

# Comment l'Ouest a été gagné : reconstruction génétique de la recolonisation rapide du loup dans les paysages anthropiques d'Allemagne

Heredity  
<https://doi.org/10.1038/s41437-021-00429-6>

the  
**genetics**society

ARTICLE



## How the west was won: genetic reconstruction of rapid wolf recolonization into Germany's anthropogenic landscapes

Anne Jarausch <sup>1,2</sup> · Verena Harms<sup>1,4</sup> · Gesa Kluth<sup>3</sup> · Ilka Reinhardt <sup>2,3</sup> · Carsten Nowak <sup>1</sup>

Received: 12 March 2020 / Revised: 14 March 2021 / Accepted: 16 March 2021  
© The Author(s) 2021. This article is published with open access

### Résumé

Après une persécution et une éradication massive, une protection légale stricte a facilité le rétablissement réussi de meutes de loups en Allemagne, qui se poursuit depuis 2000. Nous décrivons ici ce processus de recolonisation par le séquençage de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial, le génotypage des microsatellites et l'identification du sexe à partir de 1341 échantillons collectés pour la plupart de manière non invasive. Nous avons reconstitué la généalogie des meutes de loups Allemandes entre 2005 et 2015 afin de fournir des informations sur les tendances de la diversité génétique, les modèles de dispersion et la dynamique des meutes au cours du processus d'expansion précoce. **Nos résultats indiquent des signes d'un effet fondateur au début de la recolonisation.** La diversité génétique des loups Allemands est **modérée** par rapport aux autres populations de loups Européennes. Bien que la dispersion entre les meutes soit biaisée en faveur des mâles dans le sens où les femelles sont plus philopatriques, les distances de dispersion sont similaires entre les mâles et les femelles une fois que seuls les disperseurs sont pris en compte. **La reproduction avec des parents proches est régulière et aucun des six loups mâles originaires de la population Italo-alpine ne s'est reproduit.** Cependant, la diversité génétique et les niveaux de consanguinité modérés de la population en recolonisation sont préservés par une socialité élevée, la dispersion entre les meutes et plusieurs événements d'immigration. Nos résultats démontrent une expansion continue, rapide et naturelle de la population de loups dans un paysage culturel utilisé de manière intensive en Europe centrale.

### INTRODUCTION

Les zones de nature sauvage diminuent rapidement sur la planète, tandis que les habitats disponibles et les effectifs des populations de grands mammifères se réduisent à l'échelle mondiale (Di Marco et al. 2014 ; Watson et al. 2016). Les grands carnivores, par exemple, sont globalement menacés en raison de leur persécution mortelle par l'homme en réaction à la prédation du bétail ainsi qu'à la réduction des habitats et de la disponibilité des proies (Ripple et al. 2014). À l'ère anthropique actuelle, un moyen important de protéger les grands animaux, y compris les grands carnivores, pourrait être de favoriser la coexistence entre l'homme et la faune sauvage au sein des mêmes paysages. Idéalement, une telle stratégie nécessite une coadaptation mutuelle (Carter et

Linnell 2016), impliquant une gestion efficace des conflits entre l'homme et la faune sauvage (van Eeden et al. 2018).

Il est intéressant de noter que le déclin mondial des populations de grands animaux n'est pas généralisé à toutes les régions et espèces. En Europe, par exemple, plusieurs populations de grands carnivores (l'ours brun *Ursus arctos*, le loup gris *Canis lupus*, le lynx d'Eurasie *Lynx lynx* et le carcajou *Gulo gulo*) ne cessent de croître grâce à des mesures de conservation efficaces et à des changements socio-économiques (Chapron et al. 2014). Bien que le **réensauvagement** en Europe avec des espèces de grands mammifères ait suscité un intérêt public et scientifique considérable et puisse servir d'étude de cas sur le potentiel de coexistence entre l'homme et les grands carnivores dans les paysages dominés par l'homme, les connaissances détaillées sur les modèles d'expansion de l'aire de répartition et de la population dans les paysages dominés par l'homme sont encore limitées. À cet égard, le loup gris *Canis lupus* Linæus, 1758 représente un sujet d'étude particulièrement intéressant. Les loups recolonisent actuellement leurs aires de répartition historiques au sein de plusieurs paysages dominés par l'homme en Europe occidentale et centrale (Chapron et al. 2014).

En Allemagne, par exemple, la première meute de loups a été confirmée en 2000 dans la partie orientale du pays, après plus de 150 ans sans loups résidents (Ansorge et al. 2006). Depuis, la population s'est étendue et est maintenant reconnue comme la population d'Europe centrale (Chapron et al. 2014), se répandant principalement dans le nord de l'Allemagne (Reinhardt et al. 2019) et l'ouest de la Pologne (Nowak et Mysłajek 2016 ; Szewczyk et al. 2019), avec des individus isolés se dispersant au Danemark (Andersen et al. 2015). Des comparaisons génétiques suggèrent que la population d'Europe centrale est probablement issue de disperseurs à longue distance de la population de loups de la Baltique dans le nord-est de la Pologne (Czarnomska et al. 2013). Les zones éloignées sont recolonisées par les loups en raison de leur grande capacité de dispersion avec des événements de dispersion par saut de plus de 300 km (Kojola et al. 2006 ; Wabakken et al. 2007 ; Ciucci et al. 2009 ; Ražen et al. 2016). **Malgré leur potentiel de dispersion sur de longues distances, une grande partie des individus dispersés s'installent à moins de 100 km de leur meute natale** (Kojola et al. 2006 ; Caniglia et al. 2014).

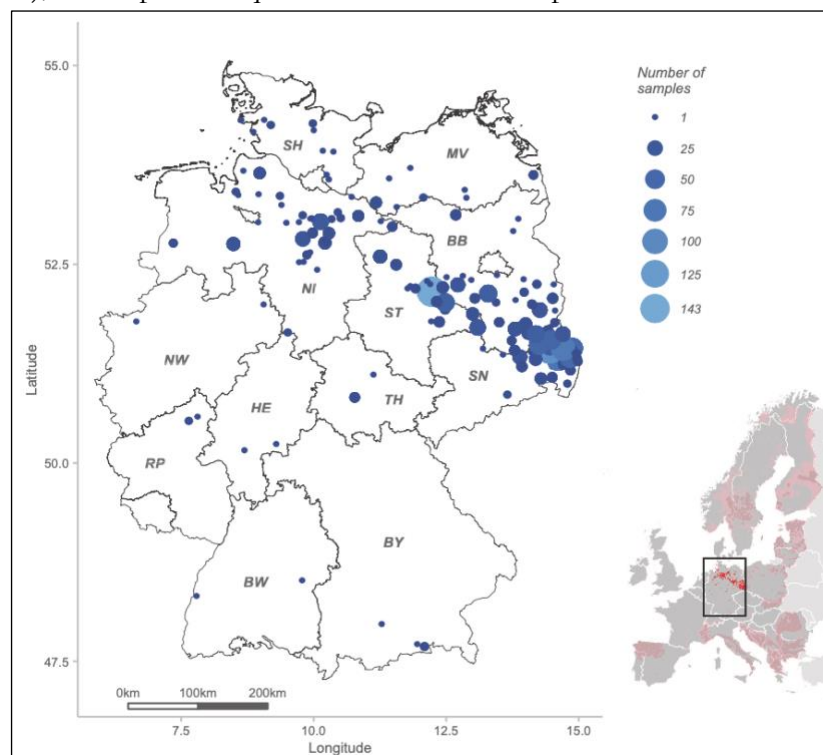
Alors que l'on dispose de nombreuses connaissances sur le déplacement des loups dans les zones naturelles ou semi-naturelles (revue dans Mech et Boitani 2003), peu d'études ont documenté les mécanismes d'extension de l'aire de répartition et d'établissement des populations dans des paysages anthropiques plus densément peuplés. Peu de **pedigrees multigénérationnels** détaillés documentant l'expansion des populations de loups ont été générés jusqu'à présent et proviennent pour la plupart de régions septentrionales faiblement peuplées par l'homme, comme la Scandinavie et le parc national de Yellowstone (Liberg et al. 2005 ; vonHoldt et al. 2008 ; Granroth-Wilding et al. 2017), ou dans les monts Apennins en Italie du Nord (Caniglia et al. 2014). Dans cette étude, nous résumons les résultats d'un suivi génétique intense du loup pendant les 15 premières années de recolonisation du loup en Allemagne afin de reconstituer les schémas de dispersion et d'expansion de la population dans un paysage intensivement dominé par l'homme. Nous avons émis l'hypothèse que les schémas de base de l'expansion de l'aire de répartition des loups seraient similaires dans un paysage dominé par l'homme et dans des habitats plus naturels. Compte tenu de la grande distance (>400 km) qui sépare la population source de l'Est de la Pologne ainsi que des schémas de dispersion connus pour les loups dans d'autres régions, y compris en Pologne (Nowak et Mysłajek 2016 ; Szewczyk et al. 2019), nous avons prédit que **(i)** nous trouverions un **effet fondateur initial** pendant la phase initiale de colonisation et que **(ii)** la recolonisation suivrait un

