

Les facteurs écologiques sont à l'origine de la différenciation chez les loups de la Colombie-Britannique

Journal of Biogeography (J. Biogeogr.) (2009)



Ecological factors drive differentiation in wolves from British Columbia

Violeta Muñoz-Fuentes^{1*}, Chris T. Darimont^{2,3}, Robert K. Wayne⁴, Paul C. Paquet⁵ and Jennifer A. Leonard^{1,6}

¹Department of Evolutionary Biology, Uppsala University, Uppsala, Sweden, ²Department of Biology, University of Victoria, Victoria, BC, Canada, ³Raincoast Conservation Foundation, Denny Island, BC, Canada, ⁴Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of California, Los Angeles, CA, USA, ⁵Faculty of Environmental Design, University of Calgary, Calgary, AB, Canada and ⁶Center for Conservation & Evolutionary Genetics, National Zoological Park, Smithsonian Institution, Washington, DC, USA

Résumé

But On prévoit une structure de population limitée pour les espèces vagiles et généralistes, comme le loup gris (*Canis lupus* L.). Nos objectifs étaient d'étudier comment la variabilité génétique des loups gris était distribuée dans une zone comprenant différents habitats situés dans le rayon de dispersion potentiel d'un individu et de faire des déductions sur l'impact de l'écologie sur la structure de la population.

Localisation La Colombie-Britannique, Canada - qui est caractérisée par un continuum de zones biogéoclimatiques à travers lesquelles les loups gris sont distribués - et les zones adjacentes au Canada et en Alaska, États-Unis.

Méthodes Nous avons obtenu des séquences de la région contrôle de l'ADN mitochondrial de loups gris provenant de toute la province et avons intégré nos résultats génétiques aux données sur le phénotype, le comportement et l'écologie (distance, habitat et composition des proies). Nous avons également comparé la diversité et la différenciation génétique des loups gris de la Colombie-Britannique avec celles d'autres populations de loups d'Amérique du Nord.

Résultats Nous avons trouvé une forte différenciation génétique entre les populations adjacentes de loups gris de la côte et de l'intérieur de la Colombie britannique. Nous montrons que le facteur le plus probable expliquant cette différenciation est la discontinuité de l'habitat entre les régions côtières et intérieures de la Colombie-Britannique, par opposition à la distance géographique ou aux barrières physiques à la dispersion. Nous émettons l'hypothèse que les loups gris dispersés sélectionnent des habitats similaires à celui dans lequel ils ont été élevés, et que cette différenciation est maintenue en grande partie par des mécanismes comportementaux.

Principales conclusions L'identification d'une forte structure génétique à l'échelle des capacités de dispersion d'un individu suggère que des facteurs écologiques sont à l'origine de la différenciation des loups en Colombie Britannique. Les loups de la côte sont très distincts et représentatifs d'un écosystème unique, tandis que les loups gris de l'intérieur de la Colombie-

Britannique ressemblent davantage aux populations adjacentes de loups situées en Alaska, en Alberta et dans les Territoires du Nord-Ouest. Compte tenu de leurs caractéristiques écologiques, morphologiques, comportementales et génétiques uniques, les loups gris de la côte de la Colombie-Britannique devraient être considérés comme une **unité évolutive significative (UES)** et, par conséquent, mériter un statut de conservation spécial. Si l'écologie peut être le moteur de la différenciation chez un généraliste très mobile comme le loup gris, elle l'est probablement aussi chez de nombreuses autres espèces.

INTRODUCTION

La structure phylogéographique est une conséquence de la dispersion limitée au sein de l'aire de répartition d'une espèce. Les structures phylogéographiques peuvent refléter un isolement par la distance, la présence d'une barrière à la dispersion (telle qu'une caractéristique géologique ou un habitat inadapté), des événements historiques ou une combinaison de ces facteurs (Avice et al., 1987). Les variables environnementales et écologiques (Doebeli & Dieckmann, 2003 ; Nosil et al., 2005 ; Funk et al., 2006) et les interactions sociales (Bolnick et al., 2003) peuvent également contribuer à façonner la structure des populations. Une aire de répartition géographique comprenant une variété d'habitats peut donner lieu à des individus adaptés à des facteurs environnementaux et/ou écologiques spécifiques (p. ex. Hoekstra et al., 2005). L'adaptation, à son tour, peut entraîner un certain degré d'isolement si les individus ont une plus grande probabilité de survie là où ils sont nés ou élevés (Nosil et al., 2005). L'aptitude différentielle peut conduire à une réduction de la migration effective entre les habitats et générer une différenciation génétique et une structure de population. Il a été proposé que la structure phylogéographique générée par des causes naturelles (non anthropomorphes) soit d'une grande importance pour la conservation, car il peut s'agir d'unités sur lesquelles l'évolution agit et qui peuvent donc parfois représenter des espèces naissantes (Moritz, 1994). Pour souligner l'importance de ces unités sous-spécifiques, le terme **d'unité significative d'évolution (UES)** a été inventé (Ryder, 1986). Récemment, la définition de l'UES a été affinée pour souligner l'importance que l'écologie et l'adaptation locale jouent dans l'évolution (Crandall et al., 2000 ; Fraser & Bernatchez, 2001). L'identification des UES est donc d'une grande importance tant pour comprendre le passé évolutif d'une espèce que pour assurer son avenir.

De nombreux grands mammifères ont une grande capacité de dispersion et sont répartis dans une grande variété d'habitats. Une littérature émergente montre que la différenciation génétique chez ces mammifères peut être associée à des différences écologiques, et pas seulement à la distance géographique. Parmi les exemples, citons le renard arctique (*Alopex lagopus* ; Dalén et al., 2005 ; mais voir Carmichael et al., 2007), le cougar (*Puma concolor* ; McRae et al., 2005), le coyote (*Canis latrans* ; Sacks et al., 2004) et le lynx (*Lynx lynx* et *L. canadensis* ; Rueness et al., 2003a, b). L'exemple le plus connu de comportement divergent associé à des différences écologiques résultant de la structure génétique est peut-être celui entre les orques (*Orcinus orca*) sympatriques résidents (mangeurs de poissons) et transitoires (mangeurs de mammifères marins) ; Hoelzel et al., 1998). Il est important de quantifier le degré auquel l'habitat entraîne une différenciation génétique. Si la spécialisation de l'habitat est un facteur majeur conduisant et/ou maintenant la divergence, alors en l'absence de données spécifiques, on devrait supposer que les populations dans différents habitats sont génétiquement différenciées, ce qui implique que lorsqu'un habitat spécifique est menacé, une population unique, différenciée des populations de la même espèce dans les zones adjacentes, est également menacée.

