

Les facteurs écologiques influencent la structure génétique de des loups gris Européens

Molecular Ecology (2006) 15, 4533–4553

doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03110.x

Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves

MAŁGORZATA PILOT,* WŁODZIMIERZ JĘDRZEJEWSKI,† WOJCIECH BRANICKI,‡
VADIM E. SIDOROVICH,§ BOGUMIŁA JĘDRZEJEWSKA,† KRYSZYNA STACHURA† and
STEPHAN M. FUNK¶**

*Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences, Ul Wilcza 64, 00-679 Warszawa, Poland, †Mammal Research Institute, Polish Academy of Sciences, 17-230 Białowieża, Poland, ‡Institute of Forensic Research, Ul Westerplatte 9, 31-033 Kraków, Poland, §Institute of Zoology, National Academy of Sciences of Belarus, Akademicheskaya Str 27, 220072 Minsk, Belarus, ¶Institute of Zoology, Zoological Society of London, London RW1 4RY, UK

Résumé

Bien que les mécanismes contrôlant le flux génétique entre les populations soient particulièrement importants pour les processus évolutifs, ils sont encore mal compris, en particulier dans le cas des grands mammifères carnivores ayant de vastes distributions continues. Nous avons étudié la question des facteurs affectant la structure génétique de la population de loup gris, *Canis lupus*, une espèce de carnivores terrestres mobiles. Nous avons analysé la variabilité de l'ADN mitochondrial et 14 locus microsatellites pour un échantillon de 643 individus de 59 localités, représentant la plupart de l'aire de présence continue des loups d'Europe de l'Est. Nous avons testé un éventail de données géographiques, historiques et de facteurs écologiques pour vérifier s'ils peuvent expliquer la différenciation génétique entre les populations de loups. Nous avons montré que les populations de loups d'Europe de l'Est affichaient des structures génétiques spatiales, en l'absence de barrières physiques aux déplacements évidentes. Ni les barrières topographiques ni la fragmentation passée pourraient expliquer la structure spatiale génétique. Cependant, nous avons constaté que la différenciation génétique entre les populations locales était corrélée au climat, aux types d'habitats et à la composition du régime alimentaire des loups. Ce résultat montre que les processus écologiques peuvent influencer fortement la quantité de flux génétique parmi les populations. Nous suggérons un environnement natal biaisant la dispersion comme mécanisme sous-jacent, liant l'écologie de la population à sa structure génétique.

INTRODUCTION

Comprendre le processus micro-évolutif qui génère une structure génétique pour les grandes populations de mammifères carnivores mobiles, est essentiel pour améliorer notre connaissance des mécanismes de leur divergence adaptative et de leur spéciation. La génétique des populations classique explique leurs structures génétiques par des traits de comportement de l'espèce (formation de troupes, ou de colonies), par des caractéristiques géographiques qui limitent le flux de gènes, comme la distance spatiale et les barrières topographiques (Hartl & Clark 1997), et par des facteurs historiques tels que la colonisation passée, l'expansion de l'aire de répartition ou l'isolement dans différents refuges glaciaires (Hewitt 1996, 2000; Taberlet et al. 1998; Templeton 1998). Cependant, outre les limitations géographiques et les événements historiques, des processus écologiques complexes peuvent influencer la quantité de flux de gènes entre les populations.

En effet, un nombre croissant d'études révèle des structures génétiques qui ne peuvent pas non plus être expliquées par des facteurs géographiques ou historiques (par exemple, Sponer & Roy 2002; Spinks et Shaffer 2005). Fait frappant, nombre de ces études concernent les mammifères carnivores de

grande et moyenne taille à distributions continues étendues : les loup gris *Canis lupus* (Carmichael et al. 2001 ; Geffen et al. 2004), les coyotes *Canis latrans* (Sacs et al. 2004), les lynx *Lynx lynx* et les *Lynx canadensis* (Rueness et al. 2003a, b), les pumas *Puma concolor* (McRae et al. 2005) et les renards arctiques *Alopex lagopus* (Dalén et al. 2005). La grande mobilité de ces animaux et leur capacité à traverser la plupart des barrières topographiques potentielles (comme les rivières ou les montagnes) minimisent l'influence des **facteurs géographiques** sur le flux génique et réduisent les effets des événements historiques, de sorte que l'effet des **facteurs écologiques** peut être plus important.

Le loup gris est l'un des plus mobiles mammifères terrestres capable de se disperser rapidement sur des distances allant jusqu'à 900 km (Fritts 1983 ; Mech et Boitani 2003). Des individus en dispersion ont traversé avec succès des autoroutes à quatre voies et ont contourné des grands lacs et des villes (Mech et al. 1995 ; Merrill & Mech 2000; Wabakken et al. 2001). La gamme historique des loups a couvert presque toute la zone Holarctique, de la toundra aux déserts (Nowak 2003). Les capacités de dispersion sur de longues distances, combinées à la capacité d'occuper une variété d'habitats, implique des taux élevés de flux de gènes qui réduisent la différenciation génétique entre les populations locales. En effet, une étude basée sur une région de contrôle de l'ADN mitochondrial (ADNmt) des données de séquence d'un échantillon mondial de loups gris, a suggéré une absence de structure génétique à grande échelle, et indique qu'une structure locale à petit grain a probablement été causé par un flux génétique restreint récent (Vilune et al. 1999).

D'autre part, une différenciation morphologique considérable, qui peut être le résultat d'une divergence génétique, est observée au sein de l'espèce (Nowak 2003). De plus, deux études sur les loups gris d'Amérique du Nord ont signalé des modèles non aléatoires de flux génétique pouvant résulter de l'écologie et du comportement de l'espèce. Une étude sur la variabilité des microsatellites des loups gris du Nord-Ouest canadien (Carmichael et al. 2001) a révélé une structure génétique de la population, qui correspond avec les modèles de migration du caribou *Rangifer tarandus*, la principale proie des loups dans cette région. À plus grande échelle, ils ont montré que les types de végétation et le climat influencent les différences génétiques entre les populations de loups gris d'Amérique du Nord (Geffen et al. 2004). Les résultats de cette étude peuvent avoir été limitée par la petite taille de l'échantillon. Par conséquent, nous avons en outre étudié le problème de l'effet de l'environnement et des **facteurs écologiques** sur la structure génétique des populations de carnivores, sur la base d'un vaste échantillon de loups gris d'Europe de l'Est. Nous avons analysé la région de contrôle de séquences d'ADNmt et 14 locus microsatellites pour 643 individus de 59 localités, réparties dans une diversité d'habitats et de zones climatiques. **L'analyse des deux types de marqueurs a révélé une structure génétique de population non aléatoire.** Nous avons testé sa dépendance à l'égard des données historiques, des facteurs géographiques et écologiques, visant à identifier les mécanismes sous-jacents de la différenciation génétique entre les populations de loups.

MATERIEL ET METHODES

Échantillons

Nous avons analysé 643 échantillons de tissus de loups de 59 localités, situés dans 10 pays : Pologne, Lituanie, Lettonie, Biélorussie, Ukraine, la partie européenne de la Russie, la Slovaquie, la Bulgarie, la Grèce et la partie européenne de la Turquie. Ces localités représentent la majeure partie de l'aire de présence continue de l'espèce en Europe (voir la figure 4 dans les résultats). Le nombre d'échantillons dans une localité variaient de 2 à 37, avec une moyenne de 11. La plupart des échantillons (97%) datent des années 1995–2004. Les échantillons plus anciens (datés des années 1958 à 1994) étaient des peaux de loups tués par des chasseurs en Pologne. Un groupe de loups d'une localité sera appelée population locale (nous n'avons pas supposé qu'une population discrète se trouvait dans chaque localité ; cependant, la définition des groupes d'échantillons était nécessaire pour les analyses basées sur la population).

