

Variation du polymorphisme mononucléotidique (SNP) chez les loups (*Canis lupus*) du Sud-Est de l'Alaska et comparaison avec les loups, les chiens et les coyotes d'Amérique du Nord

Journal of Heredity 2015;106(1):26–36
doi:10.1093/jhered/esu075
Advance Access publication November 26, 2014

© The American Genetic Association 2014. All rights reserved.
For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Variation of Wolves (*Canis lupus*) in Southeast Alaska and Comparison with Wolves, Dogs, and Coyotes in North America

MATTHEW A. CRONIN, ANGELA CÁNOVAS, DANIKA L. BANNASCH, ANITA M. OBERBAUER, AND JUAN F. MEDRANO

From the School of Natural Resources and Extension, University of Alaska Fairbanks, Palmer, AK (Cronin); the Department of Animal Science, University of California-Davis, Davis, CA (Cánovas, Oberbauer, and Medrano); and the Department of Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California Davis, Davis, CA (Bannasch).

Address correspondence to Matthew A. Cronin at the address above, or e-mail: macronin@alaska.edu.

Résumé

La génétique des loups (*Canis lupus*) suscite un intérêt considérable en raison de leur étroite relation avec les chiens domestiques (*C. familiaris*) et de la nécessité d'une conservation et d'une gestion éclairées. Cela inclut les populations de loups du **Sud-Est de l'Alaska** pour lesquelles nous avons déterminé les génotypes de 305 loups à 173 662 loci de polymorphisme de nucléotide simple (SNP). Après élimination des SNP invariants et liés, 123 801 SNP ont été utilisés pour quantifier la différenciation génétique des loups du Sud-Est de l'Alaska et des loups, coyotes (*C. latrans*) et chiens d'autres régions d'Amérique du Nord. Il existe une différenciation des fréquences alléliques SNP entre les espèces (loups, coyotes et chiens), bien que la différenciation soit relativement faible entre certaines populations de loups et de coyotes. **Il existe des niveaux variables de différenciation entre les populations de loups, notamment une faible différenciation des loups dans l'intérieur de l'Alaska, en Colombie-Britannique et dans le nord des montagnes Rocheuses Américaines.** Il existe une différenciation considérable des fréquences alléliques SNP des loups du Sud-Est de l'Alaska par rapport aux loups des autres régions. Cependant, les loups du Sud-Est de l'Alaska ne constituent pas un groupe génétiquement homogène et il existe des niveaux comparables de différenciation génétique entre les zones du Sud-Est de l'Alaska et entre le Sud-Est de l'Alaska et d'autres zones géographiques. La variation des SNP et d'autres données génétiques sont discutées en ce qui concerne la taxonomie et la gestion.

INTRODUCTION

Il est important de comprendre la génétique du loup (*Canis lupus*) en raison de sa relation étroite avec le chien domestique (*C. familiaris*) et de l'application des approches génétiques à la conservation

et à la gestion de la faune sauvage. Les chiens ont été domestiqués à partir d'ancêtres du loup il y a aussi peu que 13 000-17 000 ans (selon les preuves archéologiques) à plus de 100 000 ans (selon les estimations de l'horloge moléculaire, Vilà et al. 1997, Honeycutt 2010). La variation génétique inhérente aux progéniteurs des loups a permis une sélection concertée et le développement de plus de 400 races de chiens qui présentent une grande divergence phénotypique. Des études comparatives des fondements génétiques des loups et des chiens peuvent aider à comprendre la base de la variation phénotypique, la généalogie et la phylogénie des deux espèces (Honeycutt 2010 ; vonHoldt et al., 2010, 2011 ; Brown et al. 2011 ; Vaysse et al., 2011 ; Wayne et von-Holdt 2012).

Dans cet article, nous décrivons la variation génétique des loups et la comparons à celle des chiens et des coyotes (*C. latrans*), ces derniers ayant divergé de la lignée des loups il y a environ 1 à 2 millions d'années (Nowak 1979 ; Kurtén et Anderson 1980). Il s'agit d'un sujet important en raison des relations systématiques et de la taxonomie incertaines des taxons de canidés en Amérique du Nord (Chambers et al. 2012). Les évaluations récentes des profils génétiques des loups ont été utilisées à la fois pour la science fondamentale (génomique, systématique, taxonomie et génétique des populations, par exemple, Vilà et al. 1999 ; Wayne et von-Holdt 2012) et pour la gestion appliquée (par exemple, l'identification des unités potentielles de consanguinité, d'hybridation et de gestion des populations, par exemple, Carmichael et al. 2008 ; Hedrick et Fredrickson 2008 ; Monzón et al. 2014). Notre étude contribue à la science fondamentale de la systématique et de la taxonomie des canidés d'Amérique du Nord et est également pertinente pour la conservation et la gestion.

L'émergence de nouvelles méthodes génétiques utilisant un grand nombre de marqueurs génétiques (polymorphismes de nucléotides simples SNP) permet une plus grande résolution des relations et de l'ascendance des populations que les méthodes précédentes. Par exemple, vonHoldt et al. (2011) ont clarifié la taxonomie en appliquant des données SNP pour déterminer que les loups existants dans la région des Grands Lacs aux États-Unis (considérés comme *C. l. lycaon* ou *C. lycaon*) et le loup rouge (considéré comme *C. l. rufus* ou *C. rufus*) ont des ancêtres loups et coyotes mélangés. La taxonomie des loups dans d'autres régions est également incertaine, notamment le Sud-Est de l'Alaska et la côte de la Colombie-Britannique. Les populations de loups de cette région sont relativement intactes par rapport à d'autres régions d'Amérique du Nord dans lesquelles les loups ont été exterminés ou fortement réduits en nombre. Les analyses morphologiques suggéraient que les loups du Sud-Est de l'Alaska étaient une sous-espèce distincte (*C. l. ligoni*, Hall 1981) mais une nouvelle analyse les a combinés avec une sous-espèce (*C. l. nubilus*) présente dans une grande partie de l'Amérique du Nord (Figure 1, Nowak 1995, 2002). Cependant, le *C. l. ligoni* est encore utilisé par certains auteurs (Weckworth et al. 2005, 2010, 2011 ; MacDonald et Cook 2009) et a été proposé comme une sous-espèce en danger dans le sud-est de l'Alaska (CBD 2011 ; USFWS 2014).

Des études génétiques ont montré que les loups du Sud-Est de l'Alaska sont génétiquement différenciés des loups d'autres régions, y compris les haplotypes de l'ADN mitochondrial (ADNm) qui varient en fréquence entre les loups du Sud-Est de l'Alaska et d'autres endroits d'Amérique du Nord (Leonard et al. 2005 ; Muñoz-Fuentes et al. 2009, 2010 ; Weckworth et al. 2010, 2011). L'analyse de **12 loci microsatellites nucléaires** montre des différences de fréquence des allèles entre les loups du Sud-Est de l'Alaska et les loups des zones continentales, bien qu'il y ait peu d'allèles privés dans le Sud-Est de l'Alaska (Weckworth et al. 2005). Une étude approfondie de la variation de 14 loci microsatellites de 1923 loups d'Amérique du Nord a également montré une différenciation entre le Sud-Est de l'Alaska et les autres populations (Carmichael et al. 2007, 2008),

bien que les analyses en grappes aient regroupé les loups du Sud-Est de l'Alaska, de l'intérieur de l'Alaska et du nord-ouest du Canada. Une analyse de 48 036 SNP a montré une différenciation génétique des loups de la côte de la Colombie-Britannique et des populations continentales nord-Américaines (vonHoldt et al. 2011), bien que cette analyse n'ait inclus que 3 loups de la côte de la Colombie-Britannique. Knowles (2010) a décrit une variation à 26 221 SNP qui a montré une différenciation de 155 loups de l'intérieur de l'Alaska et du Canada et de 10 loups du Sud-Est de l'Alaska.