Les loups gris (*Canis lupus* L.) sont des carnivores très mobiles qui se dispersent souvent sur plus de 100 km avant de se reproduire (Fritts, 1983 ; Merrill & Mech, 2000 ; Linnell et al., 2005). Les caractéristiques géologiques qui peuvent constituer des barrières pour certaines espèces, telles que les chaînes de montagnes, constituent probablement peu d'obstacles aux déplacements des loups, et peuvent même servir de corridors (Forbes & Boyd, 1996). En plus de leur vagabondage, les loups gris sont des généralistes de l'écosystème, occupant une grande variété d'habitats. En Amérique du Nord, ils vivent dans des habitats aussi divers que la toundra arctique, les forêts boréales, les plaines, les montagnes, les déserts et les forêts pluviales tempérées. En raison de ces caractéristiques, on s'attend à une faible structure phylogéographique chez les loups. En effet, les premières études phylogéographiques des loups gris du monde entier et d'Amérique du Nord ont confirmé cette prédiction, ne montrant aucune structure à grande échelle au sein de l'Eurasie ou de l'Amérique (Lehman et al., 1991 ; Wayne et al., 1992 ; Vilà et al., 1999). Des études utilisant un échantillonnage plus détaillé ont cependant suggéré qu'il pouvait exister une structure génétique dans les populations de loups gris (Carmichael et al., 2001, 2007 ; Sharma et al., 2003 ; Geffen et al., 2004 ; Pilot et al., 2006 ; Musiani et al., 2007). Geffen et al. (2004) ont réanalysé certaines études précédentes sur les loups gris en Amérique du Nord et ont identifié un modèle d'isolement associé à l'habitat et au climat. À une échelle plus fine, la spécialisation des proies peut être à l'origine de la structure de la population de loups gris des Territoires du Nord-Ouest, au Canada (Musiani et al., 2007). De même, des facteurs écologiques tels que la distribution des proies, l'habitat et le climat ont été mis en corrélation avec la différenciation génétique des populations de loups gris d'Europe de l'Est (Pilot et al., 2006).

Les loups de la côte de la Colombie-Britannique occupent une région étroite qui comprend la côte continentale et les habitats insulaires proches du rivage couvert par une forêt pluviale tempérée qui s'étend de l'île de Vancouver au sud jusqu'à l'archipel Alexander au sud-est de l'Alaska au nord (Fig. 1). Bien qu'il soit urgent de répondre aux menaces imminentes qui pèsent sur la biodiversité de cet écosystème, il existe peu d'informations scientifiques pour étayer l'importance évolutive de cette région (Cook et al., 2001, 2006 ; Darimont & Paquet, 2002 ; Paquet et al., 2004-2005). Récemment, une étude sur les loups du sud-est de l'Alaska a identifié une divergence génétique entre les loups de l'intérieur et ceux de la côte sud-est de l'Alaska (Weckworth et al., 2005). Cela souligne la nécessité d'étudier les loups de la Colombie-Britannique adjacente, car la forêt pluviale côtière du sud-est de l'Alaska s'étend au sud de la Colombie-Britannique.

Les loups de la Colombie-Britannique, au Canada, constituent un bon système pour évaluer les effets de la distance et de la variation de l'habitat sur la structure génétique des populations, car ils sont répartis dans des habitats très différents à une échelle comprise dans la distance de dispersion d'un individu (Fig. 1 et Tableau 1). Une discontinuité écologique existe entre les régions intérieures et côtières, respectivement à l'est et à l'ouest de la chaîne des montagnes côtières. Les zones du plateau intérieur sont sèches, avec un climat continental (chaud en été, froid en hiver). Huit espèces d'ongulés, dont la répartition varie, sont disponibles comme proies pour les loups de l'intérieur (Cowan & Guiguet, 1975 ; Nagorsen, 1990 ; Shackleton, 1999) (Tableau 1). En revanche, la région côtière est définie par une forêt pluviale de basse altitude avec un climat tempéré (doux toute l'année). Une seule espèce d'ongulés est distribuée sur toute la côte, le cerf à queue noire (*Odocoileus hemionus* ; Cowan & Guiguet, 1975 ; Nagorsen, 1990 ; Shackleton, 1999). Ce cerf et les ressources marines, telles que les mammifères marins et les saumons frayant de façon saisonnière, constituent l'essentiel du régime alimentaire des loups côtiers (Darimont et al., 2004, 2007, 2008). Cette variabilité de l'habitat existe sur des distances géographiques à l'échelle des aires de dispersion

connues des loups dans l'ouest de l'Amérique du Nord. Par conséquent, un individu peut potentiellement rencontrer à la fois des habitats côtiers et intérieurs au cours de sa dispersion naturelle.

Afin d'évaluer le degré de différenciation, et donc l'importance de la conservation, des loups de la côte et de l'intérieur de la Colombie-Britannique, nous avons obtenu des séquences de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial (ADNmt) pour des animaux provenant de toute la province et avons intégré nos résultats génétiques aux données sur le phénotype, le comportement et l'écologie. L'ADNmt est un marqueur approprié pour examiner la structure générale de la population de loups, car la dispersion n'est pas biaisée par le sexe (Mech & Boitani, 2003) et il a été démontré qu'elle est en corrélation avec la différenciation au niveau des marqueurs nucléaires dans d'autres populations de loups (Pilot et al., 2006 ; Musiani et al., 2007). Nous avons également utilisé ces données pour tester l'hypothèse selon laquelle l'écologie est le moteur de la différenciation génétique en évaluant la co-variation de la distance, de l'habitat et de la composition des proies avec la différenciation génétique. Pour mettre nos résultats en perspective, nous avons également comparé la diversité et la différenciation génétiques des loups de Colombie-Britannique avec ces mesures dans d'autres populations nord-américaines.

MATÉRIAUX ET MÉTHODES

Matériaux

Un total de 160 séquences de la région de contrôle de l'ADNmt de loups provenant de la Colombie-Britannique ont été analysées dans cette étude. Les échantillons comprenaient des fèces, du sang, du sérum sanguin, des poils, des muscles, de la peau et des dents. Les fèces ($n = 43$) ont été collectées entre 2000 et 2005 à travers la région côtière dans les zones que nous appelons Côte 1, Côte 2 et Côte 3 dans cette étude (Fig. 1). Des échantillons de haute qualité comprenant du sang ou du sérum sanguin, des muscles, de la peau et des poils ($n = 46$) ont été collectés par des taxidermistes sur des animaux chassés légalement et par des fonctionnaires provinciaux sur des animaux piégés pour des raisons autres que cette étude ; parmi ceux-ci, cinq provenaient de la côte. Des échantillons de racines de dents ($n = 71$) provenant de spécimens de musées collectés entre 1932 et 1989 ont été analysés afin d'améliorer la couverture géographique, en particulier dans les zones intérieures (voir l'annexe S1 dans les informations complémentaires).

Pour des analyses comparatives, des échantillons provenant de régions adjacentes ont été inclus dans cette étude. L'ADN des loups du centre de l'Alaska a été obtenu à partir d'échantillons de muscles provenant de la collection de tissus congelés de l'Université de l'Alaska ($n = 20$; Annexe S1) et de la collection de R. K. Wayne ($n = 11$). Les échantillons musculaires de l'Alberta ($n = 10$) ont été obtenus auprès de l'Alberta Environment Natural Resources Service, Canada. L'ADN des loups d'Inuvik (Territoires du Nord-Ouest) provient de la collection de R. K. Wayne ($n = 37$). Toutes les séquences de la collection de R. K. Wayne et de l'Alberta ont été précédemment rapportées comme données non publiées dans Leonard et al. (2005). Des séquences supplémentaires pour les loups de ces trois régions ont été obtenues dans la littérature (Vilà et al., 1999 ; Musiani et al., 2007).

Méthodes moléculaires...

Analyse des données...

