

Un pan du passé : L'hécatombe de la diversité génétique du loup Mexicain

Received: 31 December 2020

Accepted: 21 June 2021

DOI: 10.1111/mec.16037

SPECIAL ISSUE

MOLECULAR ECOLOGY WILEY

A sliver of the past: The decimation of the genetic diversity of the Mexican wolf

Ulrike H. Taron¹ | Isabel Salado² | Mariana Escobar-Rodríguez¹ |
Michael V. Westbury³ | Susanne Butschkau¹ | Johanna L. A. Pajmans¹ |
Bridgett M. vonHoldt⁴ | Michael Hofreiter¹ | Jennifer A. Leonard²

Résumé

On sait que le loup Mexicain (*Canis lupus baileyi*), espèce menacée d'extinction, présente des niveaux de diversité génétique extrêmement faibles. Cela pourrait être (i) le résultat de schémas évolutifs à long terme tels qu'ils existent à la limite la plus méridionale de la répartition de l'espèce à une taille effective relativement réduite, ou (ii) dû au déclin rapide de la population causé par la persécution humaine au cours du siècle dernier. Dans le **premier cas**, la sélection purificatrice devrait avoir minimisé l'impact de la consanguinité. Dans le **second cas**, les déclins rapides et récents de la diversité génétique peuvent avoir eu de graves conséquences sur la condition physique. Pour différencier ces hypothèses, nous avons effectué des analyses comparatives du génome entier de cinq loups Mexicains historiques (1907-1917) et de 18 loups Mexicains et gris contemporains d'Amérique du Nord et d'Eurasie. Sur la base des données du **génomme entier**, les loups Mexicains historiques et modernes forment ensemble une unité discrète. De plus, nous avons constaté que les loups Mexicains modernes ont une diversité génétique réduite et une consanguinité accrue par rapport à la population historique, qui était répandue dans le sud-ouest des États-Unis et non limitée au Mexique comme on le supposait auparavant. Enfin, bien que les loups Mexicains aient évolué en sympatrie avec les coyotes (*C. latrans*), nous avons observé une introgression plus faible entre les loups Mexicains historiques et les coyotes qu'avec les loups Mexicains modernes, malgré des similitudes de taille corporelle. Dans l'ensemble, nos données montrent que le **déclin récent** des populations est probablement à l'origine de la réduction du niveau de diversité génétique, mais pas de la différenciation observée entre les loups Mexicains et les autres loups d'Amérique du Nord.

1 | INTRODUCTION

Le loup Mexicain (*Canis lupus baileyi*) est la **sous-espèce** de loup gris qui habitait le Mexique et le sud-ouest des États-Unis (Hendricks et al., 2016 ; Nowak, 1995). Le statut de sous-espèce a d'abord été défini morphologiquement par leur petite taille et leur forme crânienne distincte (Bogan & Melhop, 1983 ; Nelson & Goldman, 1929). Des études ultérieures de l'ADN mitochondrial (ADNmt) ont confirmé la distinction entre le loup Mexicain et les autres populations de loups gris, et ont suggéré qu'ils représentaient une colonisation distincte et antérieure de l'Amérique du Nord par les loups Eurasiens (Vilà et al., 1999 ; Wayne et al., 1992). De même, des données d'ADNmt provenant de spécimens de musées centenaires ont renforcé cette distinction de la lignée de loups Mexicains en décrivant des haplotypes supplémentaires apparentés (« clade sud » dans Leonard et al., 2005). Plus récemment, les données génomiques ont apporté un soutien important au loup

Mexicain en tant que lignée distincte (Fan et al., 2016 ; Hailer & Leonard, 2008 ; vonHoldt et al., 2011).

Malgré la pléthore de preuves soutenant le loup Mexicain comme une lignée distincte, le flux génétique par l'hybridation suivie d'introgression a été une composante importante de l'histoire de toutes les populations de *Canis* d'Amérique du Nord (Heppenheimer et al., 2020 ; vonHoldt et al., 2011, 2018). Les loups gris de la région des Grands Lacs présentant une introgression substantielle et ancienne provenant du coyote (*C. latrans*), et du loup roux (*C. rufus*) semble avoir un dossier évolutif étendu et long de flux génétique avec les coyotes (vonHoldt et al., 2011, 2016). De plus en plus de preuves suggèrent que le mélange et l'introgression génomiques, à l'échelle du génome et des gènes liés à la condition physique, constituent l'attente plutôt que l'exception tout au long de l'histoire de l'évolution du genre *Canis* (Adams et al., 2003 ; Anderson et al., 2009 ; Fan et al., 2016 ; Hedrick, 2013 ; vonHoldt et al., 2011, 2016). Les canidés Américains présentent une large gamme de tailles corporelles à travers les gradients d'habitat, longitudinaux et d'altitude (Mech & Paul, 2008 ; Monzón et al., 2014 ; Way, 2007). Beaucoup suggèrent que les similitudes de taille corporelle augmentent la probabilité de croisement et d'hybridation, notamment chez les canidés (Hinton et al., 2018 ; Nagel & Schluter, 1998 ; Stronen et al., 2012). La faible taille des populations est un autre facteur qui augmente les chances d'hybridation chez les canidés (Leonard et al., 2014). Ainsi, la taille relativement réduite des loups Mexicains et leur faible population pourraient suggérer une hybridation avec des taxons *Canis* sympatriques : coyotes, loups roux et chiens (*C. familiaris*) (Hailer & Leonard, 2008). Et, en fait, les marqueurs génétiques mitochondriaux et du chromosome Y des loups Mexicains historiques ont montré des preuves d'une **introgression ancienne** des coyotes vers les loups Mexicains (Hailer & Leonard, 2008 ; Leonard et al., 2005).

Les loups Mexicains ont été quasiment éradiqués dans les années 1960. Au cours de la décennie suivante, les quelques individus sauvages restants ont été inscrits sur la liste des espèces menacées (1976), puis capturés et transférés dans trois programmes d'élevage en captivité, ne comprenant finalement que sept fondateurs (García-Moreno et al., 1996 ; Hedrick & Fredrickson, 2008, 2010). Le programme d'élevage le mieux documenté n'a utilisé que trois fondateurs indépendants (lignée certifiée ou McBride), tandis que deux autres lignées ont été fondées par deux individus chacune, avec beaucoup moins de documentation (Aragón et Ghost Ranch) (Hedrick & Fredrickson, 2008, 2010). Au départ, il n'était pas possible d'exclure la présence d'individus métissés parmi les fondateurs d'Aragón ou de Ghost Ranch, ce qui a obligé à maintenir les trois lignées séparément jusqu'à ce que la génétique confirme que les fondateurs n'étaient effectivement pas métissés (Hedrick et al., 1997). Des études génomiques récentes ont signalé les plus faibles niveaux d'hétérozygotie chez les loups Mexicains modernes parmi toutes les populations de loups gris séquencées, y compris la population de loups gris hautement consanguine et isolée de l'île Royale (206 mi²) du Michigan, dans le lac Supérieur (Fan et al., 2016 ; Robinson et al., 2019 ; Sinding et al., 2018).

