

Phylogéographie de l'ADN mitochondrial et histoire de la population du loup gris *Canis lupus*

Molecular Ecology (1999) 8, 2089–2103

Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*

C. VILÀ,*† I. R. AMORIM,†‡ J. A. LEONARD,† D. POSADA,§ J. CASTROVIEJO,¶
F. PETRUCCI-FONSECA,‡ K. A. CRANDALL,§ H. ELLEGREN* and R. K. WAYNE†

*Department of Evolutionary Biology, Uppsala University, Norbyvägen 18D, S-752 36 Uppsala, Sweden, †Department of Organismic Biology, Ecology and Evolution, University of California, 621 Charles E. Young Drive, Los Angeles, CA 90095-1606, USA, ‡Departamento de Zoologia e Antropologia/Centro de Biologia Ambiental, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Ed. C2, Campo Grande 1749-016 Lisboa, Portugal, §Department of Zoology and M. L. Bean Museum, Brigham Young University, Provo, UT 84602, USA, ¶Estación Biológica de Doñana, C.S.I.C., Apdo. 1056, 41080 Sevilla, Spain

Résumé

Le loup gris (*Canis lupus*) et le coyote (*C. latrans*) sont des carnivores très mobiles qui se dispersent sur de grandes distances à la recherche de territoires et de partenaires. Des études génétiques antérieures ont montré une faible structure géographique chez ces deux espèces. Cependant, la structure génétique des populations est également influencée par les événements d'isolement passés et les fluctuations de population pendant les périodes glaciaires. Dans cette étude, les données de séquence de la région de contrôle d'un **échantillon mondial** de loups gris et d'un échantillon plus limité de coyotes ont été analysées. Les résultats suggèrent que la fluctuation de la taille des populations au cours du Pléistocène tardif a laissé une **signature** génétique sur les niveaux de variation chez les deux espèces. **Les mesures généalogiques de la diversité nucléotidique suggèrent que les tailles historiques des populations étaient beaucoup plus importantes chez les deux espèces et que les loups gris étaient plus nombreux que les coyotes.** Actuellement, il existe environ 300 000 loups et 7 millions de coyotes. Chez les loups gris, la diversité génétique est plus grande que celle prédite par la taille de la population recensée, ce qui reflète les **récents déclin**s historiques de la population. En revanche, la diversité des nucléotides chez les coyotes est inférieure à celle prévue par la taille de la population recensée, ce qui reflète une **expansion récente** de la population après la disparition des loups de la majeure partie de l'Amérique du Nord. Les deux espèces montrent peu de partitionnement des haplotypes à l'échelle continentale ou régionale. Cependant, une analyse statistique de parcimonie indique une structure génétique locale qui suggère un **flux génétique restreint récent**.

INTRODUCTION

Les ancêtres immédiats du loup gris (*Canis lupus*) et du coyote (*C. latrans*) étaient respectivement l'espèce Eurasiennne du Pléistocène tardif *C. etruscus* et la forme nord-américaine du Pléistocène précoce *C. lepophagus* (Nowak 1979). Les loups gris étaient autrefois largement répandus en Europe, en Asie et en Amérique du Nord, et occupaient une grande variété d'habitats, notamment le désert sec d'Arabie, les zones arbustives xériques de la Méditerranée, les forêts de conifères de Sibérie et la toundra gelée de l'île d'Ellesmere (Mech 1970). Cependant, au cours des derniers siècles, le loup a disparu de la plupart de son ancienne aire de répartition (Young & Goldman 1944). Les

populations survivantes sont souvent isolées géographiquement et génétiquement les unes des autres (Ginsberg & Macdonald 1990 ; Wayne et al. 1992).

La répartition historique du coyote était limitée aux plaines et aux déserts du centre de l'Amérique du Nord (Gier 1975 ; Bekoff & Wells 1986). Avec la disparition des loups et la modification des paysages qui a suivi l'expansion vers l'ouest des pionniers, l'aire géographique des coyotes s'est étendue à l'ensemble des États-Unis et à la majeure partie du sud et du nord-ouest du Canada (Macdonald 1984). Ces événements démographiques récents ont laissé leur signature sur la structure génétique des deux espèces. Les haplotypes de l'ADN mitochondrial (ADNmt) du coyote ne sont pas structurés géographiquement et les coyotes se croisent avec les loups dans des endroits où la population de loups a dramatiquement diminué (Lehman & Wayne 1991 ; Wayne & Jenks 1991 ; Roy et al. 1994). Les loups d'Amérique du Nord ont une distribution plutôt continue à travers le Canada et l'Alaska et, comme pour les coyotes, aucune structure phylogéographique bien définie n'est observée (Roy et al. 1994). Cependant, en Europe et peut-être en Asie, les populations de loups sont génétiquement isolées et ont une variabilité génétique réduite, probablement en raison de goulots d'étranglement récents (Wayne et al. 1992 ; Randi et al. 1995 ; Ellegren et al. 1996).

Dans cette étude, la variabilité génétique et les relations des loups gris à travers le monde, basées sur les séquences de la région de contrôle, ont été évaluées. La variabilité génétique des loups a été comparée à celle des coyotes, ce qui a permis de mieux comprendre l'origine des deux espèces et leur diversification au pléistocène. Enfin, les informations génétiques sur les loups ont été intégrées pour identifier les populations présentant de faibles niveaux de variation génétique et pour définir des unités d'évolution et de gestion pour la conservation (Moritz 1994).

MATERIEL ET METHODES

Échantillons

Les séquences de la région de contrôle de 167 et 59 loups gris ont été obtenues à partir d'une étude précédente sur l'origine de la variabilité génétique chez les chiens (Vilà et al. 1997) et d'études de population de loups gris (Ellegren et al. 1996 ; Taberlet et al. 1996 ; Tsuda et al. 1997 ; Pilgrim et al. 1998), respectivement. De nouvelles séquences ont été obtenues à partir d'échantillons de sang et de tissus de 33 autres loups sauvages et captifs (Tableau 1). Les loups provenant de zones où l'hybridation loup-coyote est connue (Lehman et al. 1991) et qui se sont révélés porteurs de séquences d'ADNmt de type coyote, ont été exclus de l'analyse. Dans l'étude de Ellegren et al. (1996), seuls les loups Scandinaves sauvages et les fondateurs sauvages de la population captive ont été considérés. Au total, les séquences d'ADNmt de 259 loups provenant de 30 localités du monde entier ont été analysées (Tableau 1). La fréquence des parents proches dans l'échantillon est probablement faible car les échantillons ont été collectés de manière opportuniste pendant de nombreuses années et sur une large zone dans chaque localité.

