

## Différenciation alimentaire et évolution de la structure génétique de population d'un carnivore très mobile

OPEN ACCESS Freely available online



### Dietary Differentiation and the Evolution of Population Genetic Structure in a Highly Mobile Carnivore

**Małgorzata Pilot<sup>1,2</sup>, Włodzimierz Jędrzejewski<sup>3,4</sup>, Vadim E. Sidorovich<sup>5</sup>, Wolfram Meier-Augenstein<sup>6</sup>, A. Rus Hoelzel<sup>1\*</sup>**

1 School of Biological and Biomedical Sciences, Durham University, Durham, United Kingdom, 2 Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences, Warszawa, Poland, 3 Mammal Research Institute, Polish Academy of Sciences, Białowieża, Poland, 4 Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Centro de Ecología, Caracas, Venezuela, 5 Institute of Zoology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus, 6 Stable Isotope Laboratory, James Hutton Institute, Invergowrie, Dundee, United Kingdom

**Citation:** Pilot M, Jędrzejewski W, Sidorovich VE, Meier-Augenstein W, Hoelzel AR (2012) Dietary Differentiation and the Evolution of Population Genetic Structure in a Highly Mobile Carnivore. PLoS ONE 7(6): e39341. doi:10.1371/journal.pone.0039341

#### Résumé

Des études récentes sur les carnivores très mobiles ont révélé des structures génétiques cryptiques de population, corrélées aux transitions entre des types d'habitats et de composition d'espèces proies. Cela a conduit à l'hypothèse selon laquelle la dispersion biaisée par l'habitat natal, pourrait être responsable de générer une structure génétique de population. Cependant, des preuves directes de la différenciation écologique et génétique concordante entre les populations de mammifères très mobiles sont rare. Pour y remédier, nous avons analysé les profils isotopiques stables (valeurs  $\delta^{13}\text{C}$  Carbone et  $\delta^{15}\text{N}$  Nitrogène) pour les loups d'Europe de l'Est (*Canis lupus*) comme mesure indirecte quantifiable de l'alimentation des individus génotypés dans une étude antérieure (montrant une structure génétique cryptique), pour fournir une évaluation quantitative de la relation entre le comportement alimentaire individuel et le génotype. Nous avons trouvé une corrélation significative entre les distances génétiques et la différenciation alimentaire (expliquant 46% de la variation) à la fois dans le test marginal et surtout, lorsque la distance géographique a été comptabilisée comme une co-variable. Ces résultats, interprétés dans le contexte d'autres mécanismes possibles comme l'allopatrie et l'isolement par la distance, renforcent les études antérieures, suggérant que le régime alimentaire et le choix d'habitat associé, influencent la structuration des populations de carnivores très mobiles.

#### INTRODUCTION

Des études récentes sur des mammifères carnivores très mobiles ont révélé des structures génétiques cryptiques de population, corrélées à la transition entre divers types d'habitats et la composition des espèces de proies [1–10]. Par exemple, chez le lynx canadien *Lynx canadensis*, trois des unités génétiquement distinctes ont été révélées dans toute la gamme de l'espèce, qui correspondait à trois populations démographiquement distinctes, chacune avec des cycles de population synchronisés, habitant trois régions climatiques [1]. Une étude plus approfondie a suggéré que le différentiel des conditions de neige entre ces régions entraînent différentes dynamiques du lynx et de sa principale proie, le lièvre d'Amérique *Lepus americanus*, qui désynchronise les cycles de population entre régions et conduit à une structure génétique [2]. Les autres exemples montrent une différenciation génétique, qui semble être directement corrélée à la spécialisation des proies. Dalén et coll. [4] a démontré que la structure génétique du renard arctique *Alopex lagopus* tout au long de sa gamme, correspond à deux écotypes dont un spécialisé sur les lemmings et un autre se nourrissant de nourriture côtière. La différenciation des habitats et l'alimentation ont également été démontré être en corrélation avec la structure génétique chez le loup gris *Canis lupus* [7–10]. Des exemples similaires peuvent être trouvés chez certains Odontocetes sociaux (baleine à dents), espèces qui montrent également des subdivisions de population cryptiques, corrélant avec la structure de l'habitat ou les spécialisations des proies (voir revue dans [11]). Pour l'épaulard *Orcinus orca*, il a été proposé qu'apprendre comment et où exploiter

des ressources de proies fiables, favorise la **philopatrie** et conduit à la différenciation génétique entre les populations sympatriques et **parapatriques**, qui se spécialisent sur différentes ressources de proies [12].

On pourrait soutenir que la différenciation, par rapport à l'alimentation, peut être attendue parmi les populations, suffisamment isolées pour les différencier génétiquement, et qu'il n'y a peut-être pas de relation de cause. Cependant, la spécialisation de la ressource, corrélée à la structure génétique de la population, n'est pas toujours le cas. Pour exemple, les huîtres pie (*Haematopus ostralegus*) spécialistes d'un habitat sympatrique n'ont montré aucun signe de différenciation génétique (contrairement aux épaulards spécialistes sympatriques, voir ci-dessus) [13], et le modèle de la spéciation parmi les espèces fraternelles de poissons à triple nageoire (Tripterygiidae) n'a pas toujours suivi les attentes, en fonction des spécialisations des ressources [14]. Il est nécessaire de définir les mécanismes spécifiques, afin de mieux comprendre pourquoi l'isolement reproductif est promu dans certains cas et pas dans d'autres.

