

Effet du dernier âge glaciaire sur la spéciation et la structure génétique de la population du loup d'Éthiopie (*Canis simensis*), espèce menacée d'extinction

Molecular Ecology (2004) 13, 2275–2286

doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02226.x

The effect of the last glacial age on speciation and population genetic structure of the endangered Ethiopian wolf (*Canis simensis*)

DADA GOTTELLI,* JORGELINA MARINO,+ CLAUDIO SILLERO-ZUBIRI+ and STEPHAN M. FUNK*
*Institute of Zoology, Zoological Society of London, Nuffield Building, Regent's Park, London NW1 4RY, UK, +Wildlife Conservation Research Unit, Zoology Department, Oxford University, Oxford, UK

Résumé

Au cours de la dernière période glaciaire, les habitats afro-alpins étaient répandus sur les hauts plateaux d'Éthiopie. On pense qu'un ancêtre canidé de type loup a colonisé cet habitat en expansion et a donné naissance à une nouvelle espèce remarquablement adaptée à l'environnement de haute altitude : le loup éthiopien *Canis simensis*. Ici, nous abordons la question du moment de la divergence génétique et examinons l'histoire et la structure génétique de la population en étudiant la distribution de la variation de la séquence de l'ADN mitochondrial (ADNmt). Le modèle de variation de l'ADNmt et la distribution géographique indiquent une expansion initiale de la population, probablement immédiatement après la divergence avec l'ancêtre semblable au loup, il y a environ 100 000 ans. La partition des haplotypes d'ADNmt qui a suivi est très probablement le résultat de la réduction et de la fragmentation de l'habitat au début de la déglaciation, il y a environ 15 000 ans. Les associations phylogénétiques et géographiques suggèrent que le partitionnement génétique le plus probable correspond à trois zones montagneuses, Arsi/Bale, Wollo/Shoa et Simien/Mt. Guna. Bien qu'il y ait un certain degré de regroupement des haplotypes des deux côtés de la vallée du Rift, l'absence de monophilie réciproque ne soutient pas la classification taxonomique de deux sous-espèces. Cette étude souligne l'importance des populations au nord de la vallée du Rift pour le maintien de la variabilité génétique au sein de l'espèce et a des implications conséquentes pour la conservation.

INTRODUCTION

Les périodes glaciaires majeures ont dominé les 700 000 dernières années de l'histoire de la Terre, avec des cycles de 100 000 ans interrompus par des interglaciaires relativement chauds. Notre connaissance des changements climatiques est meilleure pour le dernier cycle glaciaire qui s'étend sur ~ 135 000 ans, en particulier la progression depuis les conditions de pleine glace 20 000 ans avant notre ère jusqu'à la période chaude actuelle (Hewitt 1996). On pense que les oscillations climatiques sévères de la fin du Pléistocène ont façonné la répartition de nombreuses espèces (Hewitt 2000) et les cycles climatiques ont été identifiés comme un mécanisme important de spéciation (Roy 1997). On pense qu'au cours de la dernière glaciation (70 000 à 10 000 ans avant notre ère), les blocs montagneux tropicaux ont soutenu des environnements avec une continuité à travers les changements climatiques, ce qui a permis aux espèces nouvellement formées de persister (Fjeldsa & Lovett 1997). **En effet, ces zones montagneuses, y compris les hautes terres d'Afrique**

de l'Est, sont dominées par des espèces récemment radiées ou nouvelles (DeMenocal 1995 ; Roy 1997).

Au cours de la dernière glaciation, lorsque les tropiques africains étaient plus froids et plus secs (Bonnefille et al. 1990), les landes et les zones afro-alpines d'Afrique de l'Est se trouvaient ~ 1000 m plus bas qu'aujourd'hui (Flenley 1979). Dans ces habitats montagnards nouvellement étendus, de nombreuses espèces de vertébrés adaptées aux hautes terres ont étendu leur aire de répartition (Hewitt 2000). L'Éthiopie, en particulier, est remarquable pour l'étendue de ses hautes terres, englobant près de 80% de toutes les terres de plus de 3 000 m dans la région afrotropicale (Yalden 1983). Jusqu'à il y a 10 000 ans, les hautes terres d'Éthiopie étaient largement couvertes de landes et de prairies afro-alpines (Messerli et al. 1977) ; les espèces adaptées à l'altitude s'épanouissaient dans ce vaste massif montagneux avec des niveaux d'endémisme élevés (Kingdon 1990).

Ces habitats étaient généralement dépourvus des troupeaux de grands ongulés caractéristiques des plaines africaines, mais des mammifères plus petits étaient présents en grande abondance, en particulier les rats taupiers (Rhizomyinae) et les rats herbivores (Murinae), dont la plupart sont des endémiques Ethiopiens. Il a été suggéré que dans ce scénario, un canidé de type loup a colonisé l'écosystème afro-alpin (Gottelli et al. 1994) via des ponts terrestres reliant les habitats alpins dans un continuum allant de l'Europe de l'Est au nord-est de l'Afrique en passant par le Moyen-Orient (Kingdon 1990).

Le loup éthiopien, *Canis simensis*, est un canidé de taille moyenne qui a évolué dans l'isolement géographique du massif Ethiopien, et est actuellement limité à **sept** populations isolées dans cet écosystème de haute altitude (Gottelli & Sillero-Zubiri 1992). Une étude phylogénétique moléculaire a fourni un support pour une hypothèse d'immigration récente vers l'Afrique pour les loups Ethiopiens, suggérant une spéciation récente à partir d'un ancêtre étroitement lié aux coyotes (*C. latrans*) et aux loups gris (*C. lupus*) (Gottelli et al. 1994).

Contrairement à d'autres canidés de taille moyenne à grande, qui sont typiquement des prédateurs généralistes avec de larges distributions (Moehlman 1989), **les loups Ethiopiens ont développé une spécialisation alimentaire extrême sur les rongeurs de haute altitude, avec une gamme écologique étroite et une grande spécificité d'habitat** (Sillero-Zubiri & Gottelli 1995a). La morphologie de leur crâne indique des adaptations pour attraper des rongeurs, comme un crâne très allongé avec de longues mâchoires dans lesquelles les dents (surtout les prémolaires) sont très espacées (Dalton et al. non publié). **Une relation étroite entre la densité des loups et la biomasse des rongeurs soutient l'hypothèse que la distribution actuelle des loups Ethiopiens est limitée par la distribution et la disponibilité des rongeurs afro-alpins** (Sillero-Zubiri & Gottelli 1995b).

