

Structure génétique des populations de loups (*Canis lupus*) en expansion en Italie et en Croatie, et premières étapes de la recolonisation des Alpes orientales

Mammalian Biology 79 (2014) 138–148

Contents lists available at ScienceDirect

Mammalian Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mambio

Original Investigation

Genetic structure of expanding wolf (*Canis lupus*) populations in Italy and Croatia, and the early steps of the recolonization of the Eastern Alps

E. Fabbri^{a,*}, R. Caniglia^a, J. Kusak^b, A. Galov^c, T. Gomerčić^b, H. Arbanasić^c, D. Huber^b, E. Randi^a

^a Laboratorio di Genetica, Istituto Superiore per la Protezione e Ricerca Ambientale (ISPRA), via Cà Fornacetta 9, 40064 Ozzano Emilia (BO), Italy
^b Department of Biology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Heinzelova 55, 10000 Zagreb, Croatia
^c Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Résumé

Après des siècles de contraction de l'aire de répartition et de déclin démographique, les loups sont maintenant en expansion en Europe, colonisant des régions d'où ils étaient absents depuis des siècles. Les loups qui colonisent les Alpes occidentales sont issus de l'expansion de la population Italienne. Des loups vagabonds d'origine Italienne et Dinarico-Balkanique ont été récemment observés dans les Alpes orientales. Dans cette étude, nous avons comparé la structure génétique des populations de loups en Italie et en Croatie, afin d'identifier les sources de la recolonisation en cours dans les Alpes orientales. Des échantillons d'ADN, extraits de 282 loups Italiens et 152 Croates, ont été génotypés au niveau de 12 microsatellites autosomiques (STR), de quatre STR liés à l'axe Y et de la partie hypervariable de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial (ADNmt CR1). **Les loups de Croatie et d'Italie ont subi des goulots d'étranglement démographiques récents, mais ils diffèrent en termes de diversité génétique et de structure de population.** Les loups de Croatie étaient plus variables au niveau des loci STR ($N_A = 7,4$, $H_O = 0,66$, $H_E = 0,72$; $n = 152$) que les loups d'Italie ($N_A = 5,3$, $H_O = 0,57$, $H_E = 0,58$; $n = 282$). Nous avons trouvé quatre haplotypes d'ADN mitochondrial (ADNmt CR1) et 11 haplotypes Y-STR chez les loups de Croatie, mais seulement un ADNmt CR1 et trois haplotypes Y-STR en Italie. Les loups de Croatie ont été subdivisés en trois sous-populations génétiquement distinctes (dans les régions de Dalmatie, de Gorski Kotar et de Lika), alors que les loups Italiens n'ont pas été subdivisés. Les tests d'assignation montrent que les Alpes orientales et centrales sont recolonisées par des loups se dispersant à partir des populations Italiennes et Dinariques. **La recolonisation des Alpes va vraisemblablement se poursuivre à l'avenir et la nouvelle population sera génétiquement mélangée et très variable, avec de plus grandes possibilités d'adaptations locales et de survie.**

INTRODUCTION

Au cours des dernières décennies, les populations d'ongulés et de carnivores, qui avaient décliné par le passé en raison des changements climatiques du Pléistocène (Sommer et Benecke 2005 ;

Sommer et Nadachowski 2006 ; Hofreiter et Stewart 2009) ou des pressions anthropiques (Rosser et Sue 2002), ont commencé à s'étendre, recolonisant des parties de leurs aires de répartition historiques. Les populations de carnivores en expansion se rencontrent et se mélangent souvent dans les zones de contact (Hailer et Leonard 2008). Les résultats de l'hybridation sont variables, en fonction de l'ampleur de la divergence génétique et de l'origine des populations parentales. **L'hybridation et l'introgession** subséquente peuvent perturber les pools génétiques coadaptés, menaçant l'intégrité des populations locales ou d'espèces entières et conduisant à des extinctions génétiques (Allendorf et al. 2001). Dans d'autres cas, les zones de mélange peuvent générer de nouveaux réseaux de gènes qui sont filtrés par la sélection naturelle, augmentant finalement la capacité des populations qui se mélangent (Arnold et Martin 2009 ; Kays et al. 2010). En outre, le flux de gènes peut contribuer à sauver des populations consanguines isolées et génétiquement appauvries (Tallmon et al. 2004).

Les loups (*Canis lupus*) ont fortement décliné en Europe au cours des derniers siècles en raison de la persécution humaine et du déclin de leurs proies naturelles (Breitenmoser 1998). Des populations isolées ont survécu en Ibérie et dans le sud de l'Italie, tandis que des populations de loups plus importantes sont restées en Europe de l'Est, en particulier dans les chaînes de montagnes des Carpates et du Dinar et des Balkans (Linnell et al. 2008). **Les loups d'Italie et de Croatie ont partagé des histoires démographiques partiellement similaires. Les loups d'Italie ont été isolés au sud des Alpes au moins pendant un siècle, mais probablement depuis quelques milliers d'années (Lucchini et al. 2004), et sont génétiquement différenciés de toutes les autres populations de loups dans le monde** (vonHoldt et al. 2010 ; Fig. 3). Lors du **goulot d'étranglement démographique** des années 70, les loups d'Italie ont survécu en se divisant en deux sous-populations fragmentées de moins de 100 individus, confinées dans des zones montagneuses isolées des Apennins centraux et méridionaux (Boitani 2003). Par la suite, à partir des années 80, les loups ont connu une expansion rapide, recolonisant les Apennins et se déplaçant vers les Alpes occidentales Italiennes et Françaises où ils ont établi une population transfrontalière stable (Fabbri et al. 2007 ; Marucco et al. 2012). Aujourd'hui, la population de loups des Alpes occidentales et des Apennins Italiens pourrait compter environ 800 à 1000 individus (Linnell et Boitani 2012).

Les loups étaient largement répandus dans toute la Croatie jusqu'à la fin du 19^{ème} siècle (Frkovic et Huber 1992). La chasse et les programmes d'éradication du 20^{ème} siècle les ont fait disparaître de la majeure partie du pays. Les loups ont décliné jusqu'à 30-50 individus dans les années 1980, confinés dans les montagnes Croates des régions de Gorski kotar et de Lika. Cette population est toujours restée et est toujours connectée avec la petite population voisine de loups Dinariques en Slovénie (Adamic 1992), et avec une plus grande (environ 400 individus) en Bosnie-Herzégovine (Kusak 2010). Au début des années 1990, les loups en Croatie ont commencé à croître pour atteindre une taille actuelle estimée à 175-240 individus (Kusak et Huber 2010a). Au cours des 20 dernières années, les loups se sont répandus des régions de Gorski Kotar et de Lika vers les régions voisines de Dalmatie, Banija et Ucka, reconstituant une seule population plus grande et continue (Kusak et Huber 2010b).