processus similaire à celui trouvé dans d'autres régions (Mech et Boitani 2003). Ce processus commence généralement par une meute initiale à partir de laquelle la progéniture se disperse dans les zones voisines. Les disperseurs locaux de la meute initiale se reproduisent alors généralement avec les individus nouvellement immigrés. Nous nous attendions également à ce que (iii) le flux de gènes et la dispersion entre les meutes soient principalement orientés vers les mâles (vonHoldt et al. 2008 ; Caniglia et al. 2014). De plus, nous supposons que (iv) la diversité génétique serait plus faible et que les niveaux de consanguinité seraient plus élevés dans la population de recolonisation par rapport aux populations de loups européennes plus grandes et persistantes (Hindrikson et al. 2017). Sur la base des données généalogiques, nous étudions les tendances en matière de diversité génétique, de consanguinité et de structure de population.

## MATERIEL ET METHODES

### Zone d'étude et prélèvement d'échantillons

Au sein de l'Union Européenne (UE), dont l'Allemagne est un État membre, le loup figure aux annexes II et IV de la législation sur la conservation de la directive Européenne sur les habitats (directive 92/43/CEE du Conseil), l'objectif global étant d'atteindre un « état de conservation favorable » (article 2 de la directive 92/43/CEE du Conseil). L'article 2 prévoit que l'état de conservation du loup en tant qu'espèce prioritaire doit être surveillé par les États membres (article 11). La population de loups en Allemagne est surveillée depuis 2001. Les principales méthodes de surveillance utilisées en Allemagne sont les enquêtes sur les signes de présence combinées au piégeage par caméra et aux analyses génétiques (Kaczensky et al. 2009 ; Reinhardt et al. 2015). Les principaux objectifs de la surveillance du loup en Allemagne sont l'évaluation annuelle de la zone d'occurrence et la taille de la population donnée comme le nombre minimum de meutes (y compris les reproductions), de couples marqueurs-olfactifs et de loups isolés territoriaux.



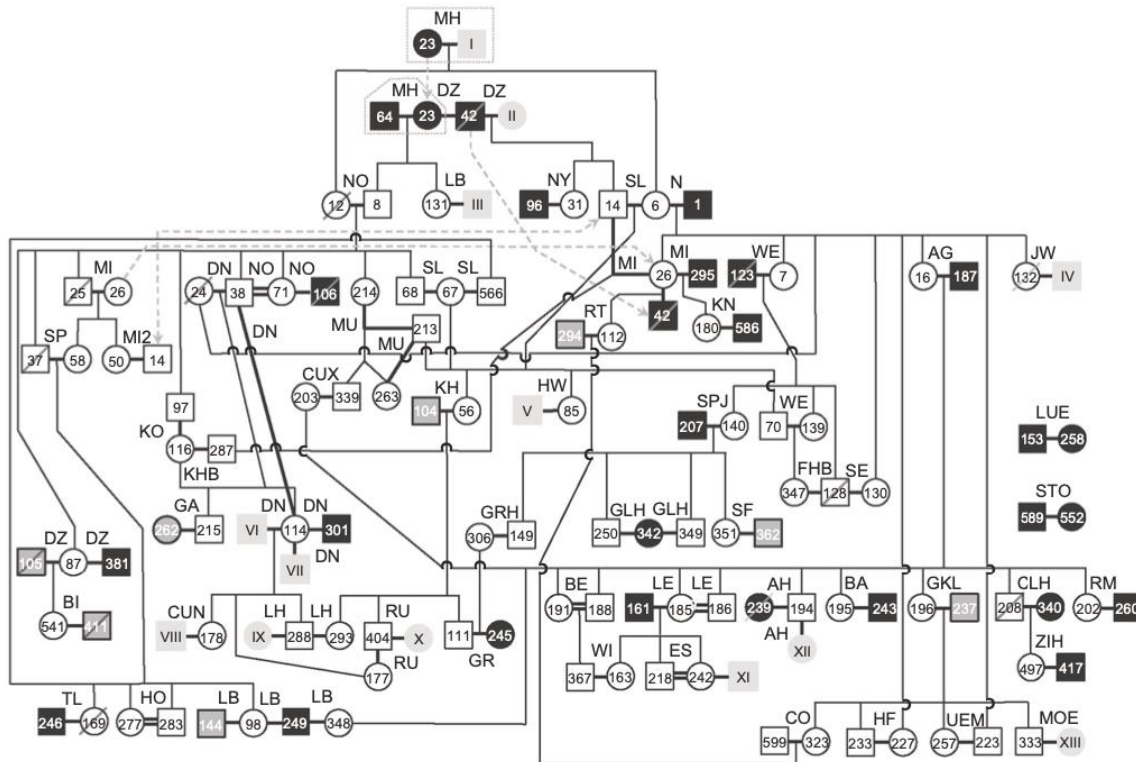
**Fig. 1** La zone d'étude du loup et les localités d'échantillonnage couvrent l'ensemble de l'Allemagne et sont divisées en 16 états fédéraux (lignes noires). Le nombre d'échantillons génotypés avec succès collectés entre 2003 et avril 2016 (cercles bleus) dans 12 états fédéraux (marqués par des initiales grises, voir tableaux S1-S3) est indiqué. La plus petite carte montre la distribution du loup à travers l'Europe en 2011 avec la présence permanente (rose foncé) et la présence sporadique (rose pâle) selon Chapron et al. (2014) et la présence confirmée du loup en Allemagne pour 2015 (rouge) selon la Dokumentations-und Beratungsstelle des Bundes zum Thema Wolf (2017).

