


Hurlements du passé : phylogéographie historique et pertes de diversité chez les loups gris Européens

PROCEEDINGS B

rspb.royalsocietypublishing.org

Research




Cite this article: Dufresnes C, Miquel C, Remollino N, Biollaz F, Salamin N, Taberlet P, Fumagalli L. 2018 Howling from the past: historical phylogeography and diversity losses in European grey wolves. *Proc. R. Soc. B* **285**: 20181148.
<http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2018.1148>

Howling from the past: historical phylogeography and diversity losses in European grey wolves

Christophe Dufresnes^{1,4}, Christian Miquel⁵, Nadège Remollino¹, François Biollaz^{1,6}, Nicolas Salamin^{2,3}, Pierre Taberlet^{5,†} and Luca Fumagalli^{1,†}

¹Laboratory for Conservation Biology, Department of Ecology and Evolution, ²Department of Ecology and Evolution, and ³Department of Computational Biology University of Lausanne, Biophore Building, CH-1015 Lausanne, Switzerland
⁴Department of Animal and Plant Sciences, University of Sheffield, Alfred Denny Building, Western Bank, Sheffield S10 2TN, UK
⁵Laboratoire d'Écologie Alpine (LECA), UMR5553, BP53, 38041 Grenoble, Cedex 9, France
⁶Route Pra de Louetse 32, 1968 Mase, Switzerland

 LF, 0000-0002-6648-2570

Résumé

Les goulots d'étranglement génétiques résultant des déclin de population induits par l'homme sont des symboles alarmants de la perte irréversible de notre héritage naturel dans le monde entier. Le loup gris (*Canis lupus*) est un exemple emblématique de déclin extrême dû à des facteurs anthropiques. Ici, nous avons évalué les signatures génétiques de 150 ans de persécution du loup dans le Paléarctique occidental par le séquençage à haut débit de l'ADN mitochondrial de spécimens historiques dans un cadre spatio-temporel sans précédent. Malgré les goulots d'étranglement du Pléistocène supérieur, nous montrons que la variation génétique historique est restée élevée dans toute l'Europe jusqu'à ces dernières centaines d'années. En Europe de l'Ouest, où les loups ont été presque totalement exterminés, la diversité s'est dramatiquement effondrée au début du vingtième siècle et la recolonisation à partir de quelques populations relictuelles homogènes a induit des changements drastiques de la composition génétique. En revanche, les régions d'Europe de l'Est, où la persécution humaine a eu moins d'effets sur la démographie des loups, ont connu peu de déplacements génétiques et des niveaux de diversité stables. En comparant les modèles préhistoriques, historiques et modernes de diversité génétique, notre étude retrace donc la chronologie et le rôle actif de l'homme dans le déclin du loup gris, un animal emblématique mais controversé qui symbolise la relation complexe entre les sociétés humaines et la conservation de la nature.

1. INTRODUCTION

La variation génétique est la clé de voûte du potentiel adaptatif des espèces et une composante importante de notre héritage naturel [1,2]. Les **goulots d'étranglement génétiques** (c'est-à-dire la perte de variantes génétiques lorsque les populations se contractent) sont une conséquence cachée de la crise de la biodiversité dans le monde. Lorsque les efforts de conservation portent leurs fruits, la reconstitution des espèces et la recolonisation d'anciennes aires de répartition peuvent également remodeler la composition génétique des populations, avec des effets néfastes potentiels tels que la charge migratoire (c'est-à-dire la réduction de la valeur adaptative (*Fitness*) des migrants en raison d'une mauvaise adaptation [3]) et la charge d'expansion (c'est-à-dire la fixation par dérive de mutations légèrement délétères pendant les expansions démographiques [4]). Les populations génétiquement appauvries peuvent donc être plus sensibles aux stress extrinsèques [5]. Comprendre les impacts génétiques de la dynamique passée et présente des populations dans des

sociétés et des environnements humains en mutation est donc un aspect central de la recherche sur la conservation. En outre, la quantification des pertes irréversibles de diversité peut sensibiliser les acteurs institutionnels et l'opinion publique aux questions de conservation.