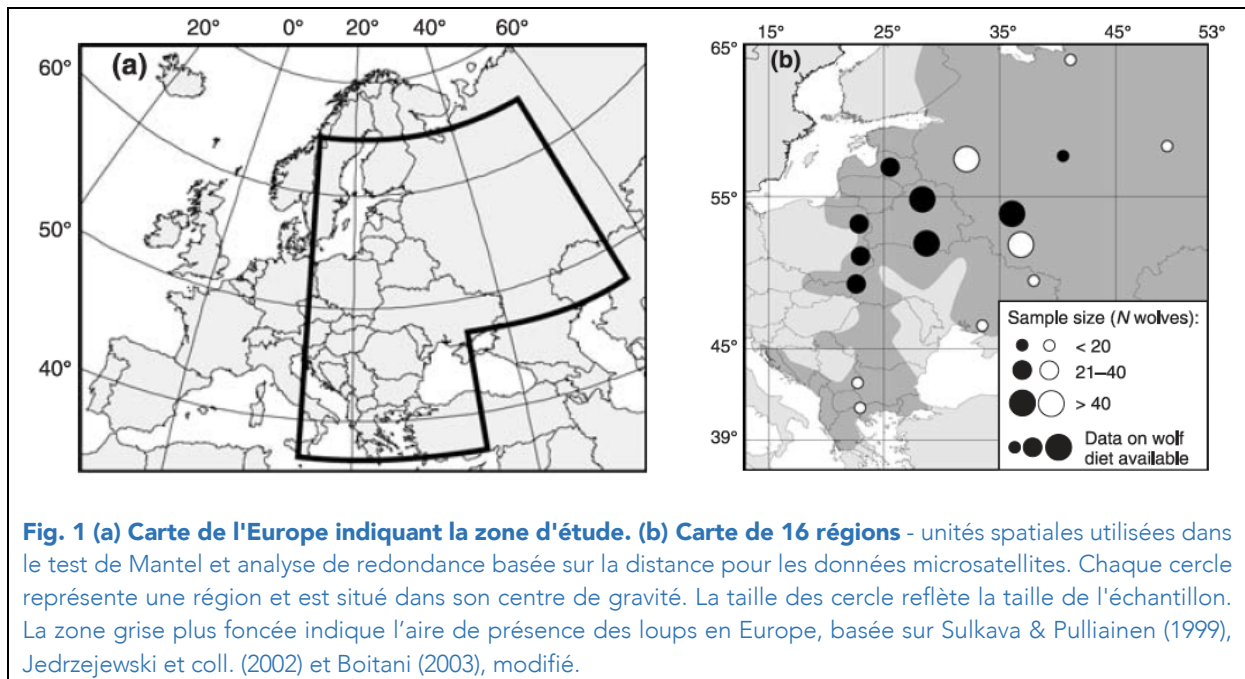


Fig. 1 (a) Carte de l'Europe indiquant la zone d'étude. (b) Carte de 16 régions - unités spatiales utilisées dans le test de Mantel et analyse de redondance basée sur la distance pour les données microsatellites. Chaque cercle représente une région et est situé dans son centre de gravité. La taille des cercles reflète la taille de l'échantillon. La zone grise plus foncée indique l'aire de présence des loups en Europe, basée sur Sulkava & Pulliainen (1999), Jedrzejewski et coll. (2002) et Boitani (2003), modifié.

RESULTATS

Variabilité génétique des loups d'Europe de l'Est

Nous avons trouvé 21 haplotypes de la région de contrôle de l'ADNmt parmi les échantillons analysés. Quatorze de ces haplotypes étaient déjà connus d'après des études antérieures (Vilà et al. 1999 ; Randi et al. 2000 ; Jedrzejewski et coll. 2005) **et sept ont été trouvés pour la première fois** (voir le tableau 1 pour les numéros d'accès GenBank). La plupart des localités (83%) avaient plus d'un haplotype et les localités voisines avaient souvent les mêmes haplotypes. Le nombre d'haplotypes trouvés dans une localité était corrélé avec le nombre d'échantillons analysés ($r = 0,60$, $P < 0,001$).

Le nombre total d'haplotypes dans la zone d'étude était estimée à partir de la courbe de raréfaction à 23 (estimation moyenne : $23,3 \pm 1,4$, médiane : 23,1, plage : 20,0–29,9).

La variabilité génétique des marqueurs nucléaires a été évaluée pour 545 échantillons génotypés avec succès pour au moins 11 sur 14 loci analysés (la plupart des échantillons pour lesquels le génotypage a échoué étaient les peaux tannées). Le nombre moyen d'allèles par locus dans la population totale était de 11 (intervalle 5–18). L'hétérozygotie observée, estimée à 0,71 (SD = 0,10) était plus faible que l'hétérozygotie attendue estimée à 0,78 (SD = 0,08), et la carence en hétérozygotes était significative ($P < 0,0001$; voir l'annexe I).

Relations phylogénétiques entre les haplotypes d'ADNmt

La diversité des nucléotides parmi les haplotypes de loup gris était de 0,017 (SD = 0,009) et la divergence moyenne des séquences intra-espèces était de 0,032 (SE = 0,013). La divergence de séquence nette entre loups et leurs plus proches parents sauvages, les coyotes, était de 0,334 (SE = 0,209). Le test du rapport de vraisemblance de Shimodaira & Hagesawa (1999) n'a pas rejeté l'hypothèse d'une horloge d'évolution des séquences analysées ($P = 0,11$). **Les relations phylogénétiques entre les haplotypes ont révélé la présence de deux clades principaux** (Fig. 2a). La plupart des individus (87%) avaient des haplotypes du clade 4-1. Les valeurs de prise en charge de Bootstrap étaient faibles, probablement en raison du petit nombre (15) de parcimonie entre les séquences de loups. Cependant, toutes les méthodes de construction d'arbres, ont fourni des topologies similaires et ont soutenu ces deux clades principaux. De plus, l'approche de réseau à portée minimale prise en compte, reflète mieux les relations phylogénétiques intraspécifiques que les arbres phylogénétiques (Crandall et al. 2000) ont également soutenu la subdivision des haplotypes en deux clades principaux (Fig. 2b).

Il n'y avait pas de modèle géographique clair dans la distribution des haplotypes : les gammes des deux clades s'étendaient sur la plupart de la zone d'étude. Ils indiquent que la population de loup d'Europe de l'Est, n'a pas de sous-unités géographiquement distinctes, qui seraient réciproquement monophylétique pour les haplotypes d'ADNmt, ce qui suggère qu'il n'y a pas d'évolution d'unités significatives (sensu Moritz 1994b). Les haplotypes précédemment signalés d'Europe occidentale tombent dans les deux principaux clades des haplotypes européens de l'Est : un haplotype de la Péninsule des Apennins (lu5 dans Vilà et al.1999n; W14 dans Randi et al. 2000) chute dans le clade 4-2 et les haplotypes de la péninsule Ibérique (lu1, lu3, lu4 dans Vilà et al.1999 ; W19, W20 dans Randi et al. 2000) tombent dans le clade 4-1. L'haplotype Scandinave (lu12 dans Vilà et al.1999) est identique à notre haplotype w1 (voir le tableau 1). Ainsi, également à l'échelle de l'Europe entière, il n'y a pas d'unités évolutives significatives. Dans les arbres des haplotypes de loups mondiaux (Vilà et al.1999 ; Leonard et al. 2005), les haplotypes des deux clades d'Europe de l'Est ne forment pas de branches monophylétiques, mais sont mélangés avec des haplotypes d'Asie et d'Amérique du Nord.

