Variabilité génétique du loup gris *Canis lupus* dans le Caucase en comparaison avec l'Europe et le Moyen-Orient : Une population distincte ou intermédiaire ?

OPEN ACCESS Freely available online April 2014 | Volume 9 | Issue 4 | e93828 PLOS ONE

Genetic Variability of the Grey Wolf *Canis lupus* in the Caucasus in Comparison with Europe and the Middle East: Distinct or Intermediary Population?

Małgorzata Pilot[1], Michał J. Dąbrowski[2,8], Vahram Hayrapetyan[3], Eduard G. Yavruyan[4], Natia Kopaliani[5], Elena Tsingarska[6], Barbara Bujalska[2], Stanisław Kamiński[7], Wiesław Bogdanowicz[2]*

1 School of Life Sciences, University of Lincoln, Brayford Pool, Lincoln, United Kingdom, **2** Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences, Warszawa, Poland, **3** Stepanakert Branch of the Armenian National Agrarian University, Stepanakert, Armenia, **4** Scientific Centre of Zoology and Hydroecology, National Academy of Sciences of Armenia, Yerevan, Armenia, **5** Institute of Ecology, Ilia State University, Tbilisi, Georgia, **6** BALKANI Wildlife Society, Sofia, Bulgaria, **7** Department of Animal Genetics, University of Warmia and Mazury, Olsztyn, Poland, **8** Department of Cell and Molecular Biology, Science for Life Laboratory, Uppsala University, Uppsala, Sweden

Résumé

Malgré une distribution historique continue du loup gris (*Canis lupus*) dans toute l'Eurasie, l'espèce présente une différenciation morphologique considérable qui a conduit à la délimitation d'un certain nombre de sous-espèces. Cependant, ces discontinuités morphologiques ne sont pas toujours cohérentes avec les modèles de différenciation génétique. Nous évaluons ici la spécificité génétique des loups gris du Caucase (une région à la frontière entre l'Europe et l'Asie occidentale) qui ont été classés comme une sous-espèce distincte *C. l. cubanensis*. Nous avons analysé leur variabilité génétique sur la base de la région de contrôle de l'ADNmt, des loci microsatellites et des génotypes SNP à l'échelle du génome (obtenus pour un sous-ensemble des échantillons), et avons trouvé des niveaux de diversité génétique similaires ou supérieurs à tous ces types de loci par rapport aux autres populations Eurasiennes. Bien que nous n'ayons trouvé aucune preuve d'un goulot d'étranglement génétique récent, les modèles de déséquilibre de liaison à l'échelle du génome suggèrent un déclin démographique à long terme dans la population Caucasienne - une tendance cohérente avec les autres populations Eurasiennes. Les loups Caucasiens partagent des haplotypes d'ADNmt avec les loups d'Europe de l'Est et d'Asie de l'Ouest, ce qui suggère un flux génétique passé ou en cours. Les données microsatellites suggèrent également un flux génétique entre le Caucase et l'Europe de l'Est. Nous avons trouvé des preuves d'un **métissage modéré** entre les loups Caucasiens et les chiens domestiques, à un niveau comparable à celui des autres populations Eurasiennes. Dans l'ensemble, nos résultats montrent que les loups Caucasiens ne sont pas génétiquement isolés des autres populations Eurasiennes, qu'ils partagent avec elles les mêmes tendances démographiques et qu'ils sont affectés par des problèmes de conservation similaires.

INTRODUCTION

Le loup gris *Canis lupus* est un prédateur supérieur dans les écosystèmes terrestres de la **zone Holarctique**, et tous les aspects de sa biologie ont été largement étudiés (voir [1] et [2] pour une revue). Cependant, la répartition géographique de ces études a été considérablement biaisée, la majorité d'entre elles étant axées sur les loups d'Amérique du Nord et d'Europe. Les études sur les loups d'Asie ont été relativement rares (à l'exception des études sur la domestication des chiens, qui n'étaient pas explicitement axées sur les loups), mais elles ont contribué de manière substantielle à nos connaissances sur cette espèce. Par exemple, deux lignées distinctes d'ADNmt ont été

découvertes en Inde et dans l'Himalaya [3-5], qui sont basales par rapport aux autres lignées de loups gris dans le monde. Une autre lignée distincte a été découverte au Japon [6]. Des études sur la diversité morphologique ont également permis d'identifier une variété de types distincts de loups gris en Asie, ce qui a constitué une base pour la délimitation des sous-espèces (voir [7] pour une revue).

Le **Caucase** est situé à la frontière géographique entre l'Europe et l'Asie, la chaîne de montagnes du Grand Caucase constituant à la fois des frontières biogéographiques et politiques. Cette région est située dans l'aire de répartition continue du loup gris et relie les populations de la Russie Européenne à celles de l'Asie occidentale (Moyen-Orient). Malgré la continuité de l'aire de répartition, une variabilité morphologique considérable a été signalée chez les loups gris de cette région [7]. Les loups Caucasiens ont été assignés à une sous-espèce distincte *C. l. cubanensis* Ognev, 1923 [8]. Au nord du Caucase, on trouve la sous-espèce nominale *C. l. lupus*, dont l'aire de répartition est étendue à l'Europe de l'Est et à l'Asie du Nord [7]. Au sud du Caucase, on a décrit une autre sous-espèce, *C. l. pallipes* Sykes, 1831 [9], dont l'aire de répartition couvre le sud-ouest de l'Asie, de la Turquie et d'Israël à l'Inde [10].

Dans certaines régions, les sous-espèces de loups gris définies sur la base de la différenciation morphologique présentent un niveau élevé de distinction génétique, par exemple les loups Ibériques *C. l. signatus* Cabrera, 1907 [11] et les loups Italiens *C. l. italicus* Altobello, 1921 [12] sont génétiquement distincts des loups d'Europe de l'Est (*C. l. lupus*) [13-15]. Par conséquent, sur la base de la distinction morphologique des loups Caucasiens, on peut s'attendre à ce qu'ils soient génétiquement distincts des populations voisines de loups de Russie et du Moyen-Orient. D'un autre côté, il existe également des cas où la délimitation morphologique des sous-espèces est incompatible avec les données génétiques - par exemple, les loups de l'Himalaya appartiennent à une lignée d'ADNmt unique pour cette région et distincte des autres lignées de loups Eurasiens [3-5], mais sur la base de la morphologie, ils ont été classés dans la sous-espèce *C. l. chanco*, qui a une large aire de répartition en Chine et en Mongolie.

On sait peu de choses sur l'histoire des populations de loups du Caucase et sur leur parenté génétique avec les autres populations de loups d'Eurasie. La région du Caucase est considérée comme un important **refuge glaciaire** pour les espèces végétales et animales tempérées, au même titre que les refuges Ibérique, Apennin et Balkanique en Europe [16-18]. Cependant, le loup gris n'est pas une espèce tempérée typique. Il était présent au nord des **refuges glaciaires** Européens au Pléistocène supérieur [19] et faisait partie de la faune des steppes du Pléistocène [20], de sorte que l'importance des **refuges glaciaires** pour l'histoire de l'évolution de cette espèce est incertaine. Les schémas contemporains de la distribution des haplotypes de l'ADNmt sont incompatibles avec la division phylogéographique en **refuges glaciaires** ; au contraire, deux haplogroupes principaux se chevauchent spatialement dans toute l'Eurasie, et leurs origines géographiques ne sont pas claires [21]. Le séquençage du **mitogénome** d'anciens canidés ressemblant à des loups a révélé une autre lignée ancienne, mais elle n'a été détectée que chez trois spécimens de la fin du Pléistocène en Belgique et n'a pas été trouvée chez les loups contemporains [22]. L'un des haplogroupes contemporains, **l'haplogroupe 2**, était fréquent chez les loups Européens à la fin du Pléistocène et au début de l'Holocène, mais sa fréquence a ensuite diminué. Aujourd'hui, **l'haplogroupe 2** est abondant en Italie, dans les Balkans et dans les Carpates, mais rare ailleurs en Europe [21]. En Asie, seuls quatre haplotypes d'ADNmt identifiés jusqu'à présent appartiennent à cet haplogroupe [21],

et deux d'entre eux se trouvent au Moyen-Orient [23]. La composition haplotypique des loups Caucasiens peut donc éclairer l'histoire phylogéographique des loups en Eurasie.

