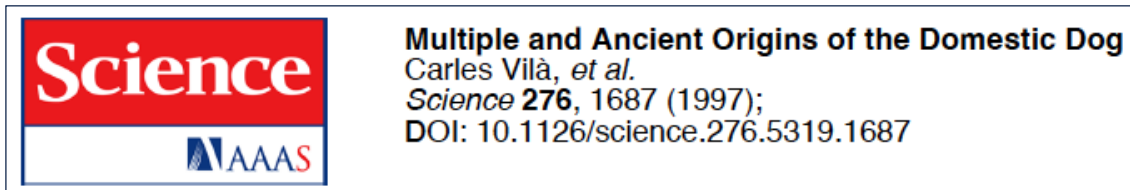


## Origines multiples et anciennes du chien domestique



Carles Vilà, Peter Savolainen, Jesús E. Maldonado,  
Isabel R. Amorim, John E. Rice, Rodney L. Honeycutt,  
Keith A. Crandall, Joakim Lundeberg, Robert K. Wayne\*

### Résumé

Les séquences de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial ont été analysées à partir de 162 loups provenant de 27 localités du monde entier et de 140 chiens domestiques représentant 67 races. Les séquences provenant de chiens et de loups ont montré une diversité considérable et ont soutenu l'hypothèse selon laquelle les loups étaient les ancêtres des chiens. La plupart des séquences de chiens appartenaient à un clade monophylétique divergent ne partageant aucune séquence avec les loups. **La divergence des séquences au sein de ce clade suggère que les chiens sont apparus plus de 100 000 ans avant le présent.** Les associations d'haplotypes de chiens avec d'autres lignées de loups indiquent des épisodes de mélange entre loups et chiens. Les échanges génétiques répétés entre les populations de chiens et de loups peuvent avoir été une source importante de variation pour la sélection artificielle.

Les données archéologiques ne permettent pas de déterminer si les chiens domestiques sont issus d'une seule population de loups ou s'ils proviennent de plusieurs populations à des époques différentes (1, 2). Pendant la majeure partie de la fin du Pléistocène, les hommes et les loups ont coexisté sur une vaste zone géographique (1), ce qui a donné lieu à des événements de domestication indépendants et à des échanges génétiques continus entre les loups et les chiens. L'extrême diversité phénotypique des chiens, même aux premiers stades de la domestication (1, 3, 4), suggère également un patrimoine génétique varié. Par conséquent, la diversité génétique des chiens peut avoir été enrichie par de multiples événements fondateurs, éventuellement suivis de croisements occasionnels avec des populations de loups sauvages.

Nous avons séquencé des parties de l'ADN mitochondrial des loups et des chiens domestiques. Dans un premier temps, 261 paires de bases (pb) du domaine gauche de la région de contrôle mitochondriale (5) ont été séquencées à partir de 140 chiens représentant 67 races et cinq croisements et de 162 loups représentant 27 populations d'Europe, d'Asie et d'Amérique du Nord (Fig. 1) (6). Étant donné que toutes les espèces sauvages du genre *Canis* peuvent se croiser (7) ils sont donc des ancêtres potentiels du chien domestique, cinq coyotes (*Canis latrans*) et deux chacals dorés, deux chacals à dos noir et huit chacals de Simien (*C. aureus*, *C. mesomelas* et *C. simensis*, respectivement) ont également été séquencés.

La région de contrôle des loups et des chiens était très polymorphe (Figure 1). Nous avons trouvé 27 haplotypes de loups qui différaient en moyenne de  $5,31 \pm 0,11$  ( $\pm$  SE) substitutions ( $2,10 \pm 0,04\%$ ), avec un maximum de 10 substitutions ( $3,95\%$ ). La distribution des haplotypes de loups a démontré une spécificité géographique, avec la plupart des localités

