne. Au Portugal, où le dernier recensement a estimé une taille de population de seulement 300 individus (Pimenta et al., 2005) et où la tendance actuelle est inconnue (Torres & Fonseca, 2016), le statut de conservation du loup Ibérique est « **En danger** », et il est entièrement protégé par la loi (loi Portugaise 90/88). En Espagne, le statut de conservation du loup Ibérique est « **Vulnérable** » et sa protection varie selon les régions. Dans certaines régions, il est entièrement protégé et dans d'autres, comme le nord-ouest de l'Espagne, la chasse est légale. La plupart des loups sont présents dans le nord-ouest de la péninsule Ibérique et au sud du fleuve Douro, avec un petit groupe incertain dans la Sierra Morena (sud de l'Espagne) (Álvares, 2011 ; López-Bao et al., 2015).

Dans la péninsule Ibérique, les sous-espèces de chiens et de loups ont fait l'objet de plusieurs études où des marqueurs moléculaires ont été utilisés pour décrire la composition génétique, la structure de la population et la phylogénie. Les analyses microsatellites et AFLP du chien moderne suggèrent que la variabilité génétique des races de chiens est structurée en fonction des races et de la géographie (Pires et al., 2009) et que les chiens Portugais ont de multiples haplotypes d'ADNmt en accord avec la diversité d'ADNmt trouvée chez les autres chiens Européens (Pires et al., 2006).

L'occurrence de flux génétiques entre chiens domestiques et loups Ibériques a été documentée et estimée (van Asch et al., 2010 ; Fan et al., 2016 ; Godinho et al., 2011, 2015 ; Ramirez et al., 2006). Cependant, les hybrides loup-chien en Ibérie n'ont été signalés que pour des noyaux de loups marginaux et récemment étendus (Godinho et al., 2011) avec l'implication possible de chiens de chasse ou de garde du bétail, plutôt que de chiens sauvages. Une autre étude dans la région du Caucase rapporte l'existence d'un flux génétique entre les loups et les chiens de protection du bétail (Kopaliani et al., 2014).

Des informations provenant d'autres marqueurs génétiques, comme l'ADN mitochondrial (ADNmt) ou les SNP à l'échelle du génome, sont également disponibles pour les loups Ibériques (van Asch et al., 2005 ; Godinho & Ferrand, 2007 ; Godinho et al., 2011 ; Pilot et al., 2010, 2014 ; Vilà et al., 1997, 1999). Brièvement, ces dernières études ont conclu que pour le genre *Canis* trouvé en Ibérie, en particulier au Portugal : (1) les loups Ibériques présentent à la fois des haplotypes ADNmt uniques et des haplotypes partagés avec d'autres loups Européens et Asiatiques ; (2) certains haplotypes de loups sont répandus, tandis que d'autres sont rares avec une distribution restreinte, mais il n'y a pas de structure géographique évidente des haplotypes ADNmt ; (3) les haplotypes d'ADNmt des chiens et des loups sont pour la plupart distincts, et peu d'haplotypes sont partagés ; et (4) l'analyse du génome du loup Ibérique montre des signatures d'un isolement à

long terme des autres populations de loups Européens, des preuves d'une sélection diversifiante due à une adaptation locale et un métissage avec des chiens.

Des informations à haute résolution combinant des marqueurs STR et SNP du chromosome Y pour les chiens et les loups de la péninsule Ibérique n'ont cependant pas été divulguées. Les marqueurs moléculaires spécifiques du chromosome Y sont importants pour compléter les études sur l'ADNmt et se sont avérés utiles pour étudier les modèles d'évolution à médiation masculine chez les espèces sauvages et domestiquées (par exemple, Ginja, Telo da Gama, & Penedo, 2009 ; Ginja et al, 2010 ; Godinho et al., 2011 ; Gomerčić, Sindičić, & Florijančić, 2013 ; Götherström et al., 2005 ; Hellborg, 2004 ; Meadows et al., 2006 ; Petit, Balloux, & Excoffier, 2002 ; Schregel et al., 2015 ; Sundqvist et al., 2006).

Pour le genre *Canis*, les études les plus récentes utilisant des marqueurs du chromosome Y sont celles de Brown et al. (2011), Godinho et al. (2011), Ding et al. (2012), Gomerčić et al. (2013) et Sacks et al. (2013). Brown et al. (2011) ont étudié les Y-STR et les Y-SNP dans une grande population de 633 chiens du monde entier (incluant des chiens de village et de race) et ont conclu que les races de chiens Européennes modernes possèdent des racines dans les chiens d'Asie du Sud-Est et que les chiens Africains ont des origines patrilinéaires différentes. Godinho et al. (2011) ont utilisé six loci Y-STR dans leur étude sur l'hybridation loup-chien Ibérique et ont trouvé six haplotypes liés au Y différents chez 99 loups mâles, et 14 haplotypes Y différents chez 78 chiens mâles (y compris des chiens de race et des chiens sauvages). Pour approfondir la phylogéographie du chien domestique, Ding et al. (2012) ont étudié un fragment de séquence de 14 437 paires de bases (pb) d'ADN chromosomique Y chez 151 chiens répartis dans le monde entier, ce qui a révélé 28 haplotypes répartis dans cinq haplogroupes. De plus, ils ont observé qu'une région d'Asie, au sud de la rivière Yangtze (ASY), présente presque toute la gamme de diversité génétique, ce qui soutient les preuves précédentes de l'ADNmt (Pang et al., 2009) selon lesquelles l'ASY était la principale région où les loups ont été domestiqués. Gomerčić et al. (2013) ont également utilisé les séquences du chromosome Y et ont conclu que les chiens et les loups gris de Croatie ne pouvaient pas être différenciés car ils partageaient un seul haplotype. Sacks et al. (2013) ont utilisé des **patrilignages** de chiens, en combinant des Y-STR à mutation rapide et des Y-SNP à mutation plus lente, pour dater l'origine des chiens occidentaux modernes.

Comme mentionné par Lescureux et Linnell (2014), d'autres études sont nécessaires pour clarifier la relation entre les loups et les chiens. En accord avec ce besoin, notre recherche vise à analyser la variabilité génétique globale et la relation phylogénétique entre les loups et les chiens autochtones de la péninsule Ibérique. Nos principaux objectifs étaient les suivants : (1) capturer des variantes génétiques non signalées pour les populations Portugaises du genre *Canis* ; (2) comprendre la force de la divergence génétique entre les lignées paternelles des chiens indigènes Portugais et le loup Ibérique ; (3) étudier si les chiens et les loups Ibériques représentent des réservoirs génétiquement distincts de leurs homologues mondiaux ; et (4) fournir des données pour aider à la conservation de la sous-espèce de loup Ibérique adaptée localement.

2 | MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 | Prélèvement des échantillons et extraction de l'ADN

2.1.1 | Chiens

Un total de 168 échantillons de chiens de race (76 mâles et 92 femelles) ont été sélectionnés sur la base des normes de la race et en évitant les animaux apparentés jusqu'à la troisième génération. Des échantillons de sang, de poils ou de tissus ont été prélevés pour neuf races de chiens indigènes Portugais lors d'expositions canines, dans des chenils d'élevage et dans des lieux distincts des régions où la race est historiquement présente, et pour d'autres races dans des régions géographiquement voisines comme l'Espagne et l'Afrique du Nord-Ouest (Maroc) (Tableau 1). Les échantillons ont été collectés par un vétérinaire et en présence des propriétaires. En outre, des échantillons ont été prélevés sur des chiens de village vivants détenus dans plusieurs refuges au Portugal (Açores, montagne d'Estrela et Alentejo) et en Tunisie (Afrique du Nord-Ouest). Vingt-huit échantillons de chiens de village (10 mâles et 18 femelles) ont été prélevés sur des spécimens dont le phénotype ne pouvait être attribué à aucune race, y compris les races courantes dans le monde, et ne ressemblait pas au phénotype des hybrides loup-chien (Tableau 1).

