

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

Molecular Ecology (2007) 16, 1661–1671

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

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

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

Résumé

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

INTRODUCTION

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

dans une petite population de loups en Scandinavie (Vilà et al. 2003). Les résultats provenant de programmes de surveillance génétique non invasifs ont révélés que les Alpes sont recolonisées par l'expansion naturelle de loups des Apennins (Lucchini et al. 2002 ; Valière et al. 2003). Les loups et les chiens en liberté s'hybrident sporadiquement en Italie, et l'expansion des populations de loups des Apennins ne montre pas d'introgession substantielle de gènes de chiens (Randi & Lucchini 2002 ; Verardi et al. 2006).

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

MATERIEL ET METHODES

Collecte des échantillons et analyses de l'ADN des marqueurs microsatellites

L'ADN a été extrait de tissus, collectés principalement auprès des populations sources de loups dans les Apennins centraux et méridionaux, et d'échantillons d'excréments collectés de manière non invasive auprès des populations qui se sont récemment étendues dans les Apennins septentrionaux et ont recolonisé les Alpes (Tableau 1). Les échantillons de tissus des populations d'origine ont été collectés par l'Institut Italien de la faune (INFS) et le Département de biologie animale et humaine de l'Université de Rome « La Sapienza » au cours des 20 dernières années sur des loups sauvages tués accidentellement ou illégalement en Italie. Tous ces animaux présentaient le motif typique de la couleur du pelage du loup Italien et ne présentaient aucun signal morphologique et génétique détectable d'hybridation avec le chien (Randi et al. 2000 ; Randi & Lucchini 2002). Des échantillons de tissus de France et de Suisse ont également été obtenus à partir d'animaux morts, par les correspondants de terrain du Réseau Loup Français (coordonné par l'Office National de la Chasse) et du Projet Loup Suisse (projets de recherche coordonnés pour la conservation et la gestion des carnivores en Suisse (KORA)). En outre, nous avons analysé 2885 excréments, qui ont été collectés de manière non invasive dans le nord des Apennins (Emilia-Romagna, projet Life Nature) et dans les Alpes (Italie, France et Suisse ; progetto Lupo Piemonte, coordonné par la Regione Piemonte, Life Nature en France et KORA en Suisse ; Tableau 1), principalement en 2000-2004. Nous avons subdivisé ces échantillons en quatre groupes (ci-après dénommés quatre « populations » ; Tableau 1) : loups collectés dans le nord, le centre ou le sud des Apennins, et dans les Alpes (Fig. 1). Bien qu'il n'y ait pas de rupture géographique évidente dans la distribution des loups, ou de barrière à la dispersion, cette subdivision vise à regrouper séparément les échantillons qui ont été collectés dans les deux zones des Apennins centraux

et méridionaux où l'espèce a survécu pendant le goulot d'étranglement des années 1970, et ceux qui ont été collectés dans les deux zones d'expansion récente dans les Apennins septentrionaux et dans les Alpes. Les échantillons de tissus et d'excréments ont été conservés à -20°C dans de l'éthanol à 95%. L'ADN a été extrait en utilisant un protocole guanidinium-silice (Gerloff et al. 1995) ou avec le kit QIAGEN Stool (QIAGEN), et génotypé par réaction en chaîne par polymérase (PCR) à 12 microsatellites : six dinucléotides (CPH2, CPH4, CPH5, CPH8, CPH12 ; Fredholm & Wintero 1995 ; C09. 250 ; Ostrander et al. 1993), et six tétranucléotides (FH2004, FH2079, FH2088, FH2096, FH2132 et FH2137 ; Francisco et al. 1996). Les amplifications ont été réalisées dans des réactions de 10- μL , en utilisant, respectivement, 1 ou 5 μL de solutions d'ADN provenant d'extractions de tissus ou de scats, plus 1 μg de BSA. Les conditions de PCR ont été optimisées pour chaque paire d'amorces et pour les échantillons de tissus ou de scories (les détails du laboratoire sont disponibles sur demande).

Les ADN excrémentiels ont été extraits et amplifiés dans une pièce séparée uniquement dédiée aux échantillons à faible teneur en ADN, génotypés par un protocole à tubes multiples (Taberlet et al. 1996 ; Lucchini et al. 2002), suivi d'une analyse de fiabilité (Miller et al. 2002). Des contrôles négatifs (pas d'ADN dans la PCR) et positifs (échantillons avec des génotypes connus) ont toujours été utilisés. Les produits PCR ont été analysés à l'aide d'un séquenceur automatique ABI 3100 et du logiciel ABI GENOTYPER version 3.7.

