

Dispersion à longue distance d'un loup, *Canis lupus*, dans le nord-ouest de l'Europe

Mamm Res
DOI 10.1007/s13364-015-0220-6 Mamm Res 60, 163–168 (2015)

SHORT COMMUNICATION

Long-distance dispersal of a wolf, *Canis lupus*, in northwestern Europe

Liselotte Wesley Andersen · Verena Harms · Romolo Caniglia ·
Sylwia D. Czarnomska · Elena Fabbri · Bogumiła Jędrzejewska ·
Gesä Kluth · Aksel Bo Madsen · Carsten Nowak · Cino Pertoldi ·
Ettore Randi · Ilka Reinhardt · Astrid Vik Stronen

Résumé

Plusieurs espèces de mammifères ont recolonisé leurs aires de répartition historiques à travers l'Europe au cours des dernières décennies. En Novembre 2012, un canidé ressemblant à un loup a été retrouvé mort dans le parc national de Thy (56° 56' N, 8° 25' E) dans le Jutland, au Danemark. L'ADN de cet individu et de neuf loups Allemands a été génotypé à l'aide d'un panel pangénomique de 22,163 marqueurs de polymorphisme nucléotidique simple (SNP) canin et comparé aux profils existants basés sur le même panel de marqueurs obtenus à partir de loups du nord-est de la Pologne (n = 13), de chiens domestiques (n = 13) et d'hybrides loup-chien connus (n = 4). Le canidé Thy a été confirmé comme étant un loup de la population de l'ouest de l'Allemagne Polonaise, à environ 800 km au sud-est. L'accès à la base de données de référence Allemande sur les profils ADN basés sur 13 microsatellites autosomiques de loups Allemands a permis de déterminer l'origine exacte de la meute du loup de Thy en Saxe, en Allemagne. Il s'agit de la première observation documentée d'un loup au Danemark depuis 200 ans et d'un autre exemple de déplacement à longue distance d'un carnivore.

INTRODUCTION

Au cours des dernières décennies, les populations de plusieurs espèces de mammifères qui avaient décliné dans le passé en raison de diverses pressions anthropogéniques (Rosser et Mainka 2002) ont commencé une recolonisation progressive de leurs aires de répartition historiques à travers l'Europe (Chapron et al. 2014). Les loups (*Canis lupus*), par exemple, étaient historiquement répartis dans toute l'Europe, mais de nombreuses populations ont décliné vers l'extinction aux XVIII^{ème} et XIX^{ème} siècles, principalement en raison de la persécution et de la surexploitation (Randi 2011 et références). Des populations isolées ont survécu en Ibérie et dans le sud de l'Italie, tandis que des populations de loups plus importantes sont restées en Europe orientale (Linnell et al. 2008 ; Kaczensky et al. 2013).

La protection légale stricte des loups, ainsi que le rétablissement des populations de proies naturelles, sont probablement les principales causes du récent rétablissement et de l'expansion de l'aire de répartition des populations de loups Européennes (Chapron et al. 2014 ; Nowak et al. 2011 ; Randi 2011). Les loups de Pologne ont recolonisé l'Allemagne à la fin des années 1990 et étendent désormais leur aire de répartition depuis la première zone centrale établie dans la région

de Lausitz (près de la frontière Polonaise, Fig. 1) vers la Basse-Saxe et le Schleswig-Holstein au nord-ouest (Reinhardt et al. 2013). Des loups se dispersant depuis la région de Lausitz ont également été enregistrés dans d'autres pays comme la Biélorussie (Reinhardt et Kluth 2011). En novembre 2012, la carcasse d'un canidé ressemblant à un loup a été découverte dans le parc national de Thy (56° 58' N, 8° 26' E) dans le Jutland, au Danemark, où les loups sont absents depuis 1813 (Jensen 1993). L'examen morphologique a révélé un canidé mâle mort de causes naturelles. L'objectif de notre analyse était d'identifier 1) l'espèce propre et 2) l'origine géographique de ce canidé. Pour répondre à ces questions, nous avons choisi une approche à l'échelle du génome avec des données provenant d'un panel de marqueurs de polymorphisme nucléotidique simple (SNP) de chiens, *Canis lupus familiaris*. Pour déterminer l'origine géographique, l'Allemagne et le nord-est de la Pologne ont été choisis comme sources possibles sur la base des résultats de l'étude de Czarnomska et al. (2013) qui ont constaté que les loups colonisant l'ouest de la Pologne et l'est de la Germany étaient génétiquement similaires et probablement dérivés des loups du nord-est de la Pologne, un flux génétique continu reliant probablement les régions. Par la suite, des analyses de regroupement avec des échantillons de loups provenant du nord-est de la Pologne et de l'Allemagne, des chiens domestiques et des hybrides loup-chien connus ont été réalisées sur la base de marqueurs SNP, et en outre, nous avons effectué une analyse microsatellite traditionnelle, suivie d'une comparaison avec une base de données de génotypes de loups à la recherche d'une correspondance de profil ADN individuel.