Un mécanisme candidat, conduisant à une différenciation génétique, basée sur la spécialisation des ressources, a une dispersion biaisée vers des ressources ou des habitats. Une dispersion non aléatoire, éventuellement dirigée vers un habitat convenable ou l'acquisition de ressources, peut conduire à une structuration et une différenciation évolutive, par dérive génétique. Pour exemple, l'étude d'une population locale de mésanges charbonnière *Parus major* ont montré que la dispersion non aléatoire causée par les différences de qualité d'habitat, peut renforcer la différenciation évolutive rapide, à des échelles spatiales étonnamment petites, par rapport à la dispersion de l'aire de répartition de l'espèce [15]. Les études comportementales sur un large éventail de taxons animaux, indiquent que les animaux en dispersion ont des préférences vers des habitats contenant des indices comparables à ceux de leur habitat de naissance [16]. Cependant, la plupart des preuves recueillies jusqu'à présent indiquent que l'habitat et / ou la différenciation alimentaire peut favoriser indirectement la différenciation génétique des marqueurs neutres, d'après des études corrélatives de populations, vivant dans des conditions écologiques différentes. Les preuves plus directes sont rares, mais une étude combinant le suivi direct des coyotes individuels (*Canis latrans*) avec une différenciation génétique, a démontré que la sélection conservatrice de l'habitat, parmi les disperseurs individuels, a servi de mécanisme immédiat pour la structuration génétique [5].

Dans cette étude, nous avons analysé le régime alimentaire (tel que reflété dans les profils d'isotope stable) de loups gris européens individuels, avec des génotypes connus dans une zone où la structure génétique cryptique de la population a été révélée plus tôt. Pilot et coll. [7] ont étudié 643 loups sur 59 emplacements, représentant la plupart de la répartition de cette espèce en Europe de l'est, et ont trouvé une structure génétique de la population, corrélée avec le climat, le type d'habitat et la composition du régime alimentaire. Dans cette étude, la corrélation entre le choix des proies et la structure de la population était étudiée, en utilisant la part moyenne de quatre espèces de proies d'ongulés, dans le régime alimentaire des loups (basé sur les données publiées concernant la fréquence d'une espèce parmi les ongulés tués par les loups dans une zone donnée). Cependant, les données sur le régime alimentaire des loups n'étaient disponibles que pour 17 des 59 régions étudiées et, dans la plupart des cas, ils n'ont pas été collectés exactement dans la même localité que les échantillons pour les analyses génétiques. Pour les régions où la composition des proies n'a pas pu être incluse, une autre variable environnementale a été testée. Le type de végétation était la variable la plus importante en termes de **force** de corrélation, et de pourcentage de variation génétique expliqué [7].

Lorsque la composition du régime alimentaire peut être testée, la force de la corrélation dépendait des marqueurs génétiques utilisés (mitochondrial *vs* nucléaire). Cependant, parce que la composition en espèces d'ongulés (étant la proie de base des loups) dépend fortement du type d'habitat et du climat, les loups génétiquement différenciés devraient différer dans la composition du régime, soit en raison du choix des proies ou d'autre indice d'habitat en corrélation avec la composition des proies. Nous utilisons donc une analyse isotopique stable, pour obtenir des informations discrètes, sur l'alimentation

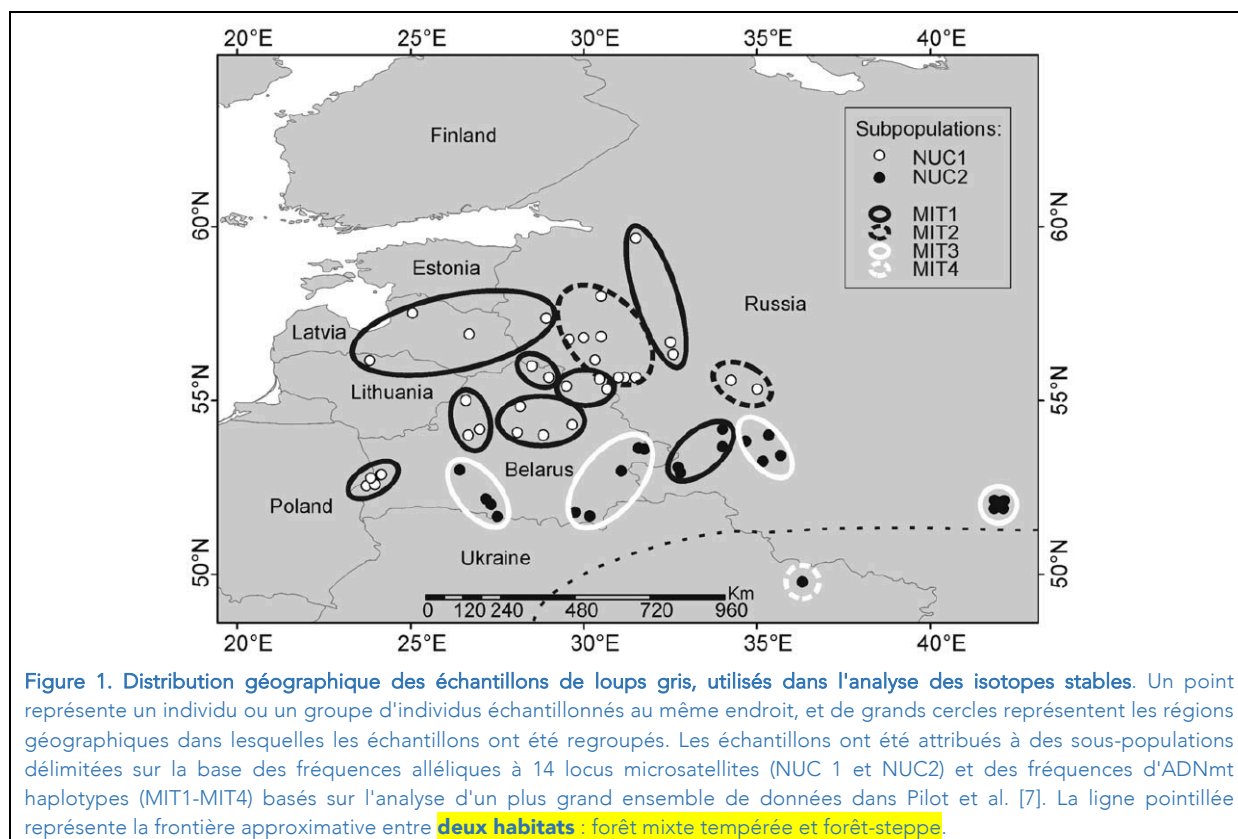
individuelle des loups, pour lesquels des génotypes de microsatellite et d'ADNmt ont été obtenus dans une étude antérieure [7]. Nous testons l'hypothèse selon laquelle les données alimentaires expliquent la plus grande proportion de variance génétique neutre, pour les populations de loups gris par rapport aux données sur la distance géographique - un résultat attendu si la différenciation des populations de loups est façonnée par des facteurs écologiques, plutôt que par les contraintes géographiques.

