

Structure génétique des populations de loups dans le nord-ouest de la région Dinarique-Balkanique


Received: 9 November 2021 | Revised: 25 November 2021 | Accepted: 26 November 2021

DOI: 10.1002/ece3.8444

RESEARCH ARTICLE

Ecology and Evolution Open Access WILEY

Population genetic structure of wolves in the northwestern Dinaric-Balkan region

Dragana Šnjegota¹  | Astrid Vik Stronen²  | Barbara Boljte² | Duško Ćirović³  | Mihajla Djan⁴  | Djuro Huber⁵  | Maja Jelenčić² | Marjeta Konec² | Josip Kusak⁵  | Tomaž Skrbinšek² 

¹Department of Biology and Ecology, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Banja Luka, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

²Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

³Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

⁴Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia

⁵Department of Biology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Correspondence

Dragana Šnjegota, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Banja Luka, Mladena Stojanovića 2, 78000, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina.
Email: dragana.snjegota@pmf.unibl.org

Funding information

Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia; Rufford Foundation; Ministry for Environment of the Republic of Croatia; Bernd Thies-Stiftung; European Commission - LIFE SLOWOLF, Grant/Award Number: LIFE08 NAT/SLO/000244; EuroNatur Stiftung; Ministry of the Environment and Spatial Planning of the Republic of Slovenia

Résumé

La péninsule des Balkans et les monts Dinariques possèdent une biodiversité extraordinaire et abritent l'une des populations de loups (*Canis lupus*) les plus importantes et les plus diversifiées d'Europe. Les résultats obtenus à l'aide de divers marqueurs génétiques montrent une sous-structure ouest-est, également observée chez diverses autres espèces, malgré l'absence de barrières évidentes aux déplacements. Cependant, l'étendue spatiale des clusters génétiques reste non résolue, et notre objectif était de combiner un échantillonnage à échelle fine avec des analyses génétiques des populations et spatiales pour améliorer la résolution des clusters génétiques de loups. Nous avons analysé 16 microsatellites autosomiques provenant de 255 loups échantillonnés en Slovénie, en Croatie, en Bosnie-Herzégovine (BIH) et en Serbie et avons documenté trois clusters génétiques. Ceux-ci comprenaient (1) la Slovénie et les régions de Gorski Kotar et Lika en Croatie, (2) la région de Dalmatie dans le sud de la Croatie et de la Bosnie-Herzégovine, et (3) la Serbie. Lorsque nous avons cartographié les clusters géographiquement, nous avons observé une structure génétique ouest-est dans toute la zone d'étude, ainsi qu'une structure spécifique en BIH-Dalmatie. Nous avons observé que le cluster 1 avait une taille de population effective plus petite, ce qui est cohérent avec les rapports précédents sur le rétablissement de la population depuis les années 1980. Nos résultats constituent une base pour de futures études génomiques qui permettraient de mieux résoudre la structure de population ouest-est observée et son histoire évolutive chez les loups et d'autres taxons de la région et d'identifier les zones focales pour la conservation de l'habitat. Ils ont

également une importance immédiate pour la planification de la conservation des loups dans l'une des parties les plus importantes de l'aire de répartition Européenne de l'espèce.

1 | INTRODUCTION

Des études de génétique des populations de loups Européens (*Canis lupus*) ont été menées à l'aide de divers marqueurs moléculaires (par exemple, Djan et al., 2014 ; Montana et al., 2017 ; Pilot et al., 2006, 2010 ; Stronen et al., 2013). Ces études nous ont donné un aperçu complet de la structure historique et actuelle de la population d'une espèce qui était autrefois présente dans toute l'Europe. De nos jours, les loups Européens sont divisés en plusieurs populations (Kaczensky et al., 2013), la perte d'habitat, les conflits homme-faune, l'hybridation avec les chiens domestiques (*C. l. familiaris*) et d'autres processus affectant la structure observée (Loxterman, 2011 ; Sinclair et al., 2001 ; Walker et al., 2002 ; Woodroffe & Frank, 2005). Cependant, divers changements, dont la mise en œuvre de nombreux programmes de gestion de la conservation au cours des dernières décennies (Chapron et al., 2014), ont permis aux loups de coloniser à nouveau des parties substantielles de leurs anciennes aires de répartition et ont facilité la reconnexion de populations auparavant séparées (par exemple, Louvrier et al., 2020 ; Nowak et al., 2016 ; Schley et al., 2021).

L'une des plus grandes populations de loups en Europe occupe la région Dinarique-Balkanique dans le sud-est du continent (Chapron et al., 2014 ; Hindrikson et al., 2017). La population Dinarique-Balkanique habite donc une région qui a constitué un important refuge glaciaire pour de nombreux groupes taxonomiques (Hewitt, 2000) et conserve une quantité substantielle de la variation génétique historique de l'espèce au niveau continental (par exemple, Gomerčić et al., 2010 ; Randi et al., 2000). La population joue un rôle clé dans la connexion entre les loups d'Europe de l'Est et de l'Ouest (Djan et al., 2014) et représente une source importante de diversité génétique pour la population Italienne longtemps isolée (Fabbri et al., 2014 ; Ražen et al., 2016) et peut-être aussi pour les zones plus au nord, y compris l'Allemagne (Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2021). Des études antérieures de génétique des populations avec différents marqueurs génétiques, notamment l'ADN mitochondrial (ADNmt) (Djan et al., 2014 ; Šnjegota, 2019), les microsatellites (Fabbri et al., 2014 ; Montana et al., 2017 ; Šnjegota, 2019) et les polymorphismes mononucléotidiques (SNP) (Stronen et al., 2013), ont montré un gradient ouest-est cohérent dans la population Dinarico-Balkanique. Cependant, ces études étaient pour la plupart conduites localement ou incluaient des zones plus larges avec un échantillonnage discontinu. Par exemple, les analyses SNP à l'échelle du génome ont révélé une différenciation entre les loups échantillonnés en Bulgarie et en Grèce par rapport aux profils de la Croatie (Stronen et al., 2013), mais en raison de l'échantillonnage discontinu, il n'a pas été possible de déterminer l'étendue spatiale de ces groupes de population. Un échantillonnage plus fin est donc nécessaire pour déterminer la sous-structure de la population Dinarique-Balkanique. De plus, Djan et al. (2014) ont observé des sous-populations occidentales et orientales basées sur les haplotypes de l'ADNmt, la Bosnie-Herzégovine (désormais BIH) et la Croatie divergeant de la Serbie et de la Macédoine du Nord, ce qui suggère qu'un échantillonnage plus détaillé et l'analyse de marqueurs moléculaires de plus haute résolution à travers cette région peuvent aider à résoudre la structure de la population et fournir une base de référence pour le suivi génétique et les efforts de conservation transfrontaliers vitaux.

