

## Les génomes mitochondriaux entiers éclairent les anciennes dispersions intercontinentales des loups gris (*Canis lupus*)

Journal of Biogeography (J. Biogeogr.) (2016) 43, 1728–1738



ORIGINAL  
ARTICLE

### Whole mitochondrial genomes illuminate ancient intercontinental dispersals of grey wolves (*Canis lupus*)

Stephan Koblmüller<sup>1,2</sup>, Carles Vilà<sup>1</sup>, Belen Lorente-Galdos<sup>3</sup>, Marc Dabad<sup>3</sup>, Oscar Ramirez<sup>3</sup>, Tomas Marques-Bonet<sup>3</sup>, Robert K. Wayne<sup>4</sup> and Jennifer A. Leonard<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Conservation and Evolutionary Genetics Group, Estacion Biologica de Donana (EBD- CSIC), 41092 Sevilla, Spain, <sup>2</sup>Institute of Zoology, University of Graz, Universitätsplatz 2, A-8010 Graz, Austria, <sup>3</sup>ICREA, Institut de Biologia Evolutiva (CSIC-UPF), Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain, <sup>4</sup>Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of California, Los Angeles, CA 90095-1606, USA

#### Résumé

**Objectif** Les loups gris (*Canis lupus*) sont répandus dans la zone **Holarctique**. Nous testons ici l'hypothèse précédemment proposée selon laquelle les loups d'Amérique du Nord actuels sont issus de multiples vagues de colonisation en provenance d'Asie. Nous testons également l'hypothèse selon laquelle les connexions terrestres ont joué un rôle important dans l'histoire de l'évolution d'autres populations de loups isolées au Japon.

**Localisation** Zone holarctique.

**Méthodes** Nous analysons **105 génomes mitochondriaux** complets précédemment publiés et nouvellement obtenus à partir d'un échantillon géographiquement diversifié de loups gris et nous datons les branches critiques de l'arbre phylogénétique. Les hypothèses phylogéographiques sont testées dans une approche de calcul bayésien approximatif.

**Résultats** Nous constatons que les **mitogénomes** de tous les loups vivants en Amérique du Nord, y compris les loups Mexicains, dérivent très probablement d'un seul événement de colonisation en provenance d'Eurasie qui a étendu l'aire de répartition du loup gris en Amérique du Nord. Cette colonisation s'est produite alors qu'un pont terrestre liait l'Eurasie et l'Amérique du Nord avant que les calottes glaciaires de la Cordillère et des Laurentides ne fusionnent au cours du dernier maximum glaciaire, vers 23 ka, ce qui est beaucoup plus récent que ce qui est prédit d'après les archives fossiles. Les **ponts terrestres** du Pléistocène ont également facilité la colonisation séparée d'Hokkaido et des îles du sud du Japon.

**Principales conclusions** Les lignées de loups existantes en Amérique du Nord proviennent de loups qui ont migré en Amérique du Nord en même temps que la formation du plus récent pont terrestre avec l'Eurasie. Les **lignées maternelles** des loups Américains du Pléistocène précédent ne sont pas représentées chez les loups Américains vivants, ce qui indique qu'ils n'ont pas laissé de descendants. Le moment de la colonisation de l'Amérique du Nord, d'Hokkaido et des îles du sud du Japon correspond aux changements dans la connectivité terrestre, conséquence de la modification du niveau de la mer.

#### INTRODUCTION

Le loup gris (*Canis lupus* L. 1758) est le plus grand canidé et, avec le renard roux (*Vulpes vulpes* L. 1758), le carnivore sauvage le plus répandu. L'espèce est présente dans tout l'Holarctique, du Haut-Arctique aux déserts du Moyen-Orient et du sud de l'Amérique du Nord, mais elle a historiquement

disparu de certaines parties de son aire de répartition d'origine, comme le Japon et une grande partie de l'Amérique du Nord et de l'Europe. Il est très proche du coyote (*Canis latrans* Say 1819), un petit canidé endémique d'Amérique du Nord. Les archives fossiles confirment la première apparition des loups en Eurasie au début ou au milieu du Pléistocène, soit entre 1 et 2,5 Ma, puis en Amérique du Nord au milieu du Pléistocène (Kurten, 1968 ; Tedford et al., 2009).

La découverte de **schémas phylogéographiques** distincts s'est avérée insaisissable chez les loups gris. Les premières études à grande échelle portant sur l'ADN mitochondrial n'ont guère permis de confirmer l'existence de modèles à grande échelle et ont plutôt révélé une ascendance polyphylétique des loups d'Amérique du Nord au sein de la diversité des loups d'Eurasie. Cependant, les premières ramifications critiques des arbres phylogénétiques étaient mal étayées (Wayne et al., 1992 ; Vila et al., 1999 ; Leonard et al., 2005 ; Pilot et al., 2010 ; Thalmann et al., 2013). Les haplotypes quelque peu divergents limités aux loups Mexicains (*C. l. baileyi*) ont été supposés représenter une invasion précoce des loups en Amérique du Nord (Wayne et al., 1992 ; Leonard et al., 2005 ; Thalmann et al., 2013). Des recherches ultérieures basées sur des loci nucléaires ont suggéré la **monophilie** des loups gris d'Amérique du Nord (vonHoldt et al., 2011). **Malgré des recherches génétiques considérables sur les loups gris, on ne sait toujours pas quand ils ont colonisé l'Amérique du Nord, ni s'il y a eu des flux génétiques ou des événements de colonisation ultérieurs.** L'enregistrement des loups gris en Amérique du Nord au milieu du Pléistocène révèle une histoire longue et complexe. Il est possible que la première colonisation ait eu lieu pendant une période où le niveau des mers était considérablement abaissé, lorsque le pont terrestre de Bering était exposé et reliait l'Asie à l'Amérique, ce qui s'est produit à plusieurs reprises au cours du Pléistocène et a facilité la colonisation de l'Amérique par des vertébrés terrestres Eurasiens (par exemple Brunhoff et al., 2003 ; Davison et al., 2011 ; Kutschera et al., 2013). **Le pont terrestre de Bering n'était pas une bande étroite comme le mot « pont » peut le suggérer, mais couvrait une superficie de plus d'un million et demi de kilomètres carrés et incorporait certaines îles actuelles, comme l'île Wrangel.** Les mêmes fluctuations du niveau de la mer qui ont mis à nu le pont terrestre de Bering entre l'Asie et l'Amérique du Nord ont également mis à nu d'autres **ponts** terrestres reliant, par exemple, Hokkaido et les îles du sud du Japon à l'Asie continentale, permettant l'expansion des loups dans ces îles, où ils ont survécu jusqu'au début du XX<sup>ème</sup> siècle (Matsamura et al., 2014).

