

Structuration concordante de l'ADN mitochondrial et microsatellite entre les loups des plaines Polonaises et des montagnes des Carpates

Conserv Genet (2013) 14:573–588
DOI 10.1007/s10592-013-0446-2

RESEARCH ARTICLE

Concordant mitochondrial and microsatellite DNA structuring between Polish lowland and Carpathian Mountain wolves

Sylvia D. Czarnomska · Bogumiła Jędrzejewska · Tomasz Borowik · Magdalena Niedziałkowska · Astrid V. Stronen · Sabina Nowak · Robert W. Mysłajek · Henryk Okarma · Maciej Konopiński · Małgorzata Pilot · Wojciech Śmietana · Romolo Caniglia · Elena Fabri · Ettore Randi · Cino Pertoldi · Włodzimierz Jędrzejewski

Résumé

Les études phylogéographiques des grands carnivores très mobiles suggèrent que la différenciation génétique intraspécifique des espèces modernes pourrait être la conséquence de la glaciation pléistocène la plus récente. Cependant, l'influence relative des processus **biogéographiques** et de la fragmentation des populations induite par l'homme nécessite une meilleure compréhension. La Pologne représente la limite occidentale des distributions relativement continues de nombreuses espèces à large spectre, par exemple le lynx (*Lynx lynx*), les loups (*Canis lupus*), l'élan (*Alces alces*) et, par conséquent, une zone clé pour comprendre les modèles historiques et contemporains de flux génétique en Europe centrale. Nous avons examiné la structure génétique du loup en Pologne et dans une zone récemment recolonisée en Allemagne de l'Est en utilisant des profils microsatellites ($n = 457$) et le séquençage de l'ADN mitochondrial (ADNmt, $n = 333$) à partir d'échantillons fécaux. Nous avons trouvé une structure génétique significative et des niveaux élevés de différenciation entre les loups des Carpates et des plaines Polonaises. Nos résultats sont cohérents avec la subdivision de l'ADNmt précédemment rapportée entre les plaines du nord et les montagnes du sud, et ajoutent de nouveaux résultats concordants basés sur la variation des marqueurs autosomiques. Les loups de l'ouest de la Pologne et de l'est de l'Allemagne ont montré une différenciation limitée par rapport au nord-est de la Pologne. Bien que la présence d'allèles privés suggère une immigration également à partir de zones non échantillonnées dans cette étude, la plupart des individus semblent être des immigrants du nord-est de la Pologne ou leurs descendants. Nous avons observé une différenciation génétique modérée entre certaines régions de plaine du nord-est séparées par moins de 50 km. De plus, les résultats de l'ADNmt indiquent une sous-population du sud-est près de la frontière avec l'Ukraine. La structure observée pourrait refléter la fragmentation du paysage et / ou des différences logiques résultant de la dispersion natale basée sur l'habitat.

INTRODUCTION

Les glaciations du Pléistocène ont eu de profondes répercussions sur les processus biogéographiques tels que les distributions, la fragmentation des populations et le flux génétique des espèces sauvages (par exemple Taberlet et al. 1998 ; Hewitt 2000). Les données relatives aux

grands carnivores très mobiles indiquent une faible structuration phylogéographique avant le dernier maximum glaciaire, ce qui suggère que les distributions actuelles de lignées génétiques distinctes sont apparues à la suite de la glaciation la plus récente (Hofreiter et al. 2004). Cependant, l'activité humaine qui a suivi a entraîné une fragmentation supplémentaire et plus récente des populations d'espèces telles que l'ours brun européen (*Ursus arctos*) (Zedrosser et al. 2001), le lynx eurasien (*Lynx lynx*) (Schmidt et al. 2011) et le loup canadien (*Canis lupus*) (Stronen et al. 2012). La mesure dans laquelle les processus biogéographiques historiques et la fragmentation récente induite par l'homme ont contribué à façonner les sous-divisions génétiques des populations actuelles chez les taxons vagiles nécessite une compréhension plus approfondie.

Une transition écologique abrupte entre les grandes plaines Européennes et les Carpates se produit dans le sud de la Pologne. Ces régions représentent des zones de contact potentielles entre des lignées génétiquement divergentes d'organismes qui ont recolonisé l'Europe centrale au cours de l'Holocène à partir de différents **refuges glaciaires** dans les Balkans, les Carpates et dans d'autres parties de l'Europe de l'Est (Bhagwat et Willis 2008 et leurs références). Les exemples incluent l'épicéa de Norvège *Picea abies* (Tollefsrud et al. 2008), le campagnol roussâtre *Myodes glareolus* (Wojcik et al. 2010), et le cerf élaphe *Cervus elaphus* (Niedzialkowska et al. 2011). La Pologne représente la limite occidentale des distributions relativement continues d'espèces paléarctiques à large spectre, notamment le lynx (Schmidt et al. 2009), l'élan (*Alces alces*) (Schmolcke et Zachos 2005) et le loup (Jedrzejewski et al. 2010). Certaines de ces populations s'étendent actuellement vers l'ouest, recolonisant des parties de l'Europe centrale [par exemple, l'élan (Schmolcke et Zachos 2005, et les références qui y figurent) ; le loup (Nowak et al. 2011)]. D'autres populations sont géographiquement et peut-être génétiquement isolées. On a signalé que les lynx habitant le nord-est de la Pologne sont génétiquement distincts de leurs congénères de Lettonie et d'Estonie et sont probablement isolés par des habitats de dispersion inadaptés (Schmidt et al. 2009). L'élan semble s'étendre de la limite occidentale de son aire de répartition en Pologne vers la République Tchèque et l'Allemagne (revue dans Schmolcke et Zachos 2005). Bien que la structure de la population de cerfs rouges en Pologne et dans les pays voisins ait été principalement façonnée par la translocation humaine, une certaine différenciation entre les populations des Carpates et du nord de la Pologne est encore détectable (Niedzialkowska et al. 2011, 2012 et références).