Tableau 1 : Fréquences en pourcentage des haplotypes d'ADNmt parmi les sous-populations de loups en Europe de l'Est. Le nombre d'échantillons, les haplotypes différents et les haplotypes uniques, ainsi que la diversité des haplotypes et la richesse allélique sont indiqués pour chaque sous-population. Les haplotypes communs dans chaque sous-population sont indiqués en gras. Pour les haplotypes trouvés dans des études antérieures, les numéros d'identification précédemment attribués sont donnés : « lu » désigne les noms d'haplotype de Vilà et al. (1999) et « RW » de Randi et al. (2000). AF344300 et AF098123 sont les numéros d'accèsion des haplotypes GenBank de Jedrzejewski et al. (2005) et une étude non publiée de B. F. Koop et collaborateurs, respectivement. Les numéros d'accèsion des nouveaux haplotypes trouvés dans cette étude, sont indiqués par des astérisques.

Haplotype	Subpopulations										ID
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
w1	67.1	20.2	6.5	20.0		18.2		4.9			lu12, RW8
w2	11.3	5.6	20.3					2.5			AF344300
w3	10.3	15.7	64.0			9.1					lu8
w4	1.1	2.3	2.0	15.0		63.6	11.1			27.8	lu7, RW4
w5	0.7	2.3	2.0	10.0							lu13, RW13
w6		1.1						85.4	25.0	5.6	RW16
w7	6.4	44.9	4.6	5.0	100						lu17
w8	1.1	3.4									AY842293*
w9	0.3										AF098123
w10	0.3			50.0						16.7	lu3, RW9
w11		1.1				9.1					RW17
w12	0.3	3.4									DQ421802*
w13										22.2	lu10, RW5
w14									75.0		lu6
w15							88.9				DQ421803*
w16								2.4		5.5	RW1
w17										22.2	DQ421804*
w18								2.4			DQ421805*
w19			0.6								RW18
w20								2.4			DQ421806*
w21	1.1										DQ421807*
N samples	283	89	153	20	11	11	9	41	8	18	
N different haplotypes	11	10	7	5	1	4	2	6	2	6	
N unique haplotypes	2	0	1	0	0	0	1	2	1	2	
Haplotype diversity	0.52	0.73	0.55	0.71	0	0.60	0.22	0.27	0.43	0.84	
Allelic richness	2.01	3.01	1.94	2.76	0	2.40	0.89	1.14	1.00	3.58	

Bien que la différenciation de la population de loups d'Europe de l'Est, ne soit pas assez forte pour former réciproquement des sous-unités monophylétiques, les fréquences haplotypiques diffèrent substantiellement entre les populations locales. Une permutation catégorique d'analyse de contingence de l'ensemble du réseau, a rejeté la valeur nulle de l'hypothèse d'absence d'association avec la situation géographique ($P < 0,0001$), ce qui indique une différenciation de la population. Pour trois clades, le NCA a indiqué un flux génétique restreint avec un isolement avec la distance. Sur le reste

des résultats significatifs, la NCA a montré des événements passés d'expansion de l'aire de répartition en cinq clades de niveaux différents (Fig. 2b ; Annexe II).

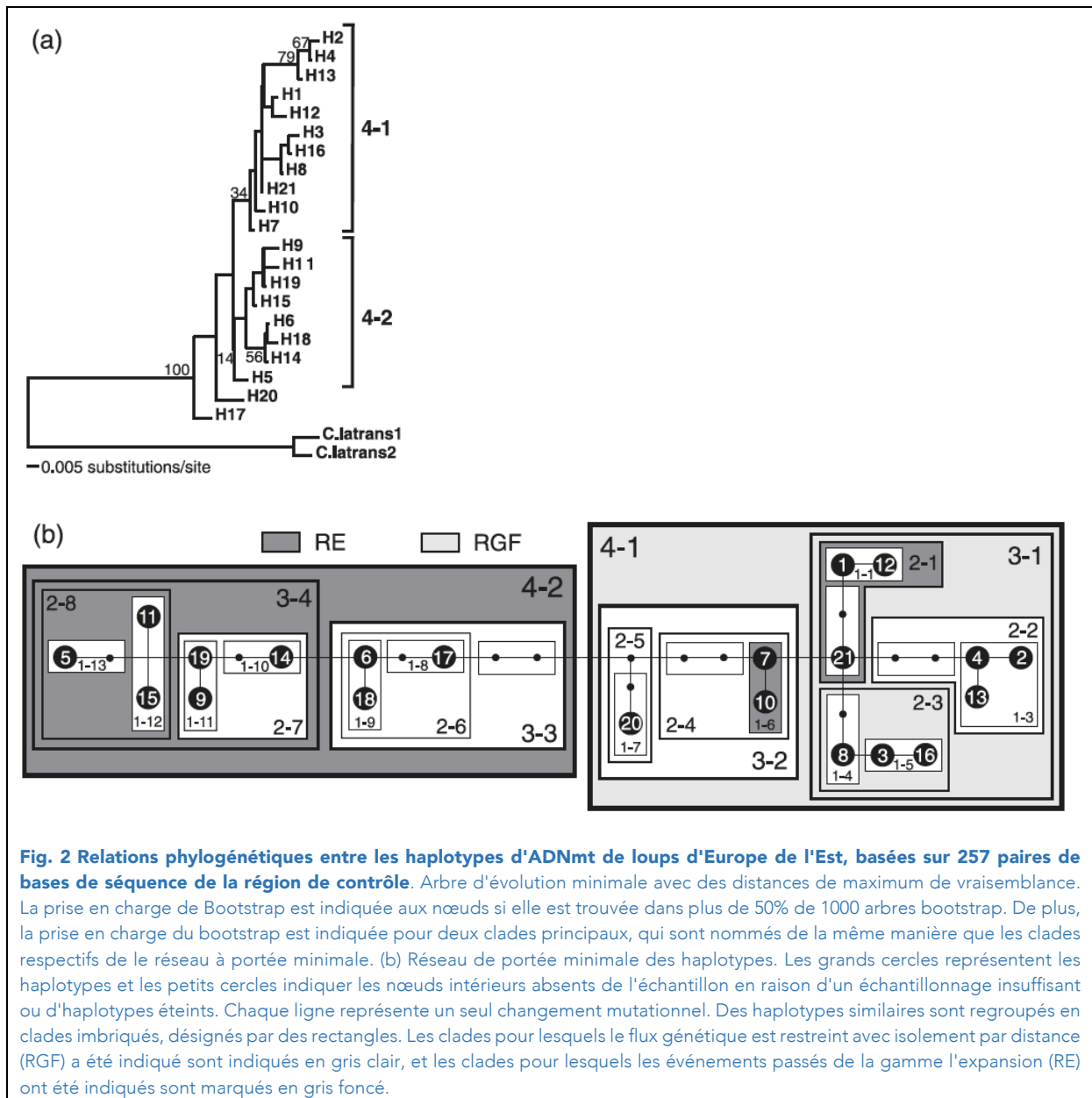


Fig. 2 Relations phylogénétiques entre les haplotypes d'ADNmt de loups d'Europe de l'Est, basées sur 257 paires de bases de séquence de la région de contrôle. Arbre d'évolution minimal avec des distances de maximum de vraisemblance. La prise en charge de Bootstrap est indiquée aux nœuds si elle est trouvée dans plus de 50% de 1000 arbres bootstrap. De plus, la prise en charge du bootstrap est indiquée pour deux clades principaux, qui sont nommés de la même manière que les clades respectifs de le réseau à portée minimale. (b) Réseau de portée minimale des haplotypes. Les grands cercles représentent les haplotypes et les petits cercles indiquent les nœuds intérieurs absents de l'échantillon en raison d'un échantillonnage insuffisant ou d'haplotypes éteints. Chaque ligne représente un seul changement mutationnel. Des haplotypes similaires sont regroupés en clades imbriqués, désignés par des rectangles. Les clades pour lesquels le flux génétique est restreint avec isolement par distance (RGF) a été indiqué sont indiqués en gris clair, et les clades pour lesquels les événements passés de la gamme l'expansion (RE) ont été indiqués sont marqués en gris foncé.