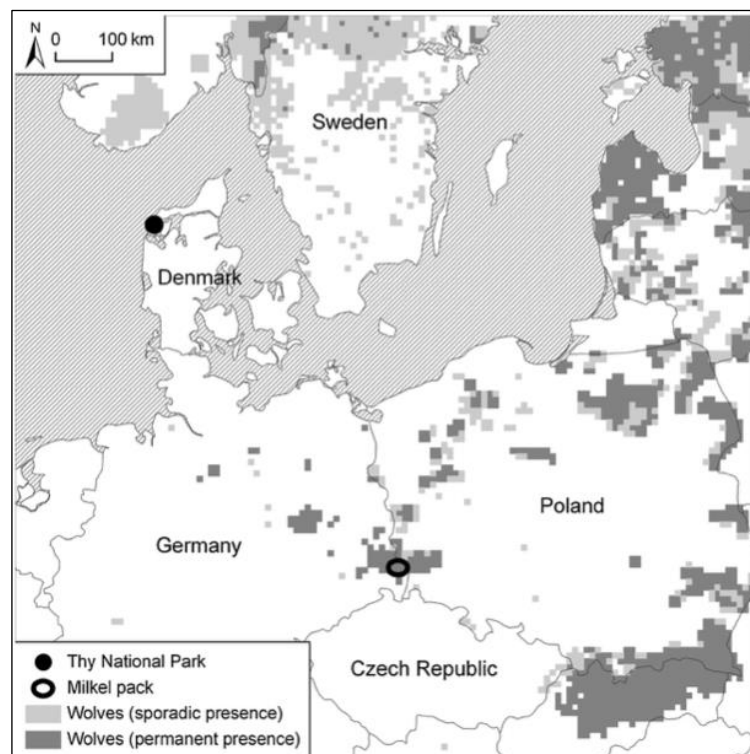


Fig.1 Carte indiquant la présence permanente et sporadique de loups dans le nord-ouest de l'Europe (Kaczensky et al. 2013). Cercle noir : la meute de Milkel dans la région de Lausitz, dans l'est de l'Allemagne ; point noir : parc national de Thy, Danemark.

MATERIEL ET METHODES

Génotypage SNP

Nous avons comparé l'ADN d'un échantillon de tissu du canidé Thy avec les profils génétiques de loups, chiens domestiques et hybrides connus. Les profils de référence comprenaient des loups d'Allemagne (n = 9, analysés dans la présente étude) et principalement du nord-est de la Pologne

(quelques-uns étaient originaires de l'ouest de la Pologne) ($n = 13$), des chiens domestiques ($n = 13$, d'origine Italienne) et des hybrides connus (en captivité) loup mâle \times chien femelle de première génération (F1) ($n = 3$ d'origine italienne) et un hybride allemand (analysé dans la présente étude). Les profils Italiens et Polonais étaient disponibles grâce à des recherches antérieures (Stronen et al. 2013). Les échantillons Polonais ont été sélectionnés dans des zones sources connues de la recolonisation vers l'ouest (ouest et nord-est de la Pologne) (Czarnomska et al. 2013). Les échantillons Allemands ont été obtenus à partir de la base de données de référence génétique pour la surveillance des loups Allemands de l'Institut Senckenberg Research, en Allemagne.