La consanguinité sur de longues périodes à l'état sauvage entraîne une réduction de la variation génétique, bien que ces réductions ne soient pas toujours préjudiciables car elles peuvent conduire à une **purge** des allèles inadaptés (Hedrick & Garcia-Dorado, 2016). Par exemple, le renard des îles (*Urocyon littoralis*), extrêmement consanguin, présente un appauvrissement presque complet de la variation génomique, et pourtant il ne présente pas les traits attendus de la dépression de la condition physique (Robinson et al., 2016). Des analyses ultérieures ont suggéré que la **purge**

efficace des allèles fortement délétères soutient la persistance de l'espèce malgré la faible variation génomique, les faibles tailles effectives et la consanguinité (Robinson et al., 2018).

Indépendamment de la **purge**, certains ont suggéré que la dépression de consanguinité est souvent absente chez les loups gris en raison de leur capacité à résister aux goulots d'étranglement de la population communs à la dispersion, la colonisation et l'expansion de la population (Boitani, 2003 ; Fritts & Carbyn, 1995). Des études plus récentes ont cependant révélé que la dépression de consanguinité avait des impacts sérieux allant d'une faible reproduction à la déformation du squelette dans ces deux cas (Hedrick et al., 2014 ; Liberg et al., 2005 ; Räikkönen et al., 2009, 2013).

Bien que la dépression de consanguinité ait été identifiée chez le loup Mexicain, et malgré la faible taille de leur population, aucune preuve d'hybridation avec les chiens domestiques n'a été documentée (Asa et al., 2007 ; Fitak et al., 2018). Des preuves d'introgression historique ou ancienne de coyotes ou de loups rouges dans le génome du loup Mexicain ont été documentées à partir de données de polymorphisme mononucléotidique (SNP) à l'échelle du génome nucléaire (vonHoldt et al., 2011) et d'ADNmt historique (Leonard et al., 2005). Ici, nous utilisons les séquences du génome entier de loups Mexicains historiques et contemporains pour caractériser (i) la quantité et le moment de l'introgression, (ii) le moment du déclin de la diversité génétique et du changement de la consanguinité chez les loups Mexicains, et (iii) l'étendue de leur distribution géographique. Nous avons combiné ces données avec les génomes publiés d'autres canidés d'Amérique du Nord pour tester les hypothèses selon lesquelles l'introgression récente est le résultat de la persécution et du déclin de la taille de la population alors qu'elle était menacée d'extinction, et que les faibles niveaux de diversité génétique observés sont la conséquence d'un déclin démographique historique causé par l'homme. Enfin, nous plaçons ces nouvelles données provenant de l'ancienne population de loups Mexicains dans le contexte des efforts de conservation du loup Mexicain en cours.

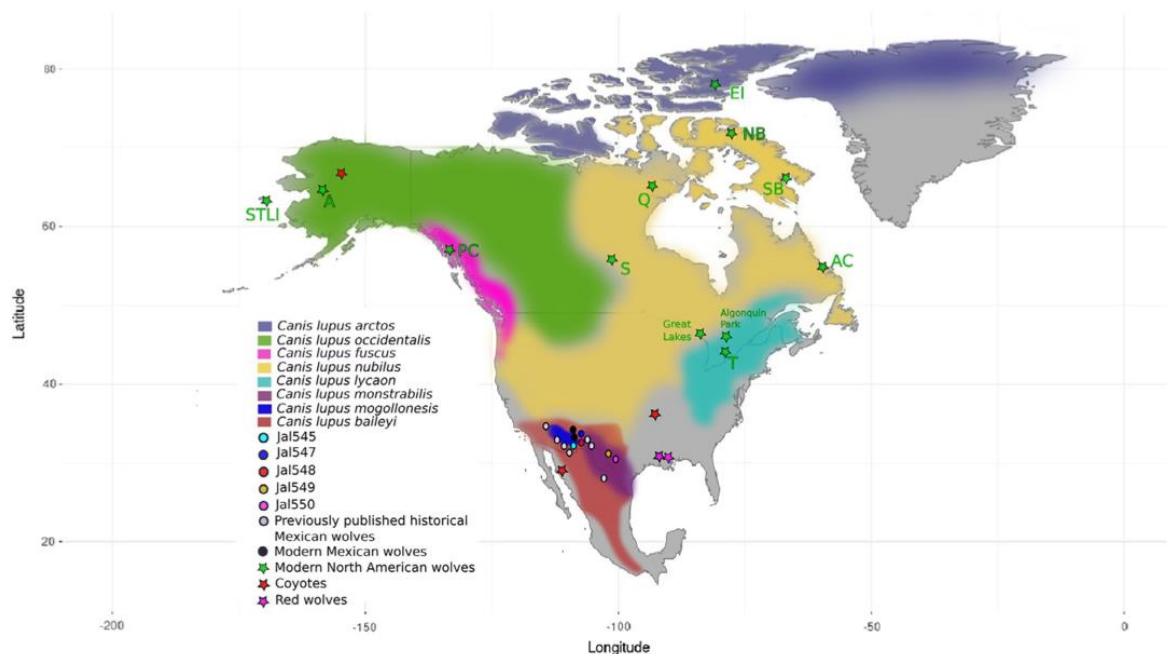


FIGURE 1. Distribution historique du loup gris (*Canis lupus*) en Amérique du Nord montrant les sous-espèces actuellement acceptées. Les emplacements approximatifs des loups Mexicains historiques et modernes pour lesquels des données génétiques étaient précédemment disponibles et/ou sont présentées ici sont indiqués par un point. Les autres génomes nucléaires de canidés utilisés dans cette étude sont indiqués par des étoiles. SB, sud de l'île de Baffin ; NB, nord de l'île de Baffin ; EI, île d'Ellesmere ; Q, Qamanirjuaq ; S, Saskatchewan ; T, Toronto ; AC, côte Atlantique ; A, Alaska ; PC, côte pacifique ; STLI, île Saint-Laurent

