Sur le chemin de l'extinction : consanguinité et métissage dans une population de loups gris en déclin

Received: 27 March 2018 | Revised: 13 July 2018 | Accepted: 16 July 2018

DOI: 10.1111/mec.14824

ORIGINAL ARTICLE

WILEY MOLECULAR ECOLOGY

On the path to extinction: Inbreeding and admixture in a declining grey wolf population

Daniel Gómez-Sánchez[1] | Iñigo Olalde[1] | Natalia Sastre[2,3] | Conrad Enseñat[4] | Rafael Carrasco[5] | Tomas Marques-Bonet[1,6,7] | Carles Lalueza-Fox[1] | Jennifer A. Leonard[8] | Carles Vilà[8] | Oscar Ramírez[1,9]

Résumé

L'effet allee réduis la viabilité des petites populations de nombreuses façons différentes, qui agissent en **synergie** pour conduire les populations vers des **vortex d'extinction**. La population de loups de Sierra Morena, isolée dans le sud de la péninsule Ibérique et composée d'une seule ou de quelques meutes pendant des décennies, représente un bon exemple de la façon dont diverses menaces agissent de manière **additive** dans de très petites populations. Nous avons séquencé le génome de l'un des derniers loups identifiés (et tués sur la route) dans la Sierra Morena et celui d'un autre loup du programme d'élevage en captivité du loup Ibérique, et nous les avons comparés à d'autres génomes de loups et de chiens du monde entier (y compris deux séquences génomiques de loups Ibériques du nord publiées précédemment). Les résultats ont montré une diversité génétique globale relativement faible chez les loups Ibériques, mais des histoires de population diverses, y compris l'introgression passée de gènes de chien. Le loup de la **Sierra Morena** présentait un niveau extraordinairement élevé de consanguinité et de longues séries d'homozygotie, résultant d'un long isolement. En outre, environ un tiers du génome était d'origine canine. Malgré l'introgression de gènes de chien, l'hétérozygotie est restée faible en raison de la consanguinité continue après plusieurs événements d'hybridation. Les résultats illustrent donc le cas d'une petite population de loups isolée où la faible densité de population a pu favoriser l'hybridation et l'introgression d'allèles de chiens, mais où la consanguinité continue a pu faire disparaître complètement de la population de grands fragments chromosomiques d'origine loup, remplacés par des fragments chromosomiques d'origine chien. Les dernières études de population suggèrent que cette population pourrait s'être éteinte.

INTRODUCTION

L'empiètement de l'homme a entraîné des déclins historiques de la plupart des grands carnivores au cours du siècle dernier, par une combinaison de modification de l'habitat et de persécution directe (Ripple et al., 2014). Un plus petit nombre d'individus peut entraîner une diminution de la densité, une réduction de l'aire de répartition et une fragmentation accrue des populations restantes. Lorsque la taille de la population diminue, des facteurs démographiques et environnementaux stochastiques commencent à déterminer la dynamique des populations, la dérive génétique aléatoire entraîne la perte de variantes génétiques potentiellement bénéfiques, le pouvoir de la sélection naturelle est diminué et la consanguinité (et le potentiel de dépression de consanguinité) augmente. Tous ces phénomènes sont l'expression de **l'effet Allee**, c'est-à-dire la diminution de la **valeur adaptative** (*Fitness*) individuelle lorsque la taille de la population diminue (Courchamp, Clutton-

Brock et Grenfell, 1999 ; Kramer, Dennis, Liebhold et Drake, 2009). Un autre effet Allee est la diminution des **interactions sociales**, qui augmente encore le niveau de menace et le risque d'extinction d'une population, car il devient plus difficile de trouver un partenaire, les groupes sociaux deviennent plus petits, ce qui réduit les possibilités de coopération en matière de chasse ou de défense, etc. Si la **fragmentation** en petites populations est susceptible d'affecter négativement tous les vertébrés, les carnivores et les animaux sociaux y sont particulièrement sensibles. Les carnivores sont généralement présents à de faibles densités et la plupart des parcelles d'habitat de petite et moyenne taille sont insuffisantes pour maintenir des populations viables. De même, les espèces sociales ont besoin de territoires plus étendus et d'un plus grand nombre d'individus par unité de reproduction que les espèces solitaires (bien que la socialité puisse contribuer à atténuer les **effets Allee**, voir Angulo, Rasmussen, Macdonald et Courchamp, 2013). En ce sens, on a supposé que les **effets Allee** jouaient un rôle important dans le déclin des populations de lycaons (*Lycaon pictus*) (Courchamp, Clutton-Brock, & Grenfell, 2006).

Le loup gris (*Canis lupus* L.) est un bon exemple de carnivore social souvent menacé par la réduction de la taille des populations et la fragmentation. Le loup gris était historiquement distribué dans tout l'Holarctique, mais la persécution directe et la perte d'habitat et de proies ont conduit à une réduction de la distribution et de la densité (Boitani, 2003). Cependant, une série de petites populations ont survécu et certaines d'entre elles ont augmenté en taille et se sont étendues au cours des dernières décennies (Chapron et al., 2014). Parce que le loup gris est un prédateur supérieur et une espèce très charismatique, certaines de ces petites populations fragmentées ont reçu l'attention des chercheurs pendant de nombreuses années. Ainsi, il a été possible de suivre l'expansion de la population de loups Scandinaves à partir de seulement trois fondateurs (Åkesson et al., 2016 ; Liberg et al., 2005 ; Vilà et al, 2003), la survie à long terme des loups de l'île Royale à partir d'un événement fondateur tout aussi réduit (Peterson, Thomas, Thurber, Vucetich, & Waite, 1998), et la survie durable en captivité des loups Mexicains malgré leur disparition à l'état sauvage (Hedrick & Fredrickson, 2008 ; Hedrick, Miller, Geffen, & Wayne, 1997). Ces cas ont conduit certains à penser que les loups étaient presque immunisés contre les effets délétères de la dépression de consanguinité et que de petites populations très consanguines pouvaient être parfaitement viables. Cependant, les preuves accumulées au cours des dernières années montrent clairement que ce n'est pas le cas. Ces populations de loups deviennent des exemples du fardeau que les allèles délétères peuvent imposer aux populations naturelles en raison de la consanguinité. Par exemple, des anomalies du squelette ont été observées chez les loups de Scandinavie et de l'Isle Royale (Räikkönen, Bignert, Mortensen, & Fernholm, 2006 ; Räikkönen, Vucetich, Peterson, & Nelson, 2009), une réduction du rendement reproductif en Scandinavie (Liberg et al, 2005), la réduction de la qualité du sperme (Asa et al., 2007) et le déclin de la condition physique (Fredrickson, Siminski, Woolf, & Hedrick, 2007 ; Hedrick, Peterson, Vucetich, Adams, & Vucetich, 2014) chez les loups Mexicains. Ces études partagent une caractéristique unique qui en a fait d'excellents modèles pour comprendre les conséquences des **effets Allee** associés au déclin et à la **fragmentation** des populations : les populations ont été suivies en continu sur le terrain et en laboratoire pendant une longue période. Cependant, il s'agit d'une situation exceptionnelle et, dans la plupart des cas, les connaissances disponibles sur l'histoire démographique et la perte de diversité génétique sont inexistantes pour les populations sauvages gravement menacées. L'une de ces populations mal connues mais gravement menacées est la population Espagnole de loups de la Sierra Morena.