TABLEAU 1. Échantillonnage de *Canis lupus familiaris*. Les échantillons de chiens ($N = 196$, 86 mâles, 110 femelles) sont organisés par affiliation et fonction de la race, telle que reconnue par l'Organisation Canine Mondiale (Fédération Cynologique Internationale, FCI)

Dog breed groups (sample size)	Designation of breed/population of dogs	Sample size (Y-Chromosome and/or mtDNA)	Geographic location
Livestock guard dogs/Group 2 (60)	CLWD	9♂;8♀	NW Portugal
	EMD	10♂;12♀	East Portugal
	AM	8♂;9♀	SE Portugal
	TM	4♂;0♀	NE Portugal
Livestock herding dogs/Group 1 (29)	ACD	7♂;13♀	Azores archipelago
	PSD	4♂;5♀	SE Portugal
Fishing dogs/Group 8 (11)	PWD	7♂;4♀	South Portugal
Hunting dogs/Group 5 and 7 (38)	PP	3♂;6♀	Undetermined
	PWH	7♂;22♀	Undetermined
Other dog populations (39)	SM	7♂;3♀	Spain
	Aidi	6♂; 4♀	Morocco
	Sloughi	4♂;6♀	Morocco
	Tunisia village dogs	2♂;7♀	Tunisia
Portuguese Village dogs (19)	Portuguese village dogs	8♂;11♀	NE, SE mainland Portugal and Azores
Total (196)		86♂;110♀	
Individuals sampled per population (Average \pm SD)		14 \pm 6.8	

Breed/Dog Populations acronyms: ACD, Azores cattle dog, AM, Alentejo Mastiff (previously denominated Alentejo Shepherd dog), CLWD, Castro Laboreiro Watchdog, EMD, Estrela Mountain Dog, PP, Portuguese Pointer, PSD, Portuguese Sheepdog, PWD Portuguese Water Dog, PWH, Portuguese Warren Hound; SM, Spanish Mastiff, TM, Transmontano Mastiff, PortVilldog, Portuguese village dogs.

2.1.2 Loup Ibérique

L'échantillonnage des loups comprenait 56 individus : 44 animaux sauvages morts collectés au hasard au Portugal ($n = 42$) et en Espagne ($n = 2$) ; et 12 spécimens captifs vivants conservés au Centre de récupération du loup Ibérique (trois spécimens originaires d'Espagne et neuf du Portugal). Les échantillons des spécimens sauvages étaient soit des tissus soit du sang (provenant d'animaux nécropsiés), obtenus de la banque de tissus de loups (SMLM) gérée par l'Institut Portugais pour la conservation de la nature et des forêts (ICNF) ; le sang des animaux captifs

vivants a été prélevé par un vétérinaire. Les échantillons comprenaient 11 femelles, 44 mâles et un spécimen de sexe indéterminé et ont été collectés entre 1987 et 2008 (Figure 1).



FIGURE 1. Échantillonnage de *Canis lupus signatus* ($N = 56$, 44 mâles, 11 femelles, 1 sexe indéterminé). L'origine géographique des échantillons de loups Ibériques est cartographiée par région (le nombre d'échantillons par site est indiqué à l'intérieur des points), sauf pour cinq individus pour lesquels seul le pays d'origine est connu (Portugal $N = 4$, Espagne $N = 1$)

L'ADN génomique total a été extrait du sang entier et des tissus à l'aide d'un protocole standard protéinase K/phénol-chloroforme (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989), du kit Nucleospin Blood QuickPure (Macherey-Nagel), ou d'une méthode à haute teneur en sel (Montgomery & Sise, 1990). L'ADN a été extrait de la racine des poils dans une solution de Chelex à 20% (Walsh, Metzger, & Higuchi, 1991) dans une autre pièce dédiée à l'extraction de l'ADN afin d'éviter toute contamination.

2.2 | Marqueurs génétiques

2.2.1 | Génotypage STR autosomal

Dix-neuf **marqueurs microsatellites autosomiques** (STR) de canidés ont été génotypés dans un ensemble de 122 chiens et 52 loups : AHT121 (Holmes et al., 2009) ; C22.279, CXX.109, CXX.173, CXX.225, FH2001, FH2054, FH2010 et FH2159 (Francisco et al., 1996) ; FH2247 (Richman et al., 2001) ; FH2611 (Eichmann, Berger, & Parson, 2006) ; FH2361 (Mellersh et al., 1997) ; FH4012 et FH3210 (Guyon et al., 2003) ; PEZ06 et PEZ08 (Neff et al., 1999) ; REN247M23 (Moore & Sacks, 2010) ; VWF.X (Shibuya et al., 1994) ; et C38 (van Asch et al., 2010). Toutes les amorces directes étaient marquées par fluorescence (6-FAM, Hex, ou NED d'Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les conditions de PCR et d'électrophorèse sont décrites dans les matériaux supplémentaires.

2.2.2 | SNP du chromosome Y

2.2.2.1 | Conception des amorces

Les séquences des **amorces** nouvellement conçues pour l'amplification par PCR des fragments du chromosome Y (Natanaelsson et al., 2006) et pour les réactions d'extension SNaPshot sont présentées dans les Tableaux S1 et S2, respectivement. Les amorces pour les fragments Ydog_20, Ydog_21, Ydog_28, Ydog_29, Ydog_30, Ydog_B, Ydog_G et Ydog_N ont été conçues à l'aide du logiciel Primer3 (<http://simgene.com/Primer3>) et basées sur les séquences GenBank (numéros d'accèsion : DQ973626-DQ973805). La séquence de l'haplotype 1 de l'isolat y20 de *Canis lupus*

familiaris a été utilisée comme référence pour la conception des amorces SNaPshot (séquences GenBank : DQ973626, DQ973627, DQ973631, DQ973635, DQ973636, DQ973638, DQ973639 et DQ973642). La taille des produits PCR variait de 130 à 492 pb (Tableau S1). Les amorces d'extension pour les réactions SNaPshot s'annulent immédiatement à côté du site SNP d'intérêt sur le brin d'ADN sens ou antisens (Tableau S2). Pour vérifier la possibilité de cibles de recuit répétitives, les séquences d'amorces ont été testées en les alignant préalablement sur les bases de données de séquences du NCBI à l'aide du programme BLAST.

Pour les **amplicons** contenant plusieurs SNP, des amorces d'extension ont été conçues pour détecter les polymorphismes aux sites nucléotidiques (nt) 599, 619 et 873 de l'amplicon Ydog_28 (positions des SNP ici nommées Ydog_28A, Ydog_28B, et Ydog_28C, respectivement) et aux nt 66 et 146 de l'amplicon Ydog_G (partie 1) (positions SNP nommées ici Ydog_G1A et Ydog_G1B, respectivement) selon le schéma d'étiquetage de Natanaelsson et al. (2006) (Tableau S2).

2.2.2.2 Amplification par PCR

Les amplifications par PCR ont été réalisées individuellement pour chaque fragment du chromosome Y en utilisant les paires d'amorces décrites dans le Tableau S1. Tous les mélanges réactionnels contenaient 25-50 ng d'ADN génomique, 1× Biomix PCR master mix (Bioline), et 0,2 µmol/L de chaque amorce dans un volume total de 15 µL. Les conditions de PCR et d'électrophorèse sont décrites dans les matériaux supplémentaires. Six échantillons femelles des deux sous-espèces ont également été testés par PCR pour tous les loci afin de vérifier la spécificité Y des paires d'amorces.

2.2.2.3 Réaction SNaPshot pour l'extension de l'amorce de la sonde

Cette étape a consisté en une réaction multiplex pour l'extension des amorces à base unique à l'aide du kit multiplex ABI PRISM® SNaPshot™ (Applied Biosystems) selon le protocole du fabricant. Deux réactions multiplex distinctes ont été préparées : l'une comprenait des produits PCR et des amorces d'extension regroupés pour les loci Ydog_21, Ydog_28, Ydog_G (partie 1) et Ydog_B (partie 2) (position des SNP appelée ici Ydog_B), couvrant sept SNP spécifiques aux chiens ; et l'autre multiplex comprenait les produits PCR et les amorces d'extension pour les autres loci mentionnés dans le Tableau 2 (Ydog_20, Ydog_29, Ydog_30, Ydog_N), couvrant quatre SNP.

2.2.2.4 Analyse de la séquence d'ADN du chromosome Y

Dans le cadre de la recherche de **nouveaux polymorphismes**, des réactions de séquençage ont été performées pour chaque locus chez les chiens et les loups. Les produits PCR ont été séquencés dans les deux sens par le kit de séquençage BigDye Terminator v1.1 et analysés sur un analyseur génétique automatisé ABI PRISM 3130 à fluorescence (Applied Biosystems).