Les loups d'Europe orientale présentent des niveaux élevés de diversité génétique et des haplogroupes d'ADNmt distincts (Pilot et al. 2010). Deux **haplogroupes** d'ADNmt, qui pourraient avoir divergé il y a environ 200 000 ans, convergent dans les montagnes des Carpates (Pilot et al. 2010). Cependant, des résultats antérieurs obtenus à partir de marqueurs microsatellites n'ont pas permis d'identifier des populations distinctes dans le nord-est de la Pologne et dans les Carpates (Pilot et al. 2006), ce qui souligne la nécessité de clarifier les schémas de flux génétique et l'origine des populations en expansion.

Une structuration génétique distincte de la population de loups Polonais a été suggérée par une étude antérieure à grande échelle des loups d'Europe centrale et orientale (Pilot et al. 2006). Bien que Pilot et al. (2006) n'aient échantillonné qu'une partie de l'aire de répartition des loups Polonais, ils ont détecté 3-4 sous-populations délimitées par l'ADNmt et 2 sous-populations basées sur des loci microsatellites. La Pologne occidentale dispose d'un habitat abondant pour les loups, et le pays pourrait accueillir deux à trois fois sa population actuelle d'environ 650 loups (selon les estimations de Jedrzejewski et al. 2008, 2010). Les loups ont récemment recolonisé des parties de l'ouest de la Pologne et de l'est de l'Allemagne, probablement à partir du nord-est de la Pologne (Jedrzejewski

et al. 2004, 2005a ; Ansoerge et al. 2006 ; Nowak et al. 2011). Par conséquent, la Pologne représente une zone clé pour comprendre les schémas historiques et contemporains du flux génétique du loup en Europe centrale.

Dans cette étude, nous avons échantillonné l'ensemble de l'aire de distribution du loup en Pologne et une partie de l'Allemagne orientale qui représente maintenant une extension naturelle de la population de l'ouest de la Pologne. Le loup est une espèce protégée, et nous avons donc basé nos investigations principalement sur des techniques moléculaires non invasives utilisant de l'ADN extrait d'échantillons fécaux. L'objectif de notre étude était de répondre aux questions suivantes : (1) Les populations de loups sont-elles génétiquement structurées à travers la Pologne ? (2) Les marqueurs génétiques mitochondriaux et nucléaires présentent-ils des résultats concordants ? L'aire de répartition des loups d'Europe centrale s'étant étendue au cours des dernières décennies, nous avons également posé les questions suivantes : (3) La Pologne occidentale et l'Allemagne orientale ont-elles été recolonisées par des loups provenant du nord-est ou du sud de la Pologne ?

MATERIEL ET METHODES

Zone d'étude

Nous avons collecté des excréments et des échantillons de tissus de loups dans toute la Pologne (311 904 km², 49°000 -54°500 N, 14°080 -24°090 E). Ce territoire s'étend sur plusieurs régions géographiques, avec des basses terres (<300 m d'altitude) dominant dans la partie nord et centrale et des hautes terres (301-500 m d'altitude) et des montagnes (501-2,499 m d'altitude) dans le sud. Le climat de la Pologne est tempéré à caractère transitoire (océanique au nord et à l'ouest, continental à l'est). La température annuelle moyenne diminue du sud-ouest (8,5 °C) au nord-est (6 °C). Les précipitations annuelles sont de 500-650 mm dans les basses terres et de 1 200-1 500 mm dans les montagnes. La couverture neigeuse persiste en moyenne 40 jours dans le sud-ouest de la Pologne, 100 jours dans le nord-est du pays et 200 jours dans les montagnes (Concise Statistical Yearbook of Poland 2011). La densité moyenne de la population humaine est de 122 habitants/km² et varie de 20 dans le nord-ouest et le nord-est de la Pologne à 500 habitants/km² en Haute-Silésie dans le sud-ouest de la Pologne (Annuaire démographique de la Pologne 2011).

Collecte d'échantillons

Méthodes de laboratoire

Probabilité d'identité et test pour la présence d'hybrides loup-chien

Analyses statistiques

RESULTATS

Variabilité génétique et structuration basée sur l'ADNmt

Nous avons trouvé six haplotypes d'ADNmt (H1, H2, H3, H6, H8, H14- nomenclature conforme à la Fig. 2 de Pilot et al. 2006) parmi les 333 échantillons analysés. Ils sont tous connus des études précédentes (Vila et al. 1999 ; Randi et al. 2000 ; Jedrzejewski et al. 2005a ; Pilot et al. 2006). H1, H2, H3 et H8 appartiennent à l'haplogroupe 1, qui est répandu en Europe du Nord-Est et centrale et dans la péninsule Ibérique, tandis que H6 et H14 appartiennent à l'haplogroupe 2 qui domine en Europe du Sud-Est et en Italie (Pilot et al. 2010). Le nombre d'haplotypes d'ADNmt par région variait de 1 à 4 (tableau 2). Nous n'avons observé aucune relation entre le nombre d'échantillons et le nombre d'haplotypes par région ($r^2 = 0,004$, $F_{1,10} = 0,038$, $P > 0,8$). Notamment, nous avons trouvé le plus grand nombre d'haplotypes (4) dans les régions 4 ($n = 25$ individus analysés) et 5 (n

= 10 inds). Cette dernière région a également montré le plus grand nombre de sites polymorphes (tableau 2). A l'inverse, les échantillons des régions 2 (n = 28 inds) et 7 (n = 27 inds) n'ont révélé qu'un seul haplotype, qui était H6 et H2, respectivement.