Le nord-ouest de la péninsule Ibérique, qui comprend l'Espagne et le Portugal, abrite une population modérément importante de loups - actuellement environ 2200-2500 individus

(Hindrikson et al., 2017) - qui est restée isolée des autres populations Européennes de loups depuis le milieu du 19ème siècle. Il s'agit de la plus grande population d'Europe occidentale. Cependant, à des centaines de kilomètres au sud de la limite méridionale de la distribution de cette population de loups se trouve la Sierra Morena, un système montagneux où une très petite population de loups vit en isolement complet depuis peut-être un demi-siècle (Blanco & Cortés, 2007 ; Fig. S1). Cette population est séparée de la population de loups du nord par de vastes zones agricoles, de grandes rivières et des zones hautement développées. Différents rapports au cours des 25 dernières années ont indiqué que cette population est soit composée de quelques groupes de loups, soit d'un seul, soit d'aucun. Il a été impossible d'obtenir une connaissance précise de la population car l'aire de répartition des loups est située sur des domaines de chasse privés dont l'accès est très limité et difficile. Les dernières preuves robustes de la présence de loups dans la région proviennent de fèces identifiées comme étant des loups à l'aide de l'ADN mitochondrial en 2012 et 2013, et un groupe reproducteur a été localisé en 2013 (Junta de Andalucía, 2015) mais le dernier recensement national Espagnol, de 2016, considère qu'il n'y a pas de population reproductrice (MAGRAMA, 2016). Cependant, des difficultés logistiques empêchent la réalisation d'enquêtes répétées et fiables. L'évaluation des conséquences de la fragmentation et de l'isolement sur le statut et la santé de cette population s'est avérée irréalisable.

Heureusement, les approches génomiques peuvent aider à surmonter certaines des limites inhérentes à l'étude de cette mystérieuse population. Au lieu de nécessiter des échantillons d'une fraction importante de la population pour la suivre dans le temps, les **séquences génomiques** d'individus potentiellement représentatifs pourraient renseigner sur les pertes de diversité à l'échelle de la population, le **métissage** entre lignées divergentes ou l'histoire démographique. Dans cette étude, nous utilisons la séquence complète du génome **d'un seul loup** de la population de Sierra Morena qui a été tué sur la route en 2003 et nous la comparons aux séquences du génome entier obtenues à partir de trois loups du nord de l'Espagne et à d'autres séquences du génome de chiens et de loups publiées précédemment. La comparaison de ces séquences peut nous aider à mieux comprendre la survie à long terme de cette population et les conséquences du maintien d'une petite taille pendant plusieurs générations.

MATÉRIAUX ET MÉTHODES

Échantillonnage et séquençage

Nous avons généré les séquences du **génome entier** de 2 loups Ibériques : l'un provenant d'une population d'élevage en captivité appartenant aux Programmes Européens pour les espèces menacées (EEP, ci-après dénommé wEEP), et l'autre du sud de l'Espagne (Sierra Morena, wSierraMorena). L'échantillon de loup captif était constitué de sang total prélevé lors d'un examen vétérinaire de routine sur un loup né en captivité au parc zoologique de Barcelone qui descend de la population Ibérique du Nord-Ouest et la séquence obtenue pour cet individu a été utilisée en parallèle dans une autre étude (Botigué et al., 2017).

Les analyses génétiques précédentes ont révélé que la plupart de la diversité présente dans la population de loups sauvages était également présente dans la population captive en raison du grand nombre de fondateurs utilisés (Ramirez et al., 2006). L'échantillon de loup de la Sierra Morena provient d'un animal trouvé tué sur la route en 2003 dans le nord-Est de l'Andalousie (sud de l'Espagne), avec une apparence générale de loup ne suggérant pas un métissage avec des chiens et conservé par le gouvernement régional Andalou. Les librairies Illumina ont été construites selon

les instructions du fabricant (matériel supplémentaire) et séquencées au CNAG (Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica, Barcelone, Espagne). Ces séquences du génome entier ont été comparées aux séquences génomiques précédemment publiées de 11 chiens (issus de 11 races) et de 14 loups provenant de 10 populations de l'ensemble de l'aire de distribution et comprenant deux autres loups Ibériques (issus de la population du Nord-Ouest et échantillonnés en Espagne et au Portugal, wSpain et wPortugal ; Fan et al., 2016 ; Freedman et al., 2014 ; Serres-Armero et al., 2017 ; Wang et al., 2013).

Cartographie, appel de SNP et filtrage

Toutes les séquences ont été cartographiées sur le génome de référence du chien (canFam3.1) en utilisant la version 0.6.1 de BWA (Li & Durbin, 2009) avec le paramètre d'ajustement de la qualité réglé sur un score de qualité Sanger de 15 et les paramètres par défaut. Ensuite, nous avons utilisé Picard Tools version 1.70 (http://broadinstitute.github.io/picard/) pour supprimer les doublons PCR et GATK version 2.5 (McKenna et al., 2010) pour effectuer le réalignement des indel. Les fichiers résultants ont été utilisés pour l'appel de variants. Nous avons produit un ensemble préliminaire de 19 640 837 SNP en utilisant UnifiedGenotyper et VariantFiltration de GATK avec les paramètres de filtrage recommandés pour le cas où le recalibrage du score de qualité des variants (VQSR) n'est pas disponible (Van der Auwera et al., 2013). Pour éviter les régions de faible complexité et les lacunes (Li, 2014), les régions mappables ont été obtenues à l'aide de GEM mappability (Derrien et al., 2012) et de scripts Perl personnalisés. Nous avons obtenu un jeu de données final contenant 18 956 547 SNP qui ont été identifiés dans toutes les séquences du génome. L'outil DepthOfCoverage implémenté dans GATK a été utilisé pour calculer la profondeur moyenne de couverture de cet ensemble final.