Une étude récente de Kopaliani et al. [24] a révélé que les loups gris de Géorgie (Caucase du Sud) partagent des haplotypes d'ADNmt communs avec les chiens domestiques vivant en liberté dans cette région (chiens de protection du bétail et chiens bâtards). Ceci a été interprété comme le résultat d'une hybridation récente, et l'analyse des loci nucléaires microsatellites a révélé que 13% des loups et plus de 10% des chiens ont une ascendance **mixte** [24]. **L'introgression** de gènes provenant de chiens peut biaiser l'interprétation des modèles phylogéographiques et la reconstruction de l'histoire de l'évolution des loups dans le Caucase et dans le monde. Cependant, le rétrocroisement dans la population de loups peut être dominé par des hybrides maternés et élevés par des loups femelles, ce qui n'a aucun effet sur la composition de l'ADNmt. Par conséquent, les haplotypes d'ADNmt partagés sont plus susceptibles de provenir de loups contemporains plutôt que de chiens (alors qu'en fin de compte, ils dérivent tous de loups anciens).

Dans cette étude, nous analysons la variabilité génétique des loups gris du Caucase par rapport à d'autres populations d'Europe et du Moyen-Orient afin d'évaluer si leur spécificité morphologique se reflète dans la variabilité génétique. Nous reconstituons également les changements démographiques passés des loups Caucasiens pour évaluer s'ils suivent ou non les tendances reconstituées pour les populations de loups Européennes [15] afin de comprendre si les loups Caucasiens constituent une population démographiquement indépendante. En outre, nous nous penchons sur la question de l'hybridation entre les loups et d'autres grands canidés en liberté dans le Caucase.

MATERIEL ET METHODES

Zone d'étude et collecte des échantillons

Notre principale zone d'étude était le sud du Caucase, mais - à des fins de comparaison - nous avons également analysé les populations de loups gris de Bulgarie et d'Espagne (Figure 1A). Dans le sud du Caucase, nous nous sommes concentrés sur deux régions : la Géorgie et le Nagorno-Karabakh. La Géorgie est située dans le sud-ouest du Caucase, sur le versant sud de la chaîne de montagnes du Grand Caucase (Figure 1B). Environ deux tiers du pays est montagneux - l'altitude moyenne est de 1 200 m au-dessus du niveau de la mer (a.s.l.), l'altitude la plus élevée étant de 5 184 m a.s.l. La plupart des échantillons de loups de Géorgie proviennent de trois régions : Kazbegi, Svaneti et Colchis. Les régions de Kazbegi et de Svaneti sont situées dans les parties orientale et occidentale de la chaîne de montagnes du Grand Caucase central. La région de Colchis est située dans les plaines de l'Est de la Géorgie qui s'étendent jusqu'à la mer Noire. La densité humaine moyenne en Géorgie est de 65,4/km^2.

Le Nagorno-Karabakh est situé au sud-Est de la chaîne de montagnes du Petit Caucase (Figure 1B). La majeure partie de la région est montagneuse, et la densité humaine est faible - 29/km^2. Même dans les basses terres, la densité humaine est relativement faible et il existe de vastes zones inhabitées par l'homme. La plupart des échantillons de loups ont été collectés dans trois régions : Martakert, Kashatakh et Hadrut. Les régions de Martakert et de Kashatakh sont montagneuses, avec des sommets atteignant 3 000-3 500 m d'altitude. La région de Hadrut est montagneuse dans sa partie nord-Est, tandis que dans sa partie sud se trouvent les basses terres de la rivière Araks, couvertes de prairies et de pâturages.

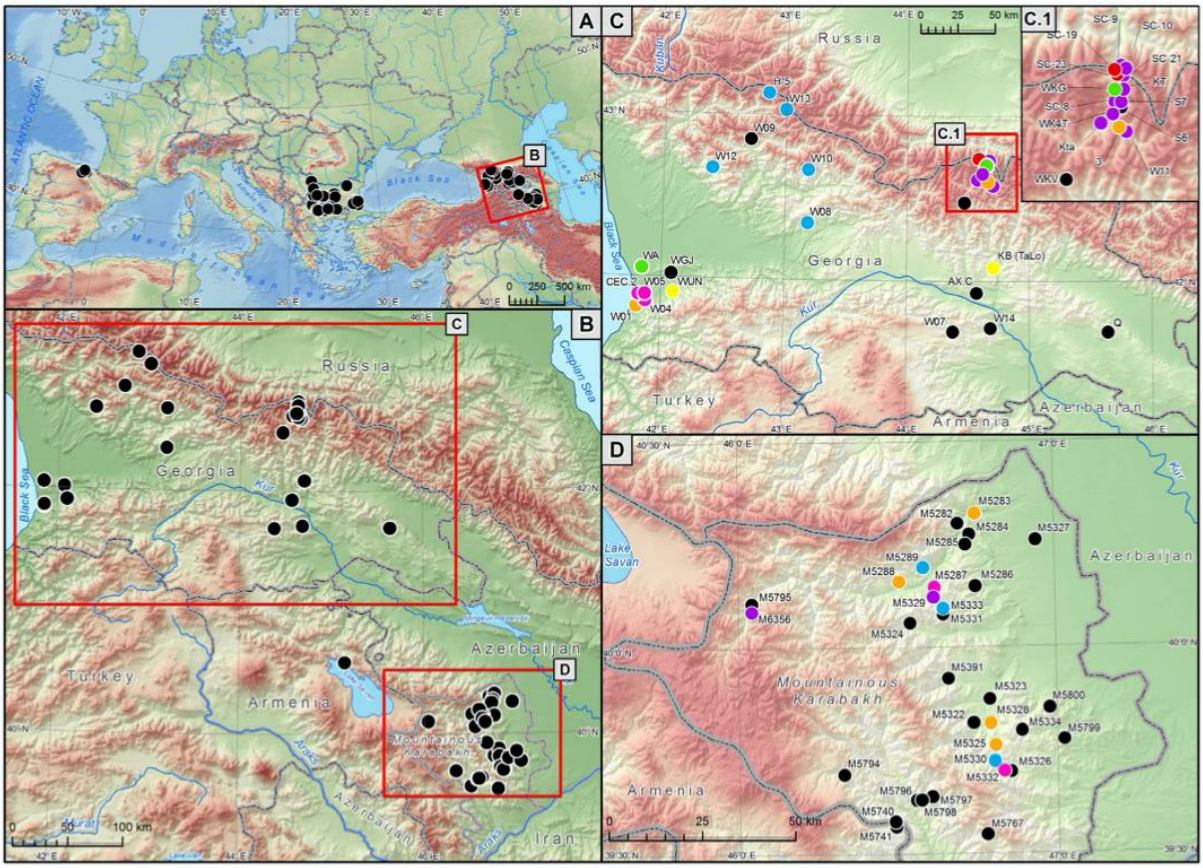

Figure 1. (**A**) Localisation géographique de la population de loups gris du Caucase par rapport aux populations Bulgares et Espagnoles analysées à des fins de comparaison ; (**B**) Distribution des échantillons dans le Caucase ; (**C**) Distribution des individus étroitement apparentés identifiés parmi les loups échantillonnés en Géorgie et (**D**) dans le Nagorno-Karabakh. Chaque couleur représente un groupe de parenté, et les individus sans parenté échantillonnée sont marqués en noir. doi:10.1371/journal.pone.0093828.g001

La végétation naturelle du Caucase varie en fonction de l'altitude : la zone située en dessous de 1 800 m d'altitude est couverte de forêts de feuillus, de forêts mixtes et de conifères, la zone située entre 1 800 et 3 000 m d'altitude est couverte de végétation subalpine et alpine, et les hauts sommets sont couverts de glaciers. Le Nagorno-Karabakh possède également des zones semi-désertiques et désertiques dans certaines régions de plaine. Le biome semi-désertique est également présent dans les plaines de la Géorgie orientale.

En Géorgie, les proies potentielles des loups parmi les ongulés sauvages sont le cerf rouge (*Cervus elaphus maral*), le chevreuil (*Capreolus capreolus*), le sanglier (*Sus scrofa*) et le chamois (*Rupicapra rupicapra*). Les turs (*Capra cylindricornis* et *Capra caucasica*) et la chèvre bezoar (*Capra aegagrus*) habitent en haute altitude et deviennent rarement des proies du loup [25]. Dans le Haut-Karabakh, la communauté des ongulés est relativement différente, puisque le mouton sauvage (*Ovis ammon*) est présent, tandis que deux espèces de turs (*C. caucasica* et *C. cylindricornis*) sont absentes. Le chamois et le mouton sauvage sont rares, et la chèvre bézoard *C. aegagrus* est plus abondante. Dans certaines régions (par exemple, la plaine de Colchis et la région de Kazbegi en Géorgie), les ongulés domestiques (vaches, moutons, chèvres, ânes, chevaux) sont les principales proies des loups. La proie non ongulée la plus commune dans le Caucase du Sud est le lièvre brun *Lepus europaeus*, et dans le Nagorno-Karabakh également le porc-épic *Hystrix leucura*. Outre le loup gris, deux autres espèces de canidés ressemblant à des loups sont présentes dans le sud du Caucase, le chacal doré (*Canis aureus*) et le chien domestique en liberté (*Canis lupus familiaris*) [E. G. Yavruyan, données non publiées].