En Allemagne, toutes les activités de surveillance des loups sont coordonnées et menées par les 16 États fédéraux, selon les normes Allemandes de surveillance des grands carnivores (Reinhardt et al. 2015), où les analyses génétiques constituent une partie essentielle. La recherche d'échantillons génétiques tels que les excréments ou les traces d'urine est généralement menée à l'échelle régionale par un réseau de personnes formées et coordonnées par les Agences environnementales des États responsables. En raison de la décentralisation des responsabilités locales, l'intensité de la surveillance et les stratégies de collecte d'échantillons varient dans l'espace et dans le temps. Toutefois, des échantillons génétiques sont régulièrement collectés dans tous les États fédéraux où la présence du loup est occasionnelle ou régulière. Les activités de surveillance durant la phase initiale de la recolonisation ayant été particulièrement intenses, nous supposons que toutes les meutes ont été identifiées au moins jusqu'en 2013.

Dans cette étude, les excréments constituaient la majeure partie du matériel génétique utilisé à des fins de surveillance et étaient généralement collectés tout au long de l'année lors des enquêtes sur les signes de présence. D'autres types d'échantillons fréquemment collectés étaient des poils (par exemple sur les lits de jour), de l'urine et des taches de sang pendant la période pré-oestrus, collectés pendant le suivi de la neige. Des traces de salive ont été recueillies sur des animaux d'élevage et des ongulés sauvages tués. Des échantillons de tissus ont été prélevés sur des carcasses de loups et une dent sur un ensemble de restes squelettiques. Des échantillons de sang, de poils et de salive ont été prélevés sur certaines carcasses de loups en plus des échantillons de tissus. Des échantillons de sang ont été prélevés sur des loups blessés. Des échantillons de sang, de poils ou de salive ont été prélevés sur des loups capturés pour être équipés de colliers-radio.

Au cours des premières années de surveillance de l'espèce en Allemagne, les premières analyses génétiques ont été réalisées à l'Institut de conservation de la nature de l'Académie Polonaise des sciences, à Cracovie, en Pologne (Reinhardt et Kluth 2007). En 2009, tous les États fédéraux d'Allemagne ont convenu d'utiliser l'Institut de recherche Senckenberg comme laboratoire central pour les analyses génétiques de loups afin de garantir la production de données harmonisées entre les États fédéraux. Dans cette étude, nous avons utilisé des échantillons de loups qui ont été collectés dans toute l'Allemagne (47°16'-55°03' N et 5° 52'-15°02' E) entre janvier 2003 et avril 2016 dans le cadre des activités de surveillance locale à long terme basées sur les états fédéraux (Fig. 1). Nous avons commencé à partir de 2005 avec les troisièmes et quatrièmes couples reproducteurs (GW006f et GW001m en N ; GW012f et GW008m en NO, voir les tableaux S1 et S2 pour les détails sur l'ID du génotype individuel et les territoires des loups, respectivement) pour décrire les tendances de la diversité génétique et de la consanguinité des couples reproducteurs jusqu'en 2015 ; entre 2000 et 2004, seuls deux couples reproducteurs successifs et un événement d'hybridation ont eu lieu. La première reproduction de loup a été documentée dans la Muskauer Heide (MH), en Saxe, en 2000 (Ansorge et al. 2006). Le suivi et les données génétiques suggèrent que la femelle GW023f et le loup mâle « I » au génotype manquant ont formé le premier couple reproducteur (Fig. 2), qui s'est reproduit en 2000 et 2001. De 2002 à 2004, GW023f s'est reproduit avec un autre mâle GW064m dans MH. De plus, un événement d'hybridation a eu lieu en 2003 (Reinhardt et Kluth 2007). L'analyse microsatellite a révélé que la femelle GW006f s'est accouplée avec un chien domestique adjacent à son territoire natal. Durant l'hiver 2003/2004, quatre louveteaux hybrides étaient encore vivants. Deux d'entre eux ont été capturés et amenés dans un enclos, tandis que les deux autres hybrides ont disparu. L'événement d'hybridation F1- a été confirmé par des analyses supplémentaires basées sur 93 polymorphismes mononucléotidiques (Harmoinen et al. 2020).

Extraction d'ADN et génotypage  
 Analyse des données  
 Reconstruction du pedigree, diversité génétique et consanguinité

