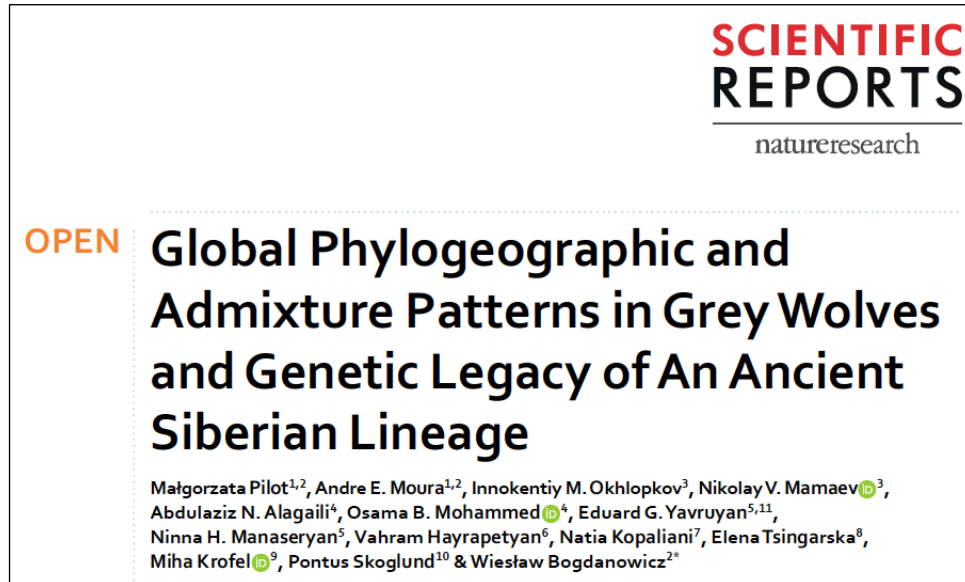


## Modèles mondiaux de phylogéographie et de métissage chez les loups gris et héritage génétique d'une ancienne lignée Sibérienne



### Résumé

Les relations évolutives entre les lignées éteintes et les lignées existantes fournissent des informations importantes sur la réaction des espèces aux changements environnementaux. Le loup gris fait partie des quelques grands carnivores holarctiques qui ont survécu aux extinctions de la mégafaune du Pléistocène supérieur et qui ont réagi aux profonds changements environnementaux de cette période en perdant des lignées distinctes et en subissant des changements phylogéographiques, ainsi qu'en subissant une domestication. Nous avons reconstruit des modèles phylogéographiques globaux à l'échelle du génome chez les loups modernes, y compris les loups Sibériens précédemment sous-représentés, et évalué leurs relations évolutives avec un loup précédemment génotypé de Taimyr, en Sibérie, daté de 35 Kya. La structure phylogéographique déduite a été affectée par le métissage avec des chiens, des coyotes et des chacals dorés, ce qui souligne l'importance de tenir compte de ce processus dans les études phylogéographiques. **La lignée de Taimyr était distincte des loups modernes de Sibérie et constituait une lignée sœur des loups modernes d'Eurasie et des chiens domestiques, avec une position ambiguë par rapport aux loups d'Amérique du Nord.** Nous avons détecté un flux génétique entre la lignée du Taimyr et les races de chiens arctiques, mais les méthodes de regroupement des populations ont indiqué une plus grande similarité entre le loup du Taimyr et les loups modernes qu'avec les chiens, ce qui implique des relations post-divergentes complexes entre ces lignées. Notre étude montre que l'introgession à partir de populations con-spécifiques et con-génériques écologiquement diverses était courante dans l'histoire évolutive des loups et pourrait avoir facilité leur adaptation aux changements environnementaux.

### INTRODUCTION

Le Pléistocène tardif a été une période marquée par de nombreuses extinctions de grands mammifères, résultant de l'effet combiné du changement climatique et de l'impact de l'homme<sup>1</sup>. Les espèces qui ont survécu aux extinctions de la mégafaune ont connu des goulots d'étranglement démographiques, des extinctions locales et des changements

phylogéographiques<sup>2-4</sup> - événements qui ont également été signalés comme ayant précédé des extinctions chez de multiples espèces<sup>5-8</sup>. **Des études paléogénomiques ont révélé la présence de fragments génomiques provenant d'espèces éteintes dans les pools génétiques de leurs parents actuels**<sup>9-11</sup>. Cela pourrait indiquer que l'envahissement génétique est un facteur contribuant à ces extinctions, bien que certaines populations portent des variantes génétiques dérivées d'hybridations montrant des signatures de sélection positive<sup>9,12,13</sup>. Cela suggère que la contribution génétique des espèces éteintes pourrait avoir facilité l'adaptation de leurs parents actuels à des conditions environnementales en évolution rapide. La reconstitution des relations évolutives entre les lignées éteintes et les lignées existantes peut donc fournir un aperçu direct des voies évolutives complexes menant à l'extinction ou à la survie d'une espèce.

Le loup gris (*Canis lupus*) fait partie des quelques grands carnivores qui ont survécu aux extinctions de la mégafaune du Pléistocène tardif. Comme beaucoup d'autres espèces de la mégafaune, le loup a connu un déclin global de sa population à la fin du Pléistocène<sup>14,15</sup>, qui a été associé à des extinctions **d'écomorphes** distincts et à des changements phylogéographiques<sup>16-19</sup>. **Au cours de cette période, l'une des lignées de loups s'est transformée en chien domestique** (*Canis lupus familiaris* ; voir 20). La domestication a assuré le succès évolutif de cette lignée grâce à son expansion dans une nouvelle niche écologique, tout en affectant considérablement les populations non domestiquées par le biais de la concurrence pour les ressources, du transfert de maladies et des métissages<sup>22</sup>. Les populations de loups portent également la signature de métissages passés et actuels avec les chacals dorés (*Canis aureus*) en Eurasie<sup>23-25</sup> et les coyotes (*Canis latrans*) en Amérique du Nord<sup>26-28</sup>.

**Tous les loups existants ont un ancêtre commun récent estimé à environ 32 Kya - une date qui coïncide avec le début du déclin démographique mondial de l'espèce**<sup>15</sup>. Des études basées sur des données de séquences de génomes nucléaires entiers ont révélé que les loups Eurasiens modernes forment un clade monophylétique distinct des loups nord-Américains<sup>15,28</sup>, tandis que les génomes mitochondriaux montrent un modèle phylogéographique plus complexe<sup>18</sup>. Une analyse récente des génomes mitochondriaux de loups anciens et modernes a permis de déduire que les populations de loups modernes peuvent être rattachées à un événement d'expansion unique datant d'environ 25 000 ans en Béringie (région comprenant l'est de la Sibérie, l'Alaska et une partie du Yukon, tous précédemment reliés par voie terrestre)<sup>19</sup>. Les loups anciens provenant d'autres parties de l'aire de répartition du loup gris étaient porteurs de lignées mitochondriales distinctes qui ne sont pas représentées dans les populations de loups contemporaines, ce qui implique l'extinction et le remplacement de ces lignées<sup>18,19,29</sup>.