Le génotypage a été réalisé avec la puce Illumina® CanineHD BeadChip avec 170,000 loci SNP (Illumina, Inc. San Diego, CA, USA) chez AROS Applied Biotechnology A/S à Aarhus, Danemark. Les résultats préliminaires ont été examinés pour vérifier la qualité du génotypage comme décrit dans Stronen et al. (2013). PLINK (Purcell et al. 2007) a été utilisé pour fusionner les données de l'individu de Thy et Allemandes avec les échantillons de référence du nord-est de la Pologne et de l'Italie sur la base de 27,353 SNP élagués pour le déséquilibre de liaison (Stronen et al. 2013). L'ensemble de données résultant a été criblé dans PLINK avec les paramètres suivants : fréquence des allèles mineurs $> 0,01$ et taux maximal de manquant par SNP $< 0,02$ (Stronen et al. 2013). L'hétérozygotie observée et attendue et le pourcentage de loci manquants et polymorphes pour les groupes de population de loups ont été estimés avec PLINK et R 2.15.1 (R Development Core Team 2008). La structure de la population a été examinée par des analyses en composantes principales (ACP) réalisées avec le paquet Adegenet (Jombart 2008) dans R (www.r-project.org ; R Development Core Team 2008).

Analyse microsatellite

L'ADN extrait de l'échantillon de tissu du canidé de Thy a été amplifié avec 13 loci microsatellites autosomiques non liés couramment utilisés dans les études de génétique du loup : CPH5 (Fredholm et Winterø 1995) ; FH2001, FH2010, FH2017, FH2054, FH2087, FH2088, FH2097, FH2137, FH2040 et FH2161 (Francisco et al. 1996) ; vWF (Shibuya et al. 1994) ; et PEZ17 (Neff et al. 1999).

Trois PCR multiplex ont été réalisées dans des réactions de 10- μ l contenant le mélange maître HotStarTaq (Qiagen), 0,2 μ M de chaque amorce, 2 ng de BSA et de l'ADN génomique. Les PCR ont été réalisées dans un thermocycleur T1 plus (Biometra GmbH) avec une étape de dénaturation initiale de 95° C pendant 3 min, suivie de 5 cycles de 94° C pendant 30s, 60° C pendant 90s et 72° C pendant 60s ; 5 cycles supplémentaires de 94° C pendant 30 s, 58° C pendant 90 s et 72° C pendant 60 s ; 5 cycles de 94° C pendant 30 s, 54° C pendant 90 s et 72° C pendant 60 s ; 20 cycles de 94° C pendant 30 s, 54° C pendant 90 s et 72° C pendant 60 s ; et une extension finale de 72° C pendant 30 min. Les produits de la PCR ont été soumis à une électrophorèse sur un analyseur d'ADN ABI3730 (Life Technologies). Le génotype multilocus résultant a été comparé à la base de données de référence génétique pour la surveillance des loups Allemands à l'Institut de recherche Senckenberg, en Allemagne.

RESULTATS

Nous avons obtenu des profils individuels basés sur 22,163 SNP, qui ont été utilisés dans des analyses ultérieures. Pour les individus Thy et Allemands, au moins 95 % des SNP partagés ont été appelés pour chaque canidé. Le pourcentage de loci manquants était plus élevé chez les individus du nord-est de la Pologne (0,24) que chez les individus Allemands (0,06). L'hétérozygotie et le

pourcentage de loci polymorphes (P) observés (HO) et attendus (HE) étaient plus élevés chez les individus échantillonnés principalement dans le nord-est de la Pologne (HO = 0,2644 (SE 0,001), HE = 0,2576 (SE 0,001), P = 82,6) qu'en Allemagne (HO = 0,2167 (SE 0,001), HE = 0,1827 (SE 0,001), P = 55,4). Pour les loups du nord-est de la Pologne et de l'Allemagne, aucun des loci ne s'écartait significativement des attentes de Hardy-Weinberg après une correction globale de Bonferroni (Rice 1989) pour les comparaisons multiples (seuil de P = 0,05) (données non présentées).

Le canidé de Thy s'est clairement regroupé avec les loups dans l'ACP et spécifiquement parmi les individus échantillonnés en Allemagne (Fig. 2). Les loups du nord-est de la Pologne se distinguaient clairement des loups Allemands analysés. En revanche, comme prévu, les hybrides connus se sont regroupés dans des positions intermédiaires entre les loups et les chiens domestiques. De plus, un individu échantillonné en Allemagne s'est regroupé avec les loups échantillonnés dans le nord-est de la Pologne.