La recolonisation des loups à travers l'Europe crée des conflits potentiels avec les humains et nécessite donc la mise en place ou la modification de mesures de conservation et de législations nationales pour cette espèce (Salvatori et al., 2020). Ces questions sont particulièrement

importantes pour la population Dinarico-Balkanique, qui s'étend sur plusieurs frontières nationales et des différences dans les législations nationales (Hindrikson et al., 2017), et où jusqu'à présent, seules la Croatie et la Slovénie ont promulgué des lois de conservation pour les loups. L'objectif de notre étude était de combiner un échantillonnage continu à échelle fine des loups avec des analyses génétiques complètes de la population et de l'espace et de les utiliser pour mieux comprendre la structure génétique régionale de cette espèce, fournissant ainsi un contexte solide pour la conservation de l'espèce.

2 | MATÉRIAUX ET MÉTHODES

2.1 | Collecte des échantillons et zone d'étude

L'échantillonnage a été réalisé en Slovénie ($n = 65$), en Croatie ($n = 94$), en Bosnie-Herzégovine ($n = 59$) et en Serbie ($n = 37$) (Figure 1 ; Annexe S1 : note S1), ce qui représente la majeure partie de l'aire de répartition des loups dans ces pays (Chapron et al., 2014 ; Kaczensky et al., 2013). L'organisation des loups Croates en trois sous-groupes (Gorski Kotar, Lika et Dalmatie) a été faite sur la base de résultats antérieurs montrant une sous-structure régionale (Fabbri et al., 2014). Le dépistage initial (Annexe S1 : Figure S1) a permis d'obtenir 255 profils individuels pour des analyses plus poussées ; 249 échantillons ont été collectés entre 2010 et 2018, tandis que six ont été collectés avant 2010. La majorité des échantillons de BIH ont été examinés pour la structure génétique de la population par Šnjegota et al. (2018) (Annexe S1 : Figure S2), et ces échantillons ont été regénotypés pour cette étude afin de garantir des génotypes compatibles. Les échantillons étaient des tissus d'individus trouvés morts de diverses causes, et aucun animal n'a été tué pour les besoins de cette étude. Après l'échantillonnage, les tissus ont été conservés dans de l'éthanol à 95% et stockés à -20°C .

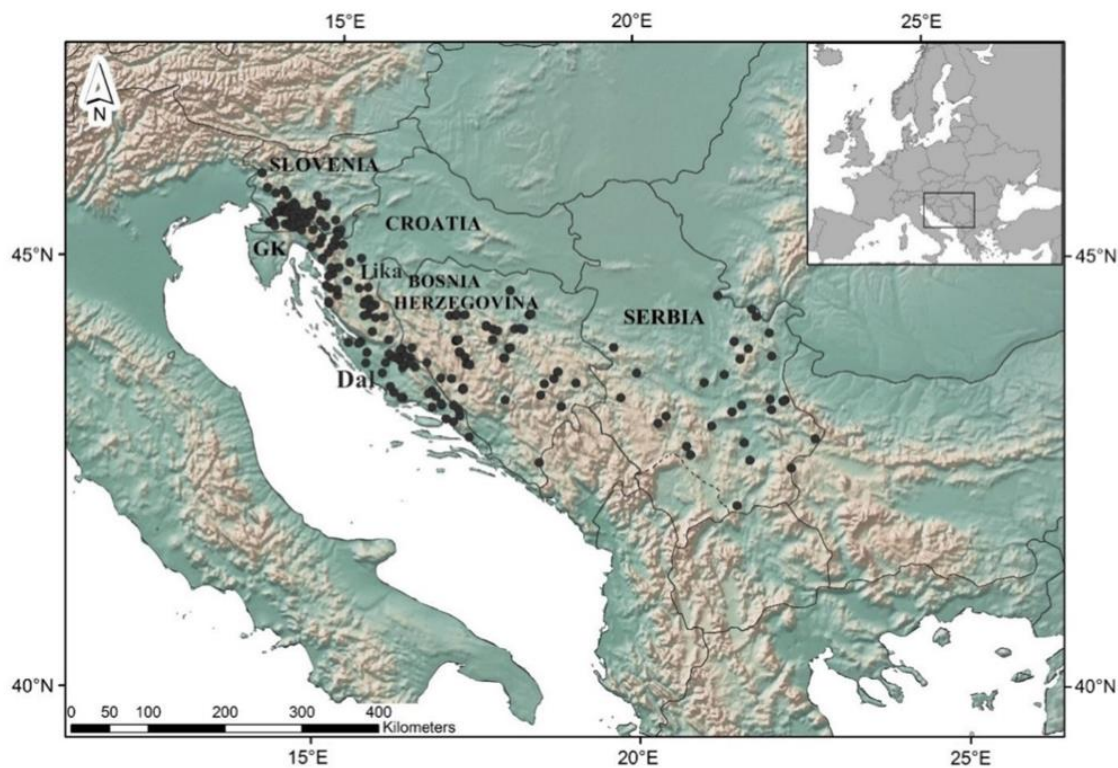


FIGURE 1 Carte montrant les localités d'échantillonnage des loups de Slovénie, de Croatie, de Bosnie-Herzégovine et de Serbie, y compris les trois régions de Croatie (Dal, Dalmatie ; GK, Gorski Kotar ; Lika)

2.2 | Extraction de l'ADN, amplification des microsatellites et génotypage

2.3 | Analyse des données

2.3.1 | *Détection de la structure de la population de loups après le dépistage initial*

2.3.2 | *Structure spatiale*

2.3.3 | *Variabilité génétique*

2.3.4 | *Flux génétique*

2.3.5 | *Taille effective de la population*

3 | RÉSULTATS

3.1 | Détection de la structure de la population de loups après le dépistage initial

Les valeurs STRUCTURE des logarithmes de vraisemblance [$\ln \Pr(X | K)$] et ΔK suggèrent que $K = 4$ est le nombre le plus probable de clusters (Figure 2a). Cependant, après avoir comparé la distribution spatiale des résultats de $K = 4$ (Figure 2b ; Annexe S1 : Figure S3) et $K = 3$ (Figures 2c et 3a), la distribution des individus de cette espèce très mobile a été mieux interprétée comme $K = 3$ groupes de population spatiaux, avec une certaine intergradation attendue entre les unités voisines. Bien que $K = 4$ puisse expliquer une plus grande partie de la variation (Annexe S1 : Figure S4), $K = 3$ a fourni une structure génétique spatiale plus claire et une base de référence plus pratique pour la gestion de la population et la planification de la conservation. Nous présentons donc les deux résultats, mais nous avons adopté $K = 3$ comme le résultat le plus parcimonieux pour les analyses suivantes.