Ces études indiquent qu'il existe une différenciation génétique entre les loups du Sud-Est de l'Alaska et les loups des autres régions. Cependant, le nombre de loups échantillonnés et de loci évalués a été limité. De nouvelles méthodes développées chez les chiens (i.e., SNP) nous permettent de développer ces études avec plus de loci et des échantillons de plus grande taille afin de mieux quantifier la variation génétique des loups dans le Sud-Est de l'Alaska comme cela a été fait ailleurs (von-Holdt et al. 2011). Dans cet article, nous décrivons la génétique des populations de loups, de coyotes et de chiens avec des données de génotype SNP obtenues à l'aide de la puce Illumina170K CanineBeadChip. Notre objectif principal est de quantifier la différenciation génétique des loups dans le Sud-Est de l'Alaska et entre les loups, les coyotes et les chiens dans plusieurs régions d'Amérique du Nord, avec un second objectif d'évaluer les données en ce qui concerne la taxonomie et la gestion.

MATERIEL ET METHODES

Collecte des échantillons

Nous avons collecté des échantillons de tissus (peau, poils, muscles, sang) de 431 loups, coyotes et chiens provenant de différentes régions d'Amérique du Nord (Tableau 1), y compris des loups de 6 unités de gestion du gibier (GMU) du Sud-Est de l'Alaska : GMU1A (y compris le continent le plus au sud et l'île Revillagigedo), GMU1B (continent au nord de GMU1A), GMU1C (continent au nord de GMU1B), GMU1D (continent au nord de GMU1C), GMU 2 (île du Prince de Galles), et GMU3 (y compris les îles Kupranof, Etolin, Mitkof, Figure supplémentaire 1 en ligne). Figure 1 en ligne). Les cartes des UGM de l'Alaska sont disponibles sur le site <http://www.adfg.alaska.gov/index.cfm?adfg=huntingmaps.bygm>. Tous les échantillons de loups et de coyotes ont été obtenus par abattage légal ou par contrôle des animaux et recherche. Nous désignons les populations par les emplacements géographiques indiqués dans le Tableau 1. Tous les échantillons proviennent de coyotes et de loups sauvages, à l'exception des loups du Nouveau-Mexique qui ont passé une partie de leur vie en captivité et une autre partie à l'état sauvage, et qui sont les descendants d'une population élevée en captivité qui a débuté avec 7 fondateurs du Mexique (M. Dwire, US Fish and Wildlife Service, communication personnelle ; Hedrick et Fredrickson 2008). Nous appelons les loups des 6 sites du Sud-Est de l'Alaska collectivement les loups du Sud-Est de l'Alaska, et les loups de l'intérieur de l'Alaska, du Montana, de l'Idaho et du Wyoming les loups du nord. Les loups de l'Idaho, du Montana et du Wyoming sont considérés comme des loups du Nord car ils proviennent d'animaux transplantés de l'aire de répartition du loup du Nord (*C. l. occidentalis*) en Alberta et en Colombie-Britannique (Forbes et Boyd 1996, 1997). Les loups de l'intérieur de l'Alaska sont également considérés comme des loups du nord (Chambers et al. 2012). Les loups de Colombie-Britannique comprennent 1 loup de l'île de Vancouver et 34 des zones situées à l'Est de la chaîne de montagnes côtières. Les loups de la Colombie-Britannique sont considérés comme *C. l. occidentalis*, *C. l. nubilus*, ou *C. l. ligoni* (Chambers et al. 2012), et sont

géographiquement adjacents au Sud-Est de l'Alaska ; nous les avons donc traités comme un groupe distinct.

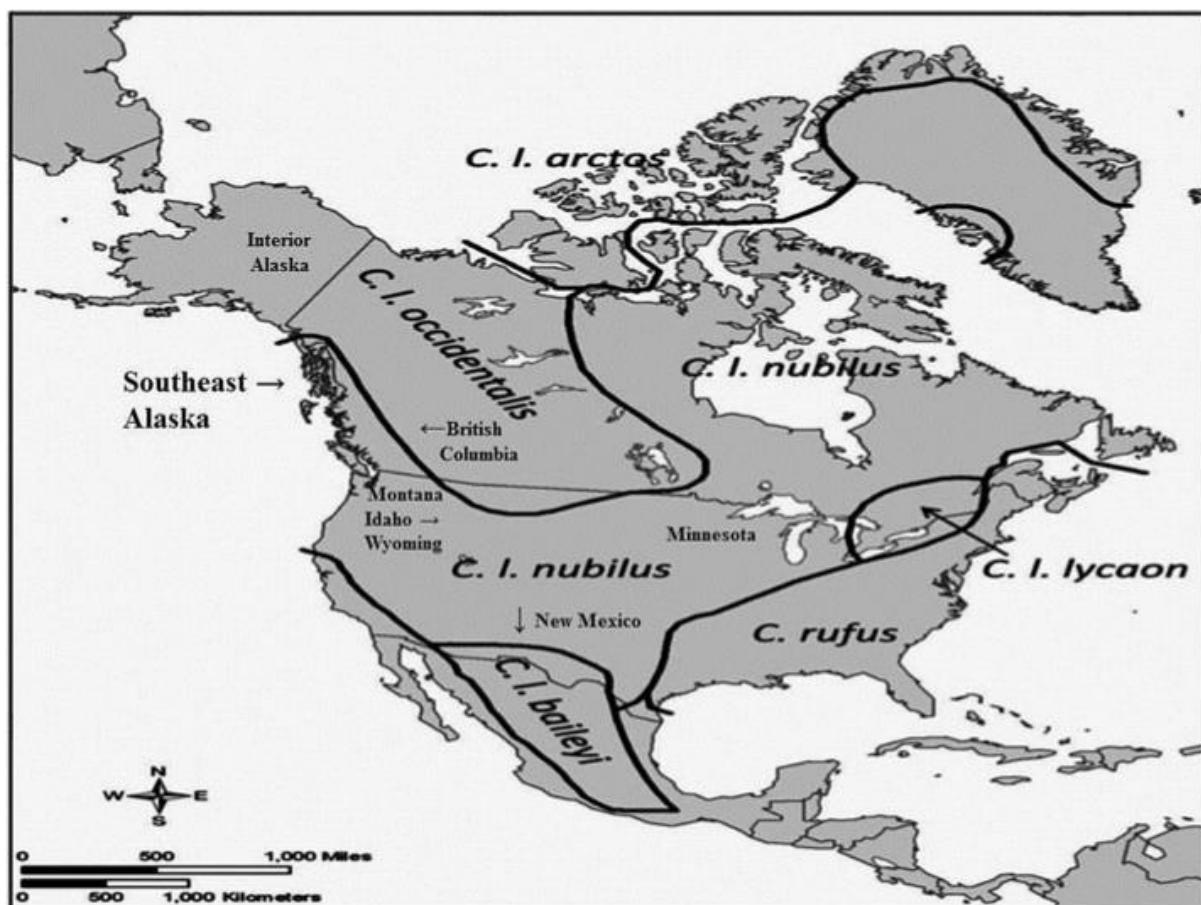


Figure 1. Lieux d'échantillonnage du loup (*Canis lupus*) en Amérique du Nord et répartition des sous-espèces (adapté de Nowak (1995, 2002) et Chambers et al. 2012)

Extraction d'ADN et géotypage

Nous avons isolé l'ADN de la peau, des muscles et du sang de loup et de coyote à l'aide du kit Qiagen DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (Qiagen, MA, USA) et du système de préparation des échantillons MagMAX™ (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA). L'ADN des échantillons de chiens a été extrait du sang collecté dans un anticoagulant EDTA avec le kit Gentra Puregene (Qiagen), comme décrit par Rincon et al. (2011). Au total, 431 échantillons de loups ($N = 305$), de coyotes ($N = 35$) et de chiens ($N = 91$) ont été géotypés pour 173 662 loci SNP à l'aide de la puce Illumina170K CanineBeadChip (Geneseek Inc., Lincoln, NE).