2.2.2.5 Microsatellites du chromosome Y

Quatre microsatellites (répétitions en tandem courtes, STR) du chromosome Y, les loci 990-35, MS41A, MS41B, et MS34TTR (Bannasch et al., 2005), ont été analysés. Tous les loci ont été amplifiés dans une seule réaction multiplex en utilisant les amorces présentées dans le Tableau S3. Les conditions de PCR et d'électrophorèse sont décrites dans les matériaux supplémentaires.

2.2.3 Amplification PCR de l'ADN mitochondrial et séquençage

Les amorces ThrL 5'- GAA TTC CCC GGT CTT GTA AAC C -3' et DLH-can 5'- CCT GAG GTA AGA ACC AGA TG -3' (Hailer & Leonard, 2008) ont été utilisées pour amplifier par PCR

un fragment d'ADNmt de 420 pb provenant d'échantillons de loups Ibériques, incluant l'extrémité 3' de l'ARNt-Thr et une partie de la région de contrôle I. Aucune séquence n'a été générée pour les échantillons de chiens du Portugal car ceux-ci sont déjà disponibles dans GenBank (Pires et al., 2006). Les conditions de PCR sont décrites dans les matériaux supplémentaires.

Les réactions de séquençage ont été réalisées à l'aide de la chimie ABI PRISM BigDye Terminator et séparées par électrophorèse sur un analyseur génétique automatisé ABI PRISM 3130 basé sur la fluorescence (Applied Biosystems).

2.3 | Analyse statistique

2.3.1 | *Analyse des données STR autosomiques*

2.3.2 | *Marqueurs du chromosome Y*

2.3.3 | *Séquences mitochondriales*

3 | RÉSULTATS

3.1 STR autosomiques

L'analyse des STRs autosomiques pour les chiens et les loups a révélé une valeur F_{ST} par paire de 0,112 ($p = .000$). L'analyse de partitionnement utilisant la procédure de clustering bayésien montre clairement une séparation nette entre les chiens, (chiens de village et chiens de race, ces derniers incluant les chiens de garde du bétail), et le loup Ibérique (Figure S1, orange et jaune, respectivement). La valeur-Q moyenne (proportion d'appartenance de chaque population prédéfinie dans chacun des deux clusters) pour les populations étudiées est élevée pour les chiens ($0,994 \pm 0,0096$) ainsi que pour les loups ($0,993 \pm 0,0134$). Nous n'avons détecté aucun individu présentant une valeur d'assignation intermédiaire (la valeur seuil considérée était de 95%).

3.2 Lignées paternelles chez Canis Ibérique

Les données de séquence, pour les loci étudiés pour un sous-ensemble de chiens ($n_{total} = 59$) et de loups ($n_{total} = 44$), n'ont pas révélé de sites polymorphes supplémentaires (numéros d'accension GenBank GQ366706-GQ366793 et KT967955-KT967970). Pour les échantillons féminins, aucun produit PCR n'a été obtenu pour aucun locus, ce qui confirme la spécificité du chromosome Y des amorces conçues.

Des génotypes complets ont été obtenus pour 11 SNP du chromosome Y et quatre STR du chromosome Y pour un total de 108 échantillons de canidés mâles, comprenant 81 chiens non apparentés (chiens de race Ibérique, $n = 62$; chiens Africains, $n = 11$; chiens de village Ibérique, $n = 8$) et 27 loups Ibériques (Tableau S4A, B).

Les essais répétés ont prouvé la reproductibilité de la méthode, et la méthodologie SNaPshot a été appliquée avec succès dans deux réactions multiplex.

Sur les 11 Y-SNP de chiens étudiés, seuls six étaient polymorphes dans le contexte Ibérique et nord-Africain : Les loci Ydog_21, Ydog_28A, Ydog_28B, Ydog_28C, Ydog_B et Ydog_G1B (Tableau 2). Deux **haplogroupes** majeurs ont été identifiés sur la base des SNP (six loci) et des STRs (quatre loci) polymorphes du chromosome Y, l'un incluant les chiens Ibériques et nord-Africains (IbAfrDog HG) et l'autre incluant les loups Ibériques (IbWolf HG) (Figure 2a). Ces deux haplogroupes diffèrent par quatre mutations diagnostiques : une transition A(chien)/G(loup) au

locus Ydog_28A, une transversion A/C au locus Ydog_28B, une transition C/T au locus Ydog_B, et une transversion C/A au locus Ydog_G1B (Tableau 2).

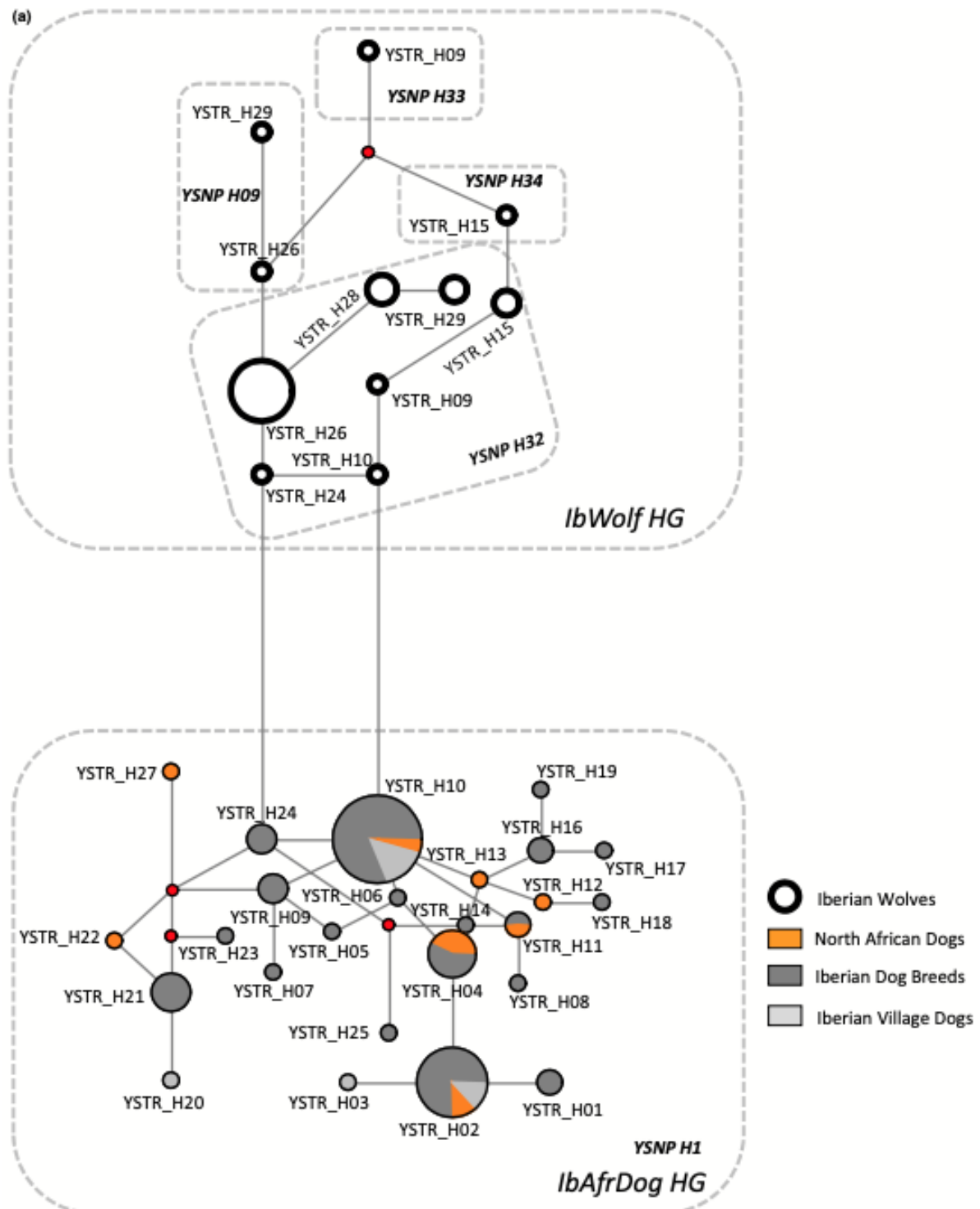


FIGURE 2. (a) Réseau de jonction médian montrant la diversité des haplotypes du chromosome Y du genre *Canis* en Ibérie, basé sur six SNP et quatre loci STR. Un total de 108 individus mâles a été analysé, dont 81 chiens domestiques (chiens de race Ibérique $n = 62$, chiens Africains $n = 11$, chiens de village Ibériques $n = 8$) et 27 loups Ibériques. Trente-six haplotypes sont affichés, 11 appartenant aux loups Ibériques et 25 aux chiens domestiques. Les points rouges représentent les vecteurs médians théoriques introduits par le logiciel du réseau. Nomenclature des haplotypes SNP (YSNP H1, YSNP H9, YSNP H32, YSNP H33 et YSNP H34) comme dans Ding et al. (2012). IbWolf HG-haplogroupe des loups Ibériques ; IbAfrDog HG-haplogroupe des chiens Ibériques et nord-Africains. Voir les Tableaux S4A, B et S5 pour une liste des haplotypes Y-SNP et Y-STR trouvés par espèce et par race/population de chiens