Tableau 1 Echantillons de loups (*Canis lupus*) collectés et analysés en Pologne et en Allemagne de l'Est, 2001-2009

No.	Region	Number of collected samples	Number of scat samples analysed	Number of wolf genotypes identified based on microsatellite markers	Number of individuals with mtDNA sequenced	Number of individuals genotyped at nine SNPs
1	Bieszczady Mountains and Dynów Foothills	115 (3)	100	72	62	8
2	Low and Sądecki Beskid	52	52	31	28	6
3	Gorce and Tatra Mountains, Żywiec-Silesian Beskid	107	100	44	32	12
4	Roztocze	161 (6)	143	38	25	6
5	Parczew, Sobibór and Włodawa Forests	73	56	12	10	–
6	Knyszyn, Białowieża and Mielnik Forests	255 (8)	184	55	39	9
7	Biebrza River Valley	168 (4)	124	45	27	9
8	Augustów Forest	272 (6)	220	40	27	10
9	Rominta and Borki Forests	84 (2)	84	17	14	4
10	Pisz Forest	125 (4)	87	26	21	–
11	Napiwoda-Ramuki Forest	72 (2)	62	20	15	–
12	Western Poland (and Eastern Germany*)	231 (3)	222	57	33	2
Total		1715 (38)	1407	457	333	66

La figure 1 montre l'emplacement de la région 1-12. Les échantillons étaient des excréments et parfois des tissus (le nombre de ces derniers est indiqué entre parenthèses, les quantités sont incluses dans le nombre total) : 19 crottes collectées, 19 crottes analysées, 9 génotypes de loups basés sur des marqueurs microsatellites, et 5 individus dont l'ADNmt a été séquencé.

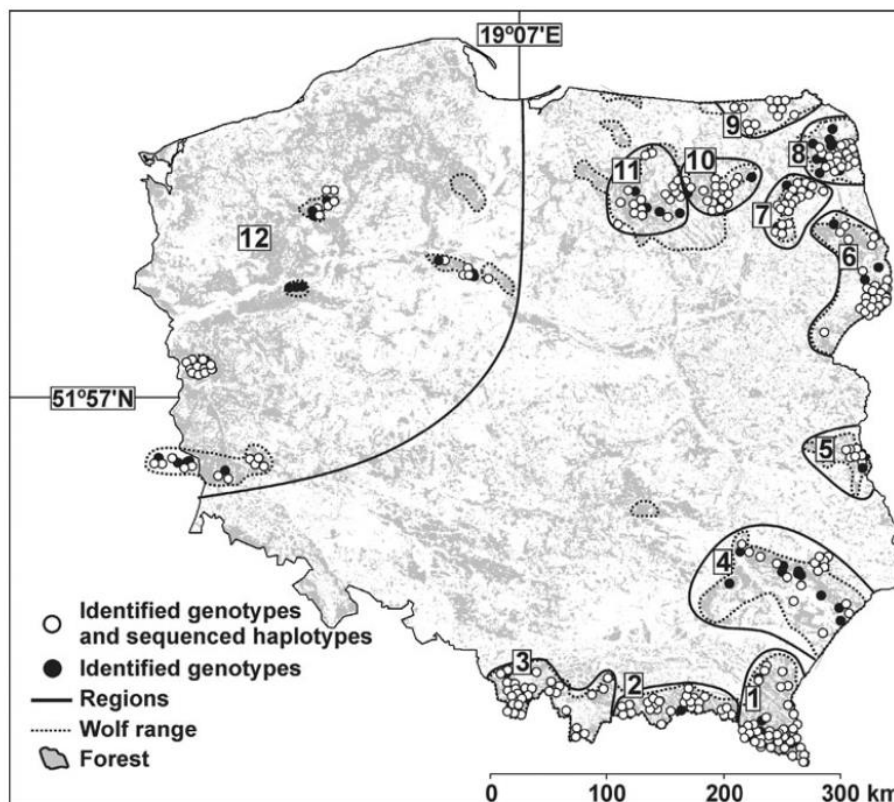


Fig. 1 Génotypes de loups (*Canis lupus*) analysés dans cette étude, représentés sur fond d'aire de répartition des loups et de couverture forestière en Pologne. Voir le tableau 1 pour les noms des régions (1-12)

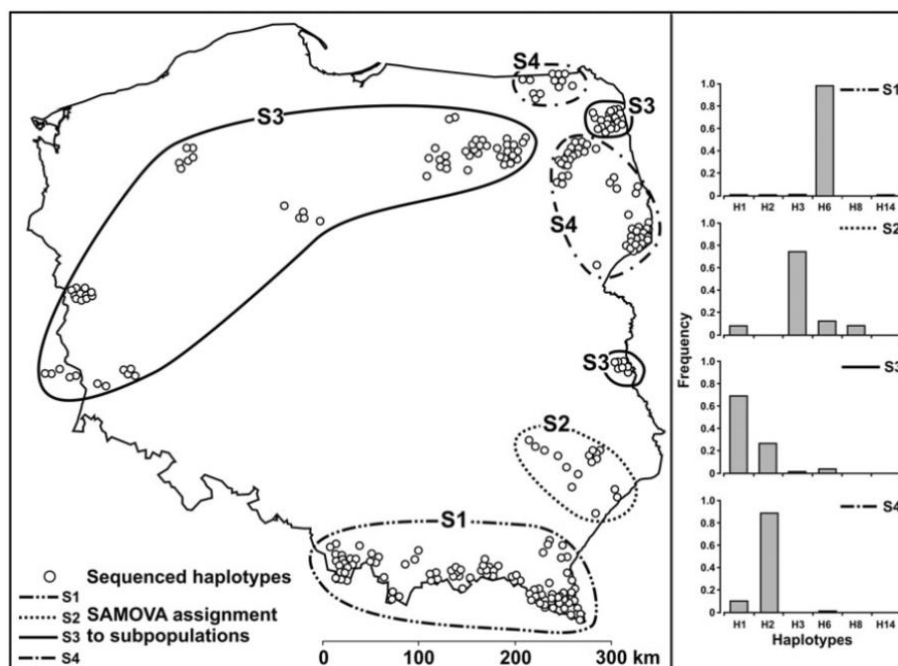


Fig. 2 Quatre sous-populations (S1-S4) de loups en Pologne, basées sur l'ADNmt, délimitées par SAMOVA (panneau de gauche) et fréquences d'haplotype pour les sous-populations (à droite). Les informations sur l'échantillonnage sont fournies dans le tableau 1

Les valeurs Φ_{ST} de distance par paires entre les 12 régions géographiquement prédéfinies étaient généralement très élevées ($>0,25$) et statistiquement significatives, ce qui indique un isolement entre de nombreuses régions selon l'ADNmt (tableau 3). Seules sept des 66 valeurs de distance par paire étaient faibles ($<0,05$). Ces faibles valeurs se sont produites entre les régions situées dans la même partie du pays, dans les basses terres et les Carpates.