Le contrôle de qualité et le filtrage des 173 662 géotypes pour chaque échantillon ont été effectués avec le logiciel SNP Variation Suite (SVS) version 7 (Golden Helix Inc., Bozeman, MT). Nous avons éliminé les SNP dont le taux d'appel était $< 0,85$, le nombre d'allèles > 2 et la fréquence des allèles mineurs (MAF) $< 0,05$ (c'est-à-dire que nous avons considéré les loci comme polymorphes avec un critère MAF $> 0,05$, par exemple, Chakraborty et al. 1980 ; Clark et al. 1981). Nous avons analysé le déséquilibre de liaison (DL) avec le module d'analyse par paires SVS DL avec élagage DL et calcul CHM avec un seuil r^2 de 0,99, et avons retiré 1 de chaque paire de loci liés de l'analyse. Nous avons calculé l'hétérozygotie observée (H_o) pour chaque population (Tableau 1) pour les loci SNP autosomiques en utilisant SVS.

Tableau 1. Nombre et localisation des échantillons et hétérozygotie observée chez les loups, les coyotes et les chiens qui ont été génotypés avec la puce Illumina170K CanineBeadChip

Species	Population name	Location	Subspecies/breed	Heterozygosity	Number	Total
Wolf	SEAK ^a wolf	GMU2 Southeast Alaska ^b	<i>Canis lupus nubilus</i> or <i>ligoni</i>	0.190	55	305
	SEAK wolf	GMU3 Southeast Alaska	<i>Canis lupus nubilus</i> or <i>ligoni</i>	0.181	38	
	SEAK wolf	GMU1A Southeast Alaska	<i>Canis lupus nubilus</i> or <i>ligoni</i>	0.195	22	
	SEAK wolf	GMU1B Southeast Alaska	<i>Canis lupus nubilus</i> or <i>ligoni</i>	0.193	8	
	SEAK wolf	GMU1C Southeast Alaska	<i>Canis lupus nubilus</i> or <i>ligoni</i>	0.230	13	
	SEAK wolf	GMU1D Southeast Alaska	<i>Canis lupus nubilus</i> or <i>ligoni</i>	0.259	2	
	BCWolf	British Columbia Canada	<i>Canis lupus nubilus</i> or <i>occidentalis</i>	0.244	35	
	INTAK ^c wolf	Interior Alaska	<i>Canis lupus occidentalis</i>	0.239	40	
	WY ^c wolf	Wyoming	Transplanted <i>C. l. occidentalis</i>	0.276	25	
	ID ^c wolf	Idaho	Transplanted <i>C. l. occidentalis</i>	0.270	23	
	MT ^c wolf	Montana	Transplanted <i>C. l. occidentalis</i>	0.251	16	
	MN wolf	Minnesota	<i>Canis lupus hyaen</i> or <i>nubilus</i>	0.237	20	
	NM wolf	New Mexico	<i>Canis lupus baileyi</i>	0.172	8	
	Coyote	AK Coyote	Alaska	<i>Canis latrans</i>	0.131	
CT Coyote		Connecticut	<i>Canis latrans</i>	0.372	1	
AZ coyote		Arizona	<i>Canis latrans</i>	0.152	15	
ME coyote		Maine	<i>Canis latrans</i>	0.281	4	
WY Coyote		Wyoming	<i>Canis latrans</i>	0.212	6	
NE coyote		Nebraska	<i>Canis latrans</i>	0.165	1	
NV coyote		Nevada	<i>Canis latrans</i>	0.157	1	
WI coyote		Wisconsin	<i>Canis latrans</i>	0.177	2	
CO coyote		Colorado	<i>Canis latrans</i>	0.162	1	
MS coyote		Mississippi	<i>Canis latrans</i>	0.228	2	
Dog		MtTx	Montana and Texas	<i>C. familiaris</i> Australian shepard, Border collie	0.334	2
	Mixed		<i>Canis familiaris</i> Mixed breed	0.351	36	
	Poodle		<i>Canis familiaris</i> Poodle	0.324	53	
Total						431

^aSoutheast Alaska.

^bGMU = Alaska Game Management Unit.

^cNorthern wolves.

Analyse génétique des populations

Nous avons évalué la différenciation des populations et des espèces à l'aide de trois méthodes : les distances génétiques individuelles et l'analyse en composantes principales (PCoA, Orloci 1978) ; les distances génétiques des populations (F_{st} , Weir et Cockerham 1984) et l'analyse en grappes de voisinage (NJ, Saitou et Nei 1987) ; et l'estimation du maximum de vraisemblance des ancêtres des animaux individuels (ADMIXTURE v. 1.23, Alexander et al. 2009).

Nous avons effectué une analyse PCoA des distances génétiques individuelles par paire avec SVS. L'analyse PCoA montre la parenté des animaux individuels sous forme de graphique multidimensionnel. La PCoA a été réalisée sous les hypothèses d'un modèle additif et d'un modèle dominant. Les données de sortie pour les graphiques P-P/Q-Q ont montré que le modèle additif était un meilleur ajustement pour les analyses PCoA (Figure supplémentaire 2 en ligne). Des analyses PCoA distinctes ont été effectuées pour les trois espèces (loup, coyote et chien) et pour les loups uniquement.

Pour quantifier la différenciation des fréquences alléliques entre les populations de loups, de coyotes et de chiens, nous avons calculé les F_{st} par paires entre les populations du Tableau 1 avec des tailles d'échantillon > 1 . L'algorithme de l'indice de fixation a été réalisé en calculant la distance génétique basée sur tous les marqueurs (après contrôle de qualité et filtrage) en utilisant les statistiques de Cochran-Mantel-Haenszel (test CMH) avec SVS. L'analyse NJ sans enracinement et avec enracinement au point médian des valeurs F_{st} par paires a été effectuée avec MEGA version 5.2 (Tamura et al. 2011). L'analyse NJ a également été effectuée avec les distances génétiques des

animaux individuels à l'aide du programme neighbor de PHYLIP (Felsenstein 2004) et un arbre de consensus sans racine a été généré avec l'option de règle de majorité du programme consensus de PHYLIP, comme cela a été fait avec d'autres données SNP chez les chiens, les coyotes et les loups (vonHoldt et al. 2010). Nous avons également comparé le F_{st} moyen au sein et entre les groupes de populations, y compris tous les loups, les loups du Sud-Est de l'Alaska et les loups du nord, à l'aide d'un test z bilatéral des moyennes ($\alpha = 0,05$). Cela permet de quantifier si les différences de fréquences alléliques (mesurées par F_{st}) entre les populations au sein d'un groupe (par exemple, au sein du Sud-Est de l'Alaska) sont plus ou moins importantes que les différences entre ce groupe et les autres (par exemple, entre le Sud-Est de l'Alaska et les loups du Nord), et donc si les populations au sein d'un groupe sont génétiquement homogènes par rapport à la différenciation intergroupe (Ramey et al. 2005 ; Cronin et al. 2013).