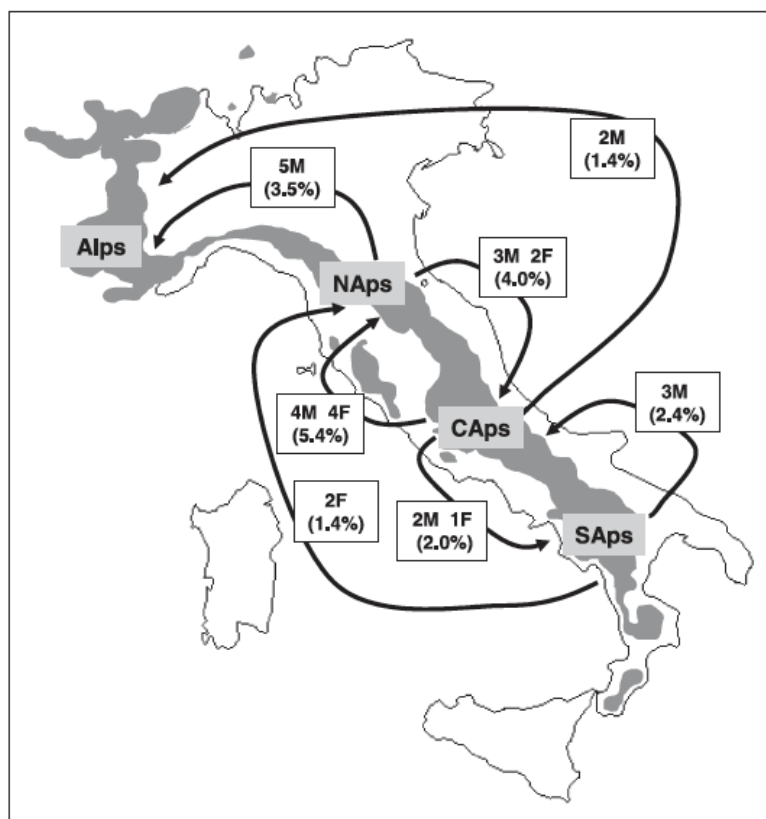


Fig. 1 Aire de répartition approximative du loup (*Canis lupus*) en Italie et dans les Alpes (en gris). Les zones en pointillé indiquent les régions de présence temporaire de loups dans le nord de la France et en Suisse. Les régions d'origine des loups échantillonnés dans les Alpes, au nord (NAps), au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

Tableau 1. Origine, nombre et sexe (M, mâle ; F, femelle ; U, indéterminé ; Lucchini et al. 2002) des échantillons de loups (*Canis lupus*) génotypés dans cette étude. Les groupes de population comprennent des échantillons collectés dans les Alpes (Piémont en Italie ; Alpes Maritimes, Alpes de Haute Provence et Hautes Alpes en France ; Grisons et Valais en Suisse) ; le nord des Apennins (NAps ; Ligurie, Émilie-Romagne, nord de la Toscane et nord des Marches) ; Apennins centraux (CAps ; sud de la Toscane, sud des Marches, Ombrie, Abruzzes, Latium et Molise) ; Apennins méridionaux (SAps ; Campanie, Calabre, Basilicate et Pouilles)

Population	Number and kind of samples	Number of distinct genotypes	Collectors (years)
Alps	885 scats 11 tissues	130 (68M; 62F) 11 (9M; 2F)	Progetto Lupo Piemonte (1999–2004) Life Nature in France (1999–2004) KORA in Switzerland (1998–2003)
NAps	2000 scats 25 tissues	122 (69M; 53F) 25 (13M; 12F)	Life Nature Emilia-Romagna (2000–2004) Regione Emilia-Romagna (2000–2004) INFS (2002–2004)
CAps	126 tissues	126 (62M; 56F; 8U)	INFS & University of Rome (1982–2002)
SAps	21 tissues	21 (9M; 10F; 2U)	INFS & University of Rome (1982–2002)
Total	3068 samples	435 (230M; 195F; 10U)	

Analyse de la variabilité génétique

Nous avons utilisé le logiciel GENALEX version 6 (Peakall & Smouse 2005) pour estimer la fréquence des allèles par locus et par population, les hétérozygoties observées (H_O) et attendues sans biais (H_E), le nombre moyen d'allèles par locus (N_A), le nombre d'allèles privés (N_P) par population (c'est-à-dire le nombre d'allèles uniques à une seule population dans l'ensemble de données). GENALEX a également été utilisé pour effectuer les procédures suivantes :

1. L'AMOVA (analyse de la variance moléculaire ; Excoffier et al. 1992 ; Michalakis & Excoffier 1996) a été utilisée pour évaluer l'étendue de la différenciation globale et par paire des populations sur la base de ϕ_{pb} , un analogue de la F_{ST} , qui estime la proportion de la variance entre les populations, par rapport à la variance totale.

2. Le test d'assignation de population basé sur la fréquence développée par Paetkau et al. (1995) a été utilisé pour détecter la population d'origine la plus probable de chaque individu en comparant la probabilité de chaque génotype multilocus dans un ensemble de populations prédéterminées. Des tests d'assignation bayésiens supplémentaires (Rannala & Mountain 1997), et la détection des migrants de première génération (Paetkau et al. 2004) ont été effectués à l'aide du logiciel GENECLASS version 2 (Piry et al. 2004). De plus, nous avons utilisé le programme bayésien structure version 2.1 (Falush et al. 2003) pour déduire la structure cryptique des populations et assigner simultanément les individus aux populations, indépendamment de toute information non génétique préalable.