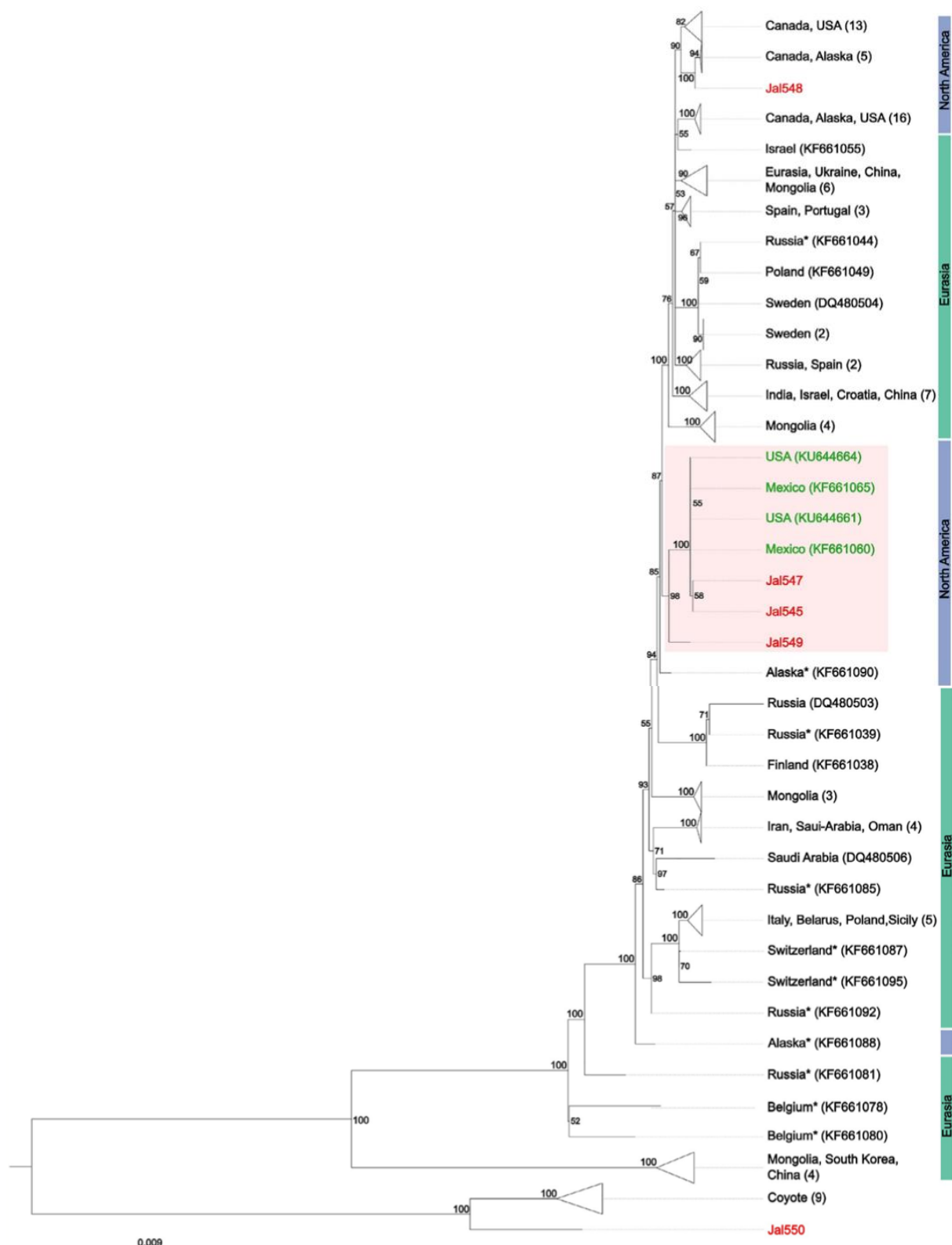


FIGURE 2. Arbre de vraisemblance maximale basé sur un alignement de 14 141 pb de 110 génomes mitochondriaux de loups et de coyotes (Tableau S5). Pour les clades effondrés, les emplacements et le nombre d'échantillons sont indiqués entre parenthèses. Les valeurs de soutien Bootstrap sont indiquées à côté des nœuds. L'outgroupe (*Cuon alpinus*) n'est pas représenté. **Texte rouge :** loups Mexicains historiques de cette étude ; **texte vert :** séquences de loups Mexicains modernes ; astérisque : échantillons anciens ; zone rouge clair : clade sud

2 | MATÉRIAUX ET MÉTHODES

2.1 Matériaux

Des échantillons d'os provenant de cinq crânes de loups Mexicains historiques collectés dans la nature entre 1907 et 1917 et déposés au National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, ont été prélevés à des fins d'analyse génétique (Figure 1, Tableau S1). Les données nouvellement obtenues à partir de ces échantillons ont été analysées en même temps que 21 ensembles de données sur le **génom**e entier publiés précédemment et provenant de deux loups Mexicains modernes, de 12 autres loups gris d'Amérique du Nord, de deux loups gris d'Eurasie, de deux loups roux et de trois coyotes (Figure 1, Tableau S2). La région de contrôle mitochondriale de l'un de ces cinq spécimens historiques (USNM 224484) a été analysée dans une étude précédente (Leonard et al., 2005).

2.2 | Méthodes moléculaires et prétraitement des données...

2.3 | Analyses de l'ADN mitochondrial...

2.4 | Analyses nucléaires...

3 | RÉSULTATS

Pour les données historiques, entre 2 970 et 18 927 lectures par individu ont été mappées avec succès au génome mitochondrial de référence (loup : Jal545, Jal547, Jal548, Jal49 ; coyote : Jal550), ce qui donne une couverture de séquence de 12x-82x pour tous les échantillons (Tableau S4). Nous avons également obtenu des couvertures génomiques moyennes de 1,1-1,2x pour les loups Mexicains historiques (39 255 346 et 48 562 475 lectures par individu) lors de la cartographie du génome de référence du chien sauvage Africain (Tableau S3). Les lectures présentaient de légères dégradations (Figures S1, S2) et des longueurs de fragments courtes (moyenne 49-73 pb ; Tableau S3), comme prévu pour les échantillons historiques (Sawyer et al., 2012). Pour l'analyse des séquences nucléaires, nous avons obtenu des données publiées précédemment (21 échantillons de *Canis* modernes, dont deux loups Mexicains modernes et trois coyotes) pour les cartographier au génome du chien sauvage Africain. Cela a produit 59 017 254 à 391 455 879 lectures cartographiées par individu, avec des couvertures moyennes de l'ensemble du génome de 2,4x-15,8x pour tous les échantillons (Tableau S2). Nous avons découvert et retenu 853 783 SNP nucléaires après filtrage pour analyse.

3.1 | Relation entre les loups Mexicains historiques et modernes

À l'exception de différences de longueur et d'un petit nombre de positions non appelées, les génomes mitochondriaux de loups Mexicains modernes publiés (KF661060.1, KF661065.1, KU644661, KU644664 ; Koblmüller et al., 2016 ; Thalmann et al., 2013) étaient tous identiques les uns aux autres et portent l'haplotype historique le plus commun, **lu33** (Leonard et al., 2005). **Cet haplotype n'a pas été identifié en dehors des loups Mexicains**. Les comparaisons par paires des séquences du génome mitochondrial des loups Mexicains historiques et modernes ont révélé des différences entre elles (moyenne = 21,9, écart-type = 21,2), la variation étant légèrement plus importante dans les échantillons historiques (moyenne = 37,7, écart-type = 20,1). Cependant, cette différence n'était pas significative ($p = 0,138$) (Tableau S6). L'échantillon Jal550 a été exclu de cette analyse en raison de son haplotype de coyote introgressé. En raison de la faible qualité de cartographie des lectures courtes d'ADNa dans les régions de faible complexité, tous les échantillons historiques contenaient des positions non appelées dans la région de contrôle mitochondriale, ce qui complique la comparaison avec les séquences de la région de contrôle

mitochondriale précédemment publiées (Leonard et al., 2005). Après avoir exclu ces sites non appelés, nous avons conservé un alignement de 343 pb et perdu huit positions de diagnostic. L'unique échantillon qui a également été précédemment séquencé par Leonard et al. (2005) (Jal545 ; USNM 224484) a donné des résultats cohérents avec l'haplotype lu33, comme précédemment trouvé. Nous avons découvert **deux nouveaux haplotypes** de loup Mexicain qui diffèrent chacun de lu33 par 1 pb (Figure 3). L'échantillon Jal550 (USNM227885) du Texas est compatible avec l'haplotype lu60, qui a été identifié précédemment chez un individu du Mexique (Jal474, USNM98313) (Leonard et al., 2005) et qui fait partie de la diversité des coyotes, comme indiqué ci-dessus (Figure 2).