Les résultats de la SAMOVA ont indiqué une structure génétique significative de la population pour chaque nombre supposé de groupes. La plus forte augmentation de la valeur de l' Φ_{CT} s'est produite entre $K = 3$ et $K = 4$ et tous les paramètres de la statistique Φ se sont stabilisés à partir de $K = 4$ (annexe : figure 7). Ainsi, nous avons supposé que quatre sous-populations constituaient la configuration de regroupement la plus parcimonieuse qui maximisait la variation entre les groupes. Les loups des régions 1, 2 et 3 des Carpates ont formé la sous-population S1 (Fig. 2). La sous-population S2 était composée exclusivement d'individus de la région 4 dans le sud-est de la Pologne. Les loups des régions 5, 8, 10, 11 et 12 formaient la sous-population S3, géographiquement disjointe. Enfin, les loups des régions 6, 7 et 9 formaient la sous-population S4. La sous-population S1 des Carpates était fortement dominée par l'haplogroupe 2 (97 % des loups), et quatre haplotypes de l'haplogroupe 1 y étaient présents à de faibles fréquences. En revanche, les sous-populations S2, S3 et S4 étaient principalement composées d'individus portant des haplotypes de l'haplogroupe 1 précédemment identifié (S2-88 %, S3-96 % et S4-99 %) et comprenaient l'haplogroupe 2 à de très faibles fréquences (Fig. 2). Les valeurs Φ_{ST} par paires entre les quatre sous-populations (S1-S4) étaient toutes très élevées ($>0,25$), ce qui indique un flux génétique d'ADNmt faible ou nul entre elles (Annexe : Tableau 5).

Différenciation et structuration génétiques basées sur les microsatellites

Nous avons identifié un total de 457 génotypes de loups. Le taux d'abandon allélique variait de 0,079 à 0,360 entre les régions. Les valeurs les plus élevées ont été observées pour les loci FH2010, FH2017 et FH2079 (Annexe : Tableau 6), qui avaient une longueur de fragment de >200 pb et

donc une probabilité plus élevée d'abandon pour les échantillons de faible qualité (Broquet et al. 2007). Sur la base des 11 loci, l'PI cumulé de tous les génotypes était de $1,35 \times 10^{-11}$ et la probabilité d'identité entre frères et sœurs (PIsib) était égale à $5,0 \times 10^{-5}$ (données détaillées disponibles sur demande). Les données provenant de sept microsatellites étaient suffisantes pour distinguer les 457 génotypes avec une PI = $3,13 \times 10^{-7}$. Nous avons utilisé trois échantillons génotypés à 6 loci. Ils ont été affectés à la région d'origine, et il est donc peu probable que leur inclusion ait biaisé nos résultats. Les données SNP pour les 66 échantillons dont les loci microsatellites B9 ont été amplifiés ont confirmé les identifications individuelles avec un PI cumulé = 0,002 et un PI-frères = 0,042. Les données microsatellites de ces 66 échantillons ont donc été incluses dans les analyses ultérieures.

Les 11 loci étaient polymorphes dans toutes les régions et le nombre moyen d'allèles microsatellites par locus variait entre 4,27 et 6,64 (tableau 2). Les valeurs d'hétérozygotie observées (HO) (intervalle 0,45-0,58) étaient inférieures aux valeurs attendues (HE, intervalle 0,63-0,69). Dans la population totale de loups Polonais, nous avons constaté une déviation significative par rapport à l'HWE pour les 11 loci (annexe : tableau 6). Nous avons également testé le HWE dans les sous-populations définies par STRUCTURE (Fig. 3). Quatre à sept des 11 loci (selon la sous-population) ont montré une déviation significative par rapport à HWE (après correction pour les tests multiples), sauf pour la sous-population 5 (régions 8-12) où 10 loci ont montré une déviation significative. Seul le locus FH2137 présentait une déviation constante par rapport à HWE dans toutes les sous-populations, les résultats pour les autres loci variant selon les sous-populations. Les valeurs F_{IS} variaient de 0,122 à 0,310 et n'étaient pas corrélées au nombre de génotypes de loups par groupe ($r^2 = 0,15$, $F_{1,10} = 1,779$, $P > 0,2$). Nous n'avons trouvé aucune relation entre le nombre d'haplotypes d'ADNmt et le nombre d'allèles microsatellites par locus dans les 12 régions (Pearson $r = 0$, $F_{1,10} = 0,002$, $P > 0,9$). Les individus des régions 5, 9 et 10 ne présentaient pas d'allèles privés (tableau 2). Le plus grand nombre d'allèles privés a été trouvé dans la région 12 (ouest de la Pologne et est de l'Allemagne), qui comprenait 57 individus répartis sur un tiers de la zone d'échantillonnage (voir Fig. 1).

Les valeurs de F_{ST} par paires entre les 12 régions géographiquement prédéfinies variaient de 0,011 à 0,212 (tableau 3) et 59 des 66 comparaisons par paires sont restées significatives après correction de Bonferroni. Les valeurs de F_{ST} indiquent généralement une différenciation génétique élevée ($>0,15$; Balloux et Lugon-Moulin 2002) ou modérée (0,05-0,15) entre les loups des Carpates (régions 1, 2, 3) et les autres régions d'échantillonnage. Dans le nord de la Pologne, nous avons observé une forte différenciation uniquement entre les régions 6 et 7. La différenciation la plus faible ($F_{ST} < 0,05$) a été observée entre les régions 10, 11 et 12 (tableau 3).

Les résultats microsatellites de STRUCTURE suggèrent une division des loups Polonais en deux sous-populations : les Carpates (régions 1-3) et les plaines (régions 4-12) (Fig. 3). Bien que le $\ln P(D)$ continue d'augmenter lorsque l'on augmente K dans les analyses STRUCTURE, ΔK (Evanno et al. 2005) a montré le plus grand soutien pour $K = 2$ suivi de $K = 5$ groupes (Annexe : Tableau 4). Cependant, le modèle d'affectation des individus dans cinq sous-populations ne suit une structure spatiale visible que pour quatre des groupes : régions 1-3, région 4, région 6 et région 7 (Fig. 3). L'élimination du locus FH2137 n'a pas modifié les groupes génétiques identifiés dans STRUCTURE, ΔK montrant le soutien le plus élevé pour les groupes $K = 2$ suivis de $K = 4$.