Ainsi, le génome nucléaire d'un loup de la péninsule de Taïmyr en Sibérie, daté de 34,9 Kya, était phylogénétiquement distinct des génomes des loups et des chiens existants, ce qui implique que cet individu représente une lignée divergente éteinte<sup>10</sup>. En revanche, le génome mitochondrial de cet individu a été regroupé avec des loups modernes<sup>10</sup>, ce qui pourrait résulter d'un flux génétique postérieur à la divergence. **En outre, il a été démontré que les races de chiens arctiques portaient la signature d'un métissage passé avec la lignée des loups du Taïmyr**<sup>10</sup>. Cependant, les races de chiens arctiques présentent également des signatures de métissage avec les loups modernes<sup>30</sup>, ce qui implique soit des épisodes de métissage

indépendants survenus à différentes époques, soit la continuité de la lignée du Taïmyr chez les loups de Sibérie. Une meilleure compréhension de l'héritage génétique de la lignée des loups de Taïmyr nécessite une comparaison avec des données complètes sur les loups modernes, mais la représentation des loups Asiatiques modernes dans les études génétiques publiées est très limitée, la Sibérie étant particulièrement sous-représentée. L'origine Béringienne proposée pour les loups modernes<sup>19</sup> aurait dû entraîner une similarité génétique entre les populations modernes de Sibérie orientale et d'Alaska (anciennes parties de la Béringie), mais ces populations n'ont pas été incluses dans les études précédentes sur la phylogéographie mondiale des loups. Par conséquent, la connaissance des schémas phylogénétiques des loups modernes d'Asie, et de Sibérie en particulier, est nécessaire pour mieux comprendre l'histoire complexe de cette espèce.

Dans cette étude, nous reconstruisons les schémas phylogéographiques à l'échelle du génome dans les populations modernes de loups gris à travers leur distribution holarctique, sur la base d'un vaste ensemble d'échantillons comprenant des loups de Sibérie précédemment sous-représentés (Fig. 1). Nous fournissons également la première reconstruction mondiale des schémas de métissage des loups avec les chiens domestiques, les coyotes et les chacals dorés. Nous utilisons ces données pour tester les hypothèses suivantes :

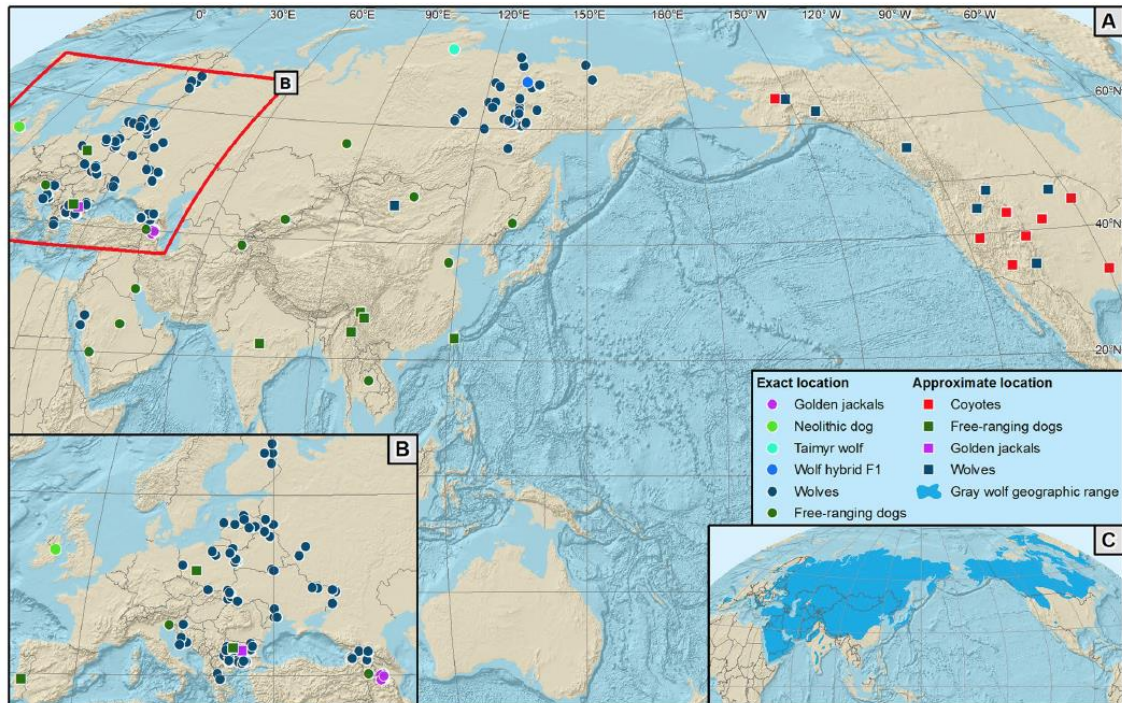
- (1) Il n'y a pas de continuité entre la lignée du Pléistocène tardif de Taïmyr et les lignées de loups modernes en Eurasie<sup>10,19</sup>.
- (2) Tous les loups modernes sont issus d'une seule expansion Béringienne<sup>19</sup>. Il devrait en résulter une augmentation progressive du déséquilibre de liaison à mesure que l'on s'éloigne de la Sibérie orientale et de l'Alaska.
- (3) Le métissage de loups dans les races de chiens arctiques provient de la lignée du Taïmyr<sup>10</sup>. Cela devrait permettre de déduire un flux génétique provenant du loup de Taïmyr plutôt que des loups Sibériens modernes dans les races arctiques.
- (4) Les loups gris et les chacals dorés d'Eurasie ont connu un métissage ancien<sup>23,25</sup>. Dans ce scénario, des blocs d'ancêtres provenant du chacal doré devraient être détectés chez les loups gris d'Eurasie.
- (5) L'inférence phylogéographique chez les loups gris modernes est affectée par des épisodes de métissage avec d'autres canidés. Dans ce cas, nous nous attendons à ce que la topologie des relations ancestrales déduites entre le loup et les autres lignées de canidés change une fois que les épisodes de mélange sont pris en compte.

## RESULTATS

### Modèles d'hétérozygotie et de déséquilibre de liaison dans les populations de loups du monde entier

Nous avons trouvé que toutes les populations de loups d'Asie avaient des niveaux similaires d'hétérozygotie à l'échelle du génome ( $H_o = 0,27$ ), qui étaient comparables à ceux des populations Européennes et plus élevés que ceux des populations nord-Américaines (Tableau supplémentaire 2). Les loups de Mongolie présentaient un déséquilibre de liaison (DL) plus faible que toutes les autres populations représentant les principales régions géographiques d'Eurasie et d'Amérique du Nord, dans toutes les classes de distance évaluées (Fig. 2). Les populations des régions correspondant à l'est et à l'ouest de la Béringie (Alaska intérieur et Yakoutie, respectivement) présentaient un DL nettement plus élevé dans toutes

les classes de distance par rapport aux loups de Mongolie. Les niveaux de DL dans les populations nord-Américaines étaient plus élevés que dans les populations Eurasiennes et augmentaient le long d'un gradient nord-sud à travers le continent nord-Américain. En revanche, les populations Eurasiennes ne présentaient pas de gradient géographique unique de DL (Figure 2, Figure supplémentaire 1).