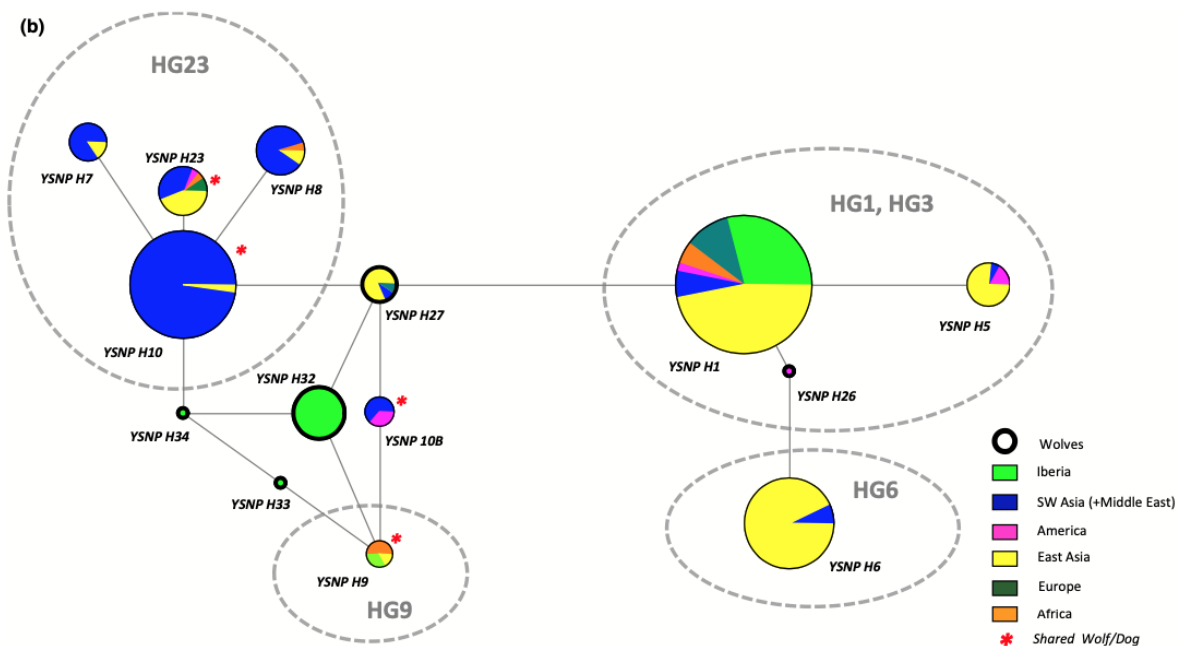


FIGURE 2. (b) Réseau de jonction médian affichant la diversité mondiale des haplotypes du chromosome Y du genre *Canis* sur la base de 11 Y-SNP. Un total de 563 individus mâles a été considéré (517 chiens domestiques et 46 loups) affichant 14 haplotypes (indiqués en italique). Nomenclature des haplogroupes (HG1, HG3, HG6, HG9 et HG23) comme dans Ding et al. (2012). Voir le Tableau S4A pour une liste des haplotypes Y-SNP trouvés dans le monde entier.

Sur la base des seuls SNP, le HG *IbAfrDog* comprend une seule lignée (YSNP H1), tandis que le HG *IbWolf* comprend quatre lignées : YSNP H9, YSNP H32, YSNP H33, et YSNP H34, suivant la nomenclature de Ding et al. (2012).

En ce qui concerne les STRs uniquement, un total de 25 haplotypes est décrit pour les chiens étudiés (Tableau S4B). Les chiens de race Ibérique partagent quatre haplotypes avec les chiens nord-Africains et deux avec les chiens de village Ibériques. Des haplotypes exclusifs peuvent être détectés dans chaque sous-groupe de chiens : 13 pour les chiens de race Ibérique, quatre pour les chiens nord-Africains et deux pour les chiens de village Ibérique (Figure 2a, Tableau S4B). La diversité haplotypique (HD) (non biaisée) \pm SE est de $0,59 \pm 0,11$ pour les chiens Africains, de $0,52 \pm 0,11$ pour les chiens de race Ibérique, de $0,46 \pm 0,08$ pour les chiens de village Ibérique et de $0,52 \pm 0,05$ pour le groupe de tous les chiens domestiques étudiés. Les valeurs de Φ_{PT} par paire entre ces groupes de chiens variaient entre 0 (pour les chiens de race Ibérique et les chiens de village) et 0,052 (pour les chiens de village Ibérique et les chiens Africains). Ces valeurs n'étaient pas significatives (valeurs $p > 0,05$).

Le loup Ibérique présente sept haplotypes Y-STR, dont trois sont partagés avec les chiens et quatre sont exclusifs au loup Ibérique (Tableau S4B). Le HD (non biaisé) \pm SE pour le loup Ibérique est plus petit que pour la population canine et est de $0,41 \pm 0,04$. La valeur Φ_{PT} par paire entre les chiens et les loups Ibériques de cette étude est de 0,27 ($p = 0,00$).

La combinaison de 10 loci informatifs du chromosome Y (quatre STRs plus six SNPs) a permis l'identification de 36 haplotypes. Au sein de l'HG *IbAfrDog* et de l'HG *IbWolf*, 25 et 11 haplotypes ont été révélés, respectivement (Figure 2a ; Tableau S4A, B). Les valeurs HD (non biaisées) \pm SE considérant les deux marqueurs Y étaient similaires entre les chiens et les loups Ibériques et étaient

de $0,14 \pm 0,07$ et $0,13 \pm 0,05$, respectivement. La valeur Φ_{PT} par paire entre les chiens et les loups Ibériques a augmenté à $0,70$ ($p = 0,00$).

TABLEAU 2. Liste des 11 séquences du chromosome Y analysées et nucléotides détectés dans chaque position polymorphe pour chaque sous-espèce. Les fragments et nucléotides qui séparent les chiens domestiques des loups Ibériques sont mis en évidence en gras

Y- chromosome fragment	Iberian and North African dogs' SNPs	Iberian wolves' SNPs
Ydog_20	A	A
Ydog_21	G	A/G
Ydog_28A	A	G
Ydog_28B	A	C
Ydog_28C	G	G/A
Ydog_29	A	A
Ydog_30	C	C
Ydog_B	C	T
Ydog_G1A	T	T
Ydog_G1B	C	A
Ydog_N	C	C
	Iberian and North African Dog haplogroup (IbAfrDog HG)	Iberian Wolf haplogroup (IbWolf HG)

Les 11 SNP du chromosome Y de cette étude ont également été analysés à l'échelle géographique mondiale en tenant compte d'autres données mondiales du genre *Canis* disponibles chez Ding et al. (2012) et Brown et al. (2011) pour un total de 517 chiens et 46 loups. Un total de 14 haplotypes a été détecté (Figure 2b, Tableau S4A). Les haplotypes de chiens ont pu être regroupés en quatre haplogroupes : HG1 et HG3 (fusionnés), HG6, HG9 et HG23 (nomenclature des haplogroupes comme dans Ding et al., 2012). Quatre haplotypes - YSNP H9, YSNP H10, YSNP 10B et YSNP H23 - étaient partagés entre les loups (d'Ibérie, de Chine, d'Iran et du Canada) et les chiens (principalement échantillonnés en Asie du Sud-Ouest et au Moyen-Orient) (Figure 2b ; Tableau S4A). En particulier, l'haplotype YSNP H9 est partagé entre deux loups Ibériques (échantillons IbWolf-22 et IbWolf-24), et des chiens d'Afrique (race de chien Basenji, Afrique du Sud) et d'Asie de l'Est (race de chien Laika de Sibérie orientale, Asie de l'Est). L'haplotype YSNP H9 diffère de l'haplotype YSNP 10B, un autre haplotype partagé entre les loups et les chiens, par un seul SNP (locus B) (Tableau S4A).