Des échantillons de tissus de 12 coyotes provenant de différentes localités d'Amérique du Nord ont été analysés (Californie, $n = 4$; Floride, $n = 1$; Louisiane, $n = 1$; Manitoba, $n = 1$; Michigan, $n = 1$; Texas, $n = 2$; Utah, $n = 1$; et Washington, $n = 1$). Des séquences provenant de fèces de canidés Mexicains ($n = 2$) et du Minnesota ($n = 1$) et d'un loup rouge Texan (*Canis rufus*), dont les séquences ont été classées avec celles des coyotes, ont également été incluses. Enfin, les séquences publiées de deux coyotes du Montana (Pilgrim et al. 1998) ont été incluses. Un loup Ethiopien (*C.*

simensis), un chacal doré (*C. aureus*) et un chacal à dos noir (*C. mesomelas*) ont été séquencés pour être utilisés comme hors-groupe dans l'analyse phylogénétique.

Extraction et amplification de l'ADN...

Séquençage de l'ADN...

Mise en relation des séquences de la région de contrôle de l'ADNmt...

Modèles régionaux de subdivision géographique, flux génétique et taille effective des populations...

Tableau 1 Distribution des haplotypes de loups à chaque endroit échantillonné. Le nombre d'échantillons, les différents haplotypes et les haplotypes uniques sont indiqués pour chaque colonne (population)

Haplotype	Portugal	Spain	France	Italy	Romania	Bulg.	Croatia	Yugos.	Greece	Poland	Sweden	Finland	Estonia	Russia	Turkey	Israel	S.Arabia	Iran	Afghan.	India	China	Mongol.	Alaska	Yukon	NWT	Alb.	Mont.	Minn.	Labra.	Mexico
lu-1	18	56																												
lu-2		1																												
lu-3	1						5		1		1				1*	2														
lu-4		27								1†																				
lu-5			7†	12+9†																										
lu-6					2+1†	1			1																					
lu-7											1*				1															
lu-8							1																							
lu-9								1																						
lu-10																														
lu-11																														
lu-12																														
lu-13											1+14*	2	1+1*	1																
lu-14																														
lu-15																16														
lu-16																														
lu-17																														
lu-18																														
lu-19																														
lu-20																														
lu-21																														
lu-22																														
lu-23																														
lu-24																														
lu-25																														
lu-26																														
lu-28																														
lu-29																														
lu-30																														
lu-31																														
lu-32																														
lu-33																														
n	19	84	7	21	4	2	6	7	7	1	18	2	2	4	2	16	7													
Different haplotypes	2	3	1	1	2	0	2	2	4	1	4	1	1	4	1	1	5	2	2	1	3	4	1	3	1	1	1	1	1	1
Uniques	0	1	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	0	2	3	0	3	0	0	0	0	0	1

*Sequences from Ellegren et al. (1996); †sequences from Taberlet et al. (1996); ‡sequences from Tsuda et al. (1997); §sequences from Pilgrim et al. (1998). Bulg., Bulgaria; Yugos., Yugoslavia; S. Arabia, Saudi Arabia; Afghan., Afghanistan; Mongol., Mongolia; NWT, Northwest Territories (Canada); Alb., Alberta (Canada); Mont., Montana (USA); Minn., Minnesota (USA); Labra., Labrador (Canada).

RESULTATS

Divergence des séquences chez les coyotes et les loups

La diversité des haplotypes était beaucoup plus importante chez les coyotes que chez les loups. Trente-quatre haplotypes d'ADNmt différents ont été trouvés chez 259 loups et 15 chez 17 coyotes. Les séquences de loups différaient par une à 12 substitutions et présentaient des **indels** à deux positions. Les séquences de coyotes différaient par une à 14 substitutions et présentaient des **indels** sur sept positions. La diversité nucléotidique (π ou θ_T) entre les haplotypes chez les loups, 0,026 (SD = 0,014), était significativement inférieure à la valeur de 0,046 (SD = 0,025) chez les coyotes (test *t* de Student, $P < 0,05$). En revanche, les estimations du maximum de vraisemblance de θ_T étaient considérablement plus grandes chez les deux espèces, et la valeur de 0,744 (SD = 0,133) chez les loups était significativement plus grande que la valeur de 0,373 (SD = 0,103) chez les coyotes (test *t* de Student, $P < 0,05$).

La divergence moyenne des séquences au sein de l'espèce, corrigée pour les occurrences multiples en utilisant le modèle de mutation HKY ($\alpha = 0,317$), et avec un rapport transition/transversion de 15,47, était de 2,9% (erreur standard (SE) = 0,05, plage : 0 - 7,4 %) et 4,2% (SE = 0,20, fourchette : 0,5 - 8,3%) pour les loups et les coyotes, respectivement. Ces estimations de divergence étaient significativement différentes (test *t* de Student, $P < 0,001$). La divergence moyenne des séquences entre les loups et les coyotes était de 13,1% (SE = 0,09, plage : 8,0 - 19,2%).

La plus grande divergence entre les séquences de coyotes par rapport à celles des loups gris est également indiquée par la plus grande longueur des branches terminales des coyotes dans un arbre de voisinage (Fig. 1). Dans les comparaisons par paires des longueurs de branche du loup et du coyote en utilisant trois espèces hors groupe (loup Ethiopien, chacal doré et chacal à dos noir), nous n'avons pas trouvé de preuve de variation du taux de substitution entre les espèces (test de Tajima (1993), $P > 0,05$). Par conséquent, ces résultats suggèrent que les séquences de la région de contrôle mitochondriale du coyote ont divergé à une époque plus ancienne que les séquences du loup gris.

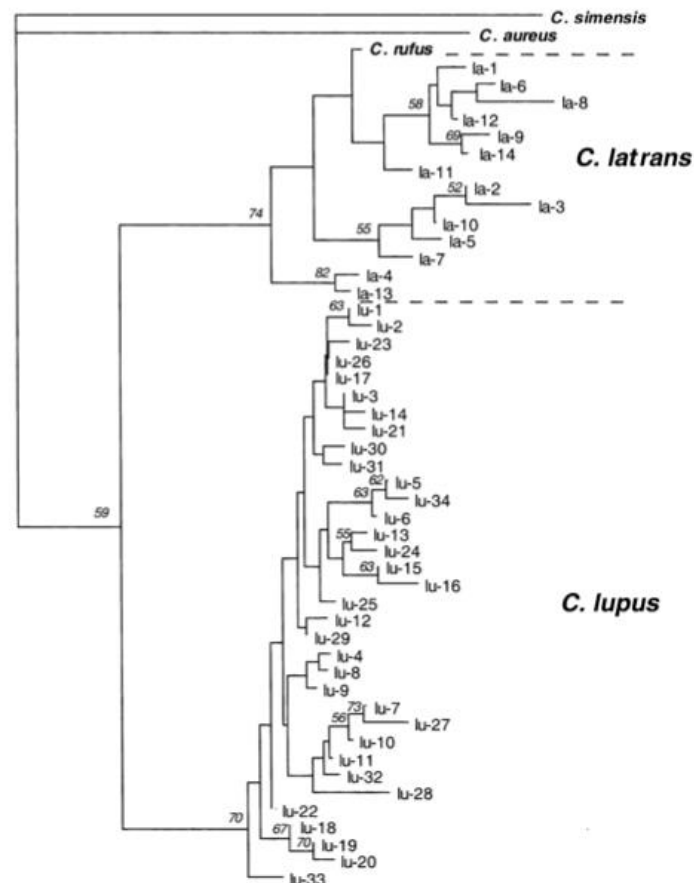


Fig. 1 Arbre de voisinage basé sur le modèle HKY de divergence des séquences avec un paramètre de forme gamma de $\alpha=0,317$ et un rapport transition/transversion de 15,47. Le support bootstrap est indiqué aux nœuds s'il est trouvé dans plus de 50% des 1000 arbres bootstrap