**Figure 1.** Distribution des canidés sauvages et des chiens en liberté analysés dans cette étude. (A) Distribution des échantillons à travers l'Holarctique, (B) distribution des échantillons en Europe, (C) aire de distribution du loup gris. Chaque symbole représente plusieurs individus échantillonnés aux mêmes endroits. La carte n'inclut pas les échantillons de chacals à dos noir (de Namibie), de chiens en liberté d'Amérique du Nord (dont les lieux d'échantillonnage sont inconnus) et de chiens de race pure. Pour la liste de tous les échantillons analysés dans le cadre de l'étude, voir le tableau supplémentaire 1. Logiciel utilisé pour générer la carte : ESRI 2014. ArcGIS Desktop : Release 10.2.2. Redlands, CA : Environmental Systems Research Institute. Relief ombré généré à partir du SRTM DEM 90 m<sup>63</sup>. Les pays sont marqués à l'aide des données Natural Earth (données cartographiques vectorielles et matricielles gratuites @ [naturalearthdata.com](http://naturalearthdata.com)). Toutes les versions des données cartographiques matricielles et vectorielles de Natural Earth sont dans le domaine public. Elles peuvent être utilisées de n'importe quelle manière sans licence, y compris la modification du contenu et de la conception, la diffusion électronique et l'impression offset. L'aire de répartition géographique du loup gris a été dessinée d'après Boitani et al.<sup>64</sup>

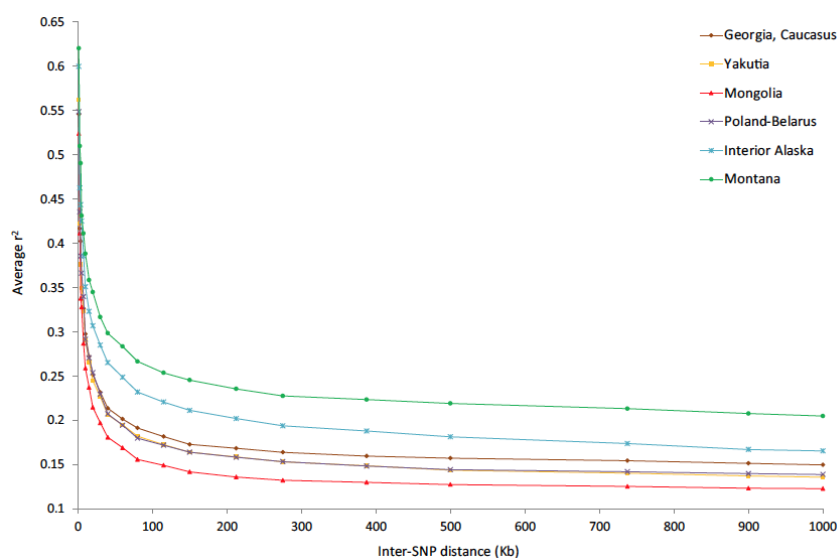
### Modèles de métissage dans la population mondiale de loups détectés à partir d'analyses de regroupement de populations

Nous avons utilisé ADMIXTURE<sup>31</sup> pour évaluer la structure génétique des populations mondiales de loups, en tenant compte du mélange avec d'autres canidés sauvages et des chiens. Cette analyse, ainsi que les autres analyses décrites ci-dessous (sauf indication contraire), ont été basées sur un ensemble de 42 320 loci SNP, obtenus après élimination des loci non génotypés chez le loup du Taïmyr afin de maximiser la précision de la comparaison de cet ancien loup avec les populations modernes.

L'analyse des mélanges a permis de distinguer les chiens des canidés sauvages à  $K = 2$  et les loups des autres canidés sauvages (coyotes, chacals dorés et chacals à dos noir) à  $K = 3$ . L'augmentation des valeurs de  $K$  a entraîné la formation de sous-ensembles au sein des populations de loups et de chiens plutôt que la séparation des autres espèces de canidés



sauvages. Ces espèces se sont regroupées en raison de la petite taille des échantillons (voir ci-dessous). Aucun  $K$  optimal n'a pu être identifié entre  $K = 1$  et  $K = 15$ , l'erreur de validation croisée diminuant continuellement avec l'augmentation de  $K$ . Cela n'implique pas un manque de structure, mais reflète des sous-groupes au sein des multiples espèces de canidés étudiées.



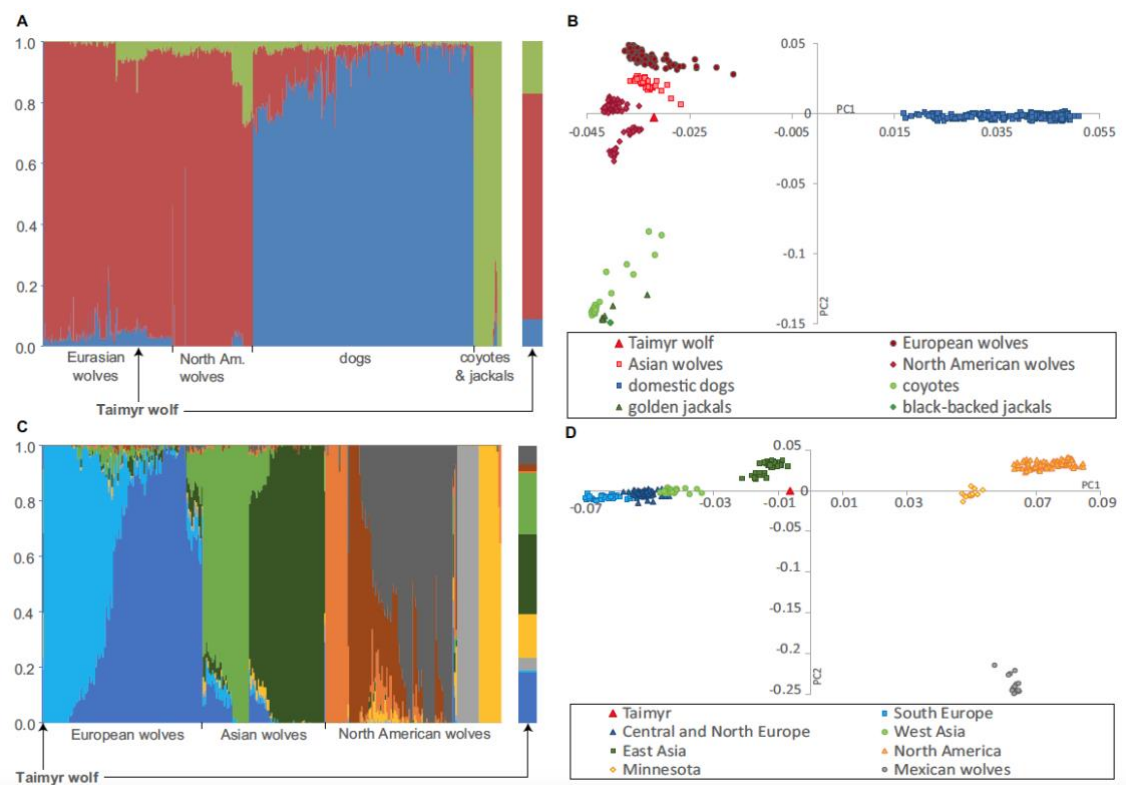
**Figure 2.** Schémas de déséquilibre de liaison dans les populations de loups. Le déséquilibre de liaison est représenté par le coefficient d'association génotypique moyen  $r^2$  et est tracé en fonction de la distance inter-SNP. L'estimation a été réalisée pour 10 individus non apparentés par population. Les données relatives aux loups mexicains ont été exclues du graphique par souci de clarté et sont présentées à la place dans la Figure supplémentaire 1