Nous avons obtenu 65 échantillons de loups gris dans le sud du Caucase : 33 de Géorgie, 31 du Nagorno-Karabakh et un d'Arménie (Figure 1B). La majorité des échantillons (n = 50 ; 77%) étaient des tissus musculaires ou cutanés. Les échantillons restants (de Géorgie et d'Arménie) étaient des poils (n = 7 ; 11%) et des fèces (n = 8 ; 12%). Les échantillons de tissus musculaires et cutanés ont été obtenus à partir d'individus tués légalement par des chasseurs locaux. En Géorgie, la chasse au loup est interdite en général, mais des autorisations sont accordées pour tuer des individus ou des meutes particulières impliquées dans des attaques sur le bétail. Les échantillons ont été collectés entre 2008 et 2012.

Nous avons également analysé des échantillons de tissus de loups gris provenant de Bulgarie (appartenant à la sous-espèce nominale *C. l. lupus* ; n = 124) et d'Espagne (*C. l. signatus* ; n = 12), afin de comparer directement leur variabilité génétique avec celle des loups Caucasiens et d'estimer le niveau de leur diversification. Ces échantillons ont été collectés entre 2000 et 2012. Quatre-vingt-douze échantillons Bulgares ont déjà été génotypés pour les besoins d'études antérieures [26], [27], tandis que les échantillons restants ont été génotypés dans cette étude.

Afin de vérifier la présence d'individus **métissés** parmi les loups gris Caucasiens, nous avons inclus dans l'analyse 14 chiens domestiques en liberté et trois chacals dorés de Bulgarie, génotypés par Moura et al [27] pour les mêmes loci microsatellites que dans cette étude. Nous avons également génotypé un échantillon de chacal doré provenant du sud du Caucase (Nagorno-Karabakh). Idéalement, nous aurions dû utiliser dans cette analyse un grand nombre d'échantillons de chiens en liberté et de chacals dorés provenant des mêmes régions que les loups gris, mais nous n'avons pas eu accès à de tels échantillons. Notre ensemble de données était suffisant pour identifier les individus **métissés** (hybrides F1/F2) et les exclure de l'analyse ultérieure des données, mais pour une analyse détaillée des schémas d'hybridation parmi les canidés de type loup dans le Caucase, un échantillonnage plus important est nécessaire.

Déclaration d'éthique

Les échantillons de tissus utilisés dans cette étude ont été prélevés sur des individus tués dans le cadre d'une chasse légale, sur des animaux tués sur la route ou sur des individus morts de causes naturelles. Aucun animal n'a été tué dans le cadre de cette étude.

Procédures de laboratoire…

Analyse de métissage et de la structure de la population des loups Caucasiens basée sur les loci microsatellites…

Analyse de la parenté…

Analyse de la variabilité génétique et des schémas démographiques à partir de loci microsatellites…

Analyse de la variabilité génétique, des schémas démographiques et de la structure de la population à partir de l'ADNmt…

Reconstruction des changements démographiques à partir de données SNP à l'échelle du génome…

Tableau 1. Fréquence des haplotypes d'ADNmt dans le Caucase, et distribution de ces haplotypes en Eurasie

Haplotype	GenBank accession no.	Frequency	Other locations
w4	FJ978010	0.200	Belarus, Ukraine, Russia, Romania, Bulgaria, Greece
w7C	KJ195895	0.025	unique for the Caucasus
w10B	FJ978020	0.250	Poland, Russia, Croatia, Bulgaria, Greece, Turkey
w29	KJ490942	0.050	Israel
w32A	KJ490944	0.100	Saudi Arabia, Iran, India
w32B	DQ480507	0.075	Saudi Arabia, Iran, India
w47	KJ490943	0.125	Iran
w76	KJ195896	0.050	unique for the Caucasus
w77	KJ195897	0.125	unique for the Caucasus

RESULTATS

Métissage entre canidés de type loup Caucasien

L'analyse STRUCTURE de l'ensemble de données constitué de loups gris Caucasiens, de chiens et de chacals a identifié la subdivision en trois clusters ($K = 3$) correspondant aux trois espèces comme étant la structure génétique la plus probable. Les chiens ont été affectés au groupe des chiens avec une probabilité de 0,96-0,99, et les chacals ont été affectés au groupe des chacals avec une probabilité de 0,94-0,99 (Tableau 2). La majorité (75%) des loups gris Caucasiens ont été assignés au groupe des loups avec une probabilité supérieure à 0,95, et 12,5% avec une probabilité de 0,90-0,95. Nous avons également examiné l'affectation des loups gris au groupe des chiens et au groupe des chacals.

Huit individus identifiés morphologiquement comme des loups gris (12,5%) ont été assignés au groupe des chiens avec une probabilité comprise entre 0,14 et 0,70 (Tableau 2 ; Figure S1 du Fichier S1). Pour cinq de ces individus, les probabilités d'affectation aux clusters loup et chien étaient proches de 0,3 : 0,7, ou inversement (Tableau 2), et leur statut d'hybride de première génération ou de **rétrocroisement** était donc ambigu. Ces individus étaient porteurs de cinq haplotypes d'ADNmt différents (Tableau 2), tous trouvés chez des loups gris non métissés. Un seul de ces haplotypes (**w4**) a également été signalé dans la GenBank comme haplotype d'un chien domestique (du Japon ; numéro d'accession GenBank AB605514). Les individus métissés ont été retirés des analyses de la variabilité génétique et de la structure de la population.

Presque tous les loups gris ont été assignés au groupe des chacals avec une probabilité inférieure à 0,025. Un individu a été assigné à chacun des trois clusters avec une vraisemblance similaire (0.32-0.34). Le même niveau de métissage pour les trois espèces n'est pas réaliste ; ce résultat peut indiquer que cet individu est une aberration génétiquement distincte des loups gris Caucasiens, mais il ne peut être considéré comme une preuve d'hybridation loup/chacal. Un autre individu qui a été morphologiquement attribué au loup gris, a été attribué au groupe des chacals avec une probabilité de 0,94, et son haplotype d'ADNmt (numéro d'accession GenBank KJ490945) s'est regroupé avec les haplotypes de chacal doré publiés avec une similarité de 99% (AF184048 [63] : 575/577 match, AY289996 [4] : 610/619 match, AY289996 [4] : 606/615 match). Cet individu a été exclu de l'analyse de la variabilité génétique des loups Caucasiens.

Analyse de la parenté

Parmi les échantillons de loups Caucasiens, nous avons identifié 11 groupes de parents proches (parents et progéniture ou frères et sœurs complets). Ces résultats étaient très cohérents entre les analyses CERVUS et KINGROUP : > 85% des paires parents-reproducteurs et des frères et sœurs

identifiés dans CERVUS ont également été identifiés dans KINGROUP comme parents-reproducteurs ou frères et sœurs. Les groupes de parenté identifiés étaient composés de 2 à 9 individus, et dans chaque groupe, soit tous les individus, soit tous sauf un, portaient le même haplotype d'ADNmt, ce qui suggère que ces groupes pourraient être des meutes (avec un ADNmt partagé entre une mère et sa progéniture).

Ceci est particulièrement probable dans le cas des échantillons fécaux de Géorgie, qui ont été sélectionnés à partir d'un ensemble plus large de fèces collectées dans de petites zones, dont la distribution spatiale était cohérente avec les frontières des territoires de meute [Kopaliani N, Gurielidze Z, Tevzadze G, Shaqarashvili M, Qurkhuli T, et al., données non publiées]. Cependant, dans de nombreux cas, les individus apparentés ont été échantillonnés dans des lieux géographiques éloignés (Figure 1C, D), ce qui suggère que certains membres des groupes de parenté se sont dispersés de leur meute natale. L'un de ces groupes de parenté comprenait 4 des 8 individus ayant une ascendance métisse loup-chien, ce qui suggère qu'ils représentent un événement d'hybridation plutôt que 4 événements indépendants.