Un grand nombre d'études ont déduit des **goulots d'étranglement génétiques** à partir d'analyses démographiques basées sur des échantillons contemporains [6-9], mais avec la difficulté inhérente de distinguer les pertes récentes et anthropiques de diversité des goulots d'étranglement à long terme initiés plus tôt au cours du Quaternaire. En outre, les événements d'extinction provoqués par l'homme pourraient jouer un rôle clé dans la (re)structuration spatiale de la biodiversité, avec des conséquences importantes pour la conservation [10]. Pour aborder ces questions, il faut avoir accès aux niveaux initiaux et à la distribution de la diversité génétique à partir de collections historiques, ce qui constitue un défi en raison de leur faible contenu en ADN, de leur qualité et de leur disponibilité souvent limitée. Par conséquent, jusqu'à présent, la plupart des études analysant l'ADN historique des espèces en déclin sont restées limitées à des régions géographiques et des échelles de temps étroites. Pourtant, des cadres spatio-temporels complets sont nécessaires pour attribuer un rôle aux pressions anthropiques et aux déclinés historiques dans la formation des modèles actuels de diversité.

Peu d'animaux illustrent mieux que le loup gris (*Canis lupus*) les relations contrastées entre la société et la nature. Autrefois le mammifère le plus répandu sur Terre, sa persécution jusqu'au vingtième siècle a conduit à des déclinés extrêmes et à des extinctions dans de grandes parties du Paléarctique et du Néarctique [11,12]. Cependant, les loups du Paléarctique occidental ont connu des histoires contrastées. La persécution, principalement due à la compétition pour les ressources alimentaires et aux préjugés culturels, a été extrêmement sévère en Europe de l'Ouest, impliquant des programmes de chasse et de piégeage initiés dès le Moyen Âge et conduisant finalement à la disparition de l'Angleterre (XVI^{ème} siècle), de l'Écosse (1684), de l'Irlande (1786), du Danemark (1772), des Pays-Bas (1869), ainsi que de l'Allemagne, de la Suisse et de la France (fin du XIX^{ème}/début du XX^{ème} siècle). La population Italienne (*C. l. italicus*) n'a persisté que dans d'étroites poches Apennines, avec seulement une centaine d'individus survivants [13], tandis que la population Ibérique (*C. l. signatus*) a vu son aire de répartition réduite à deux zones dans les parties sud et nord-ouest de la péninsule [11,12]. En revanche, l'espèce a été confrontée à une pression plus détendue en Europe centrale et orientale. Malgré quelques périodes de persécution entraînant des déclinés de population régionaux et des contractions de l'aire de répartition, les loups n'ont jamais disparu des pays Balkaniques et Baltes. En outre, les loups pouvaient facilement migrer depuis l'empire Russe, où les programmes de chasse sont restés relativement modérés et où les populations ont maintenu des effectifs raisonnables [12]. Par exemple, la population Finlandaise de loups a subi une perfusion de la Carélie Russe adjacente.

Comme pour d'autres grands carnivores, des changements culturels combinés à des actes législatifs forts favorisent désormais la reconstitution et l'expansion des anciennes aires de répartition. Le loup est légalement protégé dans la plupart des pays et a recolonisé l'Arc alpin à partir de la population Italienne restante. À l'Est, les effectifs ont rapidement augmenté au cours des deux dernières décennies dans les États baltes, en Finlande et en Pologne [14,15]. Les loups se répandent maintenant plus à l'ouest en Suède et en Allemagne, et sont régulièrement observés en Autriche [14-16].