Nous analysons ici des **mitogènes** nouveaux et déjà publiés de loups gris anciens et modernes provenant de l'ensemble de leur aire de répartition afin d'évaluer les patrons phylogéographiques à grande échelle et d'évaluer statistiquement des scénarios alternatifs concernant la colonisation de l'Amérique du Nord au moyen d'une approche de calcul bayésien (ABC) approximative. La période testée a été limitée par la généalogie calibrée dans le temps et les reconstructions du niveau des mers du Quaternaire et de l'étendue des calottes glaciaires au cours du **dernier maximum glaciaire (LGM)** (Siddall et al., 2003 ; Miller et al., 2005 ; Rabassa & Ponce, 2013). La période totale considérée s'étend jusqu'à l'époque de l'ancêtre commun le plus récent pour tous les mitogénomes de loups (80 ka ; Thalmann et al., 2013) **et est beaucoup plus récente que la période suggérée par les archives fossiles** (Tedford et al., 2009), mais cohérente avec la divergence récente des loups de l'Ancien Monde suggérée par les données nucléaires (Freedman et al., 2014 ; Skoglund et al., 2015). Par conséquent, nous émettons l'hypothèse que, puisque la colonisation de l'Amérique du Nord n'était possible que pendant les périodes où le pont terrestre de Bering était présent, elle a dû se produire lors de la dernière émergence du pont terrestre de Bering (Fig. 1). La profondeur moyenne des eaux du détroit de Bering est de 40 à 50 m. Le pont terrestre était probablement

ouvert lorsque le niveau de la mer baissait de plus de 50 m par rapport au niveau actuel, avec un niveau de la mer relatif minimum (environ 140 m) au LGM, 20 ka (Siddall et al., 2003 ; Miller et al., 2005). L'avant-dernière émergence du pont terrestre a eu lieu vers 130 ka et est donc trop ancienne pour être compatible avec les données de séquences d'ADN mitochondrial. À partir de 24-13 ka environ, la fusion de la calotte glaciaire des Laurentides avec celle de la Cordillère a empêché le flux génétique entre la Béringie (et donc l'Eurasie) et l'Amérique du Nord continentale (par exemple Burns, 2010 ; Gowan, 2013 ; Rabassa & Ponce, 2013). Après le début du retrait des calottes glaciaires (vers 13 ka), le corridor du Yukon s'est ouvert et a potentiellement permis la dispersion entre l'Eurasie et l'Amérique du Nord continentale jusqu'à la fermeture du détroit de Béring suite à l'élévation du niveau de la mer vers 10 ka, empêchant finalement la migration intercontinentale des loups gris. Nous avons utilisé ce cadre historique et géographique pour évaluer si la diversité actuelle des loups Américains s'explique par une ou plusieurs colonisations en provenance d'Eurasie et pour dater l'arrivée des loups modernes en Amérique du Nord.

## MATERIELS ET METHODES

### Génomes mitochondriaux

Nous avons analysé 105 séquences des 12 gènes codant pour des protéines situées sur le brin H du génome mitochondrial de loups gris répartis en Eurasie et en Amérique du Nord, mais excluant les lignées divergentes de l'Inde et de l'Himalaya (Sharma et al., 2004 ; Aggarwal et al., 2007) (Tableau 1). Parmi les séquences étudiées, nous en avons inclus 10 provenant de loups anciens (>14 000 ans) d'Eurasie et d'Amérique du Nord de Thalmann et al. (2013). Trente-cinq nouveaux **mitogénomes** de loups modernes ont été générés pour cette étude, soit séquencés par Sanger selon Björnerfeldt et al. (2006) ( $n = 24$ ) et alignés à l'œil dans MEGA 6.05 (Tamura et al., 2013), soit reconstruits à partir d'un séquençage **shotgun du génome entier (WGS)** ( $n = 11$ ).

Pour chaque échantillon WGS, nous avons capturé des lectures mitochondriales à partir de l'ensemble des lectures séquencées en mappant les données brutes contre un génome mitochondrial de loup de référence (DQ480508, Björnerfeldt et al., 2006). Nous avons profité de la circularité de l'ADNmt afin d'augmenter le nombre de lectures capturées aux extrémités de l'assemblage. Avec cet objectif en tête, nous avons appliqué une deuxième série de cartographie et aligné les lectures sur un assemblage de séquences modifié, en changeant l'origine de l'assemblage de référence au milieu de l'ADNmt (8 kbp à partir du début). Pour la cartographie, nous avons utilisé l'aligneur BWA 0.6.1 avec les paramètres `-n 6 -q 15` (Li & Durbin, 2009). Nous n'avons conservé que les lectures en paires de haute qualité en retenant les paires de lectures qui ont été cartographiées et correctement appariées et dont la qualité de cartographie était  $> 50$  (avec samtools 0.1.18 `-f 2 -q 50` ; Li et al., 2009). Nous avons écarté les paires d'extrémités appariées si au moins une des deux extrémités appariées avait un score de qualité Phred médian  $< 32$ . Nous avons utilisé Hapsembler 1.1. (`-p Illumina -t 4 -d no -PHRE- D_OFFSET 33 -MIN_CONTIG_SIZE 1000 -EPSILON 0.05`) (Donmez & Brudno, 2011), une boîte à outils d'assemblage de génome spécifique aux haplotypes, pour construire des séquences plus longues à partir de lectures multiples qui se chevauchent (contigs) à partir des lectures capturées. La couverture mitochondriale élevée, calculée à partir des lectures capturées de haute qualité, diminue l'efficacité de l'assembleur. Par conséquent, nous avons sélectionné au hasard des lectures pour obtenir une couverture de 3509 20 fois pour chaque assemblage de référence (le standard et celui avec l'origine modifiée) et nous les avons utilisées pour construire des contigs. Cela permet de compenser la représentation aléatoire et à basse fréquence des lectures provenant des copies nucléaires de l'ADN mitochondrial (numts)

assemblées dans la séquence mitochondriale. Pour chacune des 40 fois où nous avons itéré la réduction des lectures et l'assemblage de novo postérieur, nous avons orienté les contigs en utilisant des alignements locaux sur la référence correspondante (avec blast, Altschul et al., 1990) et les avons joints en utilisant mafft 6.903 (Katoh & Toh, 2008), en incorporant les paires de bases non appelées (N's) à la fois dans les lacunes existantes et dans les sites qui restent non résolus en raison de différences dans les contigs qui se chevauchent. On obtient ainsi 40 assemblages mitochondriaux par échantillon, dont la séquence contiguë est la séquence mitochondriale finale par individu.