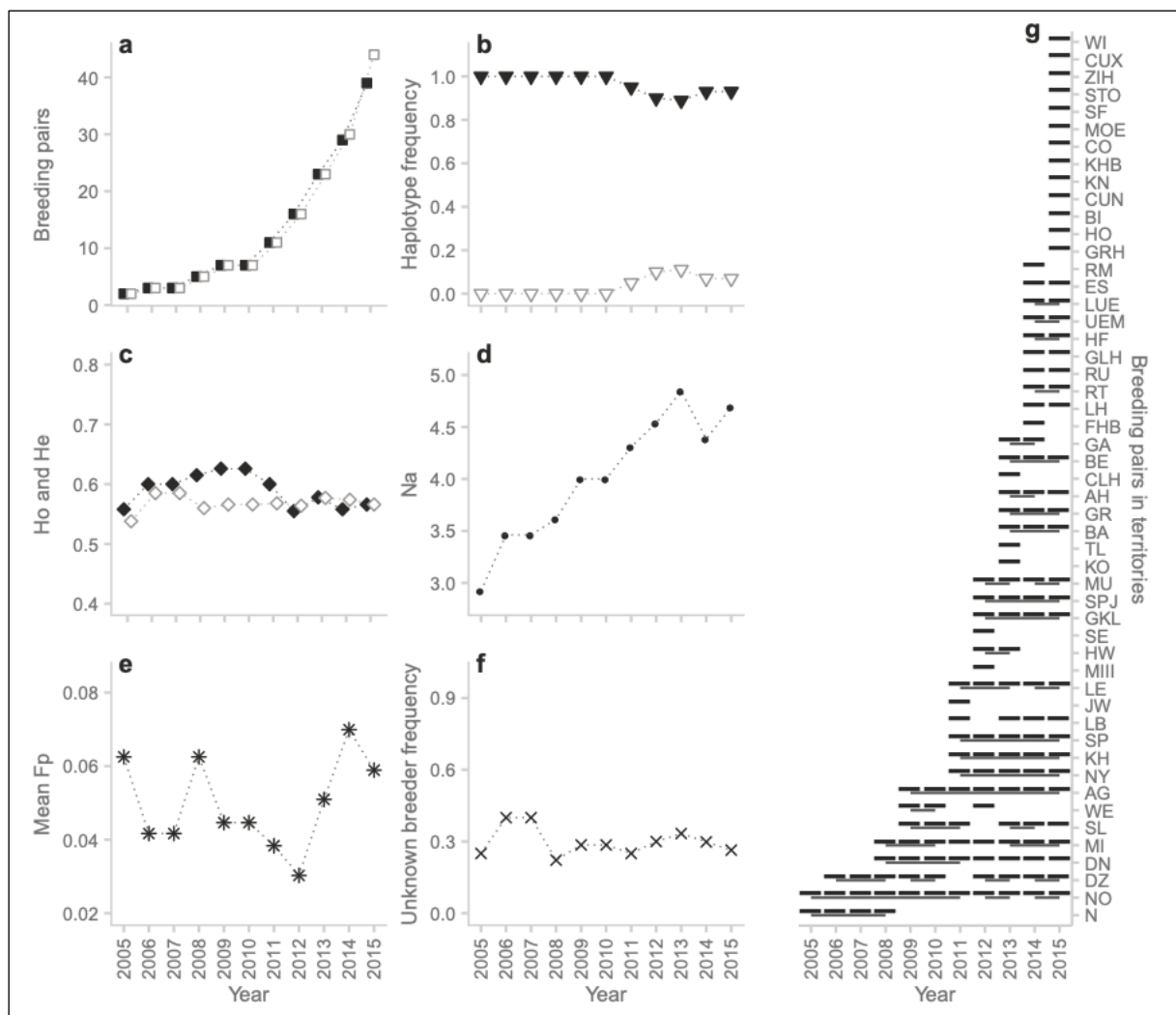


**Fig. 2.** Pedigree des loups Allemands se reproduisant au cours de la période de suivi 2005-2015 reconstruit à partir d'une combinaison de données micro-satellites, ADNmt et de terrain. Les lignes noires en gras symbolisent les reproductions réussies entre loups femelles (cercles) et mâles (carrés), les lignes noires doubles en gras mettent en évidence la reproduction des frères et sœurs à part entière, tandis que les lignes noires fines indiquent les relations parents- descendants. Quatre individus sont illustrés deux fois (flèche avec ligne grise pointillée). Les individus dont la meute source connue est porteuse de l'haplotype HW01 (non rempli), les individus dont la meute source inconnue est porteuse de l'haplotype HW01 (rempli de noir) et les individus dont la meute source inconnue est porteuse de l'haplotype HW02 (rempli de gris foncé). Les individus trouvés morts sont barrés. Les individus dont le génotype est manquant sont indiqués en gris clair avec des chiffres romains. Les couples reproducteurs dans lesquels les deux reproducteurs n'ont pas été génotypés ne sont pas représentés. La première paire (GW023f et I de 2000 à 2001) et la deuxième paire (GW023f et GW064m de 2002 à 2004) dans la Muskauer Heide (MH) sont encadrées d'une ligne pointillée grise et ne sont pas incluses dans les analyses ultérieures sur les tendances de la diversité génétique et de la consanguinité des paires de reproducteurs jusqu'en 2015 (voir 'Matériaux et Méthodes')

## RESULTATS

Nous avons réussi à génotyper 1341 échantillons collectés entre 2002 et 2015 à travers l'Allemagne, dont 872 excréments, 126 traces de salive de proies tuées, 108 échantillons de tissus et 108 échantillons d'urine, 78 échantillons de poils, 34 échantillons de sang, huit taches de sang d'œstrus, six échantillons de salive collectés sur des carcasses ou sur des loups capturés vivants et une dent. Au total, nous avons identifié 524 individus dans les échantillons analysés (Tableau S1). Les loups individuels ont été génotypés de 1 à 18 fois, et 43,3% des génotypes ont été identifiés une seule fois. **Les individus ont été échantillonnés 2,6 fois en moyenne.** Il n'y a pas eu de distorsion de fréquence par des abandons d'allèles importants ou des pics de « bégaiement » et aucun allèle nul n'a été identifié pour les loci microsatellites, à l'exception du locus PEZ17 où des allèles nuls peuvent être présents. En testant l'ensemble des 524 individus génotypés qui ont été identifiés entre 2002 et 2015, six des 13 loci s'écartent significativement de HWE ( $p < 0,05$ ). Le test des ensembles de données de l'éleveur pour chaque année de 2005 à 2015 a révélé que  $< 6\%$  des loci dans les onze

sous-ensembles s'écartaient significativement de HWE ( $p < 0,05$ ). En comparant les schémas d'hérédité avec les données de terrain, 7 des 13 loci présentaient des schémas d'hérédité mendéliens cohérents. Dans 17 des 431 génotypes de la descendance (3,9 %), un allèle à l'un des six loci (CPH5, FH2137, FH2161, FH2054, FH2088 ou PEZ17) ne correspondait pas entre les parents et la descendance. Comme ce taux était faible, les 13 loci ont été utilisés pour les analyses ultérieures. Pour les 524 individus identifiés, le nombre moyen d'allèles était de 6,62, l'hétérozygotie observée était de 0,574 et l'hétérozygotie attendue était de 0,573. Le contenu en information polymorphe pour l'ensemble des 13 loci était élevé (PIC = 0,526). La probabilité d'identité (PID) était de  $2,8 \times 10^{-09}$  et la probabilité d'identité entre frères et sœurs (PIDSib) était de  $1,85 \times 10^{-04}$ , indiquant que la présence d'individus partageant le même génotype par hasard était très peu probable au sein de la population.



**Fig. 3** Tendances de la diversité génétique et augmentation exponentielle des couples reproducteurs en Allemagne entre 2005 et 2015. **a** Nombre annuel de couples reproducteurs génotypés (carrés noirs) comparé au nombre de tous les couples reproducteurs confirmés (carrés gris non remplis). **b** Fréquence annuelle des haplotypes (HW01 [triangles noirs] et HW02 [triangles gris non remplis]) des reproducteurs. **c** Niveaux d'hétérozygotie annuels moyens observés (Ho ; losanges noirs), attendus sans biais (He ; losanges gris non remplis) et **d** le nombre moyen d'allèles (Na ; points noirs) des individus reproducteurs. **e** Coefficients de consanguinité annuels moyens basés sur le pedigree (Fp moyen) de la progéniture des paires reproductives (astérisques noirs). **f** Fréquence annuelle des reproducteurs dont la meute d'origine est inconnue (croix noires). **g** Paires reproductives génotypées dans les différents territoires. Pour les couples reproducteurs qui ont persisté sur plusieurs années, des lignes relient les années respectives.

## Parenté entre les individus reproducteurs

L'analyse de meute et de pedigree basée sur des données génétiques et de terrain a permis de déterminer la parenté entre les individus identifiés. Cette analyse a été réalisée pour 76 couples reproducteurs différents dans 51 territoires avec un total de 145 portées entre 2005 et 2015 (dont 648 louveteaux confirmés par le suivi Allemand, dont 431 ont été génotypés) (Tableaux 1, S2 et Figs. 2, S2). Par rapport au total de 151 couples reproducteurs confirmés par le suivi Allemand, 96,03% des couples reproducteurs de la population ont été génotypés jusqu'en 2015 (Tableau S4). Ainsi, nous avons pu reconstruire un pedigree presque complet. Soixante-dix-neuf (69,9 % ; 31 mâles, 48 femelles) des 113 reproducteurs génotypés sont nés dans une meute Allemande, tandis que 34 reproducteurs (30,1 % ; 26 mâles, 8 femelles) n'ont pas pu être affectés à une meute génétiquement connue. **Comme ces individus ne présentaient aucune relation de premier ordre avec des meutes Allemandes connues, ils ont été considérés comme des immigrants probables.** Plusieurs couples reproducteurs ont persisté pendant plusieurs années, alors que dans certains territoires, des changements multiples de reproducteurs ont eu lieu, **ce qui fait que certains individus se sont reproduits avec différents partenaires reproducteurs** (tableau 1 et figures 2, 3g). Plusieurs couples reproducteurs entre loups apparentés ont été identifiés, y compris cinq couples reproducteurs de frères et sœurs et deux couples reproducteurs parents/progéniture (voir Fig. 2 et le paragraphe suivant).