Nous avons également quantifié la différenciation des populations du Tableau 1 avec une estimation du maximum de vraisemblance des ascendances animales individuelles avec ADMIXTURE v. 1.23 en considérant des nombres de clusters supposés (valeurs K) de 2 à 28. Des résultats cohérents ont été obtenus en utilisant l'erreur standard la plus faible estimée avec la méthode de validation croisée (Alexander et al. 2009).

RESULTATS

Sur les 173 662 SNP analysés, 125 595 SNP ont passé l'analyse de contrôle de qualité et ont donné des génotypes fiables de loups, de chiens et de coyotes (les données de génotype SNP ont été déposées dans l'archive de données Dryad). Les 48 067 autres SNP ont été retirés de l'analyse. L'analyse par paire du DL des 125 595 SNP a donné lieu à 1794 paires en DL. Une de chaque paire liée a été retirée de l'analyse, ce qui a donné un ensemble final de 123 801 SNP qui ont été utilisés dans l'analyse génétique des populations. **L'hétérozygotie était généralement plus élevée chez les chiens ($> 0,3$) que chez les loups (0,17-0,28) et les coyotes (0,13-0,37, Tableau 1).**

Analyses génétiques des populations

La PCoA prenant en compte les distances génétiques entre les individus (Tableau supplémentaire 1 en ligne) montre graphiquement les relations inter-espèces et interpopulations pour les 123 801 SNP loci (Figure supplémentaire 3 en ligne). En considérant les 3 espèces, les 2 premiers axes de coordonnées expliquent 75% de la variation des distances génétiques et montrent les chiens dans un groupe distinct de celui des loups et des coyotes. Au sein du groupe des chiens, les chiens de race mixte sont séparés des caniches. Certains loups sont proches des coyotes ou se chevauchent avec eux dans le graphique PCoA, en particulier certains loups de l'Idaho, du Montana et du Wyoming et les coyotes du Maine. En ne considérant que les populations de loups, les deux premiers axes coordonnés expliquent 62% de la variation des distances génétiques dans l'analyse PCoA. Cette analyse indique que les distances génétiques individuelles des loups du Sud-Est de l'Alaska varient entre les UGM avec un chevauchement des UGM adjacentes : UGM1A, 1B, 1C et 1D sur le continent, et UGM2 et UGM3 sur les îles à l'ouest (Figure 2). L'analyse PCoA montre que les loups du Sud-Est de l'Alaska GMU1C et GMU1D chevauchent la Colombie-Britannique et les populations de loups du nord. Les loups du Nouveau-Mexique, de l'intérieur de l'Alaska, du Minnesota, du Montana, du Wyoming et de l'Idaho se chevauchent largement. Certains des loups du Montana, du Wyoming et de l'Idaho, ainsi qu'un loup de Colombie britannique, sont dispersés en dehors des principaux groupes de loups.

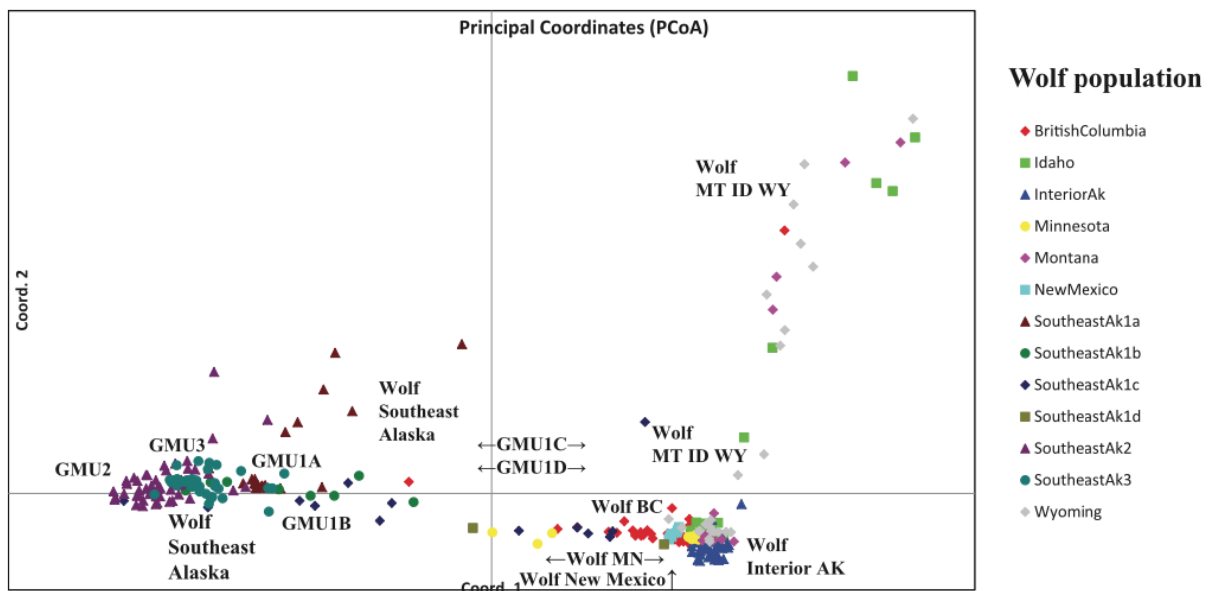


Figure 2. Graphique des deux premiers axes de coordonnées de l'analyse en composantes principales (PCoA) des distances génétiques individuelles des loups pour 123 801 loci de polymorphisme nucléotidique simple (SNP)

L'analyse ADMIXTURE a été réalisée en considérant $K = 2$ à 28. Les valeurs de validation croisée variaient de 0,418 ($K = 14$) à 0,529 ($K = 2$). L'analyse ADMIXTURE indique un meilleur ajustement de $K = 14$ montrant la valeur d'erreur de validation croisée la plus faible (0,418, Figure supplémentaire 4 en ligne). Cependant, de faibles valeurs de validation croisée de 0,420 à 0,429 ont également été identifiées pour $K = 9, 10, 11, 12, 15, 16$ et 17, de sorte que le nombre de clusters définissant les populations n'est pas définitif. Les clusters ADMIXTURE avec $K = 14$ contiennent des groupes avec des probabilités d'inclusion $> 75\%$ (Tableau supplémentaire 2 en ligne), notamment : le cluster 6 des coyotes de tous les endroits sauf le Maine et le Connecticut ; le cluster 4 des chiens de race mixte ; le cluster 2 des loups du Minnesota ; le cluster 12 des loups du Nouveau-Mexique ; et le cluster 5 des loups de la GMU3 du Sud-Est de l'Alaska (Figure 3). Les chiens caniches étaient présents dans 3 groupes (1, 4 et 7) avec des probabilités d'inclusion comprises entre 10% et 61%. Les loups de l'intérieur de l'Alaska étaient prédominants dans le cluster 13 (probabilité = 74%), et étaient également présents dans le cluster 10 (probabilité = 23%) avec des loups du Wyoming, du Montana, de l'Idaho et de la Colombie-Britannique (probabilité = 13-65%). Les loups du Wyoming, du Montana, de l'Idaho et de la Colombie britannique étaient également communs dans le cluster 14 (probabilité = 19-64%). Les coyotes du Maine et du Connecticut étaient communs dans plusieurs clusters (probabilité = 13-47%), notamment le cluster 6 avec les autres coyotes, les clusters 8 et 14 avec les loups du Wyoming, du Montana et de l'Idaho, et les clusters 9 et 11 avec les loups du Sud-Est de l'Alaska.