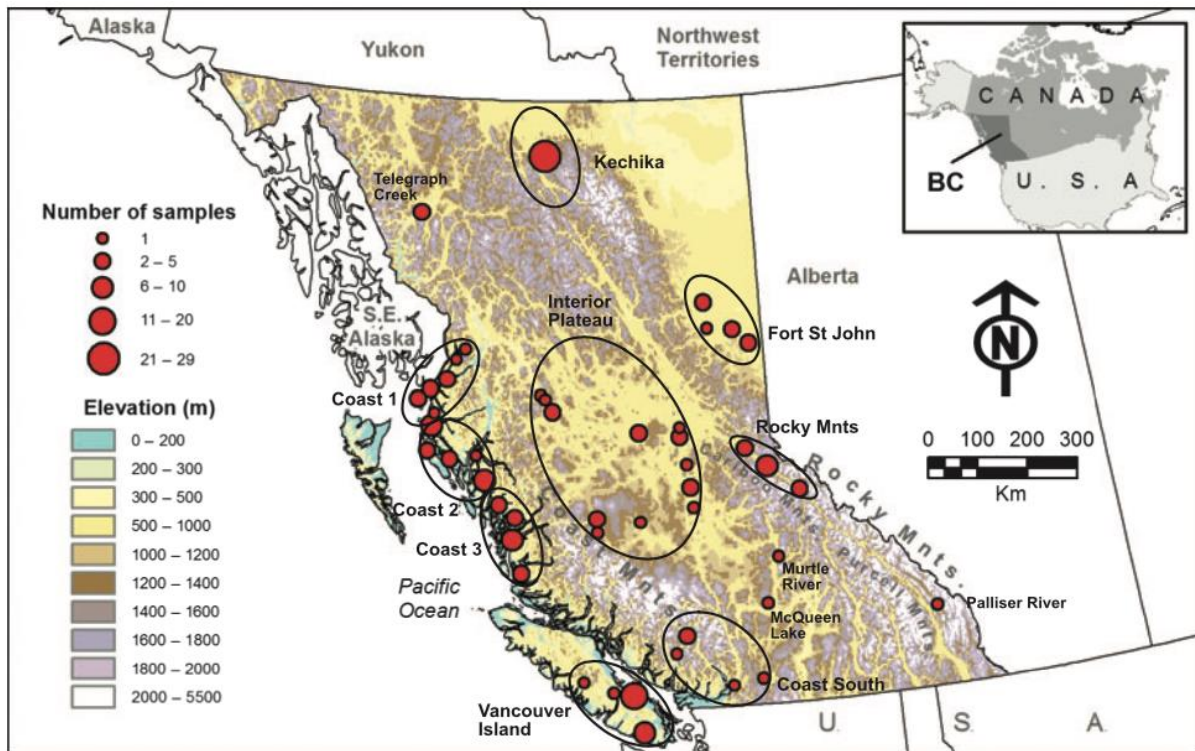


Figure 1 Carte de la Colombie-Britannique montrant l'altitude et la distribution des localités d'échantillonnage des loups, comme indiqué par les cercles rouges. Les ellipses indiquent le regroupement des localités d'échantillonnage en fonction de leur proximité géographique en zones d'échantillonnage pour les analyses. Les localités d'échantillonnage de Coast 1, Coast 2, Coast 3, Coast South et l'île de Vancouver se trouvent sur la côte de la Colombie-Britannique, à l'est de la chaîne Côtière, et les autres localités d'échantillonnage se trouvent à l'intérieur de la Colombie-Britannique

Tableau 1 Coordonnées géographiques et données écologiques pour chaque zone d'échantillonnage. La composition des ongulés a été saisie comme : commune = 2 ; rare = 1 ; ou absente = 0

Sampling area	Latitude	Longitude	BGC zone	Black-tailed deer	White-tailed deer	Elk	Moose	Caribou	Goat	Big-horn sheep	Dall's sheep
Vancouver	49.25	-124.33	CWH	2	0	2	0	0	0	0	0
Coast 1	54.92	-129.98	CWH	2	0	0	1	0	2	0	0
Coast 2	53.35	-128.87	CWH	2	0	0	1	0	2	0	0
Coast 3	52.13	-128.00	CWH	2	0	0	0	0	2	0	0
Coast South	50.00	-122.17	CWH	2	1	1	2	0	2	0	0
Kechika	59.00	-127.00	BWBS	2	2	2	2	2	2	0	2
Fort St John	56.04	-121.12	BWBS	2	2	2	2	2	2	0	2
Interior Plateau	53.33	-123.95	SBS	2	2	1	2	0	2	0	0
Rocky Mountains	53.01	-119.50	SBS	2	2	2	2	2	2	2	0

BGC zone, biogeoclimatic zone; CWH, coastal western hemlock; BWBS, black and white boreal spruce; SBS, sub-boreal spruce.

RÉSULTATS

Nous avons identifié huit **haplotypes** distincts chez 160 loups de Colombie-Britannique (Fig. 2) définis par 11 sites variables dans la région de 425 pb que nous avons séquencée. Ces sites variables comprenaient 10 transitions (C-T, A-G) et un indel. **Un haplotype chez les loups de la côte (lu68) et un autre chez les loups de l'intérieur (lu67) n'avaient pas été décrits précédemment.** Les six autres **haplotypes** ont été trouvés ailleurs en Amérique du Nord (Vilà et al., 1999 ; Leonard et al., 2005 ; Musiani et al., 2007 ; cet article) (Tableau 2). **L'haplotype** le plus commun était lu38 (50% des individus analysés).

En Colombie-Britannique, la distribution des haplotypes suggérait une différenciation entre les loups des régions côtières et ceux des régions intérieures. L'haplotype lu68 était absent chez les loups de l'intérieur, et les haplotypes lu28, lu29, lu31, lu36 et lu67 étaient absents chez les loups de la côte. Seuls deux haplotypes étaient partagés, lu38 étant plus fréquent sur la côte qu'à l'intérieur des terres (76% et 27% des individus, respectivement), et lu32 plus fréquent à l'intérieur des terres que sur la côte (36% et 5%, respectivement) (Tableau 2). Au total, plus d'haplotypes ont été identifiés chez les loups de l'intérieur des terres ($n = 7$) que chez les loups de la côte ($n = 3$), mais aucun haplotype endémique présent à plus de 2% n'a été identifié dans la population de l'intérieur des terres. Par conséquent, les loups côtiers présentaient une diversité d'haplotypes plus faible ($Hd \pm SD = 0,390 \pm 0,060$) que les loups de l'intérieur des terres ($Hd \pm SD = 0,749 \pm 0,025$) et, du fait que tous les haplotypes sont étroitement liés sur la côte, les loups côtiers présentaient également une diversité nucléotidique plus faible ($\pi \pm SD = 0,00096 \pm 0,00016$) que les loups de l'intérieur des terres ($\pi \pm SD = 0,00641 \pm 0,00057$). Ces données suggèrent que les loups de la côte sont plus isolés des autres populations de loups que les loups de l'intérieur des terres et que la taille effective de leur population est plus petite.

Tableau 2 Haplotypes identifiés chez les loups de la Colombie-Britannique et d'autres populations nord-américaines utilisées dans cette étude. BC, Colombie-Britannique ; TNO, Territoires du Nord-Ouest

Haplotype	Coast BC	Inland BC	Central Alaska	Alberta	Inuvik (NWT)
lu11					2*
lu28		15	6 + 3* + 3†	10‡ + 3*	1*
lu29		2	5	1‡	3*
lu30			3 + 1*	1‡	
lu31		11	4*	2‡	4*
lu32	4	31	1*	3‡ + 7*	22* + 3†
lu35				5‡	
lu36		2		3‡	
lu37			1 + 1*		
lu38	57	23	2 + 1*	9‡	4*
lu61			3		1*
lu67		1			
lu68	14				
<i>n</i>	75	85	34	44	40

DDBJ/EMBL/GenBank database accession numbers: FM201598–FM201777.

*Leonard *et al.* (2005).

†Vilà *et al.* (1999).

‡Musiani *et al.* (2007).