## Tendances en matière de diversité génétique et de consanguinité

La population de loups Allemands a connu une nouvelle expansion depuis la première reproduction en 2000, avec une augmentation exponentielle de **30,5%** pour toutes les paires reproductrices confirmées et des taux de croissance annuels de **29,8%** pour les paires reproductrices génotypées (figure 3a et tableau S4). En 2005, deux couples reproducteurs génotypés et confirmés se sont reproduits, tandis qu'en 2015, la reproduction a été constatée pour 39 couples génotypés sur 44 couples reproducteurs confirmés. **Nous avons trouvé quatre haplotypes d'ADNmt parmi les 524 individus identifiés : HW01, HW02, HW03 et HW22, nomenclature adaptée à Pilot et al. (2010).** HW01, HW02 et HW03 sont largement répandus en Europe du Nord-Est et centrale, **tandis que l'haplotype HW22 est largement prédominant pour les populations de loups Italiennes et alpines** (Pilot et al. 2010). **HW22** peut être considéré comme une indication fiable de l'origine de la population Italienne ou alpine, car les autres haplotypes sont rarement trouvés dans ces deux populations (Dufresnes et al. 2018). Les individus reproducteurs ne portaient que les haplotypes HW01 et HW02 (figures 2 et 3b). Cent cinq reproducteurs portaient l'haplotype HW01, tandis que seulement huit reproducteurs, sept mâles et une femelle, portaient l'haplotype HW02. Les fréquences des haplotypes ont diminué (HW01) et augmenté (HW02) de manière significative avec le temps ( $p = 0,01$ , pente de Sen =  $\pm 0,009$ ) (Figs. 2, 3b et Tableau S4). HW01 a été détecté avec une fréquence beaucoup plus élevée (89-100%) chez les individus reproducteurs que HW02 (5-11%), qui est apparu pour la première fois en 2011. HW03 a été trouvé chez un individu par un seul échantillon d'excréments collecté en 2014 dans le nord-est de l'Allemagne. **Six loups mâles étaient porteurs de l'haplotype HW22** (quatre ont été retrouvés morts et deux ont été identifiés une fois sur des ongulés tués).

L'hétérozygotie moyenne observée chaque année sur les loci microsatellites se situait entre 0,56 et 0,63, tandis que l'hétérozygotie attendue se situait entre 0,54 et 0,59. Aucune tendance significative de l'hétérozygotie n'a été détectée dans le temps (Fig. 3c et Tableau S4). Le nombre moyen d'allèles chez les individus reproducteurs a augmenté de manière significative ( $p < 0,001$ , pente de Sen = 0,179), passant de 2,9 en 2005 à 4,8 en 2013 (Fig. 3d et Tableau S4), tandis que la richesse allélique

moyenne ( $A_r$ ) se situait entre 1,54 et 1,58 (aucune tendance significative). Les coefficients de consanguinité moyens annuels des portées issues de couples reproducteurs étaient faibles ( $F_p$  moyen entre 0,03 et 0,07) et aucune tendance significative n'a été détectée (Fig. 3e et Tableau S4). L'augmentation du  $F_p$  moyen observée au cours des 3 dernières années a été associée à neuf portées issues de cinq événements de reproduction entre frères et sœurs. Le coefficient de consanguinité basé sur le pedigree le plus élevé ( $F_p = 0,379$ ) a été trouvé pour la portée du couple reproducteur en HO en 2015. De 2013 à 2015, trois portées provenaient d'événements de reproduction **fillo-père** où les grands-parents étaient déjà étroitement liés, ce qui a entraîné des coefficients de consanguinité de  $F_p = 0,297$  et  $0,328$ . Dans l'ensemble, 51 des 145 portées (35,2 %) ont résulté d'un accouplement avec des parents proches ( $F_p = 0,008-0,379$ ), tandis que seulement 19 portées (13,1 %) ont présenté des coefficients de consanguinité accrus  $F_p = 0,156-0,379$  (voir les figures S3 et S4). La fréquence annuelle des reproducteurs dont le pack source est inconnu se situait entre 22 et 40 % (moyenne = 29,9 % ; pas de tendance significative) (Fig. 3f et Tableau S4). **Tout au long de la période d'étude, les 76 liens entre les couples reproducteurs ont duré en moyenne 1,91 an** (entre 1 et 7 ans, Fig. 3g), bien que certains couples reproducteurs considérés dans cette étude aient persisté au-delà de l'année 2015.

### Dispersion des reproducteurs et dynamique des meutes

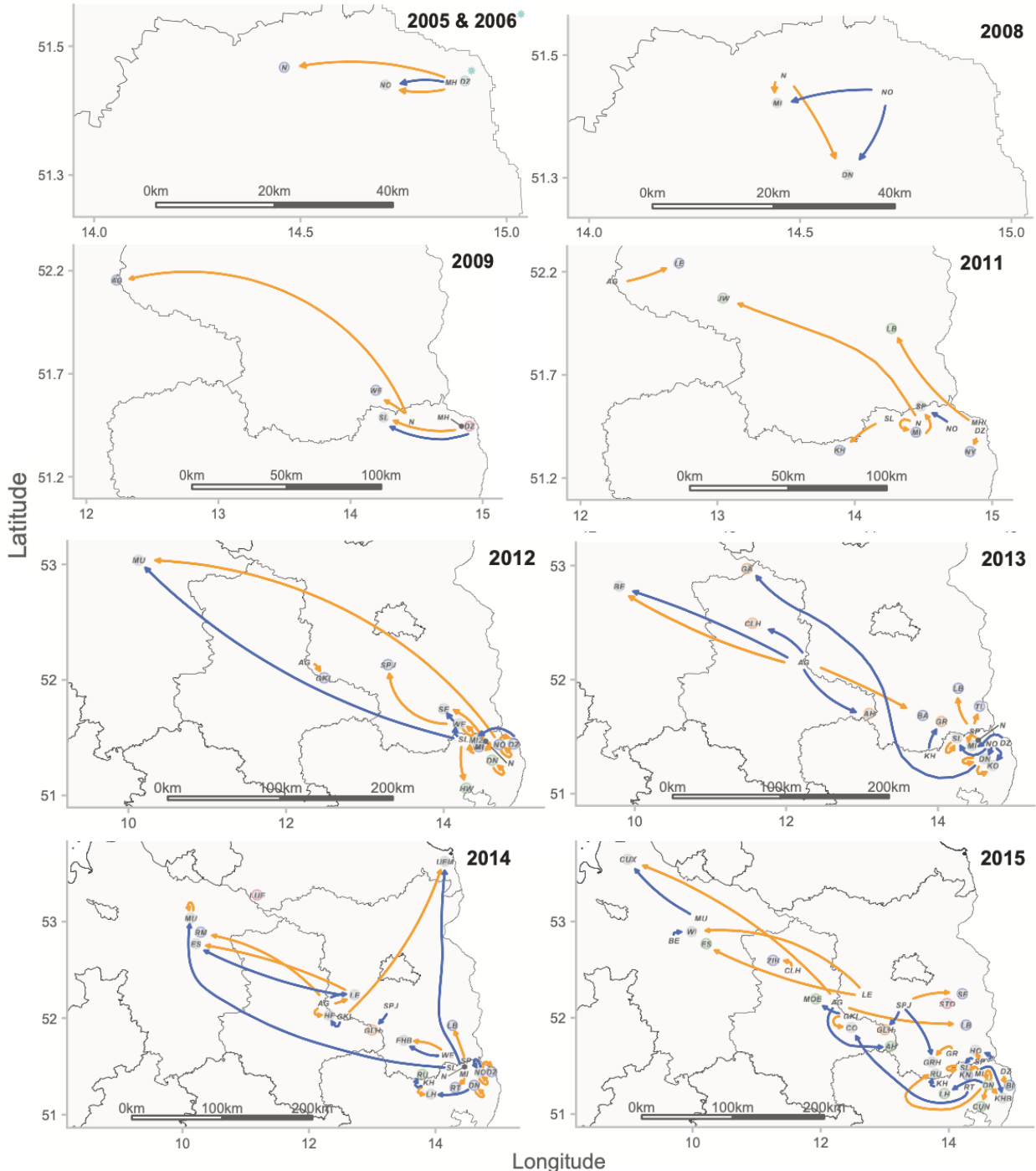
Au cours des premières années de recolonisation (jusqu'en 2011), 12 des 13 femelles reproductrices provenaient de meutes Allemandes, tandis que 5 des 12 mâles reproducteurs étaient nés dans la zone d'étude (Fig. 4). La première reproduction à une distance considérable (environ 170 km) au nord-ouest de la zone centrale initiale a eu lieu en 2009, lorsque la femelle GW016f née dans le territoire N s'est reproduite avec le mâle immigré GW187m formant le couple reproducteur AG. Une autre reproduction réussie a eu lieu à plus de 300 km au nord-ouest de la **zone centrale initiale** en 2012, lorsque les deux cousins germains, le mâle GW213m et la femelle GW214f, originaires de SL et NO, ont établi la meute initiale de MU. Par conséquent, les mâles et les femelles disperseurs sont devenus des reproducteurs dans des territoires établis loin du territoire ou de la zone centrale la plus proche (Fig. 4 et 5). **Cependant, les femelles disperseuses ou les femelles de printemps ont principalement initié l'établissement de couples reproducteurs dans des territoires adjacents à leur meute d'origine** (38 femelles contre 22 mâles). La plupart des mâles disperseurs sont devenus de nouveaux partenaires de reproduction dans des meutes déjà établies, tandis que le nombre de femelles reproductrices est resté constant (neuf mâles contre deux femelles). En outre, seule la progéniture féminine a repris des positions de reproduction sur son territoire natal et a formé un autre couple reproducteur avec un nouveau mâle. En 2014, la progéniture femelle GW263f en MU a repris la position de la mère de GW214f et s'est reproduite avec son père GW213m.