Structure génétique de la population déduite de l'ADNmt

Les résultats de l'analyse spatiale de la variance moléculaire (samova), a indiqué une structure génétique importante de la population pour chaque nombre supposé de groupes, de 2 à 20 ($P < 0,00001$ dans chaque cas). Dans un graphique de l'évolution des valeurs de Paramètres Φ -statistiques avec K, la plus forte augmentation de la valeur Φ_{CT} entre $K = 9$ et $K = 10$, et tous les paramètres des statistiques Φ stabilisées à partir de $K = 10$ (Fig. 3). Ainsi, nous avons identifié $K = 10$ comme le nombre le plus probable de groupes. Dans la subdivision en 10 groupes déduits par la procédure samova, certains groupes n'étaient pas géographiquement homogène, car certaines localités ont été placées dans la zone d'autres groupes. Cependant, après avoir modifié cette subdivision de manière à recevoir géographiquement des sous-populations homogène, nous avons encore reçu une subdivision très importante ($\Phi_{CT} = 0,37$, $P < 0,00001$; Tableau 2 et Fig.4) qui était supposée être la structure génétique de la population la plus probable. Les sous-populations identifiées de cette manière, différaient considérablement dans la composition des haplotypes (tableau 1) et dans les caractéristiques environnementales, comme indiqué par les valeurs des variables environnementales analysées pour les localités au sein de chaque sous-population (tableau 3).

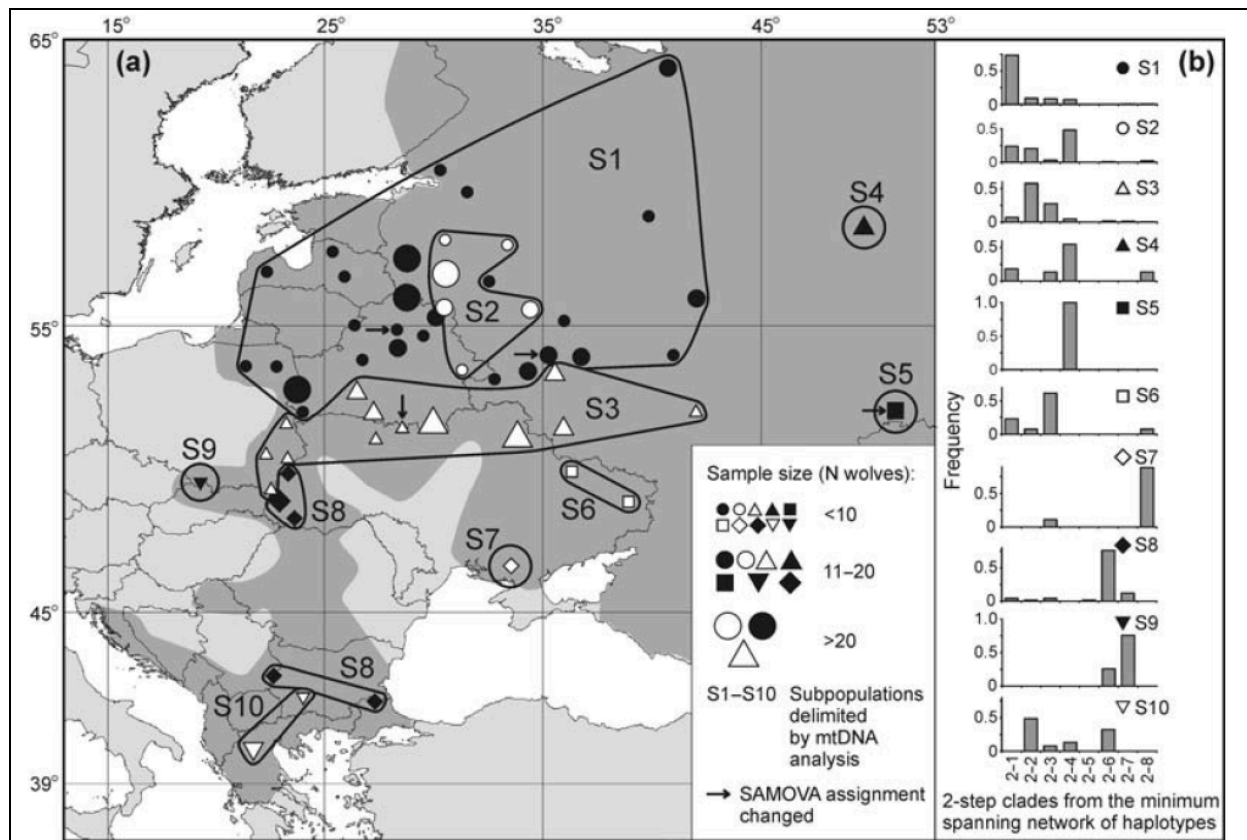


Fig.4 (a) : Sous-populations de loups d'Europe de l'Est délimitées sur la base des fréquences des haplotypes d'ADNmt, dans le contexte de la gamme continue du loup (zone grise plus foncée). Chaque symbole représente une population locale et est situé dans son centre de gravité. La taille d'un symbole reflète la taille de l'échantillon. Différents symboles représentent des populations locales affectées à différents groupes par la procédure samova. Les flèches indiquent les populations locales pour lesquelles l'attribution originale de samova a été modifiée pour recevoir des groupes géographiquement homogènes. **(b)** Fréquence des haplotypes appartenant à différents clades en 2 étapes du réseau à portée minimale (voir Fig. 2) dans chaque sous-population.

Tableau 3 Climat, végétation potentielle et composition moyenne du régime alimentaire des loups dans les zones des sous-populations de loups S1 – S10. Les variables climatiques (température et pluviométrie) ont été calculées en tant que moyennes des localités étudiées au sein des sous-populations respectives. De même, la composition du régime alimentaire moyen du loup d'une sous-population a été calculée comme une moyenne des localités où la composition du régime alimentaire des loups était connue (voir le texte principal pour références). Seules les espèces de proies communes d'ongulés ont été considérées : l'orignal (A.a.), le cerf élaphe (C.e.), le chevreuil (C.c.) et le sanglier (S.s.). Les symboles de la végétation potentielle sont les suivants: BF, forêt boréale; TF, forêt feuillue tempérée et mixte; FS, forêt-steppe; ST, steppe; MF, forêt de montagne tempérée; MW, forêts et arbustes méditerranéens

Sub-population	Mean annual temperature (°C)	Mean temperature of January (°C)	Mean temperature of July (°C)	Mean annual rainfall (mm)	Potential vegetation	Mean wolf diet composition (%)			
						A.a.	C.e.	C.c.	S.s.
S1	5.4	-6.8	17.4	610	BF, TF	39	21	24	16
S2	4.4	-8.2	16.5	604	BF, TF	26	0	14	60
S3	6.7	-5.9	18.3	625	TF, FS	3	41	43	13
S4	1.8	-14.2	18.1	563	BF, TF				
S5	4.7	-13.6	22.5	363	ST				
S6	7.7	-6.5	21.0	472	ST				
S7	9.8	-1.5	21.6	450	ST				
S8	9.2	-1.7	19.3	663	MF	0	47	41	12
S9	8.1	-3.5	18.1	687	MF	0	46	50	4
S10	13.0	1.9	21.3	517	MW				

Structure génétique de la population déduite du loci microsatellite

Sur une série de 10 geneland avec des variables K, sept ont donné un nombre modal de 3 sous-populations, et trois ont donné un nombre modal de 4 sous-populations. Nous avons ensuite préformé 20 passages avec K = 3 et comparé la distribution des sous-populations inférées dans les exécutions suivantes. Les résultats de ces essais ont montré à l'échelle mondiale une bonne consistance. Dans cinq courses indépendantes, les individus ont été attribués de la même manière : deux sous-populations (A et B) étaient des sous-populations modales de 298 et 245 individus, respectivement (Fig. 5a). La troisième sous-population (C) était modal pour deux individus seulement et la majorité de la zone de cette sous-population correspondait à la partie de la zone d'étude sans individus échantillonnés (Annexe IIIa). Avec cinq essais supplémentaires, la sous-population C, était modal pour aucun des individus. Dans les 10 exécutions restantes, il était modal pour 1– 21 individus (selon la série) de neuf endroits, qui ne constituaient pas un groupe géographiquement homogène (Fig. 5b). Cela suggère que la sous-population C, est une « **population fantôme** », telle que définie par Guillot et al. (2005a), plutôt qu'une vraie sous-population.