A  $K = 3$ , le loup du Taïmyr s'est regroupé avec les loups modernes (avec une valeur d'assignation de 0,74), mais a montré des valeurs d'assignation positives aux groupes des chiens (0,09) et des coyotes/ chacals (0,17). Pour des valeurs de  $K$  comprises entre 4 et 15, les valeurs d'assignation du loup du Taïmyr ont montré une variation limitée : 0,731-0,775 pour les groupes de loups gris, 0,075-0,107 pour les groupes de chiens et 0,131-0,168 pour les groupes de coyotes et de chacals (Tableau complémentaire 3). Notre ensemble de données comprenait des populations structurées de plusieurs espèces et s'écartait donc des hypothèses du modèle d'amalgame selon lesquelles tous les individus proviennent de populations homogènes et chaque population est bien représentée dans l'ensemble de données analysé<sup>32</sup>. L'ascendance mixte déduite pour le loup de Taïmyr indique des relations complexes entre la lignée de Taïmyr et des représentants contemporains du genre *Canis*, mais les proportions estimées de mélange ne doivent pas être interprétées comme l'ascendance réelle de cet individu.

A  $K = 3$ , les loups Asiatiques modernes ont été affectés positivement au groupe des chiens (0,02-0,13) et au groupe des chacals/coyotes (0,01-0,13) (Fig. 3A, Fig. supplémentaire 2A, Tableau supplémentaire 4). Les loups Européens ont montré une grande variation dans les valeurs d'assignation au groupe des chiens, et leur assignation au groupe des chacals/coyotes n'était pas supérieure à 0,02. Les loups Mexicains (la population qui habite actuellement le Nouveau Mexique et l'Arizona) ont des valeurs d'assignation faibles mais positives pour le groupe des chiens, et plus élevées pour le groupe des chacals/coyotes (0,13-0,15). Les loups du Minnesota avaient des valeurs d'attribution au groupe chacal/coyote supérieures à 0,2, tandis que les autres populations d'Amérique du Nord n'avaient pas plus de 0,05 de

l'ascendance coyote inférée et aucune signature de métissage avec le chien, à l'exception de deux individus. Le terme « loups d'Amérique du Nord » sera appliqué par la suite à la population nord-Américaine, y compris les loups du Mexique et du Minnesota, qui présentent des modèles distincts de métissage et de structure de la population.

Certains canidés sauvages individuels présentaient des niveaux de métissage suggérant qu'il s'agit d'hybrides ou de rétro-croisements de génération récente. Il s'agit notamment d'un individu noir ressemblant à un loup de Yakoutie (le premier cas de coloration noire dans cette région que nous connaissons), de deux individus de l'Idaho et de la Colombie-Britannique échantillonnés comme des loups, et d'un chacal doré du Nagorny Karabakh dans le Caucase, qui présentait un métissage faible mais détectable avec le loup (Fig. 3, Tableau supplémentaire 4).



**Figure 3.** Structure de la population déduite pour tous les canidés étudiés (A, B) et pour les loups uniquement (C, D) en utilisant ADMIXTURE et EIGENSOFT

Les races de chiens et les chiens en liberté ont varié dans leurs valeurs d'affectation au groupe des loups, les valeurs les plus élevées étant observées chez les chiens originaires de l'Asie de l'Est et de l'Arctique (Tableau supplémentaire 4). Les races originaires d'un mélange récent connu avec des loups avaient des valeurs d'affectation au groupe des loups de 0,15-0,17 (chien-loup Tchécoslovaque) et de 0,23-0,34 (chien-loup de Saarloos).

Après l'évaluation des schémas de mélange globaux, nous avons effectué une analyse de mélange incluant uniquement les loups. Cette analyse a permis de distinguer les loups d'Eurasie et d'Amérique du Nord à  $K = 2$ , et les loups d'Eurasie occidentale, d'Asie orientale et d'Amérique du Nord à  $K = 3$ . Le  $K$  optimal était de 9, distinguant deux populations régionales en Europe, deux en Asie et cinq en Amérique du Nord (Fig. 3C, Fig. supplémentaire 2B). Avec  $K = 9$ , le loup du Taïmyr a été attribué avec les probabilités les

plus élevées à quatre populations de loups : Asie de l'Est (0,29), Asie de l'Ouest (0,22), Europe du Nord-Est (0,18) et Minnesota (0,16), les cinq autres groupes ayant des valeurs d'affectation faibles (0,15 au total). En revanche, les valeurs d'affectation des loups Asiatiques contemporains aux populations nord-Américaines n'étaient pas supérieures à 0,016.

### **Structure génétique de la population mondiale de loups déduite de l'analyse en composantes principales**

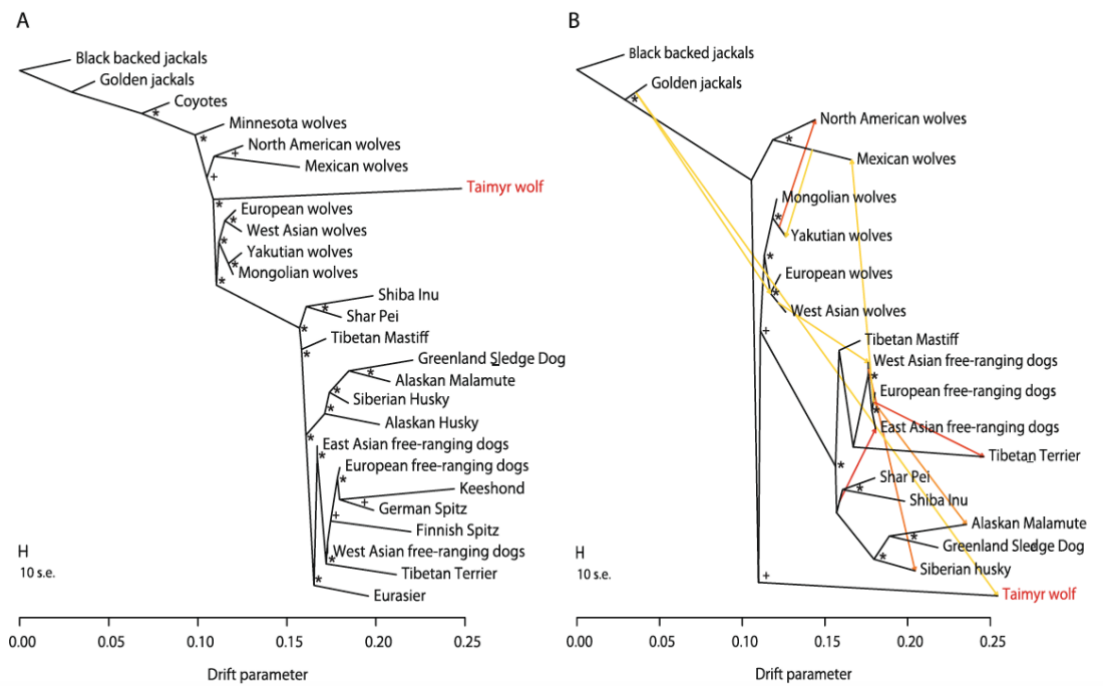
L'ACP (réalisée à partir de 42 320 loci) a révélé des schémas de regroupement similaires à ceux d'ADMIXTURE, avec des groupes distincts de loups gris et de chiens, et les autres espèces de *Canis* regroupées (Fig. 3B, Fig. supplémentaire 3A). Les positions des loups Eurasiens sur le graphique de l'ACP correspondaient à leurs distances géographiques, mais les différences géographiques entre les populations Eurasiennes et nord-Américaines ne se reflétaient pas dans leur différenciation génétique. **Tous les loups nord-Américains se sont regroupés, à l'exception des populations du Minnesota et du Mexique, qui étaient plus proches du groupe des coyotes et des chacals.** Lorsque seuls les loups ont été inclus dans l'analyse, les loups Eurasiens et nord-Américains ont été distingués sur PC1, et les loups Mexicains ont été distingués des autres loups nord-Américains sur PC2 (Fig. 3D, Fig. supplémentaire 4).