3. Des analyses d'autocorrélation spatiale multivariées et un test de Mantel (Smouse & Paekall 1999) ont été utilisés pour détecter la structuration spatiale à travers les corrélations entre les matrices de distance géographique et génétique par paire. La richesse allélique, qui corrige le nombre d'allèles observés en fonction des différences de taille des échantillons, a été calculée avec FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet 1995). L'estimateur de consanguinité F_{IS} de Wright (Weir & Cockerham 1984) et les tests de déviation de l'équilibre de Hardy-Weinberg ont été calculés avec le logiciel genetix 4.03 (Belkhir et al. 2001).

Effets fondateurs et détection du goulot d'étranglement

Nous émettons l'hypothèse que le processus actuel de colonisation par le loup a impliqué un goulot d'étranglement de la population, qui peut être conçu comme suit : un petit nombre de

colonisateurs s'est déplacé il y a environ 20-15 ans (1990) de la population source dans les Apennins, à travers le couloir étroit le long de la crête des Apennins nord-ouest (Ligurie), et a pénétré dans le sud des Alpes Italiennes (Ligurie et Piémont) et Françaises (Alpes Maritimes), pour finalement arriver en Suisse en 1996.

Pour évaluer la **force du goulot d'étranglement**, nous avons utilisé le test de Cornuet & Luikart (1996) tel qu'implémenté dans la version 1.2.02 de BOTTLENECK (Piry et al. 1999), qui est basé sur l'attente que dans une population récemment goulotée, l'hétérozygotie observée est plus élevée que l'hétérozygotie attendue à partir du nombre observé d'allèles sous l'hypothèse d'une population à l'équilibre mutation-dérive. Cette attente ne vaut que pour les loci évoluant selon le modèle de l'allèle infini (IAM), et pas nécessairement pour les marqueurs suivant un modèle strict de mutation par étapes (SMM). Sous un modèle intermédiaire à deux phases (TPM), un excès d'hétérozygotie est attendu après un goulot d'étranglement. Luikart & Cornuet (1997) ont recommandé le TPM pour les microsatellites, avec une prédominance de mutations à une étape et un faible pourcentage ($P = 5-10\%$) de changements à plusieurs étapes. Dans cette étude, nous avons génotypé 15 - 40 individus par population avec 12 loci. Nous avons testé l'effet de goulot d'étranglement sous le TPM avec $P = 10\%$, et en utilisant le signe, le test de Wilcoxon unilatéral, et les tests de distribution en forme de l.

Les effets d'un **goulot d'étranglement** de la population sur la variabilité génétique ont été simulés à l'aide de BOTTLESIM (Kuo & Janzen 2003), dans le but d'estimer combien de colonisateurs sont nécessaires pour expliquer la variabilité observée dans la population de loups Alpains. Nous avons spécifié les paramètres suivants : multilocus diploïde, taille de population variable, générations se chevauchant complètement, système d'accouplement aléatoire, longévité attendue des organes de 8 ans, âge de reproduction de 1 an, sex ratio 1/1. Nous avons simulé (i) les effets de goulots d'étranglement de taille variable (d'un minimum de 2 à 20 fondateurs) dans des populations nouvellement fondées, qui restent stables jusqu'à 8 ans (ce qui correspond aux trois premières générations après le début de la colonisation des loups dans les Alpes) ; et (ii) les effets des goulots d'étranglement de taille variable (d'un minimum de 4 à 14 fondateurs) dans les populations nouvellement fondées, qui se sont développées pendant 14 ans (correspondant aux cinq premières générations après le début de la colonisation par le loup dans les Alpes) à un taux annuel variable entre 7% et 21% (Ciucci & Boitani 1991). Une estimation précise de la population de loups des Apennins n'étant pas disponible, nous avons supposé une taille de population source de 300 individus, dont la variabilité génétique a été décrite par les génotypes qui ont été échantillonnés dans le nord et le centre des Apennins. Les valeurs de la moyenne de N_A , H_E et de l'indice de fixation (F), qui ont été obtenues après 100 itérations dans chaque simulation, ont été tracées et comparées aux valeurs correspondantes observées dans la population de loups des Alpes. De plus, nous avons comparé les valeurs F_{ST} simulées et réelles calculées entre les populations de loups des Alpes et du nord des Apennins.