La relation entre les haplotypes a été reconstruite à l'aide d'un réseau de parcimonie sans racine (Fig. 2). Le réseau montre clairement une structure de population, avec plusieurs haplotypes présents uniquement chez les loups de la côte ou de l'intérieur. L'unique haplotype endémique aux loups côtiers, lu68, ne diffère que d'une paire de bases de l'haplotype le plus répandu et le plus commun, lu38 (Tableau 2). Pour représenter graphiquement la diversité des haplotypes sans imposer de regroupement, les haplotypes ont été indiqués directement sur une carte (Fig. 3). Les Figures 2 et 3 illustrent toutes deux visuellement la différence d'haplotypes et de fréquence des haplotypes entre les loups de la côte et les loups de l'intérieur avant de procéder aux tests statistiques, qui nécessitent un regroupement des échantillons.

La SAMOVA a identifié une structure basée sur cinq groupes ($K = 5$) comme étant la plus probable ($\Phi_{CT} = 0,321$; $P = 0,006$) (Tableau 3) : un groupe côtier, formé par les quatre zones d'échantillonnage côtières plus l'île de Vancouver (Fig. 1), et les quatre zones d'échantillonnage intérieures. Pour deux groupes ($K = 2$), la structure la plus probable identifiée par SAMOVA était

basée sur un groupe côtier comprenant toutes les zones d'échantillonnage à l'ouest de la chaîne Côtière, et un groupe intérieur comprenant toutes les autres zones d'échantillonnage ($\Phi_{CT} = 0,210$; $P = 0,006$). Entre $K = 2$ et $K = 5$, les zones d'échantillonnage côtières sont restées un groupe unifié, tandis que les zones d'échantillonnage intérieures, initialement regroupées, se sont séparées séquentiellement pour chaque augmentation de K . Les zones d'échantillonnage côtières se sont divisées lorsque K était supérieur au nombre de zones d'échantillonnage intérieures + 1 ($K = 6$ et $K = 7$), mais l' Φ_{CT} a ensuite diminué. Cela suggère que les zones d'échantillonnage côtières forment un groupe cohésif et qu'il existe une plus grande différenciation génétique entre les zones d'échantillonnage intérieures qu'entre les zones d'échantillonnage côtières. Comme la Côte Sud n'était représentée que par quelques échantillons ($n = 5$), nous avons refait la SAMOVA en retirant cette zone d'échantillonnage de l'analyse. Les résultats sont restés inchangés.

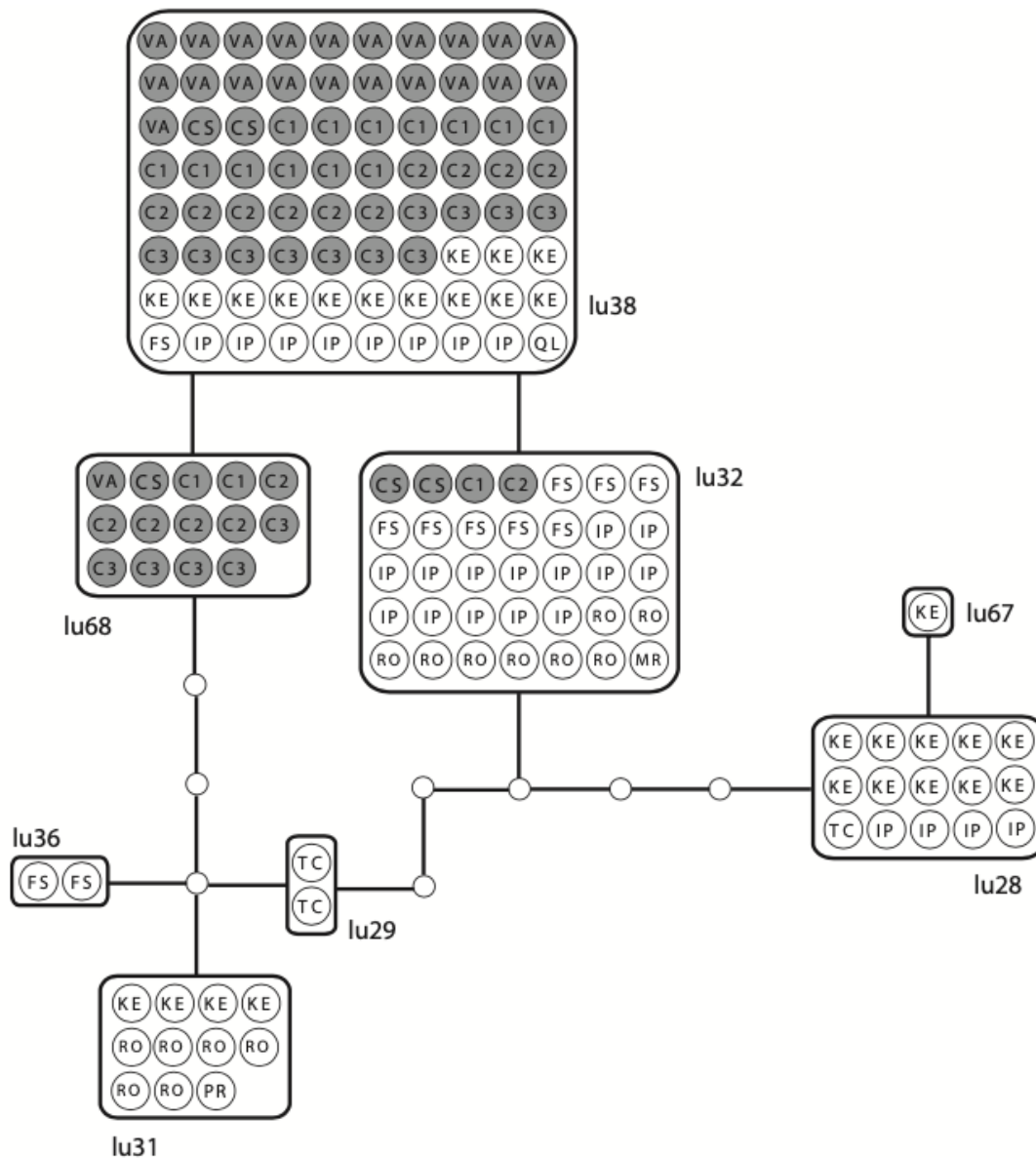


Figure 2 Réseau d'haplotypes d'ADN mitochondrial identifiés chez les loups de la Colombie-Britannique. Le gris indique un haplotype trouvé chez un loup de la côte et le blanc indique un haplotype trouvé chez un loup de l'intérieur. Chaque cercle représente un individu, chaque carré un haplotype, et les lettres majuscules désignent la zone dans laquelle l'échantillon a été prélevé. VA, île de Vancouver; CS, Coast South; C1, Coast 1; C2, Coast 2; C3, Coast 3; KE, Kechika; FS, Fort St John; IP, Interior Plateau; RO, Rocky Mountains; TC, Telegraph Creek; QL, McQueen Lake; PR, Palliser River; MR, Murtle River. Les petits cercles vides représentent des haplotypes hypothétiques ou manquants, et chaque barre un changement d'une paire de bases