## MATERIELS ET METHODES

### Matériel

Nous avons analysé les profils isotopiques stables (exprimés en valeurs  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{15}\text{N}$ ) des tissus musculaires de 110 loups gris de Russie, Biélorussie, Lettonie, Ukraine et Pologne. Ils représentaient un sous-échantillon de 317 individus de 15 régions géographiques analysant la région de contrôle de l'ADN mitochondrial (ADNmt) et 14 locis microsatellites, par Pilot et al. [7]. Cette étude antérieure avait trouvé un soutien pour deux sous-populations cryptiques, telles que définies par les données ADN microsatellite (appelées ici NUC1 et NUC2), plus une subdivision basée sur les données de l'ADNmt (MIT1 - MIT4) [7].

Entre 4 et 15 échantillons ont été analysés dans chaque zone géographique, à l'exception de la région la plus au sud, CHAR, où un seul échantillon a été analysé. La répartition géographique des échantillons est présentée dans la figure 1. Le nombre d'échantillons analysés par région était limité par la disponibilité du matériel approprié (c'est-à-dire des échantillons de tissu musculaire conservés congelés). D'autres types de tissus n'ont pas pu être utilisés dans l'analyse comparative, en raison des différences de taux de renouvellement isotopique, et d'échantillons conservés dans l'éthanol, qui n'étaient pas adaptés à l'analyse. Comme le montre l'étude en l'Amérique du Nord sur les loups gris, la taille des échantillons  $n \geq 4$ , doit refléter correctement les profils isotopiques stables des populations locales [17]. Ces résultats concordent avec une autre étude réalisée pour le cerf à queue noire [18]. Tous les échantillons ont été collectés pendant la saison d'hiver (Novembre-mars) sur une période de 9 ans entre 1995 et 2004. Tous les individus étaient adultes ou subadultes, c'est-à-dire que tous étaient sevrés. Les individus des deux sexes ont été analysés : 68 mâles (62%) et 42 (femelles 38%).



Nous avons analysé des échantillons de tissus musculaires qui ont un taux de rotation (quelques mois), car cela nous a permis d'évaluer le régime alimentaire d'un individu dans une seule localité, et à éviter ainsi, les signaux confus de l'alimentation au cours des étapes de la vie antérieure (comme cela se refléterait dans le collagène osseux). La plupart des loups se dispersent de leurs meutes natales, et ils sont capables de se déplacer à des distances allant jusqu'à 1000 km [19]. Par conséquent, en utilisant le tissu musculaire, au lieu du collagène osseux, nous avons pu contrôler les emplacements lors de la comparaison de la variation isotopique avec la diversité génétique. Le court laps de temps représenté dans les tissus musculaires est compensé par le fait que tous les échantillons, sauf trois régions, ont été obtenus en plusieurs années et à partir d'une plage de dates pendant les mois d'hiver. Par conséquent, ils représentent en moyenne, les signaux diététiques de plusieurs saisons d'hiver, et fournissent une bonne représentation de la saison d'hiver complète. Nos données sont donc spécifiques à la saison, mais en moyenne dans le temps.

De plus, afin de vérifier si les profils isotopiques stables, reflètent fidèlement le régime alimentaire des loups, nous avons analysé des échantillons de tissus musculaires des espèces de proie, les plus courantes en Europe de l'Est : l'original *Alces alces* (5 individus), le cerf élaphe *Cervus elaphus* (5), le chevreuil *Capreolus capreolus* (5), le sanglier *Sus scrofa* (4), le castor *Castor fiber* (5), et le lièvre brun *Lepus europaeus* (9). Ces espèces représentaient une majorité de la biomasse consommée par les loups, dans les écosystèmes d'Europe de l'Est, comme déduit des matières fécales ou de la composition du contenu de l'estomac [20–25]. Les tissus des proies ont également été échantillonnés dans le centre-est de l'Europe, mais ne couvraient pas toute l'aire de répartition géographique des échantillons de loup. La petite taille de l'échantillon et la couverture géographique des espèces proies (en raison de la disponibilité limitée d'échantillons contemporains pour cette étude) limite notre résolution pour déterminer la composition du régime, mais ce n'est pas un objectif principal pour cette étude, où notre objectif est de comparer un proxy au régime (valeurs isotopiques stable de loup  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$ ) à la structure génétique de la population.