Selon les valeurs q , 90 individus (35%) ont formé le cluster 1, tandis que 50 individus (19,5%) ont été assignés au cluster 2 et 45 (17,6%) au cluster 3. Soixante-dix individus (27,4%) ont été classés comme admixtes avec des contributions de différents clusters de populations de loups. La plupart des loups mélangés ont été échantillonnés en BiH et en Dalmatie (Croatie). Après avoir reporté sur la carte les individus en fonction de leurs valeurs q pour $K = 3$ clusters, un gradient nord-ouest-sud-est est clairement visible (Figure 3a). Les résultats ont montré trois sous-populations correspondant généralement à la Croatie et à la Slovénie (cluster 1), à BiH et à la Dalmatie (cluster 2), et à la Serbie (cluster 3), avec un certain mélange entre les clusters.

Un gradient ouest-est similaire était également visible dans les résultats de l'ACP et de la DAPC (Annexe S1 : Figure S5). Dans l'ACP, le premier axe de la composante principale indiquait une différenciation entre les loups de Slovénie, de Gorski Kotar et de Lika et ceux de Serbie. Les loups de BiH et de Dalmatie représentaient la principale zone de mélange. La DAPC a fourni une image plus claire que l'ACP, et le résultat le plus stable et le plus interprétable a été obtenu avec les groupements a priori selon le lieu d'échantillonnage (Annexe S1 : Figure S5B, C), l'analyse de groupement de novo indiquant un schéma similaire mais moins clair (non montré). Nous avons fini par retenir 60 PC, comme le suggère la validation croisée, mais le test de différents nombres de PC retenus (de 20 à 100) a fourni une interprétation similaire. Le DAPC a montré une différenciation claire des animaux échantillonnés en Serbie et un gradient de la Slovénie à BiH pour les autres animaux (Annexe S1 : Figure S5B). Lorsque les groupes de lieux d'échantillonnage ont été fusionnés selon le regroupement suggéré par STRUCTURE, le résultat a montré un groupe bien séparé en Serbie et deux groupes plus proches en Slovénie-Croatie (Gorski Kotar et Lika) et BiH-Croatie (Dalmatie) (Annexe S1 : Figure S5C).

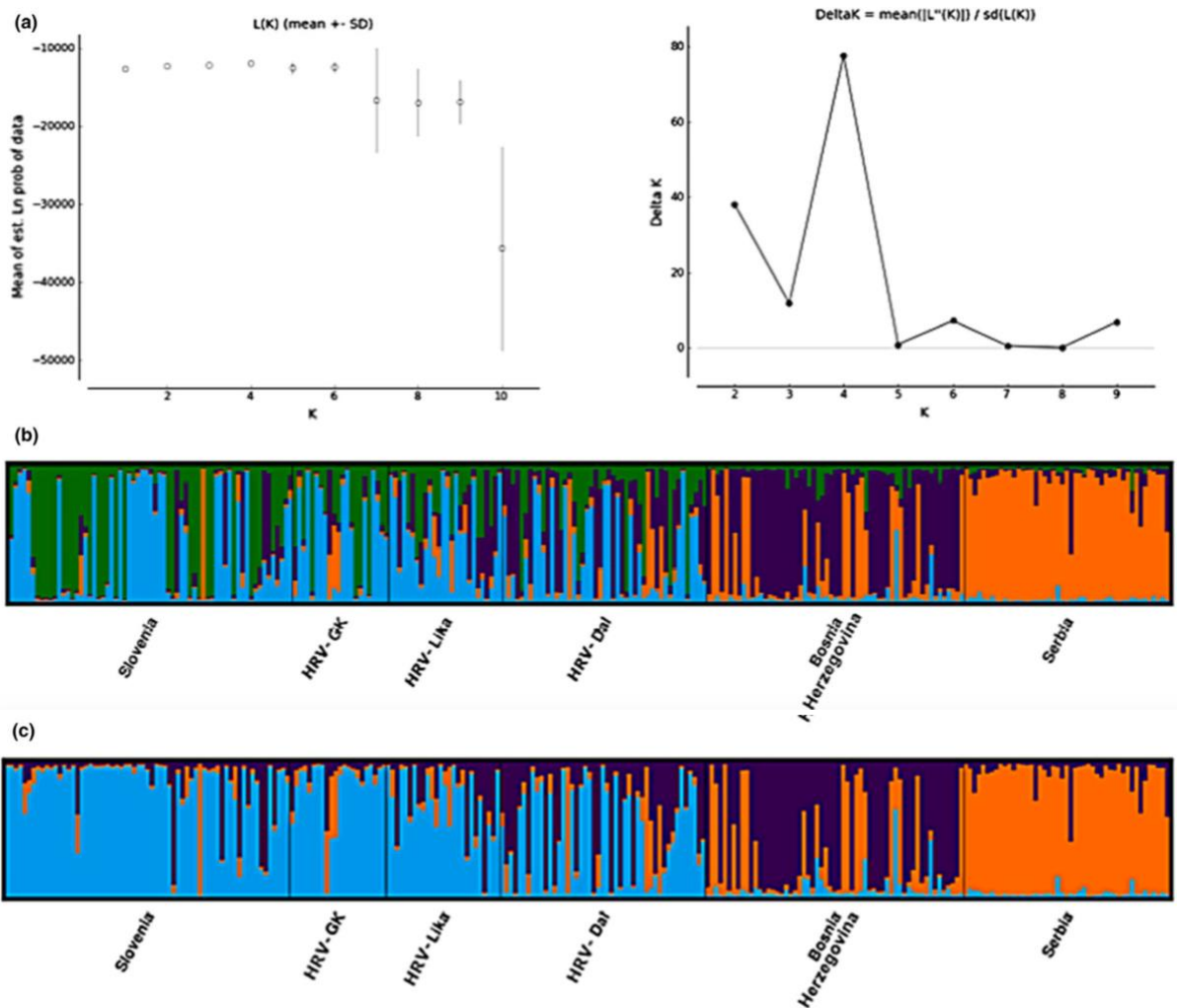


FIGURE 2 (a) Nombre le plus probable de clusters ($K = 4$) détectés pour les loups de Slovénie, Croatie, Bosnie-Herzégovine et Serbie dans STRUCTURE, sur la base des log-vraisemblances [$\ln \Pr(X | K)$] et de la méthode ΔK . (b) Diagramme à barres des analyses STRUCTURE montrant quatre clusters génétiques ($K = 4$). Chaque couleur correspond à un cluster ; chaque ligne représente un individu, montrant la probabilité d'assignation (page 0-1) par cluster. (c) Diagramme à barres des analyses STRUCTURE montrant trois groupes génétiques ($K = 3$)