Analyse de la diversité et consanguinité…

Analyse de l'introgression…

RESULTATS

Hétérozygotie et consanguinité

Les deux échantillons de loups Ibériques séquencés pour cette étude, wSierraMorena et wEPP, ont été séquencés à une couverture élevée (44x et 23x respectivement) afin de garantir des estimations fiables de l'hétérozygotie. La couverture pour les deux autres loups Ibériques précédemment séquencés était également élevée (23x et 24x pour wSpain et wPortugal, respectivement), empêchant ainsi des estimations faussement basses pour cette population isolée (Tableau 1). Parmi ces loups, wSierraMorena présentait l'hétérozygotie moyenne la plus faible (1,09 x 10^{-3} positions hétérozygotes par pb, het/bp). wPortugal présentait une hétérozygotie légèrement supérieure (1,18 x 10^{-3} het/bp) tandis que les autres loups Ibériques présentaient des valeurs proches de 1,5 x 10^{-3} (Fig. S2). L'hétérozygotie moyenne observée dans les séquences génomiques des autres loups Eurasiens était d'environ 1,6 x 10^{-3} het/bp (sauf pour le loup Italien, issu d'une population hautement consanguine, où elle est la plus faible, 0,3 x 10^{-3} ; Tableau 1, Fig. S3b), ce qui est cohérent avec d'autres études portant sur l'ensemble du génome (Freedman et al., 2014 ; Lindblad-Toh et al., 2005). Les loups Américains présentaient également des valeurs élevées similaires, à l'exception du loup Mexicain hautement consanguin (les échantillons étudiés ici correspondent à la lignée Ghost Ranch, une lignée particulièrement consanguine ; Fig. S3b). D'autre part, les chiens de race pure présentaient une hétérozygotie réduite (0,88 x 10^{-3} het/bp en moyenne ; Tableau 1, Fig. S3a), comme prévu du fait de leur isolement relatif et de la petite taille de leur population effective

(Calboli, Sampson, Fretwell, & Balding, 2008), mais variable selon les races. L'hétérozygotie de wSierraMorena était similaire à celle observée chez certains chiens de race pure et seulement inférieure à celle des populations de loups les plus consanguines (Tableau 1, Fig. S3).

TABLEAU 1. Diversité génétique chez les loups et les chiens

Sample	Species	Population	Cov	Het (×1000)	F_{ROH}	Dog blocks
wSierraMorena	Grey Wolf (Iberia)	South Spain	43.94	1.093	0.42	31.88
wSpain	Grey Wolf (Iberia)	NW Iberia	22.68	1.543	0.15	14.30
wPortugal	Grey Wolf (Iberia)	NW Iberia	24.30	1.183	0.30	2.94
wEEP	Grey Wolf (Iberia)	NW Iberia	22.74	1.466	0.15	3.20
Wolf Croatia	Grey Wolf (Eurasia)	Croatia	6.98	1.473	0.09	
Wolf China	Grey Wolf (Eurasia)	China	26.36	1.484	0.23	
Wolf India	Grey Wolf (Eurasia)	India	24.90	1.814	0.01	
Wolf Iran	Grey Wolf (Eurasia)	Iran	26.27	1.781	0.03	
Wolf Israel	Grey Wolf (Eurasia)	Israel	6.01	1.507	0.05	
Wolf Italy	Grey Wolf (Eurasia)	Italy	5.81	0.321	0.51	
Wolf Great Lakes	Grey Wolf (America)	North America	24.34	1.831	0.08	
Wolf Yellowstone A	Grey Wolf (America)	Wyoming	25.73	1.546	0.18	
Wolf Yellowstone B	Grey Wolf (America)	Wyoming	24.07	1.586	0.13	
Wolf Yellowstone C	Grey Wolf (America)	Wyoming	5.41	1.485	0.09	
Wolf Mexico A	Grey Wolf (America)	Mexico	23.59	0.038	0.70	
Wolf Mexico B	Grey Wolf (America)	Mexico	5.23	0.120	0.70	
Airedale Terrier	Dog		7.33	0.644	0.44	
Basenji	Dog		12.35	0.686	0.34	
Boxer	Dog		29.33	0.664	0.41	
Chinese Crested	Dog		19.17	0.763	0.41	
Chinook	Dog		7.84	0.807	0.39	
English Cocker Spaniel	Dog		9.66	1.044	0.25	
Kerry Blue Terrier	Dog		15.83	0.688	0.44	
Labrador Retriever	Dog		10.80	1.105	0.20	
Miniature Schnauzer	Dog		5.47	0.767	0.32	
Soft Coated Wheaten Terrier	Dog		17.18	0.703	0.41	
Standard Poodle	Dog		12.63	1.016	0.28	

Notes. Nom de l'échantillon, espèce et population d'origine pour chaque échantillon dont la séquence génomique a été étudiée ici. Cov : (×1 000) : hétérozygotie (position hétérozygote par 1 000 pb) ; F_{ROH} : coefficient de consanguinité ; Blocs chiens : pourcentage de blocs d'ascendance chien à travers le génome. wSierraMorena et wEEP ont été séquencés pour cette étude, les autres sont issus de la littérature (Freedman et al., 2014)

Les Runs d'homozygotie ROHs sont apparus chez tous les loups Ibériques (Fig. S4), mais étaient beaucoup plus fréquents chez wSierraMorena, dont les chromosomes étaient presque entièrement homozygotes (chromosomes 18, 27, 35, 37 et 38 ; Fig. 1). Cet individu présentait les plus grands ROHs à 40-60 Mb, et la courbe cumulative inverse était clairement supérieure à celle de tous les autres loups Ibériques (Fig. S4). La présence de longues séries d'homozygotie chez wSierraMorena (Fig. S4) implique une forte consanguinité il y a quelques générations (voir Thompson, 2013)). Bien que wPortugal ait également présenté quelques runs de plus de 40 Mb, leur distribution était similaire à celle des autres loups Ibériques. wSpain et wEEP ont montré des courbes cumulatives de ROHs pratiquement identiques et presque tous les runs d'homozygotie étaient plus courts que 30 Mbp. Le **coefficient de consanguinité** a montré que wSierraMorena était le loup Ibérique le plus consanguin (F_{ROH} = 0,42). Les loups Ibériques les moins consanguins provenaient du nord de l'Espagne, wSpain et wEEP (F_{ROH} = 0,15), et le coefficient de consanguinité était intermédiaire pour wPortugal (F_{ROH}= 0,30 ; Tableau 1). Pour les autres loups, le F_{ROH} avait tendance à être beaucoup plus faible que pour les loups Ibériques, avec la plupart des valeurs entre 0,01 et 0,09 (Tableau 1). Les exceptions à cette tendance sont les loups Italiens (F_{ROH} = 0,51) et Mexicains (une

population captive, F_{ROH} = 0,70), où une consanguinité élevée a déjà été montrée dans des études précédentes et est en accord avec les attentes de leur histoire démographique (Fabbri et al., 2007 ; Hedrick et al., 1997 ; vonHoldt et al., 2010, 2011). Cette valeur est également un peu élevée pour le loup Chinois (F_{ROH} = 0,23), mais les raisons de cette valeur élevée ne sont pas claires. Pour la population de loups de Yellowstone, fondée récemment à partir d'un nombre relativement faible de fondateurs, le F_{ROH} varie entre 0,09 et 0,18. Comme on pouvait s'y attendre, les chiens de race pure présentent une consanguinité élevée, avec un F_{ROH} compris entre 0,20 et 0,44. Cependant, ces valeurs sont similaires ou inférieures à la consanguinité estimée pour wSierraMorena.