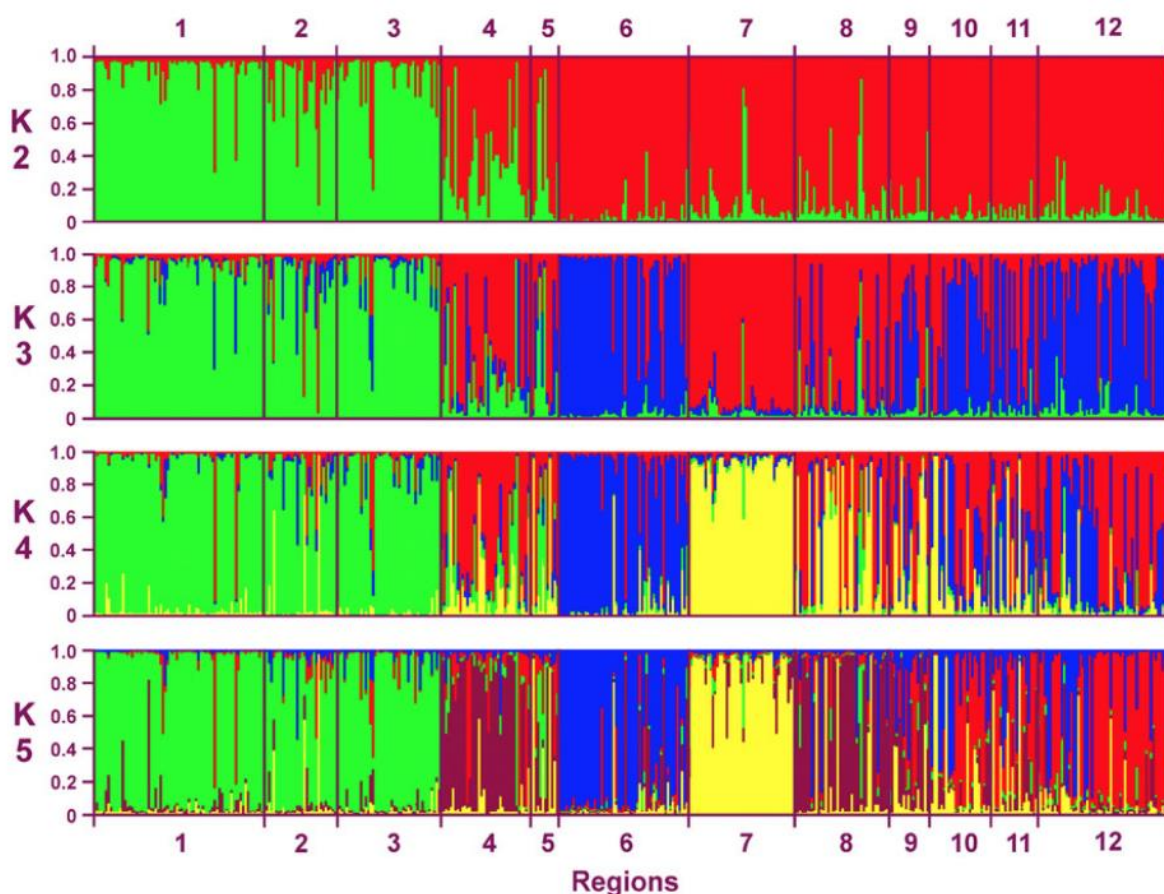


Fig. 3 Résultats de l'analyse STRUCTURE pour les loups Polonais, basée sur 11 loci microsatellites, en supposant que $K = 2$ à 5 sous-populations de loups. Les lignes noires séparent les loups de différentes régions d'échantillonnage. Les informations relatives à l'échantillonnage sont fournies dans le tableau 1

Les inférences effectuées dans GENELAND ont confirmé une séparation claire entre les montagnes des Carpates (régions 1-3) et les zones du sud-est comprenant les loups des régions 4 et 5 (Fig. 4). Vingt-six des 50 passages ont donné une valeur modale à cinq, tandis que 24 ont donné un mode à six pour la distribution postérieure de K . Aucun des 50 passages n'a indiqué de populations fantômes. L'emplacement des deux groupes du sud était constant dans les 50 séries, et 147 loups des régions 1, 2 et 3 ont été systématiquement affectés à la sous-population des Carpates dans 43 des 50 séries. De même, 35 individus de la région 4 ont été affectés à la sous-population du sud-est dans 40 des 50 passages. Les 275 autres loups des régions 6 à 12 ont été répartis de manière aléatoire et incohérente en trois ou quatre groupes.

Enfin, les deux premières composantes de l'ACP ont clairement divisé les loups en 2 groupes principaux. La composante PC-1 différencie les loups des Carpates (régions 1-3) des individus des plaines, et la composante PC-2 sépare les régions 6 et 7, qui se chevauchent toutes deux avec les régions 8-12 (Fig. 5). Les loups des régions 4-5 ont été placés sur le graphique de l'ACP entre les individus des Carpates et ceux des plaines, ce qui correspond aux résultats de STRUCTURE et GENELAND.

La structuration génétique des loups basée sur les marqueurs microsatellites et déduite par trois outils analytiques (STRUCTURE, GENELAND, PCA) et les résultats de l'ADNmt (SAMOVA) a permis de diviser de manière cohérente la population de loups Polonais en une sous-population des Carpates et une sous-population de plaine. Au sein des plaines, seule la différenciation de la

région 4 (Roztocze) par l'ADNmt était soutenue par les résultats des microsatellites (GENELAND, STRUCTURE avec $K = 5$). Nous avons trouvé une concordance entre les distances génétiques par paires entre les loups dans 12 régions basées sur les marqueurs mitochondriaux et nucléaires (Fig. 6). Un test partiel de Mantel (Smouse et al. 1986) où la matrice de distance géographique était maintenue constante, tandis que la relation entre F_{ST} et Φ_{ST} était déterminée, a montré une corrélation positive significative des deux mesures de distance génétique (Mantel $r = 0,521$, $P = 0,001$, test avec 999 permutations).