### Analyse de la composition du régime alimentaire

Les différences dans les valeurs d'abondance isotopique pour le carbone et l'azote, chez les loups dans différentes régions géographiques et les sous-populations, ont été évaluées à l'aide du test de Kruskal-Wallis. La consommation de différentes espèces de proies par les loups a été estimée en utilisant un modèle de mélange alimentaire implémenté dans le programme IsoSource [26]. IsoSource utilise des ratios isotopiques pour quantitativement déterminer la contribution proportionnelle de plusieurs sources mélangées, c'est-à-dire dans ce cas, la proportion d'espèces de proies différentes dans le régime alimentaire. Pour calculer les paramètres alimentaires correspondant à des proies spécifiques, nous avons utilisé les signatures isotopiques moyennes de muscles de chaque espèce de proie corrigés pour la discrimination alimentaire, en ajoutant les valeurs d'enrichissement trophique de l'alimentation du loup de 1,360,6% pour  $\delta^{13}\text{C}$  et 4,660,7% pour  $\delta^{15}\text{N}$ , estimé pour les loups de l'Isle Royale [17].

Nous avons également appliqué un modèle bayésien de mélange d'isotopes stables implémenté dans le logiciel MixSIR [27], qui nous a permis de tenir compte de l'incertitude associée à plusieurs proies, et l'incertitude des valeurs isotopiques de chaque proie et du prédateur. Parce que nous voulions tester à quel point nos données sont informatives, plutôt que reconstruire précisément le régime, nous avons utilisé des *priors* non informatifs. Nous avons effectué 100000000 itérations à chaque exécution, ce qui était suffisant pour obtenir une bonne performance du modèle (voir tableau S3).

## RESULTATS

### Composition du régime alimentaire des loups d'Europe de l'Est

La valeur moyenne de l'isotope stable du Nitrogène (de l'Azote)  $\delta^{15}\text{N}$  pour le tissu musculaire des loups d'Europe de l'Est était de 9,3% (SD 1,0%) et la valeur moyenne de l'isotope stable du Carbone  $\delta^{13}\text{C}$  était de 224,1% (SD 0,9%). Les gammes des valeurs d'isotopes stables étaient larges : de 5,97% à 12,14% pour  $\delta^{15}\text{N}$  et de 220,27% à 226,31% pour  $\delta^{13}\text{C}$  (pour les résultats individuels des loups, voir le tableau S1 ; pour les proies individuelles exemples de données, voir le tableau S2). Les loups des différentes

régions géographiques différaient significativement dans la composition isotopique stable ( $\delta^{15}\text{N}$  :  $H = 43,9$ ,  $P < 0,0001$  ;  $\delta^{13}\text{C}$  :  $H = 54,3$ ,  $P < 0,0001$  ; Tableau 1). Les loups appartenant à différentes sous-populations délimitées sur la base les données de l'ADNmt (MIT1– MIT4) différaient significativement en valeurs  $\delta^{13}\text{C}$  ( $H = 19,5$ ,  $P < 0,0001$ ), tandis que les différences dans les valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  étaient marginales ( $H = 3,7$ ,  $P = 0,055$ ; tableau 2). Les sous-populations délimitées en fonction des données microsatellites (NUC1 et NUC2) étaient significativement différenciées uniquement pour les valeurs  $\delta^{13}\text{C}$  ( $H = 21,4$ ,  $P = 0,0001$  ; Tableau 2). Bien que les différences isotopiques moyennes entre les sous-populations génétiques étaient modestes, la variation sous-jacente entre 14 régions (sur laquelle nous avons évalué la corrélation entre différenciation génétique et isotopique) était beaucoup plus grande, avec des valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  comprises entre 7,30% et 10,03% (différence 2,73%) et de  $\delta^{13}\text{C}$ , compris entre 225,79% et 223,19% (différence de 2,60% ; voir le tableau 1). Il n'y avait pas de corrélation entre l'année de collecte et le régime, exprimés par les valeurs d'isotopes stables ( $R = 0,05$ ,  $P = 0,60$  pour  $\delta^{15}\text{N}$  et  $R = 0,18$ ,  $P = 0,06$  pour  $\delta^{13}\text{C}$ ).

La composition de l'alimentation du loup déduite dans IsoSource, basée sur les valeurs moyennes d'isotopes stables, des espèces de proies potentielles, est rapportés comme des fourchettes du 25<sup>ème</sup> au 75<sup>ème</sup> centile, pour la valeur de contribution relative de chaque proie. Les valeurs moyennes sont données à des fins de comparaison uniquement, et doivent être traité avec prudence [26]. Le régime alimentaire moyen estimé des loups en Europe de l'Est, se composait principalement d'ongulés : cerf élaphe (fourchette : 12–29% ; **moyenne : 20%**), chevreuil (9–34% ; **22%**), orignal (5–23% ; **15%**) et sanglier (24–26% ; **25%**), avec un mélange de castor (3–12% ; **8%**) et de lièvre (3–14% ; **9%**).