L'analyse PCA réalisée après l'inclusion d'échantillons supplémentaires de chacals dorés et de chacals à dos noir (pour obtenir des tailles d'échantillons plus équilibrées) a donné trois groupes clairement distincts de coyotes, de chacals dorés et de chacals à dos noir (Fig. supplémentaire 5). Cela implique que ces espèces étaient regroupées dans l'ensemble de données original en raison d'un déséquilibre dans la taille des échantillons.

La position du loup de Taïmyr sur le graphique de l'ACP a été fortement influencée par l'ensemble de SNP analysé et la composition des populations de référence. Dans l'ACP basée sur l'ensemble de données comprenant les loci SNP avec des données manquantes pour le loup du Taïmyr (90 554 loci), cet individu était placé au centre du graphique, avec des distances similaires aux groupes de loups, de chiens et de coyotes (Figure supplémentaire 3B). **L'élagage des loci SNP manquants chez le loup du Taïmyr a permis de le regrouper avec les loups modernes, mais pas au sein d'une population régionale** (Fig. 3B, Fig. supplémentaire 3A). **Lorsque seuls les loups ont été inclus dans l'analyse, le loup du Taïmyr a été placé près du groupe des loups modernes d'Asie de l'Est, mais pas au sein de ce groupe** (Fig. 3D, Fig. supplémentaire 4C). Pour maintenir la précision de l'inférence concernant le loup du Taïmyr, tous les résultats présentés ci-dessous sont basés sur l'ensemble de données où les loci manquants pour cet individu ont été retirés de l'ensemble de données analysé.

### **Reconstruction des relations ancestrales entre les populations de loups en tenant compte des flux de gènes interspécifiques**

**L'arbre du maximum de vraisemblance reconstruit à l'aide de TreeMix<sup>33</sup> a montré que les loups d'Amérique du Nord ont divergé avant la séparation entre les loups Eurasiens modernes et les chiens domestiques.** Le loup de Taïmyr a été placé (avec un soutien de bootstrap de 100%) comme lignée sœur de tous les loups Eurasiens et des chiens domestiques, les loups d'Amérique du Nord se ramifiant avant la séparation de la lignée de Taïmyr et des loups Eurasiens modernes (Fig. 4A, Fig. supplémentaire 6).



**Figure 4.** Relations d'ascendance entre le loup du Taïmyr et les populations modernes de loups et de chiens déduites dans TreeMix pour (A) l'ensemble des populations de canidés, (B) un ensemble réduit de populations, excluant celles dont l'histoire des mélanges est connue, et supposant 10 événements de flux génétique. Le flux génétique est représenté par des flèches, les couleurs reflétant l'intensité du flux génétique, du plus faible (jaune) au plus fort (rouge). Les nœuds ayant un soutien bootstrap de 95-100% sont marqués d'un astérisque, et les nœuds ayant un soutien bootstrap de 50-95% sont marqués d'un symbole plus

L'ajout de 10 arêtes de migration n'a pas modifié les relations d'ascendance entre les populations de loups, à l'exception des loups du Minnesota. Le TreeMix a également détecté un flux génétique post-divergence des loups de Yakoutie vers les loups d'Amérique du Nord, et des coyotes vers l'ancêtre commun des loups d'Eurasie ; cependant, ce dernier résultat est peu probable étant donné l'isolement géographique à long terme de ces populations. Les autres événements migratoires reflètent le mélange entre différentes races ou populations de chiens, y compris les cas de mélange entre races de chiens qui sont cohérents avec l'histoire de la formation des races (par exemple, les chiens-loups Tchécoslovaques). L'analyse jackknife a fourni un soutien solide pour tous les événements de migration, avec  $P < 3 \times 10^{-10}$  dans tous les cas.

Nous avons ensuite répété l'analyse pour un ensemble de données réduit obtenu en excluant les populations impliquées dans des événements de mélange en dehors de l'Eurasie ou entre races de chiens (coyotes, loups du Minnesota, Huskies de l'Alaska, Eurasiers et races de chiens Européennes de type spitz). Dans cette nouvelle analyse, l'appui bootstrap pour la ramification du loup du Taïmyr après les loups d'Amérique du Nord a diminué de 100% à 56% (Fig. 4B), indiquant que les positions relatives de ces deux lignées peuvent être influencées par le mélange des loups d'Amérique du Nord avec les coyotes. Cette nouvelle analyse a permis de déduire un flux génétique du chacal doré vers le loup du Taïmyr et du chacal doré vers l'ancêtre commun des loups d'Asie occidentale/centrale et d'Europe. Nous avons également identifié un flux de gènes des loups de Yakoutie vers les loups d'Amérique du Nord et des loups d'Asie de l'Ouest vers les chiens d'Asie de l'Ouest (Fig. 4B, Fig. supplémentaire 7). Tous les flux de gènes déduits ont bénéficié d'un soutien statistique de  $P < 0,03$ , à l'exception du flux de gènes déduit des chiens Européens vers le terrier Tibétain.



Une analyse supplémentaire, dans laquelle nous avons inclus les coyotes mais exclu les autres populations et races mentionnées ci-dessus, a donné des résultats globalement cohérents avec ceux décrits ci-dessus, mais le flux de gènes des chacals dorés n'a plus été détecté (Fig. 8 supplémentaire).

L'analyse ne prenant en compte que les canidés originaires d'Asie, et en supposant 10 fronts de migration, a révélé un flux génétique de la lignée du Taïmyr vers la lignée ancestrale des races de chiens de l'Arctique : Husky de Sibérie, Malamute d'Alaska et Chien de traîneau du Groenland. Les races arctiques ont également reçu un flux génétique des loups modernes d'Asie de l'Est et de la lignée ancestrale des chiens libres d'Asie (Figure supplémentaire 9).

### Mélange déduit de l'analyse des blocs d'ascendance dans LAMP

La proportion de blocs chromosomiques d'ascendance chien chez les loups individuels estimée dans LAMP<sup>34</sup> (en supposant 10 générations depuis le mélange) variait entre 0 et 27%, et la proportion de blocs chromosomiques d'ascendance loup chez les chiens individuels variait entre 0 et 7% (Tableau 1, Tableau supplémentaire 5, Fig. supplémentaire 10). Le chien Irlandais néolithique avait 0,17% d'ascendance loup estimée. Les races de chiens-loups dont on sait qu'elles sont issues d'un mélange récent de loups et de chiens par l'homme avaient une proportion considérable d'ancêtres loups : 11-12% pour le chien-loup Tchécoslovaque et 18-33% pour le chien-loup de Saarloos. Cinq canidés sauvages, échantillonnés en tant que loups, présentaient des proportions d'ascendance de loup comprises entre 35% et 73%.