### **Analyses phylogénétiques et datation**

Pour placer notre nouveau génome et les autres génomes publiés dans la généalogie mitogénomique calibrée dans le temps de Thalmann et al. (2013), nous avons utilisé beast 1.8.0 (Drummond & Rambaut, 2007) et employé les mêmes paramètres que ceux utilisés dans cette étude [modèle d'évolution moléculaire SRD06 (Shapiro et al., 2006) ; horloge moléculaire stricte]. Des âges radiocarbone calibrés moyens ou des âges attribués de manière stratigraphique ont été utilisés comme priors pour tous les échantillons anciens (Tableau 1). Deux chaînes de Markov Monte Carlo indépendantes ont été exécutées pendant 100 millions de générations, les paramètres du modèle et les arbres étant échantillonnés toutes les 1000 générations. Les premiers 10% des générations ont été éliminés de chaque fichier de logs et d'arbres à titre de rodage avant que les deux chaînes ne soient combinées à l'aide de LogCombiner (disponible dans le pack beast-age). La convergence des chaînes vers la stationnarité pour tous les paramètres du modèle a été évaluée dans Tracer 1.6 (Rambaut et al., 2013). Les tailles d'échantillon effectives post-burn-in regroupées pour tous les paramètres dépassaient 200, ce qui indique que le fichier journal regroupé représentait avec précision la distribution postérieure (Kuhner, 2009). Les temps de divergence ont été calculés à partir des résultats groupés de l'analyse post-intervention et TreeAnnotator (disponible dans le package beast) a été utilisé pour calculer un arbre de crédibilité maximale par clade, qui a été visualisé dans FigTree 1.4.1 (Rambaut, 2014). Les temps de divergence ont été calculés en tant que hauteurs moyennes des nœuds des intervalles de la plus haute densité postérieure (HPD) à 95%. Pour nous assurer que nos estimations n'étaient pas biaisées par des échantillons mal datés, nous avons répété plusieurs fois l'analyse BEAST avec différents ensembles d'échantillons anciens.

### **Analyses démographiques**

Les trajectoires passées de la taille des populations de loups d'Eurasie et d'Amérique du Nord ont été déduites à l'aide du modèle bayésien de grille de ciel (Gill et al., 2013 ; 100 intervalles de taille de population, seuil de 80 kyr - d'autres valeurs de seuil ont été évaluées mais ont donné des résultats identiques) tel qu'implémenté dans BEAST 1.8.0 et en utilisant les paramètres d'évolution et de coalescence utilisés dans les analyses phylogénétiques.

### **Test d'hypothèses phylogéographiques avec ABC**

Pour tester des hypothèses alternatives concernant la colonisation de l'Amérique du Nord par les loups gris, nous avons employé une approche ABC telle qu'implémentée dans Diyabc 2.0 (Cornuet et al., 2014). La période testée a été contrainte par la généalogie calibrée dans le temps déduite dans BEAST, les reconstructions du niveau des mers au Quaternaire et l'étendue des boucliers glaciaires à la fin du Pléistocène (Fig. 2) (Siddall et al., 2003 ; Miller et al., 2005 ; Rabassa & Ponce, 2013). Compte tenu de ces changements dans la **connectivité** entre les continents, quatre scénarios ont été évalués (Fig. 2). Le **scénario 1** supposait que la diversité mitochondriale existante des loups d'Amérique du Nord était due à une seule vague de colonisation avant la fusion des calottes

glaciaires des Laurentides et de la Cordillère (> 24 ka), qui a empêché la migration entre la Béringie et l'Amérique du Nord continentale. Le **scénario 2** suppose un événement de colonisation unique le long du corridor du Yukon, une fois que les boucliers glaciaires des Laurentides et de la Cordillère se sont séparés après le LGM (< 13 ka). En se basant sur l'hypothèse que les loups Mexicains dérivent d'un événement de colonisation plus précoce que les autres loups nord-Américains, les scénarios 3 et 4 ont supposé deux vagues de colonisation (une avant et une après le LGM) mais avec des taux de mélange différents. Les échantillons Japonais ont été exclus de cette analyse car ils peuvent représenter une migration inverse de l'Amérique du Nord vers l'Eurasie (échantillons d'Hokkaido, voir Résultats), et cette possibilité n'est pas envisagée dans le modèle.

Nous avons attribué des distributions uniformes aux périeurs, en tenant compte, dans la mesure du possible, des résultats des analyses bayésiennes de la grille du ciel, de la fermeture et de l'ouverture du détroit de Béring, et de la présence d'inlandsis au cours du LGM (les périeurs des différents scénarios évalués sont indiqués dans le Tableau S1 de l'Annexe S1 des informations complémentaires). En tant que prior pour le taux de substitution, nous avons employé l'intervalle HPD de 95% déduit d'une analyse bayésienne de la grille de ciel de BEAST. Comme le modèle SRD06 d'évolution moléculaire n'est pas implémenté dans Diyabc et que nous voulions éviter une suparamétrisation inutile de l'analyse, nous avons utilisé un modèle d'évolution standard (TN93+G, Tamura & Nei, 1993 ; tel que déduit en employant le critère d'information bayésien dans jModeltest 0.1, Posada, 2008) sur des données non partitionnées. La topologie et les temps de divergence de l'arbre bestial basé sur le modèle TN93+G (non montré) étaient presque identiques à l'arbre bestial original avec le modèle SRD06, de sorte que nous étions convaincus que l'utilisation du modèle simulateur n'introduirait pas de biais dans les inférences tirées des simulations ABC. Nous avons supposé un temps de génération de 3 ans (Mech & Seal, 1987) et utilisé des périeurs larges et plats du taux de migration ( $r$ ) et de  $Ne$  pour toutes les populations (voir le Tableau S1 de l'annexe S1). L'antériorité du taux de mutation  $\mu$  a couvert l'intervalle HPD de 95% déduit dans BEAST [Uniform ( $1,85 \times 10^7$  -  $3,00 \times 10^7$  par génération)]. Nous avons simulé un million de générations pour chaque scénario et calculé les statistiques sommaires suivantes pour les ensembles de données observés et simulés : nombre d'haplotypes, nombre de sites de ségrégation, moyenne des différences par paires, variance des différences par paires,  $D$  de Tajima, sites de ségrégation privés, nombre moyen de nucléotides les plus rares dans les sites de ségrégation et variance des nombres de nucléotides les plus rares dans les sites de ségrégation. La probabilité postérieure de chaque scénario a été estimée à l'aide d'une approche de régression logistique mise en œuvre dans DIYABC.