La distribution du nombre de substitutions par paires entre les haplotypes diffère également entre les deux espèces (Fig. 2). Les loups présentent une distribution fortement unimodale avec une valeur modale de cinq (moyenne : 5,27, SE = 0,09). En revanche, chez les coyotes, un mode distinct n'était pas apparent, la distribution était irrégulière et les valeurs comprises entre quatre et 11 substitutions étaient tout aussi courantes. Le nombre moyen de différences par paires chez les coyotes, 7,35 (SE = 0,31), était significativement plus élevé que chez les loups (test U de Mann-Whitney, $P < 0,001$). Bien que la distribution de l'inadéquation chez les loups ne montrait pas d'aplatissement significatif ($g_2 = -0,196$; test t de Student, $P > 0,05$; Sokal & Rohlf 1981), la distribution était significativement platykurtique pour les coyotes, elle était plus agglomérée, plus large et les valeurs modales n'étaient pas bien définies ($g_2 = -0,930$; test t de Student, $P < 0,05$). La distribution des distances par paires entre les loups et les coyotes était clairement unimodale, avec des valeurs modales de 19 et 20 substitutions (moyenne : 18,79, SE = 0,10 ; Fig. 2c).

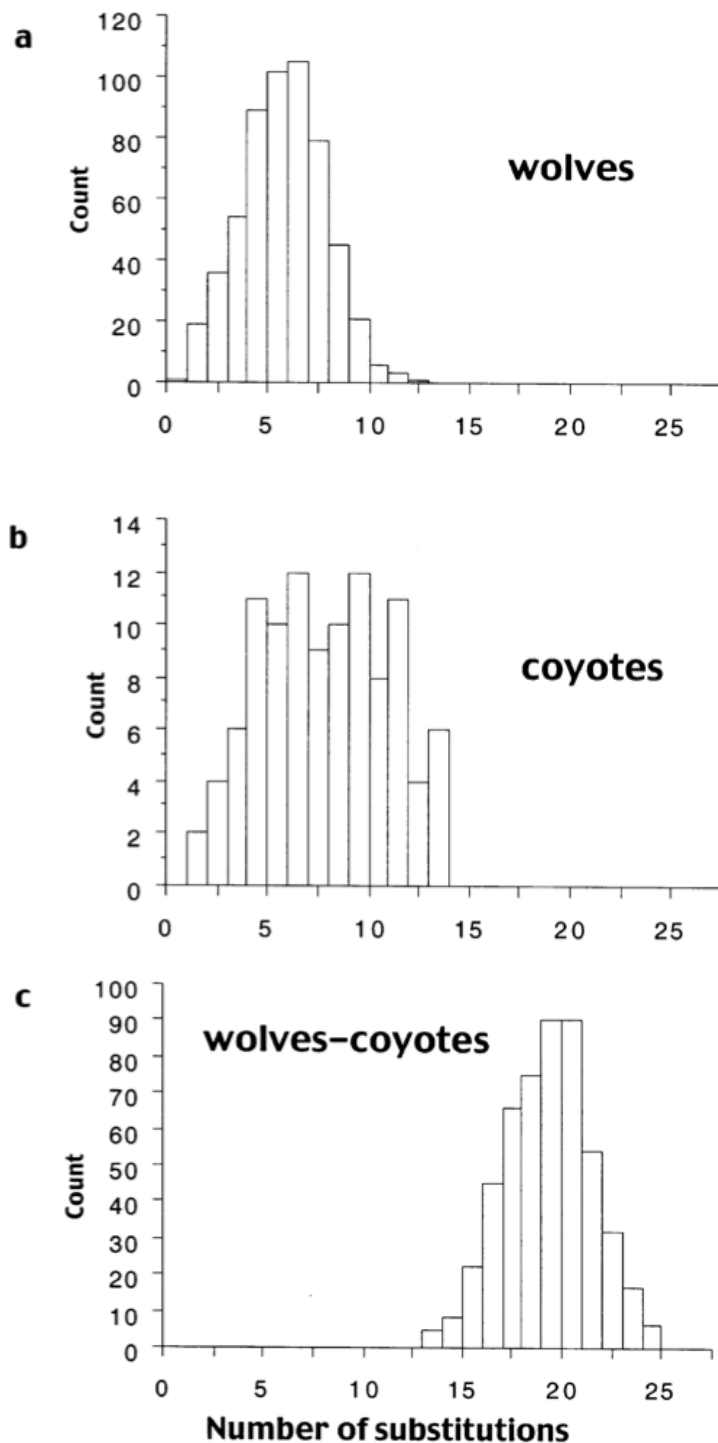


Fig. 2 Distribution des distances par paires (mesurées en nombre de substitutions) (a) entre les haplotypes de loup, (b) entre les haplotypes de coyote, (c) entre les haplotypes de loup et de coyote. Une région d'alignement difficile entre les espèces a été exclue de toutes les comparaisons (voir Matériaux et méthodes)

Phylogéographie

Les séquences de la région de contrôle des loups étaient souvent limitées à une seule localité ou partagées seulement entre des localités voisines (Tableau 1, par exemple lu-1, lu-2, lu-5, lu-6). **Cependant, quelques haplotypes avaient une distribution beaucoup plus large.** L'exemple extrême est **lu-3**, qui a été trouvé chez des loups du Portugal, de Croatie, de Grèce, de Suède, de Russie Européenne et de Turquie. L'haplotype **lu-8** a été trouvé en Bulgarie et en Arabie Saoudite ; et **lu-32** a été trouvé dans les Territoires du Nord-Ouest, en Alberta, au Montana et au Labrador. Chez

les coyotes, seuls trois haplotypes ont été trouvés chez plus d'un individu, et dans chaque cas, les individus avec des haplotypes identiques provenaient de la même localité.

Seulement 16 sites informatifs de parcimonie ont été trouvés pour les loups et pour les coyotes. Le petit nombre de sites informatifs de parcimonie, ainsi que le nombre élevé d'haplotypes (34 pour les loups et 15 pour les coyotes) ont empêché la résolution complète des relations phylogénétiques en utilisant les méthodes de maximum de vraisemblance et de parcimonie. La technique de parcimonie statistique, qui est plus puissante lorsque les séquences diffèrent dans quelques sites (Crandall & Templeton 1996), a été utilisée pour comprendre les relations entre les génotypes et leur correspondance avec la distribution géographique (Fig. 3 ; Crandall & Templeton 1993).