**Tableau 1.** Proportion des ancêtres des chiens et des chacals dorés dans les populations modernes et anciennes de canidés, déduite en utilisant ADMIXTURE et LAMP pour les chromosomes autosomiques. Le logiciel ADMIXTURE déduit des modèles de mélange à long terme, tandis que l'analyse LAMP a été effectuée en supposant un mélange dans les 10 dernières générations d'ancêtres. Les résultats de l'analyse ADMIXTURE sont rapportés pour l'analyse supposant 3 groupes génétiques. Les résultats de l'analyse des mélanges pour le loup de Taïmyr en supposant un plus grand nombre de groupes sont présentés dans la figure supplémentaire 3. Les résultats de l'analyse LAMP sont présentés sous forme de valeurs moyennes pour tous les chromosomes autosomiques. †Assignation au groupe comprenant les chacals dorés ainsi que les chacals à dos noir et les coyotes, ces deux derniers étant absents d'Eurasie

Population	Dog ancestry ADMIXTURE	Golden jackal† ancestry ADMIXTURE	Dog ancestry LAMP	Golden jackal ancestry LAMP
Taïmyr wolf	0.09	0.17	0.03	0.02
modern Eurasian wolves	0.00–0.26	0.00–0.13	0.00–0.27	0.00–0.01
modern dogs	0.70–0.99	0.00–0.05	0.93–1.00	—
golden jackal	0.00–0.05	0.95–1.00	—	0.98–1.00

L'ancien loup de Taïmyr présentait 100% d'ascendance de loup dans 36 chromosomes, tandis qu'une ascendance putative de chien était détectée dans les chromosomes 15 et 23 (22% et 100% d'ascendance de chien, respectivement ; voir Résultats supplémentaires, p. 2). L'ascendance canine moyenne estimée sur l'ensemble des chromosomes autosomiques était de 3%. Le chromosome 23 n'avait que 261 loci SNP retenus pour l'analyse Lamp (sur la base du seuil LD  $r^2 < 0,1$ ), tandis que la gamme de loci retenus dans les chromosomes autosomiques restants allait de 1701 (dans le chromosome 1) à 501 (dans le chromosome 38). L'inférence de la tangente au chromosome 23 pourrait donc être affectée par le nombre réduit de loci SNP informatifs.

L'analyse de LAMP sur les mélanges entre loups et chacals dorés a montré que les loups modernes ne portent pas plus de 0,2% de blocs chromosomiques provenant d'un mélange récent avec des chacals dorés, et que les chacals - à une exception près - portent 0,1-0,3% de blocs chromosomiques provenant d'un mélange récent avec des loups (Tableau 1, Tableau supplémentaire 5, Fig. supplémentaire 11). Un chacal doré du Caucase avait 1,7% d'ascendance de loup sur les chromosomes autosomiques, et affichait 3-21% d'ascendance de loup sur 7 chromosomes. **Le loup de Taïmyr avait 2% d'ascendance de chacal d'oré estimée sur les chromosomes autosomiques, mais cela résultait d'une grande proportion (48%) d'ascendance putative de chacal d'oré déduite sur un seul chromosome - le chromosome 37.** Ce chromosome avait un nombre relativement faible de loci SNP retenus pour l'analyse LAMP (510), mais ce nombre était typique d'autres chromosomes de longueur similaire, puisque les chromosomes 35-38 avaient tous moins de 600 loci retenus pour l'analyse. Par conséquent, l'ascendance du chacal doré inférée pour le chromosome 37 ne peut pas être attribuée uniquement au petit nombre de SNP utilisés dans l'analyse, mais nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la faible résolution ait affecté l'inférence de LAMP.

### **Métissage déduit de l'analyse des blocs d'ascendance à ELAI**

Les résultats de l'analyse des blocs d'ascendance dans ELAI<sup>35</sup> (en supposant 100 générations de mélange) étaient cohérents avec les résultats de LAMP pour l'identification des hybrides loup-chien et des rétrocroisements récents (Tableau supplémentaire 6, Fig. supplémentaire 12). Les résultats d'ELAI confirment également les résultats de LAMP qui montrent un mélange de chiens dans les populations de loups d'Eurasie, mais pas de métissage de chiens (à quelques exceptions près) chez les loups d'Amérique du Nord, à l'exception des loups Mexicains. ELAI a identifié des niveaux de métissage plus élevés que LAMP dans plusieurs races qui ont connu une hybridation historique, y compris les chiens-loups de Saarloos et de Tchécoslovaquie, les races d'Asie de l'Est et de l'Arctique, l'Eurasier et le husky d'Alaska (Tableau supplémentaire 6).

## **DISCUSSION**

Le principal clivage phylogéographique parmi les populations de loups gris étudiées s'est produit entre les populations Eurasiennes et nord-Américaines, ce qui est cohérent avec leur séparation à long terme depuis l'inondation post-glaciaire du pont de Bering. En Eurasie, le principal clivage phylogéographique se produit entre les loups d'Asie de l'Est et les loups d'Eurasie de l'Ouest, bien que leur caractère distinctif puisse résulter en partie de discontinuités dans notre couverture géographique d'échantillonnage. **Parmi les loups d'Amérique du Nord, les populations les plus distinctes étaient les loups Mexicains et les loups des Grands Lacs (représentés ici par les loups du Minnesota).** Le caractère distinctif des loups Mexicains résulte probablement d'un isolement géographique et d'un goulot d'étranglement démographique<sup>26,36</sup>. La spécificité des loups des Grands Lacs a été expliquée soit par un mélange considérable de coyotes<sup>26-28,37</sup> soit par une origine évolutive distincte<sup>38,39</sup> (voir le matériel supplémentaire pour une liste de références plus complète). Notre étude ne dispose pas d'un échantillon complet des loups des Grands Lacs et nous ne pouvons donc pas tirer de conclusions quant à leur statut taxonomique.

**Notre analyse TreeMix a montré que lorsque la possibilité d'un flux génétique entre les coyotes et les loups est prise en compte, tous les loups d'Amérique du Nord, y compris les**

loups du Mexique et du Minnesota, forment un seul groupe. La monophylie de tous les loups d'Amérique du Nord est cohérente avec une inférence basée sur les génomes nucléaires entiers<sup>28</sup>. Une étude basée sur les génomes mitochondriaux a également conclu que les loups d'Amérique du Nord provenaient d'un événement de colonisation unique en provenance d'Asie qui a eu lieu 23-30 Kya, après la formation du pont terrestre de Bering<sup>18</sup>. Aucune des populations de loups d'Eurasie ne semble être génétiquement plus proche des loups d'Amérique du Nord que d'autres populations. Ceci est cohérent avec la déduction des données du génome nucléaire entier, montrant que toutes les populations modernes de loups d'Eurasie avaient un ancêtre commun il y a environ 30 Kya, et ne se sont diversifiées qu'après la divergence avec les loups d'Amérique du Nord<sup>15</sup>.