3.2 Structure spatiale

Pour la sPCA, les tests ont indiqué une structure globale statistiquement significative ($p < .001$) et aucune structure locale ($p = .395$). Le tracé des valeurs propres et le scree plot de l'ACP ont indiqué deux ou peut-être trois composantes interprétables (Figure 4 Scree plot). Lorsqu'elle est cartographiée géographiquement, la première composante indique un **cline** ouest-est, suggérant une structure génétique clinique dans la zone d'étude (Figure 4C1). La deuxième composante (Figure 4C2), en revanche, suggère une structure spécifique en BIH-Dalmatie. La troisième composante n'a pas indiqué de structure clairement interprétable.

Les résultats d'une analyse d'autocorrélation spatiale dans GenAlEx (Annexe S1 : Figure S6) suggèrent également la présence d'une structure génétique dans la partie centrale de notre zone d'étude. Ces résultats ont été obtenus avec des classes de distance de 30 km, mais nous avons également effectué les analyses avec 50 et 100 km où nous avons obtenu des résultats similaires (non montré).

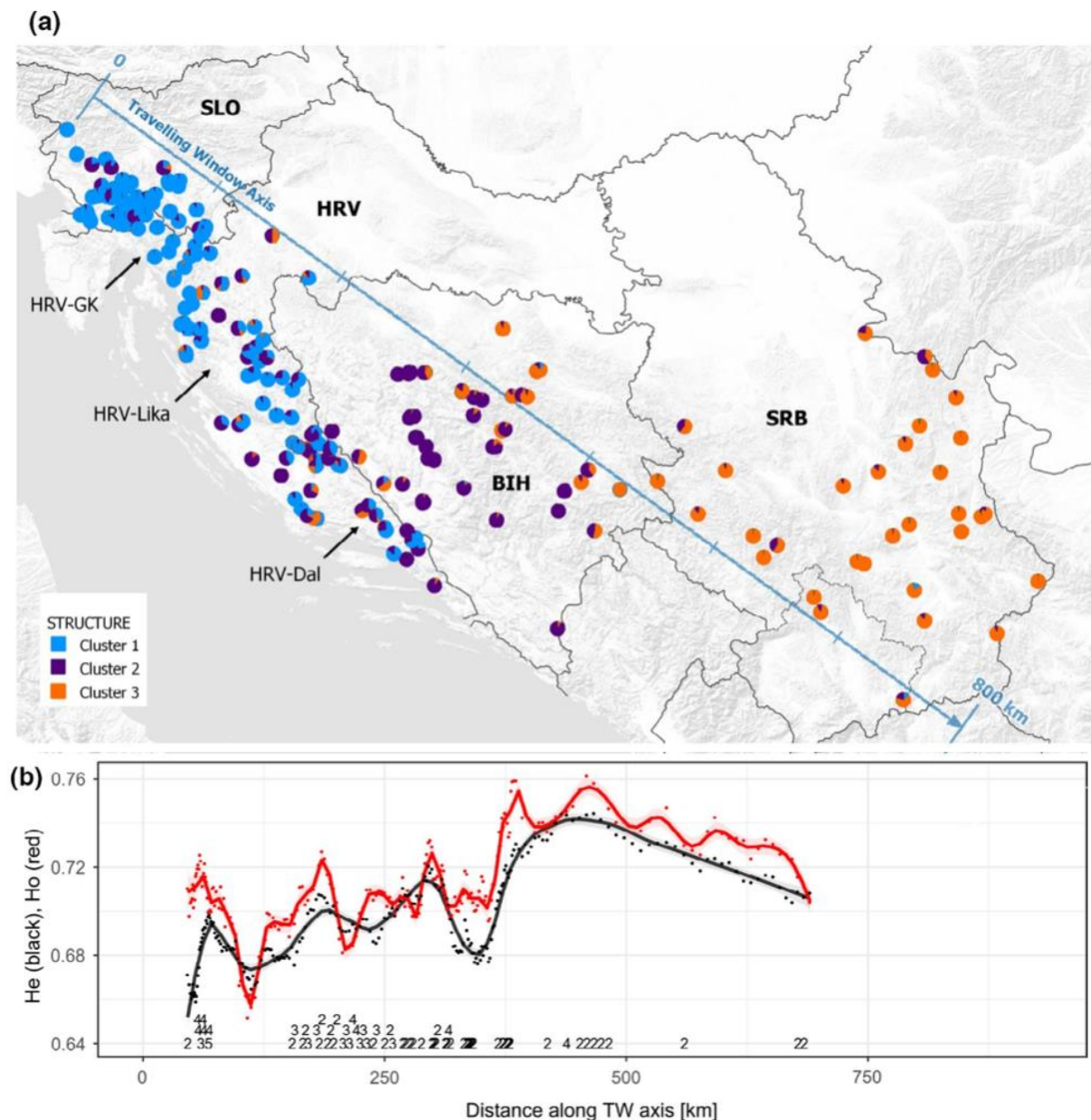


FIGURE 3 (a) La distribution géographique et le gradient ouest-est observé des clusters génétiques de loups ($K = 3$) basés sur les valeurs q individuelles dans STRUCTURE. Les couleurs du camembert indiquent l'appartenance individuelle à chaque groupe. Les abréviations utilisées sont BIH, Bosnie-Herzégovine ; HRV-Dal, Croatie-Dalmatie ; HRV-GK, Croatie-Gorski Kotar ; HRV-Lika, Croatie-Lika ; SLO, Slovénie ; SRB, Serbie. (b) Analyse HWDS. La distance coïncide avec la distance sur l'axe de la fenêtre mobile (TW) dans (a). Les valeurs en bas indiquent le nombre de loci s'écartant des attentes de Hardy-Weinberg à $p < 0,05$. Certaines des valeurs ont été supprimées là où les points sont très denses (en particulier entre 0 et 100 km) pour améliorer la lisibilité

3.3 | Variabilité génétique et flux génétique

Les analyses de la variabilité génétique du loup ont montré que tous les loci étaient polymorphes. Les valeurs moyennes les plus élevées pour le nombre d'allèles ($N_a = 8$), les hétérozygoties observées ($H_o = 0,74$) et attendues ($H_e = 0,75$) ont été détectées pour le cluster 2, correspondant généralement aux loups de BIH et de Dalmatie, tandis que le nombre moyen d'allèles ($N_a = 6$) et les valeurs d'hétérozygoties ($H_o = 0,69$, $H_e = 0,70$) les plus faibles ont été détectés dans le cluster 1, correspondant généralement aux loups de Slovénie, de Lika et de Gorski Kotar. Des loci s'écartant de HWE ont été trouvés dans le cluster 1 et le cluster 2 (Tableau 1). Aucun locus ne présentait de DL significatif après correction pour les tests multiples. Le plus grand nombre d'allèles privés a été détecté dans le cluster 3, correspondant généralement aux loups de Serbie (18 allèles

privés sur huit loci) ; dix allèles privés sur sept loci ont été détectés dans le cluster 2, et un allèle privé dans le cluster 1 (Annexe S1 : Figure S7).