Les importantes questions économiques et de conservation associées à la dynamique du loup ont souligné la nécessité de programmes de surveillance génétique dans la plupart des pays Européens. Les modèles modernes de diversité ont donc fait l'objet d'une attention considérable [15, 17, 18], certains d'entre eux étant compatibles avec des goulots d'étranglement génétiques locaux [15]. En revanche, malgré quelques cas épars (limités à la Fennoscandie [19,20]), la génétique des populations Européennes de loups avant et pendant leur déclin n'a jamais été abordée. Sur la base d'analyses génomiques de spécimens contemporains, plusieurs études ont fait état d'une perte de variation génétique ancienne (Pléistocène tardif) et de déclin démographiques à long terme précédant de plusieurs dizaines de milliers d'années l'époque moderne [21 - 23], ce qui soulève des questions quant à la quantité réelle de diversité restant dans les populations de loups avant leur récente disparition et, par extension, quant au rôle de la persécution humaine dans les goulots d'étranglement génétiques détectés [24]. La dissection de ce rôle nécessite donc une mesure directe des modèles de diversité génétique pendant les persécutions humaines, sur une échelle géographique et temporelle complète, afin de tirer des conclusions générales.

Ici, nous fournissons un tel cadre spatio-temporel comparatif avec une résolution sans précédent en étudiant les changements dans la diversité de l'ADN mitochondrial (ADNmt) chez les loups du Paléarctique occidental sur deux siècles d'histoire. L'utilisation de l'ADNmt, et en particulier de la région de contrôle hypervariable (RC), permet de capturer des niveaux élevés de polymorphisme sur de courtes séquences (voir Matériel et Méthodes), une condition préalable pour des analyses informatives d'ADN dégradé provenant de spécimens préparés par les musées. Il est important de noter que la RC a été massivement utilisée dans la génétique contemporaine des populations de loups du monde entier (revue dans [18]), ce qui permet des comparaisons directes. À cette fin, nous avons réalisé une analyse phylogéographique des populations de loups passées et présentes, en combinant plus de 150 échantillons de musée couvrant une région zoogéographique entière, avec des métadonnées provenant de 20 études régionales. Nous avons cherché (i) à quantifier la quantité initiale de diversité, (ii) à quantifier le taux de perte de diversité au cours des déclin des XIX^{ème} et XX^{ème} siècles et (iii) à évaluer les changements de composition génétique résultant des événements d'extinction et de recolonisation. En particulier, nous avons vérifié si les régimes de persécution contrastés ont laissé des signatures génétiques différentes entre l'Europe occidentale et l'Europe centrale et orientale.

2. RESULTATS

Nous avons identifié 42 haplotypes de l'ADNmt hypervariable CR (validés par clonage et/ou séquençage à haut débit ; voir Matériels et Méthodes) parmi 155 spécimens historiques (complétés par 22 autres publiés en Finlande ; [20]), couvrant la période du XIX^{ème} au début du XX^{ème} siècle (Figure 1 ; matériel électronique supplémentaire, Figure S1). La moitié environ a disparu depuis : seuls 22 de ces haplotypes subsistent parmi les 1814 loups modernes analysés en Europe et dans les régions adjacentes (Figure 1 ; matériel électronique supplémentaire, Tableau S1). Dix autres haplotypes trouvés chez les loups modernes n'étaient pas présents dans nos échantillons historiques. De plus, seuls les haplotypes historiques H3 et H45 correspondaient à deux des 19 haplotypes de loups préhistoriques du Pléistocène supérieur et de l'Holocène inférieur publiés dans [25] (57 pb, isolés à partir de 24 restes de loups trouvés dans le Paléarctique occidental ; matériel électronique supplémentaire, Figure S2).