Le loup Ethiopien a probablement répondu aux changements climatiques de la fin du Pléistocène en suivant un ensemble particulier d'exigences environnementales. Avec le début de **l'interglaciaire** actuel, une augmentation de la température a entraîné une réduction dramatique des habitats appropriés et la population ancestrale de loups a pu se contracter et se fragmenter en populations habitant actuellement des refuges de montagne dispersés et isolés. En effet, la variabilité génétique relativement faible du loup Ethiopien -46% d'hétérozygotie et 38% de diversité allélique d'une population moyenne de canidés ressemblant à des loups - est cohérente avec une taille de population effective équilibre de seulement quelques centaines d'individus

(Wayne & Gottelli 1997), ce qui suggère que de petites tailles de population ont pu caractériser l'évolution récente du loup Ethiopien (Gottelli et al. 1994).

La vallée du Grand Rift qui divise le massif Ethiopien entre les hauts plateaux du nord-ouest et du sud-est constitue une barrière zoogéographique majeure (Yalden & Largen 1992 ; Freitag & Robinson 1993 ; Arctander et al. 1999) et peut avoir créé des opportunités supplémentaires pour la diversification évolutive de *C. simensis*. L'existence de deux sous-espèces putatives a été suggérée sur la base de la morphologie du crâne de loup et de la coloration du pelage, à savoir *C. s. simensis* au nord de la vallée du Rift, et *C. s. citernii* au sud (De Beaux 1922 ; Yalden 1983). La reconnaissance de sous-espèces ou d'autres formes de structuration génétique est une question de conservation majeure qui doit être résolue. Une meilleure compréhension de l'histoire et de la structure génétique de ce canidé en voie de disparition aiderait au développement d'une gestion efficace pour la préservation de la diversité génétique, la priorisation des zones de conservation et le rétablissement du flux génétique quand et où cela est approprié (Sillero-Zubiri & Macdonald 1997).

Dans cette étude, nous avons étudié la variation génétique du génome mitochondrial du loup d'Éthiopie afin de caractériser l'étendue et la différenciation de la diversité génétique entre les individus des sept populations isolées. La structuration génétique des populations peut résulter d'un flux génétique limité entre les populations existantes ou d'événements historiques tels que la colonisation ou la fragmentation. La distinction entre ces causes est intrinsèquement difficile, surtout lorsqu'on utilise des marqueurs nucléaires tels que les microsatellites. En principe, les marqueurs basés sur les séquences, en particulier l'ADN mitochondrial (ADNmt), fournissent les moyens analytiques de distinguer ces facteurs (Templeton et al. 1995). Plutôt que d'adopter une approche statique de la variation géographique, nous recréons l'évolution de l'aire biogéographique de l'espèce sur la base des associations d'habitats des loups modernes et d'une reconstruction de la distribution de l'habitat afro-alpin au cours du dernier cycle glaciaire-interglaciaire. Nous considérons ce cycle comme représentatif des changements climatiques qui couvrent l'histoire de l'évolution du loup Ethiopien depuis son origine présumée. L'analyse des clades emboîtés (NCA : Templeton et al. 1987, 1995 ; Templeton & Sing 1993) permet de déduire les processus démographiques passés, les différents niveaux de clades emboîtés correspondant à des périodes différentes.

Nous avons utilisé une approche multidimensionnelle combinant des informations sur la variabilité génétique, les relations phylogéographiques, la taille déduite des populations passées et les modèles de fragmentation pour étudier l'effet de la spécificité de l'habitat et de la fragmentation des populations sur la diversité génétique de l'espèce.

MATERIEL ET METHODES

Estimation des changements paléogéographiques et de la taille des populations

La distribution actuelle du loup Ethiopien suit de près celle de ses principales proies rongeurs, ce qui correspond globalement à la zone Wurch ou afro-alpine, depuis la limite des arbres à ~ 3200 m jusqu'aux plus hauts sommets Ethiopiens atteignant ~ 4500 m (Marino 2003). Ces limites altitudinales ont été utilisées pour cartographier la distribution afro-alpine dans les conditions climatiques actuelles, bien qu'actuellement de nombreuses zones situées en dessous de 3700 m aient été perdues pour l'agriculture dans tout le nord de l'Éthiopie.

Le pollen fossile et les types de reliefs glaciaires indiquent que les ceintures de végétation pendant la dernière glaciation étaient ~ 1000 m plus basses dans les montagnes de Bale et que les glaciers inférieurs atteignaient 3000-3100 m (Fenley 1979 ; Mohamed et al. 1996). Les preuves géologiques des glaciations indiquent un niveau inférieur des glaciers plus variable dans les monts Arsi et le massif du Simien. Par conséquent, pour reconstituer la distribution afro-alpine pendant la période glaciaire tardive, nous avons déterminé les limites inférieures et supérieures de l'habitat approprié du loup comme étant la limite des arbres à 2200 m et la limite glaciaire à une valeur intermédiaire de 3500 m, respectivement. L'abaissement des ceintures de végétation de 1000 m peut être retracé aussi récemment qu'il y a 10 000 ans, donc cela peut être une estimation prudente de l'étendue que l'habitat afro-alpin aurait pu atteindre pendant la période plus sèche du Pléistocène entre 50 000 et 12 000 ans avant notre ère (preuves examinées dans Yalden & Largen 1992).

Le début de la déglaciation dans les monts Balé a été estimé à ~ 13 000 -14 000 ans BP (Mohamed et al. 1996), marquant le début de la période glaciaire-interglaciaire. La température moyenne du globe s'est réchauffée de ~ 7 °C après la fin du dernier maximum glaciaire (Hurni 1982), mais les taux de réchauffement ne restent pas nécessairement constants pendant les périodes de réchauffement. Plus typiquement, les taux sont élevés au début de l'épisode et diminuent ensuite (Barnosky et al. 2003), de sorte que des changements rapides dans la distribution afro-alpine ont pu se produire sur une période relativement courte. Les estimations des zones afro-alpines qui pourraient bien représenter le réchauffement initial ont été définies en sélectionnant une limite altitudinale inférieure intermédiaire entre le climat glaciaire et le climat actuel (c'est-à-dire 500 m au-dessus du niveau de la fin du glacier).