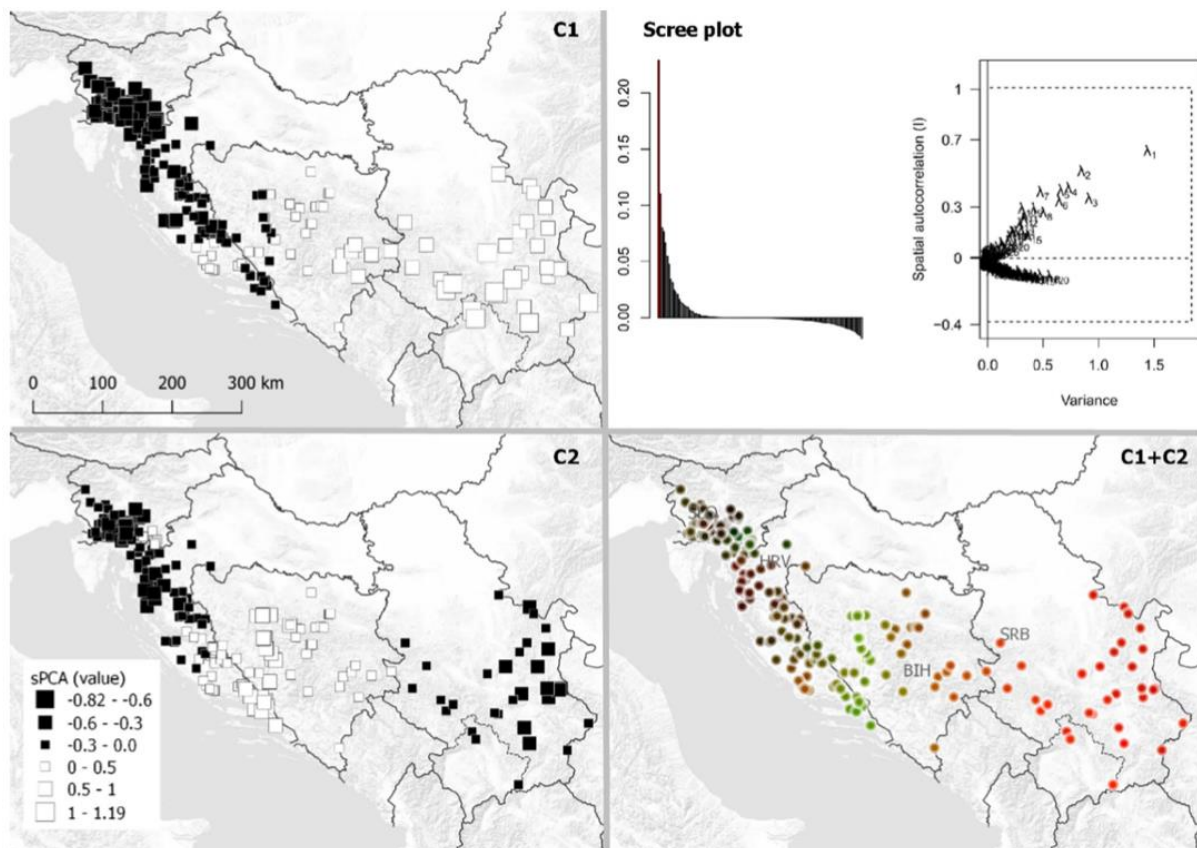


FIGURE 4 Analyse en composantes principales spatiales (ACPs) montrant la structure génétique de la population dans la zone d'étude. C1, C2 : Composantes globales sPCA 1 et 2, la taille et les couleurs des carrés indiquent les différences de valeur (entre individus) pour la composante respective ; C1 + C2 - diagramme de couleur des composantes 1 et 2 de l'ACPs, chacune étant associée à une couleur RVB (composante 1 = rouge, composante 2 = bleu). Scree plot : à gauche - diagramme en bâtons des valeurs propres ; à droite - composantes spatiales et de variance des valeurs propres. La variance moléculaire la plus élevée (91%) entre les individus (AMOVA, $p < 0,001$) et les valeurs F_{ST} par paires étaient statistiquement significatives (Annexe S1 : Tableau S1)

L'analyse HWDS a indiqué quelques écarts locaux par rapport à HWE dans certaines zones (Figure 3b) **et surtout une augmentation de l'hétérozygotie d'ouest en est**. Dans la plupart des cas d'écart détectable par rapport à HWE, l'hétérozygotie observée (H_o) était supérieure à l'hétérozygotie attendue (H_e). Cela indique que l'effet de « rupture d'isolat » (Wahlund, 1928), c'est-à-dire le fait que la progéniture d'immigrants de génération récente provoque un excès d'hétérozygotes ($H_o > H_e$) dans la population réceptrice (cluster), l'emporte sur l'impact de l'effet Wahlund ($H_e > H_o$). L'effet Wahlund (1928) apparaît lors de l'échantillonnage d'animaux provenant de différents clusters et/ou de l'échantillonnage d'immigrants directs dans les populations réceptrices (clusters).

L'analyse BAYESASS a montré un flux génétique plus élevé entre les populations voisines, par rapport à celles qui sont plus éloignées, avec un taux de migration considérablement plus élevé de BIH-HRV (Dalmatie) vers SLO-HRV (GK-Lika) que dans la direction opposée (Annexe S1 : Figure S8 ; Tableau 2).