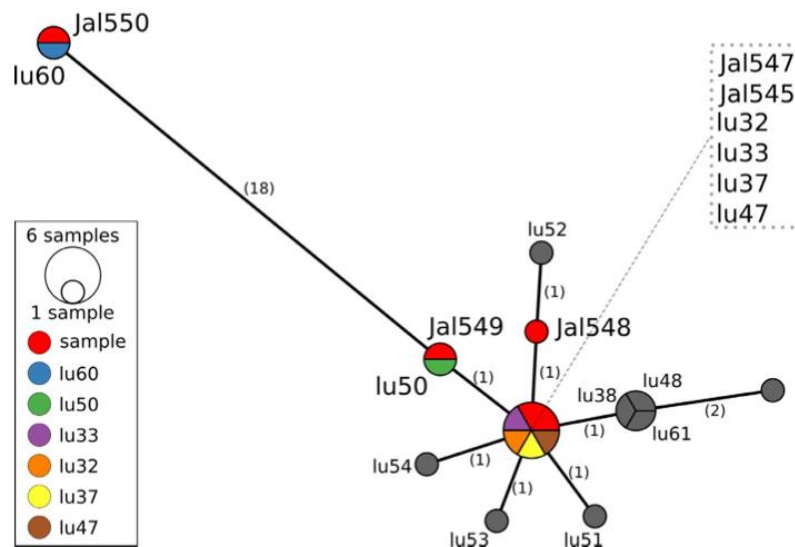


FIGURE 3. Réseau de jonction médian d'un alignement de 343 pb contenant cinq séquences historiques de loups Mexicains et 14 haplotypes de loups nord-Américains précédemment identifiés (Leonard et al., 2005). Les haplotypes colorés sont associés aux échantillons historiques de loups Mexicains, les autres haplotypes sont représentés en gris. Le nombre de différences entre les haplotypes est indiqué entre parenthèses. Réseau construit à l'aide de POPART (Leigh & Bryant, 2015)

Nous avons obtenu un alignement final de 14 141 pb des cinq génomes mitochondriaux consensus historiques du loup Mexicain et de 105 autres séquences mitochondriales de canidés. JMODELTEST a identifié HKY + I + G comme le modèle de substitution le plus approprié en utilisant quatre catégories de substitution et en estimant le rapport des transitions à la transversion, la proportion de sites invariables et le paramètre de distribution gamma comme le modèle et les paramètres les mieux adaptés selon le critère d'information bayésien.

La topologie de la phylogénie ML était qualitativement similaire aux arbres des études précédentes (par exemple, Koblmüller et al., 2016 ; Thalmann et al., 2013). Trois des cinq échantillons historiques (Jal545, Jal547 et Jal549) se sont regroupés avec les échantillons de loups Mexicains modernes dans le clade méridional précédemment identifié (Figure 2). L'échantillon historique de loup Mexicain Jal548 se situait en dehors du clade sud, mais dans la diversité des loups gris d'Amérique du Nord avec un support bootstrap élevé (100 % ; Figure 2). Le dernier échantillon historique de loup Mexicain, Jal550, s'est regroupé au sein du clade des coyotes (Figures 2, 3), bien qu'il ne corresponde à aucun haplotype de coyote décrit à ce jour (Hailer & Leonard, 2008 ; Koblmüller et al., 2012).

L'arbre nucléaire NJ regroupait les loups Mexicains modernes et historiques, séparés des autres loups gris nord-Américains, mais au sein de la diversité globale des loups gris. Les loups rouges et les coyotes se sont regroupés séparément, les loups gris des Grands Lacs et du parc Algonquin étant plus proches d'eux que des autres loups gris d'Amérique du Nord (Figure S3).

Dans l'analyse d'admixture, les loups Mexicains modernes et historiques se sont regroupés pour toutes les valeurs de K (Figure 4). Les loups gris Mexicains, Eurasiens et les autres loups gris d'Amérique du Nord sont différenciés des coyotes et des loups rouges à $K = 2$. Les loups Mexicains sont différenciés des autres loups gris, des loups roux et des coyotes à $K = 3$ et plus. A $K = 4$ et 5, des groupes géographiques au sein des loups gris deviennent apparents, et à $K = 6$, les loups roux se différencient des coyotes. EVALADMIX a trouvé que $K = 6$ était le meilleur ajustement pour notre ensemble de données (Figure S4).