RESULTATS

Variabilité génétique des populations de loups

Nous avons déterminé un total de 435 génotypes distincts de loups en utilisant 12 microsatellites non liés (Tableau 1). Tous les loci étaient polymorphes dans toutes les

populations, montrant des valeurs intermédiaires d'hétérozygotie ($H_O = 0,57- 0,62$; $H_E = 0,56 - 0,64$), et un nombre moyen d'allèles par locus allant de 5,42 (dans le nord des Apennins) à 3,50 (dans les Alpes ; Tableau 2). Les valeurs de H_E étaient significativement différentes entre les quatre populations ($P = 0,005$; test de Friedman), en raison de valeurs significativement plus faibles dans les Alpes par rapport au nord des Apennins ($P = 0,023$; test de Wilcoxon signed-rank) et par rapport au centre des Apennins ($P = 0,020$). Les loups échantillonnés dans les Alpes présentaient environ deux allèles par locus de moins que dans les Apennins, en moyenne. La richesse allélique, estimée par raréfaction pour un échantillon de taille $n = 126$ (correspondant au nombre de génotypes échantillonnés dans les Apennins centraux) était significativement plus faible dans les Alpes par rapport aux Apennins septentrionaux et centraux ($P = 0,002$; test de Friedman). **Les loups des Alpes présentaient à nouveau environ deux allèles par locus de moins que les loups des Apennins.** Les loups des Alpes et des Apennins méridionaux ne présentaient aucun allèle privé, alors qu'il y avait, respectivement, sept et cinq allèles privés à faible fréquence ($< 0,02$) chez les loups du nord et des Apennins centraux. Les loups des Apennins méridionaux étaient globalement en équilibre de Hardy-Weinberg (test multilocus), les loups des Apennins septentrionaux et centraux présentaient un léger déficit d'hétérozygotes (valeurs F_{IS} significativement positives), tandis que les loups des Alpes présentaient un léger excès d'hétérozygotes (valeur F_{IS} négative non significative). **Les résultats des tests d'équilibre de Hardy-Weinberg à un seul locus ont montré que le déficit hétérozygote n'était dû qu'aux loci FH2137 et FH2088, qui étaient tous deux significatifs dans les Alpes, tandis que seul le locus FH2137 était significatif dans les Apennins centraux** (données non présentées). Le déficit hétérozygote au locus FH2137 a été détecté à la fois dans les Alpes (génotypes obtenus à partir de crottes) et dans les Apennins centraux (génotypes obtenus à partir de tissus), ce qui exclut des biais importants de décrochage allélique dans les échantillons non invasifs. Seul le locus CPH2 a montré un excès significatif d'hétérozygotes, ce qui a déterminé la valeur négative du F_{IS} dans les Alpes. **La faible diversité génétique et le léger excès d'hétérozygotes observés par rapport à ceux attendus chez les loups des Alpes pourraient signaler les conséquences d'un goulot d'étranglement** de la population pendant le processus de colonisation.

Tableau 2. Diversité génétique chez les loups génotypés à 12 loci microsatellites non liés. Populations : Alpes, Alpes Italiennes, Françaises et Suisses ; NAs, nord des Apennins ; CAs, centre des Apennins ; SAs, sud des Apennins (n , nombre de génotypes distincts). H_O , hétérozygotie observée ; H_{Eunb} , hétérozygotie attendue non biaisée ; N_{Amoyen} , nombre moyen d'allèles par locus (comptage direct) ; N_{AR126} , richesse allélique estimée par raréfaction (à l'aide de FSTAT ; Goudet 1995) sur la base d'une taille minimale d'échantillon $n = 126$ (nombre de génotypes dans les Apennins centraux) ; N_P , nombre d'allèles privés. Erreurs standard entre parenthèses. Les écarts par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg ont été évalués pour chaque population à partir des valeurs F_{IS} multilocus moyennes (le coefficient de consanguinité individuel moyen au sein de chaque population) ; P , probabilité d'obtenir des valeurs F_{IS} inférieures (pour un F_{IS} négatif) ou supérieures (pour un F_{IS} positif) à celles observées après 1000 permutations aléatoires d'allèles dans chaque population, déterminée à l'aide de GENETIX (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Populations (n)	H_O	H_{Eunb}	N_{Amoyen}	N_{AR126}	N_P	F_{IS}	P
Alps (141)	0.57 (0.03)	0.56 (0.03)	3.50 (0.38)	3.56	0	-0.028	0.096
NAs (147)	0.60 (0.03)	0.62 (0.03)	5.42 (0.75)	5.36	7	0.037**	0.010
CAs (126)	0.62 (0.04)	0.64 (0.04)	5.25 (0.76)	5.21	5	0.035*	0.017
SAs (21)	0.59 (0.02)	0.59 (0.04)	4.08 (0.51)	—	0	0.018	0.310

Divergence génétique et flux génétique dans l'hypothèse d'un modèle insulaire et d'un équilibre génétique