En général, les haplotypes de l'**Ancien Monde** provenant de régions géographiquement voisines étaient liés par une ou deux substitutions dans le réseau de parcimonie statistique (par exemple, lu-1 et lu-2 de la péninsule Ibérique ; lu-5, lu-6 et lu-34 de France, d'Italie, de Roumanie, de Bulgarie, de Yougoslavie et de Grèce) (Fig. 3). **Cependant, dans l'ensemble, la distribution des haplotypes ne présente pas de schéma géographique clair.** Les séquences provenant de loups d'Amérique du Nord se sont regroupées en trois groupes. L'un contenait les trois haplotypes trouvés au Yukon, qui étaient caractérisés par une insertion unique. Un autre groupe contenait les haplotypes les plus largement distribués, lu-28 et lu-32. Enfin, l'haplotype trouvé uniquement chez les loups Mexicains (lu-33) définissait une lignée distincte, différant d'au moins cinq substitutions et d'un indel des autres séquences de loups gris nord-Américains. **Les populations nord-Américaines semblent présenter une plus grande continuité et moins de subdivisions que leurs homologues de l'Ancien Monde.** La même séquence (lu-32) a été trouvée dans une large gamme géographique, et lu-28 a été trouvé à la fois en Alaska et au Minnesota. Cependant, les séquences du Yukon formaient un groupe distinct (lu-29, lu-30, lu-31).

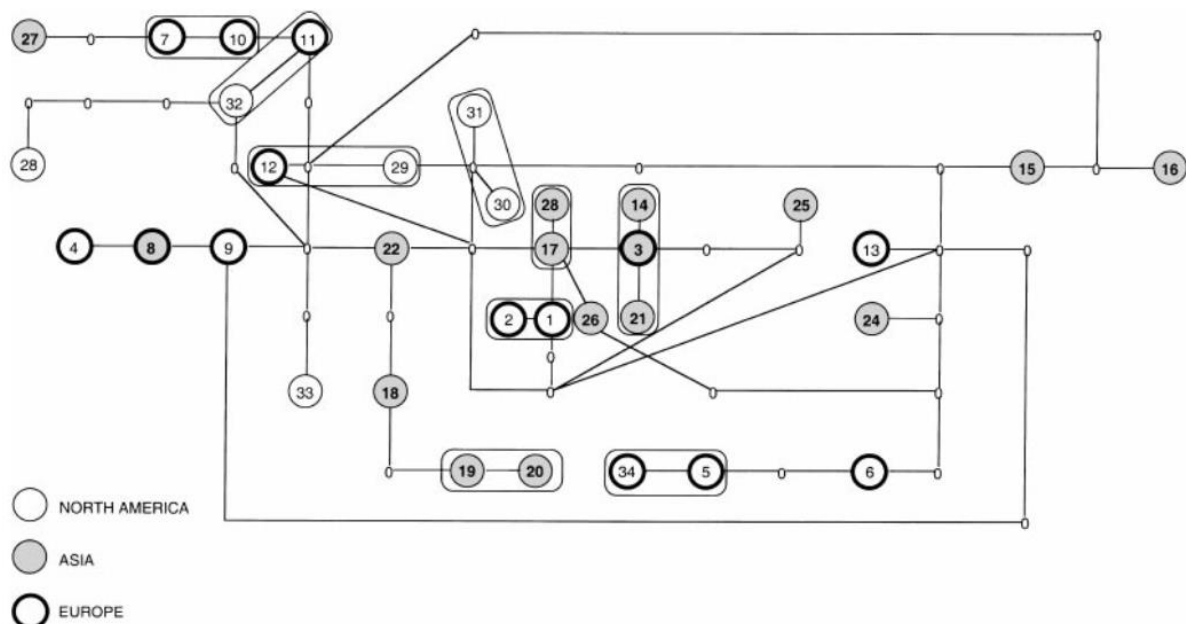


Fig. 3 Cladogramme de parcimonie statistique (Templeton et al. 1992) des haplotypes de loups basés sur le nombre de substitutions et la présence d'indels entre les séquences. Les numéros indiquent les haplotypes comme dans le Tableau 1. Le continent où chaque haplotype a été trouvé est indiqué. Seuls les clades à une étape sont représentés. L'imbrication à des niveaux plus élevés rendrait le graphique illisible

Tableau 2 Diversité nucléotidique (\pm écart-type (SD)) pour les populations comptant cinq individus ou plus (voir Tableau 1)

	Nucleotide diversity (\pm SD)
Portugal	0.000907 (0.001286)
Spain	0.003806 (0.002983)
France	0
Italy	0
Croatia	0.007184 (0.005626)
Yugoslavia	0.027094 (0.016765)
Greece	0.016010 (0.010521)
Sweden	0.006423 (0.004544)
Israel	0
Saudi Arabia	0.020115 (0.012839)
Iran	0.001456 (0.001916)
Afghanistan	0.013915 (0.009135)
Mongolia	0.014778 (0.009607)
Mexico	0

En utilisant l'algorithme de Templeton et al. (1992), tous les haplotypes de la région de contrôle ont pu être reliés en un seul réseau (Fig.3). Lorsque les mutations ont été cartographiées dans le cladogramme, la quantité de parallélismes et d'inversions était élevée. Sur les 25 sites variables, 73 étapes mutationnelles ont été observées dans le cladogramme, ce qui donne une moyenne de près de trois mutations par site. Cette quantité élevée d'homoplaxie était également indiquée par la valeur extrêmement faible du paramètre de forme gamma ($\alpha < 0,001$, voir Matériaux et méthodes) qui indiquait une distribution asymétrique avec la majorité des changements survenant sur quelques sites. Comme la plupart des changements étaient des transitions (ti/tv = 12,37), les occurrences multiples dans une seule position ne seront très souvent pas remarquées car elles représenteraient un retour à la condition ancestrale. Par conséquent, le cladogramme était complexe et comportait des boucles reliant trois haplotypes ou plus. Comme cette complexité rend la procédure d'emboîtement ambiguë, nous n'avons pas effectué d'analyse emboîtée (Templeton & Sing 1993) et n'avons indiqué qu'un sous-ensemble des groupes emboîtés possibles.