Tableau 2. Probabilités d'assignation des individus aux trois clusters génétiques estimés dans STRUCTURE

Individuals	Wolf cluster	Dog cluster	Jackal cluster	mtDNA haplotypes of admixed individuals	Probable status
grey wolves	0.904–0.993	0.004–0.083	0.003–0.025	-	-
domestic dogs	0.003–0.035	0.962–0.995	0.002–0.014	-	-
golden jackals	0.003–0.036	0.002–0.007	0.957–0.996	-	-
				gj1 (golden jackal)	
misidentified jackal	0.042	0.015	0.943	KJ490945	golden jackal
				w77 (wolf)	
admixed individual W13	0.294	0.699	0.008	KJ195897	F1/F2 wolf-dog hybrid
				w4 (wolf/dog)	
admixed individual W08	0.348	0.644	0.008	FJ978010, AB605514	F1/F2 wolf-dog hybrid
				w77 (wolf)	
admixed individual W10	0.668	0.326	0.007	KJ195897	F1/F2 wolf-dog hybrid
				w77 (wolf)	
admixed individual H-5	0.694	0.299	0.007	KJ195897	F1/F2 wolf-dog hybrid
				w4 (wolf/dog)	
admixed individual 5284	0.700	0.281	0.019	FJ978010, AB605514	F1/F2 wolf-dog hybrid
				w76 (wolf)	
admixed individual 5796	0.776	0.210	0.013	KJ195896	F2 wolf-dog hybrid
				w32A (wolf)	
admixed individual 5799	0.860	0.137	0.004	KJ490944	F2/F3 wolf-dog hybrid
				w10B (wolf)	
admixed individual W09	0.343	0.338	0.319	FJ978020	unknown

Pour les individus **mélangés**, les haplotypes d'ADNmt, les espèces auxquelles ils correspondent (voir le commentaire dans les informations supplémentaires) et les numéros d'accession GenBank, ainsi que le statut de mélange probable sont également fournis. L'**haplotype w4** a été trouvé à la fois chez les loups gris et les chiens domestiques. Un « chacal mal identifié » est un individu échantillonné comme un loup gris qui se regroupe avec des chacals dorés et qui porte un haplotype d'ADNmt de chacal doré. doi:10.1371/journal.pone.0093828.t002

Diversité génétique au niveau des loci microsatellites et différenciation des populations de loups du Caucase, des Balkans et de la péninsule Ibérique

La diversité génétique de chaque population de loups a été estimée pour un ensemble de données constitué de loups gris non apparentés et non métissés. Dans le Caucase, le nombre moyen d'allèles par locus et l'hétérozygotie attendue étaient similaires à ceux de la Bulgarie, mais l'hétérozygotie observée était plus élevée par rapport à la Bulgarie, et par conséquent le **coefficient de consanguinité** F_{IS} était plus faible (Tableau 3). En Espagne, tous les indices de diversité étaient plus faibles que dans le Caucase et en Bulgarie (Tableau 3).

Tableau 3. Diversité génétique des loups Caucasiens en comparaison avec les populations de loups d'Europe du Sud

Region (*n* samples)	mtDNA			microsatellite loci					Source
	n haplotypes (sequence length)	Haplotype diversity	Nucleotide diversity	*n* alleles per locus (SE)	H_O (SE)	H_E (SE)	F_{IS} (SE)	N_E (LDNe)	N_E (Ne Estimator)	
Caucasus (43)	9 (660 bp)	0.87	0.012	7.8 (0.8)	0.690 (0.033)	0.749 (0.031)	0.068 (0.020)	100	88	this study
Bulgaria (74)	11 (660 bp)	0.87	0.016	7.9 (0.9)	0.624 (0.032)	0.749 (0.026)	0.167 (0.023)	164	145	this study
Spain (7)	2 (660 bp)	0.29	0.004	2.9 (0.2)	0.505 (0.055)	0.547 (0.035)	−0.030 (0.100)	-	-	this study
Spain (47)	3 (333 bp)	0.56	0.010	5.5	0.525	0.645	0.177	43	54	[52]
Italy (103)	1 (546 bp)	0	0	4.4	0.44	0.49	0.10	-	-	[13]
Italy (435)	-	-	-	4.1–5.4	0.59–0.62	0.59–0.64	0.018–0.037	-	-	[76]

doi:10.1371/journal.pone.0093828.t003

Le test global pour l'équilibre de Hardy-Weinberg a indiqué un déficit d'hétérozygotes dans les populations Caucasiennes et Bulgares (P<0,0001 dans les deux cas), et aucune déviation de l'équilibre dans la population Espagnole (P = 0,19).

Le F_{ST} par paire entre les loups Caucasiens et Bulgares était relativement faible (0,024) comparé au F_{ST} par paire entre chacune de ces populations et les loups Espagnols (0,107 et 0,103, respectivement). Le test d'assignation GENALEX a suggéré un échange continu d'individus entre les populations Caucasiennes et Bulgares (avec 16 individus mal assignés), mais aucun flux génétique entre ces populations et les loups Espagnols (Figure S2A dans le Fichier S1). L'analyse STRUCTURE effectuée sans information préalable sur la population (Figure S2B dans le Fichier S1) a identifié deux loups Caucasiens qui ont été assignés avec une probabilité plus élevée à la population Bulgare qu'à leur propre population, et deux autres individus avec une probabilité d'assignation à la population Bulgare >0,2. Deux individus Bulgares ont été assignés avec une probabilité plus élevée à la population Caucasienne qu'à leur propre population, pour deux autres individus les probabilités d'assignation étaient proches de l'égalité (0,5:0,5), et cinq autres individus avaient la probabilité d'assignation à la population Caucasienne >0,2. La plupart des individus présentaient des niveaux de **métissage** non nuls entre les trois populations, qui résultaient probablement de leur ascendance commune plutôt que de migrations récentes. L'analyse STRUCTURE effectuée avec des informations antérieures sur la population, qui sont plus appropriées pour identifier une migration récente, n'a identifié qu'un seul individu mal assigné, un loup Bulgare avec une probabilité d'assignation élevée (0,74) à la population Caucasienne (Figure S2C dans le Fichier S1). Cet individu a été analysé dans une étude antérieure [27], nous avons donc pu exclure la possibilité que cet échantillon ait été mal étiqueté. Bien qu'une dispersion directe sur une telle distance soit peu probable, ce résultat peut indiquer une immigration à partir d'une population d'Europe de l'Est moins éloignée qui montre une plus grande similarité génétique avec les loups Caucasiens qu'avec les loups Bulgares.

Variabilité de l'ADN mitochondrial des loups du Caucase

Sur la base des données de séquence de la région de contrôle de l'ADNmt de 660 pb, nous avons trouvé neuf haplotypes chez les loups Caucasiens. Trois haplotypes (numéros d'accession GenBank KJ195895-KJ195897) n'ont pas été détectés auparavant dans une autre région (et ils n'ont pas été trouvés chez les chiens domestiques non plus), ils peuvent donc être uniques pour le Caucase. Parmi les six haplotypes restants, un a déjà été trouvé dans d'autres régions d'Europe, quatre en Asie et un à la fois en Europe et en Asie (Tableau 1 ; Figure 2). Bien que l'un de ces haplotypes, **w4**, ait également été trouvé chez un chien domestique du Japon, cela ne peut pas être considéré comme une indication d'introgression d'ADNmt de chien localement dans le Caucase, car cet haplotype est répandu chez les loups Européens (Figure 2). Les haplotypes Asiatiques ont été trouvés au Moyen-Orient et en Inde ; il n'y avait pas d'haplotypes communs avec l'Asie de l'Est. Il

est important de noter que tous les haplotypes trouvés dans le Caucase n'appartiennent qu'à l'un des deux principaux haplogroupes de loups (Haplogroupe 1 ; Figure 3), alors que les deux haplogroupes sont présents dans d'autres régions d'Europe et d'Asie [21]. Les haplotypes Caucasiens n'étaient pas regroupés phylogénétiquement au sein de l'haplogroupe 1, mais étaient mélangés à des haplotypes provenant de différentes régions d'Europe et d'Asie (Figure 3). La diversité des haplotypes (dans un ensemble de données constitué de loups gris non apparentés et non mélangés) a été estimée à 0,867 ± 0,026, et la diversité des nucléotides à 0,0118 ± 0,0062.