Les différences significatives dans les valeurs d'isotopes stables pour les sous-populations de loups d'Europe de l'Est se sont traduites par une différence dans la composition de leur régime alimentaire. Les sous-populations du nord (NUC1 incorporant MIT1 et MIT2) avaient une part plus élevée d'originaux, de lièvres et de castors dans l'alimentation, par rapport aux sous-populations du sud (NUC2 incorporant MIT4 et la plupart des MIT3), qui comptaient une part plus élevée de sangliers (Figure 2 et Tableau 3).

Les estimations du régime alimentaire des loups de MixSIR étaient plus larges entre les plages de centiles 25<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> par rapport à IsoSource, et dans certains cas, avec des distributions multimodales (voir le tableau S3 et la figure S1), reflétant l'incertitude associée à la discrimination alimentaire et à la signature de l'isotope, ce qui était explicitement pris en compte dans ce modèle [27]. Ce résultat est cohérent avec les résultats du test de performance, du modèle MixSIR, qui a montré que lorsque les sources avaient des signatures isotopiques (comme ce fut le cas avec les cervidés dans notre étude), les distributions postérieures des contributions sources, ont montré une forte multimodalité [27]. Bien que les résultats de MixSIR n'aient pas fourni des estimations précises du régime alimentaire, elles ont fourni un soutien supplémentaire pour une différenciation substantielle entre le nord et le sud, des sous-populations, avec une part plus élevée de sangliers et de chevreuils dans le sud, et une proportion plus élevée de lièvres au nord.

### **Relation entre différenciation alimentaire, distance géographique et différenciation génétique parmi les individus et les populations**

L'analyse DISTLM individuelle, a montré que les distances génétiques étaient fortement corrélées avec la différenciation alimentaire et les distances géographiques ( $P = 0,0001$  dans chaque cas). **Le test conditionnel a montré que la différenciation alimentaire, était corrélée avec des distances génétiques au-delà de l'influence de la distance géographique** ( $P = 0,0002$ ). Cependant, la procédure de sélection a anticipé les distances géographiques ajustées, avant la différenciation alimentaire, dans le modèle de régression multiple. Les deux variables ont expliqué ensemble 10% de la variabilité génétique (tableau 4). La présence / absence de l'orignal était également fortement corrélée à la distance génétique ( $P = 0,0001$ ), alors qu'aucune corrélation significative n'a été mise en évidence pour le type de végétation. Dans le test séquentiel, ces deux variables étaient significatives, et ont été ajustées après la mesure isotopique stable de différenciation alimentaire dans le modèle de régression multiple, avec comme la variable la moins importante les types de végétation (tableau S4).

L'analyse DISTLM au niveau de la population, a montré que les distances génétiques entre les populations locales, étaient corrélées aux deux différenciations : alimentaires ( $P = 0,005$ ) et les distances géographiques ( $P = 0,019$ ), et elles ont expliqué 46% et 39% de la variation, respectivement. Le test conditionnel a montré que la différenciation alimentaire, était corrélée avec les distances génétiques, au-delà de l'influence de la distance géographique ( $P = 0,033$ ) et expliqué 29% des variations. La procédure de sélection de différenciation a été avancée pour les distances géographiques dans le modèle de régression multiple. Les deux variables expliquent ensemble 68% de la variabilité génétique (tableau 4). Quand la latitude et la longitude étaient considérées comme deux variables distinctes, seule la latitude était corrélée avec la distance génétique ( $P = 0,03$ ), ce qui suggère que la corrélation est due à des facteurs environnementaux qui changent en Europe, s'agissant du gradient latitudinal plutôt que de la distance géographique seule (voir [7]). En conséquence, une différenciation isotopique stable a été ajustée avant, concernant la latitude par la procédure de sélection ( $P = 0,02$ ). Nous avons aussi évalué la corrélation entre la variation isotopique entre les populations et les distances géographiques, tout en contrôlant la distance génétique. Ce test conditionnel n'a montré aucune corrélation significative ( $P = 0,34$ ), ce qui suggère qu'il y a peu de variation du signal isotopique, dû à la seule distance géographique.

La **présence / absence** d'originaux était également fortement corrélée à la distance génétique ( $P = 0,0006$ ) et expliquait 31,5% de la variation génétique. Cependant, dans le test séquentiel, cette variable a été ajustée après la différenciation alimentaire et la distance géographique, et était non significatif (tableau S4). Les types de végétation n'étaient pas significativement corrélés avec les distances génétiques, et n'ont pas augmenté la variation génétique expliquée par les variables prédictives dans le test séquentiel. Considérés séparément, les  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{15}\text{N}$  expliquent une proportion similaire de variabilité génétique (28% pour  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $P = 0,02$  et 25% pour  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $P = 0,04$ ), et la différenciation entre régions géographiques calculées séparément pour les  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{15}\text{N}$  était significativement corrélée ( $R = 0,61$ ,  $P = 0,02$ ).

Le test de Mantel a confirmé la corrélation significative des distances génétiques avec la différenciation alimentaire au niveau individuel ( $P = 0,008$ ) et populationnel ( $P = 0,045$ ), et a également montré que la différenciation alimentaire au niveau de la population, explique un pourcentage élevé de variation génétique ( $R = 0,46$ ; Figure 3). Il y avait une corrélation marginale entre les distances isotopiques et géographiques, non significative au niveau de 0,05 (test de Mantel,  $R = 0,102$ ,  $P = 0,06$  pour les données individuelles et  $R = 0,205$ ;  $P = 0,10$  pour les populations; Figure 3).