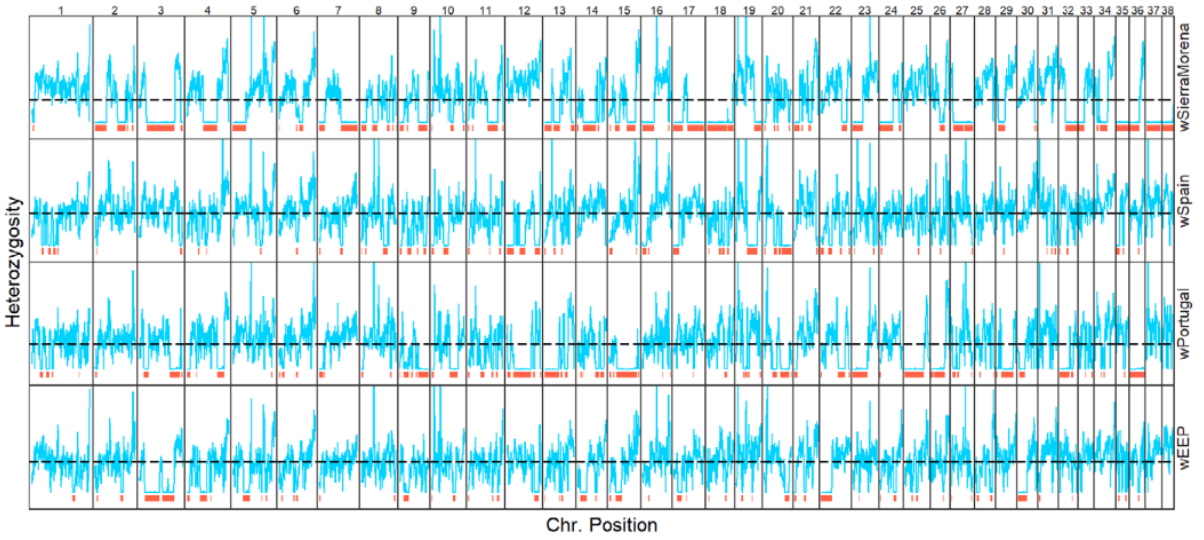

FIGURE 1. Hétérozygotie chez les loups Ibériques en utilisant des fenêtres de 1 Mb avec 200 Kb de chevauchement (lignes bleues). Les chromosomes sont séparés par des lignes (numéro de chromosome en haut). Les lignes en pointillés marquent l'hétérozygotie médiane de chaque échantillon, et les blocs rouges sont des séries d'homozygotie (ROHs) d'au moins 2 Mb de long

Introgression des allèles de chiens

Une analyse PCA utilisant les données de l'ensemble du génome (Fig. 2a) a montré que les chiens et les loups se séparaient le long de la première composante principale (PC1, Fig. 2a) tandis que le deuxième axe séparait les loups Américains et Eurasiens. Il est intéressant de noter que wSierraMorena semblait intermédiaire entre les chiens et les loups et que wSpain semblait quelque peu séparé des autres loups Ibériques. Une ACP avec une représentation réduite d'environ 43K SNP mais incluant beaucoup plus d'individus provenant d'études antérieures (Boyko et al., 2010 ; vonHoldt et al., 2011, 2010) a révélé que les loups Italiens étaient clairement séparés des autres loups Eurasiens, et a montré que si wPortugal et wEPP se regroupaient avec les autres loups Ibériques, wSpain semblait quelque peu séparé et wSierraMorena était situé à l'écart de tous les autres loups et se déplaçait vers les chiens le long de PC1 (Fig. 2b). Les axes ultérieurs sur l'ensemble de données 43K ont permis de différencier d'autres populations de loups (Fig. S5).

L'erreur de validation croisée des analyses ADMIXTURE pour l'ensemble de données de 4,5 millions de SNP a suggéré que les données étaient compatibles avec deux clusters, K = 2 (Fig. S6). À ce niveau, les chiens et les loups semblaient clairement séparés (Fig. 3), mais trois loups semblaient suggérer une introgression d'allèles de chiens dans les populations de loups, deux loups Ibériques (wSierraMorena et wSpain, avec respectivement 31,5 % et 10,4 % du génome des chiens), et l'échantillon provenant d'Israël. Cependant, à des valeurs K plus élevées, seul wSierraMorena présentait systématiquement des preuves d'introgression de chiens. Ces valeurs K plus élevées ont

également permis de différencier d'autres populations de loups. En utilisant l'ensemble de données 43K, qui comprenait beaucoup plus d'individus, la validation croisée a suggéré que les données étaient mieux expliquées par un grand nombre de clusters, au moins $K = 9$ (Fig. S6), mais le nombre exact n'a pas été correctement étudié puisque nous avons seulement exploré $K = 2^{-10}$. Quoi qu'il en soit, les résultats reflètent la fragmentation en populations de loups et en races de chiens distinctes qui sont probablement complètement isolées aujourd'hui. Comme précédemment, à $K = 2$, cette analyse a également séparé les chiens des loups et a également suggéré une introgression légèrement plus élevée d'allèles de chiens dans wSierraMorena (36,9 %) et wSpain (17,7 % ; Fig. S7). Pour les deux autres loups Ibériques, l'introgression putative semble négligeable (pour wPortugal, 0,00 % et 4,47 % dans les analyses avec les ensembles de données génomiques et 43K ; pour wEEP, 0,00 % et 3,28 %, respectivement). Les analyses des SNP 43K semblaient suggérer des taux d'introgression plus élevés, mais cela pourrait être dû en partie à un biais de vérification dans la conception des microréseaux, qui maximise la variabilité des chiens (Boyko et al., 2010 ; vonHoldt et al., 2011, 2010).

L'introgression de gènes de chien dans le génome de ces loups Ibériques a été une surprise, en particulier pour wSpain, qui dans des études précédentes (Fan et al., 2016 ; Freedman et al., 2014) avait été pris comme un représentant des loups Ibériques du nord purs compte tenu de la faible fréquence d'hybridation loup-chien dans cette population, comme estimé dans des analyses microsatellites précédentes (Godinho et al., 2011 ; Pacheco et al., 2017). Pour évaluer dans quelle mesure un petit panel de marqueurs microsatellites pouvait identifier ces loups métissés, nous les avons typés pour 10 microsatellites autosomiques précédemment utilisés pour séparer les chiens et les loups (Sastre et al., 2011). L'estimation de l'ascendance canine obtenue avec cette approche était de 42,4 % pour wSierraMorena et de seulement 0,6% pour wSpain, l'intervalle de probabilité n'excluant pas la possibilité d'une absence d'introgression dans ce dernier échantillon (0 % du génome canin ; Fig. S8). Ces résultats sont très différents de ceux obtenus avec les données génomiques pour wSpain, qui n'a pas été identifié comme métissée, ce qui suggère une faible puissance pour estimer l'ascendance en raison du petit nombre de marqueurs.

L'identification de blocs de 50 SNP dans le génome des loups Ibériques qui pourraient provenir de chiens a révélé que près d'un tiers du génome de wSierraMorena (31,9 % des 50 SNP-fenêtres) provenait de chiens (Tableau 1, Figure 4). Cette proportion était de 14,3 % pour wSpain. Il est intéressant de noter que la distribution des blocs d'ascendance canine dans les deux échantillons était très différente. Alors que wSpain a montré un très grand nombre de petits blocs, généralement jumelés avec des blocs d'ascendance de loup (blocs Wolf/Dog), wSierraMorena a montré plusieurs régions avec de très grands blocs d'origine canine sur les deux chromosomes homologues (blocs Dog/Dog ; par exemple, sur les chromosomes 2, 3, 4, 9, 17, 36 et 38 ; Fig. 4). Les deux autres loups Ibériques, wPortugal et wEEP ne présentaient qu'environ 3 % de blocs putatifs d'ascendance canine, proches de la proportion d'ascendance canine suggérée par les analyses précédentes.