Tableau 1 Populations étudiées, échantillons et estimations de l'habitat actuel disponible et de la taille de la population

Region	Location	Suitable wolf habitat (km ²)	Popn estimate	Samples Skins (1900s–1920)	Faecal (1998–1999)	Blood/tissue (1990s–2000)
Northwest of the Rift Valley						
Gondar	Simien Mts	273	54	1	6	2
	Mt. Guna	51	10	—	—	2
Gojjam	Mt. Choke	134	extinct	3	—	—
Wollo	North Wollo (Kewa)	140	23	—	5	—
Shoa	Northeast Shoa	112	23	—	—	10
Southeast of the Rift Valley						
Arsi	Arsi Mts	870	108	8	6	—
Bale	Bale Mts	1141	250	—	—	23

Les parcelles d'habitat afro-alpin à ces trois stades ont été identifiées sur un modèle numérique d'élévation (MNE) de l'Ethiopie (US Geological Survey). Les petites parcelles d'habitat ont été exclues des calculs, en supposant une superficie minimale de 20 km² pour des populations viables, sur la base des preuves de deux extinctions récentes de populations (Marino 2003). Pour estimer la taille des populations, les parcelles voisines reliées par dispersion ont été regroupées, en supposant une distance de dispersion maximale de 20 km d'après des observations empiriques (Sillero-Zubiri et al. 2004). Les tailles des populations passées ont été estimées par extrapolation d'une densité intermédiaire de loups à l'étendue de chaque parcelle ou groupe de parcelles isolées. Une fourchette de densité de 0,3 - 0,7 loups adultes et subadultes/km² a été choisie, ce qui correspond à la densité des loups dans les habitats avec une biomasse de proies rongeurs intermédiaire à Bale (Gottelli & Sillero-Zubiri 1992).

Échantillons génétiques et extraction ADN...
Séquençage de la région de contrôle...
Analyse de la région de contrôle de l'ADNmt...

RESULTATS

Changements d'aire de répartition au Pléistocène

Dans notre reconstitution de l'altitude glaciaire, les habitats afro-alpins couvraient plus de 100 000 km² et le massif Ethiopien semblait divisé par la vallée du Grand Rift. Les zones afro-alpines sont apparues en **trois groupes** principaux séparés par des distances plus grandes que l'aire de dispersion supposée des loups Ethiopiens ; 70% de l'ensemble des habitats se trouvaient dans les vastes hautes terres du centre et du nord (Tableau 2, Fig. 1a). Avec le début de la période chaude, l'habitat afro-alpin a disparu de vastes zones situées à des altitudes plus basses, y compris la majeure partie de la chaîne sud-ouest, et les chaînes du Simien et du Choke sont devenues isolées, en termes de dispersion des loups, à la fois les unes des autres et du massif nord principal (contenant encore ~ 50% de l'habitat). Dans les conditions climatiques actuelles, l'habitat afro-alpin est apparu profondément fragmenté et limité aux plus hauts sommets ; les principales réductions ont eu lieu dans les montagnes les plus basses du centre de l'Éthiopie (Shoa) et l'habitat restant a été réparti de manière égale entre les montagnes au nord et au sud de la vallée du Rift (51 et 49%, respectivement). **On estime que seuls 5,6% de l'habitat autrefois disponible pour les loups à l'époque glaciaire subsisteront à l'époque des conditions climatiques actuelles.** Les estimations de la modification de l'habitat pendant la période initiale de réchauffement montraient déjà une réduction de 39% des habitats appropriés pour les loups (Tableau 2). Les changements déduits du nombre de loups étaient proportionnels aux changements de l'habitat disponible.

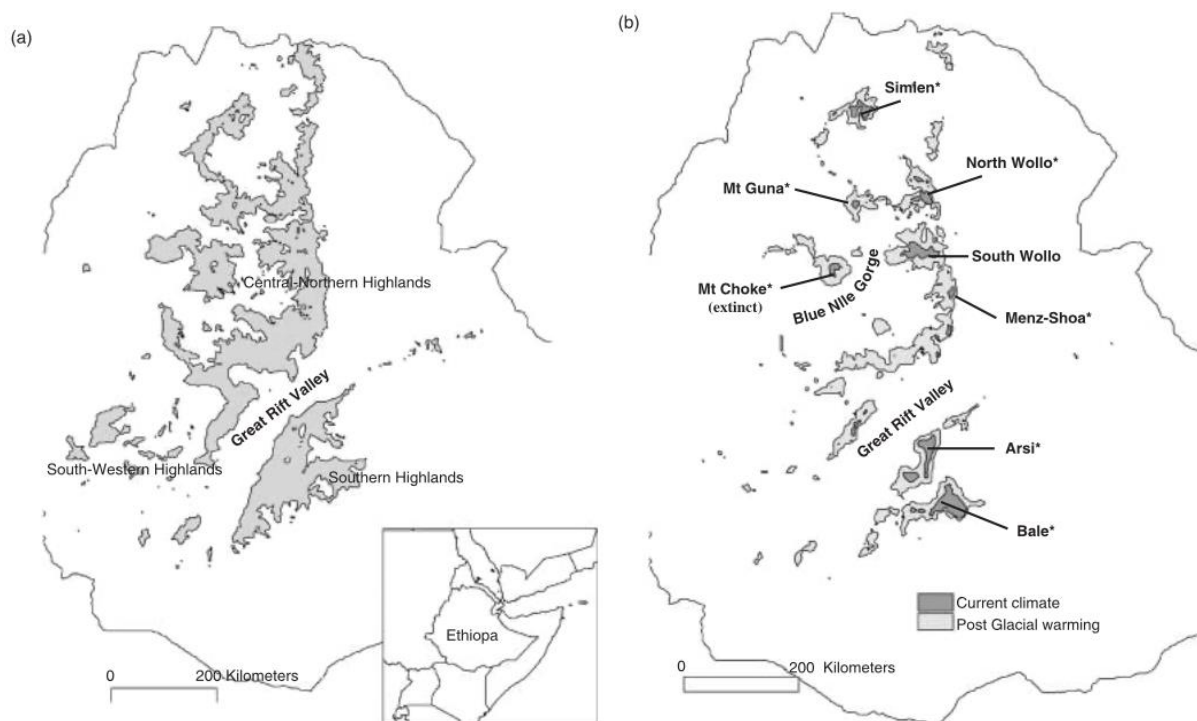


Fig. 1 (a) Distribution estimée des habitats afro-alpins au cours de la dernière période glaciaire. (b) Distribution inférée des habitats afro-alpins à un stade initial de la période de réchauffement du Pléistocène tardif (gris clair) et dans les conditions climatiques actuelles (gris foncé). Les populations de loups Ethiopiens échantillonnées (*) comprennent six des sept populations existantes et une population éteinte