Les secteurs central et oriental des Alpes sont actuellement explorés par de jeunes loups mâles en dispersion, qui n'ont pas encore établi de meutes reproductrices stables (Fig. 1) (Boitani 2000 ; Weber et Fattebert 2008). Des loups d'origine Italienne et est-Européenne ont été détectés de manière récurrente en Suisse, en Autriche et dans les Alpes Italiennes orientales (Salvatori et Linnell 2005). Un mâle muni d'un collier GPS, nommé « Slavc », né en Slovénie en 2010, a quitté la

population dinarique en 2011 pour atteindre d'abord le Trentin puis la Vénétie en Italie en 2012 (écrit par Krofel : <http://www.volkovi.si/en/blog/233-gibanje-z-ovratnico-opremljenih-volkov-v-juliju-2012> ; projet LIFE : SloWolf <http://www.volkovi.si/>). Slavic a rencontré une première femelle d'origine Italienne (nommée V1302F dans cette étude) qui a rapidement été retrouvée empoisonnée en août 2012 (comme le rapporte la presse locale). Dans la même région, une autre femelle d'origine Italienne (TN2F), voyageant avec Slavic, a été identifiée génétiquement à partir d'échantillons d'excréments collectés le long des pistes de neige en automne 2012. La première reproduction réussie entre ces deux individus (Slavic et TN2F) a été rapportée en août 2013 par la presse locale (<http://www.larena.it/stories/Home/550274-il-primo-branco-di-lupidelle-alpi-orientali/> SloWolf : <http://www.volkovi.si/en/archive/284-slavic-in-julija-imata-mladie>) et confirmée par les gestionnaires du parc naturel régional de Lessinia (comm. pers.). La recolonisation par le loup est caractérisée par des épisodes précoces et sporadiques de dispersion sur de longues distances, suivis par la mise en place de meutes reproductives stables (Valière et al. 2003). Les analyses d'adéquation de l'habitat suggèrent que l'expansion du loup dans les Alpes pourrait se poursuivre à l'avenir (Marucco et McIntire 2010). Par conséquent, les loups d'origine Italienne et Dinarico-Balkanique ont des chances de continuer à se reproduire dans les Alpes, générant de nouveaux génotypes et augmentant la diversité génétique par le biais du flux génétique, avec de nouvelles opportunités d'adaptations et d'évolution locales (Hedrick et Fredrickson 2010).

Cette étude a été planifiée pour décrire la structure génétique des populations de loups Dinariques et Italiens en expansion au tout début de leur expansion vers les Alpes centrales et orientales et avant le début de leur processus de mélange prévu. Les objectifs de l'étude sont les suivants (1) estimer et comparer la variabilité génétique des deux populations ; (2) décrire la différenciation génétique entre elles ; (3) explorer la structuration locale des populations ; et (4) identifier l'origine des loups qui ont colonisé les Alpes Italiennes centrales et orientales. Ces résultats sont utilisés pour construire un ensemble de données génétiques de base sur les populations, qui aidera à surveiller la dynamique actuelle et à prévoir la dynamique future des populations de loups dans les Alpes.

MATERIEL ET METHODES

Collecte d'échantillons

De 1996 à 2011, nous avons collecté 152 échantillons de loups dans les régions de Gorski Kotar (GK ; $n = 40$), Lika (LI ; $n = 41$) et Dalmatie (DA ; $n = 59$) en Croatie (Tableau 1). Trois échantillons supplémentaires provenant de Banovina et de Pannonia ont été ajoutés au groupe Gorski Kotar ; neuf échantillons provenant de Bosnie-Herzégovine, très proche de la frontière Croate, ont été ajoutés au groupe Dalmatie. Les loups d'Italie ($n = 282$) ont été recensés de 1990 à 2009 dans les Alpes occidentales (ALP ; $n = 7$), les Apennins du Nord (NAP ; $n = 110$), les Apennins centraux (CAP ; $n = 140$) et les Apennins du Sud (SAP ; $n = 25$). Tous les échantillons ont été obtenus à partir de loups tués par des accidents de la route, par la chasse légale, par le braconnage, par la maladie, ou capturés vivants pour le radiopistage (Kusak et al. 2005). Nous avons également analysé l'ADN extrait de 19 échantillons non invasifs (excréments, poils et urines) collectés lors de programmes de surveillance sur le terrain dans les Alpes Italiennes centrales et orientales et correspondant à cinq individus différents. Les loups présentant des anomalies phénotypiques (dans les dimensions du corps, la couleur du pelage, etc.) ou des signes de mélange génétique avec des chiens (Caniglia et al. 2013a) ont été écartés et utilisés dans une étude complémentaire sur l'hybridation loup \times chien (en préparation).