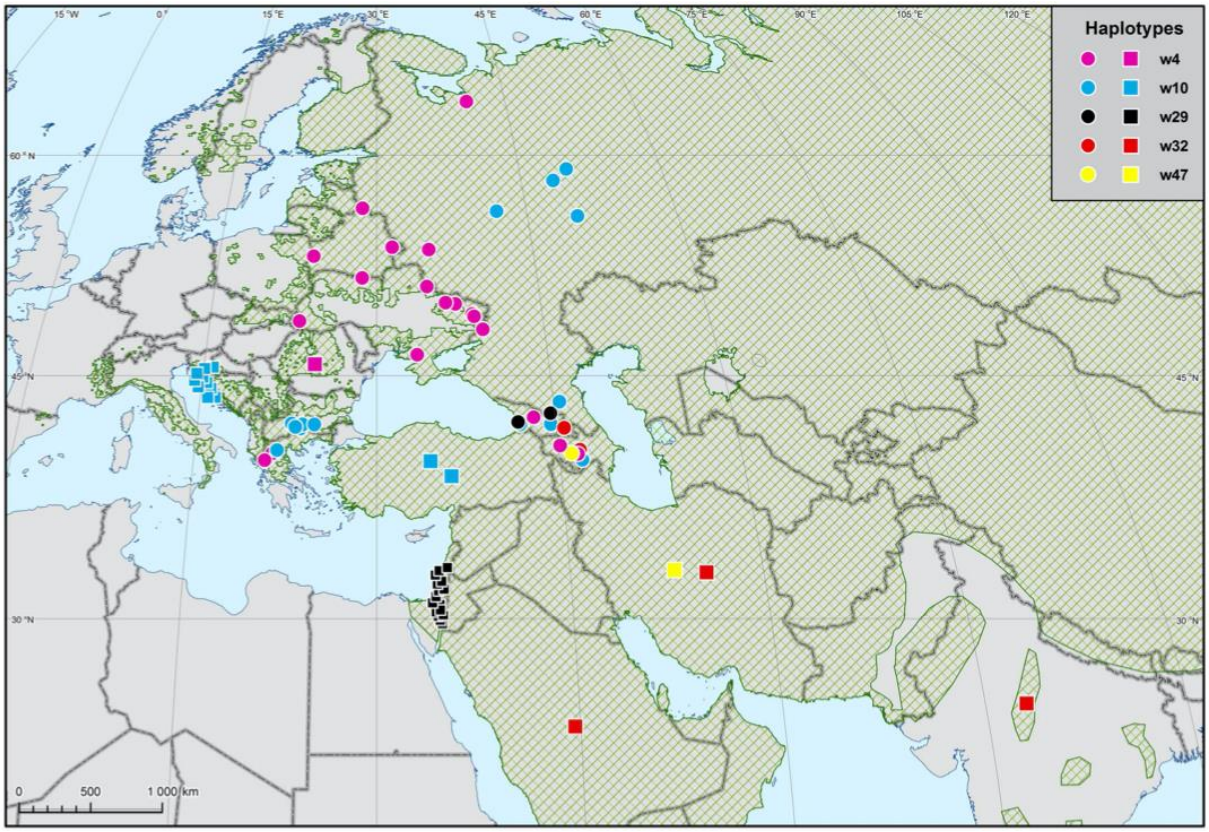

Figure 2. Distribution des haplotypes d'ADNmt trouvés dans le Caucase et dans d'autres régions d'Eurasie, dans le contexte de l'aire de répartition du loup [77]. Les échantillons provenant de localités connues sont indiqués par des cercles, l'origine des échantillons indiqués par des carrés est limitée à l'aire de répartition du pays. Basé sur des données de séquence de 230 pb. doi:10.1371/journal.pone.0093828.g002

Une comparaison des haplotypes de l'ADNmt des loups Caucasiens avec les ensembles combinés d'haplotypes de loups et de chiens provenant des études de Verginelli et al. [64] et Savolainen et al. [65] a montré que deux haplotypes Caucasiens (**w4** et **w47**) appartiennent à un **haplogroupe** partagé entre les loups Eurasiens et les chiens domestiques, appelé **haplogroupe VI** [64] ou **haplogroupe B** [65]. Les autres haplotypes Caucasiens (y compris les trois haplotypes uniques) appartiennent à un haplogroupe contenant la plupart des haplotypes de loups du monde entier et un seul haplotype de chien domestique, appelé **haplogroupe VIII** [64] ou **haplogroupe E** [65].

La distribution des inadéquations observées pour les haplotypes d'ADNmt des loups Caucasiens ne correspondait pas à la distribution attendue pour le modèle d'expansion démographique (Figure S3A du Fichier S1). L'indice de la somme des déviations carrées (SSD) et l'indice d'irrégularité (RI) étaient tous deux significatifs (SSD=0,066, P <0,0001 ; RI = 0,063, P = 0,027), indiquant des déviations importantes par rapport au modèle d'expansion soudaine. Pour le modèle d'expansion spatiale, ces deux indices n'étaient pas significatifs (SSD = 0,052, P = 0,07 ; RI = 0,063, P = 0,63),

et la distribution des disparités était conforme à la distribution attendue pour ce modèle (Figure S3B du Fichier S1). Les tests D de Tajima et Fs de Fu étaient tous deux non significatifs (D = 2,24, *P* = 0,99 ; Fs = 4,52, *P* = 0,92).

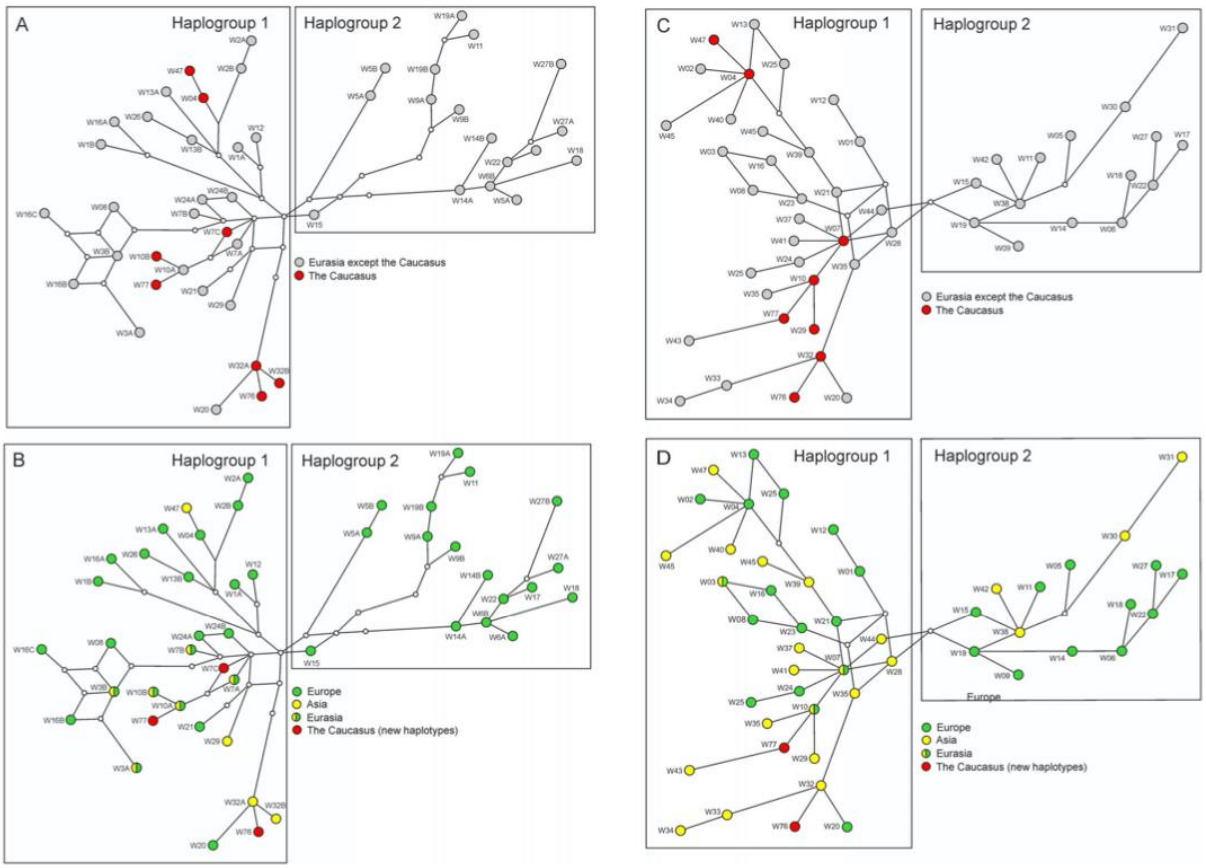

Figure 3. Réseau de jonction médian des haplotypes d'ADNmt construit pour des séquences de 660 pb (**A, B**) et de 230 pb (**C, D**). (**A, C**) Distribution des haplotypes Caucasiens (rouge) dans le réseau d'haplotypes ; (**B, D**) Distribution des haplotypes d'Europe et d'Asie dans le réseau d'haplotypes. Les nouveaux haplotypes du Caucase sont distingués par une couleur différente (rouge). doi:10.1371/journal.pone.0093828.g003

Structure génétique des populations de loups Caucasiens

Nous n'avons détecté aucune structure de population au sein des loups Caucasiens sur les loci microsatellites. Bien que l'analyse avec le logiciel STRUCTURE (effectuée pour 43 loups gris non apparentés et non mélangés du Caucase) ait indiqué que *K* = 2 était la structure génétique la plus probable, les probabilités **d'assignation** aux deux clusters génétiques étaient proches de l'égalité (c'est-à-dire environ 0,5) pour chaque individu, ce qui indique l'absence de structure génétique. Pour des niveaux *K* plus élevés, les probabilités d'assignation à chaque groupe génétique étaient également proches de l'égalité. Le modèle spatialement explicite mis en œuvre dans GENELAND a indiqué *K* = 6 comme étant la structure de population la plus probable aux loci microsatellites. Cependant, les groupes génétiques détectés n'étaient pas regroupés géographiquement, et tous les individus présentaient des niveaux élevés de mélange entre les différents groupes, avec des probabilités d'affectation aux six groupes génétiques proches de l'égalité (c'est-à-dire environ 0,17). Par conséquent, aucune structure spatiale n'a pu être définie.