Tableau 2 Estimations de l'étendue de l'habitat approprié du loup et de la taille des populations de loups depuis la dernière période glaciaire

	Late glacial	Post-glacial warming	Current climate
Altitudinal boundaries (m ASL)	2200–3500	2700–4000	> 3200
Extent of habitat (km ²)	110 000	43 000	6200
North RV	85 000 (77%)	31 000 (72%)	3200 (51%)
South RV	25 000 (23%)	12 000 (28%)	3100 (49%)
Estimated population size	33 000–77 000	12 800–30 100	1200–1800
North RV	25 000–59 500	9300–21 700	600–900
South RV	7500–17 500	3500–8400	600–900

Diversité génétique et histoire de la population

Dix sites variables ont défini 10 haplotypes de la région de contrôle dans 66 échantillons de loups Ethiopiens, ce qui représente toutes les populations de loups existantes, sauf une, et environ 10% des loups existants (Tableau 3 ; GenBank AY562099–AY562107). Les sites variables comprenaient six transitions (T_i) et quatre indels. Le test du rapport de vraisemblance hiérarchique a indiqué que le modèle de substitution sans hétérogénéité de taux (HKY) de Hasegawa et al. (1985) était le mieux adapté aux données ($-\ln L = 355,45$). Aucune **transversion** (T_v) n'a été observée chez les loups Ethiopiens. En incluant une séquence de loup gris (GenBank Accession no. AF115696), le test hiérarchique du rapport de vraisemblance a indiqué le modèle HKY avec $T_i/T_v = 8,4$ et sans hétérogénéité de taux.

Tableau 3 Haplotypes d'ADN mitochondrial et diversité nucléotidique (π). N , nombre d'haplotypes trouvés dans chaque population. Deux paires d'haplotypes (* et **) s'effondrent chacune en un seul haplotype lorsque les **indels** sont exclus

Population	Sample	N	Haplotypes including indels										π
			CS01*	CS03*	CS04	CS05	CS06	CS02**	CS07**	CS08	CS09	CS10	
South of Rift Valley													
Arsi	6	2					5		1				0.0014
Arsi (historic)	8	4					4		2	1	1		0.0059
Bale	23	2					8		15				0.002
North of Rift valley – western mts													
Mt. Choke	3	3			1	1		1					0.0089
Mt. Guna	2	1										2	0
Simien	9	3	1			4						4	0.0043
North of Rift Valley – eastern mts													
N Wollo	5	1		5									0
NE Shoa	10	2		1							9		0.0009
Totals	66	10	1	6	1	5	17	1	18	1	10	6	0.0091

La diversité nucléotidique (π) était de 0,0091 ($\pm 0,0006$) dans toutes les populations, mais était plus importante pour les deux populations représentées uniquement par des échantillons historiques (Tableau 3). Ce résultat ne reflète pas uniquement les différences de taille d'échantillon, car la diversité nucléotidique n'a pas augmenté avec la taille de l'échantillon. Les populations bien échantillonnées, comme Bale, présentaient une diversité nucléotidique plus faible et moins d'haplotypes divergents. Comme aucune transversion n'a été observée chez les loups Ethiopiens, le paramètre de population θ et le paramètre de croissance g ont été estimés par le programme fluctuant sous l'assomption de $T_i/T_v = 8,4$, le ratio trouvé pour les loups Ethiopiens dont un loup gris. Nous avons également utilisé un T_i/T_v de 5 et 50. La valeur importante et positive de $g = 122,2$ indique une croissance de la population, mais n'était pas significativement différente de zéro ($P > 0,05$, $SD = 183$), peut-être en raison de la petite taille de l'échantillon. Sous l'hypothèse d'une taille de population constante, l'estimation $\theta_{g=0}$ pour l'ensemble de la population était similaire à θ

estimée à partir de la diversité nucléotidique π ($\theta_{g=0} = 0,084$, intervalle de confiance à 95% CI = 0,0060-0,014 ; $\pi = 0,0091 \pm 0,0006$). La population au nord de la vallée du Rift a une valeur $\theta_{g=0}$ significativement plus élevée que la population au sud ($\theta_{g=0} = 0,0097$, IC à 95% = 0,0029-0,0141 et $\theta_{g=0} = 0,0011$, IC à 95% = 0,0003-0,0017, respectivement), **ce qui indique une taille de population effective de femelles presque 10 fois plus importante au nord**. Des valeurs similaires pour θ , g et $\theta_{g=0}$ ont été obtenues lorsque T_i/T_v variait entre 5 et 50. Le test de neutralité F_s de F_u , basé sur 5 000 échantillonnages simulés et incluant les **indels**, n'était pas significatif pour la population totale ($F_s = -1,36$, $P = 0,31$) et les populations au nord et au sud de la vallée du Rift ($F_s = -0,63$, $P = 0,40$ et $F_s = -0,18$, $P = 0,43$, respectivement), **indiquant l'absence d'expansion ou de déclin de la population**.

En supposant un taux de mutation de $\sim 5 \times 10^{-8}$ par sites nucléotidiques par an pour la région de contrôle I de Canis (Vilà et al. 1999) et un temps de génération compris entre 3 et 5 ans, une taille de population effective de 36 000 - 60 000 femelles est estimée à partir de $\pi = 0,0091$. Cette estimation est beaucoup plus élevée que celle déduite de la disponibilité de l'habitat, notamment pour les périodes postglaciaires et récentes. Cette surestimation est probablement due à la violation de l'hypothèse de panmixie pour l'interprétation de π et θ , mais une sous-estimation de l'habitat disponible dans le passé pourrait également expliquer cette différence.