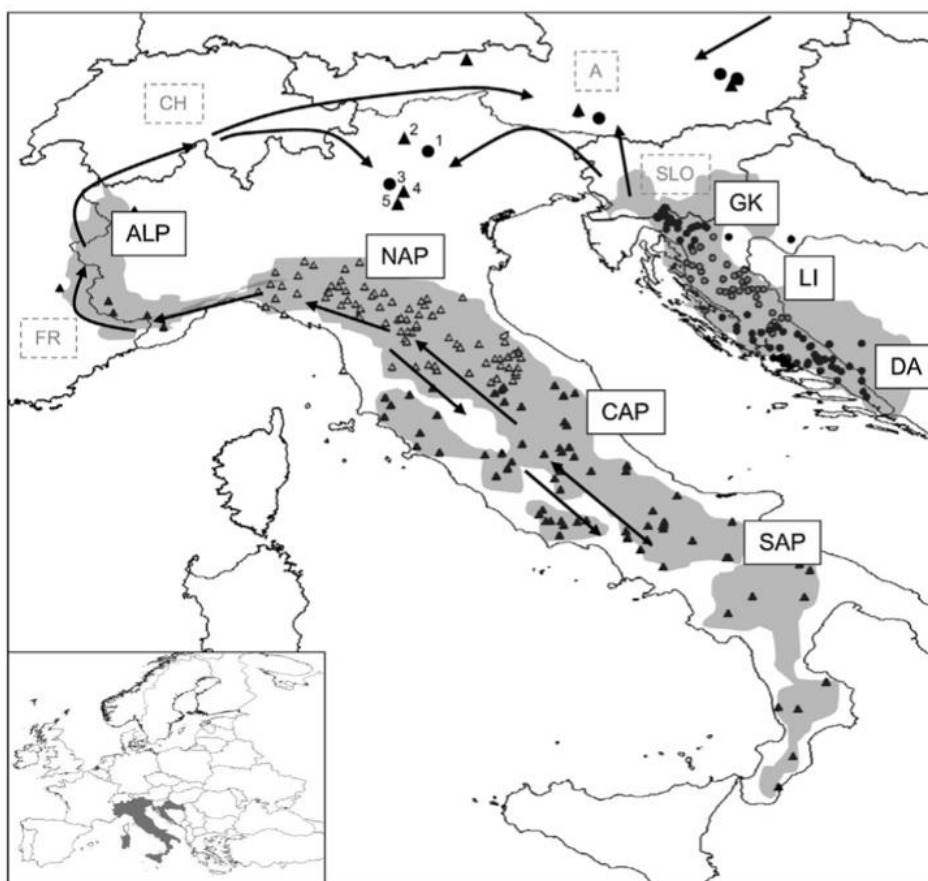


Fig.1. Aire de distribution approximative (zones ombrées) et lieux d'échantillonnage des loups en Croatie (points) et en Italie (triangles). Les flèches indiquent les principales directions d'expansion et de colonisation des loups dans les Alpes. Les plus grands symboles noirs remplis indiquent les loups solitaires en dispersion dans les Alpes (triangles : loups d'origine Italienne ; points : loups d'origine Balkanique-Dinarique). ALP : Alpes ; NAP : Apennins du Nord ; CAP : Apennins centraux ; SAP : Apennins du Sud ; GK : Gorski Kotar ; LI : Lika ; DA : Dalmatie ; FR : France ; CH : Suisse ; A : Autriche ; SLO : Slovénie

Tableau 1. Population, pays et région d'origine des individus loups utilisés dans cette étude (voir Fig. 1). F : femelles ; M : mâles ; U : sexe inconnu

Population	Country	Region	F	M	U	Total
Dinaric-Balkan	Croatia	Gorski kotar (GK)	21	19	0	40
		Lika (LI)	16	24	1	41
		Dalmatia (DA)	25	31	3	59
		Banovina and Pannonia	1	2	0	3
		Herzegovina	3	6	0	9
Apennine	Italy	Western Alps (ALP)	5	2	0	7
		Northern Apennines (NAP)	51	59	0	110
		Central Apennines (CAP)	65	74	1	140
		Southern Apennines (SAP)	10	14	1	25
Alps (dispersers)	Italy	Eastern Alps	2	3	0	5

RESULTATS

Variation génétique chez les loups Croates et Italiens

Les 12 microsatellites étaient polymorphes dans les deux populations, présentant de trois à 14 allèles par locus (Tableau supplémentaire S1). Seul le locus CPH2 des échantillons Dalmatiens présentait des allèles nuls ; aucune autre erreur de PCR (abandon d'allèles, faux allèles) n'a été détectée et tous les loci ont été utilisés pour analyser l'ensemble des données. **Les loups en Croatie ont montré une plus grande variation génétique qu'en Italie.** L'hétérozygotie chez les loups Croates ($H_o = 0,66$, $UH_E = 0,72$) était 15-20% plus importante que chez les loups Italiens ($H_o = 0,57$, $UH_E = 0,58$; Tableau 2). **Les loups Croates avaient en moyenne 2 allèles STR de plus par locus que les loups Italiens.** La distribution de la variabilité génétique (hétérozygotie et nombre d'allèles) était

uniforme dans les trois sous-populations de loups Croates, bien que les loups de Gorski Kotar aient montré une hétérozygotie légèrement réduite (Tableau 2 ; tests t par paire de H_0 par locus entre GK et LI : valeur $t = -2,53$, valeur $p = 0,03$, et entre GK et DA : valeur $t = -0,75$, valeur $p = 0,47$). Les loups des Alpes Italiennes occidentales étaient moins variables que les loups des trois secteurs des Apennins, mais de façon non significative (Tableau 2 ; tests t par paire de H_0 par locus entre ALP et NAP : t -value = $-1,21$, p -value = $0,251$, entre ALP et CAP : t -value = $-1,38$, p -value = $0,197$; entre ALP et SAP : t -value = $-1,60$, p -value = $0,138$). Le nombre d'allèles de basse fréquence (au seuil $f < 0,05$) était $N_{A(0,05)} = 4,7$ et $3,3$ en moyenne par locus chez les loups Croates et Italiens, respectivement. La richesse allélique pour la plus petite taille d'échantillon $n = 133$ était significativement plus faible chez les loups Italiens ($N_{AR} = 5,0$) que chez les loups Croates ($N_{AR} = 7,2$) (tests t appariés de N_{AR} par locus entre les populations IT et HR : valeur $t = -43$, valeur $p = 0,015$). Les loups de Croatie présentaient 37 allèles privés (3,1 par locus, en moyenne), qui n'ont pas été trouvés chez les loups Italiens, qui présentaient au contraire 14 allèles privés (1,2 par locus, en moyenne). Parmi les sous-populations Croates, les loups de Dalmatie présentaient le plus grand nombre d'allèles privés ($N_P = 13$). En Italie, les loups du sud des Apennins et des Alpes ne présentaient pas d'allèles privés. Avec des valeurs de $PID = 2,5 \times 10^{-12}$, $PIDSibs = 2,8 \times 10^{-5}$ chez les loups Croates ; $PID = 6,3 \times 10^{-9}$, $PIDSibs = 3,1 \times 10^{-4}$ chez les loups Italiens, il n'y avait pas de génotypes identiques. Dans l'ensemble, les loups Croates étaient significativement en dehors de HWE (F_{IS} moyen = $0,09$, $p = 0,000$; deux loci n'étaient pas dans HWE) et de LE (16 comparaisons par paires n'étaient pas dans LE). Les trois sous-populations de loups Croates n'étaient pas en équilibre génétique ($p = 0,005$). Les quatre sous-populations Italiennes n'étaient pas significativement hors de l'HWE ($p = 0,055$; Tableau 2) et de l'EL (trois comparaisons par paires n'étaient pas dans l'EL), mais globalement la population Italienne n'était pas dans l'HWE $\alpha > 0,01$ (F_{IS} moyen = $0,03$, $p = 0,002$).