Certains haplotypes provenant de régions géographiquement voisines faisaient partie de **clades** à une étape (par exemple, lu-1 et lu-2 de la péninsule Ibérique ; lu-19 et lu-20 d'Iran ; lu-5 et lu-34 de France, d'Italie et de Yougoslavie), mais d'autres **clades** à une étape comprenaient des haplotypes provenant de localités très éloignées (par exemple, lu-12 et lu-29, d'Europe du Nord et du Yukon). Une analyse de contingence catégorielle par permutation de l'ensemble du cladogramme a rejeté l'hypothèse nulle d'absence d'association avec la localisation géographique ($P < 0,001$). Par conséquent, la distribution des lignées n'était pas aléatoire par rapport à la géographie. Cependant, dans l'ensemble, il n'y avait pas de modèle géographique clair dans la distribution des haplotypes. Même au niveau continental, les haplotypes trouvés en Europe, en Asie et en Amérique n'étaient pas regroupés en grappes exclusives. La plupart des haplotypes Asiatiques sont apparus comme des nœuds intérieur (Fig. 3), tandis que les haplotypes Européens et Américains sont apparus en position terminale. **Les haplotypes situés aux extrémités du cladogramme avaient tendance à avoir des distributions géographiques restreintes alors que les haplotypes omniprésents, et vraisemblablement ancestraux, se trouvaient sur les nœuds intérieurs** (par exemple lu-3, lu-7, lu-8, lu-12, lu-17, lu-32).

Diversité des populations et relations

La diversité nucléotidique diffère significativement entre les populations de loups gris (Tableaux 1 et 2 ; test de Kruskal-Wallis, $H = 456,90$, d.f. = 13, $P < 0,001$). 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 comme prévu. Les populations Européennes bien échantillonnées présentaient une diversité nucléotidique plus faible et moins d'haplotypes divergents (Portugal, Espagne, Italie, Suède ou Israël) que les populations dans lesquelles seuls quelques loups avaient été échantillonnés (par exemple Yougoslavie, Grèce, Arabie Saoudite, Afghanistan ou Mongolie).

La structure générale de l'arbre des populations par appariement des voisins ne permet pas d'établir des regroupements d'ordre supérieur en fonction de la proximité géographique (Figure 4). Aucun des nœuds résultants n'était soutenu dans 50% ou plus des 100 arbres bootstrap. Certaines populations voisines étaient situées sur les mêmes branches (par exemple, le Portugal et l'Espagne ; l'Italie, la France et la Roumanie ; la plupart des populations d'Amérique du Nord ; la Suède, la Finlande et l'Estonie ; la Croatie, la Turquie et Israël), mais les groupes régionaux ou continentaux n'étaient pas suggérés par la structure de l'arbre. Pour déterminer si les populations mal échantillonnées contribuaient à l'absence de structure phylogéographique, nous avons établi des arbres avec un sous-ensemble de populations bien échantillonnées. La structure générale de ces arbres ne différait pas de celle présentée à la Figure 4.

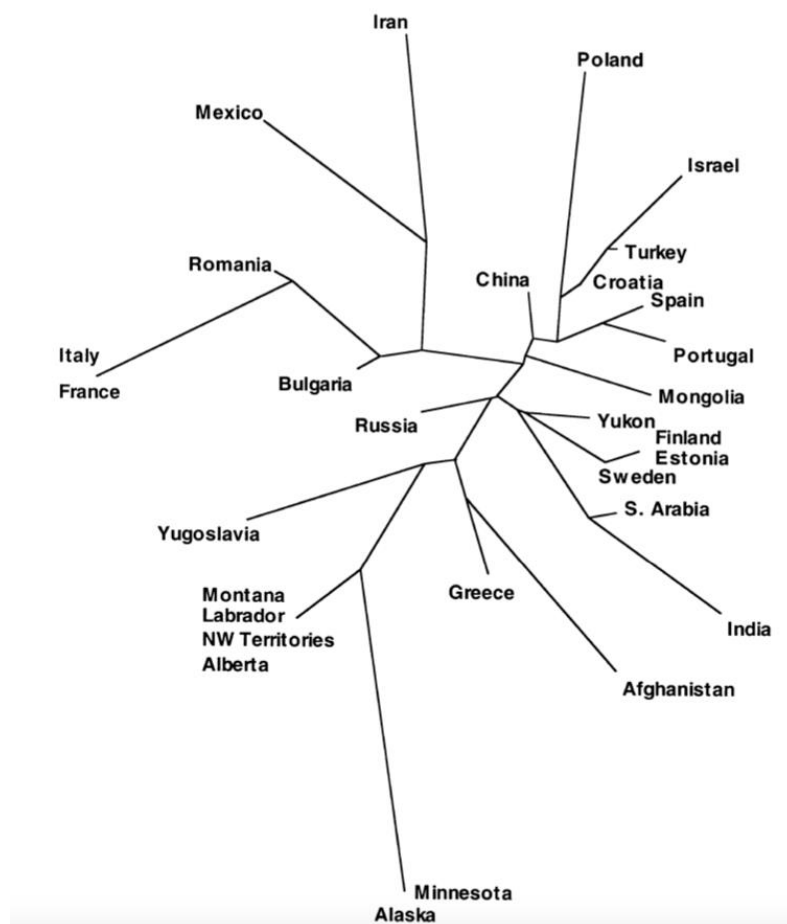


Fig. 4 Arbre de voisinage des populations basé sur le nombre estimé de substitutions nucléotidiques nettes entre chaque paire de populations (Nei 1987). Tous les nœuds étaient soutenus dans moins de 50 % des 100 arbres bootstrap

Pour l'analyse AMOVA, les populations ont été regroupées selon différentes dispositions hiérarchiques afin de découvrir les groupements présentant la valeur maximale de Φ_{CT} . Un large éventail de groupements a été testé (Tableau 3). Les populations dont on pensait qu'elles faisaient partie de la même population reproductrice et qui n'étaient pas significativement différenciées ont toujours été considérées comme une seule population interféconde (c'est-à-dire Portugal et

Espagne, France et Italie). Les valeurs Φ_{CT} les plus élevées ont été obtenues lorsque la plupart des populations Asiatiques étaient considérées comme indépendantes et que la plupart des populations du Canada et des États-Unis étaient classées dans le même groupe. **Les populations Européennes ont formé plusieurs groupes.** La valeur maximale de Φ_{CT} était de 0,62 et celle de Φ_{ST} de 0,69 (Tableau 3). Les valeurs de Φ_{CT} obtenues en regroupant les localités par continents ou comme Amérique du Nord et Eurasie ont montré que ces regroupements étaient nettement moins bons ; la variance entre les groupes ne représentait que 19% et 8%, respectivement.