contenant des haplotypes uniques à une région particulière (Fig. 1). Quatre haplotypes (W2, W7, W14 et W22) étaient largement répandus. Chez les chiens, 26 haplotypes ont été trouvés. Seul l'haplotype D6 était également présent en Roumanie (W6). La divergence des séquences entre les chiens était similaire à celle observée chez les loups. Les haplotypes de chiens diffèrent en moyenne de  $5,30 \pm 0,17$  substitutions ( $2,06 \pm 0,07\%$ ), avec une divergence maximale de 12 substitutions (4,67%). La diversité des haplotypes mitochondriaux chez les chiens n'a pas pu être répartie en fonction des races. Par exemple, chez huit bergers Allemands examinés, cinq séquences distinctes ont été trouvées, et chez six golden retrievers, quatre séquences ont été détectées. Par exemple, les haplotypes D4, D3, D5 et D1 ont été trouvés dans 14, 14, 9 et 7 races, respectivement. Aucune séquence de chien ne diffère d'une séquence de loup par plus de 12 substitutions, alors que les chiens diffèrent des coyotes et des chacals par au moins 20 substitutions et deux insertions. Ces résultats plaident clairement en faveur d'une ascendance de loup pour les chiens. Cependant, comme l'ADN mitochondrial est transmis par la mère, les croisements entre les chiens femelles et les coyotes ou chacals mâles ne seraient pas détectés. Des études plus limitées sur les marqueurs nucléaires soutiennent la conclusion que le loup est l'ancêtre du chien domestique (8).

Plusieurs méthodes d'analyse phylogénétique, dont le maximum de vraisemblance (9), le maximum de parcimonie (10), les réseaux à portée minimale (11) et la parcimonie statistique (12), ont été utilisées pour étudier les relations entre les séquences. Toutes les analyses ont permis de regrouper les haplotypes de chiens en quatre clades distincts, bien que la topologie à l'intérieur des clades et entre les clades diffère d'un arbre à l'autre (13). Comme l'illustre l'analyse par jointure de voisinage (Figure 2A), trois des quatre clades monophylétiques définissent un clade plus large contenant tous les haplotypes de chiens sauf trois et un sous-ensemble d'haplotypes de loups (W4 et W5). Le **clade I** comprend 19 des 26 haplotypes de chiens. Ce groupe contient des représentants de nombreuses races communes ainsi que des races anciennes telles que le dingó, le chien chanteur de Nouvelle-Guinée, le basenji Africain et le lévrier (14). Le **clade II** comprenait l'haplotype de chien D8, provenant de deux races Scandinaves (elkhound et jámthund), et était étroitement lié à deux haplotypes de loups trouvés en Italie, en France, en Roumanie et en Grèce (W4 et W5). Le **clade III** contenait trois haplotypes de chiens (D7, D19 et D21) trouvés dans une variété de races telles que le berger Allemand, le husky Sibérien et le chien sans poil Mexicain. Enfin, le **clade IV** contenait trois haplotypes (D6, D10 et D24) identiques ou très similaires à un haplotype de loup (W6) trouvé en Roumanie et dans l'ouest de la Russie, ce qui suggère une hybridation récente entre chiens et loups. De nombreuses races contenaient des représentants de plus d'un groupe d'haplotypes de chiens (Fig. 1).

