

## Des Apennins aux Alpes : génétique de colonisation de l'expansion naturelle de la population de loups italiens

Molecular Ecology (2007) 16, 1661–1671

doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03262.x

### From the Apennines to the Alps: colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population

ELENA FABBRI,\* CHRISTIAN MIQUEL,+ VITTORIO LUCCHINI,\* ALBERTO SANTINI,\* ROMOLO CANIGLIA,\* CHRISTOPHE DUCHAMP,‡ JEAN-MARC WEBER,§ BENOÎT LEQUETTE,¶ FRANCESCA MARUCCO,\*\* LUIGI BOITANI,‡‡ LUCA FUMAGALLI,‡‡ PIERRE TABERLET† and ETTORE RANDI\*

#### Résumé

Les loups en Italie ont fortement diminué dans le passé et ont été confinés au sud des Alpes depuis le tournant du siècle dernier, réduit dans les années 1970 à environ 100 individus survivant sur deux sous-populations fragmentées dans le centre-sud des Apennins. Les loups italiens sont actuellement en expansion dans les Apennins, et ont commencé à recoloniser les Alpes occidentales en Italie, en France et en Suisse il y a environ 16 ans. Dans cette étude, nous avons utilisé une approche génétique des populations pour élucider certains aspects du processus de recolonisation. L'ADN extrait de 3068 tissus et d'échantillons d'excréments collectés dans les Apennins (les populations sources) et dans les Alpes (la colonie), ont été génotypés à l'aide de 12 loci microsatellites visant à évaluer (i) la force du goulot d'étranglement et l'effet fondateur au début de la colonisation; (ii) les taux de flux de gènes entre la source et la colonie; et (iii) le nombre minimum de colonisateurs nécessaires pour expliquer la variabilité génétique observée dans la colonie. Nous avons identifié un total de 435 génotypes distincts, qui ont montré que les loups des Alpes : (i) **ont une diversité génétique significativement plus faible** (hétérozygotie, richesse allélique, nombre d'allèles privés) que les loups des Apennins; (ii) sont génétiquement distincts en utilisant les valeurs  $F_{ST}$  par paires, le test d'affectation de population et le regroupement bayésien; (iii) ne sont pas en équilibre génétique (test de goulot d'étranglement significatif). Les autocorrélations spatiales sont significatives parmi les échantillons séparés, jusqu'à environ 230 km, correspondant à peu près à l'écart apparent de présence permanente de loups entre les Alpes et le nord des Apennins. Le nombre de migrants estimé de première génération indique que la migration a été unidirectionnelle avec un avantage masculin, des Apennins aux Alpes, et que les loups du sud de l'Italie contribuent à la population alpine. Ces résultats suggèrent que : (i) **les Alpes ont été colonisées par quelques loups migrants de longue distance originaires de la sous-population du nord des Apennins** ; (ii) au cours du processus de colonisation, il y a eu un goulot d'étranglement modéré ; et (iii) le flux de gènes entre les sources et les colonies était modérée (correspondant à 1,25–2,50 loups par génération), malgré un fort potentiel de dispersion. Les simulations de goulot d'étranglement ont montré qu'un total d'environ 8 à 16 individus fondateurs expliquent la diversité génétique observée dans les Alpes. Le niveau de diversité génétique de la population de loups alpine en expansion et la permanence de la structuration génétique, dépendra des taux futurs de flux de gènes parmi les fragments distincts de sous-populations de loups.