3.4 | Taille effective de la population

Nous avons estimé la taille effective de la population pour chacun des clusters identifiés par STRUCTURE. Les résultats pour N_E étaient nettement inférieurs pour les loups du cluster 1

(Slovénie, Gorski kotar (HRV) et Lika (HRV). La taille effective estimée de la population était plus élevée dans les deux autres clusters (Dalmatie (HRV)-BIH et Serbie), et nous n'avons pas détecté de différences statistiquement significatives entre eux. L'intervalle de confiance pour la Serbie était relativement large, probablement en raison de la taille beaucoup plus petite de l'échantillon (Tableau 3).

TABLEAU 1 Paramètres de base de la variabilité génétique pour les loups assignés aux clusters génétiques consensuels de loups (K = 3)

	Cluster 1 (SLO, HRV-GK, HRV-Lika; N = 90)				Cluster 2 (BIH, HRV-Dal; N = 50)				Cluster 3 (SRB; N = 45)			
	N _a	H _o	H _e	HWE	N _a	H _o	H _e	HWE	N _a	H _o	H _e	HWE
AHT137	7	0.82	0.81	ns	10	0.81	0.80	ns	12	0.90	0.87	ns
AHTh171	5	0.70	0.70	ns	7	0.87	0.84	ns	8	0.82	0.80	ns
AHTh260	8	0.83	0.84	*	14	0.83	0.86	ns	8	0.85	0.86	ns
AHTk211	5	0.54	0.58	ns	5	0.74	0.68	ns	4	0.31	0.35	ns
AHTk253	5	0.73	0.76	ns	8	0.86	0.81	ns	7	0.77	0.73	ns
CXX279	7	0.76	0.76	ns	9	0.86	0.81	ns	7	0.70	0.71	ns
FH2054	7	0.65	0.57	ns	9	0.72	0.78	*	6	0.74	0.73	ns
FH2848	5	0.81	0.76	ns	5	0.68	0.72	ns	4	0.77	0.68	ns
INRA21	5	0.58	0.65	*	6	0.43	0.62	ns	5	0.68	0.67	ns
INU030	6	0.64	0.69	ns	6	0.69	0.67	ns	6	0.69	0.71	ns
INU005	5	0.61	0.73	*	6	0.59	0.62	ns	7	0.69	0.73	ns
REN162C04	5	0.59	0.53	ns	9	0.71	0.78	ns	5	0.60	0.56	ns
REN169D01	6	0.71	0.69	ns	8	0.68	0.74	*	8	0.81	0.81	ns
REN169O18	5	0.50	0.58	ns	7	0.81	0.79	ns	7	0.71	0.72	ns
REN247M23	7	0.90	0.84	ns	7	0.81	0.78	ns	8	0.79	0.80	ns
REN54P11	5	0.64	0.64	ns	7	0.76	0.71	ns	6	0.76	0.64	ns
Mean	6	0.69	0.70		8	0.74	0.75		7	0.73	0.71	
SD	1.05	0.12	0.10		2.24	0.12	0.07		1.95	0.13	0.13	

Note: N_a, number of alleles per locus; H_o, observed heterozygosity; H_e, expected heterozygosity; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium (ns, no statistically significant deviation from HWE; *p < .05—statistically significant deviation after sequential Bonferroni correction).

Abbreviations: BIH, Bosnia & Herzegovina; Dal, Dalmatia; GK, Gorski kotar; Lika, Lika; SLO, Slovenia; SRB, Serbia.

TABLEAU 2 Taux de migration estimés par BAYESASS

	Area	Migration to		
		SLO-HRV(GK-Lika)	BIH-HRV(Dal)	SRB
Migration from	SLO-HRV(GK-Lika)	0.9643 (0.0118)	0.0229 (0.0105)	0.0128 (0.0088)
	BIH-HRV(Dal)	0.1958 (0.0320)	0.7664 (0.0355)	0.0378 (0.0175)
	SRB	0.0133 (0.0123)	0.0538 (0.0280)	0.9329 (0.0298)

Note: Standard error of each estimate is noted in parentheses.

TABLEAU 3 Résultats de la taille effective de la population pour les clusters identifiés par STRUCTURE

Area	Sample size	N _e (CI)
SLO-HRV(Lika-GK)	112	43.3 (37.9–49.7)
BIH-HRV(Dal)	106	65.6 (57–76.3)
SRB	37	75.6 (53–123.4)

4 | DISCUSSION

Nous avons observé que les loups de la région Dinarico-Balkanique présentaient une **structure nord-ouest-sud-est**, ce qui correspond aux résultats précédents concernant les loups et d'autres **taxons dans cette région** (Djan et al., 2014 ; Glasnović et al., 2018 ; Šnjegota et al., 2018 ; Sotiropoulos et al., 2007 ; Ursenbacher et al., 2008 ; Veličković et al., 2015). Nous avons détecté la présence de **trois clusters génétiques** dans la population, qui, du nord-ouest au sud-est,

comprennent (1) la Slovénie et les régions de Gorski Kotar et de Lika en Croatie, (2) la région de Dalmatie dans le sud de la Croatie et de BIH, et (3) la Serbie. Les analyses de la variabilité génétique ont montré une variabilité génétique modérément élevée, bien que légèrement inférieure pour les loups de Slovénie et des régions de Gorski Kotar et Lika en Croatie. Nous avons également détecté un N_E sensiblement plus faible pour le cluster 1 (Slovénie et les régions de Gorski Kotar et Lika en Croatie) par rapport aux deux autres clusters.

4.1 Structure de la population, variabilité génétique et flux génétique

Les résultats de la structure de la population étaient très cohérents entre les méthodes que nous avons utilisées, ce qui fournit un degré supplémentaire de confiance dans nos résultats. Nous avons trouvé une sous-structure claire au sein de la Croatie, où les individus de Dalmatie ont montré une plus grande similarité génétique avec les loups de BIH, alors que les loups de Lika et Gorski Kotar ont montré une plus grande similarité avec ceux de Slovénie. Ceci est cohérent avec les résultats de Fabbri et al. (2014) qui ont détecté une substructure similaire chez les loups Croates, et des similitudes génétiques entre la Dalmatie et BIH. Les auteurs ont suggéré l'effet des variations climatiques et des conditions d'habitat de la Dalmatie, par rapport à la chaîne de montagnes Dinariques voisine de plus haute altitude, comme facteurs potentiels affectant la structure observée. L'influence du climat et de l'habitat sur la structure génétique des populations de loups a également été suggérée dans des études antérieures sur les loups (par exemple, Fabbri et al., 2014 ; Kusak et al., 2000). Fabbri et al. (2014) ont également détecté une sous-structure locale supplémentaire Lika-Gorski Kotar qui semble cohérente avec Frković et Huber (1993), qui ont noté des populations distinctes et de petite taille dans ces deux régions. Nos résultats ne soutiennent pas cette sous-structure locale supplémentaire, ce qui pourrait être dû aux différents panels de microsatellites et d'échantillons entre notre étude et celle de Fabbri et al. (2014), ou parce que la sous-structure Gorski Kotar-Lika s'est dissoute avec l'augmentation du nombre de loups et du flux génétique. Ce dernier scénario semble également soutenu par l'analyse de sous-échantillonnage dynamique de Hardy-Weinberg (Figure 1b), qui indique un effet prononcé de « rupture d'isolat » de l'excès hétérozygote qui peut être causé par l'échantillonnage de la progéniture d'immigrants dans le cluster récepteur, indiquant un mélange en cours des clusters.