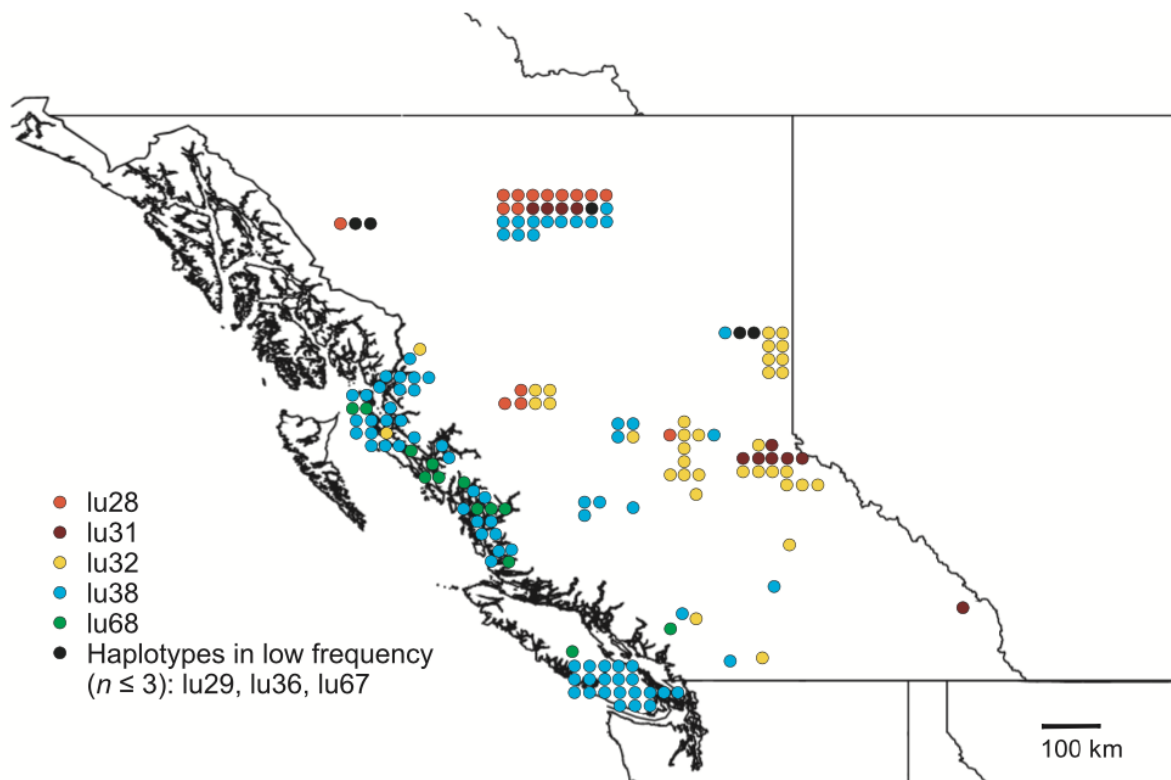


Figure 3 Code couleur des **haplotypes** des loups de la Colombie-Britannique et leur distribution dans la province

L'analyse de l' Φ_{ST} par paires entre les zones d'échantillonnage (Tableau 4) indique que les zones côtières ne sont pas significativement différenciées les unes des autres (à l'exception de l'île de Vancouver et de Coastal South ; $P \leq 0,05$), alors que la différenciation génétique entre les zones intérieures va de non significative à hautement significative. Comme dans l'analyse SAMOVA, ce résultat indique que les zones intérieures sont, en général, plus différenciées les unes des autres que les localités côtières. Les zones d'échantillonnage côtières et intérieures étaient significativement différenciées les unes des autres ($\Phi_{ST} \geq 0,248$, $P \leq 0,01$ ou $P \leq 0,001$), sauf pour les comparaisons impliquant la Côte Sud. La différenciation génétique de Coastal South par rapport à toute autre zone d'échantillonnage n'était pas significative, à l'exception de l'île de Vancouver, probablement en raison d'un manque de puissance statistique dû à la petite taille de son échantillon ($n = 5$).

La distance géographique n'a pas pu expliquer la plus grande différence entre les zones d'échantillonnage de la côte et de l'intérieur des terres (Figure 4 ; le plotting de l' Φ_{ST} ou du rapport $\Phi_{ST} / (1 - \Phi_{ST})$ sur l'axe des y a donné des résultats très similaires). Des zones d'échantillonnage aussi éloignées que l'île de Vancouver et la côte 1, séparées par 770 km, ou l'île de Vancouver et la côte 2, séparées par 580 km, n'étaient pas significativement différentes, alors que la côte 1 et le plateau intérieur, séparés par 430 km, ou la côte 2 et le plateau intérieur, séparés par 330 km, étaient significativement différents.

Les analyses avec DISTLM ont testé si la distance génétique entre les zones d'échantillonnage était corrélée soit avec la distance géographique entre elles, soit avec les différences d'habitat ou de composition des proies. Une corrélation positive significative a été trouvée entre la distance génétique et la localisation géographique (66% de la variation expliquée, $P = 0,039$), mais lorsque la latitude et la longitude ont été analysées séparément, la longitude expliquait davantage la différenciation génétique dans les données et était marginalement significative (41% de la variation

expliquée, $P = 0,047$), et la latitude n'avait aucune valeur explicative ($P = 0,512$). La couverture végétale, indexée par la zone biogéoclimatique, explique 56% des données et est significative ($P = 0,016$). L'habitat, saisi comme côte ou intérieur, expliquait 65% des données ($P = 0,014$). La plus grande différence écologique en Colombie-Britannique est entre les zones côtières et intérieures. Cela suggère que l'association entre la distance génétique et géographique est le résultat de l'association entre l'habitat et la longitude, ainsi que de celle entre l'habitat et la différenciation génétique. Il y avait une association significative entre la présence de cerfs de Virginie et d'originaux et la distance génétique, avec 80% ($P = 0,017$) et 79% ($P = 0,001$) des données expliquées, respectivement. La présence des autres ongulés n'était pas significativement corrélée à la distance génétique (tous les $P > 0,05$). Le cerf à queue noire n'a pas été testé car il était présent dans toutes les zones d'échantillonnage. Comme précédemment, parce que la Côte Sud était représentée par un petit échantillon ($n = 5$), nous avons refait le DISTLM après avoir retiré cette zone d'échantillonnage de l'analyse, et les conclusions sont restées les mêmes. **Ces résultats suggèrent fortement que l'habitat est le principal facteur déterminant la structure de la population en Colombie-Britannique.**

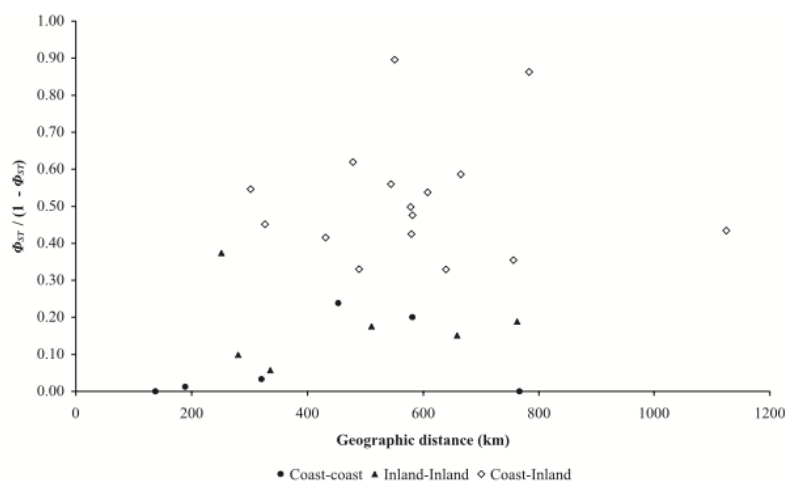


Figure 4 Φ_{ST} par paires entre les groupes ($n > 5$) et distance géographique les séparant