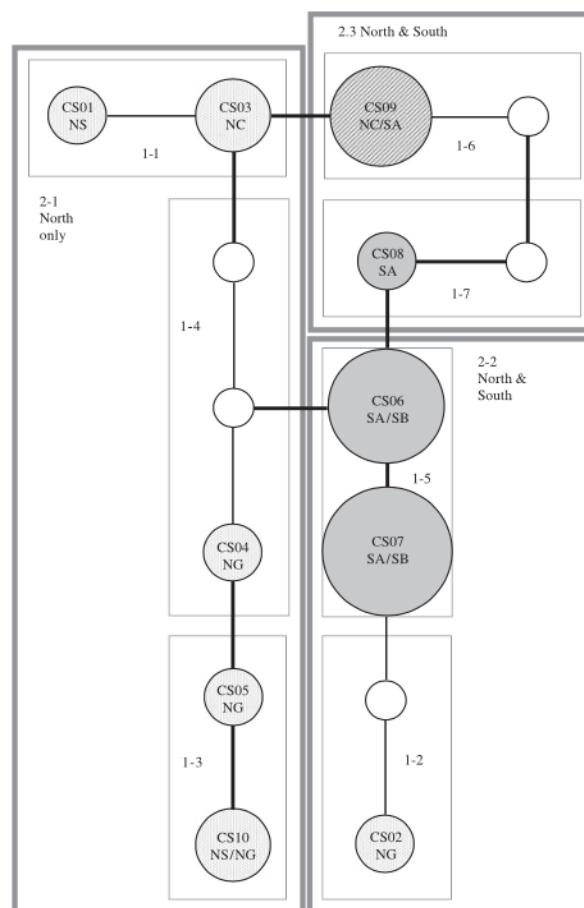


Fig. 2. Relations phylogénétiques des haplotypes de la région de contrôle du loup Ethiopien. Réseau de portée minimale basé sur la parcimonie statistique de Templeton et al. (1987, 1992). Chaque ligne pleine représente une étape mutationnelle (lignes pleines simples pour les indels et lignes pleines épaisses pour les transitions). Les nœuds contiennent le numéro de l'haplotype et la fréquence de l'haplotype (Arsi, SA ; Bale, SB, au sud de la vallée du Rift et Wollo/Shoa, NC ; Simien, NS et Mt. Guna/Mt. Choke, NG, au nord de la vallée du Rift) ; les nœuds vides indiquent des états intermédiaires d'haplotype non détectés. La taille des nœuds indique la fréquence de l'haplotype dans

l'ensemble de l'échantillon. Les cases en pointillé et grises indiquent les niveaux d'emboîtement à 1 étape (1-1 à 1-7) et les niveaux d'emboîtement à 2 étapes (2-1 à 2-3) pour l'analyse des clades emboîtés NCA, respectivement

Différenciation génétique et phylogéographie

Des génotypes spécifiques à une population et des génotypes ubiquistes ont été identifiés. Six haplotypes ont été trouvés exclusivement au nord de la vallée du Rift et trois haplotypes au sud de la vallée du Rift (Tableau 3). L'haplotype CS09 avait la fréquence la plus élevée à Shoa, au nord de la vallée du Rift, mais a également été trouvé une fois au sud de la vallée du Rift. Le minimum spanning network (Fig. 2) indique un regroupement des haplotypes du nord par rapport aux haplotypes du sud de la vallée du Rift, mais l'arbre NJ (non montré) est peu soutenu par les valeurs bootstrap et ne soutient pas la monophilie réciproque des haplotypes du nord et du sud. La figure 2 montre le plan imbriqué obtenu en utilisant les règles données dans Templeton et al. (1987) et Templeton & Sing (1993). L'analyse de contingence exacte de 1000 permutations de l'ensemble du cladogramme a rejeté l'hypothèse nulle d'absence d'association avec l'emplacement géographique ($P < 0,001$). Tous les haplotypes du clade 2-1, emboîté en 2 étapes, proviennent du nord de la vallée du Rift, mais les deux autres clades 2-2 et 2-3, emboîtés en 2 étapes, contiennent tous deux un mélange d'haplotypes du nord et du sud.

0-step clades	CS01	CS03	CS05	CS10	CS04	CS06	CS07	CS02	CS09	CS08
Dc	0	88332	144449	101213		48572	31890S			
Dn	184083	110428	100612	89294		41359L	34662S			
Nested clade	1-1		1-3			1-5				
I-TC	88332		43236			N/A				
I-Tn	-73655		11319			N/A				
Inference	Don't reject Ho		Don't reject Ho			Don't reject Ho				
1-step clades	1-1		1-3		1-4	1-5		1-2	1-6	1-7
Dc	124238		144449		0	44464S		0	107800	0
Dn	150729		163548		199276	59052S		422079L	136434	291060
Nested clade	2-1				2-2			2-3		
I-TC	-132659L				44464S			N/A		
I-Tn	43206				-363027S			N/A		
Inference	Past fragmentation				Contiguous Range Expansion			Don't reject Ho		
1-step clades	2-1				2-2			2-3		
Dc	149793S				72554S			159484S		
Dn	408443L				280590S			284737		
Nested clade	Total cladogram									
I-TC	60247									
I-Tn	-40022									
Inference	Range expansion, but can't discriminate between contiguous range Expansion and Long Distance Colonization									

Fig. 3 Analyse cladistique emboîtée des distances géographiques. Les distances entre clades (DC) et clades emboîtés (DN) sont données pour tous les clades emboîtés contenant une variation géographique et génétique. S indique que la distance est significativement petite au niveau de 5%, et L indique qu'elle est significativement grande. Les distances intérieur/extrémité, DC et DN, sont indiquées pour les clades emboîtés dont le statut intérieur/extrémité est connu et pour lesquels il existe à la fois des extrémités et des intérieurs. Au sein d'un même groupe d'emboîtement, le nom du clade est ombragé pour les clades intérieurs. Les inférences sont données en suivant la clé d'inférence de Templeton et al.'s (1995)