Les sous-populations inférées dans les cinq essais indépendants étaient séparés par des zones de bordure étroites, indiquant des discontinuités génétiques (Fig. 5a et Annexe IIa). Les autres exécutions différaient de ce résultat modal dans l'affectation d'individus situés à proximité des zones frontalières entre sous-populations (Fig.5b), et - par conséquent - les frontières entre les sous-populations étaient moins droites (annexe IIIb). Les courses qui ont déduit le modèle le plus compliqué de la répartition des sous-populations, avec sous-population C qui n'était pas spatialement homogène, avait le plus de probabilité postérieure moyenne. Cependant, la répétabilité du résultat entre les exécutions peut être un meilleur indicateur de la réelle affectation à des sous-populations, que la probabilité moyenne postérieure (voir Coulon et al. 2006). L'emplacement général de deux sous-populations principales étaient cohérentes parmi les 20 essais, et 453 (83%) individus ont été affectés de la même manière dans toutes les séries (259 individus pour la sous-population A et 194 individus à la sous-population B). Sur les 92 individus restants, 67 ont été affectés à la sous-population A ou B, 23 à la sous-population A ou C, et deux individus ont été attribués aux sous-populations A, B ou C, selon la série (Fig. 5b).

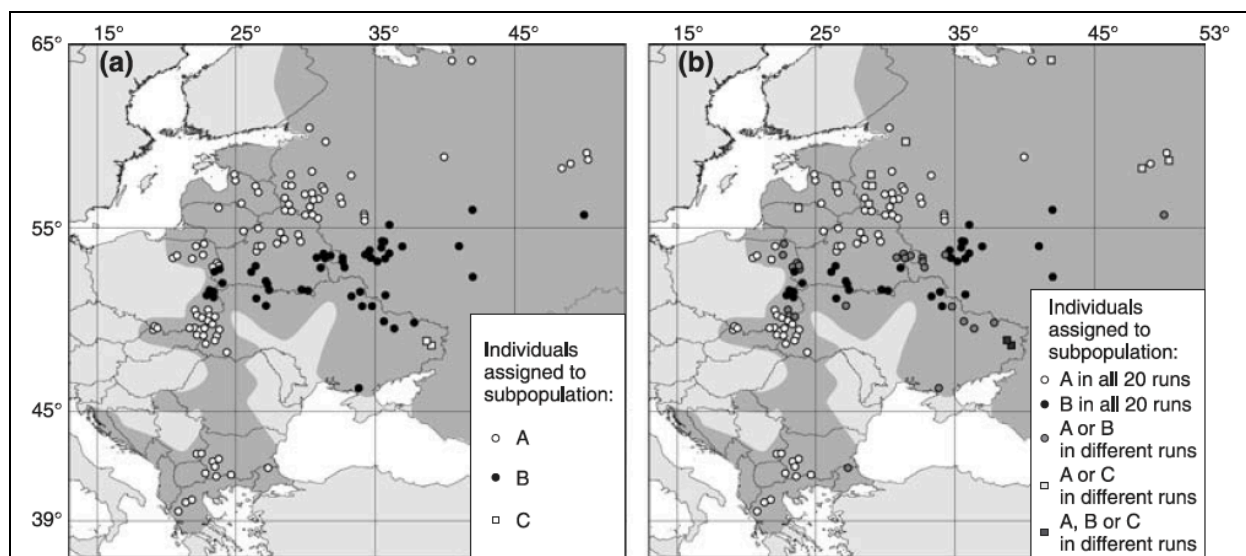


Fig. 5 Sous-populations de loups d'Europe de l'Est, délimitées sur la base des fréquences alléliques des loci microsatellites, sur le fond de l'aire de répartition continue du loup (zone grise plus foncée). (a) Modèle d'affectation d'individus, c'est-à-dire affectation qui a été déduite en cinq essais indépendants à l'aide du logiciel geneland. (b) Récapitulation des résultats de l'assignation des 20 essais. Les cartes sont basées sur 545 individus qui ont été génotypés avec succès. Chaque point représente un loup ou plusieurs loups du même endroit, et différents symboles représentent des sous-populations.

En raison de la grande cohérence des 20 séries exécutées, nous avons décidé qu'effectuer plus d'exécutions avec K = 3 serait inutile. Cependant, nous avons effectué trois autres séries avec K = 4. Ces essais ont indiqué deux sous-populations correspondant aux sous-populations A et B révélées

fonctionner avec $K = 3$. La troisième sous-population, correspondant à la sous-population C, n'était modale pour aucun des individus (une série) ou pour 13 individus de quatre endroits qui n'ont pas été regroupés dans l'espace (deux essais). La quatrième sous-population chevauchait spatialement la troisième et n'était pas modal pour tous les individus. Ce qui a confirmé que $K = 3$ était le nombre approprié de sous-populations.

Pour la structure génétique de chacune, déduite des 20 séries qui fonctionnent avec $K = 3$, nous avons effectué l'analyse de variance des molécules (amova). Amova a confirmé l'importance de la structure inférée par geneland ($P < 0,00001$ dans chaque cas), bien que la différenciation génétique entre les sous-populations fût faible (la F_{ST} variait de 0,014 à 0,024 selon l'analyse).

Isolation par la distance : ADNmt et microsatellites

La différenciation spatiale en fréquences haplotypiques, mesurée comme ST linéarisé par paires entre 59 localités, était significativement plus élevée que prévu pour une population **panmictique** et suivi de l'isolement par la distance (test de Mantel, $r = 0,149$, $P = 0,007$). La différenciation spatiale en fréquences d'allèles microsatellite, mesurés comme la distance génétique standard de Nei entre 16 régions, suivi également de l'isolement par la distance ($r = 0,241$, $P = 0,036$). Cependant, lorsque la distance génétique était mesurée comme F_{ST} linéarisée par paire, sa dépendance à l'égard de la distance était insignifiante ($r = 0,186$, $p = 0,078$).

La **panmixie** (Définition de WIKIPEDIA), en [génétique des populations](#), est le principe qui considère que les individus sont répartis de manière homogène au sein de la population et se reproduisent tous aléatoirement.

En d'autres termes, on considère qu'il n'y a aucune [sélection pré-zygotique](#), les [gamètes](#) de tous les individus de la génération considérée étant *poolés*. La formation de la génération suivante est donc le produit d'un [tirage aléatoire](#) dans ce [pool](#) gamétique.

Autrement dit, un individu appartenant à une population panmictique a autant de chances de se reproduire avec n'importe quel autre individu de cette population, au contraire de ce qui se passe dans les populations où des mâles ou femelles dominants jouent un rôle majeur en termes de reproduction.

Les espèces panmictiques posent des problèmes particuliers de [conservation](#), car ne pouvant être efficacement traités que sur une échelle globale. Parfois, au sein d'une même famille on peut identifier des espèces proches, les unes étant panmictiques, et les autres non.