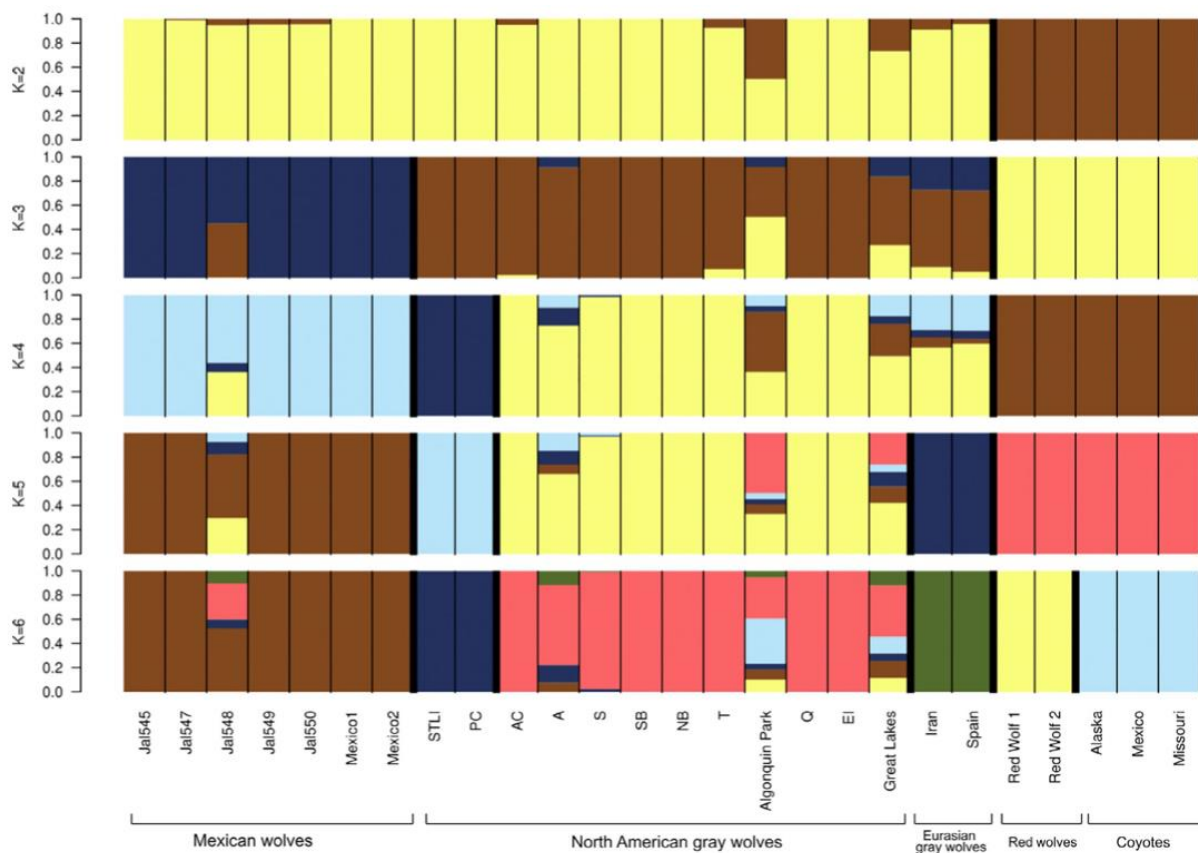


FIGURE 4. Proportions de mélange à l'aide de NGSADMIX, en spécifiant des valeurs K de 2 à 6. Les loups Mexicains historiques sont Jal545, Jal547, Jal548, Jal549, Jal550 ; les loups Mexicains modernes sont Mexico 1 et Mexico 2 ; les loups gris Eurasiens et nord-Américains modernes sont nommés selon leur origine géographique. SB, Sud de Baffin ; NB, Nord de Baffin ; EI, île d'Ellesmere ; Q, Qamanirjuaq ; S, Saskatchewan ; T, Toronto ; AC, côte atlantique ; A, Alaska ; PC, côte pacifique ; STLI, île Saint-Laurent. Les coyotes sont aussi nommés en fonction de leur origine géographique

3.2 Introgression ancienne dans les loups Mexicains

Bien qu'un haplotype mitochondrial montre qu'il a dû y avoir une introgression à partir des coyotes à un moment donné, aucune introgression nucléaire récente n'est discernable dans les résultats du mélange (Figure 4). L'ACP n'a pas non plus suggéré de regroupement entre les loups Mexicains et les coyotes ; même l'échantillon Jal550, qui contient l'haplotype mitochondrial du coyote, a été regroupé avec les loups Mexicains historiques (Figure 5). Le premier PC a différencié les loups gris de la variation génomique des coyotes (50,99 % de la variation des données expliquée par le PC1),

tandis que le PC2 (8,3 %) et le PC3 (4,95 %) ont différencié la diversité au sein des loups gris (Figure 5, Figure S5). En outre, PC2 semblait polarisé par les loups gris et les loups Mexicains (modernes et historiques), avec deux loups gris Eurasiens (Espagne et Iran) inclus. La PC4 (3,78 %) différenciait les loups rouges des loups gris et la variation génomique des coyotes (Figure S5). Étant donné que le PC1 capturait la variation génétique des coyotes chez les canidés nord-Américains et que les loups rouges, les loups de l'Est et les loups gris des Grands Lacs étaient chargés positivement sur cet axe, ils ont été exclus de l'analyse des statistiques D au niveau de la population (Figures 4, 5). Nous avons détecté un flux génétique significatif entre les coyotes et les loups Mexicains modernes par rapport aux loups Mexicains historiques ($D = 0,154$; $p < 0,001$ dans [HistMex, ModMex ; Coyote]) au niveau des populations (Tableau S7) et des individus (Figure 6, Tableau S8). Bien que les statistiques D aient également détecté différents niveaux d'introgession avec les coyotes au sein des loups Mexicains historiques, notamment dans les échantillons Jal550 et Jal547 (Figure 6, Tableau S9), ce flux génétique était plus faible que pour les loups Mexicains modernes. Nous avons également trouvé plus d'introgession entre les coyotes et les loups Mexicains modernes par rapport aux autres loups nord-Américains (Tableau S7).

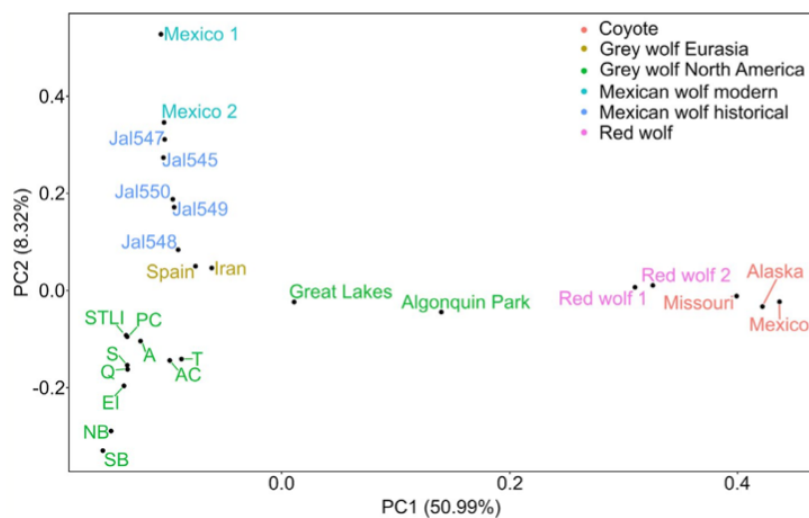


FIGURE 5. Analyse en composantes principales (ACP) de 26 génomes de canidés (Tableaux S2 et S3) basée sur les autosomes, uniquement les transversions. Les loups gris modernes d'Eurasie et d'Amérique du Nord sont étiquetés selon leur origine géographique. SB, sud de Baffin ; NB, nord de Baffin ; EI, île d'Ellesmere ; Q, Qamanirjuaq ; S, Saskatchewan ; T, Toronto ; AC, côte atlantique ; A, Alaska ; PC, côte pacifique ; STLI, île du Saint-Laurent. Les coyotes sont également nommés selon leur origine géographique. La variation des données expliquée par chaque CP est indiquée entre parenthèses

De même, nous avons également détecté un flux génétique entre les loups Mexicains modernes et les autres loups nord-Américains par rapport aux loups Mexicains historiques, tant au niveau de la population ($D = 0,139$; $p < 0,001$ dans [HistMex, ModMex ; GreyW], Tableau S7) qu'au niveau individuel (Figure 6, Tableau S10). Bien que les statistiques D aient également détecté différents niveaux d'introgession avec les loups nord-Américains au sein des loups Mexicains historiques (Tableau S11), suggérant un schéma à long terme, ce flux génétique était à nouveau plus faible qu'avec les loups Mexicains modernes (Figure 6, Tableau S10). L'introgession à partir de loups gris nord-Américains a également été identifiée pour Jal548 dans les résultats de mélange (Figure 4).