Les loups du Sud-Est de l'Alaska provenant de différentes GMU étaient communs dans différents groupes ADMIXTURE : les loups de la GMU3 dans le groupe 5 (probabilité = 85%) ; les loups de la GMU1C et de la GMU2 dans le groupe 9 (probabilité = 21-50%) ; les loups de la GMU2 dans le groupe 11 (probabilité = 41%) ; les loups de la GMU1D dans le groupe 13 (probabilité = 27%) ; et les loups de la GMU1A et de la GMU1B dans le groupe 3 (probabilité = 24-63%). Les loups des UGM1C et UGM1D étaient également communs dans le cluster 10 (probabilité = 37-44%), tout comme les loups de la Colombie-Britannique (65%) et de l'intérieur de l'Alaska (23%). Les loups de toutes les GMU du Sud-Est de l'Alaska étaient présents dans le cluster 5 avec un large éventail de probabilités : 6% (GMU2), 14% (GMU1C), 20% (GMU1D), 23% (GMU1A), 55% (GMU1B), 20% (GMU1D), et 85% (GMU3).

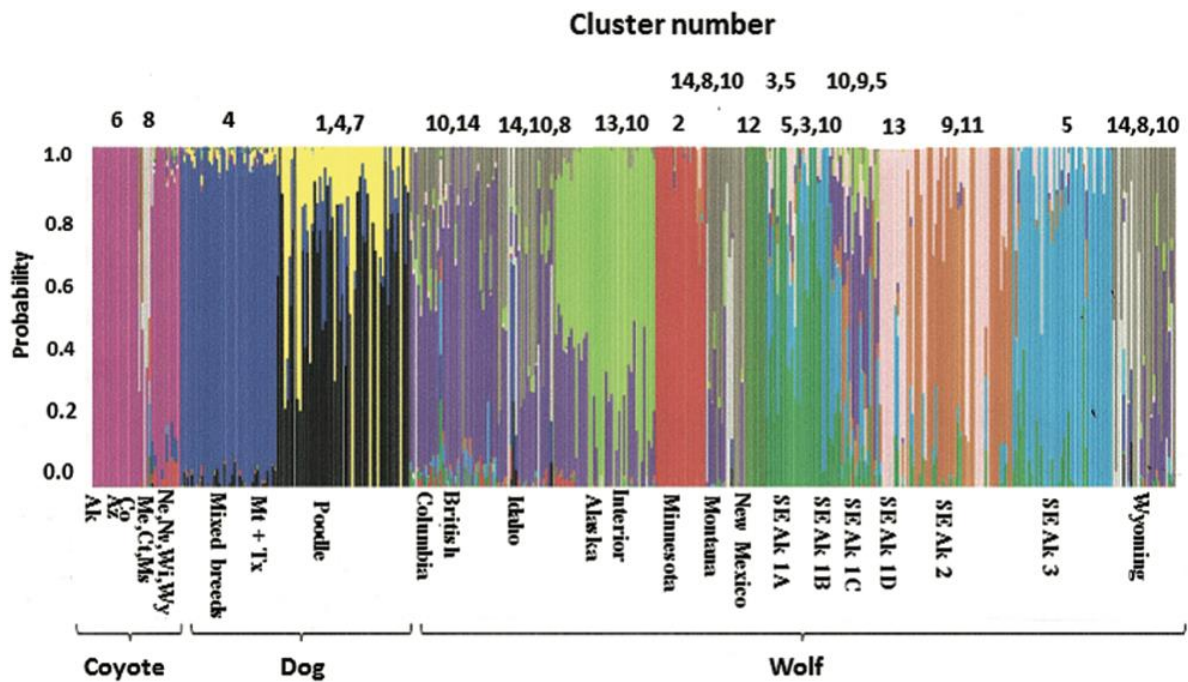


Figure 3. Histogramme de l'analyse ADMIXTURE pour $K = 14$ des 123 801 génotypes SNP pour 431 loups, coyotes et chiens

Les valeurs F_{st} (Tableau supplémentaire 3 en ligne) montrent une plus grande différenciation inter-espèces des fréquences alléliques des loups, des chiens et des coyotes (F_{st} moyen = 0,2790-0,3379) que la différenciation intra-espèces entre les populations, bien qu'il y ait un chevauchement des plages des valeurs F_{st} inter- et intra-espèces (Tableau 2). Les loups, les chiens et les coyotes se trouvent dans des groupes différents, et les coyotes et les chiens sont séparés des loups dans l'arbre NJ (Figure 4). Cette topologie se produit aussi bien dans un arbre non enraciné que dans un arbre enraciné au milieu, et quelles que soient les populations de coyotes et de chiens incluses ou exclues de l'analyse NJ. Ceci est inattendu car on pense que les loups et les chiens sont monophylétiques par rapport aux coyotes (Vilà et al. 1999 ; Wayne et vonHoldt 2012). Cependant, les distances génétiques individuelles des animaux (utilisées dans l'analyse PCoA) ont également été soumises à l'analyse NJ et, dans ce cas, les loups et les chiens se regroupent, séparément des coyotes (Figure supplémentaire 5 en ligne).

L'analyse NJ de F_{st} indique que les loups du Sud-Est de l'Alaska se regroupent et sont proches des loups de la Colombie-Britannique et de l'intérieur de l'Alaska (Figure 4). Le groupe de loups le plus septentrional du Sud-Est de l'Alaska (GMU1D) se regroupe avec les loups de l'intérieur de l'Alaska, en dehors du regroupement avec les autres populations du Sud-Est de l'Alaska et de la Colombie-Britannique, bien que la petite taille de l'échantillon ($N = 2$) pour GMU1D rende ce résultat préliminaire. Les loups des UGM2 et UGM3 cooccurrent sur une branche terminale de l'arbre NJ. Les loups des États du nord des Rocheuses (Montana, Idaho, Wyoming) se regroupent ensemble, et les loups du Minnesota et du Nouveau-Mexique se regroupent sur une branche distincte de l'arbre NJ. La même topologie des populations de loups est obtenue dans les analyses NJ avec un arbre non enraciné ou un arbre enraciné au milieu, et avec ou sans chiens et/ou coyotes inclus.

Les interprétations des graphiques PCoA et ADMIXTURE et de l'arbre NJ sont quelque peu subjectives, c'est pourquoi nous avons procédé à une évaluation quantitative de la différenciation des populations telle qu'indiquée par F_{st} . Les comparaisons de F_{st} indiquent que le niveau de

différenciation entre les sites du Sud-Est de l'Alaska est comparable à la différenciation entre le Sud-Est de l'Alaska et les populations d'autres zones géographiques (Tableau 2). La différenciation entre les 6 sites du Sud-Est de l'Alaska (F_{st} moyen = 0,1268) n'est pas significativement différente du F_{st} moyen entre toutes les populations de loups échantillonnées en Amérique du Nord (F_{st} moyen = 0,1525, $P = 0,22$), du F_{st} moyen entre le Sud-Est de l'Alaska et la Colombie-Britannique (F_{st} moyen = 0,1195, $P = 0,79$), ou entre le Sud-Est de l'Alaska et les loups du nord ($F_{st} = 0,1501$, $P = 0,29$). La différenciation entre les sites du Sud-Est de l'Alaska est significativement inférieure à la différenciation entre le Sud-Est de l'Alaska et les loups du Minnesota ($F_{st} = 0,2012$, $P = 0,007$), et entre le Sud-Est de l'Alaska et les loups du Nouveau-Mexique ($F_{st} = 0,3448$, $P < 0,0001$). La différenciation entre les loups de l'UGM2 et les 5 autres sites du Sud-Est de l'Alaska (F_{st} moyen = 0,1511) n'est pas significativement différente de celle entre les 5 autres sites du Sud-Est de l'Alaska (F_{st} moyen = 0,1147, $P = 0,36$).