Par exemple, chez l'anguille, l'étude des [microsatellites](#) a montré que l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) n'est pas panmictique, mais qu'elle présente des isolats génétiques induits par la distance entre l'aire de vie et de reproduction (mer des sargasses), alors que l'anguille américaine (*Anguilla rostrata*) semble bien panmictique (avec aucun isolement par la distance détecté). En Atlantique nord (Islande) des hybrides existent. Ces trois populations ont depuis les années 1970 perdu une grande partie de leur effectif, ce qui a déjà dû se produire dans le passé selon les études de diversité génétique de ces espèces, avec un étranglement populationnel lors de la glaciation dite « du Wisconsin », ce qui laisse penser que l'anguille est particulièrement sensible aux changements climatiques qui, il y a 20 000 ans, ont affecté la force et la forme du [Gulf Stream](#).

Dépendance de la diversification génétique aux variables de l'environnement : l'ADNmt

Un test sur l'influence de la latitude et de la longitude (traité comme covariables) sur la différenciation génétique des populations locale de loup, ont montré que les mesures Φ_{ST} par paires entre les localités dépendaient fortement de la latitude ($P = 0,0001$), mais pas de la longitude ($P = 0,48$). Comme en Europe, de nombreux facteurs changent le long de l'axe nord-sud, nous avons analysé un tableau de variables environnementales pour évaluer s'ils peuvent expliquer la différenciation génétique chez les populations locales au-delà de l'influence de la distance géographique. Dans les tests marginaux, deux ensembles de **variables environnementales** étaient significativement corrélées à la distance génétique : types de végétation et température (tableau 4a). Lorsque les coordonnées géographiques ont été prises en compte sous forme de covariables dans l'analyse de régression multiple, les **types de végétation** étaient encore significativement corrélés à la distance génétique, mais la température ne l'était pas (tableau 4a). Cependant, quand l'influence combinée des types de végétation et de température a été prise en compte, ces variables étaient significativement corrélées à la distance

généétique ($P = 0,01$) et a expliqué 43% de la variation génétique au-delà de l'influence de la distance géographique. De plus, la sélection avant procédure (Anderson 2003) qui classe les variables selon la proportion de variation expliquée, a ajusté les types de végétation et la température avant la distance géographique dans le modèle de régression multiple (tableau 4a).

Pour 17 localités situées dans la partie nord-ouest de la zone d'étude (dans les sous-populations S1 – S3, S8 et S9, voir Fig.4), **nous avons pu analyser l'influence d'un autre facteur : la composition du régime alimentaire**. Pour ces 17 localités, quatre des ensembles de variables environnementales étaient corrélés avec les distances : coordonnées géographiques, température, précipitations, et types de végétation (tableau 4a). La composition du régime alimentaire du loup n'était pas corrélée significativement avec la distance génétique. Cependant, lorsque seule la fréquence d'une espèce de proie, le cerf élaphe, a été pris en compte dans le régime alimentaire, la corrélation était marginalement significative ($P = 0,057$) et 20% des variations génétiques était expliqué par ce facteur. Lorsque les coordonnées géographiques ont été prises en compte sous forme de covariables dans l'analyse de régression multiple, seuls les types de végétation étaient significativement corrélés à la distance génétique (tableau 4a). Cependant, nous avons constaté qu'une combinaison de températures, de précipitations, de types de végétation et une fréquence de cerf élaphe dans le régime alimentaire, explique 54% de la variation génétique des localités ($P = 0,008$), considérées comme un ensemble dans le test conditionnel où les coordonnées géographiques étaient incluses comme covariables. De plus, toutes les variables ci-dessus ont été classées comme plus importantes que la distance géographique par la procédure de sélection anticipée (tableau 4a).

Dépendance de la diversification génétique et variables environnementales : locus microsatellites

De même que dans le cas de l'ADNmt, la distance génétique par paire entre les régions calculées pour les locis microsatellites dépendait de la latitude ($P = 0,002$ pour distance D_S et $P = 0,003$ pour F_{ST}), mais pas de la longitude ($P = 0,236$ et $0,156$, respectivement). Dans les tests marginaux, seules les précipitations étaient significativement corrélées avec la distance génétique mesurée par paire F_{ST} ($P = 0,023$). Il était également légèrement corrélé à la distance génétique de Nei ($P = 0,058$), alors que les autres variables n'étaient pas corrélées (Tableau 4b, c). Lorsque la distance géographique a été prise en compte sous la forme d'une covariable dans l'analyse de régression multiple, les types de végétation étaient corrélés avec la distance génétique Nei et avec F_{ST} par paire ($P = 0,005$ et $0,042$, respectivement), mais d'autres variables n'étaient pas corrélées avec toute les mesures de distance génétique (tableau 4b, c). L'influence des types de végétation expliquent 53% de la variation génétique mesurée comme la distance génétique de Nei et 47% de la variation génétique mesurée par paire F_{ST} , au-dessus de l'influence de la distance génétique. À l'opposé de la variation génétique mesuré pour l'ADNmt, si les types de végétation et la température ont été analysés ensemble, ils n'étaient pas corrélés avec la distance génétique.

Dans le cas de la distance génétique de Nei, la procédure a ajusté la sélection directe des types de végétation, avant la distance géographique et les autres variables dans le modèle de régression multiple (Tableau 4b, c). Dans ce test, ni la distance géographique ni la température n'était significative, lorsque l'influence des types de végétation ont été pris en compte. Les deux résultats du test conditionnel et de la procédure de sélection anticipée ont indiqué que l'influence des types de végétation explique la proportion substantielle de variation génétique au-delà de l'influence de la distance génétique. Dans le cas du F_{ST} par paire, la distance géographique a été ajustée avant les types de végétation (Tableau 4b, c). **Cependant, dans les deux cas, l'influence des types de végétation expliquent d'avantage la variation génétique que l'influence de la distance géographique.**

Pour huit régions de la partie nord-ouest de l'étude (voir Fig.1), **nous avons également analysé la corrélation des distances avec la composition du régime alimentaire du loup**. Pour ces huit régions, seule la température était corrélée à la distance génétique dans un test marginal ($P = 0,006$ pour la distance génétique de Nei et $P = 0,01$ pour F_{ST}). La composition du régime alimentaire du loup n'était pas corrélée à la distance génétique dans un test marginal, mais la procédure de sélection avant, l'a

installé juste après la température, dans le modèle de régression multiple, à la fois dans le cas de la distance génétique de Nei (tableau 4b) et du F_{ST} par paire (tableau 4c). Dans ce cas, la température et la composition du régime alimentaire du loup étaient significativement corrélés avec la distance génétique et expliquaient ensemble 98% et 99% de la variation génétique, respectivement, tandis que les autres variables étaient insignifiantes.

DISCUSSION

Nous avons constaté que la plupart des populations locales de loups d'Europe de l'Est avait plus d'un haplotype d'ADNmt et la plupart des haplotypes ont été largement diffusés. Ce résultat est contradictoire avec les études antérieures, basées sur un échantillonnage moins extensif, qui ont suggéré que la majorité des populations existantes en Eurasie ont qu'un seul haplotype (Wayne et al. 1992 ; Vilà et al. 1999). Cet écart peut s'expliquer par le fait que le nombre d'haplotypes trouvés dans une localité dépend du nombre d'échantillons analysés. Il peut également être important que les échantillons provenant de populations occidentales fortement fragmentées, prévalait dans les données analysées par Wayne et al. (1992) et Vilà et al. (1999), alors que ceux de l'aire de répartition des espèces en Europe de l'Est était limitée. En effet, Randi et coll. (2000) ont montré que les loups du sud-est et le nord-est de l'Europe sont plus différenciés (9 haplotypes ont été trouvés parmi 29 individus de Bulgarie et 3 haplotypes chez cinq individus de Finlande), ce qui est en accord avec nos résultats. Dans notre étude, le nombre d'haplotypes détectés est proche du nombre total attendu des haplotypes, estimés à partir de la courbe de raréfaction. Ce résultat indique que notre échantillon est représentatif de la population étudiée, car la plupart des haplotypes ont été détectés.