## DISCUSSION

Les analyses individuelles et basées sur la population de manière cohérente, ont montré une corrélation entre la différenciation alimentaire et génétique. Alors que les différences alimentaires individuelles expliquaient un petit pourcentage de la variation génétique (qui pourrait être lié à une forte variation individuelle, dans le régime alimentaire des loups, par ex. [32]), les données au niveau de la population, ont montré que les différences alimentaires expliquent une grande proportion des différenciations génétiques. Cette association est restée significative (avec la plus grande proportion de variance expliquée par le régime alimentaire) après avoir pris en compte l'influence de la distance. **Cela suggère que les facteurs écologiques déterminent le régime alimentaire des loups** (par exemple, le type d'habitat et les compositions de la communauté des ongulés) et contribuent à la structuration des populations de loups. Nous en discutons dans le contexte des interprétations alternatives après avoir considéré l'utilité de nos données sur les isotopes stables, comme marqueur fiable de la différenciation alimentaire chez les loups à travers l'aire d'étude.

### Fiabilité des données d'isotopes stables en tant que proxy pour l'alimentation du loup dans notre étude

La valeur moyenne de  $\delta^{13}\text{C}$  pour le tissu musculaire des loups européens était du même ordre, que celui signalé pour les loups américains du nord du Minnesota [17]. Cependant, la valeur moyenne de  $\delta^{15}\text{N}$  chez les loups d'Amérique du Nord, était inférieure de 2,1%. Cela peut résulter du manque de sanglier (qui en tant qu'omnivore a des tissus plus chargés en  $\delta^{15}\text{N}$ , que les consommateurs primaires



tels que les cervidés et les lièvres) provenant de l'alimentation des loups d'Amérique du Nord et des valeurs inférieures en  $\delta^{15}\text{N}$  de la même espèce de proie ou d'espèces sœurs en Amérique du Nord par rapport à l'Europe [17,32]. Les larges gammes d'isotopes stables des valeurs des loups d'Europe de l'Est, suggèrent une alimentation très variée et des différences alimentaires entre les individus, ce qui est cohérent avec les résultats des études d'isotopes stables, sur les loups d'Amérique du Nord [17,32].

Une partie de la variabilité isotopique du loup pourrait être liée à la variation géographique (par exemple résultant de la variation des valeurs isotopiques des plantes ou du sol) plutôt que d'une niche alimentaire différentes entre les populations. Par exemple, il y a un gradient observé dans les valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  pour C3 et C4 des plantes terrestres, sur de larges plages latitudinales [33], plus prononcées en C4 pour les plantes. Cependant, les relations trophiques pertinentes pour notre étude, sont dominées par le C3 à la base des plantes et ne montrent aucune tendance sur la plage latitudinale pertinente (50° – 60° nord) dans les plantes C3 [33], les herbivores ou les carnivores [34]. Il y a aussi le potentiel pour un « effet de canopée » des habitats ouverts des herbivores, qui peuvent avoir des valeurs isotopiques différentes de celles des habitats forestiers [35]. Cependant, le cerf rouge et le chevreuil comparés aux régions géographiques pertinentes en Europe, n'ont montré aucune différence [35,36], et aucune preuve d'un simple effet de canopée n'a été trouvé chez le cerf élaphe européen [36]. En outre, un aspect clé des résultats, était l'absence de corrélation significative entre le signal isotopique et la distance géographique (voir figure 3), qui ne serait pas attendu si le signal pour une espèce de proie donnée variait avec la distance géographique (ou nécessiterait des contrebalancements de signaux entre les espèces de proies). Nous avons également montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre les valeurs isotopiques et la distance géographique, lorsque nous contrôlions la diversité génétique.

Le manque de preuves de corrélation entre les isotopes stables et la composition des tissus du loup, et la distance géographique, sont cohérentes avec des études suggérant que la variation de signal de l'isotope stable des ongulés, n'est pas un facteur important sur l'intervalle de la zone géographique pertinente. Nous ne pouvons pas exclure, la possibilité que les valeurs isotopiques des plantes ou du sol peuvent varier de manière non linéaire, indépendamment de la distance géographique, mais une telle variation, est beaucoup plus susceptible de diminuer la force de la corrélation entre la différenciation génétique et la différenciation diététique inférée, que de produire un faux signal pour une corrélation significative. De plus, pour une variation non linéaire, due à des facteurs autres que l'alimentation, on pourrait s'attendre à des modèles incohérents entre les deux isotopes (voir [34]). Cependant, dans notre étude, la différenciation calculée séparément pour les  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{15}\text{N}$  n'est pas significativement corrélée, et chacune de ces deux variables explique séparément une proportion similaire de la variabilité génétique.

La composition isotopique stable du tissu musculaire reflète le régime alimentaire sur une période de plusieurs semaines [37], et donc, les variations saisonnières du régime alimentaire des loups ou des proies [38, 39] pourraient potentiellement affecter les résultats. Pour cela, nous avons contrôlé en échantillonnant des individus pendant la saison d'hiver seulement, et il n'y a aucune preuve d'une variabilité significative du régime alimentaire des loups, pendant la saison d'hiver en Europe de l'Est [20, 22, 24, 25, 40]. De plus, toutes les régions, sauf trois, ont été échantillonnées sur plusieurs années, de sorte, que les résultats représentent le régime alimentaire moyen sur plusieurs saisons d'hiver. Cependant, nous n'avons trouvé aucune corrélation entre l'année de collecte de l'échantillon et le régime, exprimés en valeurs d'isotopes stables.