La figure 3 présente les résultats de l'ANC des distances géographiques et décrit les inférences tirées en utilisant la clé donnée par Templeton et al. (1995) pour les résultats statistiques. Elle montre que la structure et l'histoire de la population ont joué un rôle important dans la détermination des associations géographiques. **L'hypothèse nulle** d'absence d'association géographique n'a pu être rejetée pour aucun clade imbriqué au niveau d'imbrication le plus bas (1-1, 1-3 et 1-5). Pour le clade emboîté à deux niveaux 2-1, comprenant exclusivement des haplotypes nordiques, une

fragmentation passée a été déduite. Une expansion continue de l'aire de répartition a été diagnostiquée dans le clade emboîté 2-2 impliquant des haplotypes du nord et du sud. Aucune association géographique n'a pu être déduite dans le clade 2-3, qui n'implique que des haplotypes de la chaîne de montagnes bordant la vallée du Rift au nord et au sud (Wollo/Shoa et Arsi, respectivement). Au niveau d'imbrication 3, qui correspond au cladogramme total, l'expansion de l'aire de répartition a été déduite comme étant la cause principale de l'association géographique, mais il n'a pas été possible de distinguer entre l'expansion contiguë et la dispersion à longue distance.

Le ϕ_{ST} moyen par paire entre les populations était de 0,64 (Tableau 4). Un test exact de différenciation des populations montre que toutes les populations sont significativement différenciées les unes des autres, à l'exception des populations historiques et récemment échantillonnées d'Arsi ($P = 0,49$) et du Mont Guna et du Mont Choke par rapport au Simien ($P = 0,30$). L'échelle multidimensionnelle des divergences de séquences moyennes corrigées entre les populations, d_A , suggère plusieurs groupes de populations (Fig. 4). Les paires de populations Arsi/Bale, Wollo/Shoa et Simien/Mt. Guna semblent regroupées, mais la position du Mt. Choke n'est pas claire. L'analyse amova soutient le regroupement des populations selon leur emplacement géographique et différencie les populations au sud de la vallée du Rift et les populations orientales et occidentales au nord de la vallée du Rift (valeur la plus élevée de $\phi_{CT} = 0,73$; Tableau 5). Le mont Choke est le plus fortement associé au Simien et au mont Guna. Le regroupement de toutes les populations du nord par rapport aux populations du sud obtient le soutien le plus faible ($\phi_{CT} = 0,39$).

Tableau 4 Comparaisons ϕ_{ST} par paires

	Arsi recent	Arsi historic	Bale	MtChoke/Guna	Simien	NWollo
Arsi historic	-0.039					
Bale	0.296*	0.218*				
MtChoke/Guna	0.612**	0.488**	0.750**			
Simien	0.699**	0.603**	0.800**	-0.023		
NWollo	0.942**	0.688**	0.894**	0.739**	0.742**	
NEShoa	0.939**	0.767**	0.914**	0.831**	0.821**	0.851**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

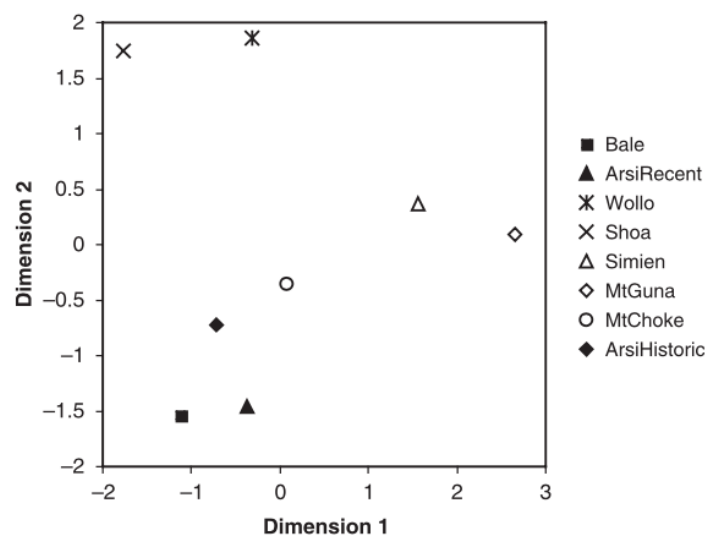


Fig. 4. Mise à l'échelle multidimensionnelle des différences moyennes corrigées par paire d_A entre les populations de loups Ethiopiens

DISCUSSION

Impact des changements climatiques du Pléistocène sur l'histoire de l'évolution et la structure de la population

Dans cette étude, nous avons combiné des informations sur le degré et le modèle de différenciation génétique à travers l'aire de répartition géographique du loup Ethiopien et l'étendue des calottes glaciaires et des paléoclimats pour tirer des conclusions sur l'histoire évolutive du loup Ethiopien. Compte tenu de la difficulté d'obtenir des échantillons d'espèces menacées à l'état sauvage et de la très faible densité de loups dans les populations existantes, en particulier dans le nord, les échantillons utilisés dans cette étude représentent le résultat d'un temps et d'efforts considérables. Cependant, nous sommes conscients des limites statistiques imposées par la petite taille de l'échantillon dans certaines des analyses utilisées, en particulier lors de la comparaison entre les populations, et celles-ci sont soulignées chaque fois que cela est nécessaire dans cette discussion.

L'histoire du loup Ethiopien semble être relativement courte. La divergence moyenne des séquences d'ADNmt au sein des loups Ethiopiens est de $\sim 1,0\%$, et en supposant un taux de divergence de $10\%/Myr$ pour la région de contrôle I des canidés (Vilà et al. 1999), une coalescence de $\approx 102\ 602$ ans est impliquée. Bien qu'il faille faire preuve d'une grande prudence dans l'interprétation littérale des temps de divergence en raison des imprécisions de l'horloge moléculaire (Gibbons 1998), le temps de coalescence estimé soutient davantage l'hypothèse selon laquelle le loup Ethiopien a divergé relativement récemment des loups gris (Gottelli et al. 1994), qui sont apparus en Eurasie il y a $\sim 700\ 000$ ans (Kurten 1968). La période de coalescence estimée coïncide également avec le début du dernier cycle glaciaire, lorsque $> 110\ 000\ km^2$ d'habitat afro-alpin sont devenus disponibles, permettant à la population de loups de s'étendre. Sur cette base, nous nous sommes concentrés sur les changements d'habitat et leur influence sur la distribution des loups Ethiopiens au cours de la période qui a suivi la dernière glaciation.