A la suite d'un événement d'expansion de l'aire de répartition, on s'attend à ce que le déséquilibre de liaison dans les populations augmente avec la distance par rapport au centre géographique de l'expansion<sup>40</sup>. Toutes les populations de loups d'Amérique du Nord avaient des niveaux de déséquilibre de liaison plus élevés que les loups d'Eurasie et montraient une augmentation du déséquilibre de liaison du nord (Alaska) au sud (Nouveau Mexique), ce qui est cohérent avec un seul événement d'expansion de l'Asie vers l'Amérique du Nord en passant par la Béringie. L'augmentation de la DL peut également s'expliquer par le déclin récent des populations de loups dans la zone contiguë des États-Unis, qui a été particulièrement sévère chez les loups Mexicains. Cependant, nos résultats sont cohérents avec d'autres sources de données qui suggèrent une expansion unique vers le sud en Amérique du Nord<sup>18</sup>. En revanche, les profils de DL dans les populations Eurasiennes n'indiquent pas clairement un modèle de fondation en série de l'expansion de la Béringie vers l'Eurasie. Bien que l'on puisse s'attendre à un gradient géographique unique de DL dans le cas d'un événement d'expansion unique à partir de la Béringie proposé dans<sup>19</sup>, les schémas de DL résultant d'une expansion de population pourraient avoir été modifiés par des événements ultérieurs (tels que des événements d'hybridation et une perte récente de diversité due à une chasse intensive), dissimulant ainsi l'origine de l'expansion géographique.

Notre analyse TreeMix a placé le loup du Taïmyr dans la lignée sœur des loups Eurasiens modernes et des chiens domestiques, conformément à la conclusion originale<sup>10</sup>. Par conséquent, notre inférence de la structure génétique de la population a révélé un regroupement du loup du Taïmyr avec n'importe quelle population de loups modernes, ce qui démontre sa spécificité. Il convient toutefois de noter que les estimations obtenues pour un seul individu ancien ne sont probablement pas représentatives de l'ensemble de la population dont il est issu. Par conséquent, nos résultats concernant le loup de Taïmyr doivent être interprétés avec prudence. Néanmoins, ils soulignent l'importance d'effectuer des analyses similaires pour un plus grand nombre de loups du Pléistocène lorsque leurs génotypes seront disponibles.

L'ambiguïté dans la position déduite de la lignée de loups de Taïmyr par rapport aux loups modernes d'Amérique du Nord peut résulter d'un mélange entre les loups d'Amérique du Nord et les coyotes. Le fait de supposer des divisions de lignées purement dichotomiques en présence d'un flux génétique postérieur à la division peut conduire à une reconstruction biaisée de l'histoire évolutive des lignées étudiées. Cependant, l'ambiguïté de la position du loup de Taïmyr peut également suggérer que ces deux lignées ont divergé des loups Eurasiens modernes à la même époque. L'estimation démographique du temps de coalescence pour

tous les loups modernes, basée sur les données de la séquence du génome entier, est d'environ 32,5 Kya<sup>15</sup>, ce qui fait que le loup du Taimyr est presque contemporain du temps de divergence entre les loups modernes d'Eurasie et d'Amérique du Nord. Les débuts de la domestication des chiens ont été estimés à 33-29 Kya<sup>15,41</sup>, peu après la divergence entre les loups d'Amérique du Nord et d'Eurasie<sup>15</sup>. Ceci suggère que la diversification entre les principales lignées de loups contemporains, la lignée de Taimyr et la lignée de chiens domestiques s'est produite dans un court laps de temps proche du début du dernier maximum glaciaire (33-26,5 Kya<sup>42</sup>).

Au cours de cette période, les loups ont connu des déclin démographiques considérables et des changements phylogéographiques<sup>14,15,19</sup>, avec la disparition d'écomorphes distincts, probablement en raison du déclin et de l'extinction de leurs espèces proies<sup>16,43</sup>. Les changements de densité et de composition des communautés d'ongulés ont pu conduire à des extinctions locales, mais aussi à la diversification des lignées, étant donné que les loups modifiaient leurs niches alimentaires dans de nouvelles directions, y compris celle de commensal de l'homme. Les changements écologiques et phylogéographiques qui se sont produits au cours de cette période ont joué un rôle crucial dans l'histoire évolutive du loup gris et du chien domestique.

Nos résultats montrent que l'évolution du genre *Canis* a été considérablement affectée par l'hybridation. Les proportions exactes de métissage déduites pour les populations régionales sont sujettes à un manque de précision, étant donné que les modèles d'inférence sont intrinsèquement plus simples que l'histoire évolutive réelle de ces populations. Malgré cette limitation, les modèles de métissage sont un outil utile pour déduire l'effet des flux de gènes sur les trajectoires évolutives des populations. L'analyse des mélanges indique que les loups Asiatiques contemporains ont des valeurs d'affectation positives, mais faibles, au groupe composé de chacals dorés, de chacals à dos noir et de coyotes (qui ont été regroupés en raison de la petite taille des échantillons ; voir la Figure supplémentaire 5). Seul le chacal doré pourrait être impliqué dans le métissage avec les loups Asiatiques, étant donné que les deux autres espèces n'ont jamais été présentes en Eurasie. Les proportions de métissage entre les loups modernes et les chacals dorés déduites dans LAMP étaient plus faibles que les résultats obtenus par ADMIXTURE et TreeMix, probablement parce que l'inférence de LAMP était limitée aux 10 dernières générations. La déduction d'un métissage ancien entre les loups et les chacals dorés est cohérente avec des résultats antérieurs basés sur des données de séquences de génomes entiers<sup>15,23,25</sup>. Cela n'exclut pas la possibilité de flux génétiques plus récents entre les deux espèces, qui ont également été signalés auparavant<sup>24,44</sup>. La distinction entre le métissage ancien et récent nécessite un plus grand nombre d'échantillons de loups et de chacals dorés provenant des régions où leurs aires de répartition se chevauchent, ainsi qu'une plus grande densité de loci SNP.

L'analyse TreeMix a déduit de multiples cas de flux de gènes entre les loups et les chiens, en accord avec des études antérieures, par exemple<sup>30,45-48</sup>. En conséquence, l'analyse des blocs d'ascendance mise en œuvre dans LAMP et ELAI a identifié des signatures de métissage de chiens dans toutes les populations de loups Eurasiens et dans les loups Mexicains. La population de loups Mexicains était la seule population nord-Américaine à présenter un métissage de chiens (sans compter les individus mélangés détectés dans d'autres populations). Comme cette population est petite et très consanguine<sup>36</sup>, les allèles dérivés du chien ont pu

passer à une fréquence relativement élevée dans cette population à la suite d'un seul événement d'hybridation. Par ailleurs, ce résultat pourrait être dû à une fréquence élevée d'allèles représentant des polymorphismes ancestraux partagés entre les loups et les chiens.