La comparaison du génotype multilocus par microsatellite a révélé une correspondance parfaite du canidé de Thy avec l'un des individus connus de la base de données des génotypes de loups Allemands, un mâle identifié en Saxe. Une analyse génétique antérieure (données non montrées) a identifié cet individu comme étant la progéniture de la meute de Milkel dans la région de Lausitz, la zone centrale de la distribution du loup en Allemagne.

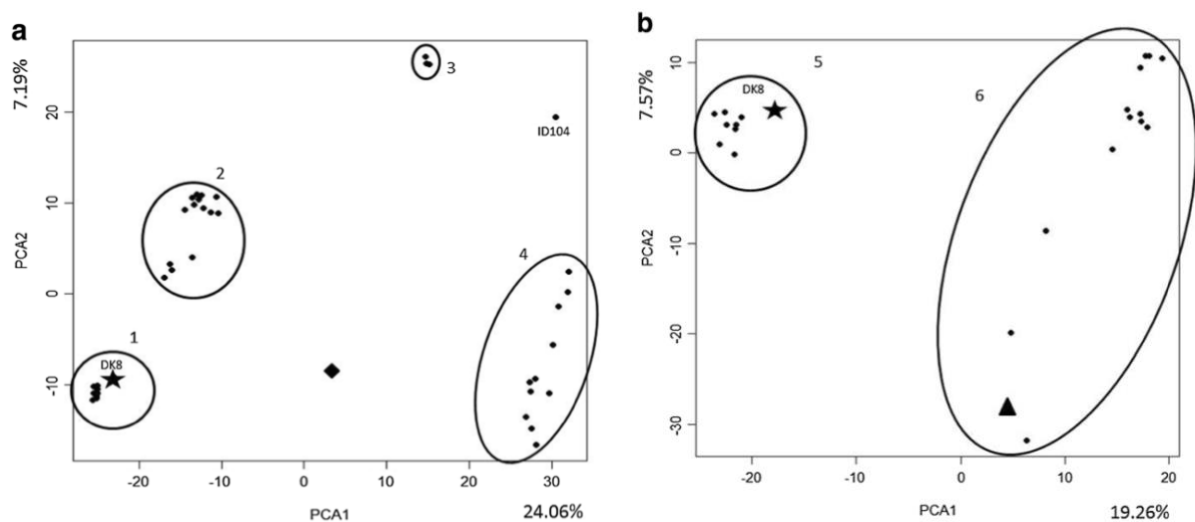


Fig.2 a = Analyse en composantes principales (ACP) des loups, chiens domestiques et hybrides d'Allemagne et du nord-est de la Pologne, basée sur 22,163 SNP, montrant le regroupement de **l'individu Danois. Étoile DK8**. 1 = loups Allemands, 2 = loups du nord-est de la Pologne, 3 = hybrides et 4 = chiens domestiques. ID104 (chien Italien aberrant) pourrait être un hybride loup-chien × chien rétrocroisé. Diamant = Hybride loup-chien allemand. **b** ACP sans les chiens domestiques et les hybrides ; 5 = loups allemands, 6 = loups du nord-est de la Pologne et triangle loup Allemand

DISCUSSION

Nos résultats SNP ont permis d'identifier sans ambiguïté le canidé Thy comme un loup sauvage, probablement originaire de la population Germano-ouest Polonaise (Lausitz-Bas-Silésie) et représentant le premier loup signalé au Danemark depuis plus de 200 ans. Les loups du nord-est de la Pologne et de l'Allemagne présentaient une hétérozygotie observée supérieure à celle attendue, mais l'écart était plus important chez les loups Allemands et semblait cohérent avec un effet

fondateur. Cependant, un échantillon Allemand semblait avoir une origine Polonaise plus au nord-est, ce qui suggère un événement d'immigration récent.

Il n'y avait aucune indication **d'ascendance** de chien domestique chez le loup de Thy ni chez d'autres loups d'Allemagne. Cependant, l'occurrence passée connue d'un hybride Allemand et différents rapports d'Europe du Nord (par exemple Hindrikson et al. 2012 ; Stronen et al. 2013), d'Italie (Caniglia et al. 2014 ; Randi et al. 2014), d'Espagne (Godinho et al. 2011) et d'Amérique du Nord (Monzón et al. 2014) suggèrent qu'une surveillance continue des hybrides est nécessaire. **Les loups et les chiens présentent une différenciation claire avec des profils SNP à l'échelle du génome** (par exemple, vonHoldt et al. 2011), et il est peu probable que l'utilisation d'échantillons de référence de chiens Italiens ait limité la capacité à identifier les hybrides.