La dispersion globale biaisée par les mâles a également été confirmée par le test de dispersion biaisée par le sexe, puisque les mâles avaient une moyenne de l'indice d'assignation corrigé ( $mAIc$ ) inférieure à celle des femelles ( $p < 0,001$ ,  $mAIc$  femelles = 2,131 ;  $mAIc$  mâles = -2,077). De plus, nous avons trouvé plusieurs cas de monogamie en série où les femelles avaient entre deux et quatre partenaires de reproduction (voir Tableau 1 et Fig. 2).

**Le processus d'expansion spatio-temporel caractérisé par une recolonisation initiale loin de la meute source suivante et une colonisation ultérieure dans les zones environnantes a indiqué la formation de trois zones centrales** (voir Fig. S1). Nous n'avons trouvé aucune différence substantielle en comparant les indices de diversité microsatellites des individus se reproduisant en

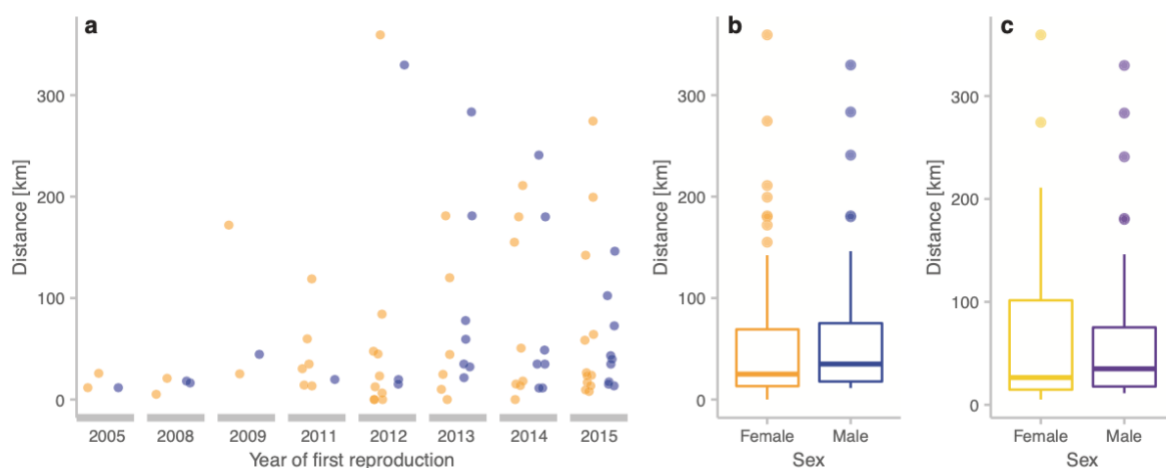


2015 entre ces trois zones (voir tableau S5). La diversité génétique était similaire entre CORE1, CORE2 et CORE3, avec des valeurs moyennes d'hétérozygotie observée comprises entre 0,55 et 0,58 et des valeurs d'hétérozygotie attendue comprises entre 0,55 et 0,57. L'analyse Snapclust a indiqué que le nombre le plus probable de clusters génétiques était  $K = 3$  incluant tous les individus se reproduisant pour l'année 2015 (voir Fig. S5).



**Fig. 4.** Représentation schématique de la dispersion des reproducteurs et de la dynamique des meutes pendant la recolonisation du loup en Allemagne de 2005 à 2015. Sont représentés les territoires de loups où un couple nouvellement établi s'est reproduit pour la première fois (cercles gris) dans la zone d'étude (divisée en états fédéraux [lignes grises]). Seuls les reproducteurs dont la meute source est connue sont représentés (femelles [flèches orange] et mâles [flèches bleues]). Les reproducteurs dont la meute source est inconnue sont indiqués par une bordure bleue (mâle), orange (femelle) ou rose (mâle et femelle) autour des territoires respectifs, tandis que les reproducteurs dont le génotype est manquant sont indiqués par une bordure verte (un seul parent). La bordure cyan autour de DZ indique le mâle dont la meute d'origine est inconnue et la femelle dont le génotype est manquant. Les territoires de loups dans lesquels les génotypes étaient manquants pour les deux reproducteurs ne sont pas représentés.

Les distances linéaires de dispersion entre les centres du territoire natal et le territoire de la première reproduction variaient de 0 à 359,5 km (Fig. 5a-c). Les distances de dispersion les plus courtes et les plus longues pour les loups qui sont devenus des reproducteurs réussis ont été enregistrées pour les femelles. Le sex-ratio des reproducteurs avec des données sur la distance de dispersion, y compris les individus qui sont restés et se sont reproduits dans leurs territoires natals, était de 48 femelles (60,8%) contre 31 mâles (39,2%) et ne s'écartait pas de la parité ( $\chi^2 = 3,658$ ,  $df = 1$ , valeur  $p = 0,06$ ). Les distances de dispersion entre les femelles et les mâles reproducteurs ne différaient pas significativement (test de Wilcoxon rank-sum,  $W = 629,5$ , valeur  $p = 0,25$ , Fig. 5b). La distance moyenne de dispersion était de 62,4 km pour les femelles et de 71,4 km pour les mâles, tandis que la médiane était de 25 km pour les femelles et de 35 km pour les mâles. Après avoir exclu les cinq femelles qui sont restées et se sont reproduites dans leurs territoires natals, le sex-ratio était de 43 femelles (58,1%) contre 31 mâles (41,9%) ( $\chi^2=1,946$ ,  $df=1$ , valeur  $p= 0,16$ ). Les distances de dispersion entre les femelles et les mâles reproducteurs ne différaient toujours pas de manière significative (test de la somme des rangs de Wilcoxon,  $W = 629,5$ , valeur  $p = 0,69$ , Fig. 5c). La distance moyenne de dispersion des femelles a légèrement augmenté à 69,7 km (médiane 26,4 km), tandis que les distances de dispersion des mâles n'ont pas changé (voir ci-dessous).