LAMP et ELAI ont tous deux déduit un métissage limité de loups dans les races de chiens d'origine Européenne et les chiens Européens en liberté, mais des niveaux plus élevés de métissage de loups dans les chiens en liberté et les chiens de race pure d'Asie de l'Est et de l'Arctique, ce qui est cohérent avec les conclusions de notre étude précédente basée sur un ensemble de données indépendantes<sup>48</sup>. Le métissage chez le chien Irlandais du Néolithique<sup>49</sup> était faible et se situait dans la fourchette des chiens Européens modernes. Nous avons également déduit un flux génétique de l'ancienne lignée de loups du Taïmyr vers la population ancestrale des races arctiques, en accord avec Skoglund et al.<sup>10</sup>. Étant donné que la lignée du Taïmyr se distingue des loups modernes, cela implique des événements d'introgession de loups indépendants chez les chiens de l'Arctique qui se sont produits à plusieurs périodes.

On s'attend à ce que le loup du Taïmyr ne soit pas mélangé à des chiens, puisqu'il a été daté de 35 Kya - l'époque qui précède ou est contemporaine des débuts du processus de domestication des chiens<sup>10</sup>. Le modèle déduit de l'analyse des blocs d'ascendance, avec 36 chromosomes ayant une ascendance de loup et une forte proportion d'ascendance de chien dans deux chromosomes restants, n'est pas compatible avec l'introgession neutre de parallèles dérivés de l'hybridation. Nos résultats indiquent également que la lignée de loups du Taïmyr a reçu un flux génétique de coyotes et/ou de chacals dorés. Cependant, la situation septentrionale de la péninsule de Taïmyr exclut la présence de chacals dorés au cours du pléistocène tardif, et le coyote n'est jamais apparu en Eurasie, ce qui rend peu probable un événement d'hybridation locale. L'analyse des blocs d'ascendance n'a montré aucune preuve de l'ascendance du chacal doré chez le loup de Taïmyr, à l'exception d'un chromosome présentant près de 50% de l'ascendance présumée du chacal. Une fois de plus, un tel schéma n'a pas pu résulter d'une introgession neutre et peut être attribué au faible nombre de loci SNP informatifs sur les chromosomes où l'ascendance exogène a été déduite, combiné à la présence d'une variation ancestrale partagée entre les lignées. Cela suggère que les erreurs dans l'inférence des mélanges résultant des informations génétiques limitées utilisées dans l'analyse ne sont pas susceptibles de produire des schémas de mélange cohérents sur plusieurs chromosomes. Par conséquent, l'analyse des blocs d'ascendance à l'intérieur des chromosomes peut constituer un moyen efficace d'identifier les erreurs dans l'inférence des mélanges à partir de la moyenne du génome.

L'analyse des mélanges de canidés devrait idéalement être basée sur les données de séquence du génome entier afin de maximiser le nombre de sites variables utilisés. Cependant, le coût du séquençage du génome entier à haute couverture est encore relativement élevé, ce qui limite le nombre d'individus pouvant être analysés (par exemple, Fan et al.<sup>15</sup> ont inclus 34 individus, et Sinding et al.<sup>28</sup> ont inclus 40 individus). Notre étude a montré une grande variation dans les proportions de mélanges au sein des populations, ce qui implique que l'inférence des mélanges pour des individus isolés n'est pas représentative des tendances à l'échelle de la population. Le génotypage SNP à l'échelle du génome permet de générer des données pour un grand nombre d'individus et fournit une densité suffisante de sites variables pour réaliser l'analyse par blocs d'ascendance. L'application de puces SNP à des espèces autres que celle utilisée pour la conception de la puce comporte un risque inévitable de biais



de vérification. Bien que nous ne puissions pas exclure que ce biais affecte nos résultats, nos analyses suggèrent qu'il est probablement faible (voir les informations complémentaires pour une discussion plus détaillée sur le biais de vérification). Par conséquent, le génotypage de SNP à l'échelle du génome est actuellement la méthode optimale pour générer les données au niveau de la population nécessaires à l'estimation des mélanges, et il peut compléter les études basées sur les données de séquence du génome entier.

## CONCLUSIONS

Les modèles phylogéographiques mondiaux des populations de loups modernes ont été façonnés par le changement phylogéographique majeur qui s'est produit vers la fin du Pléistocène et par les mélanges locaux qui ont suivi. Les populations de loups d'Eurasie portent la signature d'un métissage géographiquement répandu avec les chiens et d'un métissage rare avec les chacals dorés, tandis que les populations de loups d'Amérique du Nord présentent des niveaux variables de métissage avec les coyotes et un métissage rare avec les chiens. L'hybridation introgressive à partir de populations con-spécifiques et congénériques écologiquement diverses peut être inadaptée dans de nombreuses circonstances. Cependant, dans les périodes de changement environnemental rapide, cette introgression pourrait avoir facilité l'adaptation des loups à des conditions environnementales en évolution rapide. Cela a également été suggéré dans le cas du métissage entre l'ours brun (*Ursus arctos*) et l'ours polaire (*Ursus maritimus*)<sup>50</sup>. Le métissage a affecté les relations inférées entre les populations régionales de loups, soulignant l'importance de prendre en compte ce processus dans les études phylogéographiques, si des espèces étroitement apparentées sont ou ont été présentes dans la région étudiée.

Les modèles de déséquilibre de liaison et la reconstruction des relations ancestrales suggèrent que les loups gris nord-Américains (y compris les loups Mexicains) sont issus d'une colonisation unique en provenance d'Asie, ce qui est cohérent avec les résultats d'une étude récente basée sur les données du génome entier<sup>28</sup>. Cependant, il n'y a pas de preuve évidente d'un modèle de fondateurs en série pour l'expansion des loups de la Béringie vers l'Eurasie. Les loups d'Asie centrale et orientale présentaient le déséquilibre de liaison le plus faible de toutes les populations étudiées, et d'autres populations Eurasiennes ne présentaient pas de gradient géographique linéaire de déséquilibre de liaison, ce qui implique une histoire évolutive complexe.

De manière cohérente, nous avons constaté que l'ancienne lignée de loups de Taïmyr n'est pas clairement assignée aux loups Sibériens modernes ou à toute autre population régionale de loups. L'héritage génétique de cette lignée a persisté dans les races de chiens de l'Arctique à la suite d'un métissage ancien, mais il a été dilué par le flux génétique ultérieur des loups modernes. La reconstitution des relations ancestrales entre les populations de loups a placé l'ancien loup du Taïmyr dans une lignée sœur des loups d'Eurasie modernes et des chiens domestiques, avec une position ambiguë par rapport aux loups d'Amérique du Nord. Cette ambiguïté suggère que la divergence des lignées menant aux loups modernes d'Eurasie et d'Amérique du Nord, au loup du Taïmyr et aux chiens domestiques, s'est produite sur une courte période et a probablement été déclenchée par des changements environnementaux associés au début du dernier maximum glaciaire. Les processus évolutifs survenus au cours

de cette période ont façonné les schémas de diversité génétique des loups actuels et des premiers chiens domestiques.

L'histoire évolutive d'un autre grand carnivore holarctique, l'ours brun, suit un schéma similaire de remplacement global des lignées<sup>4</sup> et d'hybridation introgressive généralisée à partir d'espèces étroitement apparentées<sup>11,50</sup>. Les schémas observés peuvent donc représenter une réponse évolutive commune des espèces de mégafaunes aux changements environnementaux survenus pendant la transition Pléistocène/Holocène, ce qui justifie une étude comparative incluant de multiples espèces existantes et éteintes.