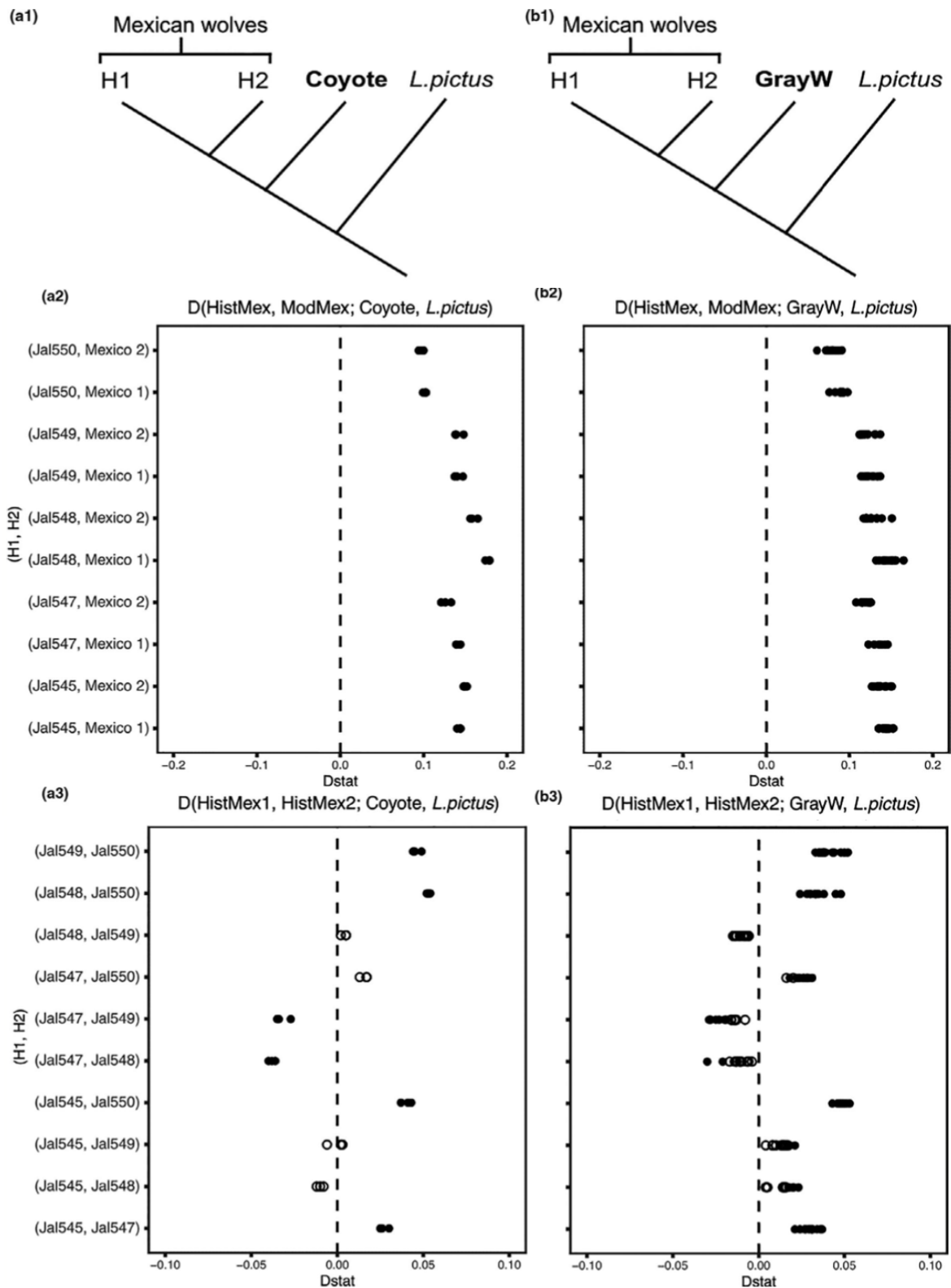


FIGURE 6. *D*-statistiques calculées au niveau individuel (Tableaux S8-11). Les parcelles de gauche (a1, a2, a3) montrent le mélange avec les coyotes, tandis que les parcelles de droite (b1, b2, b3) montrent le mélange avec d'autres loups gris nord-Américains (GreyW). (b1, b2, b3) avec d'autres loups gris d'Amérique du Nord (GreyW). (a1, b1) Phylogénies utilisées pour les analyses ; (a2, b2) loups Mexicains historiques (HistMex) comme H1 et loups Mexicains modernes (ModMex) comme H2 ; (a3, b3) loups Mexicains historiques comme H1 et H2. Les cercles remplis indiquent des valeurs *D* significatives ($3 < Z < -3$). Le chien sauvage Africain (*L. pictus*) a été utilisé comme sous-groupe dans chaque comparaison