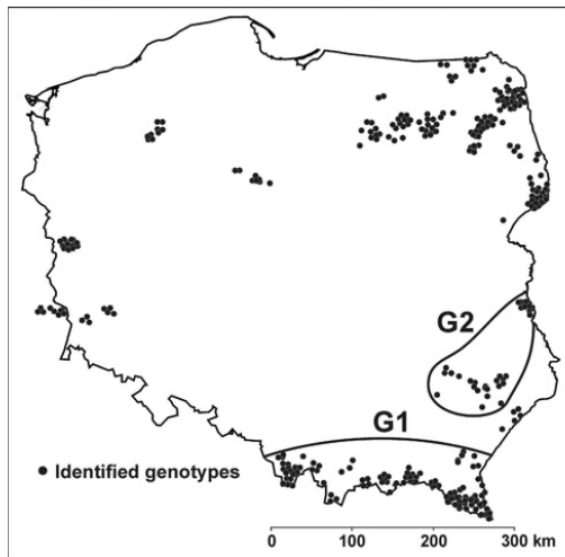


Fig. 4 Structuration de la population de loups Polonais déduite par GENELAND sur 50 passages. Les individus ont été assignés à la sous-population G1 dans 43 des 50 passages et à la population G2 dans 40 des 50 passages. Les autres individus ont été groupés de manière incohérente. Les informations sur l'échantillonnage sont fournies dans le tableau 1

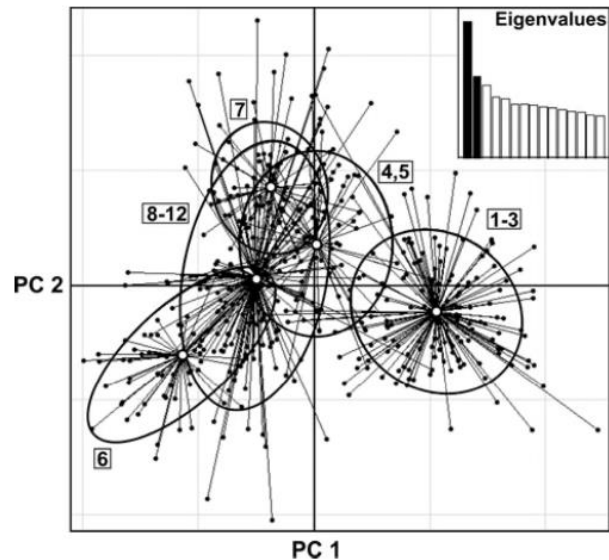


Fig. 5 Analyse en composantes principales (ACP) des loups Polonais représentant 5 sous-populations suggérées par STRUCTURE et GENELAND. Le graphique montre les loups individuels organisés par régions d'échantillonnage (détaillées dans le tableau 1). Les ovales noirs sont des ellipses à 95 % d'inertie. Treize valeurs aberrantes (provenant de sept régions différentes) ont été exclues pour améliorer la résolution de la figure. Aucune des 13 valeurs aberrantes ne semble avoir d'ascendance canine, et neuf (pour lesquelles l'ADNmt a été analysé) présentaient des haplotypes de loups communs

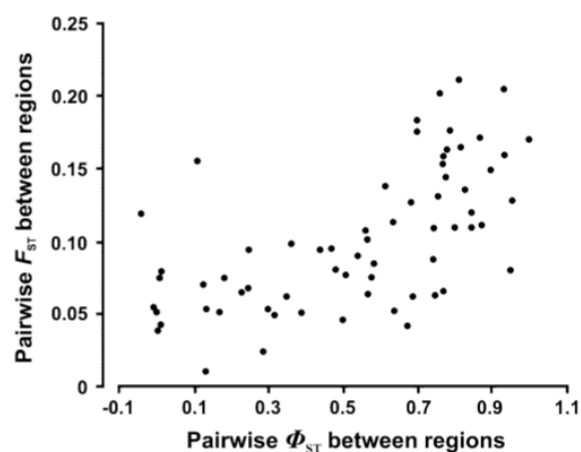


Fig. 6 Relation entre les distances génétiques par paire pour les loups polonais des 12 régions d'échantillonnage basées sur les marqueurs microsatellites (F_{ST}) et ADNmt (Φ_{ST}). Les informations sur l'échantillonnage sont fournies dans le tableau 1

DISCUSSION

Les populations de loups sont-elles structurées à travers la Pologne ?