Tableau 3 Quelques exemples d'analyse de la variance moléculaire (AMOVA). Les indices de fixation sont indiqués, ainsi que le pourcentage de la variance totale qui est expliqué par le groupement et sa signification. Pour les noms des populations, voir le Tableau 1

Groups	Φ_{SC}	Φ_{ST}	Φ_{CT}	% among groups	P
[Spain, Portugal] [France, Italy] [Romania, Bulg.] [Croatia] [Yugos.] [Poland, Estonia, Sweden, Finland, W Russia] [Greece, Turkey] [Israel] [Iran] [Afghan.] [India] [S Arabia] [China] [Mongol.]					
[Alaska] [Yukon] [NWT, Alb., Mont., Minn., Labra.] [Mexico]	0.185	0.689	0.619	61.89	< 0.01
[Eurasia] [America]	0.661	0.724	0.186	18.55	< 0.05
[Eurasia] [USA, Canada] [Mexico]	0.650	0.749	0.284	28.38	< 0.01
[Europe] [Asia] [USA, Canada] [Mexico]	0.660	0.689	0.086	8.55	0.09
[Spain, Portugal] [France, Italy] [Romania, Bulg.] [Croatia] [Yugos.] [Greece, Turkey] [Poland, Estonia, Sweden, Finland, W Russia] [Israel] [S Arabia] [Iran] [Afghan.] [India, China] [Mongol.]					
[Alaska] [Yukon, NWT, Alb., Mont., Minn., Labra.] [Mexico]	0.271	0.689	0.573	57.27	< 0.01
[Spain, Portugal] [France, Italy] [Romania, Bulg., Croatia, Yugos.] [Greece, Turkey] [Poland, Estonia] [Sweden, Finland] [Israel] [W Russia] [S Arabia] [Iran] [Afghan.] [India, China] [Mongol.]					
[Alaska] [Yukon, NWT, Alb., Mont., Minn., Labra.] [Mexico]	0.344	0.687	0.523	52.34	< 0.01

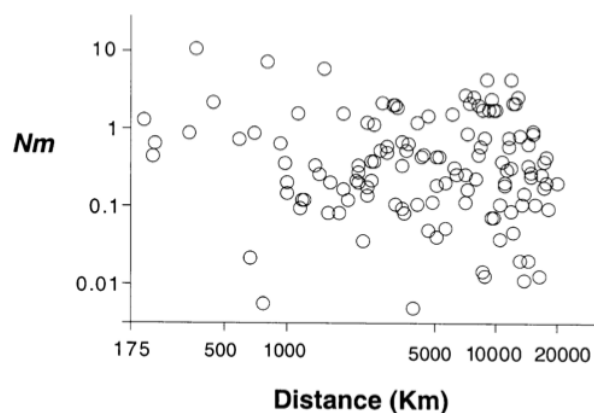


Fig. 5 Tracé du nombre de migrants par génération (N_m), estimé à partir des statistiques Φ_{ST} , et de la distance géographique entre les groupes définis dans l'analyse AMOVA (voir texte) estimé à partir des statistiques Φ_{ST} , et de la distance géographique entre les groupes définis dans l'analyse AMOVA (voir texte). Certaines valeurs de N_m s'approchent de l'infini et ne sont pas incluses

Le nombre de migrants par génération (N_m) estimé à l'aide des valeurs Φ_{ST} issues de la comparaison par paires des populations suggérées dans l'analyse AMOVA, n'a pas montré de relation significative avec la distance (Fig. 5, test de permutation de Mantel $P > 0,05$). Par exemple, le nombre de migrants entre la péninsule Ibérique (Espagne + Portugal) et l'Italie plus la France était de 0,11 alors qu'il était de 1,70 entre la péninsule Ibérique et la Chine. De même, le nombre de migrants entre le Yukon et la Grèce + Turquie était de 4,00 alors qu'il était de 0,09 entre le Yukon et l'Alaska. Comme la plupart de ces populations sont actuellement isolées les unes des autres, les valeurs de N_m reflètent les migrations passées et les méthodes utilisant la **coalescence** peuvent être plus appropriées. Les estimations du maximum de vraisemblance de la migration passée par

génération obtenues à l'aide du programme MIGRATE ont donné des résultats très similaires. Nous avons attribué ces valeurs incohérentes à la petite taille de l'échantillon, à un niveau élevé d'homoplasie et à des violations du modèle insulaire de migration (Whitlock & McCauley 1999).

DISCUSSION

Divergence des loups gris et des coyotes et cycles de population au Pléistocène

Les premiers loups gris sont apparus dans l'Ancien Monde il y a environ 700 000 ans (Kurtén 1968), et les coyotes sont apparus en Amérique du Nord il y a environ 1 million d'années (Kurtén & Anderson 1980). Nous considérerons, de manière conservatrice, que la date minimale de divergence des deux lignées est de 1 million d'années (voir aussi Nowak (1979)). La divergence des séquences entre les coyotes et les loups gris peut être corrigée du polymorphisme ancestral au sein de l'espèce en utilisant l'expression $p_{wc}(\text{net}) = p_{wc} - (p_w + p_c)/2$, où p_{wc} est la divergence des séquences (basée sur la distance HKY + Γ) entre les coyotes et les loups, et p_w et p_c la divergence moyenne des séquences au sein des loups et au sein des coyotes, respectivement (Nei 1987 ; Avise & Walker 1998). La divergence de séquence corrigée entre les loups et les coyotes est de 9,6%. Par conséquent, étant donné un taux de divergence d'environ 10% par million d'années et une divergence de séquence moyenne chez les loups gris de 2,9%, une **coalescence** des haplotypes de loups il y a environ 290 000 ans est impliquée. De même, la divergence moyenne des séquences chez les coyotes, de 4,2%, implique une **coalescence** il y a environ 420 000 ans. L'analyse du site de restriction de l'ensemble du génome mitochondrial a trouvé une valeur similaire de 200 000 à 400 000 ans comme période de **coalescence** pour les loups gris (Lehman et al. 1991 ; Wayne et al. 1992). Cependant, l'estimation du site de restriction de la **coalescence** pour les coyotes est d'environ 1 million d'années, aussi ancienne que la divergence entre les loups et les coyotes (Lehman et al. 1991). Nos résultats suggèrent que la **coalescence** est récente pour les deux espèces.

Cette **coalescence** des séquences de loup et de coyote est plus récente que ce que l'on peut prévoir d'après la taille actuelle des populations des deux espèces. A l'équilibre entre la dérive et la mutation, et en supposant une faible variance de la taille des familles, le temps de **coalescence** attendu en générations est de deux fois le nombre effectif de femelles (Hartl & Clark 1989). Pour les loups et les coyotes, la taille actuelle des populations recensées dans le monde est de l'ordre de centaines de milliers et de millions, respectivement (Lehman et al. 1991). Ces chiffres laisseraient présager une **coalescence** très ancienne. La **coalescence** récente observée pourrait être due à l'effet des fluctuations de la population pendant les cycles glaciaires du Pléistocène sur la moyenne harmonique de la taille effective de la population. Les fluctuations historiques de la taille de la population font que la moyenne harmonique de la taille effective de la population est beaucoup plus petite que la taille moyenne de la population recensée (Avise et al. 1984) et entraîne une **coalescence** plus récente que celle prédite par la seule taille de la population recensée. Les fluctuations historiques de la taille des populations étaient probablement courantes pour les loups gris et les coyotes, car les périodes glaciaires ont dû imposer de fortes réductions de l'aire de répartition géographique de ces deux espèces. La réduction de la taille de la population pendant les maxima glaciaires a probablement été suivie d'une expansion pendant les périodes interglaciaires. De tels cycles sériels d'expansion et de contraction de la population tout au long du Pléistocène auraient considérablement réduit la variabilité génétique en dessous de celle prédite par les tailles de population interglaciaires (par exemple, chez les guépards, voir Menotti-Raymond & O'Brien (1993)).