Une F_{st} multilocus moyenne significative = 0,09 ($P = 0,01$; calculée à partir de l'AMOVA) indique que la diversité génétique a été répartie de manière significative entre les quatre groupes de loups. Toutes les valeurs de F_{st} par paire (Tableau 3) étaient significatives ($P < 0,001$). Les plus grandes valeurs de F_{st} ont été observées entre les Alpes et les Apennins, qui ont par conséquent montré les plus petits taux de migration effectifs basés sur la F_{st} . En supposant un équilibre génétique, les loups des Alpes devraient échanger $N_m = [1 / (F_{st} - 1)] / 4 = 2,44$ individus effectifs par génération avec les populations sources du nord des Apennins (Tableau 3). Le flux génétique était le plus faible entre les Alpes et le sud des Apennins ($N_m = 1,6$), et le plus élevé entre les loups du nord et du centre des Apennins ($N_m = 15,1$). Malgré une dispersion et un flux génétique potentiellement élevés, les loups échantillonnés dans des zones distinctes en Italie sont significativement différenciés, ce qui suggère que le processus d'expansion de la population en cours est soutenu par un flux génétique limité, et que les populations autrefois isolées ne se sont pas encore complètement mélangées.

Tableau 3. Valeurs par paires de la F_{ST} (en dessous de la diagonale) et estimations dérivées de N_m (au-dessus de la diagonale) parmi quatre populations de loups

Population	Alps	NAps	CAps	SAps
Alps		2.44	2.74	1.60
NAps	0.093		15.01	3.21
CAps	0.084	0.016		5.51
SAps	0.135	0.072	0.043	

Détection de la structure géographique à l'aide de modèles de population continus

Le test d'assignation de population mis en œuvre dans GENECLASS (méthode de Rannala & Mountain, avec l'option « leave-one-out », c'est-à-dire en omettant l'échantillon qui est assigné aux populations) a montré que 342/435 (78,6%) loups ont été correctement assignés à leurs populations échantillonnées (Tableau 4). Parmi les 93 loups assignés à d'autres populations, 10 loups échantillonnés dans les Alpes ont été assignés aux Apennins nord et centraux, et 6 loups échantillonnés dans les Apennins nord et centraux ont été assignés aux Alpes. Aucun loup n'a été échangé entre les Alpes et le sud des Apennins. Le test d'assignation a montré que la subdivision de la population dans les Apennins nord et central avait un faible support génétique car les proportions de mauvaise assignation sont élevées (environ 20%). Environ 24% des loups échantillonnés dans le sud des Apennins ont été assignés aux populations de l'Apennin central, mais aucun à celles du nord des Apennins. De plus, les loups du sud des Apennins sont génétiquement distincts. Les nombres (et pourcentages) de migrants de première génération déduits (mâles et femelles), tels qu'identifiés par GENECLASS en utilisant la procédure de Paetkau et al. (2004), sont rapportés dans la Fig. 1. Ces données montrent que la colonisation des Alpes a été soutenue principalement par des loups dispersés à partir de la population des Apennins du nord (cinq migrants de première génération détectés), et à un degré moindre à partir de la population des Apennins du centre (deux migrants de première génération). Les loups du sud des Apennins n'ont pas contribué à la recolonisation des Alpes. La migration était biaisée par les mâles car tous les migrants de première génération présumés dans les Alpes étaient des mâles. Les résultats des tests d'assignation indiquent que les loups des Alpes sont différenciés, peut-

être en raison d'un effet de **goulot d'étranglement** et d'un flux génétique réduit pendant le processus de recolonisation en cours. La migration était un processus unidirectionnel, les loups se déplaçant principalement des Apennins vers les Alpes.

Tableau 4. Résultats du test d'assignation de population réalisé à l'aide de la méthode de Rannala & Mountain (1997), avec l'option « leave-one-out » telle qu'implémentée dans GENECLASS (Piry et al. 2004). Le tableau indique le nombre (et le pourcentage) de génotypes de loups qui ont été échantillonnés dans une région, et qui ont été assignés à l'échantillonnage ou à une autre région

Sampled in	Assigned to			
	Alps	NAds	CAds	SAds
Alps: 141	131 (93%)	6 (4%)	4 (3%)	0
NAds: 147	4 (3%)	111 (75%)	26 (18%)	6 (4%)
CAds: 126	2 (2%)	28 (22%)	84 (67%)	9 (9%)
SAds: 21	0	0	5 (24%)	16 (76%)

La subdivision de la population a été confirmée par STRUCTURE. La probabilité postérieure des données [LnP(D)] a été estimée à partir de quatre séries répétées pour un nombre de sous-populations $K = 1-10$, chacune d'entre elles comprenant 10^4 burn-ins suivis de 10^5 itérations, en utilisant le modèle de mélange et les fréquences alléliques corrélées (modèle F ; Falush et al. 2003). La valeur optimale de K a été identifiée en utilisant une procédure décrite par Garnier et al. (2004). Les résultats ont montré une augmentation des valeurs de vraisemblance jusqu'à $K = 4$. La première division de la population, obtenue en supposant que $K = 2$, a séparé les loups des Alpes de ceux des Apennins, qui ont été, respectivement, assignés au cluster I avec une probabilité $Q_I = 0,90$, ou au cluster II avec une probabilité $Q_{II} = 0,84 - 0,92$ (Tableau 5). Des proportions mineures de génotypes de loups échantillonnés dans les Alpes ou dans les Apennins ont été assignées aux autres clusters avec $Q_I = 0,10-0,16$. La division ultérieure de la population, obtenue avec $K = 3$ et $K = 4$ (Tableau 5) a permis de séparer les loups du sud des Apennins, et de confirmer la distinction génétique des loups des Alpes.