La distribution des haplotypes peut résulter des deux processus actuels et historiques. Ainsi, un aperçu de l'historique de la population est nécessaire pour une inférence appropriée sur les facteurs contemporains façonnant la structure génétique de la population. Selon les archives fossiles, les loups gris et les coyotes ont divergé il y a environ 2 millions d'années (Nowak 2003). Partant de cette date de divergence, une nette divergence de séquence entre ces espèces de 33,4% et une divergence de séquence moyenne des loup gris d'Europe de l'Est de 3,2%, une coalescence des haplotypes de loups d'Europe de l'Est, peut être approximativement estimée à 200 000 ans environ. Un tel temps de coalescence est conforme à celui estimé pour toutes les lignées de loups connues il y a 290 000 ans (Vilà et al. 1999), en tenant compte du fait que les loups européens représentent la plupart de ces lignées (Vilà et coll. 1999). Comme ce temps de coalescence est largement antérieur au dernier maximum glaciaire (il y a 17 000 à 21 000 ans), il implique que la plupart des haplotypes ont divergé avant la dernière glaciation. Ainsi, le modèle génétique actuel peut potentiellement résulter de processus survenus pendant et après les glaciations du pléistocène. L'un des plus importants processus historiques qui ont fortement influencé les modèles de différenciation génétique de nombreuses espèces, était l'isolement dans différents refuges glaciaires (Hewitt 1996, 2000 ; Taberlet et al. 1998). Cependant, la NCA n'a fourni aucune preuve d'un événement de fragmentation passé chez les populations de loup d'Europe de l'Est, et a indiqué que les événements passés d'expansion de l'aire de répartition comme principal facteur historique ont influencé la distribution actuelle des haplotypes. Il était impossible d'indiquer la direction de cette extension de plage, comme les résultats pour les différents clades ont indiqué des directions différentes et certains d'entre eux étaient en face de l'autre. Cela suggère une propagation non directionnelle d'haplotypes sur tout le continent. Ainsi, nous pouvons conclure que la différenciation de la population de loups en Europe de l'Est est le résultat d'un mélange passé (c.-à-d. une expansion de différents haplotypes dans différentes directions) et présentent un flux génétique restreint. Puisque les restrictions actuelles dans le flux génétique ont été identifiées comme un facteur déterminant la distribution d'haplotypes pour le clade 4-1, qui comprenait des haplotypes de la plupart (87%) des loups d'Europe de l'Est, cela indique la capacité de l'ADNmt pour révéler des modèles contemporains dans ce cas.

Les restrictions du flux génétique se reflètent dans la structure de la population, révélée par les fréquences d'haplotypes d'ADNmt par l'analyse de samova. Cette structure présente deux caractéristiques inhabituelles. Premièrement, la sous-population S8, connectée avec les montagnes, est

présenté comme ayant une gamme non continue (voir Fig.4). Cela est dû au manque d'échantillons provenant des Carpates Roumaines, situées entre les deux parties de cette sous-population. Deuxièmement, la sous-population S2 est située dans la fourchette de la sous-population S1, qui est un modèle inhabituel. Le modèle général de subdivision en sous-populations s'explique par l'influence de facteurs écologiques, mais les différences écologiques importantes entre les zones des sous-populations S1 et S2 ne sont pas évidentes. Cependant, il peut y avoir d'autres causes de l'existence d'une sous-population distincte S2 au sein de la sous-population S1. Pour exemple, une apparition récente d'un haplotype qui est nouveau pour une zone donnée (par exemple en raison de l'immigration) peut entraîner une apparition temporaire d'une « île » de sa forte concentration qui peut être reconnue comme une sous-population distincte. Le fait que la sous-population S2 n'a pas été reconnue comme une sous-population basée sur l'analyse des microsatellites est cohérente avec cette explication. Si la sous-population S2 n'a pas été distinguée au sein de la sous-population S1, la structure de la population était encore très significative ($\Phi_{CT} = 0,34$, $P < 0,00001$; voir Tableau 2).

Une telle structure génétique de population distincte, indique une restriction de flux génétique, malgré les importantes capacités de dispersion des loups. L'étendue des gammes qui chevauche les principaux clades du réseau, à portée minimale, indiquent l'absence de caractéristiques géographiques dans le paysage qui constitueraient des barrières efficaces pour la dispersion des loups. **Donc, les restrictions du flux génétique doivent être causées par des facteurs autres que les barrières géographiques.** Les caractères distinctifs élevés des sous-populations peuvent être dans une certaine mesure un artefact de la méthode d'analyse. Les changements de fréquences des haplotypes peuvent être plus clinal, pas aussi discret que le suggère l'analyse samova. Cependant, les résultats montrent explicitement que la population n'est pas **panmictique**. De plus, il est peu probable que la différenciation de la population résulte de l'isolement par la seule distance, comme la différenciation génétique entre les loups de différentes localités était corrélée avec la latitude, mais pas avec la longitude. **Cela reflète l'influence des facteurs environnementaux, car en Europe, l'axe nord-sud est une direction de changements importants pour de nombreuses variables environnementales, comme les types de végétation, la température et l'épaisseur de la couverture de neige.** La variation de la morphologie, de la taille et de la couleur des loups de l'Ancien Monde est également plus importante, le long de l'axe nord-sud (Bibikov 1985; Nowak 2003). La dépendance de la différenciation génétique sur des variables environnementales cliniquement changeantes est en accord avec le modèle théorique de Doebeli & Dieckmann (2003), montrant que les processus d'évolution et de diversification peut conduire à une forte différenciation géographique le long des gradients environnementaux. Comme les environnements dégradés que nous considérons avoir existé pendant une période de temps prolongée, ils sont susceptibles d'être reflétés dans l'ADNmt, malgré sa variabilité relativement faible.

Surtout, le même résultat - corrélation de la distance génétique entre les populations de loups avec la latitude et les variables environnementales - a été obtenu sur la base des locus microsatellites. Cela indique que ce modèle est indépendant du type de marqueurs et du chemin pour délimiter des groupes d'échantillons. Cependant, la structure des locus microsatellites de population génétique était moins prononcée et moins de sous-populations ont été délimitées que dans le cas de l'analyse de l'ADNmt. Les différences de degré de structuration dans l'ADN mitochondrial et nucléaire ont également été observés dans les populations de loups gris d'Amérique du Nord, qui ont été regroupées en grappes lors du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP) lorsque des profils d'ADNmt ont été pris en compte, mais n'ont pas affiché de regroupements similaires basés sur l'analyse des microsatellites (Geffen et al. 2004). Le contraste entre les profils d'ADN mitochondrial et nucléaire a également été signalé pour d'autres animaux, par exemple : la tortue verte, *Chelonia mydas* (Karl et al. 1992), la salamandre élancée d'Oregon, *Batrachoseps wrighti* (Miller et al. 2005), l'ours brun, *Ursus arctos* (Waits et al. 2000), et le carcajou, *Gulo gulo* (Chappell et al. 2004). Ils sont généralement expliqués par des différences de dispersion entre les mâles et les femelles (Karl et al. 1992 ; Avise 1994 ; Moritz 1994a) : le flux génétique biaisé par les mâles implique une faible introgression des haplotypes d'ADNmt de populations voisines, et donc une plus grande structuration en ADNmt par rapport aux marqueurs nucléaires. C'est aussi une explication possible des résultats obtenus dans notre étude, car

certaines données montrent que la dispersion sur de longues distances peut être biaisée par les mâles chez les loups (Wabakken et al. 2001 ; Flagstad et al. 2003 ; Jedrzejewski et coll. 2005). Les différences mitochondriales et les modèles d'ADN nucléaire peuvent également résulter du fait que la taille effective de la population d'ADNmt est quatre fois plus petite que celui de l'ADN nucléaire, et donc la variabilité de l'ADNmt est plus sensible à la dérive aléatoire qu'à la variabilité d'ADN nucléaire (Avice et al. 1984). Ainsi, la diversification génétique résultant d'un gène limité n'a pas totalement empêché le débit peut être plus prononcé dans les fréquences haplotypes d'ADNmt que dans la variabilité des loci microsatellites.