De même, pour les données d'ADNmt, l'exécution de GENELAND sans prise en compte de l'information spatiale a indiqué *K* = 2 comme étant la structure de population la plus probable, mais les groupes génétiques détectés n'étaient pas regroupés géographiquement. Cependant, le modèle spatialement explicite pour les données d'ADNmt a montré une division claire en deux

groupes génétiquement et géographiquement distincts, correspondant à la Géorgie et au Nagorno-Karabakh, l'échantillon d'Arménie et un échantillon de l'Est de la Géorgie se regroupant avec le Nagorno-Karabakh (Figure S4 dans le Fichier S1). Les probabilités d'assignation des individus à leurs groupes respectifs étaient comprises entre 0,95 et 1, à l'exception de l'individu de Géorgie qui a été assigné à la sous-population du Nagorno-Karabakh avec une probabilité de 0,82.

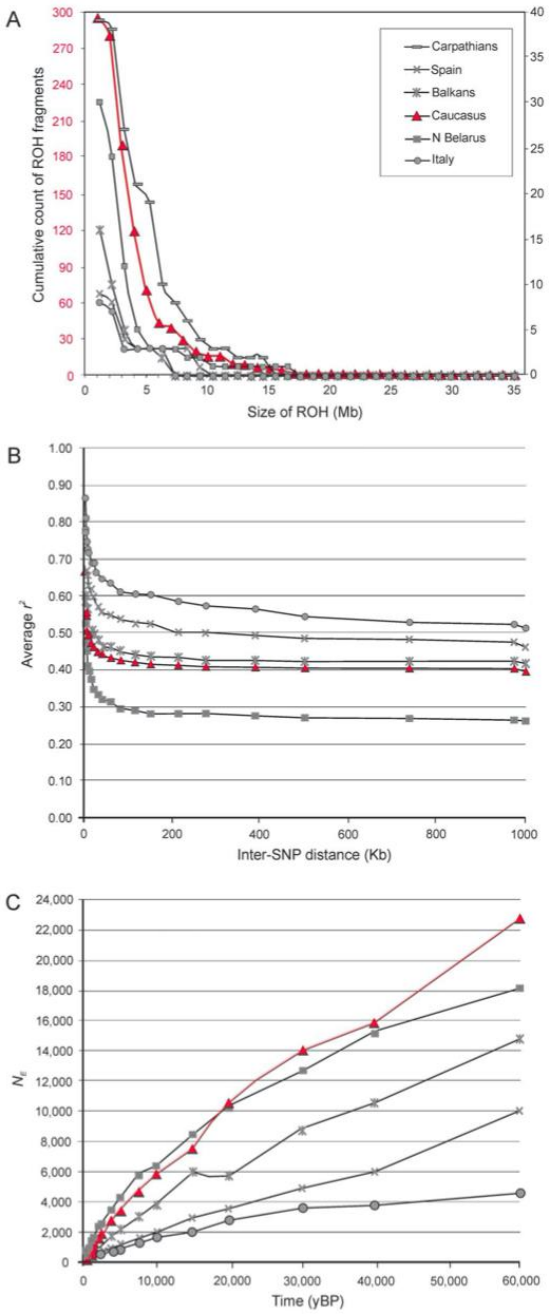

Figure 4. Niveaux de consanguinité et schémas démographiques chez les loups Caucasiens déduits des données SNP à l'échelle du génome, en comparaison avec les populations de loups Européens analysées par Pilot et al [15]. (**A**) Distribution de fréquence des runs d'homozygotie (ROH). Cette figure présente des échelles différentes sur l'axe vertical pour le Caucase (à gauche, marqué en rouge) et pour les autres populations (à droite) en raison des différences dans le nombre de SNP analysés ; (**B**) Étendue du déséquilibre de liaison, représentée par les changements dans le coefficient d'association génotypique moyen r^2 avec une distance inter-SNP croissante. (**C**) Changements temporels de la taille effective de la population (N_E). Nous présentons les données pour les populations représentant les extrêmes de la gamme (voir Figure 5 dans [15]), ainsi que les données pour les populations des Balkans et d'Espagne qui ont été comparées à la population Caucasienne dans d'autres parties de cette étude. La population des Carpates n'est présentée que dans la partie **A**, car elle présentait des valeurs extrêmes de ROH, mais des valeurs moyennes pour les autres paramètres. doi:10.1371/journal.pone.0093828.g004

Reconstruction démographique basée sur les loci microsatellites
La taille effective de la population estimée dans LDNE (en utilisant les allèles dont la fréquence est supérieure à 0,01) était de 100 (IC à 95% : 71-159) pour les loups Caucasiens et de 164 (IC à 95% : 117-258) pour les loups Bulgares. La taille effective de la population estimée dans NEESTIMATOR était de 88 (IC à 95% : 68-119) pour les loups Caucasiens et de 145 (IC à 95% : 114-195) pour les loups Bulgares.

Le test de BOTTLENECK pour la population Caucasienne a montré une déviation significative de l'équilibre **mutation-dérive** vers un excès d'hétérozygotie pour le modèle TPM (test de Wilcoxon : $P = 0{,}001$), mais aucune déviation n'a été détectée lorsque le modèle SMM a été utilisé ($P = 0{,}91$). Le test de décalage de mode a montré une distribution de la fréquence des allèles en forme de L attendue pour les populations non-bottleneckées. Dans l'ensemble, ces résultats ne fournissent pas de preuve solide de l'occurrence d'un goulot d'étranglement génétique. Le test de goulot d'étranglement pour la population Bulgare n'a pas non plus donné de résultats clairs. Le test pour le modèle TPM a montré une déviation significative de l'équilibre **mutation-dérive** vers un excès d'hétérozygotie (test de Wilcoxon : $P = 0.015$), mais aucune déviation n'a été détectée lorsque le modèle SMM a été utilisé ($P = 0{,}45$), et le test de décalage de mode a montré une distribution en forme de L.

Les analyses démographiques n'ont pas été effectuées pour les loups Espagnols car la taille de l'échantillon était trop petite pour cela. Au lieu de cela, nous avons utilisé les estimations N_E publiées ([52], Tableau 3).

Reconstruction démographique basée sur les données SNP à l'échelle du génome
Les valeurs d'IBD par paires pour les individus analysés étaient comprises entre 0,55 et 0,67. Cela confirme que ces individus n'étaient pas apparentés, car le seuil des individus apparentés au niveau des demi-frères et sœurs ou à un niveau supérieur a été établi empiriquement à IBD>0,8 pour les populations de loups gris [66]. L'hétérozygotie observée chez les loups Caucasiens a été estimée à 0,217, et l'hétérozygotie attendue à 0,239.

Le nombre moyen de segments homozygotes par individu était de 99, et leur longueur moyenne était de 3506 Kb. Les fragments ROH d'une longueur de 1 Mb étaient relativement peu fréquents (26% de tous les ROH), et les fragments ROH les plus fréquents avaient une longueur comprise entre 1 et 5 Mb (58%) ; le fragment le plus long était de 34 Mb (Figure 4A). Le niveau de DL était modéré (r^2 est tombé en dessous de 0,5 à 7,5 Kb), comme prévu pour une population qui n'a pas connu de goulot d'étranglement sévère (Figure 4B). Les intervalles de confiance à 95% pour les estimations de r^2 délimitées sur la base des erreurs standard bootstrap sont présentés sur la Figure S5A du Fichier S1. Bien que nous n'ayons trouvé aucune preuve d'un goulot d'étranglement récent, la reconstruction démographique basée sur les patrons de DL a montré que la taille effective des populations de loups Caucasiens a progressivement diminué sur toute la période considérée (Figure 4C). L'estimation la plus ancienne de l'EN (il y a 60 000 ans) était de 22 750 (IC 95% : 20 098-24 913 ; Figure S5B dans le Fichier S1), tandis que l'estimation la plus récente (il y a 150 ans) était de 144 (IC 95% : 140-148). Ces résultats suggèrent que la population Caucasienne a connu une consanguinité récente (accouplement entre individus ayant un ancêtre commun récent à quelques générations près), qui n'est pas le résultat d'un goulot d'étranglement sévère, mais d'un déclin progressif de la population et d'autres facteurs tels que la pression de chasse (voir Discussion).