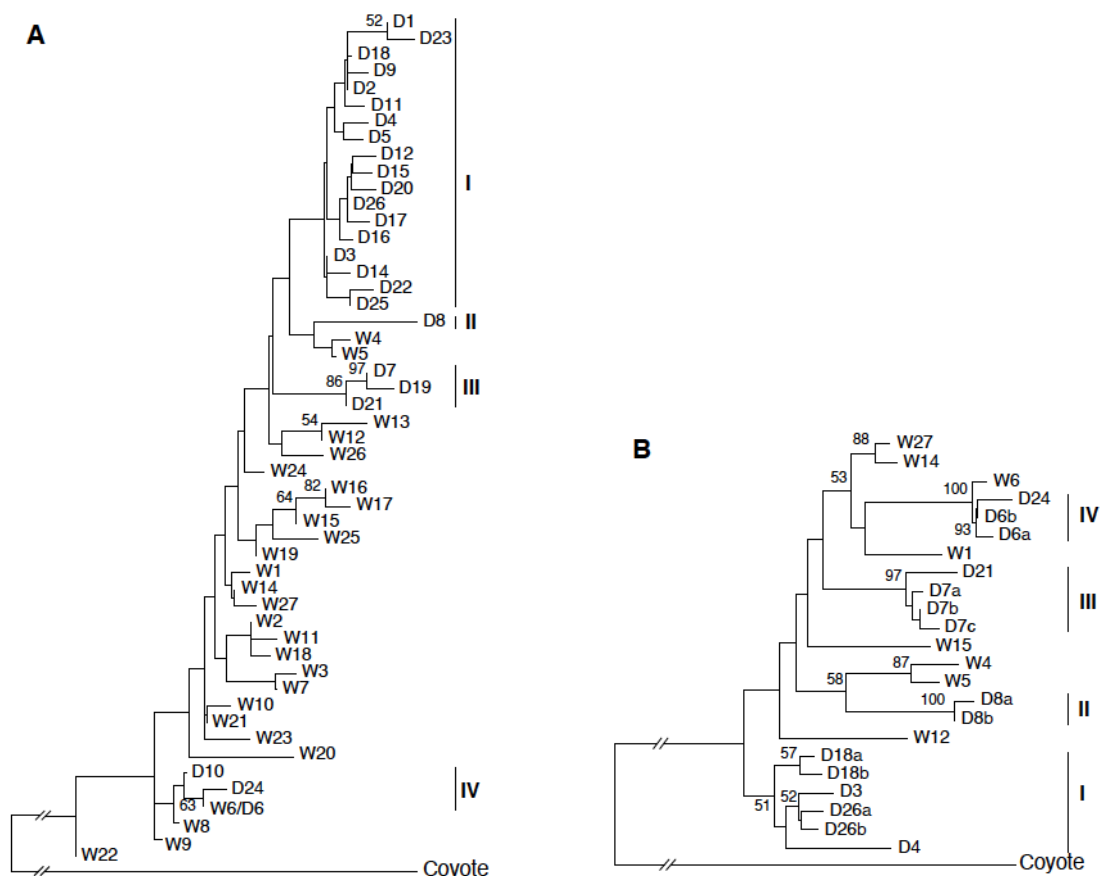
Comme le support bootstrap global pour de nombreux inter-nodes de la Figure 2A était faible, 1030 pb de la région de contrôle ont été séquencés pour 24 canidés, y compris des représentants des quatre clades de chiens (15). Bien que l'association des clades soit différente, les analyses des séquences plus longues ont fourni un support plus fort pour les quatre groupements monophylétiques d'haplotypes de chiens (Fig. 2B) (13). Un test de Wilcoxon a été utilisé pour évaluer la monophylie des clades de chiens (16). La monophylie de tous les haplotypes de chiens peut être rejetée, et la monophylie des clades I, II et III est marginalement rejetée ( $P = 0,0004$  et  $P = 0,053$ , respectivement). Dans les deux arbres, les clades II et IV d'haplotypes de chiens sont les plus étroitement liés aux séquences de loups d'Europe de l'Est (Grèce, Italie, Roumanie et Russie occidentale).

```

11111111111111111111112222222222222222
2357900125667888889999000001112222233
52549745157470345674569146890371246739
W12 AT-CCTC-TAATTT--TTGTCCTGCCGATAATATGATT
W1  .....C.....A...T.....G...A...
W2  .....G..C.....A...A.....G...A...
W3  .....G.....A.T.CA.....G...A...
W4  .....C.C.....C.A...CA.....C...
W5  .....C.....C.A...A?...C.....
W7  .....G.....A.T.CA?...A.....
W8  .....CA...A.T...G...A...
W9  .....CA...A.T.....A...
W10 .....C.....A...A.....A...