**Fig. 5** Distances linéaires de dispersion [km] des loups reproducteurs en Allemagne pour les années 2005 à 2015. **a** Distances de dispersion des femelles ( $n = 48$ ) et des mâles ( $n = 31$ ) qui se sont reproduits pour la première fois au cours des années respectives. **b** Distances de dispersion de toutes les femelles ( $n = 48$ ) et de tous les mâles ( $n = 31$ ) dont la meute natale est connue. **c** Distances de dispersion des femelles ( $n = 43$ ) et des mâles ( $n = 31$ ), à l'exclusion des cinq femelles qui sont restées et se sont reproduites sur leur territoire natal. Aucune différence significative entre les distances de dispersion des femelles et des mâles n'a été détectée.

## DISCUSSION

L'analyse génétique de différents types d'échantillons collectés pendant une décennie dans le cadre du suivi légal des loups en Allemagne nous a permis de reconstituer le rétablissement et l'expansion de l'aire de répartition des loups dans un paysage culturel intensivement utilisé. En construisant un pedigree détaillé, nous avons évalué les distances de dispersion, la dynamique des meutes et les tendances de la diversité génétique au cours de la phase initiale du processus de recolonisation.

### Effet fondateur et processus de recolonisation

Diverses études sur les loups en Europe et en Amérique du Nord ont suggéré que la colonisation naturelle des loups est généralement caractérisée par de fréquents événements de dispersion à longue distance et l'apparition de plusieurs fondateurs (Mech et Boitani 2003 ; Fabbri et al. 2007 ;

Åkesson et al. 2016 ; Ražen et al. 2016). De précédentes analyses génétiques ont montré que les premiers loups recolonisant l'Allemagne étaient originaires de la population de loups Baltes du nord-est de la Pologne (Czarnomska et al. 2013). Nos données suggèrent que la diversité génétique des loups en Allemagne a été perdue par un **effet fondateur** initial au début du processus de recolonisation, ce qui est cohérent avec les études précédentes de génétique des populations sur les recolonisations de loups en Europe (Fabbri et al. 2007 ; Granroth-Wilding et al. 2017 ; Szewczyk et al. 2019). Dans l'ensemble, la recolonisation des loups en Allemagne peut être décrite comme une expansion naturelle en cours rapide, à partir de la zone centrale initiale en Allemagne orientale près de la frontière Polonaise, avec une colonisation ultérieure en direction du nord-ouest (Reinhardt et al. 2019). L'expansion du loup en Allemagne a montré des modèles comparables à la reprise dans l'ouest de la Pologne avec une colonisation ultérieure du loup dans une direction nord-est (Nowak et Mysłajek 2016). Les fréquences des haplotypes dans notre région d'étude sont très similaires à celles de la Pologne occidentale (Czarnomska et al. 2013 ; Hulva et al. 2018 ; Szewczyk et al. 2019), soulignant que les loups d'Allemagne et de Pologne occidentale forment ensemble la population d'Europe centrale (Szewczyk et al. 2019). Outre la Pologne, les patrons de colonisation de cette étude ressemblent aux processus respectifs en Amérique du Nord, en Scandinavie ou dans les Alpes (Mech et Boitani 2003 ; Fabbri et al. 2007). De tels processus de recolonisation sont caractérisés par des **expansions par bonds** dans la **phase initiale**, permettant aux loups de former des meutes dans des zones éloignées de leurs populations d'origine. Lorsque les meutes s'établissent dans de nouvelles zones et deviennent une source de disperseurs, le modèle d'expansion change pour devenir une **dispersion stratifiée**, caractérisée par une combinaison de dispersions à longue et courte distance.

Les expansions rapides des aires de répartition peuvent affecter les modèles génétiques spatiaux des populations (Excoffier et al. 2009 ; Petit 2011). La recolonisation des loups en Allemagne a été soutenue par des zones d'entraînement militaire actives qui ont servi de tremplin et ont permis la formation ultérieure de meutes dans les zones périphériques (Reinhardt et al. 2019). Les reproducteurs d'AG ont formé le couple reproducteur le plus performant lors de la recolonisation initiale en Allemagne, avec un grand nombre de descendants se reproduisant avec succès. L'analyse de la sous-structure génétique au sein de la population a révélé la forte contribution génétique de cette meute et de ses descendants (voir la figure S5). Les individus nés dans la **zone centrale initiale** et leurs descendants, ainsi que les loups immigrants d'une meute d'origine inconnue et leurs descendants, ont également eu une forte contribution génétique au sein de la population, ce qui prouve le « surf » des allèles pendant l'expansion de l'aire de répartition (Excoffier et al. 2009).

### **Dispersion des reproducteurs et dynamique de la meute**

La méthode la plus courante pour former un couple est de se disperser et de trouver un partenaire de reproduction. Selon les circonstances, les loups ont recours à plusieurs autres pratiques de reproduction (« d'autres stratégies ») pour former un couple. L'idée sous-jacente est qu'après avoir atteint sa maturité sexuelle, chaque loup cherchera à se reproduire au sein d'une population de loups constituée de groupes sociaux territoriaux (Mech et Boitani 2003). Nous avons constaté que les loups mâles et femelles se dispersaient pour rechercher un territoire et un partenaire de reproduction. Bien que le loup ayant la plus longue distance de dispersion était une femelle, nos données n'ont pas apporté la preuve d'une différence significative des distances de dispersion entre les deux sexes parmi les disperseurs, ce qui est cohérent avec les résultats précédents sur les loups (Gese et Mech 1991 ; Mech et Boitani 2003 ; Kojola et al. 2006 ; Jimenez et al. 2017).

Les loups qui se dispersent et s'accouplent successivement avec différents partenaires reproducteurs dans différents territoires passent souvent inaperçus, car les individus munis de colliers émetteurs sont généralement suivis pendant des périodes limitées (Mech et Boitani 2003). Ici, la reconstruction d'un **pedigree** multigénérationnel nous a permis de détecter de multiples événements de dispersion de loups mâles et femelles durant les premières années de recolonisation. **Contrairement aux résultats des distances de dispersion décrites ci-dessus, nous avons constaté que la dispersion entre les meutes était fortement orientée vers les mâles.** La plupart des mâles ont immigré dans des meutes préétablies, devenant ainsi le nouveau mâle reproducteur, **tandis que la progéniture féminine a souvent établi de nouvelles meutes à côté de leur meute natale** ou le territoire a été repris par la progéniture féminine des reproducteurs originaux. Des schémas de dispersion similaires, spécifiques au sexe, entre les meutes ont été observés dans le parc national de Yellowstone (vonHoldt et al. 2008) et en Italie (Caniglia et al. 2014).