L'unique haplotype Y-SNP partagé entre les chiens Ibériques et les chiens d'Afrique du Nord-Ouest (cette étude) est l'haplotype le plus courant chez les chiens du monde entier - YSNP H1 (Figure 2b ; tableau S4A), également présent chez une forte proportion de chiens d'Asie de l'Est (47%).

3.3 Distinction des lignées paternelles des loups Ibériques

Nous avons détecté des haplotypes SNP du chromosome Y exclusifs au loup Ibérique. Les trois haplotypes SNP distincts du chromosome Y des loups Ibériques - YSNP H32, H33 et H34 - se regroupent dans le réseau entre les haplogroupes HG1 et HG3, HG9 et HG23 où plusieurs nœuds non échantillonnés avaient été détectés précédemment par Brown et al. (2011) et Ding et al. (2012) (Figure 2b). En outre, c'est la première fois que l'haplogroupe HG9, représenté par l'haplotype YSNP H9, est signalé pour les loups. Des marqueurs moléculaires indépendants, tels que les STRs autosomiques et l'ADNmt, confirment que ces échantillons HG9 ont été prélevés sur des spécimens de loups.

3.4 Lignées maternelles du genre *Canis* en Ibérie

Les 56 échantillons de loups Ibériques ont révélé sept haplotypes pour un fragment de 420 pb de la région de contrôle I de l'ADNmt : wH-1A (fréquence 82,1%), wH-1B (1,8%), wH-1C (5,4%), wH-2 (5,3%), wH-3 (1,8%), wH-4 (1,8%), et wH-5 (1,8%), où wH-1A est l'haplotype le plus fréquent trouvé dans tout le Portugal et l'Espagne (Tableau 3, Figures 3a, c ; Tableau S5).

TABLEAU 3. Description résumée des haplotypes d'ADN mitochondrial basés sur 420 pb de la région de contrôle I identifiés chez les 56 loups Ibériques séquencés. Pour des informations détaillées par échantillon individuel, voir le Tableau S5

Haplotype code ^a	Haplotype geographic distribution	Haplotype frequency (%)
wH-1A	Portugal (Aveiro, Braga, Bragança, Guarda, V.Castelo, V.Real, Viseu); Spain (X.Lima, Zamora)	82.1
wH-1B	Portugal (V.Castelo)	1.8
wH-1C	Portugal (Bragança, Viseu)	5.4
wH-2	Portugal (Bragança, V.Real)	5.3
wH-3	Spain (Galicia)	1.8
wH-4	Portugal (V.Real)	1.8
wH-5	Portugal (Braga)	1.8

^aPour les échantillons de loups séquencés, les haplotypes plus longs (420 pb) qui se regroupent en un même haplotype lorsqu'ils sont réduits à 230 pb ont reçu la même étiquette racine suivie d'une lettre, par exemple, wH-1A, wH-1B et wH-1C sont indistincts lorsqu'ils sont réduits à 230 pb

En tenant compte des fragments de séquence plus importants disponibles pour les loups Ibériques, nos résultats augmentent le nombre total d'haplotypes de la région de contrôle I de l'ADNmt rapportés pour le loup Ibérique à 24 (voir Vilà et al., 1997, 1999 ; Randi et al., 2000 ; Valière et al., 2003 ; Björnerfeldt, Webster, & Vilà, 2006, numéros d'accèsion GenBank non publiés EF380226-9, et Godinho & Ferrand, 2007). Parmi les 24 haplotypes décrits pour l'Ibérie, deux se retrouvent à la fois au Portugal et en Espagne, neuf se retrouvent au Portugal (dont cinq exclusivement au Portugal), et 13 se retrouvent en Espagne (dont 11 exclusivement en Espagne).

Cinq des sept haplotypes ADNmt de 420 pb trouvés dans cette étude ont été identifiés pour la première fois chez les loups Ibériques (haplotypes wH-1B, wH-1C, wH-2, wH-3 et wH-4 dans cette étude) et ont été soumis à la GenBank (numéros d'accèsion JX845621-JX845625, où JX845621 peut correspondre à l'haplotype D de Godinho & Ferrand, 2007) ; un avait déjà été identifié en Espagne (haplotype wH-1A de cette étude ; Björnerfeldt et al., 2006, isolat d'haplotype 1) ; et un est partagé avec des chiens (races de chiens indigènes Portugaises - chien de garde Castro Laboreiro, chien de chasse Portugais, mâtin d'Alentejo et chien de berger Portugais ; chiens Espagnols - mâtin Espagnol ; et chiens de Tunisie) (haplotype wH-5 de loup de cette étude provenant de l'échantillon IbWolf-05 ; haplotypes H10 et H48 de chien, clade A de chien de Pires et al. 2006) (Figures 3a, c ; Tableau S5).

Les séquences de loup générées dans cette étude divergeaient de 1 à 9 nucléotides par rapport aux autres séquences de loup rapportées pour la péninsule Ibérique, l'haplotype le plus divergent étant celui qui est partagé avec les chiens (cette étude haplotype wH-5 du loup, Pires et al., 2006 haplotypes H10 et H48 du chien).

Pour le fragment chevauchant 420 pb dans 164 échantillons de chiens d'Ibérie et d'Afrique du Nord séquencés dans une étude précédente (Pires et al., 2006 ; fragment de taille originale 887 pb), nous avons trouvé 37 haplotypes (Figures 3a, c ; Tableau S5). Lorsque le fragment chevauchant plus court de 230 pb a été pris en compte pour une comparaison de l'étendue géographique plus large (loups du monde entier), nous avons trouvé huit haplotypes pour les loups Ibériques et 27 haplotypes pour les chiens (Figure 3b ; Tableau S5). Parmi les huit haplotypes de 230 pb identifiés dans l'ensemble des études pour les loups Ibériques, cinq d'entre eux étaient toujours uniques à la péninsule Ibérique (haplotypes wH1, wH3 et wH4 du loup de cette étude ; haplotype MIT2 - numéro d'accès à la GenBank EF380216 ; et haplotype w10 - Valière et al, 2003), trois étaient limités à l'Espagne (haplotype wH3 de cette étude ; haplotype w10-Valière et al., 2003 ; et haplotype MIT2), et un était uniquement présent au Portugal (haplotype wH4 de cette étude) (Figure 3b). Tous les échantillons de loups séquencés dans cette étude, une fois coupés à 230 pb, ségrègent dans le clade de loups précédemment rapporté pour Iberia (Pilot et al., 2010), à l'exception d'un individu (haplotype wH-5 de cette étude) (Figure 3b). Cette exception correspond au seul haplotype d'ADNmt qui est partagé entre les loups Ibériques et les chiens, représentant l'un des cinq cas de partage d'haplotype loup/chien détectés dans notre analyse mondiale des loups (Figure 3b). Il en est de même pour le fragment de 420 pb (haplotype wH-5 du loup dans cette étude ; et haplotypes H10 et H48 du chien de Pires et al., 2006) (Figure 3a).

Dans les deux analyses phylogénétiques, en considérant soit le fragment de 420 pb, soit celui de 230 pb (modèle d'évolution GTR+I+G et TPM1uf+I+G, respectivement), les séquences de loup Ibérique générées dans cette étude se regroupent avec d'autres séquences de loup formant des clades avec un support nodal élevé (probabilité postérieure $\geq 0,90$), à l'exception de : l'haplotype wH-2 dans l'analyse mondiale de 230 pb qui forme un groupe avec un faible soutien avec d'autres séquences de loup ; et l'haplotype wH-5 (partagé avec les chiens) qui forme un groupe avec un soutien nodal élevé avec d'autres séquences de chien (haplogroupe A de chien) (probabilité postérieure 0,94) (Figures 3a, b).

Pour le fragment de 230 pb, les échantillons de loups séquencés dans cette étude divergeaient de 1 à 10 nucléotides par rapport aux autres séquences de loups dans le monde, et la séquence d'haplotype de loup Ibérique la plus divergente a également été trouvée chez d'autres loups Européens et Asiatiques (haplotype de loup wH-2 et haplotype W3-Pilot et al., 2010).