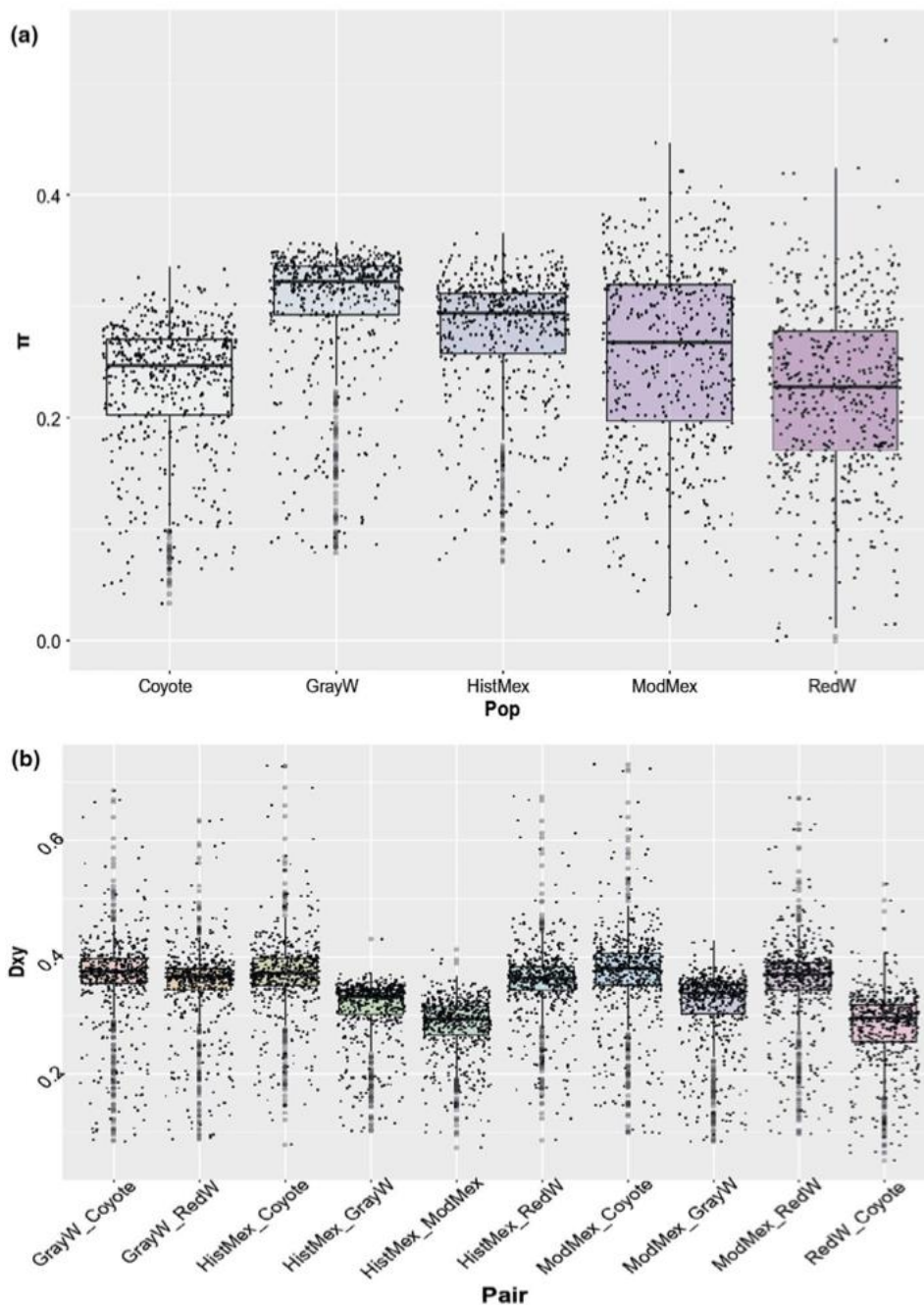


FIGURE 7. Boxplots de (a) la diversité nucléotidique (π) et (b) la divergence des populations (D_{xy}) entre les canidés nord-Américains. Individus regroupés en cinq populations : deux loups Mexicains modernes (ModMex), cinq loups Mexicains historiques (HistMex), trois coyotes modernes (Coyote), deux loups roux (RedW) et 12 loups gris nord-Américains (GrayW). Les petits points indiquent la valeur moyenne par fenêtre non chevauchante de 1 Mo. Dans les boxplots, la ligne horizontale la plus épaisse marque la médiane, les charnières les premier et troisième quartiles et les moustaches la valeur la plus grande ne dépassant pas $1,5 \times \text{IQR}$ de la charnière

3.3 | Changements de la diversité génétique et de la consanguinité chez les loups Mexicains au fil du temps

Nous avons découvert deux nouveaux haplotypes mitochondriaux du « clade sud » (Figures 2, 3). Cette découverte augmente considérablement la diversité mitochondriale historique connue des loups Mexicains.

L'un des loups Mexicains modernes présentait le coefficient de consanguinité le plus élevé de tous les canidés de cette étude ($F = 0,365$), tandis que l'autre loup Mexicain moderne présentait le

troisième coefficient de consanguinité le plus élevé si l'on exclut les coyotes ($F = 0,226$; Tableau S12). La plupart des loups gris de l'Alaska et du Canada avaient un coefficient de consanguinité très faible ($F = 0,005-0,03$; Tableau S12), bien que les populations menacées et insulaires présentaient des niveaux élevés d'estimations de consanguinité ($F = 0,043- 0,179$). Alors que le niveau de consanguinité trouvé chez les loups Mexicains historiques était plus important que celui trouvé dans les populations de loups gris d'Amérique du Nord ($F = 0,041-0,172$), il était sensiblement inférieur à celui d'aujourd'hui ($F = 0,226-0,365$). En outre, nous avons constaté que la différence entre les loups Mexicains modernes ($F = 0,295$) et historiques ($F = 0,125$) était significative ($t = -135,7$, $df = 32,792$, $p < 2,2 \times 10^{-16}$). De même, la parenté était élevée entre les deux loups Mexicains modernes ($R = 0,24$) et très faible en moyenne parmi les loups gris (Tableau S13). Nous avons noté une grande variance dans la parenté entre les loups Mexicains historiques et modernes ($R = 0,0-0,24$).

Les loups Mexicains (modernes et historiques) avaient des niveaux de diversité génomique significativement plus élevés ($\pi = 0,278$) que les coyotes ($\pi = 0,229$, $t = 14,4$, $df = 1050,3$, $p = 2,2 \times 10^{-16}$) ou les loups rouges ($\pi = 0,223$, $t = 13,8$, $df = 933,9$, $p = 2,2 \times 10^{-16}$), et significativement plus faible que les autres loups gris nord-Américains ($\pi = 0,299$, $t = -6,0$, $df = 1041,7$, $p = 2,3 \times 10^{-9}$). Bien que la taille des échantillons soit faible, nous avons constaté que les loups Mexicains historiques ($n = 5$) présentent une diversité plus élevée ($\pi = 0,275$) que les individus modernes ($n = 2$, $\pi = 0,257$, $t = 4,15$, $df = 969,0$, $p = 3,6 \times 10^{-5}$) (Figure 7a). Nous avons également constaté que les niveaux de divergence génétique entre les loups Mexicains (modernes +historiques) et les coyotes ($D_{xy} = 0,371$, $SD = 0,07$) étaient similaires mais légèrement supérieurs à ceux de la divergence entre les coyotes et les loups gris ($D_{xy} = 0,365$, $SD = 0,08$). Les loups Mexicains et les loups gris présentaient de faibles niveaux de divergence ($D_{xy} = 0,314$, $SD = 0,06$), mais le plus faible était celui entre le loup rouge et le coyote ($D_{xy} = 0,281$, $SD = 0,06$). Lorsque nous avons analysé séparément les loups Mexicains historiques et modernes, nous avons constaté qu'ils avaient à peu près la même divergence avec les coyotes ($D_{xy} = 0,373$, $SD = 0,08$ pour les coyotes modernes ; $D_{xy} = 0,370$, $SD = 0,07$ pour les coyotes historiques). La divergence entre les loups Mexicains historiques et modernes était faible ($D_{xy} = 0,283$, $SD = 0,05$), et à peu près la même que la divergence entre les loups rouges et les coyotes ($D_{xy} = 0,281$, $SD = 0,06$) (Figure 7b).

4 | DISCUSSION

En moins d'un siècle, la distribution des loups Mexicains a dramatiquement décliné, passant d'une époque où ils étaient répandus dans une grande partie du Mexique et du sud-ouest Américain à une extinction à l'état sauvage (Fredrickson & Hedrick, 2002 ; Hedrick & Fredrickson, 2010). Ici, nous ajoutons aux études précédentes des données génétiques historiques des loups Mexicains (Hailer & Leonard, 2008 ; Hendricks et al., 2016 ; Leonard et al., 2005) et trouvons une diversité mitochondriale historique supplémentaire (Figure 3, Tableau S6). Nous rapportons également les séquences du génome entier de cinq loups Mexicains historiques, qui présentaient une diversité génomique plus élevée et des niveaux de consanguinité plus faibles que les loups Mexicains captifs et réintroduits actuels (Figure 7). Ces nouvelles données suggèrent que les faibles niveaux de diversité génomique sont dus à un déclin récent de la population avec une consanguinité accrue plutôt qu'à une histoire évolutive à long terme de faible diversité génétique. La sélection purificatrice peut contourner la dépression de consanguinité dans les lignées présentant des tailles effectives faibles et stables malgré une très faible diversité génétique (Robinson et al., 2018). Cependant, la **dérive** est forte dans les populations qui ont connu des déclinés rapides de la taille

effective, ce qui mine la capacité de la sélection purificatrice à purger les allèles délétères liés à la dépression de la *fitness* (Hedrick & Garcia-Dorado, 2016). Les loups Mexicains appartiennent à cette dernière catégorie - un déclin rapide de la taille effective de la population et de la diversité génétique.