Nous avons trouvé une structure génétique significative entre les populations de loups des Carpates et des plaines Polonaises. Nos résultats concernant l'ADNmt semblent correspondre à ceux rapportés par des recherches antérieures englobant une plus grande zone d'Europe de l'Est. Une sous-population des Carpates indiquée dans Pilot et al. (2006) correspond à la sous-population S1 identifiée dans notre étude. De même, S2 correspond à une sous-population s'étendant du sud-est de la Pologne à la Russie en passant par le sud de la Biélorussie et le nord de l'Ukraine. S3 et S4 semblent faire partie d'une sous-population s'étendant du nord-est de la Pologne et vers l'est en Russie (Pilot et al. 2006). Une étude ultérieure a examiné la distribution historique des haplogroupes en Europe (principalement) orientale (Pilot et al. 2010). Ces résultats suggèrent que la plupart des haplotypes de S1 appartiennent à l'haplogroupe 2 du sud de l'Europe, tandis que S2, S3 et S4 sont principalement composés de loups de l'haplogroupe 1. La zone de contact actuelle entre les deux lignées en Europe centrale semble être le résultat d'un haplogroupe (1) remplaçant partiellement un haplogroupe plus ancien (2) qui avait été prédominant au cours des derniers millénaires et qui reste largement distribué dans le sud de l'Europe (Leonard et al. 2007 ; Pilot et al. 2010). La présence d'un seul haplotype (H6) de l'haplogroupe 2 dans les Carpates Polonaises indique une faible diversité génétique dans son aire de répartition septentrionale actuelle. Par conséquent, la Pologne peut être considérée comme une zone de rencontre entre deux lignées de loups. Malgré la proximité géographique bien en deçà de la distance de dispersion des loups (par exemple, Wabakken et al. 2007), nos résultats suggèrent un flux génétique très limité entre les deux régions et, par conséquent, une zone de contact restreinte entre le nord et le sud. Pilot et al. (2006) ont observé un seul groupe de population englobant les loups du nord et du sud de la Pologne. Nos résultats microsatellites ont montré une forte structure génétique entre les Carpates et les plaines Polonaises, et démontrent donc une substructuration supplémentaire au sein de la Pologne par rapport aux résultats précédents. La déviation observée par rapport à HWE peut être due à plusieurs raisons : la présence d'allèles nuls, le taux élevé d'abandon allélique dans les études non invasives, l'existence d'une structure génétique locale (effet Wahlund), l'absence d'accouplement aléatoire ou la présence d'individus étroitement apparentés (membres des groupes familiaux) dans un échantillon. Bien que les erreurs de génotypage et les allèles nuls aient pu contribuer à l'excès d'homozygotes, il est peu probable que ces facteurs expliquent la structure montagne-plaine observée chez les loups Polonais. D'autres études sur la structure des populations de loups (qui ont utilisé des échantillons de tissus) ont également montré un déficit hétérozygote significatif et des valeurs positives de F_{IS} , ce qui a été expliqué par une consanguinité modérée, la présence d'individus étroitement liés ou la présence d'une structure supplémentaire non détectée (Lucchini et al. 2004, Pilot et al. 2006, Jansson et al. 2012).

En plus de la structure nord-sud, nos résultats indiquent un regroupement au sein de la zone de plaine. Les valeurs de F_{ST} entre les petits groupes peuvent refléter la structure sociale et peuvent montrer des valeurs relativement élevées entre les groupes familiaux locaux. Par exemple, Thiessen (2007) a rapporté une différenciation entre meutes de $F_{ST} = 0,179$ sur la base de $n = 36$ meutes de loups dans l'ouest du Canada. Les loups vivent généralement en groupes sociaux et territoriaux de 2 à 11 individus (Fuller et al. 2003 ; Jedrzejewski et al. 2010). Bien que la structure sociale des loups ait pu contribuer à la valeur élevée du F_{ST} (0,156) observée entre la région 6 ($n = 55$) et la région 7 ($n = 45$), les échantillons de ces régions représentent des membres de plusieurs meutes (Jedrzejewski et al. 2004). En conséquence, on ne s'attend pas à ce que la structure de la meute de

loux seule produise des valeurs de F_{ST} aussi élevées. Les valeurs modérées de F_{ST} (0,05-0,15) observées entre un certain nombre de régions de plaine nécessitent une étude plus approfondie, ainsi que la valeur élevée de F_{ST} (0,156) observée entre les loups des régions 6 et 7 qui sont séparés par <50 km. L'évaluation d'échantillons provenant de régions contiguës, de caractéristiques du paysage et de marqueurs génétiques supplémentaires pourrait permettre de mieux comprendre dans quelle mesure ces différences peuvent être expliquées par la fragmentation du paysage ou par des différences écologiques résultant d'une dispersion dans l'habitat natal (Geffen et al. 2004 ; Sacks et al. 2004 ; Pilot et al. 2006).

Facteurs qui pourraient maintenir les divisions entre les populations de loups génétiquement distinctes en Pologne

Les résultats de l'ADNmt et des microsatellites ont systématiquement montré une différenciation entre les loups des Carpates et ceux des plaines Polonaises. Nous n'avons examiné que des fragments non codants de l'ADN, et de futures analyses des gènes sous sélection (en utilisant par exemple la cartographie des SNP dans les exons ou les séquences régulatrices des gènes fonctionnels) pourraient aider à clarifier si des différences génétiques adaptatives pourraient jouer un rôle dans la structure observée. Les associations entre les facteurs environnementaux (type d'habitat, climat, abondance des proies) et les variantes génétiques pourraient avoir entraîné le développement **d'écotypes** de loups adaptés à différents habitats (par exemple, Carmichael et al. 2001 ; Musiani et al. 2007 ; Munoz-Fuentes et al. 2009). Ceci est cohérent avec les résultats selon lesquels (1) les facteurs écologiques (habitat, proies, climat) semblent expliquer une grande partie de la variation spatiale de la diversité génétique des loups en Europe centrale et orientale (Pilot et al. 2006), et selon lesquels (2) les loups de trois populations génétiquement distinctes en Pologne présentent des différences significatives dans la composition et les préférences en matière de proies (Jedrzejewski et al. 2012). Dans le nord-est de la Pologne, les loups s'attaquent à quatre espèces d'ongulés (élan, cerf rouge et chevreuil, sanglier), bien que seul le cerf rouge ait été tué dans une proportion supérieure à celle attendue en fonction de la disponibilité. Dans l'Est de la Pologne (régions 4 et 5), les loups préfèrent le chevreuil, tandis que dans le sud-est (régions 1 à 3), ils chassent principalement le cerf rouge et ne consomment qu'une faible proportion de chevreuil et de sanglier (Jedrzejewski et al. 2012).