Pour le modèle le mieux étayé, les distributions postérieures des paramètres de ce modèle ont été estimées à l'aide d'une régression linéaire locale des ensembles de données simulées de 1% les plus proches des données observées après transformation logistique des valeurs des paramètres (voir le Tableau S2 de l'Annexe S1 ; Cornuet et al., 2008). La confiance dans le choix du scénario a été évaluée en comparant la correspondance entre les statistiques sommaires observées et simulées et en calculant les taux d'erreur de type I et II (Cornuet et al., 2010). Par conséquent, 500 ensembles de données de test ont été simulés sous chacun des quatre scénarios, et les probabilités postérieures des scénarios ont été évaluées pour chacun des ensembles de données simulés. Les taux d'erreur de type I ont été estimés en comptant la proportion de fois où le « vrai » scénario (c'est-à-dire le scénario le mieux ajusté) n'avait pas la probabilité postérieure la plus élevée parmi les scénarios alternatifs. Les taux d'erreur de type II ont été calculés en comptant la proportion de fois où le

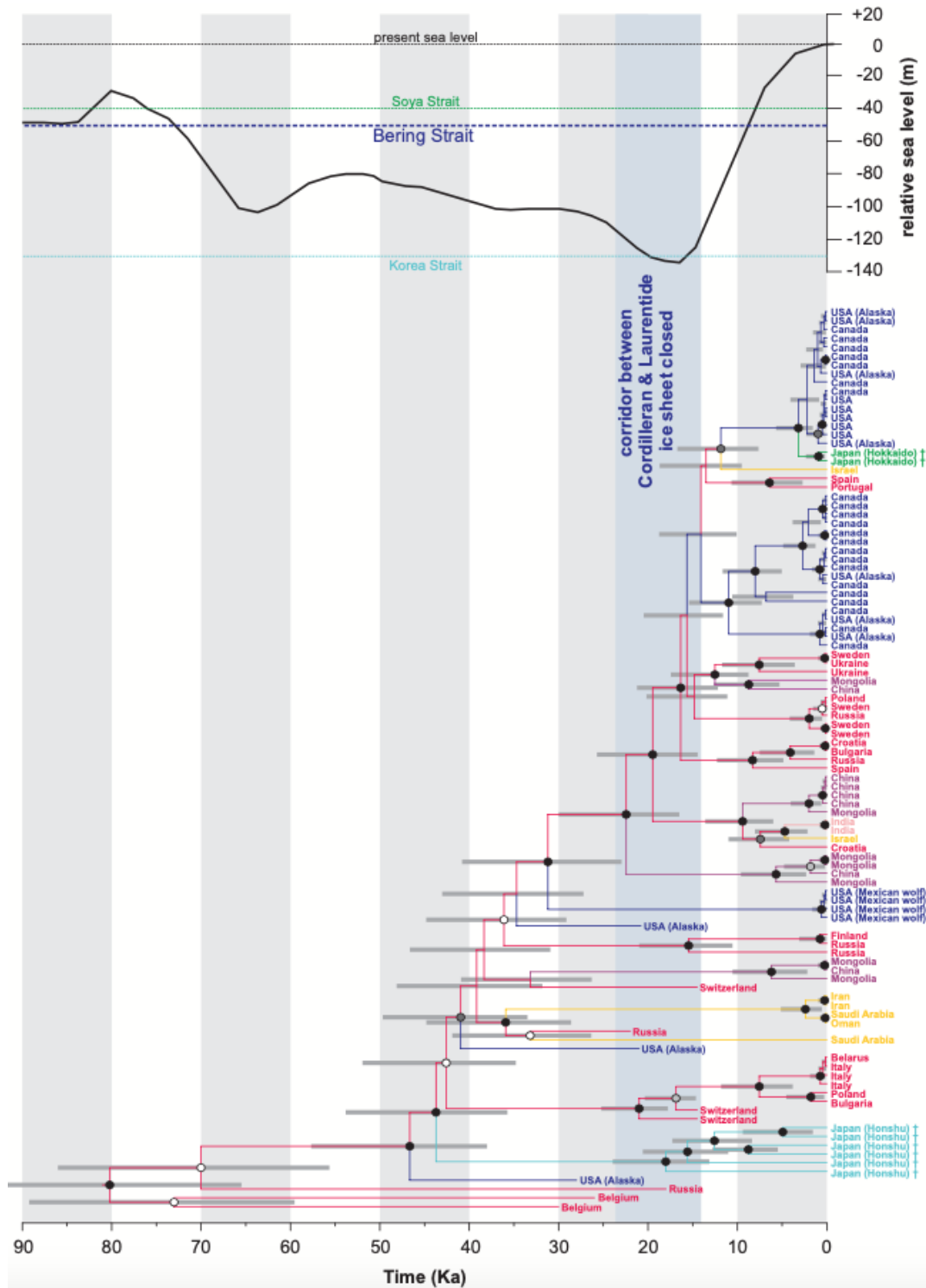
« vrai » scénario avait la probabilité postérieure la plus élevée parmi les scénarios concurrents lorsque la simulation était basée sur un scénario alternatif (sous-optimal). Pour évaluer si le scénario sélectionné correspond aux données observées, nous avons utilisé l'option de vérification du modèle mise en œuvre dans DIYABC (Cornuet et al., 2010). Plus précisément, nous avons simulé  $10^3$  ensembles de données avec des paramètres tirés de l'échantillon postérieur ( $10^4$  valeurs de la distribution postérieure des paramètres obtenus à partir des 106 ensembles de données simulés dans le cadre du scénario le mieux étayé). Les statistiques de test observées ont été comparées aux  $10^3$  statistiques de test simulées, et leurs valeurs-*P* ont été calculées et corrigées pour les comparaisons multiples selon Benjamini & Hochberg (1995).