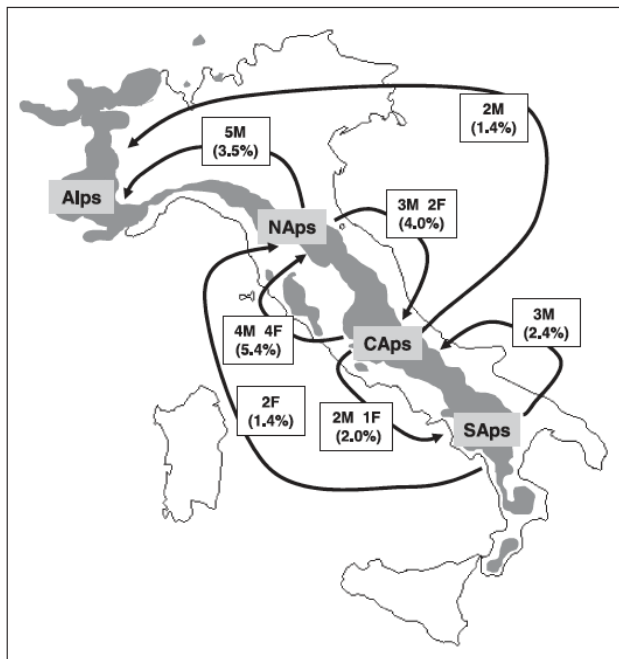
#### INTRODUCTION

La base génétique des processus naturels de colonisation est mal connue (Clobert et al. 2001), sauf pour certains aspects de la dynamique des métapopulations, qui sont normalement fragmentées dans les parcelles **qui ont des taux d'extinction locale et de recolonisation substantielle** (Hanski 1999). Les conséquences génétiques des processus démographiques, comme l'expansion historique d'une population ou de son déclin, sont généralement évaluées a posteriori, en utilisant des analyses

d'inadéquation (Rogers & Harpending 1992), des modèles coalescents (Beaumont 1999) et une variété de modèles de simulation (par exemple Currat et al. 2004). Cependant, les données génétiques peuvent également être utilisées avec succès pour révéler les modèles de processus démographiques en cours (Bohonak et al. 2001; Estoup et Clegg 2003). Par exemple, la génétique de la colonisation peut être dominé par des goulots d'étranglement si les populations sont fondées par un petit nombre de colons. La dérive aléatoire pourrait entraîner de nouvelles pertes de variabilité génétique si les colonies ne se développent pas rapidement et restent isolées de leur populations source. L'effet fondateur, l'isolement et les faibles taux de flux génique prolongé pourraient alors réduire la diversité génétique et le potentiel d'adaptation, augmentant de façon concomitante la consanguinité et la probabilité d'extinction de colonisation des populations (Hedrick & Kalinowski 2000). Les données génétiques permettent d'estimer le nombre minimum de colonisateurs qui sont nécessaires pour expliquer la variabilité génétique observée dans les colonies (Bellinger et al. 2003). Révéler les modèles génétiques de l'expansion démographique et de la recolonisation en cours, jouent également un rôle important dans la biologie de la conservation (McDonald & Johnson 2001), en particulier si la structure parentale, les niveaux de consanguinité et la dispersion sexiste sont évalués dans et parmi les noyaux de population (Clobert et al. 2001). Les loups ont été progressivement éradiqués Europe de l'Ouest et dans les Alpes aux XVIII<sup>e</sup> et XIX<sup>e</sup> siècles (Breitenmoser 1998), survivant dans des populations fragmentées dans la péninsule Ibérique et en Italie (Blanco et al. 1992; Boitani 2003). Les loups en Italie étaient confinés au sud de la rivière Pô depuis le milieu du siècle dernier, continuant de décliner jusqu'aux années 1970, jusqu'à atteindre environ 100 individus répartis dans deux zones fragmentées du centre-sud des Apennins (Zimen & Boitani 1975). Dû à une protection juridique plus efficace et à des changements substantiels dans l'écologie des zones de montagne (par exemple, diminution de la densité et augmentation des ongulés sauvages), ce déclin démographique s'est rapidement inversé au cours des années 1980, lorsque les loups ont commencé à se développer en Italie et dans d'autres pays européens (Breitenmoser 1998; Wabakken et al. 2001; Boitani 2003). Les loups d'Italie ont traversé les Apennins du nord pour recoloniser les Alpes du sud-ouest, où l'identification génétique a confirmé leur présence depuis 1992 en France et 1996 en Suisse (Valière et al. 2003), et réapparut à nouveau dans les Alpes italiennes centrales en 2000. De nos jours, la population de loups italiens est estimée à plus de 600 individus (Boitani 2003). La réapparition du loup dans les Alpes atténue les risques de conservation et contribue à restaurer des communautés écologiques structurées, soulevant néanmoins des conflits sociaux, qui sont alimentés par l'apparition de prédateurs du bétail (Duchamp et al. 2004). Ainsi, l'expansion et la colonisation du loup doivent être soigneusement surveillées. Des études en Europe et en Amérique du Nord ont révélé que la colonisation pouvait être soutenue par des disperseurs de longue distance (Valière et al. 2003), et que les loups colonisateurs peuvent ne pas perdre des fractions significatives de leur variabilité génétique originale (Forbes & Boyd 1996). Sporadique, mais la migration récurrente a augmenté l'hétérozygotie et la croissance démographique soutenue dans une petite population de loups en Scandinavie (Vilà et al. 2003). Les résultats provenant de programmes de surveillance génétique non invasifs ont révélés que les Alpes sont recolonisées par l'expansion naturelle de loups des Apennins (Lucchini et al. 2002; Valière et al. 2003). Les loups et les chiens en liberté s'hybrident sporadiquement en Italie, et l'expansion des populations de loups des Apennins ne montre pas d'introgession substantielle de gènes de chiens (Randi & Lucchini 2002; Verardi et al. 2006).