Les méthodes génomiques modernes représentent de nouveaux outils puissants pour l'identification et le suivi des organismes sauvages. Cependant, l'interprétation des données ultérieures à haute résolution doit être faite avec prudence. Il est important de déterminer si les groupes génétiques représentent des groupes familiaux (c'est-à-dire des meutes de loups) ou des niveaux plus élevés de structure de population tels que des sous-populations ou des populations distinctes. Le cas présent suggère que les loups Allemands étaient génétiquement différents des loups du nord-est de la Pologne ; cependant, la taille limitée de l'échantillon ne permet pas de déterminer si cela est dû à des événements familiaux/fondateurs ou à des sous-populations réelles. Notre capacité à confirmer que le canidé de Thy était un loup sauvage (non hybridé) de la population d'Allemagne et de l'ouest de la Pologne a été facilitée par la disponibilité de tissus de haute qualité après la découverte de l'individu mort. Cependant, les nouvelles méthodes génomiques non invasives (par exemple, Kraus et al. 2014) représentent des contributions importantes à l'élucidation des mouvements de la faune sauvage (Deinet et al. 2013).

Le profil génétique basé sur 13 marqueurs microsatellites, combiné aux observations de terrain, a montré que le loup de Thy avait des parents de premier ordre (père et frère) dans la meute de Milkel de la région de Lausitz (données non montrées). Ce résultat a permis de localiser l'origine du loup de Thy et a corroboré le résultat de l'analyse SNP, qui a été effectuée avant l'accès à la base de données de référence Allemande. De plus, le **profil** d'ADN microsatellite obtenu a été localisé dans le nord de l'Allemagne à la mi-2012, quelques mois avant que le loup ne soit trouvé mort à Thy, au Danemark, ce qui suggère que le loup de Thy a atteint le Danemark par **dispersion active** (Harms, communication personnelle).

Une revue récente (Chapron et al. 2014) sur le rétablissement des grands carnivores en Europe considère que la coexistence actuelle des humains et des grands carnivores est aujourd'hui le résultat de l'effort de conservation conjoint des pays au cours des trois dernières décennies. Le loup s'est reconstitué pour atteindre environ 12 000 individus en Europe. Ceci est, en partie, le résultat de la capacité de l'espèce à coloniser une gamme variée d'habitats modifiés par l'homme, ce qui reflète son haut degré d'adaptabilité.

Les propensions du loup à se disperser sur de longues distances nécessitent des recherches anticipées telles que la reconnaissance et la modélisation d'habitats appropriés au Danemark, comme l'ont fait Fechter et Storch (2014) pour les loups en Allemagne et Jędrzejewski et al. (2008) pour la Pologne occidentale. Cette dernière étude a révélé que les loups peuvent s'installer rapidement dans les zones prédites comme de bons habitats potentiels pour ce grand carnivore.

Les analyses de **perméabilité** du paysage identifiant les facteurs susceptibles de déterminer les voies de migration pour la dispersion sur de longues distances (par exemple, Huck et al. 2011) seraient également d'une grande importance, notamment dans les pays d'Europe occidentale dotés d'une infrastructure de transport dense.

Le nombre de loups et leur rôle écologique en tant que prédateurs sont actuellement limités au Danemark et à l'Allemagne. Pourtant, et c'est important, le loup est une espèce indigène qui a historiquement fait partie de l'écosystème et semble jouer un rôle clé dans les pays voisins où sa fonction écologique a persisté dans le temps (Kuijper et al. 2013). Alors qu'il est bien établi que les loups d'Europe du Nord parcourent occasionnellement >1000 km (Wabakken et al. 2007), cette première observation de loups au Danemark depuis 1813 (Jensen 1993) représente un exemple passionnant de recolonisation par la faune indigène d'aires de répartition historiques dont elle a été absente pendant des siècles. Des tendances identiques d'une dispersion rapide et continue des loups (Giucci et al. 2009 ; Duchamp et al. 2012) sont observées dans d'autres pays d'Europe occidentale et centrale, dont la France et l'Allemagne.