## RÉSULTATS

Après exclusion de la région de contrôle qui n'a été que partiellement séquencée dans les études précédentes qui ont utilisé les méthodes de séquençage Sanger (par exemple Leonard et al., 2005, 2007), toutes les séquences générées pour cette étude étaient complètes et de haute qualité et constituaient les 12 gènes codant pour les protéines du brin-H uniquement (voir l'Annexe S2 pour plus d'informations ; numéros d'accession GenBank dans le Tableau 1).

Conformément aux analyses mitogénomiques de Thalmann et al. (2013) et de Matsamura et al. (2014), notre phylogénie des haplotypes de loups gris étalonnée dans le temps (Fig. 1) a révélé une **polyphie** des loups d'Amérique du Nord et une position basale des loups Japonais éteints des îles du sud du Japon (*C. l. hodophilax*) parmi les loups « modernes » existants. Les loups Mexicains divergeaient des autres loups d'Amérique du Nord, qui formaient deux clades étroitement liés. Les loups ézoïques éteints d'Hokkaido (*C. l. hattai* ;  $n = 2$ ) présentaient des séquences très différentes de celles des loups du sud du Japon mais très proches de l'un de ces clades Américains, ce qui pourrait indiquer une migration de l'Amérique vers l'Eurasie. Notre estimation de l'ancêtre commun le plus récent pour toutes les séquences de loups (environ 80 ka, Fig. 1) correspond à celle de Thalmann et al. (2013), mais est considérablement plus jeune que celle de Matsamura et al. (2014). De même, nous trouvons un ancêtre commun beaucoup plus récent pour les loups Japonais que dans Matsamura et al. (2014). Ces différences résultent d'une calibration différente de l'horloge moléculaire, car Matsamura et al. (2014) ont utilisé la scission loup-coyote comme **point de calibration unique**, alors que nous avons utilisé des âges radiocarbone calibrés moyens ou des âges attribués stratigraphiquement de plusieurs échantillons anciens pour calibrer l'arbre (suivant Thalmann et al., 2013). L'utilisation de points internes pour calibrer l'horloge nous a permis de contourner en grande partie les problèmes liés à une dépendance temporelle potentielle de l'horloge moléculaire (Ho et al., 2005) et d'obtenir des estimations du temps de divergence plus robustes et plus fiables (Ho et al., 2008). Les analyses de battement répétées avec différents ensembles d'échantillons anciens ont révélé des résultats cohérents d'une série à l'autre, ce qui indique que les estimations du temps de divergence déduites n'étaient pas déterminées par des échantillons uniques mal datés (non montré).

Les reconstitutions des trajectoires de la taille des populations passées au moyen d'analyses bayésiennes de skygrid suggèrent une taille de population relativement constante dans le temps pour les loups Eurasiens et Américains jusqu'à il y a quelques milliers d'années (Fig. 3), ce qui contraste fortement avec les résultats des analyses SNP à l'échelle du génome, qui suggèrent une diminution de la taille des populations au cours des 50 derniers millénaires pour les populations de loups Eurasiens et Américains (vonHoldt et al., 2011 ; Freedman et al., 2014).



**Figure 1.** Phylogénie des loups telle qu'elle a été déduite dans BEAST. Les changements du niveau global de la mer sont indiqués en haut de la figure, les lignes colorées indiquent la baisse du niveau de la mer nécessaire pour exposer une connexion terrestre et permettre ainsi la colonisation de l'Amérique du Nord (détroit de Béring) ou des îles Japonaises depuis l'Asie (détroits de Soja et de Corée). Les couleurs dans la phylogénie indiquent l'origine géographique de l'haplotype : rouge : Europe ; jaune : Proche-Orient ; rose : Inde ; violet : Extrême-Orient asiatique ; vert : Hokkaido (nord du Japon) ; bleu clair : sud du Japon ; bleu foncé : Amérique du Nord. Les haplotypes Américains anciens sont représentés par les branches tronquées, qui se terminent à la date radiocarbone associée à la séquence. Le support nodal sous forme de probabilités postérieures de  $\geq 0,99$ ,  $\geq 0,95$ ,  $\geq 0,90$  et  $\geq 0,70$  est indiqué par des cercles noirs, gris foncé, gris clair et blancs respectivement, les intervalles de confiance à 95% pour l'âge des nœuds sont représentés par des barres grises. Le temps est indiqué le long du bas de la figure en milliers d'années avant le présent (ka)

**Tableau 1.** Liste des échantillons utilisés dans cette étude avec l'âge approximatif des échantillons anciens qui ont été utilisés pour calibrer l'horloge moléculaire, ou la localisation des séquences provenant d'animaux modernes

GenBank	Sample ID*	References	Approximate age (bp)
<i>Ancient samples</i>			
KF661078	Belgium_26000	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	26,000
KF661080	Belgium_30000	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	30,000
KF661081	Russia_18000	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	18,000
KF661085	Russia_22000	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	22,000
KF661087	Switzerland1_14500	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	14,500
KF661088	Alaska_28000	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	28,000
KF661089	Alaska_21000	Thalmann <i>et al.</i> , 2013;	21,000
KF66190	Alaska_20800	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	20,800
KF661091	Switzerland2_14500	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	14,500
KF661095	Switzerland3_14500	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	14,500
<i>Modern samples</i>			
KU644667	YellowstoneA*	This study	Location
KU644665	YellowstoneB*	This study	Yellowstone N.P., USA
KU644663	YellowstoneC*	This study	Yellowstone N.P., USA
KU644664	MexicanWolfA*	This study	Captive Mexican wolf
KU644661	MexicanWolfB*	This study	Captive Mexican wolf
KU644669	China5*	This study	China
KU644666	India2*	This study	India
KU644671	Iran2*	This study	Iran
KU644662	Italy2*	This study	Italy
KU644668	Portugal*	This study	Portugal
KU644670	Spain2*	This study	Spain
KU696388	Bul729	This study	Bulgaria
KU696389	IT9	This study	Italy
KU696390	Bel13	This study	Belarus
KU696391	China282135	This study	China
KU696392	Mongolia1	This study	Mongolia
KU696393	Mongolia2	This study	Mongolia
KU696394	Mongolia3	This study	Mongolia
KU696395	Mongolia4	This study	Mongolia
KU696396	Mongolia5	This study	Mongolia
KU696397	CLUUkraine	This study	Ukraine
KU696398	WCRO7	This study	Croatia
KU696399	CVA354_Bulg	This study	Bulgaria
KU696400	Can1	This study	Alberta, Canada
KU696401	Can2	This study	Alberta, Canada
KU696402	Can3	This study	Alberta, Canada
KU696403	Can4	This study	Alberta, Canada
KU696404	Can5	This study	Alberta, Canada
KU696405	Can6	This study	Alberta, Canada
KU696406	Can7	This study	Alberta, Canada
KU696408	Can8	This study	Alberta, Canada
KU696407	Can9	This study	Alberta, Canada
KU696409	Can10	This study	NWT, Canada
KU696410	Can11	This study	Canada
KU696411	Ala1	This study	Alaska
EU789787	EU789787_China	Pang <i>et al.</i> (2009)	China
GQ374438	Mongolia	Unpublished	Mongolia
AM711902	AM711902_Sweden	Arnason <i>et al.</i> (2007)	Sweden
DQ480507	DQ480507_SaudiArab	Björnerfeldt <i>et al.</i> (2006)	Saudi Arabia
DQ480506	DQ480506_SaudiArab	Björnerfeldt <i>et al.</i> (2006)	Saudi Arabia
DQ480505	DQ480505_Spain	Björnerfeldt <i>et al.</i> (2006)	Spain
KF661038	Finland	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Finland
KF661039	Russia1	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Western Russia
KF661040	Sweden2	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Sweden
KF661041	China3	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	China
KF661042	Israel1	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Israel