La similarité que nous avons observée entre les loups de BIH et du sud de la Croatie est cohérente avec les résultats de Djan et al. (2014). Ils ont détecté une nette divergence nord-ouest-sud-est dans les haplotypes d'ADNmt entre les loups de Croatie et de BIH (leur sous-population « occidentale ») et ceux de Serbie et de Macédoine du Nord (sous-population « orientale »), ce qui a été confirmé par la suite avec le même marqueur moléculaire, un échantillon plus important et une zone d'étude plus large (Šnjegota, 2019, D. Šnjegota, M. Arakelyan, T. Borowik, D. Ćirović, G. Danila, M. Djan, A. Ghazaryan, Z. Gurielidze, T. Hayrapetyan, Z. Hegyeli, A. Karamanlidis, N. Kopaliani, M. Niedzialkowska, K. Plis, D. Politov, A. Vik Stronen, M. Talala, E. Tsingarska, B. Jędrzejewska, données non publiées). La structure que nous avons observée entre BIH et la Serbie est également cohérente avec des résultats microsatellites antérieurs (Šnjegota, 2019), tout comme le regroupement des loups Croates et Slovènes, et leur différenciation des loups de la région des Balkans au sud (Grèce) et à l'est (Bulgarie) (Montana et al., 2017). Des résultats similaires ont été rapportés par des analyses pangénomiques de marqueurs SNP (Stronen et al., 2013). Le gradient nord-ouest-sud-est observé semble donc être supporté à travers de multiples études avec trois types de marqueurs génétiques différents.

Les valeurs de F_{ST} statistiquement significatives détectées entre les clusters de loups, ainsi que le grand nombre d'allèles privés trouvés pour les clusters de BIH/HRV-Dal et de Serbie, soutiennent davantage la structuration observée des loups dans cette région. Cependant, l'examen de profils plus récents de notre zone d'étude a indiqué que le nombre élevé **d'allèles privés** trouvés pour le cluster de loups Serbes au locus AHTh260 était dû au hasard, car les données de suivi ultérieures montrent au moins deux de ces six allèles dans la population Dinarique (Slovénie, Gorski Kotar et Lika) (T. Skrbinšek, données non publiées). Nous avons trouvé la variabilité génétique la plus faible dans le cluster 1 (Slovénie, Gorski Kotar et Lika), en accord avec les résultats de Fabbri et al. (2014). **Ce résultat, combiné au faible N_E détecté pour le cluster 1, pourrait indiquer que les loups du nord-ouest des montagnes Dinariques ont traversé un fort goulot d'étranglement.** De plus, étant à la limite de la population, ce cluster peut avoir reçu moins de flux génétique d'autres (sous) clusters de population dans le passé, bien que les résultats du flux génétique indiquent qu'il reçoit maintenant un flux génétique considérable du cluster 2, ce qui est également soutenu par l'excès d'hétérozygotes indiqué dans la zone du cluster 1 par l'analyse HWDS.

Comme on pouvait s'y attendre, l'analyse des flux génétiques indique que les flux génétiques sont plus importants entre les zones voisines qu'entre les zones plus éloignées. Le taux de migration considérablement plus élevé de BIH-HRV (Dalmatie) vers SLO-HRV (GK-Lika) que dans la direction opposée est également intéressant, bien que nous trouvions ces résultats difficiles à interpréter avec les données actuelles. Les résultats de l'autocorrélation spatiale semblent cohérents avec les résultats de STRUCTURE (Figure 3) et de sPCA (Figure 4) en montrant une structure génétique à travers notre zone d'étude, où nous nous attendrions à une autocorrélation spatiale positive à des distances plus courtes en raison des groupes familiaux territoriaux, suivie de valeurs négatives expliquées par la structure génétique de la population.

4.2 Taille effective de la population

La taille effective de la population est l'un des paramètres les plus informatifs pour la conservation car elle décrit à la fois la sensibilité d'une population à la stochasticité génétique et son potentiel évolutif (Waples, 2002). Cependant, ce paramètre est souvent difficile à évaluer et les résultats doivent être interprétés avec précaution. La méthode du déséquilibre de liaison (DL) que nous avons utilisée suppose des générations discrètes et l'absence de structure de population. Bien que nous nous soyons probablement rapprochés de la deuxième hypothèse en estimant N_e séparément pour chaque groupe de population détecté, l'hypothèse de générations discrètes est clairement violée. Tous les animaux, à l'exception de six individus de Lika (HRV), ont été échantillonnés sur une période de 8 ans, ce qui signifie qu'ils devraient inclure entre 1,7 et 1,9 générations d'animaux en supposant un temps de génération de 4,3 à 4,7 ans chez les loups (Mech et al., 2016). Waples et Do (2010) discutent d'une conjecture raisonnable selon laquelle si le nombre de cohortes représentées dans un échantillon est approximativement égal à la durée de la génération, l'estimation du LD N_E devrait correspondre grossièrement à l' N_E d'une génération, ce qui a ensuite été soutenu par Robinson et Moyer (2013). Waples et al. (2014) ont également montré que les échantillons d'adultes d'âge mixte produisent des estimations de N_E pour une génération ; cependant, nos échantillons comprennent une période plus longue, ce qui signifie que plus d'une cohorte de parents peut avoir été incluse. En raison de la dérive génétique, cela provoque une structure génétique temporelle dans les échantillons et un effet Wahlund à deux locus (mélange de LD), ce qui entraîne un biais vers le bas des estimations de LD de N_E (Waples et al., 2014). Cela signifie que la plupart de nos estimations pourraient être faussées, mais étant donné que la période

de temps pour la plupart des échantillons est inférieure à deux générations, le biais réel est probablement très faible.