Tableau 2. Résumé des valeurs F_{st} dérivées de 123 801 géotypes SNP parmi les populations de loups, de coyotes et de chiens avec $N > 1$

Populations compared	F_{st}	F_{st}	F_{st}
	Mean (SE) ^a	Range	95% CL ^b
Intraspecies			
Among groups of dogs	0.0843 (0.0350)	0.0145–0.1251	0.1509
Among coyote locations	0.1105 (0.0211)	0.0188–0.2927	0.0453
Among all wolf locations	0.1525 (0.0101)	0.0124–0.3903	0.0202
Comparisons of southeast Alaska wolves			
Among all 6 Southeast AK locations	0.1268 (0.0184)	0.0344–0.2811	0.0394
Among 5 Southeast AK locations excluding GMU2	0.1147 (0.0225)	0.0344–0.2463	0.0508
GMU2 versus 5 other Southeast AK locations	0.1511 (0.0326)	0.1139–0.2811	0.0904
Southeast AK versus BC wolves	0.1195 (0.0215)	0.0607–0.1849	0.0552
Southeast AK versus MN wolves	0.2012 (0.0206)	0.1436–0.2638	0.0529
Southeast AK versus northern wolves (interior AK, ID, MT, WY)	0.1501 (0.0122)	0.0430–0.2441	0.0252
Southeast AK versus NM wolves	0.3448 (0.0158)	0.2810–0.3903	0.0407
Comparisons of North American populations			
Among northern wolves (interior AK, ID, MT, WY)	0.0451 (0.0109)	0.0124–0.0784	0.0279
MN wolves versus northern wolves (interior AK, ID, MT, WY)	0.1154 (0.0068)	0.0981–0.1271	0.0217
MN wolves versus NM wolves	0.2527 (N/A)	N/A	N/A
Northern wolves (interior AK, ID, MT, WY) versus NM wolves	0.2330 (0.0102)	0.2065–0.2526	0.0325
Comparisons with BC^c			
BC wolves versus NM wolves	0.2219 (N/A)	N/A	N/A
BC wolves versus northern wolves (interior AK, ID, MT, WY)	0.0390 (0.0065)	0.0240–0.0535	0.0208
BC wolves versus Northern Rockies wolves (ID, MT, WY)	0.0342 (0.0062)	0.0240–0.0454	0.0267
BC wolves versus MN wolves	0.1031 (N/A)	N/A	N/A
Interspecies			
Dog versus coyote	0.3198 (0.0185)	0.2061–0.5222	0.0391
Dog versus wolf	0.3379 (0.0113)	0.2228–0.5153	0.0228
Wolf versus coyote	0.2790 (0.0111)	0.0817–0.4480	0.0221

^aMean (and standard error) values of pairwise F_{st} (Supplementary Table 3 online) of the groups identified in Table 1 with $N > 1$.

^b95% Confidence level of the mean.

^cBC (British Columbia).

L'autre groupe pour lequel on peut comparer les variations intragroupe et intergroupe est celui des loups du Nord. La différenciation des fréquences d'allèles SNP entre les emplacements des loups du Nord loups (F_{st} moyen = 0,0451) est significativement inférieure à celle observée au sein de l'Alaska du Sud-Est ($F_{st} = 0,1268$, $P = 0,0001$), entre toutes les populations de loups ($F_{st} = 0,1525$, $P < 0,0001$), entre les loups de l'Alaska du Sud-Est et les loups du Nord ($F_{st} = 0,1501$, $P < 0,0001$), entre les loups du Nord et les loups du Minnesota ($F_{st} = 0,1154$, $P < 0,0001$), entre les loups du Nouveau-Mexique et les loups du Nord ($F_{st} = 0,2330$, $P < 0,0001$) ; et pas significativement différent du F_{st} moyen entre les loups du Nord et les loups de la Colombie-Britannique ($F_{st} = 0,0390$, $P = 0,63$). **Cela indique que la différenciation des SNP entre les populations de loups du nord est faible par rapport à la différenciation entre les zones du Sud-Est de l'Alaska, et que les**

loux du nord et les loups de la Colombie-Britannique constituent un groupe relativement homogène.

Pour les comparaisons des populations avec un seul lieu d'échantillonnage (c'est-à-dire pas de test χ car il n'y a pas de moyenne ou de variance), il y a un F_{st} relativement élevé entre les loups du Minnesota et les loups du Nouveau-Mexique ($F_{st} = 0,2527$) et les loups de la Colombie-Britannique et du Nouveau-Mexique ($F_{st} = 0,2219$) par rapport au F_{st} de tous les loups échantillonnés en Amérique du Nord ($F_{st} = 0,1525$). Ces relations sont illustrées graphiquement dans l'arbre NJ (Figure 4) dans lequel les loups du Sud-Est de l'Alaska se retrouvent dans un cluster avec les loups de la Colombie-Britannique et les loups du nord, tandis que les loups du Minnesota et les loups du Nouveau-Mexique se regroupent séparément.