Tableau 1. Suite



GenBank	Sample ID*	References	Approximate age (bp)
KF661043	India	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	India
KF661044	Russia2	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Western Russia
KF661045	Poland1	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Poland
KF661046	Russia3	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Western Russia
KF661047	Ukraine	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Ukraine
KF661048	Italy	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Italy
KF661049	Poland2	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Poland
KF661050	Oman	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Oman
KF661051	Iran	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Iran
KF661052	Sweden3	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Sweden
KF661053	China4	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	China
KF661054	Croatia	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Croatia
KF661055	Israel2	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Israel
KF661056	Canada1	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Canada
KF661057	Canada2	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Canada
KF661058	Alaska1	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Alaska
KF661059	Canada4	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Canada
KF661060	Mexico1	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Captive Mexican wolf
KF661061	Canada5	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Canada
KF661062	Canada6	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Canada
KF661063	Canada7	Thalmann <i>et al.</i> , 2013;	Canada
KF661064	USA1	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Contiguous U.S.A.
KF661065	Mexico2	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Captive Mexican wolf
KF661066	Alaska2	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Alaska
KF661067	Alaska3	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Alaska
KF661068	USA2	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Contiguous U.S.A.
KF661069	USA3	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Contiguous U.S.A.
KF661070	USA4	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Contiguous U.S.A.
KF661071	Alaska4	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Alaska
KF661072	Alaska5	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Alaska
KF661073	Alaska6	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Alaska
KF661074	Canada8	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Canada
KF661075	Canada9	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Canada
KF661076	Canada10	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Canada
KF661077	Canada11	Thalmann <i>et al.</i> (2013)	Canada
AB499818	AB499818_Jw229	Matsamura <i>et al.</i> (2014)	Japan
AB499819	AB499819_Jw233	Matsamura <i>et al.</i> (2014)	Japan
AB499820	AB499820_Jw235	Matsamura <i>et al.</i> (2014)	Japan
AB499821	AB499821_Jw237	Matsamura <i>et al.</i> (2014)	Japan
AB499822	AB499822_Jw239	Matsamura <i>et al.</i> (2014)	Japan
AB499823	AB499823_Jw240	Matsamura <i>et al.</i> (2014)	Japan
AB499824	AB499824_Jw257	Matsamura <i>et al.</i> (2014)	Japan
AB499825	AB499825_Jw258	Matsamura <i>et al.</i> (2014)	Japan
DQ480504	DQ480504_Sweden	Björnerfeldt <i>et al.</i> (2006)	Sweden
DQ480503	DQ480503_Russia	Björnerfeldt <i>et al.</i> (2006)	Russia
EU789788	EU789788_China	Pang <i>et al.</i> (2009)	China
KC461238	desertorum_China	Zhang <i>et al.</i> (2014)	China
KC896375	campestris_Mongoli	Zhang <i>et al.</i> (2014)	Mongolia

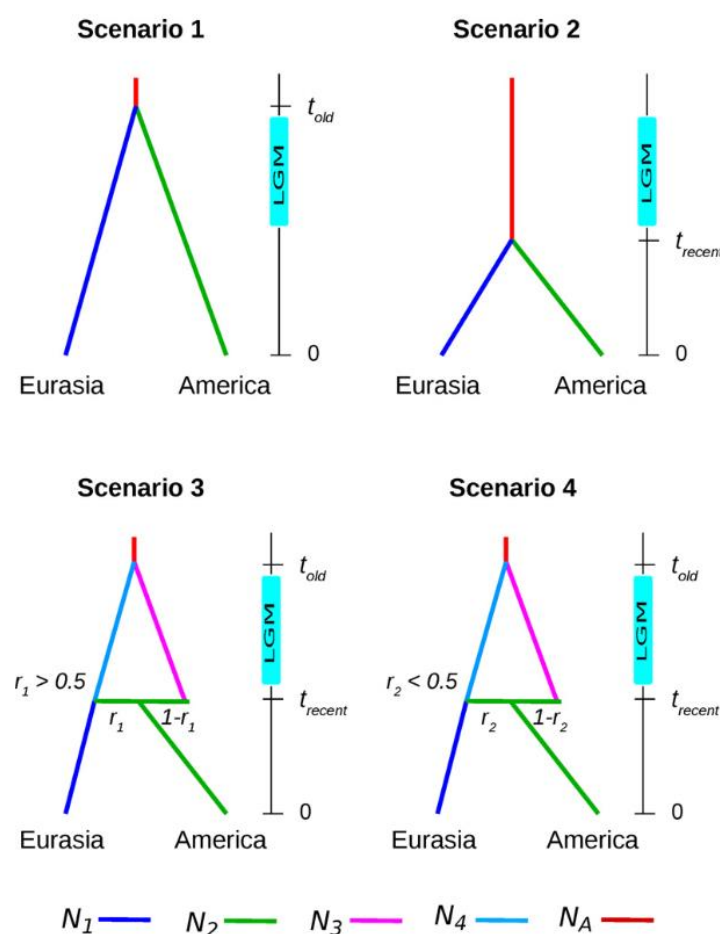
\*Mitogenomes reconstructed from whole-genome shotgun (WGS) sequencing.