Trois Y-STR (MSY34A, MSY34B et MSY41B) étaient polymorphes chez les loups Croates et Italiens, tandis que MSY41A était monomorphe dans les deux populations. Les loups Croates présentaient 11 haplotypes Y-STR distincts ; les loups Italiens ne présentaient que trois haplotypes (Tableau 3). La diversité des haplotypes était plus de trois fois supérieure chez les loups Croates ($Dh=0,51$) que chez les loups Italiens ($Dh=0,16$). Le nombre moyen d'allèles par haplotype était plus élevé en Croatie ($N_A = 3,7$) qu'en Italie ($N_A = 2,2$). N_A et Dh étaient distribués de manière égale dans les trois régions échantillonnées en Croatie, alors qu'ils étaient différents en Italie : les loups des Alpes occidentales étaient monomorphes ($Dh=0,0$) ; seuls les loups des Apennins centraux présentaient les trois haplotypes détectés jusqu'à présent en Italie ($Dh = 0,21$). Les loups en Croatie et en Italie ne partageaient aucun haplotype Y-STR (Tableau 4).

Les échantillons ont montré des différences plus extrêmes dans la distribution de la diversité de l'ADNmt (Tableau 4) : les loups Italiens ont montré un haplotype unique d'ADNmt W14 (Randi et al. 2000 ; Pilot et al. 2010) ; les loups Croates ont montré quatre haplotypes, distribués dans les trois régions échantillonnées, avec un haplotype différent sur 30 individus en moyenne ($Dh=0,70$; écart-type $SD= 0,02$). La diversité des haplotypes était plus faible dans le Gorski Kotar ($Dh = 0,36$; $SD = 0,09$) que dans le Lika ($Dh = 0,63$; $SD = 0,05$) et le Dalmatia ($Dh = 0,72$; $SD = 0,03$). La divergence des haplotypes était faible et la distance génétique moyenne était $TN93 = 0,021$. La diversité nucléotidique Pi était faible, allant de $0,01$ à $0,02$ (Tableau 3).

Structure génétique de la population

Les loups de Croatie et d'Italie sont représentés séparément dans un DAPC (Fig. 2) et sont significativement différenciés ($F_{ST} = 0,20$; $p = 0,01$). Les résultats du DAPC et de l'AMOVA ont également indiqué que les trois sous-populations en Croatie étaient plus différenciées ($F_{ST} = 0,05$; $p = 0,01$) que les quatre sous-populations en Italie ($F_{ST} = 0,01$; $p = 0,01$). Le test d'assignation dans GenALEX a montré que 73% des loups Croates étaient assignés à leur population d'origine (Tableau 5). Les loups de Dalmatie étaient les plus différenciés, avec 83% de génotypes assignés à leur population d'origine. En revanche, seulement 55% des loups d'Italie ont été assignés à leur population d'origine.

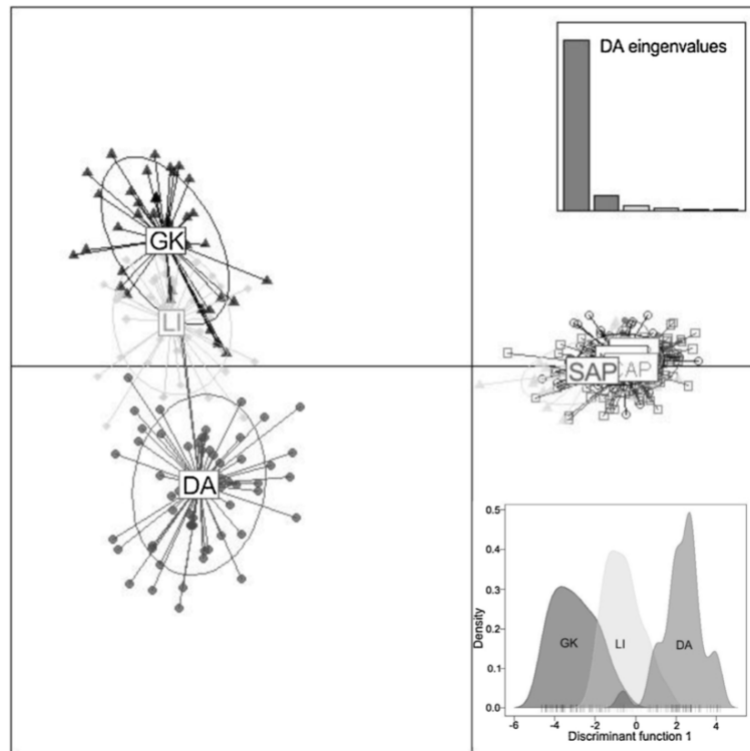


Fig. 2. Analyse discriminante du diagramme de dispersion des composantes principales (DAPC, calculée dans ADEGENET) montrant la distinction génétique entre les loups échantillonnés en Croatie (regroupement vers le côté gauche de la PC-I) et en Italie (côté droit de la PC-I, qui explique 87,12% de la variabilité génétique totale ; voir aussi l'histogramme des valeurs propres de DA dans la partie supérieure droite). Le PC-II (qui explique 7,62% de la variabilité génétique totale) indique les distinctions entre les trois sous-populations de loups Croates (GK : Gorski Kotar ; LI : Lika ; DA : Dalmatie, voir également l'insertion du diagramme de densité dans la partie inférieure droite de la figure). Les quatre sous-populations de loups Italiennes (Alpes, ALP ; Apennin Nord, NAP ; Apennin Central, CAP ; Apennin Sud, SAP) ne se sont pas regroupées séparément. Les points, triangles et carrés indiquent les génotypes individuels des loups tels que définis par 12 loci STR autosomiques