Après avoir supprimé les fenêtres SNP qui représentaient des haplotypes de chiens dans au moins un des échantillons Ibériques mélangés, une analyse PCA a montré les mêmes groupes d'échantillons que précédemment, mais maintenant les quatre échantillons de loups Ibériques se sont regroupés dans un groupe (Fig. 2c) soutenant l'idée que les individus qui semblaient séparés dans les analyses précédentes (Fig. 2a) l'étaient à cause de l'introgression d'allèles de chiens. Cependant, alors que les trois échantillons provenant de la population du nord-ouest partageaient

pratiquement la même position, wSierraMorena - provenant d'une petite population prétendument isolée depuis des décennies - semblait quelque peu séparé.

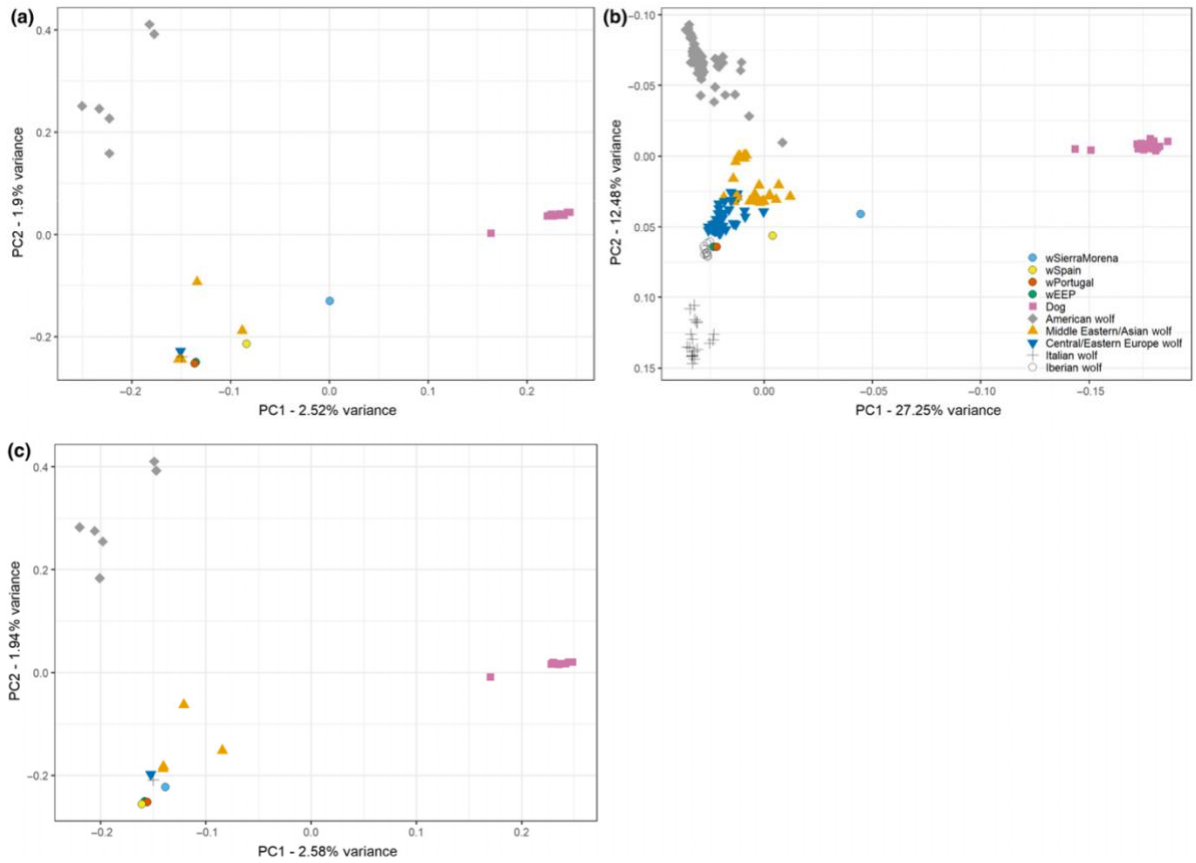

FIGURE 2. Analyse en composantes principales (ACP) de quatre loups Ibériques (wSierraMorena, bleu ; wPortugal, rouge ; wSpain, jaune ; wEEP, vert - notez que wEPP se chevauche largement avec wPortugal et est à peine visible) et d'autres chiens et loups, (a) sur la base d'un échantillon génomique de 4,5 millions de SNP. (**a**) sur la base d'un échantillon génomique de 4,5 millions de SNP, (**b**) sur la base d'un ensemble plus large d'échantillons typés avec une matrice et donnant 43K SNP, (**c**) sur la base de SNP génomiques après avoir retiré les blocs de chiens dans wSierraMorena et wSpain (Figure 3 ; notez que dans ce cas, tous les échantillons Ibériques se regroupent plus étroitement)

Conformément à cette observation, la proportion d'allèles partagés pour n'importe lequel des loups Ibériques était la plus élevée par rapport aux autres loups Ibériques, mais un peu plus faible pour wSierraMorena (Fig. S9a). La proportion d'allèles partagés était à peine plus faible lorsqu'on la comparait à celle d'un loup d'Europe centrale de Croatie, plus faible lorsqu'on la comparait à celle de loups Italiens et Moyen-Orientaux/Asiatiques, et la plus faible, comme prévu, pour les loups Américains. La proportion d'allèles partagés avec les chiens pour wPortugal et wEPP était aussi faible que la proportion partagée avec les loups Américains, ce qui suggère que ce partage est le résultat d'une histoire évolutive commune plus que d'un métissage. La proportion d'allèles partagés avec les chiens était légèrement plus élevée pour wSpain. En revanche, pour wSierraMorena, la proportion partagée avec les chiens était beaucoup plus élevée et similaire à celle des autres populations de loups Européens. Parmi les allèles présents chez les loups Ibériques (22 959 835 sur 31 616 032 dans l'ensemble de données), wSierraMorena avait une proportion plus élevée de singletons (5 %) et partageait légèrement plus d'allèles avec wSpain qu'avec les autres échantillons (Fig. S9b). Ces résultats sont cohérents avec une introgression importante d'allèles de chien dans le génome de wSierraMorena et également un niveau plus faible d'introgression dans le génome de wSpain.