Afin de placer nos résultats dans un contexte géographique plus large, la différenciation entre les loups de Colombie-Britannique et les autres populations adjacentes d'Amérique du Nord (Alaska, Alberta et Territoires du Nord-Ouest) a été étudiée. L' Φ_{ST} par paires a montré une différenciation significative dans tous les cas (Tableau 5). Les loups de la côte étaient plus différenciés que les loups de l'intérieur des terres provenant de populations extérieures à la Colombie-Britannique. Les loups de l'intérieur des terres partageaient une grande proportion d'haplotypes, avec quelques différences de fréquence, avec les loups de l'Alaska, de l'Alberta et des Territoires du Nord-Ouest, alors que les loups côtiers étaient particulièrement distincts de tous les autres en termes de fréquence et de composition des haplotypes (Tableau 2). **Les loups côtiers sont la seule population à avoir un haplotype endémique avec une fréquence supérieure à 5%** (lu68, 19%). L'haplotype le plus fréquent chez les loups côtiers, lu38 (77%), est répandu dans toute l'Amérique du Nord, mais présent à des fréquences beaucoup plus faibles dans les autres populations (c'est-à-dire 9% dans le centre de l'Alaska, 10% à Inuvik, 20% en Alberta et 27% dans l'intérieur de la Colombie-Britannique).

Nous avons également calculé l' Φ_{ST} par paire entre les loups côtiers et les deux sous-espèces de loups nord-américaines actuellement reconnues et géographiquement adjacentes, *C. l. occidentalis* et *C. l. nubilis* (comme dans Nowak, 1995). La sous-espèce *C. l. occidentalis* est représentée par des loups d'Alaska, d'Alberta et des Territoires du Nord-Ouest (Tableau 2) et *C. l. nubilis* par des données historiques (Leonard et al., 2005). Toutes les comparaisons étaient significatives ($P < 0,00001$), les loups de la côte de la Colombie-Britannique étant plus différenciés de *C. l. occidentalis* ($\Phi_{ST} = 0,305$) et de *C. l. nubilis* ($\Phi_{ST} = 0,550$) que *C. l. occidentalis* et *C. l. nubilis* ne l'étaient l'un de l'autre ($\Phi_{ST} = 0,125$). **La différenciation génétique des loups côtiers par rapport aux autres loups d'Amérique du Nord démontre que cette population est largement isolée.** Cette particularité génétique, en plus de leur morphologie et de leur écologie uniques (Tableau 6), appuie fortement leur **statut d'UES** sensu Crandall et al. (2000).

Tableau 6 Preuves qui soutiennent la non-échangeabilité écologique entre les loups de la forêt pluviale côtière et les autres populations de loups, essentielles pour remplir deux des critères suffisants pour leur désignation en tant qu'UES sensu Crandall et al. (2000) (voir texte)

Criterion	Example	Reference
Morphology	Pelage: shorter and coarser hair than interior conspecifics. Grey morph with conspicuous red tones and brown under-fur common. Brownish red tinge, a feature responsible for the one coastal region's historic sub-specific epithet <i>fuscus</i> . Smaller body sizes.	Young & Goldman (1944); Cowan & Guiguet (1975); Wood (1990)
	Cranial morphology; multivariate analyses identified distinct coastal forms.	Cowan & Guiguet (1975); Friis (1985); Wood (1990) Friis (1985)
Prey specialization	Unique prey-based ecotype: wolf-black-tailed deer system, North America's smallest ungulate. Other regions include black-tailed deer but also other ungulates.	Darimont <i>et al.</i> (2004); Theberge (1991)
	Evidence for insular predator-prey (wolf-deer) dynamics on islands. Deer consumed at frequencies inversely proportional to island isolation.	Darimont <i>et al.</i> (2004, 2009)
	Populations heavily subsidized by marine resources, especially in absence of deer; isotopic data suggest 25-75% of diet is of marine origin (especially spawning salmon and marine mammals). Salmon hunting behaviour; high efficiencies and shared fishing techniques and tissue targets across coastal region.	Darimont & Reimchen (2002); Darimont <i>et al.</i> (2003, 2004, 2008, 2009) Darimont <i>et al.</i> (2003)
Other specific behaviour	Archipelago environment with islands often smaller than home ranges necessitates frequent swimming between landmasses.	Darimont & Paquet (2002); Paquet <i>et al.</i> (2006)

DISCUSSION

Écologie et structure génétique des loups de Colombie Britannique

Des distances de dispersion de 100 km sont fréquentes chez les loups (Linnell et al., 2005), et des distances de dispersion de plus de 1000 km ont été observées (Vilà et al., 2003). Bien que la distance requise pour se disperser de l'habitat côtier à l'habitat intérieur soit bien dans la gamme des distances de dispersion des loups d'Amérique du Nord, nos données suggèrent que le flux génétique est largement limité à l'intérieur des habitats côtiers et intérieurs (Figs 2 & 3, Tables 3-5). Ceci suggère que des facteurs autres que la distance sont responsables de la structure observée.

Les barrières géographiques ne constituent pas non plus une explication raisonnable de la subdivision des populations de loups de la Colombie-Britannique. La chaîne de montagnes côtières, qui sépare les régions côtières de l'intérieur de la Colombie-Britannique, n'a qu'une largeur moyenne

de 200 km, et plusieurs grands cours d'eau qui la traversent, comme la Stikine, la Taku, la Kitimat et la Skeena, pourraient être utilisés par les loups comme corridors. Les montagnes Rocheuses de l'intérieur de la Colombie-Britannique, d'où proviennent certains des échantillons, ont été reconnues comme un couloir de dispersion pour les loups (Boyd et al., 1995 ; Forbes & Boyd, 1996 ; Carroll et al., 2004) et sont similaires en altitude moyenne et en largeur à la chaîne côtière. Pour ces raisons, il est peu probable que la chaîne de montagnes côtières explique la forte structure phylogéographique que nous identifions chez les loups de la Colombie-Britannique. Des facteurs autres que la géographie, tels que le comportement, la dynamique loup-proie ou la sélection naturelle, doivent donc être à l'origine de la différenciation génétique des loups de Colombie-Britannique.

La couverture végétale expliquait 56% des données et était hautement significative ($P = 0,016$), elle est donc un facteur important pour expliquer le schéma de différenciation génétique observé. Nous avons également trouvé une corrélation significative entre la différenciation génétique et les proies, à savoir le cerf de Virginie et l'orignal. Ces deux espèces étaient absentes de nos zones d'échantillonnage côtières (sauf l'orignal présent dans la Côte Sud) et présentes dans toutes nos zones d'échantillonnage intérieures. Aucune des proies testées n'était distribuée uniquement sur la côte. Cependant, les loups côtiers, en particulier ceux des îles, peuvent obtenir 50 à 75% de leurs protéines de sources marines, notamment du saumon et des mammifères marins (Darimont et al., 2008). Le saumon est consommé dans une moindre mesure et dans moins de zones dans les régions intérieures, probablement en raison d'une disponibilité réduite (Darimont & Reimchen, 2002). L'habitat, défini comme étant la côte ou l'intérieur, explique 65% des données ($P = 0,014$). **Par conséquent, l'habitat semble être le facteur le plus probable de la différenciation observée.**

Des analyses récentes d'autres populations de loups gris avec un échantillonnage détaillé ont identifié une **structure** de population au sein de continents liés au climat et à la végétation sur un axe ouest-est en Amérique du Nord (Geffen et al., 2004), à la spécialisation de la chasse sur le caribou migrateur par rapport aux proies non migratrices dans l'Arctique nord-américain (Carmichael et al., 2001, 2007 ; Musiani et al., 2007), et au climat, au type d'habitat et à la composition du régime alimentaire en Europe de l'Est (Pilot et al., 2006). Chez les coyotes, l'expérience natale est importante pour déterminer où les individus dispersés s'installent, mais la qualité globale de l'habitat et la cohésion sociale (individus voisins) peuvent également être des facteurs importants (Sacks et al., 2004, 2005, 2008). De même, les loups dispersés en Colombie Britannique peuvent sélectionner un territoire en fonction de la présence d'une espèce de proie particulière ou, alternativement, d'autres facteurs qui co-varient avec la distribution des proies. Indépendamment de la disponibilité de proies particulières, la structure de l'habitat peut être importante car elle peut affecter le choix du site de la tanière ou la capacité à utiliser des **comportements appris**. La dispersion en fonction de l'habitat peut favoriser la divergence entre les loups de la côte et ceux de l'intérieur.