Un autre risque auquel sont confrontées les populations de loups gris de petite taille, perturbées et en lisière est un risque accru d'hybridation interspécifique (Leonard et al., 2014 ; Stephens et al., 1999). L'introgression de matériel génétique peut apporter des avantages à court terme, mais elle ne suffit pas toujours à sauver une population. Par exemple, la population de loups gris, aujourd'hui éteinte, qui habitait la Sierra Morena dans le sud de l'Espagne, s'est hybridée avec des chiens, ce qui lui a permis de survivre pendant quelques générations supplémentaires de consanguinité menant à leur extinction il y a environ 20 ans (Gómez-Sánchez et al., 2018). L'introgression peut également avoir des effets négatifs directs tels que l'envahissement, une menace sérieuse pour le loup rouge (Heppenheimer et al., 2020 ; Miller et al., 2003). Les populations menacées qui se sont hybridées peuvent également faire face à la persécution des gestionnaires (par exemple, Vilà et al., 2003).

Les loups Mexicains ont évolué en **sympatrie** avec les coyotes tout au long de leur histoire, et ont coexisté avec les chiens pendant des milliers d'années, y compris pendant les périodes de déclin démographique. Les loups Mexicains sont les plus petits loups d'Amérique du Nord, et donc ceux dont la taille est la plus similaire à celle des coyotes et des chiens, ce qui augmente encore la probabilité d'hybridation (par exemple, Hinton et al., 2018). Malgré l'opportunité et les conditions d'hybridation interspécifique, aucune preuve d'introgression du chien n'a été identifiée dans le génome du loup Mexicain (Fitak et al., 2018). L'introgression d'ADN mitochondrial de coyotes a été identifiée dans la population historique (Hailer & Leonard, 2008 ; Leonard et al., 2005 ; cette étude).

L'unique haplotype mitochondrial de type coyote précédemment identifié chez un seul loup Mexicain historique a été ici découvert chez un second individu géographiquement disparate, malgré le faible nombre de loups Mexicains étudiés (Figure 2). Les animaux chez lesquels l'haplotype mitochondrial de type coyote a été identifié ont été collectés en 1899 et 1907 (Jal550), et le génome de Jal550 ne présentait aucune preuve d'ascendance coyote à $K = 3-6$ (Figure 4), ce qui indique que l'événement **d'introgression** était relativement ancien. Bien que l'ascendance récente du coyote n'ait pas été identifiée chez les loups Mexicains historiques dans les analyses de mélange, elle a été identifiée dans les statistiques D , ce qui suggère également un ou des événements de flux génétiques anciens plutôt que récents (Figure 6, Tableau S7).

Une explication possible de la divergence de la lignée mitochondriale chez les loups Mexicains, basée uniquement sur les données modernes, est que les loups Mexicains représentent une extrémité d'un continuum de loups gris à travers l'Amérique du Nord expliqué par un simple isolement par la distance dans lequel la partie intermédiaire est absente des analyses en raison de leur disparition (Leonard et al., 2005). Si tel était le cas, il devrait y avoir un gradient d'ascendance du loup Mexicain vers les autres loups d'Amérique du Nord du sud au nord. Ce phénomène n'a pas été observé dans les résultats historiques de l'ADN mitochondrial, et nous ne l'observons pas ici avec les données nucléaires. Même à partir de la limite nord de la distribution, les loups Mexicains ont presque tous une ascendance de loup Mexicain. L'unique individu présentant une autre ascendance de loup nord-Américain (probablement plus récente) (Jal548 ; Figure 4) est l'exception qui confirme la règle en illustrant le fait qu'un mélange récent peut être identifié dans notre ensemble de données mais n'a pas été trouvé chez les autres individus. Nous avons trouvé

des preuves d'événements d'introgession anciens chez d'autres individus de loups Mexicains, ce qui suggère que le flux génétique a pu se produire plus facilement dans le passé, lorsque les populations étaient plus grandes et peut-être plus connectées. Par conséquent, nos résultats suggèrent que leur distinction est due à des habitats distincts par rapport aux autres loups gris d'Amérique du Nord. Plusieurs populations de loups nord-Américains présentent des signaux forts d'adaptation locale et d'évolution divergente étroitement corrélés à l'environnement (Carmichael et al., 2007, 2008 ; Koblmüller et al., 2009 ; Leonard, 2014 ; Muñoz-Fuentes et al., 2010 ; Musiani et al., 2007 ; Schweizer et al., 2016 ; Zhang et al., 2014). Nous suggérons donc que les loups Mexicains représentent une lignée distincte de loups gris par le biais du processus d'adaptation locale.

En tant que taxon localement adapté associé à un habitat, l'habitat peut être un proxy utile pour déterminer la distribution appropriée du loup Mexicain, comme l'ont fait Hendricks et al, (2019). Ils ont prédit que l'aire de répartition du loup Mexicain comprenait probablement le Mexique, le Nouveau-Mexique, l'Arizona, l'ouest du Texas et le sud de la Californie (large répartition dans la Figure 1). Hendricks et al. (2019) ont soutenu cette aire de répartition étendue avec l'analyse génétique d'un loup gris historique du sud de la Californie, qui s'est révélé être un loup Mexicain. Nos données génomiques provenant des autres bords des extrêmes géographiques de l'aire de répartition du loup Mexicain soutiennent également la large distribution du loup Mexicain (Figure 1). Comme cet habitat se déplace avec le réchauffement climatique en cours, on prévoit que la zone appropriée pour les loups Mexicains se déplace également vers le nord.

Des politiques de sauvetage génétique ont été mises en œuvre pour soutenir la survie du loup Mexicain dans le passé, et elles semblent avoir été initialement couronnées de succès (Fredrickson et al., 2007 ; Kalinowski et al., 1999). Cependant, le sauvetage génétique est une solution à court terme qui permet de gagner du temps pour faire face aux autres menaces qui pèsent sur le taxon (Hedrick & Fredrickson, 2010). Dans le cas du loup Mexicain, ce temps a peut-être été gaspillé, car la taille de la population à l'état sauvage est encore largement inférieure à la taille nécessaire pour amortir l'incertitude démographique et permettre à la sélection d'agir efficacement (Frankham, 1996 ; Tanaka, 2000 ; Wright, 1931). On s'attend à ce que le sauvetage génétique soit moins réussi après la première fois, si la même population donneuse est utilisée (Hedrick & Garcia-Dorado, 2016 ; Hedrick et al., 2014). Les résultats présentés ici suggèrent que, si la taille de la population de loups Mexicains était suffisamment importante pour éviter le risque d'envahissement, d'autres sources de populations donneuses pourraient être envisagées pour augmenter la diversité génétique (en suivant les directives appropriées, telles que Hedrick & Fredrickson, 2010). S'il n'est pas possible que la taille de la population augmente de façon spectaculaire avec la diversité génétique actuellement présente, d'autres outils pour rétablir la diversité génétique perdue chez le loup Mexicain, tels que l'incorporation de sperme congelé provenant de générations antérieures ou l'insertion de la diversité observée dans les gènes d'animaux historiques à l'aide d'outils de biologie synthétique (Piaggio et al., 2017), peuvent nécessiter une considération. À long terme, la taille de la population doit augmenter pour que le risque d'extinction s'atténue jusqu'à un niveau acceptable.