Déclin démographique récent

La comparaison des estimations de θ_T et de θ_F donne un aperçu de l'histoire récente de la population. Alors que θ_T reflète la diversité et la démographie actuelles, θ_F utilise des informations généalogiques et reflète donc les niveaux historiques de variabilité (Kuhner et al. 1995). Pour les loups et les coyotes, θ_F (0,744 et 0,373, respectivement) est beaucoup plus important que θ_T (0,026 et 0,046, respectivement). Cela indique que les deux espèces ont été beaucoup plus diversifiées dans un passé récent et que les loups étaient historiquement plus diversifiés que les coyotes (voir ci-dessous).

Pour estimer les tailles de population historiques chez les loups, nous supposons un taux de substitution d'environ 5×10^{-8} par site nucléotide par an pour la région de contrôle (la moitié de la divergence de séquence entre le coyote et le loup gris, voir ci-dessus). Compte tenu d'un temps de génération moyen de 3 ans (Mech & Seal 1987), et d'une valeur de θ_F égale à 0,744 chez les loups, une taille de population effective historique d'environ 5 millions de femelles reproductrices est impliquée. De même, en supposant un temps de génération moyen de 2 ans pour les coyotes (Bekoff & Wells 1986 ; Nowak 1991), une valeur de θ_F égale à 0,373 implique un nombre effectif de femelles reproductrices de 3,7 millions. Nous suggérons que la différence spectaculaire dans l'abondance relative historique des deux espèces reflète les changements de la fin du Pléistocène dans la continuité de l'habitat et la zone occupée par les loups gris. A la fin du Pléistocène, les loups avaient une distribution **holarctique** alors que le coyote était limité aux plaines centrales d'Amérique du Nord (Mech 1970 ; Gier 1975 ; Bekoff & Wells 1986 ; Ginsberg & Macdonald 1990). Les loups sont plus dépendants des habitats forestiers dans de nombreuses parties de leur distribution (Mech 1970 ; Carbyn 1987 ; Voigt & Berg 1987) et pendant les périodes glaciaires, ces habitats ont été sévèrement fragmentés et réduits en superficie (Hewitt 1996 ; Taberlet et al. 1998). En revanche, les plaines et les déserts du centre de l'Amérique du Nord ont été moins sensibles à la fragmentation induite par les changements climatiques du Pléistocène. Par conséquent, la variabilité génétique des coyotes a pu être mieux préservée que celle des loups bien que leur distribution géographique ait été moins étendue. La distribution des différences par paires (Fig. 4) soutient cette interprétation car les loups semblent avoir connu une expansion démographique plus forte que les coyotes (Rogers & Harpending 1992 ; Rogers 1995).

La diminution très récente de la diversité génétique suggérée par la comparaison de θ_T et de θ_F chez les coyotes et les loups gris peut avoir des origines différentes. Chez les loups, une diminution substantielle de l'aire de répartition géographique et de la taille des populations a eu lieu au cours des derniers siècles (Mech 1970 ; Carbyn 1987 ; Ginsberg & Macdonald 1990). Seton (1925) a estimé que la population préhistorique de loups en Amérique du Nord était d'environ 2 millions d'individus alors que la population actuelle pourrait être inférieure à 60 000 individus (Carbyn 1987). En revanche, les coyotes ont multiplié leur aire de répartition géographique par plusieurs fois au cours des 100 dernières années et ils sont maintenant présents dans toute l'Amérique du Nord (Nowak 1979 ; Voigt & Berg 1987). Cependant, cette expansion de l'aire de répartition est trop récente pour avoir augmenté de manière significative la variabilité génétique des séquences de la région de contrôle. Les niveaux actuels de variation génétique pourraient plutôt refléter une diminution du nombre de coyotes depuis le dernier **maximum glaciaire**, il y a environ 18 000 ans, alors que les loups gris ont étendu leur distribution dans les forêts **postglaciaires** (voir Nowak (1979)). Ici, comme dans le parc national de Yellowstone et ailleurs, les loups gris limitent activement le nombre de coyotes (Mech 1970 ; Robbins 1997).

La taille actuelle de la population de loups et de coyotes telle qu'indiquée par l' θ_T diffère de celle suggérée par les estimations du recensement. La taille effective de la population de femelles basée sur l' θ_T est d'environ 173 000 et 460 000 pour les loups et les coyotes, respectivement. En supposant que 60% des loups femelles adultes se reproduisent, que le rapport des sexes est de 1 et qu'environ 50% de la population est constituée d'adultes (Mech 1970 ; Packard et al. 1983 ; dans Wayne et al. 1992), la taille actuelle de la population recensée serait d'environ 1 153 000 loups. Ce nombre est bien plus important que la taille de la population mondiale de loups estimée à moins de 300 000 (Ginsberg & Macdonald 1990). La différence entre les estimations génétiques et celles du recensement reflète probablement des déclin de population récent qui ne se reflète pas encore bien dans la perte de variabilité génétique dans le monde entier (par exemple González et al. 1996). Pour les coyotes, la taille totale de la population serait d'environ 2,2 millions en supposant que 70% des coyotes femelles adultes se reproduisent, que le sex-ratio est de 1 et que les adultes constituent 60% de la population (Connolly & Longhurst 1975 ; Lehman & Wayne 1991). Cette valeur est inférieure à l'estimation de 7 millions d'individus (1,75 million de femelles reproductrices) basée sur les données de recensement (Lehman & Wayne 1991). Comme ci-dessus, le nombre de recensement plus élevé chez les coyotes peut être dû à une expansion de la population trop récente pour avoir été enregistrée dans la diversité des séquences de la région de contrôle.

Phylogéographie et structure des populations de loups gris

Les arbres statistiques de parcimonie et de population (Figs 3 et 4), l'analyse AMOVA (Tableau 3) et l'absence de différenciation par la distance (Fig. 5), suggèrent une absence de structure géographique à grande échelle. Une conclusion similaire a été atteinte par l'analyse des sites de restriction d'un échantillon plus petit de loups provenant de moins de localités (Wayne et al. 1992). **Les multiples expansions et contractions vers des refuges que les populations de loups ont connu au cours des périodes glaciaires, ainsi que les changements dans la distribution des habitats appropriés, peuvent avoir contribué à l'absence générale de structure phylogéographique.** Les loups sont des prédateurs très mobiles, pour lesquels des distances de dispersion de plusieurs centaines de kilomètres sont courantes et des mouvements record de plus de 1000 km ont été enregistrés (Fritts 1983 ; Mech 1987 ; Mech et al. 1995). Par conséquent, pendant les périodes **interglaciaires**, les populations de loups s'étendent rapidement dans des habitats favorables, ce qui entraîne un **mélange** de populations qui obscurcit la structure phylogéographique passée causée par **l'isolement** des périodes glaciaires. L'effet des périodes glaciaires sur la distribution des haplotypes de loups est évident dans le Nouveau Monde. Plusieurs épisodes de migration ont eu lieu à travers le pont terrestre de Béring (Kurtén 1963, 1966). En Amérique du Nord, les séquences de la région de contrôle des loups gris du Yukon et du Mexique sont divergentes de celles des autres loups nord-Américains (Fig. 1). **La séquence du loup Mexicain pourrait être dérivée d'une invasion précoce de loups en Amérique du Nord** (Wayne et al. 1992). De même, la présence de séquences divergentes au Yukon peut représenter des séquences superposées provenant de **différentes migrations** à travers le pont terrestre de Béring. Les loups gris étant très mobiles, les glaciers ne constituent qu'une barrière isolante éphémère, et le **mélange** après le retrait des glaciers augmenterait la diversité de certaines populations et obscurcirait la structure historique passée des populations.