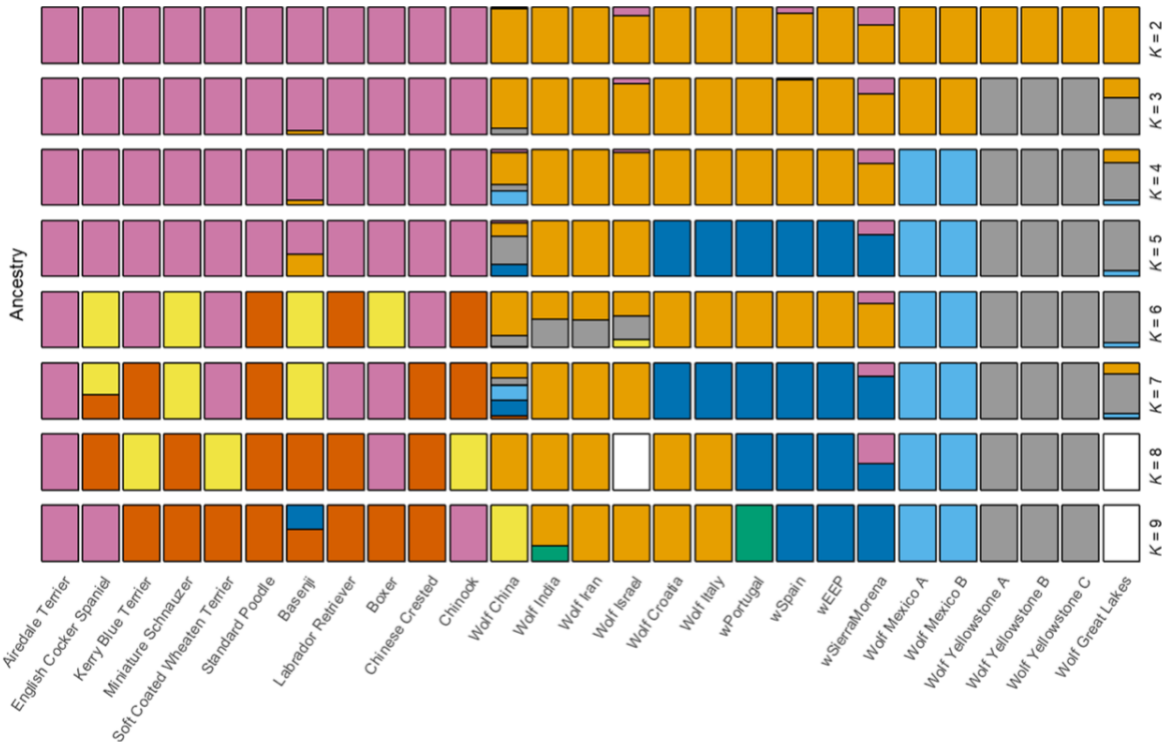

FIGURE 3. Analyse ADMIXTURE basée sur 4,5 millions de SNP à l'échelle du génome. L'erreur de validation croisée (Figure S6) a montré que les données étaient mieux expliquées par deux clusters, $K = 2$, qui différenciaient les chiens et les loups. Cependant, des valeurs croissantes de K ont permis de différencier les loups nord-Américains ($K = 3$), Mexicains ($K = 4$), Asiatiques et Européens ($K = 5$, $K = 7$) et Ibériques ($K = 8$). Les chiens de race ont commencé à se différencier à partir de $K = 6$-9

Au niveau chromosomique, la séparation des blocs d'ascendance loup (Wolf/Wolf) de ceux contenant des haplotypes chien (Dog/Dog et Wolf/Dog) a révélé que pour wSpain (et les autres loups du nord de l'Espagne), les blocs contenant des haplotypes chien avaient tendance à avoir une hétérozygotie élevée (Fig. 5). Au contraire, l'hétérozygotie de ces blocs était plus faible que celle des blocs Loup/Loup pour wSierraMorena, beaucoup d'entre eux étant en dessous du seuil d'homozygotie. Alors que les blocs Chien/Chien représentaient une très petite portion des chromosomes de wSpain et que ces blocs avaient tendance à avoir une hétérozygotie élevée (Fig. 5), ils ajoutaient plus de 50 % de la longueur totale de certains chromosomes de wSierraMorena (Fig. 4) et dans ces cas l'hétérozygotie était remarquablement faible. Cela pourrait indiquer que les plus grands blocs de chiens sont issus d'un seul événement de consanguinité et qu'un petit nombre de chromosomes de chiens se sont récemment répandus dans la population de loups de Sierra Morena. Les croisements consanguins ultérieurs ont conduit à l'identité par filiation de plusieurs de ces fragments chromosomiques.

FIGURE 4. Blocs d'ascendance chien (rouge) et loup Eurasien (bleu) chez les loups Ibériques étudiés. (**a**) wSierraMorena, (**b**) wSpain, (**c**) wPortugal, (**d**) wEEP

DISCUSSION

Populations de loups Ibériques

La séquence du génome entier de quatre loups Ibériques a révélé qu'après avoir exclu les régions affectées par l'introgression d'allèles de chien, les trois loups du nord avaient une composition génétique très similaire, se regroupant en un seul groupe serré dans l'analyse PCA, tandis que le loup originaire de la Sierra Morena semblait quelque peu différencié (Fig. 2c). Ceci était attendu en raison de l'isolement relatif de cette population du sud et d'une probable dérive intense. De plus, nos résultats ont également montré un niveau **important** de consanguinité, même chez les individus les plus consanguins (F_{ROH} = 0,15 pour wSpain et wEPP), suggérant une consanguinité en histoire profonde. Cela contraste avec les attentes, puisque la population de loups Ibériques est

la plus grande d'Europe occidentale (Chapron et al., 2014) et que sa taille n'est pas connue pour avoir été dramatiquement plus petite qu'aujourd'hui dans le passé. Cependant, le résultat est cohérent avec une taille de population effective réduite précédemment signalée sur la base d'analyses microsatellites (Sastre et al., 2011). Cela suggère que la taille de la population de loups Ibériques dans le passé pourrait avoir été plus petite que ce qui est communément admis pour le 20ème siècle.

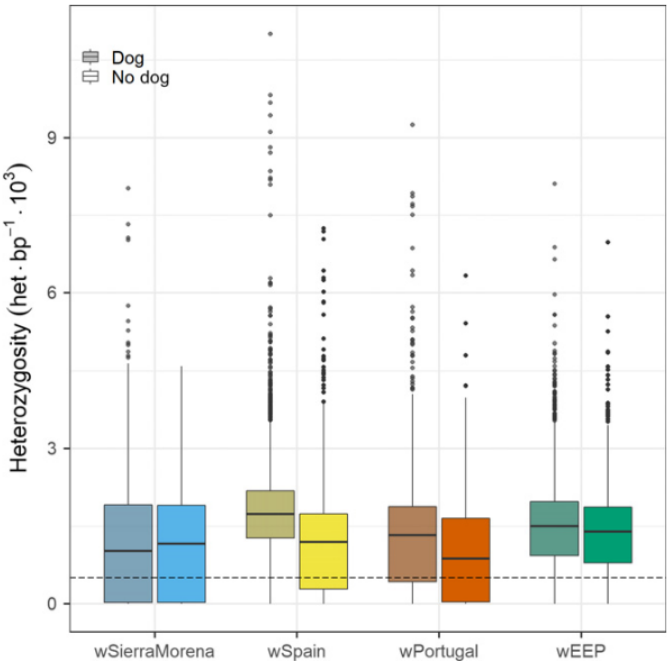

FIGURE 5. Hétérozygotie des blocs 50-SNP avec ascendance canine (Wolf/Dog ou Dog/Dog, case de gauche) et sans ascendance canine (Wolf/ Wolf, case de droite) chez quatre loups Ibériques. Les blocs d'ascendance canine étaient plus fréquents dans wSierraMorena (voir Figure 4) et très souvent ils apparaissaient comme des blocs Dog/Dog de très faible hétérozygotie (données non montrées)