Les tailles de population effectives estimées pour les différents groupes sont faibles, juste autour du critère $N_E > 50$ qui est considéré comme permettant à une population d'éviter la consanguinité, mais toujours bien en dessous du seuil minimum de $N_E > 500$ qui a été suggéré pour maintenir la diversité génétique d'une population (Allendorf & Luikart, 2009). La N_E est plus faible pour les loups de Slovénie, de Gorski Kotar et de Lika, tout comme l'hétérozygotie et la diversité allélique. Alors que les données historiques montrent que la population de loups de cette région a été sévèrement réduite dans le passé, sa situation à la limite de la plus grande population Dinarique-Balkanique limite les flux de gènes provenant d'autres populations, ce qui maintient les estimations des paramètres de diversité génétique et de la N_E à un niveau plus bas, même si la population de loups se rétablit. La durabilité à long terme de cette population est vitale d'un point de vue régional et transfrontalier et nécessite une meilleure délimitation des unités de gestion de la conservation.

Malgré un flux génétique accru entre les loups Dinariques et Italiens (Ražen et al., 2016), ces derniers ont connu un isolement à long terme et ont montré une diversité génétique comparativement plus faible que les loups de la région Dinarico-Balkanique (Stronen et al., 2013). La réduction de la variabilité génétique peut affecter la capacité d'adaptation, en particulier lorsque l' N_E est faible, augmentant ainsi la vulnérabilité des populations. Alors que la consanguinité a été associée à des déformations osseuses congénitales dans des populations de loups très petites et isolées en Scandinavie et sur l'île Royale aux États-Unis (Räikkönen et al., 2006, 2009), le flux génétique semble avoir fourni une mesure de sauvetage génétique (Scandinavie ; Åkesson et al., 2016), au moins temporairement dans le cas de l'île Royale (Hedrick et al., 2014). Étant donné que nous n'avons pas observé la substructuration entre les loups de Gorski Kotar et de Lika détectée par Fabbri et al. (2014), nos résultats semblent soutenir une augmentation du flux génétique dans la partie nord de notre zone d'étude.

4.3 Perspective de conservation

La population de loups Dinarique-Balkanique est une source précieuse de diversité génétique pour les populations voisines (Fabbri et al., 2014 ; Ražen et al., 2016) et montre un niveau considérable de flux génétique entre le Caucase et les Balkans via des populations intermédiaires (Pilot et al., 2014). En outre, cette population est la plus transnationale d'Europe, traversant le plus grand nombre de frontières nationales et, par conséquent, une variété d'approches nationales de surveillance et de gestion (Kaczensky et al., 2013).

Les résultats de l'analyse de sous-échantillonnage dynamique de Hardy-Weinberg ont montré un flux génétique considérable de loups de la Bosnie-Herzégovine vers la Croatie et la Slovénie et un flux génétique réduit, mais notable, vers la Serbie, indiquant une (re)connexion possible de ces populations. Les résultats indiquent également un flux génétique entre les clusters détectés, et BIH pourrait représenter une **zone de mélange** entre les loups des clusters 1 et 3. Des analyses récentes des loups en Croatie ont détecté des hybrides loup-chien en Dalmatie, et de possibles rétrocroisements dans la population de loups (Kusak et al., 2018) et nous ne pouvons pas exclure la possibilité que l'hybridation et l'introgession aient pu affecter nos résultats. Cependant, au-delà de l'analyse initiale visant à détecter et à supprimer les profils hybrides visibles, des analyses futures avec un plus grand nombre de marqueurs microsatellites ou SNP seront nécessaires pour résoudre cette question, qui touche plusieurs populations de loups Européennes (Salvatori et al., 2020).

Néanmoins, les résultats antérieurs des pro-fichiers ADNmt (Djan et al., 2014) et SNP à l'échelle du génome (Stronen et al., 2013) ont trouvé une sous-structure dans la population de loups Dinaric-Balkan peu susceptible d'être expliquée par l'hybridation loup-chien, et les profils SNP des loups ont été initialement évalués avec les génotypes des chiens pour détecter d'éventuels hybrides (Stronen et al., 2013). Par conséquent, la divergence ouest-est cohérente observée dans les analyses d'ADNmt, des SNP et des microsatellites soutient la présence d'au moins deux groupes de populations de loups dans la région Dinarique-Balkanique.

Nos résultats peuvent refléter la tendance générale à la récupération des grands carnivores en Europe (Chapron et al., 2014). Cette augmentation des effectifs peut cependant potentiellement entraîner des conflits entre les loups et les humains, conduisant à une chasse excessive. Il a été démontré que cela fait partie des facteurs les plus importants affectant les populations de loups au sein de l'Europe (Hindrikson et al., 2017). Le conflit entre l'homme et le loup est particulièrement important dans les pays qui n'ont pas de législation nationale sur les loups, comme BIH, où la sous-structure observée dans la population de loups (Šnjegota, 2019 ; Šnjegota et al., 2018) pourrait être le résultat de la chasse excessive. Notre étude a montré que les loups de BIH se **croisent** avec ceux de Dalmatie et peuvent se déplacer vers le nord jusqu'en Slovénie, où ils pourraient contribuer au maintien de la variabilité génétique.

Notre étude ajoute un soutien supplémentaire à la structure de population ouest-est des loups Dinarico-balkaniques, comme cela a été précédemment observé pour divers taxons à travers les Balkans (par exemple, Djan et al., 2014 ; Glasnović et al., 2018 ; Šnjegota et al., 2018 ; Sotiropoulos et al., 2007 ; Ursenbacher et al., 2008 ; Veličković et al., 2015). De nombreux facteurs peuvent contribuer à la structure observée, et l'histoire démographique, le type de paysage, la sélection des proies, l'hybridation loup-chien, les facteurs environnementaux et écologiques ont tous été rapportés comme influençant la structure de la population de loups en Europe, en Amérique du Nord et en Asie (par ex, Czarnomska et al., 2013 ; Djan et al., 2014 ; Jędrzejewski et al., 2012 ; Koblmüller et al., 2016 ; Kusak et al., 2000 ; Muñoz-Fuentes et al., 2009 ; Octenjak et al., 2020 ; Pilot et al., 2006, 2012 ; Schweizer et al., 2016 ; Stronen et al., 2015 ; Werhahn et al., 2018 ; vonHoldt et al., 2010). En outre, des résultats récents concernant les loups indiquent que la variation génétique fonctionnelle peut être liée à des facteurs environnementaux importants tels que la température, les précipitations (Schweizer et al., 2016) et l'altitude (Werhahn et al., 2018). Les futures analyses génomiques pourraient donc aider à résoudre la structure de population ouest-est observée et sont pour les loups et d'autres taxons dans la région Dinaric-Balkan à identifier des sites focaux pour la conservation de l'habitat dans cette région à la biodiversité très riche.