STRUCTURE (avec le modèle d'admixture et le modèle I) a indiqué un $K=2$ optimal qui divise les loups de Croatie ($q_{HR}=0,99$) et d'Italie ($q_{IT} = 0,99$) en deux clusters distincts (Fig. 3a) sans admixture. Les génotypes ont été assignés aux deux clusters avec une proportion individuelle d'admixture allant de $q_{IT} = 0,95$ à $0,98$, et de $q_{HR} = 0,83$ à $0,99$. Les loups Croates ont été sous-structurés en sous-populations $K = 2$ (admixture et modèles F) ou $K = 3$ (*locprior* et modèles F), indiquant dans les deux cas que les loups de Dalmatie étaient les plus différents et présentaient la plus faible admixture (Fig. 3b). Bien que le regroupement optimal des loups Italiens ait été obtenu à $K = 2$ (avec ou sans le modèle *locprior*), les individus n'ont pas été répartis en deux groupes distincts, mais tous les échantillons ont montré un fort signal de mélange, à l'exception partielle des loups du sud des Apennins, qui étaient moins mélangés que les autres sous-populations (Fig. 3c).

GENELAND a identifié trois clusters chez les loups de Croatie (Fig. 4a). Le cluster 1 comprenait tous les loups de Dalmatie, plus deux individus échantillonnés à Gorski Kotar ; les loups de Gorski kotar et de Lika ont été assignés au cluster 2 ; le cluster 3 comprenait quelques individus échantillonnés en Bosnie et en Dalmatie. Les loups Italiens n'ont montré aucune structuration génétique détectable (données non présentées). L'analyse sPCA a donné des résultats similaires (Fig. 4b). Les loups Croates ont été divisés en deux groupes : Gorski Kotar plus Lika, et Dalmatie. Les loups Italiens n'ont pas montré de signaux détectables de structuration spatiale.

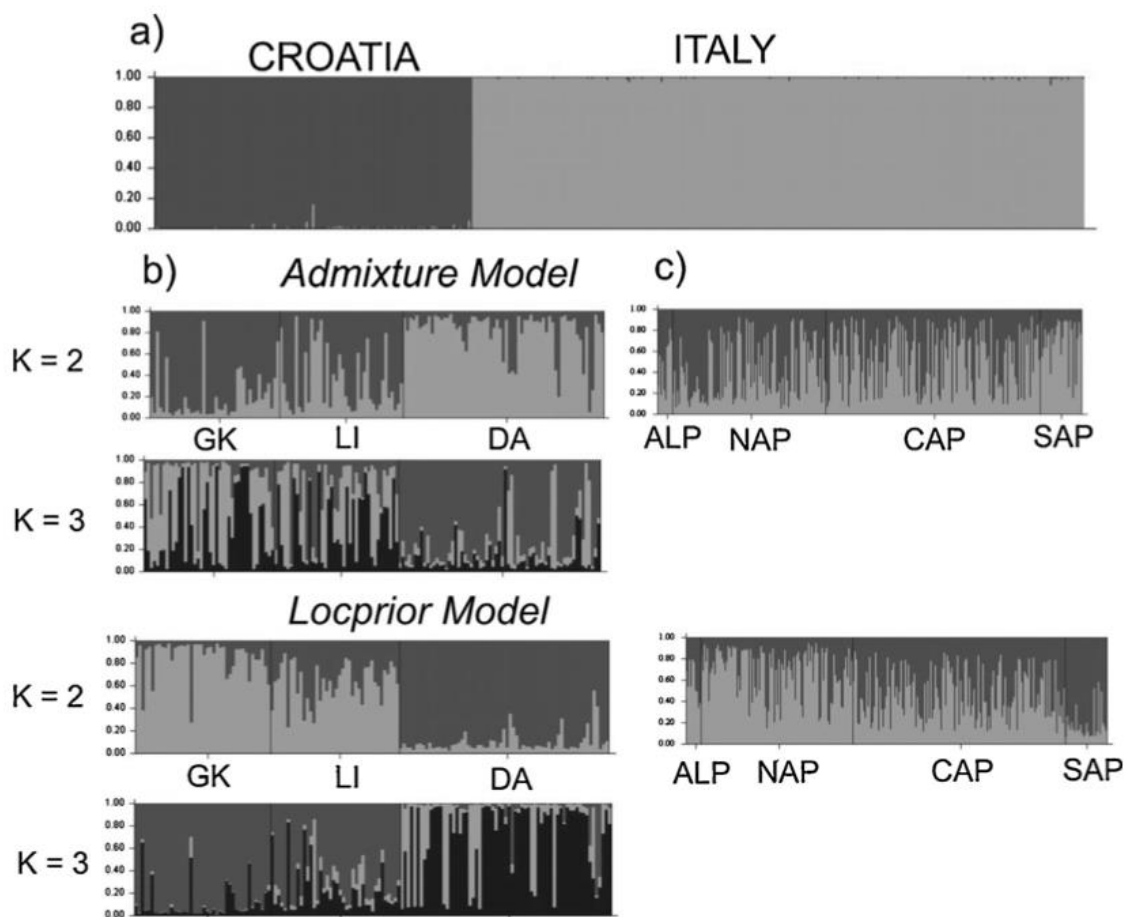


Fig.3. Regroupement bayésien des loups Croates et Italiens obtenu par analyse structurale avec : (a) les échantillons de génotypes de loups Croates et Italiens à 12 locus STR autosomiques, $K = 2$, aucune information préalable sur la population, les modèles de mélange et de fréquences alléliques indépendantes ; (b) les génotypes de loups Croates, $K = 2$ et $K = 3$, les fréquences alléliques corrélées avec les modèles de mélange et de localisation ; (c) les génotypes de loups Italiens, $K = 2$, les fréquences alléliques corrélées avec les modèles de mélange et de localisation. GK : Gorski Kotar ; LI : Lika ; DA : Dalmatie ; ALP : Alpes ; NAP : Apennin nord ; CAP : Apennin central ; SAP : Apennin sud