W11 .....G..C.....A...A.....GC..A...
W13 .....C.....C.....
W14 .....C.....A...A.....G...A...
W15 .....C..C.T...CA?...A...
W16 .....C.....C.T...CAT.....A...
W17 .....C.....C?...C.T...CAT.....A...
W18 .....G..C.....A...A...GG...A...
W19 .....C.....A...CA?...A...
W20 .....C.....CCA.T.....A.C.
W21 .....C.....A...A.....A...
W22 .....CA...CA.T.....A...
W23 .....C.....A...A.....G.G.A...
W24 .....C.....A...A.....G...
W25 .....C..C.ACT.CA.....A...
W26 .....C.....A.T.....?
W27 .....G.....C.....A...A.....G...A...
W6/D6 .....CA...A.T...GG...A...
D10  .....C.....C..CA...A.T...GG...A...
D24  .....G...CA...A.T...GG...A...
D7   .....T.....C..C.A...A...G...C...
D19  .....T.T.....C..C.A...A...G...C...
D21  .....T.....C..C.A...A...C...
D8   .....C.....C...A...CA.TA.CGG.....
D1   G..T.C.....C.....A.....
D2   G...?C.....C.....A.....
D3   G...C.....C.....A...A.....
D4   G...C.....C.....AC.....
D5   G...C.....C.....AC...A...T.....
D9   G...C.....C.....A...T.....
D11  G...C.....C.....A.....G.....
D12  G...C.....G..C.....A...A...T.....
D14  G...C.....G..C.....A...A.....
D15  GC...C.....C.....A...A...T.....
D16  G...C.....C.....A...CA...T.....
D17  G...C.....C.....A...A...T...G...
D18  G...C.....C.....A.....A...
D20  G...C.....C.....A...A...G.T.....
D22  G...C.....C.....A.T.A.....C...
D23  G..T.C.....C.....A.....G...
D25  G...C.....C.....A.T.A.....
D26  G...C.....C.....A...A...T.....