DISCUSSION

Métissage entre les canidés de type loup Caucasien

Nos résultats suggèrent un niveau considérable de métissage entre les loups gris Caucasiens et les chiens domestiques, ce qui est cohérent avec l'étude précédente menée en Géorgie [24]. Tous les individus métissés avaient les haplotypes d'ADNmt que l'on retrouve également chez les loups gris non métissés, ce qui suggère que le mode d'hybridation prédominant menant au **rétrocroisement** et à **l'introgression** de gènes dans la population de loups est celui entre les loups femelles et les chiens mâles. Ces résultats sont cohérents avec d'autres études sur l'hybridation entre loups gris et chiens dans la nature [34-38], bien que des cas inverses aient également été documentés [39], [40]. Kopaliani et al. [24] ont constaté que plus de 10% des chiens en liberté (principalement des chiens de protection du bétail) en Géorgie ont une ascendance loup détectable au niveau des loci microsatellites, ce qui implique une hybridation entre des chiennes et des loups mâles, suivie d'une introgression de gènes de loup dans la population canine. Selon Kopaliani et al. [24], outre l'hybridation spontanée, il peut y avoir des cas de croisement délibéré de ces deux espèces par l'homme : « dans les régions montagneuses de Géorgie, les chiens sont occasionnellement accouplés avec des loups capturés, ce qui est censé « améliorer la race » ». Cependant, ce processus n'affecte pas la composition génétique de la population de loups gris.

Parmi les haplotypes d'ADNmt trouvés chez les loups Caucasiens, il y avait deux haplotypes se regroupant avec l'haplogroupe B du chien domestique, tel que défini dans [65], et l'un de ces haplotypes (**w4**) a été trouvé chez un chien domestique du Japon. Cependant, ces deux haplotypes ont été détectés chez des loups gris dans d'autres régions d'Eurasie (Figure 2), et par conséquent, leur regroupement avec des haplotypes de chien n'implique pas une introgression d'ADN de chien dans la population locale de loups du Caucase. Cela peut plutôt s'expliquer par une ascendance commune récente de ces deux canidés (par exemple [22], [64], [65]), ou par l'introgression de l'ADNmt du loup dans la population canine, suite à des événements d'hybridation dans les premières phases de l'histoire de l'évolution des chiens.

La fréquence des individus métissés dans la population de loups était relativement élevée (12,5%), et conforme à l'évaluation correspondante de la population de la seule Géorgie (13% ; [24]). Cependant, quatre des huit individus métisses ont été identifiés comme des parents proches, et ils ne peuvent donc pas être considérés comme des cas indépendants. Après ajustement, la fréquence des individus métisse est réduite à **8%**. A titre de comparaison, la fréquence des individus métisse a été estimée à environ 10% en Bulgarie [27], 5% en Italie [37] et 4% dans la péninsule Ibérique [38].

Nous n'avons trouvé **aucune** preuve d'hybridation entre le loup gris et le chacal doré dans le Caucase. Cependant, il y a eu un cas de mauvaise identification morphologique d'un chacal doré en tant que loup gris, ce qui était analogue à un cas de trois chacals dorés mal identifiés rapporté dans une étude antérieure en Bulgarie [27]. Ceci peut suggérer une similarité morphologique entre ces espèces dans les zones de cooccurrence, résultant probablement d'un certain niveau de métissage. Un autre cas d'erreur d'identification morphologique a été décrit en Afrique du Nord, où des canidés précédemment classés comme une sous-espèce du chacal doré se sont avérés être porteurs d'haplotypes d'ADNmt du loup gris [67], [68]. Sur la base de ces résultats, il a été suggéré de reclasser ces canidés en tant que loup Africain *C. lupus lupaster*, bien que les auteurs aient également envisagé la possibilité d'hybridation et d'introgression génétique entre différentes espèces de

canidés [68]. L'étude de la Bulgarie [27] a trouvé des preuves d'hybridation loup-chacal doré dans ce pays, mais à une fréquence beaucoup plus faible que l'hybridation loup-chien. L'occurrence et la fréquence de l'hybridation peuvent dépendre de l'abondance relative de ces trois espèces et de la pression de chasse exercée sur chacune d'elles, qui varie selon les régions de leur distribution commune. Une étude plus approfondie couvrant toute la zone de chevauchement des aires de répartition du loup gris et du chacal doré est nécessaire pour comprendre l'étendue de leur mélange et les conditions qui peuvent le favoriser. Ceci est particulièrement important en raison de la récente expansion du chacal doré dans les zones où le loup gris était le seul grand canidé sauvage (par exemple [69], [70]).

Variabilité de l'ADNmt des loups gris du Caucase dans le contexte d'autres populations de loups

Le nombre d'haplotypes d'ADNmt et la diversité des haplotypes chez les loups Caucasiens étaient similaires à ceux des loups Bulgares (Tableau 3), qui ont une diversité d'ADNmt élevée par rapport à d'autres populations Européennes [21], [27]. La diversité nucléotidique chez les loups Caucasiens était relativement faible, ce qui résulte du fait que tous les haplotypes trouvés dans le Caucase appartenaient à **l'haplogroupe 1** (tel que défini dans Pilot et al. [21]), et que **l'haplogroupe 2** n'était pas représenté dans l'échantillon analysé. Ceci était inattendu, car **l'haplogroupe 2** est relativement fréquent en Europe de l'Est (13% ; [21]) et est également présent au Moyen-Orient (haplotypes **w30** et **w31** [21], [23]). **L'haplogroupe 2** était commun chez les loups gris Européens au Pléistocène supérieur et il a été partiellement remplacé par **l'haplogroupe 1** au cours de l'Holocène [21]. La distribution inégale de cet haplogroupe (présent en Italie et en Europe de l'Est, absent de la péninsule Ibérique et du Caucase) peut résulter de la stochasticité du processus de remplacement de la lignée, et des goulots d'étranglement qui ont été documentés pour certaines populations Européennes [13], [15], [52]. Il est probable que l'analyse de génomes mitochondriaux entiers, au lieu de la seule région de contrôle, puisse révéler une structure phylogéographique supplémentaire (voir par exemple [22] et la Figure 2 de [71]). Cependant, il est peu probable que cela change la conclusion sur la distribution des deux haplogroupes en Europe, bien que d'autres subdivisions au sein de chaque haplogroupe puissent être révélées.

Les loups Caucasiens partagent des haplotypes communs avec les loups d'Europe de l'Est et du Moyen-Orient, ce qui est cohérent avec leur localisation entre ces deux régions géographiques. Peu d'haplotypes communs entre l'Europe et l'Asie ont été identifiés précédemment (3 sur 47, 6% ; [21]). Cela pourrait être dû au grand écart spatial entre les zones échantillonnées en Europe et en Asie, et les données sur les loups Caucasiens comblent partiellement cet écart. Le pourcentage élevé d'haplotypes partagés entre le Caucase et les régions voisines suggère que les populations de loups de ces régions sont (ou étaient) connectées par un niveau considérable de flux génétique.

Les données microsatellites suggèrent également un flux génétique continu ou récent entre les populations de loups du Caucase et d'Europe de l'Est. Un niveau considérable de métissage entre les loups Caucasiens et Bulgares a été détecté, suggérant qu'ils sont connectés par un flux génétique à travers des populations intermédiaires (ce qui est possible en raison de l'aire de répartition relativement continue des loups dans les zones situées entre le Caucase et les Balkans).

Nous n'avons trouvé aucune preuve de la spécificité génétique des loups Caucasiens qui justifierait leur classification en tant que sous-espèce distincte *C. l. cubanensis*, qui a été proposée sur la base de la spécificité morphologique. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que les différences

environnementales entre les habitats principalement montagneux du Caucase et les habitats de plaine des régions voisines (par exemple, la Russie Européenne) soient associées à un certain niveau de discontinuité génétique entre les populations de loups. De telles discontinuités entre des régions qui diffèrent par les types d'habitat et les proies potentielles ont été rapportées pour les loups gris ailleurs (par exemple [26], [72- 74]).

Nos résultats n'ont pas permis de répondre sans ambiguïté à la question de savoir si le Caucase a joué un rôle de **refuge glaciaire** pour le loup gris. Nous n'avons trouvé aucune preuve de l'expansion démographique de la population Caucasienne sur la base de la distribution des mésappariements d'ADNmt et des tests D de Tajima et Fs de Fu. Cependant, la distribution des mésappariements est cohérente avec le modèle d'expansion spatiale, ce qui peut indiquer que le Caucase a pu servir de population source pour les régions voisines dans le passé. Un échantillonnage complet de ces zones voisines est nécessaire pour mieux comprendre l'histoire évolutive des loups dans cette région.