Tableau 5. Proportion moyenne d'appartenance (Q_I ; calculée à l'aide de la structure; Falush et al. 2003) des génotypes individuels de loups regroupés dans quatre populations prédéfinies, et assignés à deux ($K = 2$) ou quatre ($K = 4$) clusters inférés

Given population	$K = 2$		$K = 4$			
	Q_I	Q_{II}	Q_I	Q_{II}	Q_{III}	Q_{IV}
Alps	0.897	0.103	0.194	0.033	0.049	0.724
NAds	0.156	0.844	0.297	0.451	0.222	0.030
CAds	0.124	0.876	0.122	0.298	0.525	0.055
SAds	0.085	0.915	0.037	0.113	0.814	0.036

Les modèles de structure géographique de la population ont été évalués quantitativement par des analyses d'autocorrélation, qui ont montré une régression négative significative ($P < 0,01$) entre les distances génétiques individuelles et les distances géographiques individuelles, ce qui signifie que les loups géographiquement proches présentaient des distances génétiques (et donc une parenté) plus élevées que par hasard. Des valeurs significativement positives des coefficients de corrélation r ont été obtenues parmi les échantillons séparés jusqu'à environ 230 km (Fig. 2a). Il s'agit de la valeur du premier axe des x qui fournit une estimation de la

structure génétique non aléatoire présente dans les données. Les analyses d'autocorrélation multiple pour des tailles de classe croissantes ont montré que r diminue avec l'augmentation de la taille des classes de distance. La classe de distance à laquelle r n'est plus significatif, correspondrait approximativement à l'étendue de la structure génétique spatiale détectable. Une analyse d'autocorrélation effectuée en utilisant les quatre groupes de population (Alpes, NApS, CAps et SAps) comme classes de distance confirme la conclusion selon laquelle la similarité génétique au sein d'un groupe est plus élevée aux extrémités qu'au centre de la distribution des loups (Fig. 2b). Un test de Mantel a montré une corrélation globale significative entre la distance génétique individuelle et les matrices de distance géographique ($R = 0,219$; $P = 0,001$).

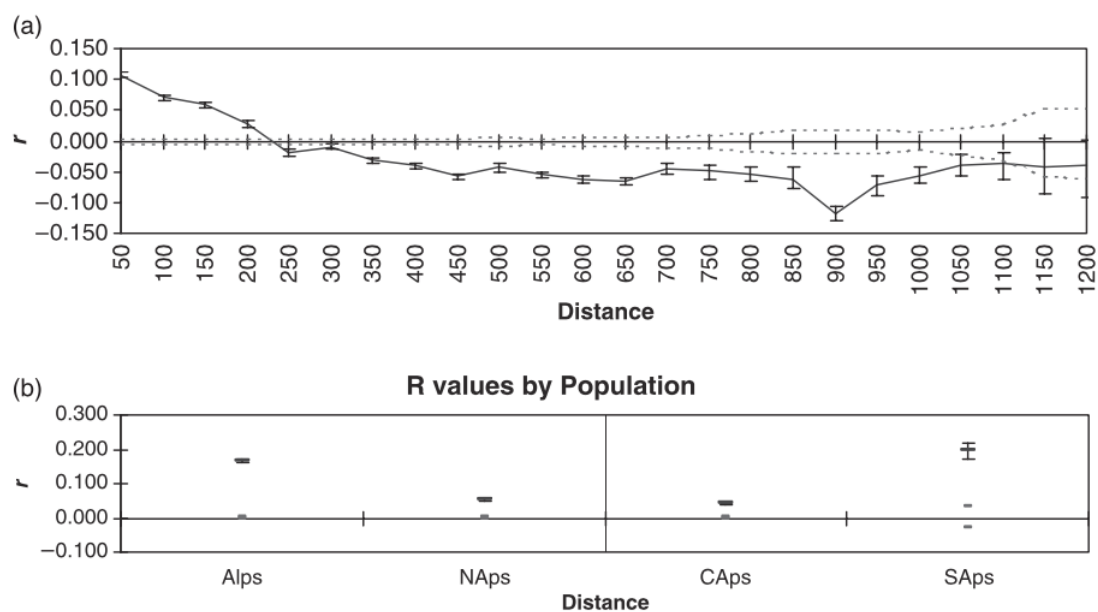


Fig. 2 Corrélogrammes montrant la corrélation génétique r en fonction de la distance (kilo-mètres) entre les populations de loups, calculée à l'aide de GENALEX (Peakall & Smouse 2005) ; (a) autocorrélation pour une classe de distance de 100 km ; (b) autocorrélation réalisées en utilisant quatre groupes de populations (Alpes, nord, centre et sud des Apennins) comme classes de distance. Les intervalles de confiance à 95% de l'hypothèse nulle d'une distribution spatiale aléatoire des génotypes (lignes brisées) et les barres d'erreur à 95% des valeurs r ont été calculés pour chaque classe de distance par bootstrap