Nos résultats mettent également en évidence la diversité des schémas évolutifs pour les loups du nord de l'Ibérie. D'une part, wPortugal a révélé une hétérozygotie étonnamment faible et une consanguinité élevée, comparable à celle des frères et sœurs complets (Tableau 1). Si l'on exclut le loup de la Sierra Morena, ces valeurs étaient plus extrêmes que pour tous les autres loups inclus dans l'étude, à l'exception des loups Italiens et Mexicains, deux populations hautement consanguines (Fabbri et al., 2007 ; Hedrick & Fredrickson, 2008 ; Hedrick et al., 1997 ; Lucchini, Galov, & Randi, 2004). L'autre loup nordique non mélangé (wEPP) présentait des valeurs de diversité plus similaires aux autres loups Eurasiens (Tableau 1). Les portions loup/loup du génome de wSpain présentaient une hétérozygotie intermédiaire (Fig. 5). La grande différence d'hétérozygotie entre ces trois loups est surprenante car l'ensemble de l'aire de répartition septentrionale des loups Ibériques ne couvre qu'environ 90 000 km^2, et la distance linéaire entre les lieux d'échantillonnage des différents individus était inférieure à 250 km et apparemment sans barrières intermédiaires. Hindrikson et al. (2017) ont montré que la diversité génétique des populations de loups en Europe pouvait être influencée par d'autres populations jusqu'à 850 km de distance, ce qui suggère une différenciation des populations de loups à grande échelle. Cependant, nos résultats montrent que la population de loups du nord de la péninsule Ibérique pourrait présenter une différenciation à des échelles très inférieures, conformément aux observations des loups Finlandais (Aspi et al., 2009 ; Aspi, Roininen, Ruokonen, Kojola, & Vilà, 2006), qui indiquent des distances de dispersion moyennes d'environ 100 km et une différenciation

significative des populations. Une étude utilisant des séquences du génome entier de loups Scandinaves a également montré de grandes différences dans la consanguinité réalisée (mesurée par le F_{ROH}) et l'hétérozygotie parmi les loups immigrants arrivant de la population Finno-Russe voisine (Kardos et al., 2018). La présence d'individus particulièrement consanguins a conduit les auteurs à suggérer qu'ils provenaient d'une petite population périphérique. Quoi qu'il en soit, des études de simulation montrent que la consanguinité réalisée peut varier fortement même parmi les individus ayant la même consanguinité généalogique (Hedrick, Kardos, Peterson, & Vucetich, 2017).

Nos analyses montrent également que l'une des séquences du génome du loup Ibérique publiées précédemment (wSpain) contenait environ 14,3 % de blocs de chiens (Tableau 1). Ce chiffre est proche des 12,5 % auxquels on pourrait s'attendre si l'un des arrière-grands-parents de ce loup était un chien. Cependant, la reconstruction des haplotypes montre que les blocs chiens étaient fragmentés en un très grand nombre de petits fragments (Fig. 4b) et que les séries d'homozygotie avaient tendance à être courtes (Fig. S4). Si l'on considère que le nombre de croisements par bras chromosomique chez le chien et le loup est compris entre 1,00 et 1,28 (Muñoz-Fuentes et al., 2015), il semble peu probable que le grand nombre de blocs observés ait pu être généré par recombinaison en seulement trois générations. Au lieu de cela, nos résultats suggèrent que la présence de petits blocs de chromosomes de chien peut être compatible avec **d'anciens** événements de croisement (Thompson, 2013) et impliquent que les gènes d'origine canine pourraient être omniprésents dans les génomes des loups Ibériques. Des études antérieures ont suggéré que certains gènes de chien pourraient avoir été introgressés et avoir été sélectionnés positivement et répandus dans certaines populations de loups nord-Américaines et Eurasiennes (Anderson et al., 2009 ; Pilot et al., 2018). Cependant, notre étude montre que l'introgression d'un très grand nombre de fragments chromosomiques de chien pourrait ne pas être aussi rare qu'on le pensait initialement.

Il est intéressant de noter que l'étude d'un petit panel de microsatellites autosomiques à l'aide de STRUCTURE, l'une des approches les plus couramment utilisées pour évaluer l'introgression et l'hybridation dans les populations naturelles, n'a pas permis d'indiquer de métissage pour ce même échantillon (Fig. S8). Cela suggère que le pouvoir d'identifier l'introgression dans de nombreuses autres études a pu être limité en raison du faible nombre de marqueurs ou de l'introgression généralisée d'un pool génétique dans l'autre (voir Sanchez-Donoso et al., 2014). Par conséquent, les estimations précédentes des taux d'introgression dans les populations Européennes de loups doivent être prises avec précaution (Godinho et al., 2011 ; Pacheco et al., 2017 ; Verardi, Lucchini, & Randi, 2006 ; Vilà et al., 2003). Un modèle fréquent émergeant de la plupart de ces études était l'identification d'un plus grand nombre d'hybrides F1 par rapport à une faible proportion de rétrocroisements de génération ultérieure (qui indiquerait l'introgression de gènes de chien dans la population de loups). Cette constatation a été utilisée pour affirmer que les hybrides F1 ont eu peu de succès lors des rétrocroisements dans la population de loups et que, par conséquent, ils peuvent avoir un effet mineur sur le patrimoine génétique des loups. **Cependant**, nos résultats suggèrent que ce n'est peut-être pas le cas et que l'introgression d'allèles de chiens s'est produite à plusieurs reprises et a pu être sous-estimée par les approches analytiques courantes.

Effets Allee dans la population de loups de la Sierra Morena

Les estimations de la taille des populations de loups dans la péninsule Ibérique sont difficiles en raison de l'absence d'une couverture neigeuse hivernale sur la majeure partie de l'aire de répartition, ce qui rend le suivi très difficile. Les estimations de la taille de la population sont donc basées sur la localisation des groupes familiaux et la confirmation de la reproduction par des approches

directes ou indirectes (Blanco, Reig, & de la Cuesta, 1992). Les difficultés pour une étude complète de la population de loups sont encore plus grandes pour la population méridionale en raison de l'accès difficile à la plupart de l'aire de répartition présumée. Cela a entraîné très peu d'enquêtes sur la population. Malgré cela, les rapports disponibles du gouvernement régional indiquent un déclin précipité au cours des dernières décennies. L'échantillon de loups de Sierra Morena que nous avons étudié semble confirmer cette vision sombre. Le nombre de meutes semble avoir été inférieur à 10 et avoir diminué au cours des 30 dernières années ou plus. L'échantillon de loups que nous avons étudié, tué sur la route en 2003, montre un niveau de consanguinité **supérieur** à celui attendu pour des frères et sœurs complets et inférieur juste à celui observé chez les loups Italiens consanguins (qui ont connu un goulot d'étranglement dramatique au cours du 20ème siècle ; (Chapron et al., 2014)) et les loups Mexicains (captifs, issus d'une poignée de fondateurs ; Hedrick & Fredrickson, 2008), et cohérent avec une population petite et isolée. Cependant, les informations sur cette population étant très rares, il n'existe aucune preuve directe de dépression de consanguinité.