Structure de la population et niveaux de consanguinité chez les loups du Caucase

Malgré la distance géographique considérable et les différences d'habitat entre la Géorgie et le Nagorno-Karabakh, nous n'avons pas trouvé de preuves de leur différenciation au niveau des loci microsatellites nucléaires, et la différenciation au niveau de l'ADNmt n'a été détectée qu'en appliquant un modèle spatialement explicite. La différence entre les modèles aux marqueurs nucléaires et mitochondriaux peut être due à des tailles de population effectives plus élevées pour les loci microsatellites par rapport à l'ADNmt, ou à des distances de dispersion potentiellement plus longues pour les mâles. Cependant, il n'y a pas de preuve sans équivoque d'une dispersion et d'un flux de gènes biaisés par les mâles chez les loups. Un échantillonnage dense est nécessaire pour identifier une faible différenciation de la population au niveau des loci microsatellites (par exemple [26], [74]), et la taille de notre échantillon était peut-être trop petite pour cela. D'autre part, une forte différenciation des populations est clairement détectable même pour des échantillons de petite taille. Par exemple, dans la présente étude, les loups Espagnols ont été clairement distingués des loups Bulgares et Caucasiens, bien que seuls sept individus Espagnols aient été inclus dans l'analyse. Par conséquent, notre étude montre qu'il n'y a pas de forte différenciation des populations dans le sud du Caucase, mais les données de l'ADNmt suggèrent qu'il pourrait y avoir une différenciation cryptique à petite échelle.

La **variabilité génétique** des loci microsatellites chez les loups Caucasiens était comparable à celle des loups Bulgares, et supérieure à celle des loups Italiens et Espagnols (Tableau 3). Le coefficient de consanguinité F_{IS} dans le Caucase était inférieur à celui de la Bulgarie, où les niveaux élevés de consanguinité ont été attribués à une chasse intense qui déstabilise la structure sociale des meutes [27]. En Géorgie, il existe des restrictions légales sur la chasse au loup, et dans tout le Caucase du Sud, les loups sont chassés principalement dans les zones bien peuplées par les humains, en particulier en réponse aux incidents de prédation sur le bétail. La chasse est peu fréquente plus haut dans les montagnes, et son effet global peut donc être plus faible. Cela peut expliquer un F_{IS} plus faible dans le Caucase par rapport à la Bulgarie. D'autre part, les tailles effectives des populations sont également faibles dans ces deux régions. En Bulgarie, la petite taille effective pourrait s'expliquer à la fois par la consanguinité et par le goulot d'étranglement documenté de la population qui a eu lieu dans les années 1970. Nous n'avons trouvé aucune preuve claire d'un **goulot d'étranglement** récent dans le Caucase sur la base du test de BOTTLENECK. Cependant, le test

génétique pour la population Bulgare, où une réduction substantielle de la taille de la population dans les années 1970 est bien documentée, a donné des résultats tout aussi peu concluants.

Modèles démographiques à long terme déduits des données SNP à l'échelle du génome
Les niveaux d'hétérozygotie estimés chez les loups Caucasiens (H_O=0,217, H_E=0,239) étaient similaires à ceux des Balkans (H_O = 0,217, H_E = 0,223 [15]), et similaires ou inférieurs à ceux des autres populations d'Europe de l'Est (H_O = 0,214-0,235, H_E = 0,219-0,263 [15] ; H_O = 0,242-0,292, H_E = 0,250-0,292 [55]). Cependant, les loups Caucasiens présentaient une hétérozygotie plus élevée par rapport aux populations isolées d'Italie (H_O = 0,165, H_E = 0,174 [55]) et d'Espagne (H_O = 0,173, H_E = 0,169 [15]) qui ont connu des goulots d'étranglement à long terme (c'est-à-dire des effectifs de population faibles sur de longues périodes [15]). Le niveau d'hétérozygotie relativement faible par rapport aux loups d'Europe de l'Est peut résulter du fait qu'il n'a été évalué que pour quatre individus échantillonnés dans une région du Caucase. Cependant, même un échantillon aussi réduit prouve que l'hétérozygotie des loups Caucasiens est plus élevée que celle des loups Italiens et Espagnols, ce qui implique que leur variabilité n'a pas été substantiellement réduite par des déclins démographiques et un isolement à long terme, comme cela s'est produit dans les péninsules Apennines et Ibériques [13], [15], [52].

De manière cohérente, le niveau de DL (quantifié comme la distance pour laquelle r^2 décroît en dessous de 0,5) était modéré (7,5 Kb) et dans la gamme observée pour les populations locales d'Europe de l'Est (2,5- 10 Kb), contrairement au DL élevé observé dans la péninsule Ibérique (275 Kb) et en Italie (>1,000 Kb) [15] (Figure 4B). Cependant, la prédominance des segments ROH longs (>1 M) sur les segments ROH plus courts suggère qu'il existe un certain niveau de consanguinité dans la population contemporaine, alors que dans le passé la consanguinité était moins fréquente (voir [57]). Des schémas similaires ont été observés dans les populations de loups d'Europe de l'Est, ce qui les différencie des populations Italiennes et Ibériques qui ont maintenu des tailles de population faibles pendant de nombreuses générations [15] (Figure 4A).

La reconstruction démographique basée sur les modèles de DL a montré un déclin progressif de la population Caucasienne depuis environ 60 000 ans jusqu'à aujourd'hui (Figure 4C). Une reconstruction similaire a montré des déclins dans d'autres populations de loups d'Europe de l'Est, d'Italie et d'Espagne [15]. Des déclins de population à long terme (d'il y a environ 20 000 ans jusqu'à aujourd'hui) ont également été déduits pour les populations de loups d'Europe, du Moyen-Orient et d'Asie de l'Est sur la base des données de séquence du génome entier [75]. Ce résultat montre que la tendance démographique à long terme dans le Caucase était cohérente avec les tendances des populations voisines d'Europe et du Moyen-Orient. L'estimation la plus récente de N_E = 144 (IC 95% 140-148), il y a environ 150 ans, se situe dans la fourchette des intervalles de confiance des estimations de N_E basées sur les microsatellites pour la population contemporaine (68-159), ce qui est cohérent avec l'absence d'un goulot d'étranglement récent.

CONCLUSIONS

Nous avons constaté que les loups gris du Caucase présentent une diversité génétique élevée pour tous les types de marqueurs analysés, par rapport aux populations de loups d'Europe du Sud. Toutes les populations d'Europe du Sud considérées ont subi un **goulot d'étranglement** génétique de gravité et de durée différentes, mais nous n'avons trouvé aucune preuve d'un tel événement dans la population Caucasienne, ce qui pourrait expliquer sa plus grande diversité.

D'autre part, les loups Caucasiens présentaient une diversité nucléotidique relativement faible au niveau des séquences d'ADNmt, ce qui peut s'expliquer par la présence d'un seul des deux principaux haplogroupes d'ADNmt présents chez les loups Eurasiens.

Les loups Caucasiens partagent des haplotypes d'ADNmt avec les loups d'Europe de l'Est et du Moyen-Orient, ce qui suggère un flux génétique passé ou en cours. Les données microsatellites suggèrent également un certain niveau de connectivité entre le Caucase et les Balkans par le biais de populations intermédiaires. Nos résultats ne **soutiennent pas** la classification des loups Caucasiens comme une sous-espèce distincte *C. l. cubanensis*, qui avait été proposée sur la base de la distinctivité morphologique. Cependant, il faut souligner qu'une faible différenciation génétique à petite échelle peut rester non détectée pour des échantillons de petite taille, et nous n'avons pas été en mesure de comparer les loups Caucasiens avec leurs populations voisines les plus proches.

Comme d'autres populations de loups gris d'Europe et du Moyen-Orient, les loups Caucasiens présentent des signes de métissage avec les chiens domestiques. Cependant, le niveau de métissage est modéré et - au moins à court terme - il ne semble pas affecter l'intégrité génétique ou écologique de la population de loups, c'est-à-dire que la distinction génétique et écologique entre les deux espèces est sans ambiguïté. Bien que les loups Caucasiens aient présenté une grande variabilité génétique et des niveaux de consanguinité relativement faibles, ils ont été affectés par d'autres problèmes de conservation qui se posent dans de nombreuses autres populations de loups, tels que la faible taille effective des populations et l'apparition d'hybrides. Par conséquent, cette population nécessite un suivi génétique plus poussé, ainsi que des études écologiques qui nous permettraient de mieux comprendre le rôle du loup gris dans les écosystèmes du Caucase et leur vulnérabilité aux changements environnementaux.