Si les tendances saisonnières, ou la variation du signal isotopique stable, des espèces de proies, parmi les régions géographiques couvertes par cette étude, confondaient considérablement nos analyses, l'effet devrait être de perturber notre capacité à détecter une espèce de proie particulière, dans plusieurs régions et la composition apparente des proies dans les régimes alimentaires estimés, devrait être incompatible avec les données provenant d'autres sources. En moyenne, le régime alimentaire des loups en Europe de l'Est, pendant la saison hivernale, selon les estimations de nos données d'isotopes stables, se composait principalement d'ongulés, avec un mélange de castors et de lièvres. Les études

d'isotopes stables sur les loups Nord-Américains ont indiqué un choix de proies similaire [17,32]. Ce résultat, est également conforme aux études sur l'écologie de l'alimentation des loups d'Europe de l'Est, basée sur des méthodes traditionnelles, telles que l'observation d'analyses des données, de l'estomac et des excréments [20–25, 40].

Les différences de composition alimentaire entre les populations locales estimées à l'aide d'IsoSource sont également cohérentes avec ces études antérieures, ainsi qu'avec les données sur la distribution des espèces de proies (bien que nous n'ayons pas testé et ne voulions pas impliquer une correspondance avec l'abondance relative) : en Europe du Nord-Est, l'original est une partie importante de la communauté des ongulés (en termes de fréquence et biomasse), et c'est une proie importante des loups [20,41]. Dans les latitudes moyennes de l'Europe de l'Est, où l'original est moins commun, le cerf élaphe, le chevreuil et le sanglier dominent la communauté des ongulés, une sélectivité positive pour le cerf élaphe **et une forte réponse fonctionnelle à une augmentation de la densité des cerfs a été observée** [21,22]. Dans le sud de l'Europe, là où l'original est absent, et le cerf élaphe est moins abondant, le chevreuil et les sangliers, dominent le régime alimentaire des loups et, à certains endroits, le sanglier est la seule proie sauvage des loups [42,43]. Globalement, les données reflètent un modèle de choix de proies, crédible sur la base des études. Divers facteurs, peuvent être importants dans le choix d'un ensemble particulier de proies, dans un endroit donné, y compris mais non limité à une abondance relative. Comme le montre notre analyse IsoSource, les différentes populations génétiques (par exemple MIT1-3) ont montré des régimes qui comprenaient différentes proportions d'espèces de **proies clés** (voir Tableau 3). Ces modèles étaient cohérents, mais pas strictement déterminés par la répartition géographique des proies. Par exemple, les populations MIT1 et MIT2 sont réparties sur une répartition géographique similaire (figure 1) et pourtant, leur apparente prise proportionnelle des différentes espèces de proies, varie (tableau 3).

Contrairement à IsoSource, le modèle MixSIR ne donne pas une estimation du régime alimentaire, en raison des distributions de probabilités multimodales de la composition des proies. C'était l'effet d'incorporer explicitement l'incertitude, associée à la discrimination de la signature isotopique alimentaire, et à l'analyse des proies, avec des profils isotopiques similaires [27]. Une étude de simulation a montré que les résultats du modèle MixSIR convergent vers les résultats IsoSource, lorsque les sources d'incertitude sont réduites [27]. Dans notre étude, la principale source d'incertitude, était une grande variance des signatures isotopiques des proies, résultant de la taille des échantillons, et donc, un échantillonnage des proies plus complet est nécessaire, pour obtenir des estimations précises du régime alimentaire, à partir de ce modèle. Cependant, même notre ensemble limité de données sur les proies, a fourni un support clair, pour une différenciation substantielle, entre les sous-populations de loups, dans la partie nord et sud de notre zone d'étude.

### Modèles de différenciation génétique

La distance géographique est un facteur commun, associé à la différenciation génétique. Dans cette étude cependant, les données de corrélation à l'appui, de l'isolement par la distance était faible. **Par exemple, de grandes distances d'Est en Ouest ont parfois montré une faible différenciation, tandis que les petites distances du nord au sud ont montré une différenciation plus forte.** Même en considérant la latitude et la longitude séparément, la latitude (qui, contrairement à la longitude, montrait un modèle significatif) explique moins la variance génétique que les données sur les isotopes stables. Nos corrélations avec la distance géographique considérée comme distance linéaire, n'ont pas montré d'obstacles crédibles à la dispersion des loups, sur la plage d'étude qui suggérerait une voie [7]. Dans la zone d'étude, il n'y a pas de barrières d'altitude (l'élévation sur toute la plage varie de zéro à environ 200 m), la plupart des systèmes fluviaux de la région, vont du nord au sud (et gèlent pendant l'hiver) et les habitats forestiers sont interconnectés et forment un réseau continu. **Une autre possibilité est la vicariance historique et l'isolement dans l'allopatrie, suivis d'une reconvergence.** Cependant, les analyses phylogéographiques, basées sur les données d'ADNmt, ne soutiennent pas un tel scénario [7,44]. Nos données montrent une relation entre la différenciation génétique et les valeurs isotopiques



(un proxy pour le régime alimentaire) qui était supérieure à la corrélation avec la distance, ce qui suggère, que les facteurs écologiques, sont importants pour définir la génétique de ces populations.