Flux génétique et affectation des loups vagabonds dans les Alpes

Les taux de flux génétiques historiques estimés à partir des valeurs de F_{ST} varient entre 1,5 et 7,1 individus par génération parmi les sous-populations de Croatie, et entre 1,9 et 22,1 parmi les sous-populations d'Italie. Les taux de flux génétiques les plus faibles ($Nm = 1,9-3,3$) étaient entre les loups des Apennins et des Alpes ; le plus important ($Nm = 22,7$) était entre les loups des Apennins centraux et du Nord. Les estimations bayésiennes du flux génétique contemporain (Tableau 5) donnent 37 migrants de première génération parmi les sous-populations de Croatie ($n = 20$) et d'Italie ($n = 17$). Huit loups échantillonnés à Gorski Kotar étaient probablement des migrants de Lika ($n = 6$) et de Dalmatie ($n = 2$). Six loups échantillonnés à Lika ont probablement migré de Gorski Kotar ($n = 2$) et de Dalmatie ($n = 4$). Six loups échantillonnés en Dalmatie provenaient des

sous-populations de Gorski Kotar ($n = 3$) et de Lika ($n = 3$). Ainsi, les taux de migration récente entre les trois sous-régions de Croatie variaient de 9% à 19%. Les taux de migration récente en Italie variaient de 4% à 20%, et la migration vers les Alpes (14%) et le sud des Apennins (20%) était apparemment plus importante qu'entre le nord et le centre des Apennins (4,5% en moyenne).

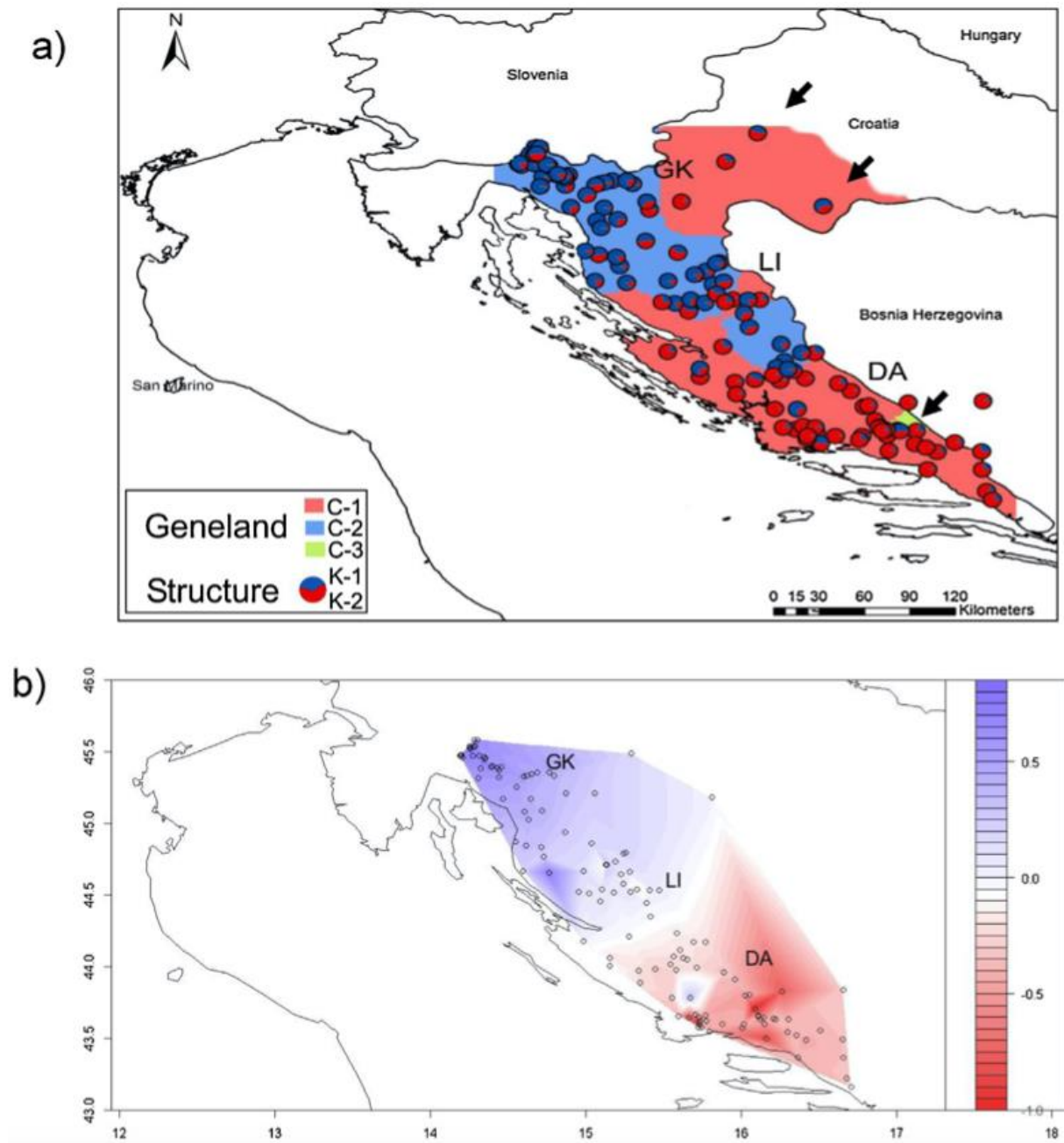


Fig. 4. (a) Résultats de l'analyse GENELAND montrant les emplacements spatiaux et les assignations des génotypes individuels des principaux clusters de loups Croates : **cluster 1**, correspondant à la population Dalmate ; **cluster 2**, correspondant aux populations de Gorski Kotar et de Lika ; les individus migrants putatifs sont identifiés comme un troisième cluster en Dalmatie, ou ils sont assignés au cluster 1 (flèches). Les résultats de STRUCTURE ($K = 2$, modèle d'admixture) sont présentés sous forme de diagramme circulaire. (b) Analyse spatiale en composantes principales (sPCA dans ADEGENET) montrant la carte interpolée des scores du génotype du loup Croate. Les cercles représentent les individus et les gradients d'ombre quantifient le degré de différenciation génétique entre les deux principaux groupes génétiques : les loups de Gorski Kotar (GK) et ceux des régions de Dalmatie (DA)