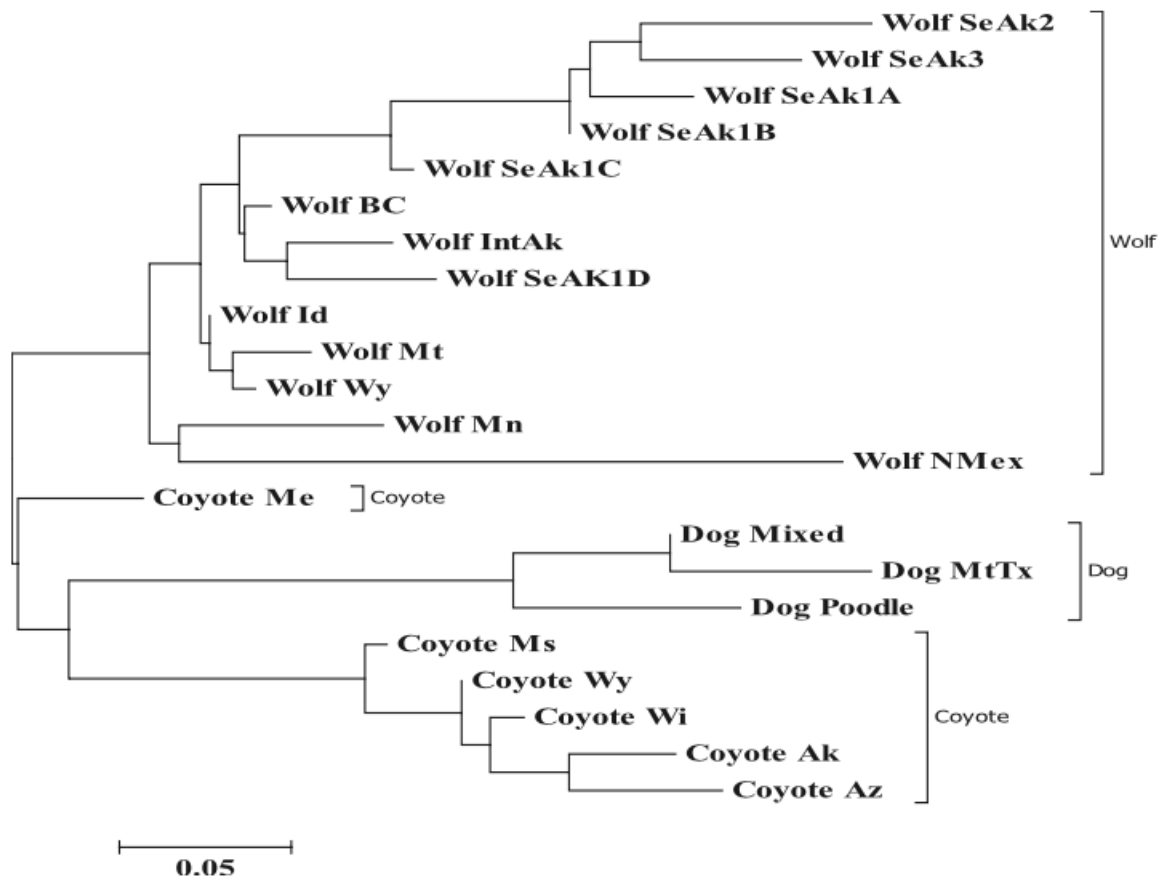


Figure 4. Arbre de jonction des valeurs F_{st} par paire dérivées des 123 801 génotypes SNP parmi les populations de loups, de coyotes et de chiens identifiées dans le tableau 1 avec $N > 1$

DISCUSSION

Dans notre étude et dans d'autres (Vaysse et al. 2011), la puce Illumina170K CanineBeadChip a permis un génotypage étendu des loups et des coyotes, en plus des chiens pour lesquels elle a été développée. Ces données SNP représentent la variation à travers le génome des canidés, y compris les régions codantes et non codantes, les substitutions synonymes et non synonymes, et pas spécifiquement les régions génétiques qui sont sous sélection ou sélectivement neutres. Nous avons trouvé une plus grande hétérozygotie chez les chiens que chez les loups ou les coyotes, ce qui peut être dû à un biais de vérification. Les SNP ont été découverts dans des comparaisons de races de chiens et peuvent être biaisés par rapport aux SNP spécifiques aux loups (Vaysse et al. 2011). D'autres tests de SNP développés chez le chien présentaient des niveaux de variabilité similaires

chez le chien, le loup et le coyote, mais une variation plus faible chez les canidés plus éloignés (vonHoldt et al. 2011). Les niveaux d'hétérozygotie observés que nous rapportons (Tableau 1) sont comparables à ceux des loups (0,12-0,25) et des coyotes (0,14-0,20) et supérieurs à ceux des chiens (0,24) rapportés par vonHoldt et al. (2011) pour le SNP 48036. Les loups du Nouveau-Mexique que nous avons échantillonnés ont une faible hétérozygotie par rapport aux autres loups, reflétant peut-être leur origine à partir de seulement 7 animaux fondateurs (Hedrick et Fredrickson 2008) ; et les coyotes du Maine et du Connecticut ont une hétérozygotie élevée par rapport aux autres coyotes, reflétant peut-être leur ascendance métisse coyote-loup (Kays et al. 2010). Parmi les loups du Sud-Est de l'Alaska, ceux de l'UGM1D présentaient l'hétérozygotie la plus élevée, ce qui suggère que la variation SNP y était adéquatement représentée malgré une taille d'échantillon de $N = 2$.

Relations inter-espèces

Les analyses phylogénétiques montrent que les chiens et les loups partagent un ancêtre commun plus récent que l'un ou l'autre avec les coyotes (Bardeleben et al. 2005 ; vonHoldt et al. 2011 ; Wayne et von-Holdt 2012). Cependant, les relations de ces 3 espèces sont contrastées en fonction des marqueurs génétiques et de l'analyse utilisée. Par exemple, nos données SNP ont donné lieu à un arbre NJ (Figure 4) dans lequel les chiens se regroupent avec les coyotes séparément des loups. Les analyses phylogénétiques de 6 séquences de gènes nucléaires regroupent également les chiens et les coyotes séparément des loups (Figure 1 de Bardeleben et al. 2005), tandis que la PCoA de 94 génotypes SNP a montré que le loup et le coyote se chevauchent dans un groupe séparé des chiens (Figure 3 de Gray et al. 2010). En revanche, l'analyse NJ des distances génétiques des animaux individuels dérivées des SNP (Figure supplémentaire 5 en ligne, vonHoldt et al. 2010), les distances génétiques des microsatellites (García-Moreno et al. 1996) et l'analyse phylogénétique des séquences d'ADNmt et de gènes nucléaires (Vilá et al. 1997, 1999 ; Bardeleben et al. 2005 ; Gray et al. 2010 ; Wayne et vonHoldt 2012) montrent que les loups et les chiens se regroupent ensemble, séparément des coyotes. Cela indique que la prudence est de mise lors de l'interprétation des relations génétiques avec les marqueurs moléculaires.

Les loups, les coyotes et les chiens sont connus pour s'hybrider en captivité et dans la nature (par exemple, Vilá et al. 1997 ; Wayne et Vilá 2003 ; Hailer et Leonard 2008 ; Kays et al. 2010 ; Monzón et al. 2014). L'évaluation de l'hybridation inter-espèces dépasse le cadre de notre étude, mais nous notons que les coyotes du Nord-Est des États-Unis (c'est-à-dire le Maine et le Connecticut) ont une probabilité relativement faible dans le cluster 6 d'ADMIXTURE qui a une probabilité élevée pour toutes les autres populations de coyotes (Tableau supplémentaire 2 en ligne), et ils se regroupent séparément des autres coyotes dans l'arbre NJ (Figure 4) et le graphique PCoA (Figure supplémentaire 3 en ligne). Cela peut être dû à une certaine ascendance de loup chez les coyotes du Nord-Est des États-Unis en raison de l'hybridation (Kays et al. 2010 ; Monzón et al. 2014).

Variation au sein du Sud-Est de l'Alaska

Les loups du Sud-Est de l'Alaska ne constituent pas un groupe génétiquement homogène et il y a autant ou plus de différenciation génétique entre les endroits du Sud-Est de l'Alaska qu'entre les autres régions (Tableau 2). Ceci inclut une différenciation significativement plus importante entre les zones du Sud-Est de l'Alaska qu'entre les populations de loups nordiques de l'intérieur de l'Alaska et des États du nord des Rocheuses. Ce schéma est probablement dû à la récente colonisation **post-glaciaire** du Sud-Est de l'Alaska, et à la géographie insulaire et montagneuse résultant en un flux génétique limité au sein du Sud-Est de l'Alaska et entre le Sud-Est de l'Alaska et d'autres régions (Weckworth et al. 2005, 2010, 2011 ; Carmichael et al. 2007, 2008).

La variation des SNP entre les sites du Sud-Est de l'Alaska montre des relations différentes, selon l'analyse utilisée. Par exemple, dans le graphique PCoA et l'arbre NJ (Figures 2 et 4), les UGM3 et UGM2 semblent étroitement liées, alors que les loups de ces emplacements prédominent dans différents clusters dans l'analyse ADMIXTURE (Figure 3). Ces différences reflètent les différentes hypothèses et caractéristiques de chaque méthode. Cependant, le F_{st} moyen entre les loups de l'UGM2 et les 5 autres sites du Sud-Est de l'Alaska n'est pas significativement différent du F_{st} moyen entre les 5 autres sites. Cela indique que, bien que les loups de la GMU2 présentent un certain degré de différenciation (Weckworth et al. 2005), ils ne sont pas particulièrement différenciés par rapport à la différenciation globale entre les sites du Sud-Est de l'Alaska et nos données génétiques ne soutiennent pas la proposition selon laquelle les loups de la GMU2 constituent un segment de population distinct (CBD 2011 ; USFWS 2014). Dans les graphiques PCoA et ADMIXTURE, les 4 GMU du Sud-Est de l'Alaska (1A, 1B, 1C, 1D) se chevauchent et les GMU1A et GMU1B se chevauchent avec les GMU2 et GMU3, ce qui indique un certain niveau de flux génétique et/ou une ascendance commune récente entre toutes les zones du Sud-Est de l'Alaska. Ces données génétiques, combinées aux données sur la démographie et les mouvements, peuvent aider les gestionnaires à comprendre les relations des loups dans le Sud-Est de l'Alaska.