Le niveau de différenciation génétique neutre entre les populations, reflète les modèles à long terme de dispersion efficace, et une association entre dispersion non aléatoire, basée sur les proies ou les préférences d'habitat et la différenciation génétique. La préférence des individus à disperser vers des habitats similaires à leur habitat natal, ont été observés dans un large éventail d'espèces animales [16]. Divers auteurs ont proposé que ces types de préférences, puissent se traduire par des populations discrètement subdivisées, le long de la limite de l'habitat [3, 6, 7, 12]. Une telle structure de population cryptique a été observée chez divers mammifères carnivores [1, 4, 6, 12], y compris les loups gris d'Amérique du Nord [3, 8–10] et d'Europe orientale [7]. Chez les carnivores, la disponibilité (c'est-à-dire la présence, l'abondance et les conditions affectant le succès de la chasse) des espèces proies sont considérées comme un indicateur important de l'habitat [2, 7, 8]. Chez le loup gris, il a été démontré que l'apprentissage et l'expérience, améliore le succès de la chasse [45], ce qui peut entraîner des préférences individuelles, pour certains types de proies (bien que les loups soient connus pour être capables de s'adapter à de nouvelles proies dans certains cas, par ex. après translocations). Ces préférences peuvent affecter la décision de dispersion, directement ou indirectement (en choisissant des habitats aux caractéristiques familières, qui sont corrélées à la composition en proies). Comme indiqué dans l'introduction, cette relation entre le choix des proies et la dispersion, se trouve également chez diverses autres espèces, comme d'autres carnivores et cétacés. Il a même été proposé comme mécanisme de dispersion, dirigée chez les microorganismes (voir revue dans [46]).

Le rôle clé de l'alimentation, dans la formation des processus évolutifs des carnivores a également été indirectement déduite, sur la base de la génétique et des analyses isotopiques du loup gris du Pléistocène tardif et du début de l'Holocène. Il a été démontré que les loups du Pléistocène d'Amérique du Nord et d'Europe, se nourrissent principalement d'espèces mégafaunales, comme les grands bovidés et les chevaux [47,48], et le déclin substantiel de ces proies au début de l'Holocène, coïncidaient avec le remplacement complet (Amérique du Nord) ou partiel (Europe) de lignées d'ADNmt de loup [44,47].

Dans notre étude, nous utilisons une métrique liée à l'alimentation qui peut être quantifiés à partir des mêmes individus, qui ont également été génotypés. Cela permet une comparaison directe entre la différenciation génétique des individus et leur alimentation (dans la mesure où l'alimentation est représentée par les valeurs isotopiques stables). Nous trouvons un signal plus fort pour l'alimentation corrélée à la distance génétique, que ceux trouvés dans une étude sur les mêmes populations [7], et suggèrent, que cela est dû à la plus grande précision, rendue possible grâce aux données d'isotopes stables (qui reflète l'alimentation individuelle totale plutôt que la composition moyenne régionale des proies) et de l'inclusion de données pour les deux métriques à partir du même ensemble d'animaux individuels. Il y a un signal pour une corrélation avec la distance géographique, comme indiqué dans une étude antérieure [7], et d'autres facteurs sont également susceptibles d'affecter nos résultats (tels que le bruit, provenant d'une relation imprécise, entre le signal isotopique stable et le régime, comme discuté ci-dessus).

Nous avons également trouvé une corrélation significative entre les distances et la présence / absence de l'original, qui soutient l'hypothèse, selon laquelle, les différences de disponibilité de types particuliers de proies, constituent un facteur important de différenciation génétique des populations de loups. Cependant, la procédure de sélection anticipée dans DISTLM, a classé cette variable comme moins importante que les données isotopiques stable, suggérant que la différenciation alimentaire globale explique mieux la variabilité génétique du loup que la présence / absence d'une seule espèce. Les types de végétation n'étaient pas corrélés à la variabilité génétique, contrairement à l'étude précédente [7]. Cependant, l'étude antérieure comprenait des échantillons provenant d'une zone géographique, couvrant plusieurs habitats différents, tandis que la zone d'étude actuelle, ne comprenait que deux types d'habitats : forêt tempérée mixte et forêt-steppe. Ce résultat suggère, que dans des habitats

similaires, la différenciation génétique des loups, peut dépendre directement des différences de composition des proies, probablement associées avec la différenciation des micro-habitats, affectant la distribution et l'abondance des espèces herbivores.

L'intégration de l'écologie et de l'évolution est une étape nécessaire vers des avancées majeures, dans notre compréhension des processus, qui façonnent et maintiennent la biodiversité [49]. Nos données fournissent des preuves, basées sur des corrélations soigneusement contrôlées, qui soutiennent une littérature croissante, indiquant une relation entre les proies ou le choix de l'habitat et la structure génétique de la population. L'inférence est cohérente et claire, mais des données supplémentaires pourraient aider à déterminer, qu'il existe une relation causale. La prochaine étape pour comprendre le système, devrait inclure des études de suivi où le comportement de recherche de nourriture individuel dans les lieux de naissances et de post-dispersion peut être évalué. Il peut également, valoir la peine de tester, si les tendances observées sont associées à la sélection différentielle locale.