Dans cette étude, nous avons utilisé 12 loci microsatellites autosomiques, extraits d'échantillons d'ADN génotypique de tissus de loups et d'excréments collectés dans les Apennins et dans les Alpes entre 1982 à 2004, visant (i) à évaluer l'étendue de la différenciation génétique entre la source des Apennins et la nouvelle population de loups alpins ; (ii) d'estimer les taux de flux de gènes qui ont soutenu la recolonisation en cours des Alpes; et (iii) inférer par simulation le nombre minimum de colonisateurs qui pourrait expliquer les paramètres génétiques de la population observée. Nous avons utilisé des modèles d'îles, basés sur valeurs FST (Weir & Cockerham 1984) estimés entre groupes de population, des modèles de population continue, basés sur l'isolement par distance et par autocorrélations (Smouse & Peakall 1999) et des modèles de regroupement bayésien (Falush et al. 2003). Décrire la structure génétique des nouvelles populations et les schémas de diversification entre

les sources et les colonies, aideraient à comprendre les modèles de dispersion, la composition et la dynamique des meutes de loups dans les zones nouvellement colonisées.



**Fig.1** Aire de répartition approximative du loup (*Canis lupus*) en Italie et dans les Alpes (en gris). Les zones en pointillé indiquent les régions de présence temporaire de loups dans le nord de la France et en Suisse. Les régions d'origine des loups échantillonnés dans les Alpes, au nord (NAps), au centre (CAps) et au sud des Apennins (SAps) sont indiquées. Les flèches indiquent les directions (avec le nombre, le sexe et le pourcentage) de loups migrants de première génération détectés à l'aide de la méthode de Rannala & Mountain (1997) telle qu'implémentée dans geneclass (Piry et al. 2004).

## DISCUSSION

### Origine de la population de loups alpins

Les analyses de l'ADN mitochondrial et des microsatellites des échantillons de loups et d'excréments collectés en Italie, en France et en Suisse, indiquent de manière concordante que les loups colonisant les Alpes proviennent de l'expansion naturelle de la population Italienne de loups des Apennins (Lucchini et al. 2002; Valière et coll. 2003). Les loups collectés dans les Alpes partagent l'haplotype de la région de contrôle de l'ADNmt (nommé W14 par Randi et al. 2000) qui est unique aux loups de la population italienne. Le test d'attribution du microsatellite multilocus génotypes corrobore cette conclusion, montrant que les loups collectés dans les Alpes, correspondent étroitement aux génotypes de loups collectés dans les Apennins (Lucchini et al. 2002; résultats de cette étude). Aucun génotype hybride loup × chien n'a été échantillonné dans les Alpes, jusqu'à présent. Dans l'ensemble, ces résultats confirment que la recolonisation en cours des Alpes n'a pas été déterminé, ou du moins fortement soutenu par des lâchers de loups reproduits en captivité d'origine non italienne, ou par une hybridation généralisée avec des chiens. Nonobstant, les loups des Alpes se distinguent génétiquement de leur population d'origine vivant dans les Apennins, aussi bien au niveau individuel qu'au niveau de la population. Les analyses d'affectation Bayésienne (geneclass) et de clustering (structure) permettent d'attribuer correctement 90–93% de chaque loup Alpin à leur population alpine échantillonnée. La sous-structuration de la population est mise en évidence par la procédure d'affectation de la population (tableau 4). La sous-structuration spatiale de la population a été détecté quantitativement par des analyses d'autocorrélation (Fig. 2). Ces résultats suggèrent que la sous-structuration de la population chez les loups en Italie a été déterminé par les effets fondateur et de goulot d'étranglement au début du processus de recolonisation des Alpes.