Variation des loups dans le Sud-Est de l'Alaska et dans d'autres zones géographiques

Il existe une différenciation considérable des fréquences alléliques SNP entre les loups du Sud-Est de l'Alaska et les loups d'autres régions. Cependant, les analyses PCoA, NJ et ADMIXTURE indiquent une différenciation relativement faible des loups dans le nord du Sud-Est de l'Alaska (GMU1C et GMU1D) et en Colombie-Britannique et dans l'intérieur de l'Alaska, comme cela a été observé pour les microsatellites (Carmichael et al. 2008). **Cela suggère que le Sud-Est de l'Alaska peut avoir été colonisé par et/ou avoir un flux génétique avec des loups provenant de zones situées au Nord et à l'Est, ainsi qu'au Sud** (Klein 1965 ; Cook et al. 2006 ; Weckworth et al. 2005, 2010). Il existe également une différenciation relativement faible entre les loups de la Colombie-Britannique et les loups du nord, y compris les loups du nord des montagnes Rocheuses Américaines qui proviennent de transplantations de loups du nord de la Colombie-Britannique et de l'Alberta (Forbes et Boyd 1996, 1997). Les données SNP indiquent que les loups du Minnesota et du Nouveau-Mexique présentent une différenciation relativement élevée de la fréquence des allèles par rapport aux autres populations de loups, ce qui correspond à d'autres données SNP (vonHoldt et al. 2011).

Taxonomie et gestion

La taxonomie de la sous-espèce des loups du Sud-Est de l'Alaska est incertaine car certains auteurs (Nowak 1995, 2002 ; Chambers et al. 2012) suggèrent que les loups du Sud-Est de l'Alaska et de la côte de la Colombie-Britannique sont des *C. l. nubilus* (Figure 1), tandis que d'autres utilisent également *C. l. ligoni* pour les loups de cette région (Weckworth et al. 2005, 2010, 2011 ; MacDonald et Cook 2009). *C. l. ligoni* a été proposé comme sous-espèce en danger dans le Sud-Est de l'Alaska (CBD 2011 ; USFWS 2014), cette désignation a donc des implications importantes tant pour la taxonomie que pour la gestion. À cet égard, il est important de reconnaître que les désignations de sous-espèces, y compris celles des loups, sont généralement subjectives (Wayne et Vilá 2003 ; Zink 2004 ; Cronin 2006 ; Cronin et Mech 2009). **Il est également important de noter que notre analyse de la différenciation des fréquences alléliques avec des algorithmes de regroupement n'est pas une analyse phylogénétique** (Felsenstein 1982). Les fréquences alléliques varient en raison de facteurs de génétique des populations (mutation, dérive, sélection, flux génétique), et pas nécessairement de la phylogénie. La taxonomie étant basée sur la phylogénie (Mayr 1982 ; Avise et Ball 1990), ces

analyses peuvent ne pas être applicables aux désignations taxonomiques officielles. Cependant, les données SNP peuvent fournir des informations pertinentes concernant l'étendue du flux génétique et l'ascendance des populations et donc aider à l'évaluation de la phylogénie des espèces et sous-espèces (Decker et al. 2009, 2014 ; vonHoldt et al. 2011).

Nos résultats et d'autres montrent que les loups du Sud-Est de l'Alaska diffèrent en fréquences alléliques des loups d'autres régions mais ne constituent pas une population homogène et ont récemment colonisé la région et/ou ont un flux génétique avec d'autres zones (Weckworth et al. 2005, 2010, 2011 ; Carmichael et al. 2007, 2008 ; Knowles 2010). Les fréquences d'haplotypes MtDNA des loups du Sud-Est de l'Alaska indiquent également un degré d'isolement, mais les haplotypes ne sont pas monophylétiques et les haplotypes des loups du Sud-Est de l'Alaska se retrouvent également dans d'autres régions (Leonard et al. 2005 ; Muñoz-Fuentes et al. 2009, 2010, Weckworth et al. 2010 ; Chambers et al. 2012). Les loups d'Amérique du Nord présentent en général une faible divergence de séquence des haplotypes d'ADNmt, un manque général de structure phylogéographique et des épisodes communs d'isolement et de mélange, ce qui n'est pas surprenant chez une espèce qui se disperse couramment sur des centaines de kilomètres (Vilá et al. 1999). Ces résultats indiquent que les loups du Sud-Est de l'Alaska ne constituent pas une population génétiquement isolée ou monophylétique, et ne soutiennent pas une désignation de sous-espèce des loups du Sud-Est de l'Alaska. Nos données et celles de vonHoldt et al. (2011) montrent également une différenciation SNP des loups Mexicains (*C. l. baileyi*) par rapport aux autres loups nord-Américains. Cependant, les échantillons existants et historiques montrent que les loups Mexicains n'ont pas de monophilie ADNmt, qu'ils partagent des haplotypes avec des loups d'autres régions et avec des coyotes (Leonard et al. 2005 ; Hailer et Leonard 2008), et que les loups Mexicains existants proviennent de seulement 7 fondateurs qui peuvent avoir inclus des ancêtres de chiens (bien que les données génétiques indiquent que cela est improbable et/ou de faible importance génétique, García-Moreno et al. 1996 ; Hedrick et al. 1997). Ces facteurs indiquent que la désignation d'une sous-espèce de loup Mexicain est d'une validité discutable. En effet, les sous-espèces de loups d'Amérique du Nord en général sont discutables et ont été décrites comme arbitraires, typologiques, et comme une série de populations inter-grade (Wayne et Vilá 2003 et références).

Ces observations concernant les loups indiquent qu'il vaut la peine de tenir compte de l'admonition de Wilson et Brown (1953) selon laquelle les populations doivent être désignées par **zone géographique** plutôt que par sous-espèces. Cela rendrait la taxonomie plus rigoureuse avec des applications pratiques. Prenons l'exemple des récentes conclusions selon lesquelles plusieurs sous-espèces inscrites sur la liste de la loi Américaine sur les espèces menacées d'extinction ne sont pas étayées par des données génétiques, notamment le Gobemouche de Californie (*Polioptila californica californica*, Zink et al. 2013), la souris sauteuse des prés de Preble (*Zapus hudsonius preblei*, Malaney et Cook 2013), le bison des bois (*Bison bison athabasca*, Cronin et al. 2013) et la sous-espèce de loup mentionnée ci-dessus. Cela indique qu'il existe une inflation taxonomique injustifiée des désignations de sous-espèces de la faune sauvage, similaire aux désignations d'espèces injustifiées (Zachos et al. 2013). Pour la gestion de la faune, l'utilisation traditionnelle des populations géographiques comme unités de gestion, comme les désignations GMU pour les populations de loups en Alaska, est plus appropriée que les sous-espèces. La rigueur scientifique de la génétique des populations, de la systématique et de la taxonomie, ainsi que leur application à la gestion et à la conservation, seraient améliorées par la mise en œuvre de cette pratique.