Sur la base de valeurs conservatrices de la densité démographique actuelle du loup à Bale (Tableau 2), nous estimons la taille de la population au pic de la dernière glaciation à $33\ 000$ - $77\ 000$ individus répartis en deux sous-populations, la population du nord (Mt. Choke, Simien, Mt. Guna, Wollo et Shoa) et la sous-population du sud (Bale et Arsi).

Suite aux changements climatiques survenus au début de l'interglaciaire actuel, quelque $18\ 000$ ans avant notre ère, un processus de fragmentation a commencé. Au cours de cette étape intermédiaire, la disponibilité de l'habitat et la densité des loups ont été réduites de moitié et les loups se sont retirés dans quatre populations isolées, le Mont Choke, le Simien, les hauts plateaux du centre et du nord-est (Mont Guna, Wollo et Shoa) et les hauts plateaux du sud (Bale et Arsi). Depuis l'Holocène, l'habitat afro-alpin et la densité des loups ont diminué d'un ordre de grandeur par rapport au pic de la dernière glaciation et les loups sont maintenant regroupés en sept populations isolées, cinq au nord et deux au sud de la vallée du Rift. Un schéma similaire de différenciation des populations dû à l'isolement de la période glaciaire est encore apparent chez l'ours brun (Taberlet et al. 1994 ; Paetkau et al. 1998) et l'ours noir (Wooding & Ward 1997).

Ce schéma de colonisation et d'expansion rapide suivi d'une fragmentation et d'une réduction de la population, suggéré par notre reconstruction des changements d'habitat et de climat, a été soutenu par les résultats de l'ANC, des comparaisons de populations par paires et des arbres

phylogénétiques, confirmant une relation étroite entre les loups et la distribution afro-alpine. Nous avons déduit l'expansion de l'aire de répartition comme la principale cause de l'association géographique au cours de l'histoire précoce du loup Ethiopien, probablement immédiatement après la **coalescence** estimée des séquences de la région de contrôle il y a $\sim 102\,600$ ans. **Cela indique un événement unique de colonisation et une expansion ultérieure de l'aire de répartition du loup Ethiopien.** Le modèle de reconstruction de l'habitat indique que la colonisation s'est faite via les hauts plateaux s'étendant vers l'Érythrée, en lien avec d'anciens ponts terrestres traversant la mer Rouge (Kingdon 1990). Bien qu'il n'ait pas été possible de distinguer entre une expansion continue et une dispersion sur de longues distances comme cause de l'expansion, la reconstitution de l'habitat indique que cette expansion initiale rapide se serait produite dans un scénario de chaînes afro-alpines presque continues, avec la vallée du Grand Rift comme seule barrière principale séparant les vastes hautes terres du nord et du sud.

Bien que les déductions dérivées des niveaux de nidification inférieurs de la NCA doivent être traitées avec prudence, une nouvelle expansion vers le sud a également été indiquée, soutenant l'hypothèse d'un ancêtre loup colonisant depuis le nord. **Cela démontre que la vallée du Rift était, au moins à un certain stade, une barrière perméable pour la dispersion des loups, puisque des flux génétiques ont été détectés entre Arsi au sud et les hautes terres du nord.** Il a également été suggéré que pendant une certaine phase du Pléistocène, le climat était suffisamment froid et sec pour faire descendre les communautés de prairies de haute altitude jusqu'au fond de la vallée du Rift à ~ 1800 m (Yalden & Largen 1992). Cela pourrait indiquer que, durant cette période, l'aire de répartition du loup Ethiopien aurait pu s'étendre davantage que nos estimations ou que les distributions de ressources auraient pu permettre des densités plus élevées et ainsi expliquer la taille de la population effective de femelles plus importante de 36 000 - 60 000 au pic de la dernière glaciation, estimée en utilisant la diversité génétique, comparée à la taille de 7000 -13 000, estimée en utilisant les données démographiques actuelles et l'étendue de l'habitat (Sillero-Zubiri et al. 2004). Alternativement, notre estimation de θ , basée sur la fluctuation, pourrait être gonflée en raison de la subdivision de la population, car les populations subdivisées prennent plus de temps à coalescer qu'une population panmictique. Un tel effet serait le plus important pour la subdivision causée par la vallée du Rift (voir également Φ_{ST} par paire dans le Tableau 4), mais θ calculé pour l'ensemble de la population est identique à la somme de θ calculée séparément pour le nord et le sud de la vallée du Rift, ce qui indique que la subdivision de la population depuis la fin de la dernière glaciation n'a pas gonflé l'estimation de θ . La différence entre l'estimation génétique et l'estimation démographique de la taille de la population effective de femelles, bien que grande, ne doit pas être sur-interprétée car l'estimation génétique est basée ici sur un seul locus.

La fragmentation plus récente des populations dans le nord de la vallée du Rift, indiquée par la NCA, est soutenue par des données géologiques qui ont montré une séparation relativement précoce des monts Simien et du mont Choke des hautes terres du centre et du nord, alors que les montagnes de Wollo et de Shoa sont restées connectées plus longtemps. (Fig. 1a, b). Pour le niveau d'imbrication le plus bas de la NCA, qui correspond aux périodes les plus récentes, aucune association géographique et génétique n'a pu être déduite, **ce qui indique une panmixie à l'échelle locale.** Ce schéma complexe de relations phylogénétiques et écologiques indique un processus dynamique d'expansion rapide d'une nouvelle forme dans de nouvelles zones montagnardes, suivi d'un isolement et d'une divergence sub-séquentes des populations. Comme pour de nombreuses espèces montagnardes, chez les loups Ethiopiens, la majorité des nœuds terminaux rayonnant entre

des zones montagneuses isolées semble s'être produite bien avant le Pléistocène, soutenant ainsi le modèle de spéciation induit par le climat (DeMenocal 1995).