### Effet fondateur lors de la recolonisation des Alpes

Les génotypes identifiés dans cette étude, ont montré que les loups échantillonnés dans les Alpes ont une faible diversité génétique (en termes d'hétérozygotie, de richesse allélique et de nombre d'allèles privés) que les loups des Apennins. La diversité génétique a été perdue pendant le goulot d'étranglement qui s'est produit au début du processus de recolonisation, indiqué par un test de goulot d'étranglement (BOTTLENECK), qui est significatif uniquement dans la population de loups alpins. Cependant, la perte de diversité génétique observée n'est pas élevée : 66% des richesses

allélique et 90% de l'hétérozygotie attendue de la population source est toujours maintenue chez les loups des Alpes après environ 16 ans, correspondant à environ 4–5 générations de loups (Aspi et al. 2006) depuis le début de la recolonisation. Par conséquent, l'effet fondateur n'était pas très fort et /ou le taux de flux génétique au cours de ces premières générations de la recolonisation n'était pas très faible. En conséquence, Nm estimé calculé à partir des valeurs FST (en supposant un équilibre génétique, ce qui n'est pas le cas), ou à partir du comptage direct de la première génération de migrants obtenus grâce à une procédure d'affectation bayésienne (geneClass), qui ne suppose aucun équilibre, a révélé qu'environ 1,25 à 2,50 migrants génétiquement efficaces par génération se sont déplacés des Apennins vers les Alpes. Fait intéressant, les loups des Alpes n'ont montré aucun allèle privé, indiquant que toute la diversité allélique provient d'un échantillonnage incomplet (en raison d'un goulot d'étranglement) depuis la population sources des Apennins. Les loups dans les Apennins du Nord ont montré sept allèles privés qui apparemment n'étaient pas en propagation dans les Alpes par les loups migrants. Chacun des allèles trouvés dans les Alpes a été détecté également dans les Apennins, excluant en outre toute contribution génétique de loups non-italiens à la colonie alpine. La force modérée du goulot d'étranglement est soutenue par des simulations (indique que 8 à 16 fondateurs efficaces sont nécessaires pour expliquer la diversité génétique actuellement observée dans les Alpes). En conclusion, ces résultats révèlent que la population de loup alpin n'a pas été fondée par un seul couple reproducteur, mais de plusieurs colonisateurs génétiquement non liés.

### Déclin historique et effet de goulot d'étranglement chez les autres populations de loups

La génétique des populations de loups qui ont récemment colonisé le centre des montagnes Rocheuses et le sud de la Suède a été étudié par Forbes & Boyd (1996) et Flagstad et al. (2003). La colonisation des loups en Amérique du Nord a montré une variation des distances de dispersion à longue distance, suggérant que les nouvelles meutes ont été créés par plusieurs individus, sans aucun goulot d'étranglement détectable lors de la création. L'origine de la recolonisation d'une population reproductrice stable après une dispersion à longue distance ont été clairement révélés par l'ADNmt et les marqueurs nucléaires typés chez les loups en Suède. Dans ce cas, la recolonisation a été initiée par un seul couple de loup, qui a migré et s'est reproduit dans le sud de la Suède, à plus de 900 km des populations sources les plus proches de Finlande et de Russie. La recolonisation en Suède a été soutenu par l'immigration ultérieure d'un seul individu, qui a introduit une variation génétique supplémentaire déterminant un « effet de sauvetage » positif dans une population à consanguinité sévère (Vilà et al.2003). Ainsi, la dispersion à longue distance et de multiples événements fondateurs semblent caractériser la génétique des événements de colonisation par le loup qui ont été décrit jusqu'à présent.

Aspi et coll. (2006) ont documenté des niveaux élevés de diversité de la population de loups en expansion rapide en Finlande, qui des années 1920 aux années 1970 a été réduite à quelques individus en raison d'une chasse excessive. Les valeurs d'hétérozygotie attendues estimées dans différents échantillons temporels de loups Finlandais ( $HE = 0,66-0,69$ ) étaient plus élevées que l'hétérozygotie dans la population italienne ( $HE = 0,56-0,64$ ). L'ensemble des données analysé par Aspi et al. (2006) a été obtenu en tapant 10 microsatellites, dont six (CPH2, CPH4, CPH8, CPH12, FH2088 et FH2096) sont en commun avec le panel utilisé dans cette étude. Les données Italiennes et Finlandaises sont donc étroitement comparables, ce qui suggère en outre que les loups en Italie pourraient avoir été isolés pendant de longues périodes au sud des Alpes (Lucchini et al. 2004).