En ce qui concerne les chiens et les loups trouvés à Iberia pour lesquels nous disposons d'informations sur la fréquence des haplotypes (135 chiens, 56 loups), l'analyse de la raréfaction a révélé que la richesse des haplotypes était environ 2,5 fois plus élevée chez les chiens que chez les loups (18,8 contre 7). La diversité des haplotypes (HD) pour les chiens Ibériques était également environ trois fois plus élevée que la valeur calculée pour les loups Ibériques, $0,92 \pm 0,008$ (moyenne \pm SD) et $0,32 \pm 0,080$, respectivement. La différence de diversité nucléotidique (π) entre les chiens et les loups trouvés à Iberia est encore plus élevée, $0,014 \pm 0,0006$ (moyenne \pm SD) et $0,002 \pm 0,0008$, respectivement.

Le test statistique indique que les chiens et les loups Ibériques sont fortement différenciés génétiquement ($\chi^2 = 186,428$, $p = .0000$), où la valeur F_{ST} entre les deux sous-espèces est de 0,486.

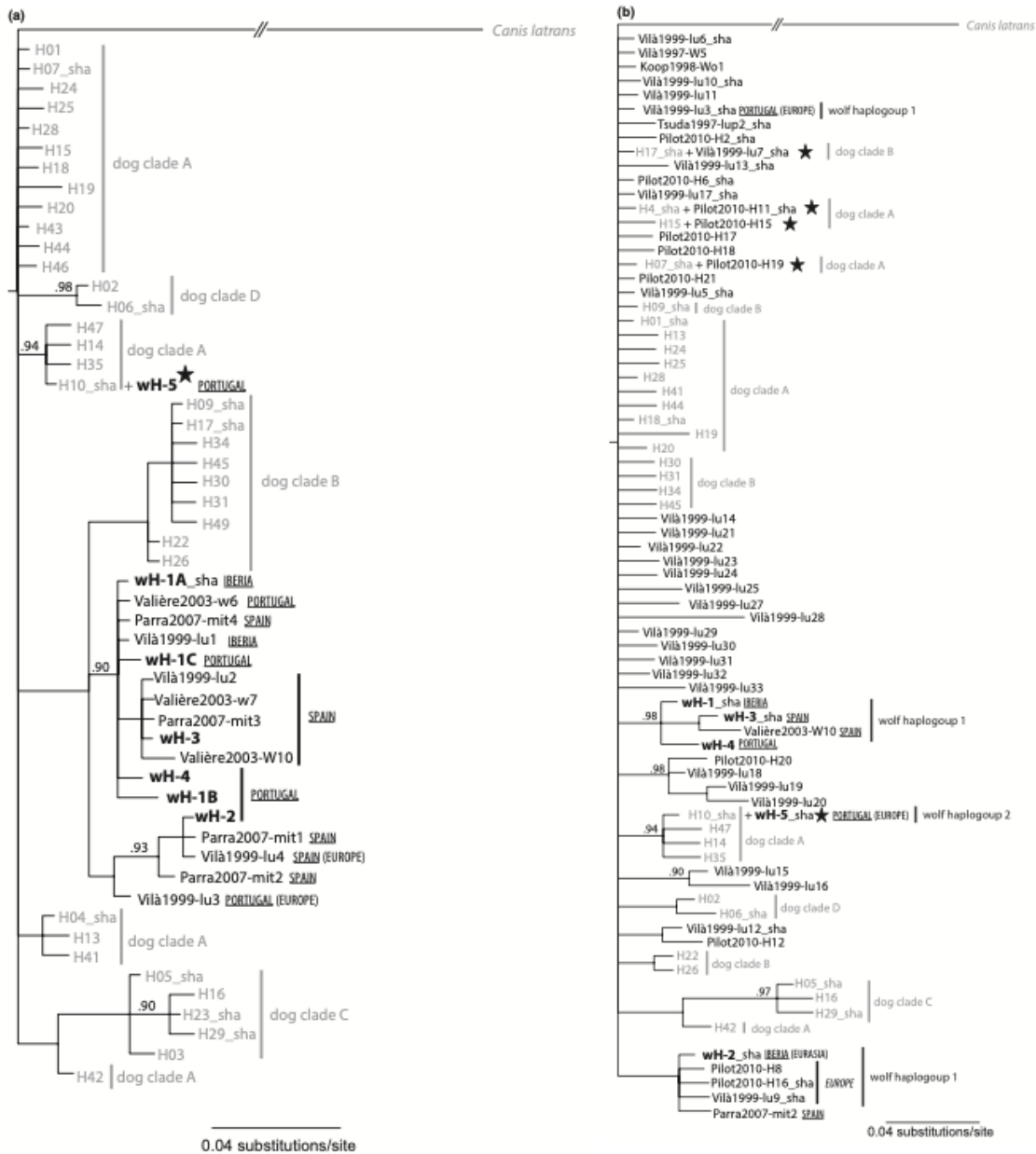


FIGURE 3. Relations phylogénétiques entre les haplotypes d'ADNmt du loup et du chien. Arbre d'inférence bayésienne basé sur un fragment mitochondrial de 420 pb (a) et sur un fragment de 230 pb de fragment mitochondrial de la région de contrôle I (b) de loups Ibériques et mondiaux, respectivement. Les haplotypes de chiens trouvés en Ibérie et en Afrique du Nord ont également été inclus (Pires et al., 2006). Les valeurs de support de probabilité postérieure $\geq 0,90$ sont indiquées. Les haplotypes de l'outgroupe et du chien sont en gris ; les haplotypes du loup sont en noir. Lorsque des haplotypes initialement distincts au sein d'une espèce ont été regroupés en un même haplotype de 420 pb ou 230 pb, l'étiquette comprend un haplotype représentatif suivi de « sha » (partagé). Les étiquettes des haplotypes de loups, pour les séquences extraites de GenBank, comprennent le nom de l'auteur et la date, suivis du code de l'haplotype original (voir le texte pour le numéro d'accension). Les séquences de loup Ibérique générées dans cette étude sont étiquetées wH-1 à wH-5 (**en gras**) ; les haplotypes qui se regroupent en un même haplotype lorsqu'ils sont réduits à 230 pb ont la même étiquette racine suivie d'une lettre (par exemple, wH-1A, wH-1B et wH-1C sont indistincts lorsqu'ils sont réduits à 230 pb). Nomenclature des haplotypes de chiens (H01-H49) comme dans Pires et al. 2006 ; clades de chiens (a-d) comme dans Savolainen et al. 2002. La distribution géographique au sein de la péninsule Ibérique (Portugal, Espagne ou Ibérie) et la distribution géographique globale (entre parenthèses) sont indiquées pour les haplotypes de loups ; pour l'arbre mondial BI (b), la distribution géographique est également indiquée pour les haplotypes de loups qui se regroupent avec les loups Ibériques (en italique) ; la nomenclature des haplogroupes de loups (1 et 2) comme dans Pilot et al., 2010 est indiquée pour les haplotypes de loups Ibériques et les autres haplotypes de loups qui se regroupent avec eux. ★ - haplotype partagé entre le loup et le chien.