Dans certains cas, la reproduction réussie de nouveaux reproducteurs peut se produire sans aucune dispersion de la meute natale. Si, par exemple, la nourriture est abondante sur un territoire, une fille mature peut se reproduire en plus de la femelle reproductrice établie (Mech et Boitani 2003). Bien qu'une telle reproduction multiple au sein d'un territoire ait été prouvée par télémétrie (Reinhardt et al. 2014), il n'a pas été trouvé de preuve de cela ou de paternités multiples dans une seule portée pour les loups de Yellowstone (Koch et al. 2019). Cependant, l'étroite parenté au sein des meutes, combinée à la diversité allélique généralement faible et aux méthodes d'échantillonnage génétique pratiquées, peut avoir conduit à ce que des stratégies de reproduction locales spécifiques soient occasionnellement négligées.

### **Diversité génétique et consanguinité**

Les populations composées d'organismes qui forment des groupes sociaux ne peuvent pas être considérées comme de simples sous-populations à accouplement aléatoire, car la structure sociale et la dispersion sexuée influencent la diversité génétique (Sugg et al. 1996). L'augmentation de la diversité génétique au cours des premières années de recolonisation est probablement due au taux d'immigration proportionnellement élevé des mâles et au fait que les loups vivent en groupes sociaux. **En effet, la structure sociale peut effectivement renforcer la diversité génétique et réduire la consanguinité** (Parreira et Chikhi 2015). Dans l'ensemble, les tendances de la diversité génétique s'accordent avec les données généalogiques et les coefficients de consanguinité basés sur le pedigree (Fp), indiquant l'immigration de nouveaux reproducteurs, **une forte socialité et un nombre croissant de portées consanguines dans les dernières années.**

**Diverses études indiquent que la reproduction avec des parents proches est plutôt rare chez les loups et que les loups sont généralement capables d'éviter la consanguinité au sein des meutes natales** (Smith et al. 1997 ; vonHoldt et al. 2008 ; Geffen et al. 2011 ; Caniglia et al. 2014). Cependant, ce phénomène peut simplement être considéré comme le résultat de la compétition de reproduction et de la structure du groupe social territorial (c'est-à-dire un échec des jeunes loups, qui perdent dans la compétition de reproduction avec les loups plus matures ; Mech et Boitani 2003). Geffen et al. (2011) ont suggéré que l'évitement de la consanguinité chez les canidés peut faire défaut en dehors des groupes natals, car le faible taux de rencontre des membres de la famille et l'organisation sociale sont suffisants pour empêcher la consanguinité. **Nos résultats suggèrent également que les loups s'accouplent sans discernement avec tout partenaire potentiel de reproduction en dehors de leur meute natale.**

Nous avons trouvé plusieurs cas de consanguinité entre proches parents pendant l'expansion du loup en Allemagne, y compris des événements de reproduction entre frères et sœurs complets en dehors des territoires natus dans quatre des cinq cas. Le cas exceptionnel concerne le mâle GW038m, né dans la meute NO. GW038m s'est d'abord accouplé avec sa cousine dans le district de Nuremberg, puis avec sa fille dans le district de Nuremberg, et enfin avec sa sœur dans le district de Nuremberg. Sa sœur s'est reproduite avec un autre mâle avant qu'ils ne s'accouplent en tant que frères et sœurs. GW038m s'est dispersé avant la naissance de sa sœur et de son partenaire de reproduction ultérieur. Dans les quatre autres cas, les frères et sœurs sont nés dans leur meute natale la même année ou l'année suivante. Ainsi, les frères et sœurs ont probablement grandi ensemble dans leur meute d'origine avant de se disperser. **Cependant, trois événements de reproduction de frères et sœurs complets ont suivi des liens de couple antérieurs et deux événements de reproduction de frères et sœurs complets se sont produits à environ 180 km des meutes natales.** Il est intéressant de noter que plusieurs des descendants d'AG se sont reproduits avec des parents proches, y compris trois événements de reproduction entre frères et sœurs. La progéniture du couple reproducteur de HO en 2015 présentait le coefficient de consanguinité basé sur le pedigree le plus élevé ( $F_p = 0,379$ ), car leurs arrière-arrière-grands-parents étaient déjà apparentés. Dans ce contexte, il convient de noter que les liens familiaux des individus d'origine inconnue ne sont pas résolus dans cette étude. Ainsi, le degré de consanguinité est probablement sous-estimé dans l'ensemble de l'ensemble de données (Robinson et al. 2013 ; Kardos et al. 2018 ; Robinson et al. 2019). Cependant, les coefficients de consanguinité trouvés dans cette étude sont bien plus faibles que ceux trouvés dans les populations consanguines de Scandinavie (Liberg et al. 2005 ; Åkesson et al. 2016) ou les loups de l'île Royale (Hedrick et al. 2014), par exemple.

## CONCLUSIONS

Cette étude documente la recolonisation rapide des loups dans les paysages culturels à usage intensif d'Europe centrale. Nous avons observé (i) des signes d'un effet fondateur et (ii) un processus de colonisation en Allemagne similaire à celui trouvé dans d'autres régions. Nous avons également constaté que (iii) le flux de gènes et la dispersion entre les meutes étaient principalement orientés vers les mâles, alors que les distances moyennes de dispersion ne différaient pas selon le sexe des disperseurs. En outre, nous avons constaté que (iv) la diversité génétique et les niveaux de consanguinité de la population en recolonisation étaient modérés par rapport aux autres populations de loups européennes (Hindrikson et al. 2017).

Le pedigree reconstruit dans cette étude documente des relations étroites, y compris plusieurs événements de consanguinité au sein de la population de loups en expansion. Une socialité élevée, la dispersion entre les meutes et l'immigration d'individus provenant probablement de Pologne étaient courantes pendant la recolonisation et ont contribué à favoriser les tendances positives observées du nombre d'allèles et de l'hétérozygotie ainsi que des niveaux relativement faibles de consanguinité globale. Les niveaux d'hétérozygotie et de consanguinité détectés dans cette étude peuvent refléter le comportement spécifique de l'espèce dans une population en ré-expansion avec un nombre limité de partenaires reproducteurs non apparentés et une structure de population cryptique résultant de forts effets de surf des allèles dans les zones nouvellement recolonisées.

**Le taux de croissance annuel de la population de loups en Allemagne d'environ 36%** (Reinhardt et al. 2019) est plus élevé que celui détecté dans la population de loups Scandinaves en recolonisation

(29% ; Wabakken et al. 2001) et similaire au taux d'augmentation de la population d'Europe centrale en Pologne occidentale (**38%** ; Nowak et Mysłajek 2016).

Ce retour rapide du loup dans ses aires de répartition historiques s'est produit au sein de plusieurs paysages dominés par l'homme en Allemagne, comprenant des forêts gérées intensivement, de grandes zones agricoles, des réseaux de circulation denses et de nombreuses zones urbaines. Bien que la mortalité anthropique (trafic ou braconnage) soit élevée (Reinhardt et al. 2019), la présence de vastes zones d'habitat approprié encore inoccupées (Kramer-Schadt et al. 2020) avec de fortes densités d'ongulés sauvages, combinée à une protection légale stricte, offre des conditions favorables à une nouvelle expansion de la population de loups. Nous nous attendons à ce que, dans un avenir proche, le flux génétique entre la population d'Europe centrale et les populations adjacentes augmente avec la poursuite de l'expansion, ce qui entraînera une plus grande diversité génétique.