```

**Fig. 1.** Substitutions et délétions (-) observées dans 261 pb de la séquence de la région de contrôle chez le loup (W) et le chien (D). La séquence du chien D13 avait la même séquence que D4, à l'exception d'une insertion d'une répétition en tandem de 67 pb. Les chiffres I, II, III et IV indiquent les assignations aux quatre clades de séquences de chiens. Localités du loup : Bulgarie (n = 1, W7) ; Croatie (n = 5, W2) ; Estonie (n = 1, W10) ; France (n = 2, W4) ; Finlande (n = 2, W10) ; Grèce (n = 7 ; W2, W5, W8, et W9) ; Italie (n = 12, W4) ; Pologne (n = 1, W3) ; Portugal (n = 19 ; W1 et W2) ; Roumanie (n = 4 ; W5 et W6) ; Russie (n = 3 ; W6, W10, et W26) ; Espagne (n = 46 ; W1 et W3) ; Suède (n = 2 ; W2 et W10) ; Afghanistan (n = 3, W18) ; Chine (n = 3 ; W14, W19 et W27) ; Inde (n = 1, W12) ; Iran (n = 6 ; W16 et W17) ; Israël (n = 16, W11) ; Arabie Saoudite (n = 7 ; W7, W12, W13, W14 et W15) ; Turquie (n = 2, W2) ; Alaska (n = 3, W20) ; Alberta (n = 1, W22) ; Labrador (n = 3, W22) ; Mexique (n = 5, W25) ; Montana (n = 1, W22) ; Territoires du Nord-Ouest (n = 3, W22) ; et Yukon (n = 3 ; W21, W23, et W24). Races de chiens : basenji (n = 1, D2) ; basset (n = 1, D6) ; boxer (n = 1, D4) ; buhund Norvégien (n = 1, D1) ; bulldog (n = 1, D6) ; chinois à crête (n = 2 ; D2 et D25) ; chow chow (n = 3 ; D1, D2 et D3) ; colley (n = 1, D1) ; border collie (n = 3 ; D1 et D5) ; teckel à poil dur (n = 3 ; D5 et D10) ; dingo Australien (n = 4, D18) ; elkhound norvégien gris (n = 9 ; D3 et D8) ; chien esquimau (n = 1, D23) ; berger allemand (n = 8 ; D4, D5, D6, D7 et D19) ; lévrier (n = 1, D9) ; groenendael (n = 1, D6) ; Mexican hairless (n = 6 ; D3, D6, D21, et D26) ; hamilton stövare (n = 1, D5) ; Afghanistan hound (n = 3, D6) ; Alaskan husky (n = 2 ; D4 et D7) ; Siberian husky (n = 3 ; D3, D7 et D18) ; jämthund (n = 3 ; D7 et D8) ; keeshond (n = 1, D5) ; kuvasz (n = 1, D4) ; Leonberger (n = 2 ; D1 et D4) ; Norvégien (n = 1, D16) ; Mareema (n = 1, D56) ; mastiff des Pyrénées (n = 1, D11) ; Terre-Neuve (n = 1, D4) ; otter hound (n = 1, D6) ; papillon (n = 2 ; D3 et D4) ; caniche (n = 1, D3) ; caniche jouet (n = 1, D6) ; carlin (n = 1, D26) ; Chesapeake Bay retriever (n = 1, D13) ; flat-coated retriever (n = 3 ; D4 et D10) ; golden retriever (n = 6 ; D4, D6, D15 et D24) ; labrador retriever (n = 6 ; D4 et D12) ; Rhodesian ridgeback (n = 1, D26) ; rottweiler (n = 2, D3) ; Samoyede (n = 3 ; D1, D4 et D5) ; St. Bernard (n = 1, D9) ; schipperke (n = 1, D4) ; schnauzer géant (n = 3 ; D4 et D7) ; schnauzer miniature (n = 1, D9) ; setter anglais (n = 4 ; D3 et D5) ; setter Irlandais (n = 3 ; D1 et D9) ; chien chanteur de Nouvelle-Guinée (n = 2, D18) ; shar (n = 1, D26) ; chien de berger Islandais (n = 1, D3) ; chien de berger de l'ancienne Angleterre (n = 1, D5) ; shiba inu (n = 1, D20) ; épagneul Cavalier King Charles (n = 1, D17) ; épagneul d'eau Irlandais (n = 1, D6) ; springer spaniel (n = 1, D3) ; épagneul Tibétain (n = 1, D6) ; spitz (n = 1, D22) ; spitz Japonais (n = 1, D3) ; airedale terrier (n = 1, D7) ; border terrier (n = 2, D3) ; fox terrier (n = 2 ; D3 et D14) ; Norfolk terrier (n = 2, D4) ; West Highland terrier (n = 2, D7) ; Tibetan terrier (n = 2 ; D2 et D9) ; wachtelhund (n = 1, D5) ; whippet (n = 1, D3) ; Irish wolfhound (n = 2, D11) ; et croisements (n = 5 ; D1, D3, D4, D5, et D18)



**Fig. 2.** (A) Arbre de jonction de voisinage des haplotypes de loups et de chiens (D13 exclu ; voir Fig. 1) basé sur 261 pb de la séquence de la région de contrôle (17). (B) Arbre de jonction des voisins de 8 génotypes de loups et de 15 génotypes de chiens, basé sur 1030 pb de la séquence de la région de contrôle. Les suffixes a, b et c après les étiquettes d'haplotypes ont été utilisés pour distinguer les séquences identiques de 261 pb qui ont des séquences différentes de 1030 pb. Le support bootstrap est indiqué aux nœuds s'ils sont trouvés dans plus de 50% des 10 000 boot straptrees