Une réduction de la valeur adaptative des individus en cours de dispersion lorsqu'ils atteignent des habitats non natals écologiquement divergents peut favoriser l'isolement génétique (« sélection contre les immigrants » ; Nosil et al., 2005). **Un individu qui se disperse et qui a appris à s'adapter à un habitat particulier aurait un avantage sur les disperseurs qui n'ont pas cette expérience.** Parmi les adaptations comportementales importantes, on peut citer les techniques de chasse et l'évitement des maladies. Un individu solitaire peut chasser le cerf, mais la capture et le démembrement d'un élan nécessitent généralement la coordination de plusieurs individus. Par exemple, un loup né à

l'intérieur des terres et qui se disperse dans les régions côtières peut se nourrir de saumon, mais il est plus susceptible de souffrir de symptômes aigus d'empoisonnement par le saumon (*Neorickettsia helminthoeca*), car la consommation de tissus de saumon à forte charge parasitaire peut être fatale aux canidés, y compris aux loups (Philip, 1955 ; Knapp & Millemann, 1970). Les loups côtiers consomment principalement la tête des saumons capturés (Darimont et al., 2003), renonçant au corps, qui a une valeur nutritionnelle, pour éviter les *Neorickettsia* concentrées dans les viscères (Bennington & Pratt, 1960 ; Baldwin et al., 1967). Les mammifères marins sont également un réservoir connu de maladies virales pour les mammifères terrestres (Prato et al., 1974), ce qui pourrait constituer un nouveau défi pour les loups migrant de l'intérieur vers la côte.

Origine évolutive des loups de la Colombie-Britannique

Sur une plus grande échelle géographique, toutes les comparaisons de la différenciation génétique entre les loups de la côte de la Colombie-Britannique, les loups de l'intérieur de la Colombie-Britannique et les loups des régions adjacentes (Alaska, Alberta et Territoires du Nord-Ouest) étaient significatives. La différenciation entre les loups de la côte et de l'intérieur des terres était similaire ou supérieure à la divergence entre les loups de l'intérieur des terres et d'autres populations de loups plus éloignées en Amérique du Nord (Tableau 5), ce qui met en évidence la spécificité génétique des loups de la côte. Les différences entre les loups de l'Alaska, de l'Alberta, des Territoires du Nord-Ouest et de l'intérieur de la Colombie-Britannique résultaient principalement des différences de fréquence de certains haplotypes largement distribués qui étaient partagés par toutes les populations. En revanche, les loups de la côte ont été différenciés par une combinaison de fréquences très divergentes dans les haplotypes partagés et un haplotype endémique (lu68) présent chez 19% des individus de la côte (Tableau 2). L'haplotype endémique côtier (lu68) diffère d'un haplotype commun et répandu (lu38) par une seule mutation. Cette relation étroite et son caractère unique suggèrent que cet haplotype a évolué dans la population de loups côtiers après que cette population ait été isolée des autres.

Au cours du **dernier maximum glaciaire**, le nord-ouest du Pacifique Canadien était presque entièrement recouvert par l'inlandsis de la Cordillère (Clark et al., 1993). Certains taxons animaux et végétaux ont survécu dans des **refuges** situés au nord (aujourd'hui en Alaska) et au sud de l'inlandsis, ainsi qu'à l'ouest, dans des îles et péninsules situées au large (archipel Alexandre, îles de la Reine-Charlotte ou Haida Gwaii) (p. ex. Heaton et al., 1996 ; Cook et al., 2006). Lorsque la glace s'est retirée, de nombreux organismes ont recolonisé la côte et l'intérieur de la Colombie-Britannique/Alaska à partir de différents **refuges**, ce qui a laissé une empreinte dans les modèles actuels de diversité génétique (p. ex. le campagnol à longue queue *Microtus longicaudus*, Conroy et Cook, 2000 ; l'hermine *Mustela erminea*, Fleming et Cook, 2002 ; la martre *Martes sp.*, Small et al., 2003 ; souris *Peromyscus sp.*, Zheng et al., 2003 ; lichen *Lobaria pulmonaria*, Walser et al., 2005 ; élan *Alces alces*, Hundertmark et al., 2006 ; pin tordu *Pinus contorta*, Godbout et al., 2008 ; oseille *Oxyria digyna*, Marr et al., 2008). Jusqu'à présent, aucun refugium approprié pour les loups n'a été trouvé dans l'ouest, et il a été démontré précédemment que la population de loups de l'Alaska de l'ère glaciaire s'est éteinte à la fin du Pléistocène et n'était pas ancestrale à une quelconque population vivante (Leonard et al., 2007). De plus, chez les loups de la Colombie-Britannique, nous avons observé des haplotypes à haute fréquence qui ont une distribution continentale et des haplotypes endémiques étroitement liés. Par conséquent, ces résultats soutiennent une origine provenant d'un seul refugium.

La distribution d'haplotypes communs à toutes les populations du nord de l'Amérique du Nord est cohérente avec l'hypothèse selon laquelle les loups ont recolonisé le Canada et l'Alaska, y compris le nord-ouest du Pacifique, à partir du sud des nappes glaciaires après le retrait du glacier de la Cordillère, probablement à la suite de l'expansion vers le nord des cerfs il y a moins de 10 000 ans (Klein, 1965 ; Cook et al., 2006 ; Leonard et al., 2007). Cela suggère que la forte différenciation entre les loups côtiers et les autres populations de loups nord-américaines a évolué au cours de l'Holocène.

La colonisation post-Pléistocène de zones précédemment glaciaires a laissé une signature de différenciation des populations chez plusieurs espèces (Hewitt, 2000 ; et références ci-dessus). Cependant, étant donné la biologie et l'écologie du loup gris, l'histoire seule ne peut pas expliquer la structure de la population observée à cette échelle car (1) il y a peu ou pas de dispersion sexuée chez les loups en Amérique du Nord (Merrill & Mech, 2000 ; Linnell et al., 2005), (2) la distance entre les habitats est faible par rapport à la capacité de dispersion des loups (Fritts, 1983 ; Merrill & Mech, 2000 ; Linnell et al., 2005), et (3) les loups sont facilement capables de traverser tous les terrains entre les deux habitats (Forbes & Boyd, 1996). Par conséquent, il est nécessaire d'envisager des explications alternatives pour la cause du schéma observé.

En utilisant des données nucléaires microsattellites, Weckworth et al. (2005) ont identifié une discontinuité similaire entre les loups de la côte sud-est et ceux de l'intérieur de l'Alaska. Cela pourrait suggérer que la population distincte que nous identifions dans la région côtière de la Colombie-Britannique s'étend au nord à travers la côte sud-est et les îles de l'Alaska.