Un phénomène similaire, mais sur une échelle de temps plus récente, s'est produit chez les coyotes nord-américains. Comme nous l'avons vu plus haut, les coyotes étaient auparavant limités aux terres arides des États-Unis et ont considérablement étendu leur aire de répartition géographique au cours

des 100 dernières années à l'ensemble des États-Unis continentaux et à une grande partie du sud et du centre du Canada. Les conséquences génétiques de cette expansion sont apparentes dans une étude du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP) des coyotes (Lehman & Wayne 1991). Des génotypes divergents ont été trouvés dans plusieurs populations et les relations génétiques entre les populations ne correspondaient pas à la géographie. Par exemple, les coyotes Californiens présentaient une diversité génétique trois fois supérieure à celle des coyotes du Minnesota, pourtant deux États récemment colonisés. Les relations entre les génotypes Californiens variaient, certains se regroupant avec ceux du Texas, d'autres avec ceux de l'Alaska (Lehman & Wayne 1991). Une analyse microsatellite (Roy et al. 1994) a confirmé l'absence d'associations géographiques entre les populations de coyotes. Une expansion rapide similaire à partir de populations refuges pendant les périodes **postglaciaires** chez les loups aurait oblitéré la structure géographique antérieure qui aurait pu exister et pourrait expliquer les niveaux variables de diversité génétique. En revanche, la différenciation des populations due à l'**isolement** de la période glaciaire est encore apparente chez l'ours brun *Ursus arctos* (Taberlet & Bouvet 1994 ; Kohn et al. 1995 ; Taberlet et al. 1995 ; Waits et al. 1998) et l'ours noir *U. americanus* (Wooding & Ward 1997), deux espèces ayant des niveaux de mobilité plus faibles.

La contraction des populations de loups dans les temps historiques, due à la persécution humaine, a conduit à la fragmentation et à l'isolement. La majorité des populations existantes, notamment en Eurasie, présentent des haplotypes uniques (Tableau 1). **Le temps prévu pour la fixation d'un haplotype dans une population est de deux fois le nombre effectif de femelles** (Hartl & Clark 1989). Ainsi, étant donné les hypothèses ci-dessus sur la structure des populations de loups, une population de 220 individus devrait être fixée pour un seul haplotype mitochondrial en deux siècles. Certaines populations Européennes de loups ont atteint des tailles de population nettement inférieures à cela, ou ont été **fragmentées** en plusieurs populations de taille plus réduite (Boitani 1982 ; Schröder & Promberger 1993 ; Ellegren et al. 1996). Ainsi, dans l'Ancien Monde, la **fragmentation** et la **dérive** pourraient contribuer à l'absence de correspondance entre le flux génétique et la distance par la fixation aléatoire de génotypes qui étaient auparavant plus répandus (Fig. 5 ; Wayne et al. 1992).

Le cladogramme de parcimonie statistique ajoute une résolution importante à notre analyse. Par exemple, le flux génétique restreint entre les régions est fortement soutenu par l'observation que la plupart des **clades** à un niveau d'emboîtement comprennent des haplotypes de la même région (Fig. 3). En outre, l'augmentation du niveau d'emboîtement accroît les distances entre les **clades** et les **clades d'extrémités** ont une plus petite portée géographique que les **clades intérieurs** (Templeton et al. 1995 ; Templeton 1998). **La restriction des flux génétiques peut s'expliquer soit par une fragmentation récente de l'habitat comme ci-dessus, soit par une expansion historique suivie d'un isolement par la distance.** La première hypothèse semble mieux étayée par les preuves historiques, bien qu'une expansion récente soit suggérée chez les loups par la distribution unimodale des différences par paires (Fig. 2).

Unités de conservation

Presque tous les groupes de population bien échantillonnés étaient significativement différenciés en ce qui concerne la fréquence des génotypes et la divergence des séquences (Tableau 1). Si les données nucléaires confirment ce résultat, alors chaque population peut être considérée comme une unité de gestion distincte (Moritz 1994). L'existence de différences morphologiques significatives entre les populations de loups (Vilà 1993 ; Nowak 1996) soutient leur délimitation en

tant qu'unités de gestion. Cependant, notre analyse montre que les populations contiennent souvent des séquences divergentes. De plus, une structure géographique hiérarchique des populations n'est pas évidente. Nous interprétons cela comme étant dû à des épisodes passés **d'isolement** suivis de **mélanges**. Ainsi, la fragmentation et la différenciation actuelles des populations de loups gris doivent être considérées comme un instantané d'un processus historique dynamique qui inclut le mélange. Si les habitats des loups étaient continuellement distribués comme par le passé, de nombreuses unités de gestion actuelles pourraient devenir moins différenciées et n'évolueraient pas en groupes monophylétiques réciproques (unités significatives sur le plan de l'évolution ; Moritz 1994). D'un point de vue évolutif, le mélange était probablement une caractéristique commune de la démographie historique du loup gris, qui n'a été interrompue que récemment par les perturbations humaines. Ainsi, en général, les individus de populations voisines ou étroitement apparentées peuvent à juste titre être utilisés comme source de réintroduction ou d'augmentation de population (par exemple, pour les réintroductions dans le parc national de Yellowstone, voir Phillips & Smith (1996) ; pour le Nouveau-Mexique, Hedrick et al. (1997)).

Les **conclusions finales** concernant la délimitation des unités de gestion et l'identification des populations sources pour la réintroduction ou l'augmentation nécessitent l'analyse des **marqueurs nucléaires** (García-Moreno et al. 1996 ; Hedrick et al. 1997) et des différences phénotypiques liées à l'adaptation (Hedrick 1999). Par exemple, la taille des loups adultes en Arabie est d'un tiers de celle des loups d'Alaska, et les modèles de pelage varient fortement entre les localités (Young & Goldman 1944 ; Vilà 1993). De même, en Amérique du Nord, l'analyse des loci nucléaires chez les loups gris a permis de mettre en évidence une différenciation génétique entre des populations très proches les unes des autres et non séparées par des barrières géographiques ou d'habitat (Roy et al. 1994 ; Forbes & Boyd 1997).