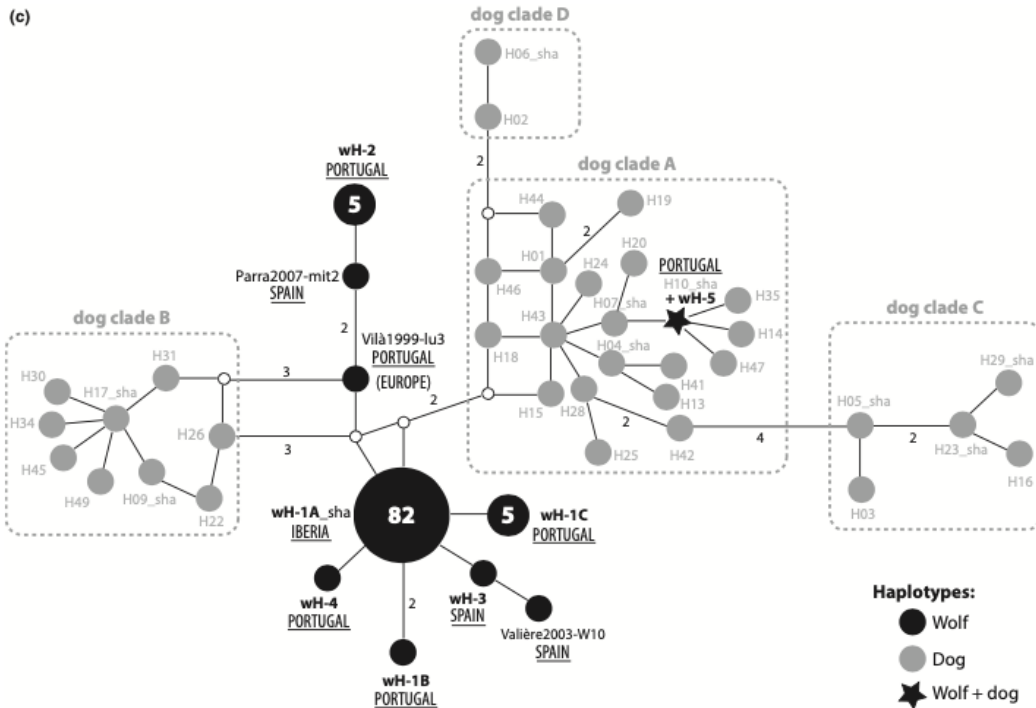


FIGURE 3. Relations phylogénétiques entre les haplotypes d'ADNmt du loup et du chien. Arbre d'inférence bayésienne basé sur un fragment mitochondrial de 420 pb (c) Réseau de jonction médian d'un fragment mitochondrial de 420 pb de la région de contrôle I des loups ibériques (sous-ensemble des données utilisées dans la Figure 3 A - voir le texte pour plus de détails). Les étiquettes des haplotypes de chiens et de loups sont celles des Figures 3 a et b. La fréquence des haplotypes n'est indiquée que pour les loups séquencés dans cette étude - la taille des cercles est proportionnelle à la fréquence (% d'occurrence à l'intérieur du cercle) ; les autres haplotypes représentent des séquences téléchargées de GenBank (aucune information sur la fréquence n'est disponible). Les petits cercles blancs représentent les haplotypes manquants (vecteurs médians), et la longueur des liens entre les nœuds est proportionnelle aux différences nucléotidiques (le nombre de mutations est indiqué à côté du lien lorsqu'il est >1) ★ - haplotype partagé entre le loup et le chien.

4 | DISCUSSION

4.1 Diversité génétique des *Canis* Ibériques

Les marqueurs maternels et paternels utilisés dans cette étude révèlent effectivement une diversité non signalée chez les chiens et les loups existants qui habitent Iberia et cela renforce la différenciation génétique significative entre les loups Ibériques et les chiens domestiques.

Le nombre d'haplotypes Y-STR est plus élevé que celui précédemment rapporté pour les chiens domestiques mâles et les loups Ibériques dans les populations du genre *Canis* d'Europe du Sud par Parra et al. (2008), Iacolina et al. (2010) et Godinho et al. (2011). Les valeurs de HD sont similaires entre les loups Ibériques et Italiens ($0,474 \pm 0,056$, Iacolina et al., 2010). Les valeurs de HD pour les chiens Portugais se situent dans la fourchette rapportée par Bannasch et al. (2005) pour un échantillon de 824 mâles comprenant des chiens de race et des bâtards (HD moyen pour les races $0,38 \pm 0,03$ et pour les bâtards $0,95 \pm 0,03$).

Les données sur le chromosome Y fournissent une mise à jour de l'arbre phylogénétique le plus parcimonieux présenté par Ding et al. (2012) avec l'ajout de nouveaux haplotypes distincts pour les loups Ibériques (*Canis lupus signatus*).

Les chiens Ibériques étudiés appartiennent à HG1, l'un des haplogroupes universellement partagés par les chiens (comme dans Ding et al., 2012), ce qui suggère une origine commune avec les autres

chiens Européens. De plus, HG1 est également présent dans la population de chiens du nord-ouest de l'Afrique analysée, dénotant la même origine patrilinéaire que les chiens Ibériques. Nos résultats sont en accord avec ceux de Ding et al. (2012) pour les races de chiens d'Afrique du Nord mais contrastent avec les résultats de Brown et al. (2011) pour les populations de chiens Africains de régions plus méridionales (Africains/Afrique du Sud, Basenji/Afrique centrale et Rhodesian ridgeback/Afrique du Sud).

Bien qu'une étude approfondie sur plusieurs populations de loups gris doive encore être réalisée pour les marqueurs du chromosome Y, **la sous-espèce de loup Ibérique présente une grande diversité avec trois lignées SNP distinctes du chromosome Y qui n'ont été trouvées chez aucun autre loup ou chien échantillonné jusqu'à présent**. Par conséquent, la sous-espèce contemporaine du loup Ibérique conserve une diversité importante sur le chromosome Y.

Les **chiens Ibériques** ont révélé un quart des lignées Y-SNP détectées chez les loups Ibériques. **Ce résultat peut être lié à des événements anciens comme la domestication, car on estime que le taux de mutation du chromosome Y est très faible chez les espèces de mammifères** (Kumar & Subramanian, 2002). Pour les chiens, un taux de mutation de $1,65 \times 10^{-9}$ substitutions par an et par paire de bases, similaire à celui des humains, a été supposé (Natanaelsson et al., 2006). Le niveau plus élevé de variabilité des Y-STR observé chez le chien est associé à la nature du marqueur (taux de mutation plus élevé que pour les SNP) et à l'expansion démographique observée pour cette sous-espèce par rapport au **goulot d'étranglement** du loup Ibérique à une **époque récente** (Sastre et al., 2011).

Deux échantillons de loups Ibériques partagent un patrilignage de basse fréquence avec des chiens d'Afrique du Sud et d'Asie de l'Est, l'haplogroupe HG9. Ce résultat soutient une origine loup pour ce clade de chiens décrit pour la première fois par Natanaelsson et ses collaborateurs (Natanaelsson et al., 2006). Il est probable qu'une étude approfondie des spécimens de loups avec des marqueurs du chromosome Y révélera d'autres populations de loups portant des haplotypes ségréguant dans l'haplogroupe HG9. **La possibilité que ces spécimens soient des hybrides chien mâle × loup femelle (la direction la plus probable de l'hybridation loup-chien (Vilà et al., 2003 ; Godinho et al., 2011, 2015 ; mais voir aussi Hindrikson et al., 2012) n'est pas soutenue par cette étude**, car notre enquête sur 74 chiens mâles en Ibérie, y compris des chiens de village, a révélé qu'ils appartiennent tous à l'haplogroupe HG1 sans exception, qui est à cinq SNP de l'haplogroupe HG9. **Par conséquent, aucun chien Ibérique analysé jusqu'à présent ne portait d'haplotypes du chromosome Y appartenant à HG9**. De plus, ces deux loups particuliers datés de 2008 portent des haplotypes d'ADNmt typiques du loup (wH-1A et wH-1B dans cette étude), et des génotypes typiques du loup en ce qui concerne les données microsatellites autosomiques. Une distinction nette entre les loups Ibériques et les chiens a été trouvée à l'aide de notre ensemble de données, ce qui est conforme aux études précédentes rapportant des niveaux de F_{ST} par paire allant de 0,193 à 0,341 ($p < 0,0001$) selon l'ensemble de marqueurs autosomiques utilisés (Godinho et al., 2011). **Nos données moléculaires autosomiques suggèrent également un faible niveau de métissage récent entre les deux sous-espèces en Ibérie, bien que le flux génétique historique ne puisse être rejeté** (Fan et al., 2016). Le partitionnement de la population à l'aide d'une procédure de regroupement bayésien et basé sur les loci microsatellites révèle une ségrégation complète entre les génotypes de chiens de village ou de chiens de garde du bétail Portugais et de loups Ibériques (Figure S1), contrairement aux résultats de Kopalani et de ses collaborateurs (Kopalani et al., 2014) pour la région du Caucase.

Il est important de souligner ici que notre stratégie d'échantillonnage a limité l'échantillonnage **d'hybrides potentiels**, car nous n'avons pas échantillonné de chiens en liberté ou sauvages. Bien que les hybrides loup-chien soient connus à l'état sauvage (Randi & Lucchini, 2002 ; Vilà & Wayne, 1999 ; Vilà et al., 2003), y compris en Ibérie (Godinho et al., 2011, 2015 mais voir aussi Echegaray & Vilà, 2010), **l'hybridation reste un phénomène limité en Ibérie** (Fan et al., 2016 ; Godinho et al., 2011, 2015). Par ailleurs, la recherche de la mutation mélanique du locus *K*, une délétion de trois nucléotides dérivée du chien (Caniglia et al., 2013 ; Randi et al., 2014), dans 42 échantillons de tissus de loups issus de cette étude et 26 prélèvements médico-légaux (écouvillonnage de blessures de bétail dues à des attaques de loups) collectés entre 1991-2015 au nord et au sud du fleuve Douro au Portugal, **n'a révélé aucun animal présentant un génotype hybride** (Quaresma, 2016).