Distinction évolutive des loups côtiers

Récemment, des efforts ont été faits pour standardiser l'application des unités en dessous du niveau de l'espèce. Les désignations d'unité de gestion (MU) et d'unité significative sur le plan de l'évolution (UES) ont été proposées avec une série de critères testables (Moritz, 1994 ; Crandall et al., 2000). Les critères de Moritz (1994) dépendent entièrement de la différenciation génétique, définie comme une monophilie réciproque aux marqueurs mitochondriaux et une divergence significative aux loci nucléaires. Cette définition donne la priorité au patrimoine évolutif sur la divergence adaptative. Selon les définitions de Moritz, les loups côtiers constituent une unité de gestion (MU), car ils ont des fréquences d'allèles d'ADNmt significativement différentes, mais ne sont pas réciproquement monophylétiques, et la divergence nucléaire n'a pas été testée.

Crandall et al. (2000) donnent du poids à la fois à l'isolement historique et à la distinctivité adaptative. Ils ont développé une classification dans laquelle quatre hypothèses nulles d'échangeabilité doivent être testées. Les quatre hypothèses concernent l'échangeabilité génétique et écologique récente et historique. Les modèles de rejet de ces hypothèses conduisent à différentes actions de gestion. Dans le cas des loups côtiers, deux des trois critères suggérés par Crandall et al. (2000) ont été utilisés pour rejeter les hypothèses d'échangeabilité génétique actuelle et historique : l'observation d'un allèle unique (lu68) et de faibles estimations du flux génétique ($Nm < 1$, approximativement lorsque $F_{ST} = 0,2$). Crandall et al. (2000) ont recommandé de tester les hypothèses concernant l'échangeabilité écologique en superposant les données écologiques à la généalogie sous-jacente de la population. Nous l'avons fait en employant une méthode d'analyse de variance multivariée non paramétrique (Anderson, 2001), qui a été développée depuis que Crandall et al. (2000) ont publié leurs recommandations mais qui s'applique très bien à ces données. Ces tests ont montré une corrélation significative entre la diversité génétique et les facteurs écologiques.

En outre, le rejet des hypothèses **d'échangeabilité** écologique est encore renforcé par certains aspects de la biologie et de l'écologie des loups côtiers, notamment un régime alimentaire unique fortement influencé par les ressources marines, des comportements distincts tels que la nage en pleine mer entre les masses continentales, ainsi que leur couleur plus foncée, leur taille plus petite et leur morphologie crânienne et dentaire (Tableau 6). Par conséquent, les hypothèses nulles **d'échangeabilité** génétique et écologique récente et historique peuvent être rejetées pour les loups côtiers, et ils devraient donc être classés comme une **UES** sensu Crandall et al. (2000).

Une autre unité définissable et sous-spécifique est **l'unité désignable** (UD) (Green, 2005). Cette unité évite de porter un jugement sur l'importance de l'évolution, et est conçue pour être l'unité de base au sein des espèces. La spécificité génétique et biogéographique des loups de la côte de la Colombie-Britannique les qualifie indépendamment les uns des autres d'unité désignable. Cette terminologie est particulièrement pertinente dans le contexte des loups de la Colombie-Britannique, car elle a été acceptée par le Comité sur la situation des espèces en péril au Canada (Green, 2005). Des sous-espèces de loups gris ont été décrites sur la base de caractéristiques morphologiques (Young & Goldman, 1944 ; Hall, 1981 ; Nowak, 1995). Sur les 24 sous-espèces reconnues en Amérique du Nord par Hall (1981), trois sous-espèces côtières ont été identifiées : *Canis lupus ligoni* dans le sud-est de l'Alaska, *C. l. fuscus* dans les régions côtières de la Colombie-Britannique, de l'État de Washington et de l'Oregon (aujourd'hui uniquement présent en Colombie-Britannique), et *C. l. crassodon* sur l'île de Vancouver. **La plus récente révision de la taxonomie du loup en Amérique du Nord a réduit les 24 sous-espèces nord-américaines précédemment reconnues à cinq et a regroupé tous les loups côtiers dans la sous-espèce *C. l. nubilus*, qui comprend les loups de la plupart des États-Unis continentaux et de l'est du Canada, y compris la région de la baie d'Hudson** (Nowak, 1995). Notamment, les loups de la côte de la Colombie-Britannique n'ont pas été inclus dans les analyses morphologiques d'accompagnement (Nowak, 1995). Dans notre étude, nous avons constaté que le niveau de différenciation génétique entre les loups de la côte de la Colombie-Britannique et les sous-espèces d'Amérique du Nord (sensu Nowak, 1995) était plus important que celui entre les sous-espèces. Un futur travail taxonomique impliquant une analyse morphologique détaillée des loups de la côte en comparaison avec les loups d'autres régions d'Amérique du Nord, réconciliée avec les données génétiques, serait instructif sur la question des sous-espèces. Bien qu'aucun spécimen type n'ait été désigné, la sous-espèce *fuscus* a été la première utilisée pour les loups côtiers (Richardson, 1839) et a donc **préséance** sur les deux autres désignations de sous-espèces.

Implications pour la conservation

Les loups côtiers constituent une population isolée, adaptée de manière unique aux forêts pluviales tempérées de la côte nord-ouest de l'Amérique du Nord. Ces forêts s'étendaient autrefois de la Californie au sud de l'Alaska (Schoonmaker et al., 1997), mais plus de la moitié d'entre elles ont été gravement altérées par des coupes claires et d'autres activités humaines, notamment en Californie, en Oregon et dans l'État de Washington, où les loups ont disparu (Jeo et al., 1999). **Les loups des forêts pluviales côtières sont maintenant limités à la Colombie-Britannique et au sud-est de l'Alaska.** Parmi les loups côtiers restants, ceux de la Colombie-Britannique occupent certains des habitats de loups les plus vierges de la planète et ont bénéficié d'une relative absence de persécution de la part des humains. Cependant, l'avenir de cette population restante n'est pas clair. Les loups de la côte sud-est de l'Alaska sont menacés par l'exploitation extensive du bois, qui devrait entraîner un déclin des populations de cerfs et, par conséquent, de loups (Person et al., 1996). La surexploitation directe pourrait également devenir un problème car leur habitat devient plus accessible aux chasseurs par

les routes forestières (Kirchhoff, 1991 ; USDA Forest Service, 1991 ; Person & Ingle, 1995 ; Person et al., 1996). Une autre menace anthropique pour ces loups se présente sous la forme des chiens domestiques, par leur capacité à propager les maladies des canidés et à s'hybrider potentiellement avec les loups (Vilà et al., 2003). La protection de la forêt pluviale tempérée du Pacifique et l'atténuation de ces menaces sont toutes deux nécessaires à la conservation à long terme des loups côtiers.

Les résultats présentés ici illustrent comment les différences d'habitat entraînent et maintiennent la différenciation génétique chez le loup gris. L'observation de ce schéma chez un écosystème généraliste doté de grandes capacités de dispersion suggère que des facteurs écologiques peuvent également entraîner une différenciation génétique chez d'autres espèces. Même en l'absence d'adaptations phénotypiques évidentes, les populations d'une espèce vivant dans des habitats différents peuvent représenter des sous-ensembles distincts de la diversité génétique totale. Les programmes de conservation devraient donc viser à englober autant de diversité écologique que possible afin de préserver la diversité génétique et le potentiel évolutif de l'ensemble des espèces.