Trois des cinq loups solitaires échantillonnés dans les Alpes Italiennes orientales ont été assignés par Structure au cluster des loups Italiens avec $q_i = 0,98-0,99$ et un IC à 90% étroit (Tableau 6). Les deux autres génotypes, les loups Slavic et TN2M, ont été assignés à la population Croate, bien

qu'avec un $q_i = 0,95$ plus faible et un IC à 90% plus large. Les résultats de GeneClass ont confirmé l'assignation du loup Slave à la population Croate ($p = 0,81$), tandis que TN2M n'a été assigné à aucune population au seuil prédéfini $p = 0,05$. Les trois loups d'origine Italienne présumée ont été assignés à la population de loups Italiens bien qu'avec des valeurs p différentes (Tableau 6). Ces trois loups présentaient l'haplotype Italien mtDNA CR1 W14 et le mâle TN1M présentait l'haplotype Y-STR loup Italien U que l'on retrouve également chez les loups des Alpes (Tableau 4). Ainsi, les preuves génétiques soutiennent de façon concordante une origine de ces trois loups dans la population des Alpes occidentales. Les deux loups non Italiens présentaient des haplotypes d'ADNmt CR1 et Y-STR répandus chez les loups Croates, mais absents chez les loups Italiens (Tableau 6). Une recherche dans GenBank a montré que l'haplotype mtDNA CR1 WCR01, trouvé chez ces deux loups, n'a été trouvé qu'en Croatie par Pilot et al. (2010 ; dans cette étude, l'haplotype a été nommé W23) et qu'il n'a été trouvé dans aucune autre population de loups dans le monde.

Les populations admixtes simulées dans les Alpes, issues du croisement de 5, 10 ou 15 colonisateurs simulés de chacune des deux populations sources (Croatie et Italie), ont montré une hétérozygotie plus élevée que dans les deux populations sources, alors que le nombre d'allèles était intermédiaire (Tableau S1).

DISCUSSION

Les loups d'Italie et de Croatie présentent des niveaux différents de diversité génétique et de structure géographique, ce qui suggère des histoires démographiques distinctes. La diversité des haplotypes autosomiques STR, mtDNA CR1 et Y-STR est plus faible chez les loups Italiens que chez les loups Croates. La faible diversité des loups Italiens a également été confirmée au niveau génomique par le génotypage d'un grand nombre de SNP (40-60 K) dans des expériences de puces à ADN (vonHoldt et al. 2011 ; Stronen et al. 2012). Ainsi, les conséquences des goulets d'étranglement démographiques ont été plus fortes chez les loups Italiens, ou leur isolement des autres populations a été plus profond (Lucchini et al. 2004, vonHoldt et al. 2011). Les loups Croates ont maintenu une variation génétique élevée, peut-être en raison du flux génétique permanent avec les loups de Slovénie, de Bosnie Herzégovine (Gomercic et al. 2010) qui s'est poursuivi malgré les récents changements d'habitat et le développement des infrastructures (Kusak et al. 2005). En revanche, les loups Italiens sont encore génétiquement isolés de toute autre population de loups. Néanmoins, les deux populations montrent un grand potentiel de croissance et d'expansion de leurs aires de répartition. Leur composition génétique est très différente en ce qui concerne la fréquence des allèles et le nombre d'allèles privés (F_{ST} moyen = 0,20). Aucun des haplotypes CR1 de l'ADNmt et Y-STR n'est partagé entre elles. Par conséquent, tous les individus des deux populations sont répartis de manière congruente en deux groupes génétiques avec une confiance de 100%, en utilisant des procédures multivariées ou bayésiennes. Les données génomiques ont également indiqué que les loups Dinarico-Balkaniques (Croatie, Grèce et Bulgarie) se sont regroupés séparément des autres populations d'Europe de l'Est et que, parmi elles, les loups Croates sont distincts (Stronen et al. 2012). L'expansion concomitante des loups Italiens des Apennins et des loups Dinarico-Balkaniques dans les Alpes centrales et orientales donnera vraisemblablement naissance à une nouvelle population présentant une diversité génétique plus élevée que celle des deux populations sources.

L'expansion du loup suit apparemment un modèle de propagation (Ibrahim et al. 1996), caractérisé par la dispersion précoce sur de longues distances d'individus solitaires, principalement de jeunes

mâles, à la recherche de nouveaux territoires appropriés et par l'établissement ultérieur de meutes reproductives stables (Valière et al. 2003 ; Fabbri et al. 2007). Ce modèle semble confirmé par les données empiriques.

Des événements de dispersion sur de longues distances ont été rapportés chez des loups porteurs de colliers émetteurs en Amérique du Nord (Linnell et al. 2005 ; leur Fig. 3 et leurs références). Les distances en ligne droite >500km n'étaient pas rares (10/298 enregistrements = 3% ; maximum 800 km), et dans certains cas, les loups voyageaient rapidement (maximum c. 20km/jour). Les disperseurs à longue distance (>300km) étaient principalement des mâles (75%). Boxall local press : <http://earthfirstnews.wordpress.com/2012/01/03/lone-grey-wolf-wanders-into-california-first-since-1924/> a documenté un voyage d'un seul loup suivi par GPS qui a parcouru plus de 1224 km de l'Oregon à la Californie du Nord. Les distances de dispersion parcourues par les loups en Finlande étaient inférieures à 100 km, en moyenne (médiane = 99 km, fourchette 35-445 km ; Kojola et al. 2006), mais deux mâles ont parcouru plus de 400 km, ce qui correspond à une distance réelle de plus de 1000 km (Wabakken et al. 2001). La recolonisation en cours de l'est de l'Allemagne est soutenue par des loups en expansion depuis le nord-est de la Pologne (Nowak et al. 2011 ; Czarnomska et al. 2013). Un loup mâle avec collier GPS d'origine Allemande a voyagé dans la direction opposée, de l'Allemagne vers l'est à travers toute la Pologne, parcourant 1200 km en 86 jours (Schede et al. 2010). En décembre 2012, après 200 ans, un loup d'origine Allemande a été retrouvé au Danemark (Andersen et al. en prép.).