Les sept haplotypes d'ADNmt décrits dans cette étude, dont cinq sont uniques aux loups Ibériques, ajoutent à la diversité précédemment rapportée pour cette petite **population isolée** de loups gris. Le fait que les séquences d'ADNmt coupées à 230 pb aient encore révélé deux nouveaux haplotypes pour les loups Ibériques trouvés au Portugal élargit la diversité précédemment signalée pour l'Ibérie au sein de **l'haplogroupe 1** des loups (Pilot et al., 2010) et **ajoute** la représentation de **l'haplogroupe 2** des loups (Pilot et al., 2010). **Cela renforce les preuves de la diversité non signalée chez les loups Ibériques**. Une faible diversité génétique a été signalée pour les populations de loups qui ont connu un déclin et une fragmentation de leur population (Randi et al., 2000). Les populations de loups en Italie, en Scandinavie, en Suisse et en France ont toutes moins d'haplotypes que la population Ibérique (Ellegren, Savolainen, & Rosen, 1996 ; Pilot et al., 2010 ; Randi et al., 2000). Cela peut très probablement s'expliquer par le fait que, bien que la population Ibérique de loups, comme les autres populations Européennes, ait connu un déclin démographique depuis le Pléistocène supérieur (Pilot et al., 2014) et ait subi un fort déclin dû à l'homme au début du 20^{ème} siècle, sa taille effective de population n'a jamais été aussi faible que dans les autres régions.

4.2 | Différenciation génétique des sous-espèces du genre *Canis*

Les marqueurs moléculaires du chromosome Y révèlent une distinction génétique du loup Ibérique par rapport aux autres loups et aux chiens domestiques. Quatre marqueurs Y-SNP sont diagnostiques et permettent de séparer les loups Ibériques des échantillons de chiens mâles. Ce résultat obtenu à partir **d'échantillons contemporains** n'est pas en faveur d'un événement local de domestication des chiens en Ibérie, car la composition génétique des chiens locaux est apparemment faite d'une myriade de lignées de chromosomes Y (y compris les Y-STR) venues d'ailleurs. Quoiqu'il en soit, les races ont une origine très récente par rapport à la domestication des chiens, et les haplotypes actuellement présents dans les races autochtones peuvent ne pas être représentatifs des haplotypes qui étaient présents dans les premières sous-espèces de chiens. Des recherches plus approfondies utilisant des échantillons historiques et anciens et des marqueurs à haute résolution (par exemple, **génomés complets** de l'ADNmt, SNP à l'échelle du génome) sont nécessaires pour reconstruire l'histoire des sous-espèces du genre *Canis* en Ibérie et pour étudier les processus d'évolution des populations associées.

Les quatre marqueurs diagnostiques Y-SNP mentionnés peuvent facilement être utilisés pour cribler des échantillons non invasifs tels que des excréments, des poils et des écouvillons médico-légaux pour déterminer leur origine d'espèce. Les informations qui en résultent sont cruciales pour la surveillance de la métapopulation de loups Ibériques sauvages. De plus, ces SNP peuvent être intégrés dans un panel unique de marqueurs à développer pour l'harmonisation des marqueurs moléculaires utiles à l'étude de la génétique des populations de *Canis lupus* (de Groot et al., 2016).

La différenciation génétique des loups Ibériques constatée pour les marqueurs du chromosome Y est probablement due à divers facteurs géographiques et génétiques, tels que leur isolement des autres populations de loups Européens et la dérive génétique qui en résulte. Comme nous l'avons mentionné précédemment, une partie de la diversité des loups a pu être perdue au cours du grave déclin de la population qui s'est produit au 20^{ème} siècle, et nous émettons donc l'hypothèse que la diversité ancestrale des lignées patrilinéaires de loups Ibériques aurait pu être plus élevée.

Nous rapportons le partage d'haplotype d'ADNmt entre les loups et les chiens dans le monde entier et dans la péninsule Ibérique. Dans la péninsule Ibérique, l'haplotype partagé wH-5 ségrège au sein du clade A d'ADNmt le plus courant chez les chiens du Portugal. En outre, les haplotypes mitochondriaux les plus proches de l'haplotype wH-5 du loup Ibérique sont d'autres haplotypes de chiens différant par une seule mutation de transition.

L'identification d'un haplotype d'ADNmt partagé entre les races de loup Ibérique et de chien peut être interprétée comme une **introgression** d'haplotypes de chien dans le pool génétique du loup Ibérique. Cet échantillon particulier (IbWolf-5, mâle) a été collecté en 2000 dans l'aire de répartition connue du loup dans le nord du Portugal (Serra da Cabreira), à partir d'un animal décédé présentant un phénotype typique de loup, ne montrant aucun signe extérieur de métissage avec un chien domestique. Probablement en raison de la mauvaise conservation de l'échantillon et donc de la dégradation de l'ADN, nous n'avons pas été en mesure de générer des données microsatellites pour cet échantillon, ni des microsatellites autosomiques ni des microsatellites liés à l'axe Y. Néanmoins, cet échantillon présente un phénotype et un profil Y-SNP de loup : des nucléotides typiques du loup ont été détectés aux loci de diagnostic décrits. **S'agissant d'un loup mâle, pour que cet échantillon appartienne à un hybride de première génération, il n'a pu résulter que du croisement entre une chienne et un loup mâle, ce qui est considéré comme rare.** Le premier enregistrement de ce type d'hybride en Europe date de 2008-2009 en Lettonie, un seul spécimen, qui a été rapporté dans Hindrikson et al. (2012). Compte tenu de la distance génétique élevée par rapport à tous les autres haplotypes d'ADNmt de loups Ibériques et du fait qu'il n'a jamais été trouvé auparavant dans aucune autre population de loups, un événement d'hybridation plus ancien ne peut être exclu. Alternativement, l'haplotype partagé peut représenter une variante ancestrale préservée jusqu'à récemment, car cet haplotype ségrège au sein de l'haplogroupe 2 du loup, qui a été extensivement détecté dans d'anciens échantillons de loups d'Europe occidentale (Pilot et al., 2010). Une fois encore, l'étude d'échantillons historiques et anciens de la péninsule Ibérique permettra de clarifier cette question et éventuellement de dater la plus ancienne preuve de cet haplotype chez les loups Ibériques.

4.3 | Impacts pour la conservation du loup Ibérique

Nous avons montré, en utilisant des données nucléaires et mitochondriales, que le loup Ibérique présente une plus grande diversité que ce qui avait été précédemment rapporté, avec de nouveaux haplotypes maternels et paternels révélés.

Nous émettons l'hypothèse que les haplotypes d'ADNmt partagés entre les loups et les chiens pourraient représenter des lignées ancestrales communes **relictuelles** de *Canis* qui n'ont pas divergé après la domestication des chiens. Bien que l'hybridation ait été enregistrée en Ibérie, le fait que, dans notre ensemble de données, le pourcentage de partage d'haplotype d'ADNmt entre chien et loup dans cette région soit environ la moitié de ce qui a été trouvé ailleurs soutient la conclusion que l'hybridation en Ibérie, plus spécifiquement au Portugal (puisque la plupart des échantillons de

loux proviennent de cette région), est un événement rare. Si la perturbation des habitats du loup dans la péninsule Ibérique se poursuit, en raison de la perte et/ou de la fragmentation de l'habitat, en plus de l'augmentation de la population de chiens sauvages, qui chevauche largement l'aire de répartition du loup (Álvares, 2011 ; LIFE Co-EX 2008), l'identité génétique du loup Ibérique est menacée.

Les loups présents en Ibérie représentent un réservoir de variantes génétiques et **écomorphologiques** uniques du loup gris. Par conséquent, selon la proposition de Hofreiter et Barnes (2010), cela souligne la nécessité de maintenir et même d'intensifier les multiples mesures visant à assurer la durabilité à long terme de cette population localement adaptée, isolée et périphérique, le loup Ibérique.