Près d'un **tiers** du génome de ce loup présentait des blocs chiens. C'est plus que prévu si un seul des grands-parents était un chien, et cela peut être cohérent avec des événements d'hybridation récurrents, où une hybridation récente (comme le montre la grande taille de nombreux blocs de chiens dans la Figure 4a) a complété des événements de croisement anciens et l'introgression de gènes de chiens. Cela pourrait être un exemple **d'effet Allee** dans une population de loups extrêmement petite. Dans le sud de la Norvège, la présence d'un loup femelle solitaire a entraîné le seul événement d'hybridation rapporté jusqu'à présent en Scandinavie (Vilà et al., 2003). De même, la perturbation de la structure sociale et les loups en marge de la distribution semblent expliquer la plupart des événements d'hybridation loup-chien en Europe (Andersone, Lucchini, & Ozoliņš, 2002 ; Godinho et al., 2011 ; Leonard, Echegaray, Randi, & Vilà, 2014 ; Verardi et al., 2006). L'absence d'une population de loups stable et suffisamment importante dans la Sierra Morena a pu favoriser l'hybridation avec les chiens, qui sont utilisés de manière très intensive en grandes meutes pour la chasse au cerf dans la région et peuvent fréquemment échapper au contrôle humain.

De manière surprenante, la forte proportion de blocs chiens dans le génome du loup de la Sierra Morena n'a pas entraîné une augmentation de l'hétérozygotie (Tableau 1). En principe, on pourrait s'attendre à ce que de tels croisements facilitent le sauvetage génétique de populations consanguines à faible variation génétique (Hedrick & Fredrickson, 2008 ; Hedrick & Garcia-Dorado, 2016). Cependant, la diversité génétique de cet individu était la plus faible parmi les loups Ibériques. Cela s'explique par le fait que la plupart des grands blocs de chiens trouvés dans un chromosome s'appariaient avec des blocs de chiens similaires dans le chromosome complémentaire (blocs Dog/Dog), conséquence de la forte consanguinité récente dans cette population, ce qui entraîne une identité par descendance. De très grandes séries d'homozygotie ont été détectées et presque des chromosomes entiers étaient sous le seuil d'homozygotie (Fig. 1), comme observé chez les loups Scandinaves qui ont souffert d'une consanguinité très élevée au cours des 10 dernières générations (Kardos et al., 2018). La faible hétérozygotie observée dans les blocs Wolf/Wolf pour cet individu, environ 1 position hétérozygote pour 1000 pb, était pratiquement la même que pour les blocs Wolf/Dog et Dog/Dog (Fig. 5). La faible hétérozygotie dans les régions d'ascendance canine peut s'expliquer par le fait que beaucoup d'entre elles ont été trouvées sous forme de grands blocs Dog/Dog, et que les chiens de race pure ont tendance à avoir une très faible diversité génétique par rapport aux loups. La disparition complète de grands blocs de chromosomes de loups dans la Sierra Morena pourrait également s'expliquer par une charge génétique plus élevée qui pourrait entraîner une sélection favorisant les blocs de chiens, comme l'ont observé (Anderson et

al., 2009) pour les loups mélaniques en Amérique du Nord. Cependant, cela semble peu probable puisque la taille de la population de cette population était excessivement petite et que la sélection serait inefficace pour entraîner ces changements spectaculaires dans la structure du génome (Whitlock, 2000).

Les résultats de cette étude pour les loups de la Sierra Morena sont basés sur l'analyse d'un seul génome. Compte tenu de la variation de l'ascendance individuelle et de la consanguinité et de l'hétérozygotie réalisées qui pourraient être attendues chez des individus ayant le même pedigree (Hedrick et al., 2017), nos résultats peuvent sembler offrir une vision biaisée de l'histoire d'une population. Cependant, cette population a juste inclus une ou très peu de meutes au cours des dernières décennies et l'échantillon étudié pourrait représenter l'un des derniers individus de la population.

Dans l'ensemble, nos résultats montrent l'effet **synergique** de divers **effets Allee** sur cette population de loups. Lorsque la population a diminué jusqu'à atteindre une taille très réduite vers la fin du siècle dernier, la consanguinité a augmenté, atteignant des niveaux plus élevés que prévu pour la descendance des accouplements entre frères et sœurs. Dans le même temps, la réduction de la taille de la population a entraîné une diminution des chances de trouver des partenaires de la même espèce, ce qui a conduit à l'hybridation avec les chiens. Malgré cela, la taille de la population n'a pas augmenté et la consanguinité élevée a continué pour la population hybride, piégeant la population dans un tourbillon d'extinction (Gilpin & Soulé, 1986). Un recensement des loups a été effectué dans toute l'Espagne ces dernières années (MAGRAMA, 2016), mais des enquêtes approfondies dans la Sierra Morena n'ont pas permis de trouver de preuves de reproduction de loups. La population de loups de Sierra Morena pourrait désormais être éteinte.

CONCLUSIONS

Plusieurs leçons peuvent être tirées de la disparition probable de la population Espagnole de loups de la Sierra Morena. **Premièrement**, la persistance d'une très petite population pendant plusieurs générations ne peut pas être considérée comme un signe de viabilité, comme l'illustre également l'effondrement de la population de loups de l'Isle Royale après des décennies de consanguinité (Hedrick et al., 2014) et les preuves croissantes de graves effets de consanguinité dans les petites populations de loups isolées (voir ci-dessus). **Deuxièmement**, les **effets Allee** sont multiformes et agissent en **synergie**, amplifiant les menaces qui pèsent sur les petites populations. Permettre aux populations de croître jusqu'à atteindre une taille minimale peut être la meilleure protection contre ces menaces multiples. **Troisièmement**, l'introgression d'allèles de chiens dans les populations de loups peut être plus répandue que ce qui est généralement déduit d'études portant sur un petit nombre de marqueurs. Toutefois, cela n'implique pas que le flux génétique soit susceptible de déboucher sur un essaim hybride. La divergence malgré les échanges génétiques est un processus bien connu (Arnold, 2015) et il est probable que les loups Ibériques ont coexisté avec de nombreux chiens pendant des millénaires mais qu'ils restent clairement différenciés et que les loups continuent à jouer un rôle écologique important. Par conséquent, le contrôle létal des hybrides putatifs suggéré dans de nombreux plans de gestion à travers l'Europe [voir Boitani (2000) et les plans d'action nationaux et régionaux] n'est peut-être pas nécessaire et, en fait, la perturbation des populations de loups induite par le contrôle létal pourrait favoriser de nouvelles hybridations (Andersone et al., 2002 ; Leonard et al., 2014).