Effet de goulot d'étranglement et simulations des schémas de colonisation

Les résultats du test de goulot d'étranglement de Cornuet & Luikart (1996), calculés dans le cadre du TPM avec $P = 10\%$, ont montré que seul l'échantillon de loups Alpains présentait un excès significatif d'hétérozygotes, en utilisant soit le test des signes ($P < 0,05$), soit le test de Wilcoxon ($P < 0,01$), alors que dans toutes les populations, la distribution des fréquences alléliques était en forme de l, comme prévu dans les populations en équilibre. **Ainsi, l'effet fondateur et le flux génétique limité pendant le processus de colonisation ont produit un signal de goulot d'étranglement détectable dans la population de loups Alpains.** Nous avons utilisé BOTTLESIM pour estimer le nombre minimum de fondateurs qui auraient pu coloniser les Alpes, conditionnellement au nombre moyen d'allèles par locus, à l'hétérozygotie attendue et aux valeurs de F_{ST} entre les Alpes et les Apennins nord et centraux. Dans ces simulations, nous avons utilisé les 273 génotypes distincts échantillonnés dans les Apennins nord et centraux, qui, selon les résultats des analyses de la structure de la population, peuvent être considérés comme la population source des loups Alpains. Une première série de simulations a été conçue pour tester un effet de **goulot d'étranglement** en supposant que les loups

alpines ne se sont pas étendus. Nous avons supposé que la population provenait de 2 à 20 fondateurs et ne s'est pas étendue pendant les huit années suivantes. **Les résultats montrent que le nombre moyen d'allèles par locus $N_A = 3,50$ (erreur standard = 0,03) observé dans la population Alpine nécessite au moins six fondateurs effectifs** (Fig. 3a). Cependant, les allèles seront perdus par dérive si la nouvelle population reste stable jusqu'à 8 ans (correspondant à environ trois générations de loups), si le nombre de fondateurs était inférieur à 14-16 (non montré). Les deux autres paramètres, H_E (Fig. 3b) et F (Fig. 3c), confirment ces conclusions, suggérant que la diversité génétique observée nécessiterait une colonisation par environ 12-16 loups effectifs. **Si nous supposons que la population de loups colonisateurs a commencé à croître immédiatement à un taux annuel moyen d'environ 7%, la diversité génétique observée après 14 ans (correspondant à 4-5 générations de loups) nécessiterait une colonisation par au moins huit fondateurs**. De même, la génération d'une F_{ST} observée = 0,08 - 0,09 entre la nouvelle population de loups dans les Alpes et les populations sources dans le nord et le centre des Apennins nécessiterait un nombre minimum d'environ huit fondateurs. Nous avons testé différents taux d'accroissement annuel (7%, 14% et 21%) mais nous n'avons pas observé de différence significative dans les valeurs N_A , H_E , F et F_{ST} (données non présentées).

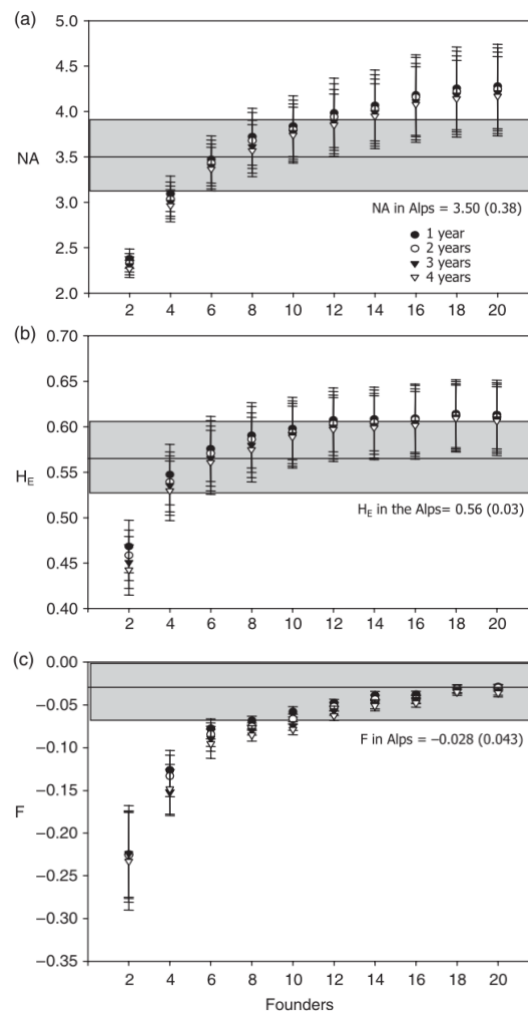


Fig. 3 Simulation de goulots d'étranglement obtenue à l'aide de BOTTLESIM (Kuo & Janzen 2003). Effets de goulots d'étranglement de taille variable (d'un minimum de 2 à 20 fondateurs) sur le nombre moyen d'allèles par locus (N_A ; a), l'hétérozygotie attendue (H_E ; b) et l'indice de fixation (F ; c), dans des populations nouvellement fondées qui restent stables pendant 1-4 ans. Les barres foncées indiquent les erreurs standard des valeurs observées chez les loups des Alpes