Les simulations ABC ont apporté le meilleur soutien au **scénario 1**, une colonisation unique de l'Amérique du Nord pendant la dernière ouverture du détroit de Béring avant la fermeture du corridor du Yukon entre les boucliers glaciaires des Laurentides et de la Cordillère pendant le LGM (voir le Tableau S3 ; la Figure S1 de l'Annexe S1). La probabilité postérieure de ce scénario était de 43,57% (IC à 95% : 42,93-44,21) et ne se chevauchait avec aucun autre scénario. Les **scénarios 2** et 4 ont reçu un soutien égal, mais considérablement plus faible (20,41%, IC 95% : 19,88-20,94% ; et 20,99, IC 95% : 20,50-21,47%). Le scénario 3 était le moins soutenu (15,03%, IC 95% : 14,61-15,46%).

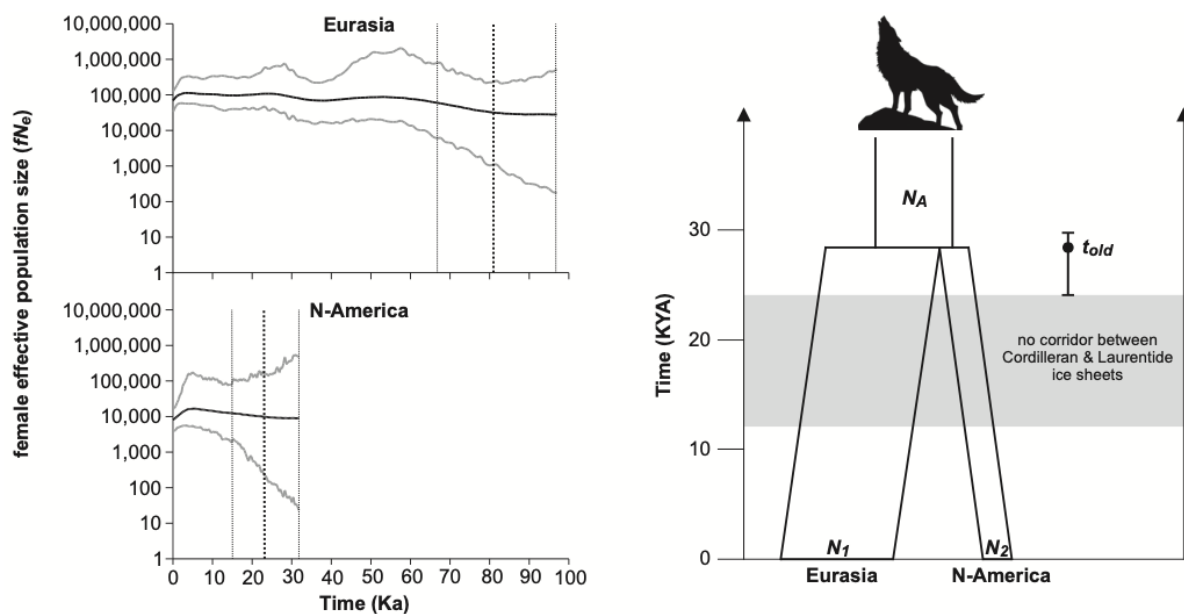
Les analyses de puissance basées sur les ensembles de données de test simulées dans le cadre des quatre scénarios ont indiqué que la méthode a une puissance assez élevée pour distinguer les scénarios concurrents, compte tenu du fait que les scénarios testés sont très similaires et couvrent une échelle de temps très courte (voir le Tableau S4 de l'Annexe S1). Les erreurs de type II n'étaient

relativement importantes que dans les simulations du scénario 4, ce qui est prévisible étant donné que ce scénario est assez similaire au meilleur scénario, car il suppose seulement de faibles niveaux d'immigration de l'Eurasie vers l'Amérique du Nord continentale après l'émergence d'un corridor libre de glace à la fin du LGM (Fig. 2).

Les implications des résultats de l'ABC sont doubles. **Premièrement**, les haplotypes uniques aux loups Mexicains ne remontent pas à une vague de colonisation antérieure à celle des autres loups d'Amérique du Nord. **Deuxièmement**, la diversité mitochondriale présente chez les loups d'Amérique du Nord a été entièrement remplacée par des haplotypes de loups ayant envahi l'Amérique du Nord avant la fusion des calottes glaciaires de la Cordillère et des Laurentides au LGM (vers 24 ka). Notre analyse suggère une coalescence de ces haplotypes envahisseurs vers 80 ka, ce qui est beaucoup plus récent que l'apparition de formes semblables aux loups dans les archives fossiles.



**Figure 2.** Représentation graphique des quatre scénarios alternatifs simulés avec DIYABC. Le scénario 1 suppose que les loups d'Amérique du Nord se sont séparés des loups d'Eurasie en raison de la fermeture d'un corridor libre de glace entre les inlandsis de la Cordillère et des Laurentides au cours du dernier maximum glaciaire (LGM) (vers 24 ka). Le scénario 2 suppose que la diversité mitogénomique actuelle des loups gris d'Amérique du Nord remonte à la colonisation de l'Amérique du Nord continentale après la réouverture du corridor entre les calottes glaciaires de la Cordillère et des Laurentides à la fin du LGM (vers 13 ka). Les scénarios 3 et 4 supposent deux vagues de colonisation de l'Amérique du Nord continentale (l'une avant le LGM, l'autre après la formation du corridor libre de glace à la fin du LGM), mais avec des taux de mélange différents.  $t_{old}$  et  $t_{recent}$  indiquent les moments de séparation des populations avant ou après le LGM respectivement.  $N_1, N_2, N_3, N_4, N_A$  se réfèrent aux différentes tailles effectives de population à travers le temps ;  $r_1$  et  $r_2$  indiquent différents taux de mélange. Pour plus de détails, voir le Tableau S1 de l'annexe S1