Il est également possible qu'un petit nombre d'échantillons de la partie Sud et Est de la zone d'étude ait empêchée la détection de sous-populations distinctes là-bas (Fig. 5). Au contraire, la partie nord-ouest de la zone d'étude était largement échantillonnée, et donc la discontinuité génétique entre les sous-populations A et B était fortement soutenue par les données. Il est important que l'emplacement de cette zone frontalière soit similaire à l'emplacement de la frontière entre deux plus grandes sous-populations, S1 et S3, délimitées sur la base de l'analyse de l'ADNmt. Dans le domaine de cette discontinuité génétique, il n'y a pas d'obstacles évidents au flux génétique, et le fait qu'il soit situé sur l'axe horizontal, suggère qu'il soit causé par des variables environnementales changeantes, le long du gradient sud-nord. L'influence du changement progressif des variables environnementales expliqueraient également pourquoi l'emplacement des zones frontalières déduites de l'ADNmt et de l'analyses des microsatellites ne sont pas exactement les mêmes : en l'absence d'une barrière absolue, un certain niveau de mélange doit se produire, et la vraie discontinuité n'est probablement pas aussi nette que les résultats des deux analyses l'indiquent.

La dépendance de la différenciation génétique sur le climat et les variables écologiques suggèrent un lien entre les processus spatio-temporels et génétiques, qui étaient auparavant suggéré pour un autre grand carnivore mobile, le lynx canadien (Rueness et al. 2003b ; Stenseth et al. 2004a, b). Il a été démontré que les modèles génétiques démographiques et de la population peuvent être influencés par l'interaction entre un carnivore et ses proies (loup : Carmichael et al. 2001 ; lynx : Stenseth et coll. 2004b). Un mécanisme possible qui peut expliquer comment la composition de la communauté des ongulés peut influencer la dispersion des loups (et donc les modèles de flux de gènes) est la sélection différentielle des proies. Dans les systèmes multi-proies, certaines espèces de proies peuvent être préférées à d'autres (Carbyn 1983 ; Potvin et coll. 1988 ; Dale et coll. 1994 ; Kunkel et coll. 2004). Dans le nord-est de l'Europe, trois cervidés - cerf élaphe, orignal, et chevreuil - dominant le régime alimentaire des loups (Okarma 1995). Une sélectivité positive pour le cerf élaphe et la forte réponse fonctionnelle à une augmentation des densités de cerfs rouges a été observée (Okarma 1995 ; Jedrzejewski et al. 2000) et l'abondance de cette espèce dans le régime alimentaire du loup était corrélée à la structure génétique dans nos tests. Cela suggère que les différences de stratégie de chasse des proies de différentes tailles, peut conduire à une spécialisation locale des proies, et donc à la différenciation génétique chez les loups.

Réponse fonctionnelle vs réponse numérique

Réponse fonctionnelle : impact de la prédation sur les proies ; il y a 3 types de réponses fonctionnelle.
Réponse numérique : l'influence des proies sur le nombre de prédateur.

Un lien entre la structure génétique de la population et la spécialisation des proies a déjà été suggérée pour les loups du nord-ouest du Canada (Carmichael et al. 2001). Selon cette étude, chaque meute de loups est liée à un troupeau de caribous, et donc les routes migratoires du caribou sont reflétées dans la structure génétique des populations de loups. Un autre cas de lien entre différenciation génétique et spécialisation des proies est connue chez le renard arctique. La structure de population génétique de cette espèce est conforme à la subdivision en deux écotypes : l'écotype « lemming » qui se nourrit principalement de lemmings et l'écotype « côtier » qui se nourrit principalement sur les œufs, les oiseaux et les charognes de l'écosystème côtier (Dalén et al. 2005). De même, une différenciation génétique significative a été trouvée entre deux groupes d'épaulards *Orcinus orque* survenu dans la

même zone, mais spécialisés dans la recherche de nourriture sur les poissons ou sur les mammifères marins (Hoelzel et al. 1998).

Comme la composition de la communauté ongulé dépend du type d'habitat, le même mécanisme peut conduire à la dépendance de la différenciation génétique des loups sur ces deux facteurs. Comme suggéré par Geffen et al. (2004), la dispersion des loups peut être biaisée par l'habitat. Les jeunes individus souvent restent longtemps dans leurs packs natals (Mech & Boitani 2003), et apprennent à s'attaquer aux animaux caractéristiques de l'habitat où ils vivent. Le fait que les jeunes loups ont observé ou aidé à la chasse d'espèces particulières, peut entraîner leur volonté ultérieure de choisir ces espèces pour proies et de choisir des habitats où ces espèces particulières sont abondantes, ce qui augmentera leurs chances de survie (Gese et Mech 1991). En effet, certains auteurs suggèrent que cette expérience et cet apprentissage aident les loups à réussir à attaquer leur proie et à éviter d'être blessé (Mech & Peterson 2003 ; Peterson et Ciucci 2003). De même, les études sur le lynx canadien ont suggéré que les individus familiers avec les conditions des proies dans une certaine zone, resteraient dans une zone de conditions similaires lors de la dispersion, car il y a un coût pour le processus d'apprentissage de l'utilisation d'un nouvel habitat, ce qui réduit la probabilité de succès reproductif (O'Donoghue et al. 2001). Les différences de reproduction et de mortalité dans les zones avec des proies connues ou inconnues peut conduire à un lien entre les types d'habitats, la composition du régime et les modèles de dispersion.

L'hypothèse selon laquelle la dispersion des loups pourrait être biaisée par l'habitat est en outre soutenue par le fait que l'un des processus les plus courants de formation de meute est appelé « **bourgeoisement** », qui se traduit par la mise en place d'une nouvelle meute proche de la meute parentale (Mech & Boitani 2003 ; Jedrzejewski et al. 2004), qui favorise une sélection d'habitats similaires par les individus. La dispersion biaisée par l'habitat natal était également suggérée pour les coyotes, comme l'explication la plus probable de structure génétique de la population qui correspond à une rupture d'habitat (Sacks et al. 2004). Ainsi, biaisé par l'habitat natal, la dispersion et la spécialisation des proies peuvent induire une association entre les types d'habitats, la composition du régime alimentaire et la structure génétique de la population.

De plus, comme l'ont montré des études sur le lynx canadien, les conditions de neige sont le facteur climatique qui influence directement les interactions prédateur-proie et peuvent donc influencer les patrons génétiques de la population par dispersion non aléatoire (Stenseth et al. 2004b). Les conditions de neige peuvent jouer le même rôle dans la différenciation génétique d'autres grands prédateurs, trouvés dans les habitats avec de longues saisons hivernales enneigées (Stenseth et al. 2004b). En effet, notre étude a montré qu'en plus des types d'habitats et la composition des proies, la structure génétique de la population de loups d'Europe de l'Est est influencée par la température, qui est un des principaux facteurs régissant les conditions de neige. Bien qu'aucun de ces facteurs environnementaux et écologiques ne constitue une barrière absolue au flux génétique, leur influence combinée peut conduire à une différenciation de la population.

Basé sur un exemple d'espèce de carnivores très mobile et largement distribué, nous avons montré qu'une structure génétique peut se produire dans les régions où les changements environnementaux sont progressifs et n'empêchent pas le flux génétique. Nos résultats soutiennent le corpus croissant de littérature qui démontre l'influence de facteurs écologiques tels que les types d'habitat et la composition du régime alimentaire sur les modèles géographiques de variation génétique au sein d'une espèce. Cela indique l'importance d'études complémentaires visant à comprendre les mécanismes qui relient l'écologie de la population et sa structure génétique.