Bien que nous ayons trouvé un regroupement clair des individus du sud de la vallée du Rift par rapport à ceux du nord, le manque de soutien pour les critères de deux sous-espèces était évident par l'absence de monophilie réciproque dans les haplotypes des clades nord et sud. La vallée du Rift a agi comme une barrière au flux génétique chez les oiseaux (Freitag & Robinson 1993) et les mammifères (Arctander et al. 1999). Chez le gnou, *Connochaetes taurinus*, on constate une différenciation significative de l'ADNmt à travers la vallée du Rift, reflétant la subdivision taxonomique actuelle, alors que les populations du même côté ne diffèrent pas. Cependant, il n'est pas clair si cette différenciation a évolué comme une conséquence directe de la discontinuité de l'habitat à travers la vallée du Rift agissant contre le flux de gènes ou si deux lignées évolutives distinctes ont colonisé les zones des deux côtés de la vallée du Rift par deux voies parallèles (Arctander et al. 1999). Chez le chien sauvage africain, *Lycan pictus*, les deux scénarios sont également discutés actuellement en ce qui concerne l'origine des deux clades d'ADNmt distincts trouvés des deux côtés de la vallée du Rift (Girman et al. 2001).

Diversité génétique

Il semble que l'impact de la fragmentation historique de l'habitat sur le flux génétique du loup d'Éthiopie ne se soit pas produit il y a assez longtemps pour entraîner une réduction significative de la diversité du génome mitochondrial. La faible diversité nucléotidique indique que l'expansion de la population était récente. L'indice de diversité nucléotidique π reflète la taille récente de la population, tandis que θ utilise les informations généalogiques et reflète la taille historique de la population. La constatation d'aucune différence significative entre eux ($\pi = 0,0091$ et $\theta = 0,0084$) indique que les récentes diminutions du nombre de loups Ethiopiens n'ont pas encore provoqué une réduction substantielle des niveaux de diversité mitochondriale. Chez d'autres espèces de carnivores comme le chien sauvage d'Afrique, la comparaison entre π (0,0102) et θ (0,0145) semble indiquer que la taille récente de la population est supérieure à la taille historique de la population (Girman et al. 2001). En revanche, les valeurs de π étaient significativement inférieures à celles de θ chez les loups gris et les coyotes, suggérant une diminution par 10 de la taille de la population au cours du Pléistocène tardif (Vilà et al. 1999).

L'isolement des populations dû à la spécificité de l'habitat peut être le facteur crucial influençant la diversité génétique chez le loup Ethiopien. Les interactions écologiques et compétitives pour les ressources limitantes empêchent la dispersion et les deux sexes montrent une forte philopatrie résultant en des groupes sociaux stables. Dans ce scénario, les allèles rares peuvent devenir fixes au sein des groupes individuels (Sugg et al. 1996). Comme il est peu probable que les mêmes allèles se fixent dans tous les groupes, ce processus peut augmenter la diversité génétique globale de la population en conservant des niveaux de diversité des haplotypes plus élevés que ceux qui pourraient être conservés dans une seule population panmictique. La perte observée d'haplotypes uniques au sein du réseau d'haplotypes est conforme à ce processus de fixation aléatoire des allèles au sein de populations isolées. En résumé, la structure génétique présente aujourd'hui dans la population de loups Ethiopiens semble être une relique de l'expansion de la fin du Pléistocène dans un habitat afro-alpin approprié. L'effet de la fragmentation et de la dérive génétique qui a suivi au cours des 10 000 dernières années peut avoir entraîné une perte locale de variabilité génétique, mais l'espèce dans son ensemble a conservé sa variabilité génétique malgré le faible nombre de loups dans les populations isolées.

Par conséquent, le faible nombre d'haplotypes d'ADNmt et la faible divergence de séquence entre eux reflètent l'évolution récente des loups Ethiopiens et la taille relativement faible de la population par rapport aux chiens sauvages, aux loups gris et aux coyotes, mais n'indique pas que l'espèce est génétiquement appauvrie en raison de la fragmentation de la population (Wayne et al. 1992).

Implications pour la conservation

Les données génétiques peuvent aider à définir l'échelle spatiale à laquelle les populations doivent être suivies et gérées à des fins de conservation. D'un point de vue évolutif, le mélange était probablement une caractéristique commune de l'ancienne démographie du loup d'Éthiopie, mais la fragmentation qui a suivi a également été un processus historique important. **Il est important de noter que les niveaux actuels de diversité des haplotypes semblent refléter une densité de population ancienne plutôt que récente par un tri aléatoire au sein de sous-populations isolées.** La plupart de ces sous-populations ont conservé plus d'un haplotype jusqu'à récemment. Cependant, l'impact des récentes perturbations humaines a encore aggravé la réduction de la taille des populations et a donc augmenté la probabilité d'une **fixation locale** et d'une perte globale d'haplotypes, comme le confirme la comparaison des échantillons historiques et récents de loups à Arsi.

Dans cette étude, nous avons montré que les populations de loups Ethiopiens au nord de la vallée du Rift constituent le principal réservoir de variabilité génétique de l'espèce, dépassant largement la variabilité des populations du sud. Par conséquent, les futurs plans de gestion de la conservation devraient se concentrer de toute urgence sur les zones situées au nord de la vallée du Rift où la pression humaine sur les habitats restants a également atteint des niveaux critiques (Marino 2003). Les analyses NCA et amova ont montré que la répartition génétique la plus probable correspond à trois zones montagneuses : Arsi/Bale, Wollo/Shoa et Simien/Mt. Guna, un schéma qui correspond étroitement à l'histoire géographique de la fragmentation afro-alpine. La gestion visant à restaurer ou à maintenir la variation dans les populations génétiquement à risque pourrait être efficace tout en maintenant ce schéma en utilisant des transplantations uniquement entre régions contiguës. Ainsi, sur la base de l'analyse de l'ADNmt, les individus issus des populations de ces zones montagneuses pourraient être utilisés à juste titre comme source de réintroduction ou d'augmentation de la population. Les conclusions finales concernant la délimitation des unités de gestion et l'identification de la population source pour la réintroduction ou l'augmentation nécessitent l'analyse des marqueurs nucléaires et des différences phénotypiques liées à l'aptitude (Gottelli et al. en préparation).