DISCUSSION

Origine de la population de loups Alpains

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

Effet fondateur lors de la recolonisation des Alpes

Les génotypes identifiés dans cette étude, ont montré que les loups échantillonnés dans les Alpes ont une faible diversité génétique (en termes d'hétérozygotie, de richesse allélique et de nombre d'allèles privés) que les loups des Apennins. La diversité génétique a été perdue pendant le goulot d'étranglement qui s'est produit au début du processus de recolonisation, indiqué par un test de goulot d'étranglement (BOTTLENECK), qui est significatif uniquement dans la population de loups Alpains. Cependant, la perte de diversité génétique observée n'est pas élevée : 66% des richesses allélique et 90% de l'hétérozygotie attendue de la population source est toujours maintenue chez les loups des Alpes après environ 16 ans, correspondant à environ 4–5 générations de loups (Aspi et al. 2006) depuis le début de la recolonisation. **Par conséquent, l'effet fondateur n'était pas très fort et /ou le taux de flux génétique au cours de ces premières générations de la recolonisation n'était pas très faible.** En conséquence, N_m estimé calculé à partir des valeurs F_{ST} (en supposant un équilibre génétique, ce qui n'est pas le cas), ou à partir du comptage direct de la première génération de migrants obtenus grâce à une procédure d'affectation bayésienne (GENECLASS), qui ne suppose aucun équilibre, a révélé qu'environ 1,25 à 2,50 migrants génétiquement efficaces par génération se sont déplacés des Apennins vers les Alpes. **Fait intéressant, les loups des Alpes n'ont montré aucun allèle privé, indiquant que toute la diversité allélique provient d'un échantillonnage incomplet (en raison d'un goulot d'étranglement) depuis la population sources des Apennins.** Les loups dans les Apennins du Nord ont montré sept allèles privés qui apparemment n'étaient pas en propagation dans les Alpes par les loups migrants. **Chacun des allèles trouvés**

dans les Alpes a été détecté également dans les Apennins, excluant en outre toute contribution génétique de loups non-Italiens à la colonie Alpine. La force modérée du **goulot d'étranglement** est soutenue par des simulations (indique que 8 à 16 fondateurs efficaces sont nécessaires pour expliquer la diversité génétique actuellement observée dans les Alpes. En conclusion, ces résultats révèlent que la population de loup Alpin n'a pas été fondée par un seul couple reproducteur, mais de plusieurs colonisateurs génétiquement non liés.

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

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

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

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

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

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

CONCLUSIONS

Cette étude documente certains aspects génétiques d'un processus de recolonisation des loups, montrant que : **(i)** la recolonisation des Alpes par le loup a apparemment impliqué un effet fondateur significatif ; **(ii)** les données génétiques montrent des cas de goulot d'étranglement modéré ; **(iii)** la différenciation génétique est au moins temporairement maintenue par un flux génétique réduit entre les populations sources et les colonies ; **(iv)** le flux génétique est principalement unidirectionnel et biaisé par le sexe, c'est-à-dire que les

loups mâles se déplacent préférentiellement du nord des Apennins vers les Alpes ; (v) la colonisation et la substructuration de la population sont à la fois générées et maintenues par des événements de dispersion récurrents mais peu fréquents à travers des couloirs étroits ou des habitats partiellement adaptés ; (vi) en conséquence, des points chauds locaux de consanguinité sont générés, ce qui signifie que les génotypes proches dans l'espace sont plus similaires que les génotypes plus éloignés dans l'espace. La dynamique des populations associée aux événements de colonisation peut avoir des influences importantes sur la trajectoire évolutive des populations nouvellement établies. Des conditions de non-équilibre sont créées lorsqu'une nouvelle population est fondée. Les principales variables influençant la façon dont la nouvelle population se différencie sont le nombre d'individus fondateurs, la durée de la petite taille de la population et de l'expansion démographique des colonies, et les schémas de flux de gènes (migration) après la colonisation (un seul événement fondateur principal ou une migration récurrente ?). D'autres études devraient inclure l'extension du programme de surveillance de la colonisation alpine, afin d'évaluer si de faibles taux prolongés de flux génétique réduiront la variabilité génétique des populations de loups dans les Alpes, et gonfleront la divergence génétique entre les sources et les colonies.