**Figure 3.** (a) Diagrammes de la grille de ciel bayésienne montrant les estimations de la taille effective passée des populations de loups femelles en Eurasie (panneau supérieur) et en Amérique du Nord (panneau inférieur) ; (b) meilleur scénario déduit par DIYABC (largeur des branches proportionnelle aux valeurs modales déduites de la taille de la population ; voir le Tableau S2 de l'Annexe S1)

## DISCUSSION

Le registre fossile est considérablement antérieur à l'ancêtre commun le plus récent mitochondrial présumé des loups gris nord-Américains actuels (Tedford et al., 2009), ce qui implique le remplacement des haplotypes originaux par de nouveaux loups gris potentiellement plus performants ou à la suite d'une extinction à l'échelle du continent. Comme aucune lacune apparente n'est identifiée dans le registre fossile, le remplacement des haplotypes originaux par de nouveaux haplotypes suggère un déplacement compétitif, surtout si l'on considère la possibilité d'un métissage de loups anciens et envahisseurs. En effet, sur la base de courts fragments de la région de contrôle mitochondriale, le remplacement complet et presque complet d'un haplogroupe mitochondrial a été précédemment rapporté pour les loups gris de l'Est du Béringien (Alaska) et d'Eurasie respectivement (Leonard et al., 2007 ; Pilot et al., 2010). Notre phylogénie du **mitogénome** soutient également cette hypothèse, car les haplotypes de loups anciens occupent pour la plupart des positions basales par rapport aux séquences de loups modernes (Fig. 1). Il est également possible que les loups anciens aient souffert d'une extinction et qu'ils aient été remplacés si rapidement que cette extinction n'a pas été détectée dans les archives fossiles.

Une baisse du niveau de la mer d'environ 50 m est nécessaire pour exposer le pont terrestre de Bering, qui s'est produit pendant la glaciation du Wisconsinien vers 70-10 ka. Pendant la majeure partie de cette période, le pont terrestre était plus large que pendant les périodes précédentes, et a potentiellement soutenu une population de loups **panmictique** allant de l'Eurasie à l'Amérique du Nord, ou du moins a permis un flux génétique important entre les continents. Vers 24 ka, le flux génétique entre le sud de l'Amérique du Nord et la Béringie (et donc l'Eurasie) a cessé avec la fusion des calottes glaciaires de la Cordillère et des Laurentides. Les loups ont survécu à la fois au nord et au sud des calottes glaciaires jusqu'à la fin du Pléistocène. Cependant, au nord des calottes glaciaires, on n'a trouvé qu'un **écotype** de loup hypercarnivore spécialisé qui s'est ensuite éteint (Leonard et al., 2007). Par conséquent, au fur et à mesure que les calottes glaciaires se retiraient entre 12 et 6 ka, les loups du sud ont progressivement recolonisé les zones anciennement glacées d'Amérique

du Nord. Par conséquent, tous les loups gris d'Amérique du Nord descendent des loups qui se trouvaient au sud des nappes glaciaires pendant le LGM. La différenciation entre les loups Mexicains et les autres lignées de loups en Amérique du Nord pourrait être le résultat d'une divergence avant l'invasion et/ou d'une structure de population en Amérique du Nord déterminée par des facteurs environnementaux (vonHoldt et al., 2011 ; Leonard, 2014). De plus, une grande partie de la distribution historique des loups en Amérique du Nord ainsi que leur diversité génétique unique ont été perdues en raison des efforts de contrôle des prédateurs et de la modification de l'habitat au cours du 20<sup>ème</sup> siècle (Leonard et al., 2005).

Les dates de colonisation d'Hokkaido et des îles du sud du Japon correspondent à des niveaux de mer bas qui impliquent la présence de ponts terrestres, ce qui était nécessaire pour la colonisation de ces îles. Avec une profondeur moyenne de 20-40 m, le détroit de Soya qui sépare Hokkaido de Sakhaline (Russie continentale) était en grande partie sec au cours des 75 kyr précédents. Néanmoins, à en juger par les deux séquences mitogénomiques disponibles (Matsamura et al., 2014), **Hokkaido ne semble avoir été colonisée que très récemment** (Fig. 1). Le tri différentiel récent des lignées à Hokkaido et en Amérique du Nord dû à la dérive génétique pourrait avoir entraîné une plus grande similarité génétique aujourd'hui qu'avant la fermeture du pont terrestre, lorsque Hokkaido faisait partie d'une population holarctique beaucoup plus importante et contenait une plus grande diversité d'haplotypes. Malheureusement, la petite taille de l'échantillon ( $n = 2$ ) du loup ézoïque disparu d'Hokkaido ne permet pas d'évaluer plus avant les scénarios alternatifs. Bien qu'il semble que les îles du sud du Japon aient été colonisées bien plus tôt au cours du dernier cycle glaciaire, la bathymétrie du détroit de Corée et les changements du niveau de la mer reconstitués impliquent que le sud du Japon a été colonisé  $< 20$  ka (Fig. 1). En effet, le MRCA du loup Japonais date de cette époque. Le fait qu'aucun proche parent du loup du sud du Japon n'ait été trouvé pourrait être lié à l'apparente rotation rapide des haplogroupes mitochondriaux généralement observée dans toute la distribution de l'Ancien Monde (Fig. 1 ; Pilot et al., 2010). Ces résultats suggèrent qu'un schéma similaire se retrouverait chez les loups historiques des îles britanniques, qui étaient également connectés à l'Eurasie continentale au Pléistocène. Les îles plus proches des sources continentales ne semblent pas avoir besoin de ponts terrestres pour la colonisation (Munoz-Fuentes et al., 2010), car au moins certaines populations de loups traversent d'étroites étendues d'océan ouvert à la nage (Darimont & Paquet, 2002 ; Munoz-Fuentes et al., 2009).

En conclusion, nos résultats soutiennent la dispersion intercontinentale des loups pendant les peuplements de bas niveau de la mer et suggèrent une coalescence bien plus récente des mitogénomes de loups que ne le prédisent les archives fossiles. Ainsi, les loups existants représentent un placage génétique recouvrant une histoire complexe de renouvellement et d'évolution. Nous constatons que les loups gris qui occupent aujourd'hui l'Amérique du Nord représentent une migration récente, les traces génétiques des événements migratoires précédents ayant été effacées du paysage. Cette origine étonnamment récente de la diversité mitochondriale du loup gris moderne en Amérique du Nord contraste avec la plus grande antiquité des haplotypes de coyotes en Amérique du Nord (Vila et al., 1999 ; Koblmüller et al., 2012).