Les Alpes occidentales Italiennes, Françaises et Suisses ont été colonisées par quelques disperseurs à longue distance originaires de la population nord-Italienne des Apennins (Lucchini et al. 2002 ; Valière et al. 2003 ; Fabbri et al. 2007). Les loups sont revenus dans les Alpes Italiennes orientales en 2006, après 150 ans. Un loup trouvé mort, génétiquement assigné à la population source Dinarique-Balkanique, a été collecté en 2008 (Lapini et al. 2010). Trois loups d'Europe de l'Est ont été génétiquement identifiés en 2009 en Autriche (Schäfer 2012) ; en 2009-2010, deux loups d'origine orientale et Italienne ont été identifiés dans les Alpes Italiennes orientales (Groff et Pedrini 2009 ; Fig. 1). Des données génétiques et GPS ont documenté en détail la dispersion sur une longue distance vers les Alpes occidentales d'un loup né dans le nord des Apennins en Italie (Ciucci et al. 2009). En 10 mois (mars 2004-janvier 2005), ce loup a parcouru une distance minimale de 958 km, correspondant à une estimation de plus de 1200 km. Durant les dernières semaines de sa vie, il a rejoint une femelle d'origine Italienne (identifiée génétiquement), mais celle-ci a été retrouvée morte avant tout événement de reproduction documenté. Les résultats de cette étude confirment que la recolonisation des Alpes orientales est caractérisée par des dispersions exploratoires initiales à longue distance. Le loup Slavic est originaire de la population de loups Slovènes, très proche de la frontière Croate et probablement en relation avec les loups Croates. Slavic a quitté la population Dinarique en 2011, a parcouru 1076 km de distance linéaire (environ 2000 km au sol ; H. Potonik, comm. pers.), a atteint la Vénétie en 2012 où il a ensuite rencontré deux femelles d'origine Italienne, et s'est reproduit avec succès en août 2013 (<http://www.volkovi.si/>).

La structure génétique des populations de loups en Italie et en Croatie est très différente. Les loups d'Italie ne sont pas géographiquement différenciés, en raison de l'expansion rapide le long de la chaîne des Apennins. Les loups de Croatie présentent une **sous-structure** significative, la sous-population de Dalmatie étant très différente des loups voisins de Gorski Kotar et de Lika. Les loups de Dalmatie pourraient avoir pour origine des zones de refuge distinctes. Les données

historiques indiquent qu'à la fin du 19^{ème} siècle et au début du 20^{ème} siècle, les loups et les chacals existaient en Dalmatie (Schwenk 1985). Cependant, au 20^{ème} siècle, les chacals ont augmenté (Krystufek et Tvrtkovic, 1990), tandis que les loups ont apparemment disparu (Frkovic et Huber 1992). Après la Seconde Guerre mondiale, la Dalmatie a été recolonisée par des loups probablement dispersés depuis le Lika voisin et/ou la Bosnie-Herzégovine (Kusak et Huber 2010a). Cependant, si les loups de Lika étaient la population source, les loups de Dalmatie ne devraient pas être génétiquement différents. En revanche, les loups de Bosnie-Herzégovine, de Serbie et du Monténégro ont été reconnus comme une sous-espèce distincte (*Canis lupus kurjak*, Décrit par Bolkay en 1925), et pourraient être génétiquement différenciés. Milenkovic et al. (2010) ont décrit des différences significatives entre les crânes des populations de loups de la région Dinarique-Balkanique et des Carpates. Cependant, les neuf loups de Bosnie-Herzégovine analysés dans cette étude n'étaient pas différents des autres loups de Dalmatie. Il est également possible que les loups n'aient jamais complètement disparu de Dalmatie, mais qu'ils aient survécu en faible nombre et se soient rétablis.

Des facteurs écologiques et comportementaux, tels que la sélection des proies, pourraient contribuer à façonner la structure génétique des loups, comme cela a été rapporté en Amérique du Nord (Carmichael et al. 2001 ; Geffen et al. 2004) et en Europe (Pilot et al. 2006, 2012 ; Jedrzejewski et al. 2012). La variété des espèces d'ongulés sauvages, avec une prédominance des espèces de grande taille (par exemple l'élan *Alces alces*) dans le nord de l'Europe (Wawrzyniak et al. 2010), et des espèces plus petites (sanglier *Sus scrofa*, chevreuil *Capreolus capreolus* ; Kusak et Krapinec 2010) dans le sud de l'Europe, peut limiter le flux génétique entre les sous-populations de loups, même en l'absence de barrières à la dispersion (Pilot et al. 2006 ; Czarnomska et al. 2013). Les différences de taille corporelle et de forme du crâne peuvent influencer la capacité à capturer et à manipuler de grandes proies (MacNulty et al. 2009). Les régions côtières de l'Adriatique et les basses terres de la Dalmatie présentent des différences climatiques et d'habitat spectaculaires par rapport aux chaînes de montagnes Dinarique-Balkanique voisines. Les loups Dinarico-Balkaniques ont été signalés comme ayant des crânes plus petits et de forme différente que les individus de la partie Serbe des Carpates (Milenkovic et al. 2010), et peuvent être avantagés pour capturer des proies plus petites et plus rapides. La distribution des espèces proies du loup correspond bien à la structure de la population de loups décrite en Croatie. Le cerf rouge est abondant dans le Gorski Kotar, rare dans le Lika et absent en Dalmatie (Kusak et Krapinec 2010). Les sangliers (ainsi que les moutons et les chèvres domestiques) sont disponibles en Dalmatie. Des changements dans la composition des proies ont été constatés dans le régime alimentaire des loups de différentes régions de Croatie (Kusak 2002). Ainsi, la **sélection différentielle** associée aux mécanismes de défense des proies et aux traits nécessaires pour les surmonter (par exemple, la taille par rapport à la vitesse) pourrait influencer la différenciation observée entre les loups s'attaquant à différents assemblages de proies.

Les conséquences génétiques de l'expansion et de la colonisation des populations sont d'un grand intérêt pour la biologie de l'évolution et la biologie pratique de la conservation. Les ensembles de données génétiques obtenus à partir de programmes de surveillance permettent d'identifier l'origine des colonisateurs, de détecter rapidement l'apparition de mélanges de populations, ce qui est particulièrement préoccupant lorsque des populations sauvages sont impliquées (Randi 2008), d'estimer l'étendue de la diversité génétique dans les colonies nouvellement fondées et de prévoir sa dynamique évolutive dans de petites populations isolées (vonHoldt et al. 2011). La recolonisation en cours des Alpes est une expérience naturelle intéressante qui pourrait fournir des données empiriques et des informations plus approfondies sur les modèles de dispersion des loups, les effets

fondateurs, les taux de flux génétiques entre la source et les colonies, les conséquences du mélange génétique sur l'introgession des gènes et la réorganisation génomique, la sélection naturelle dans la nature et les éventuels effets de sauvetage. Les futures populations de loups dans les Alpes seront génétiquement plus variées que les deux populations parentales et pourront s'adapter pour survivre à long terme.