La structure génétique des loups en Pologne montre une division spatiale forte et abrupte, et la séparation principale se produit entre les loups des plaines et ceux des montagnes des Carpates. Dans les plaines, les résultats de l'ADNmt et des microsatellites indiquent une division supplémentaire entre la région 4 (Roztocze) dans le sud-est et le nord de la Pologne. Cela semble concorder avec les résultats précédents de l'ADNmt et des microsatellites qui soutenaient la présence d'une sous-population s'étendant du sud-est de la Pologne vers l'est de la Russie (Pilot et al. 2006). Il est intéressant de noter que la séparation des loups des Carpates et des loups des plaines par une « ceinture sans loups » a également été suggérée en Ukraine (Gursky 1985). Les loups sont très mobiles (distance moyenne de déplacement quotidien chez les loups Polonais : 23 km, max 64 km, Jedrzejewski et al. 2001). De plus, les disperseurs à longue distance peuvent parcourir plusieurs centaines de kilomètres (Wabakken et al. 2001, 2007 ; Schede et al. 2010), de sorte que les individus de différentes populations devraient pouvoir se rencontrer et se croiser. L'isolement génétique observé des loups des Carpates est donc surprenant compte tenu de la remarquable capacité de dispersion de l'espèce. Plusieurs facteurs pourraient néanmoins contribuer aux divisions observées. Tout d'abord, les analyses de la structure de l'habitat dans et autour des aires de répartition des loups menées dans le sud et le nord de la Pologne (Jedrzejewski et al. 2004, 2005a) ont montré une

détérioration très rapide de la connectivité des habitats immédiatement au nord des Carpates. En revanche, le nord-est de la Pologne offre un meilleur habitat aux loups car la densité humaine et le réseau d'infrastructures de transport y sont plus faibles que dans le sud de la Pologne (Jedrzejewski et al. 2004, 2005a). Dans le sud de la Pologne, les loups ne sont présents que dans une étroite ceinture <100 km, alors que dans le nord de la Pologne, des populations stables de loups persistent à plus de 200 km de l'aire de répartition continue des loups (Jedrzejewski et al. 2004, 2005a).

Huck et al. (2010, 2011) ont analysé les coûts de dispersion entre des parcelles d'habitat du loup et des corridors de dispersion modélisés en Pologne, et ont constaté que la dispersion depuis les Carpates vers toute autre parcelle serait beaucoup plus coûteuse que la dispersion entre d'autres régions du pays. Les zones densément peuplées et urbanisées du sud de la Pologne, le long des Carpates, peuvent constituer un obstacle sérieux aux déplacements des loups et limiter leur dispersion (Huck et al. 2011). En outre, la modélisation de l'habitat approprié du loup a montré que la partie orientale de la Pologne était déjà « remplie » par les loups (Jedrzejewski et al. 2008). L'ouest de la Pologne dispose encore d'un grand nombre d'habitats appropriés pour les loups, non occupés à l'heure actuelle, qui pourraient accueillir une grande population de loups (Jedrzejewski et al. 2008). Par conséquent, les disperseurs préféreraient probablement s'installer dans l'ouest de la Pologne plutôt que dans l'est, plus saturé.

La structure actuelle du paysage et la répartition des loups en Pologne sont des facteurs importants susceptibles de limiter le flux génétique entre les loups des Carpates et ceux des plaines. Cependant, les loups peuvent se déplacer dans des paysages très hétérogènes et dominés par l'homme (Blanco et Cortes 2007) et traverser une série de barrières naturelles et anthropiques (Blanco et al. 2005 ; Wabakken et al. 2007 ; Ciucci et al. 2009). D'autres facteurs pourraient donc contribuer à la structure observée. La dispersion en fonction de l'habitat natal semble être une explication possible dans le cas des loups des Carpates, et est cohérente avec les résultats obtenus en Europe et en Amérique du Nord (Geffen et al. 2004 ; Sacks et al. 2004 ; Pilot et al. 2006). Une structure génétique de la population cohérente avec la présence d'habitats de montagne et de plaine a été signalée chez les coyotes (Sacks et al. 2004, 2005) et mérite une attention particulière dans les populations de loups des Carpates et des plaines environnantes. Les différences de statut juridique et de protection de l'espèce dans les Carpates pourraient également influencer la structure génétique, car seuls les loups des parties Polonaise et Tchèque de la bordure nord-ouest des Carpates sont protégés. En Slovaquie et en Ukraine, les loups sont régulièrement chassés ou persécutés. Cela provoque probablement un effet **source-puits** et donc une dispersion vers le sud de la partie Polonaise vers les parties Slovaques et Ukrainiennes des Carpates, où les disperseurs repeuplent les territoires vacants (Nowak et al. 2008).

Recolonisation de la Pologne occidentale et de l'Allemagne orientale

Nos résultats suggèrent que les loups colonisant l'ouest de la Pologne et l'est de l'Allemagne sont principalement originaires du nord-est de la Pologne. En particulier, il semble que la dispersion vers l'ouest à partir des régions 10 et 11 ait été relativement fréquente. L'emplacement de ces régions d'échantillonnage sur la frontière occidentale de l'aire de répartition établie des loups dans le nord-est de la Pologne, et l'habitat forestier relativement contigu dans cette zone (Huck et al. 2011) suggèrent que les régions 10 et 11 représentent un point de départ naturel pour l'expansion vers l'ouest (Jedrzejewski et al. 2008 ; Huck et al. 2010, 2011). Les loups de l'ouest de la Pologne et de l'est de l'Allemagne semblent représenter la bordure occidentale en expansion d'une vaste population de loups du nord-est de l'Europe qui habite principalement les forêts boréales et

tempérées et s'étend aux Pays Baltes, au nord de la Biélorussie, et au nord-ouest de la Russie (Pilot et al. 2006, 2010).

Fait important, notre étude a permis de détecter des allèles privés dans la région 12 (ouest de la Pologne et Est de l'Allemagne). Bien que ces allèles puissent être présents chez les loups du nord-est de la Pologne non échantillonnés, l'explication la plus probable est l'immigration en provenance de zones non couvertes par notre enquête. Les pays d'Europe de l'Est (Biélorussie, Lettonie) abritent les plus grandes populations de loups de la région, bien que les prélèvements humains soient élevés et potentiellement non durables dans certaines zones (Jedrzejewski et al. 2010), ce qui pourrait affecter la dynamique **source-puits** (Jedrzejewski et al. 2005b). Les mouvements récemment documentés d'un loup muni d'un collier émetteur entre l'Allemagne et la Biélorussie soutiennent également cette dispersion (Schede et al. 2010). La recolonisation apparente de l'ouest de la Pologne et de l'Est de l'Allemagne à partir de diverses populations **sources** devrait contribuer à garantir des niveaux élevés de variation génétique et, par conséquent, un potentiel d'adaptation à des environnements nouveaux et modifiés.