### Causes de subdivisions des populations en Italie et des autres populations de loups

Malgré un fort potentiel de dispersion et de flux génétique, les loups échantillonnés dans des zones distinctes en Italie sont significativement différenciés, suggérant que l'expansion démographique en cours est soutenue par un flux génétique limité, et qui autrefois isolés ne se sont pas encore complètement mélangés. De leur goulot d'étranglement avant les années 1970, seuls environ 100 loups étaient en Italie, fragmenté en deux sous-populations géographiquement semi-isolées des zones de montagne de l'Apennin central et méridional (Zimen & Boitani 1975). Une vaste zone d'habitat inadapté au loup, qui sépare les sections de la population du sud et du centre des Apennins (Corsi et al.1999), semble limiter, mais pas empêcher les mouvements de loups à travers les deux sous-

populations. Les résultats des analyses génétiques de la présente étude indiquent que le processus d'expansion de la population en cours n'a pas conduit les loups dans le centre et le sud des Apennins à se mélanger complètement. Les analyses d'affectation des populations montrent que les loups des Apennins du sud sont génétiquement distincts des loups des Alpes et des Apennins centraux (tableau 5). L'effet fondateur et le flux de gènes limité lors de la recolonisation des Alpes ont conduit à la distinction génétique observée entre la source nord des Apennins et les populations des colonies alpines. Les autocorrélations spatiales montrent des valeurs  $r$  parmi les échantillons séparés jusqu'à environ 230 kilomètres (Fig. 2). Cette distance correspond à peu près à l'écart apparent de présence permanente de loups entre les Alpes et les Apennins du nord. La **continuité écologique** entre le nord des Apennins et les Alpes est entretenue par un couloir étroit des Apennins liguriens : la faible densité humaine et la distribution étendue du potentiel en proies (ongulés) fournissent un habitat convenable pour la dispersion du loup, **mais le paysage est fragmenté par plusieurs grandes autoroutes et autres infrastructures perpendiculaires au corridor**. La dispersion des loups le long de ce corridor a été démontrée par radiotracking (Ciucci & Boitani, communication personnelle), mais la population source du nord des Apennins est limitée à une gamme étroite et à un nombre d'animaux probablement très faible. La future permanence de la sous-structuration de la population dépendra des taux de flux génétique, qui sera finalement contrôlé par les caractéristiques du paysage, limitant la viabilité du couloir Apennin. Tant que le flux génétique sera maintenu au niveau actuel estimé (1,25 à 2,50 individus par génération), l'avenir de la population de loups alpins semble être à l'abri des conséquences les plus graves d'un goulot d'étranglement. Cependant, une surveillance continue de sa structure génétique et du flux génétique sont nécessaires pour assurer sa conservation. La différenciation génétique significative entre populations de loups voisines, séparées juste par une rivière ont été décrit au Canada par Carmichael et al. (2001), qui suggèrent que les stratégies de chasse différentielles peuvent avoir empêché le mélange de meutes géographiquement proches, spécialisées pour chasser les ongulés résidents ou migrants. L'isolement par la distance à l'échelle continentale a été décrit dans les populations de loups d'Amérique du Nord (Geffen et coll. 2004), révélant que des facteurs d'habitat et des barrières pourraient limiter les taux historiques de flux de gènes. Pilot et coll. (2006) ont montré que la différenciation génétique entre les populations de loups d'Europe orientale étaient corrélées aux climats, aux types d'habitats et à la composition du régime alimentaire des loups. Donc, malgré le potentiel de dispersion jusqu'à 1000 kilomètres (Mech & Boitani 2003), les populations de loups peuvent rester isolées pendant des périodes de temps en raison d'une variété de comportements (dispersion dans des paysages familiers ; compétition intraspécifique ; spécialisation des proies), de facteurs écologiques ou géographiques. Les résultats de la présente étude démontrent également que l'isolement par la distance peut être généré par un goulot d'étranglement à la fondation et par un flux génétique limité lors de l'expansion de la population de loups et la colonisation de nouvelles zones.