Le coyote et le loup ont une divergence de séquence de  $0,075 \pm 0,002$  (17) et se sont séparés il y a environ un million d'années, selon les estimations des archives fossiles (18). Par conséquent, la divergence de séquence entre les génotypes les plus différents du clade I (le groupe le plus diversifié de séquences de chiens) n'étant pas supérieure à 0,010, cela implique que les chiens pourraient être apparus il y a 135 000 ans (19). Bien que ces estimations puissent être gonflées par des substitutions multiples non observées sur des sites hypervariables (20), la divergence des séquences au sein du clade I implique clairement une origine plus ancienne que les 14 000 ans avant le présent suggérés par les données archéologiques (21). Néanmoins, des ossements de loups ont été trouvés en association avec ceux d'hominidés dès le milieu du Pléistocène, il y a jusqu'à 400 000 ans (1, 22). Les dates anciennes de domestication basées sur les séquences de la région de contrôle ne peuvent s'expliquer par le maintien de lignées ancestrales de loups, car la classification I est exclusivement monophylétique par rapport aux séquences de chiens et, par conséquent, la séparation entre les chiens et les loups a été suffisamment longue pour que la coalescence ait eu lieu. Pour expliquer cette divergence, nous émettons l'hypothèse que les premiers chiens domestiques n'étaient peut-être pas morphologiquement distincts de leurs parents sauvages. Il est concevable que le passage, il y a environ 10 000 à 15 000 ans, de sociétés de chasseurs nomades à des centres de population agricole plus sédentaires ait imposé aux chiens de nouveaux régimes sélectifs qui se sont traduits par une divergence phénotypique marquée avec les loups sauvages (23).

Bien que les races individuelles présentent une uniformité en ce qui concerne le comportement et la morphologie, la plupart des races témoignent d'un héritage génétiquement diversifié, car elles contiennent des haplotypes différents. En outre, les séquences de chiens sont regroupées avec différents groupes d'haplotypes de loups. Par conséquent, après l'origine des chiens à partir d'un ancêtre loup, il est possible que les chiens et les loups aient continué à échanger des gènes. Les rétrocroisements pourraient avoir fourni une partie de la matière première pour la sélection artificielle et pour l'extraordinaire degré de diversité phénotypique du chien domestique. Les espèces domestiques de plantes et d'animaux dont les progéniteurs sauvages sont éteints ne peuvent pas être enrichies par des croisements périodiques, et les changements dus à la sélection artificielle peuvent être plus limités.

## REFERENCES AND NOTES

1. J. Clutton-Brock, in *The Domestic Dog, Its Evolution, Behaviour and Interactions with People*, J. Serpell, Ed. (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1995), pp. 7–20.
2. S. J. Olsen and J. W. Olsen, *Science* **197**, 533 (1977).
3. J. Clutton-Brock, *A Natural History of Domesticated Mammals* (Cambridge Univ. Press, British Museum of Natural History, Cambridge, 1987).
4. F. E. Zeuner, *A History of Domesticated Animals* (Harper & Row, New York, 1963); H. Epstein, *The Origin of the Domestic Animals of Africa* (Africana Publishing, New York, 1971); I. L. Brisbin Jr., *Am. Kennel Gaz.* January 1976, p. 23.
5. C. Saccone, M. Attimonelli, E. Sbisà, *J. Mol. Evol.* **26**, 205 (1987).
6. DNA from blood, tissue, or hair was isolated by cell lysis followed by organic solvent purification. A 261-bp control region fragment was sequenced from a slightly larger (394 bp) fragment amplified with primers L15910 and H16498 [R. DeSalle, A. K. Williams, M. George, *Methods Enzymol.* **224**, 176 (1993)]. See polymerase chain reaction and sequencing conditions and protocols in J. E. Maldonado, F. O. Davila, B. S. Stewart, E. Geffen, R. K. Wayne, *Mar. Mamm. Sci.* **11**, 46 (1995).
7. A. P. Gray, *Mammalian Hybrids, a Check-list with Bibliography* (Farnham Royal, Bucks, Commonwealth Agricultural Bureaux, UK, 1954).
8. D. Gottelli *et al.*, *Mol. Ecol.* **3**, 301 (1994); J. Garcia-Moreno, M. D. Matocq, M. S. Roy, E. Geffen, R. K. Wayne, *Conserv. Biol.* **10**, 376 (1996); P.W. Hedrick, P. S. Miller, E. Geffen, R. K. Wayne, *Zoo Biol.* **16**, 47 (1997).
9. K. Strimmer and A. von Haessler, *Mol. Biol. Evol.* **13**, 964 (1996).
10. D. L. Swofford, *PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.0* (Illinois Natural History Survey, Champaign, IL, 1990).
11. L. Excoffier, P. E. Smouse, J. M. Quattro, *Genetics* **131**, 479 (1992).
12. A. R. Templeton, K. A. Crandall, C. F. Sing, *ibid.* **132**, 619 (1992).
13. The coyote was used as an outgroup on the basis of morphologic and mitochondrial DNA sequence analyses [R. M. Nowak, *North American Quaternary Canis* (Monograph of the Museum of Natural History, University of Kansas, N 6, Lawrence, KS, 1979); R. K. Wayne, *Trends Genet.* **6**, 218 (1993); C. Vilà *et al.*, unpublished data]. Trees retaining the four indicated clades resulted from neighbor-joining searches with Tamura-Nei, Kimura 2-parameter, Kimura 3-parameter, and HKY85 models of evolution; parsimony searches with equal, 2:1, and 10:1 weights of transversions to transitions; and maximum likelihood analyses with the HKY85 model of evolution, taking into account differences in nucleotide frequencies and transition and transversion biases.

14. R. Coppinger and R. Schneider, in *The Domestic Dog, Its Evolution, Behaviour and Interactions with People*, J. Serpell, Ed. (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1995), pp. 21–47.
15. We amplified the entire canid control region with primers in (6) and the following primers: L16462 (5'-CATACTAACGTGGGGTTAC-3'), H222 (5'-AACTATATGTCCTGAAACC-3'), L296 (5'-ATA-CAAACCCCTTACC-3'), and H652 (5'-AAG-GCTAGGACCAAACCT-3'). The primer numbering refers to their approximate location in the human mitochondrial genome [S. Anderson *et al.*, *Nature* **290**, 457 (1981)]. The 1030-bp sequence that we report includes the entire control region except for a hypervariable region close to the 3' end that encompasses an imperfect 20-bp repeat having a variable number of units [A. R. Hoelzel, J. V. Lopez, G. A. Dover, S. J. O'Brien, *J. Mol. Evol.* **39**, 191 (1994)].
16. A. R. Templeton, *Evolution* **37**, 221 (1983).
17. Sequence divergence values and trees were based on a gamma correction [K. Tamura and M. Nei, *Mol. Biol. Evol.* **10**, 513 (1993)] with the empirically determined parameter  $a = 0.18$  for the 261-bp sequences and  $a = 0.22$  for the 1030-bp sequences [S. Kumar, K. Tamura, M. Nei, *MEGA: Molecular Evolutionary Genetic Analysis, Version 1.01* (Pennsylvania State University, University Park, PA, 1993)].
18. R. K. Wayne, B. Van Valkenburgh, S. J. O'Brien, *Mol. Biol. Evol.* **8**, 297 (1991).
19. A relative rate test indicated that substitution rates were similar for all wolf and dog sequences [F. Tajima, *Genetics* **135**, 599 (1993)].
20. T. J. Parsons *et al.*, *Nature Genet.* **15**, 363 (1997).
21. G. Nobis, *Umshau* **19**, 610 (1979); S. J. Olsen, *Origins of the Domestic Dog* (University of Arizona Press, Tucson, AZ, 1985).
22. M. E. Thurston, *The Lost History of the Canine Race. Our 15,000-Year Love Affair with Dogs* (Andrews & McMeel, Kansas City, KS, 1996).
23. D. F. Morey, *Am. Sci.* **82**, 336 (1994).
24. We thank P. Taberlet for providing wolf sequences from France and Poland and J. Castroviejo, Grupo Lobo-Portugal, E. Geffen, and many others for their help in obtaining samples. C.V. was supported by a postdoctoral fellowship from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia, and I.R.A. was supported by a fellowship from Junta Nacional de Investigaçao Científica e Tecnológica, Portugal. This research was supported in part by NSF grants to R.L.H. (DEB-9208022) and R.K.W. (BSR-9020282) and by a Sloan Young Investigator Award to K.A.C.