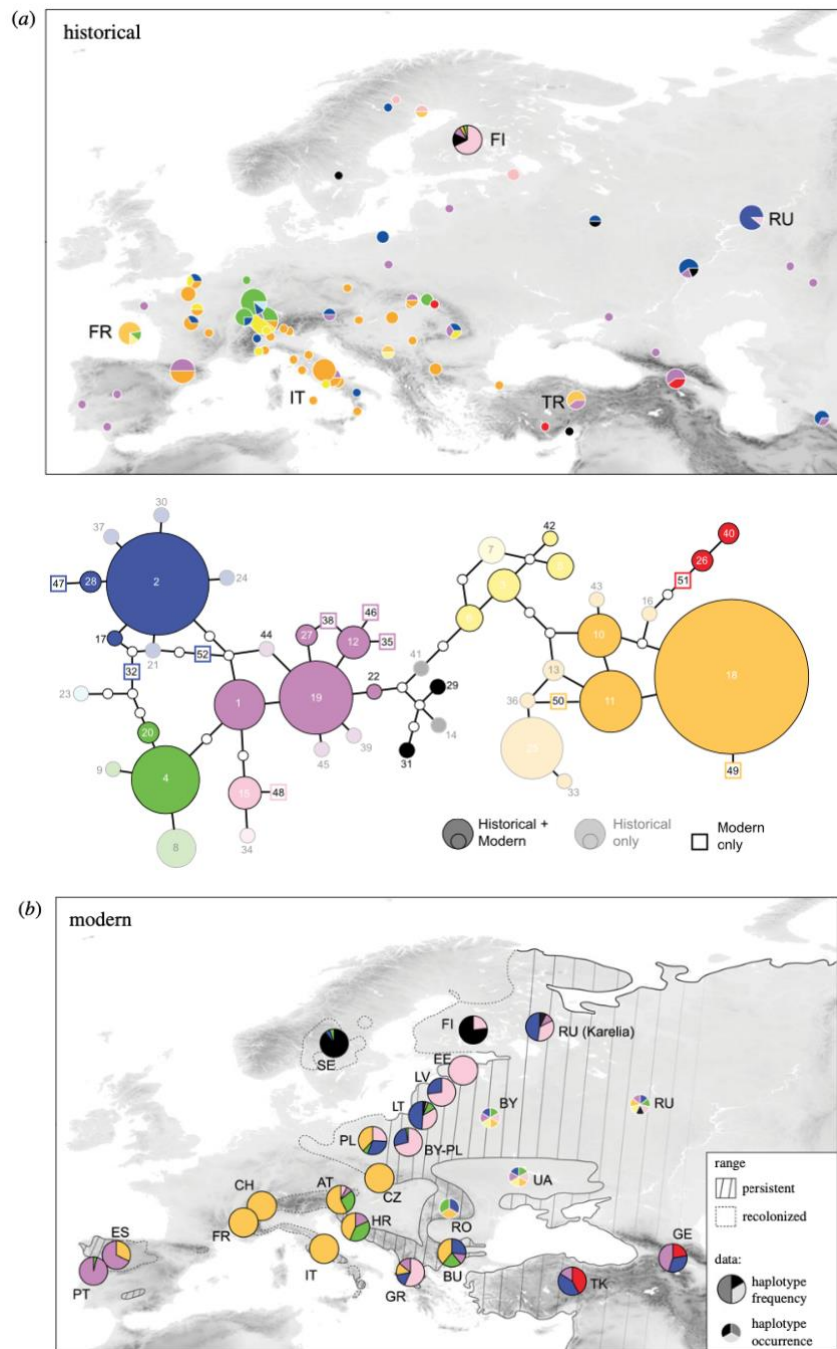


Figure 1. Réseau d'haplotypes mitochondriaux avec la distribution des haplogroupes dans (a) les périodes historiques et (b) les périodes modernes. Les haplotypes (numéro : code d'haplotype) trouvés uniquement dans notre ensemble de données historiques sont représentés dans des cercles ombragés ; les haplotypes historiques également trouvés dans les ensembles de données modernes sont représentés dans des cercles pleins. La taille des cercles illustre la fréquence relative de chaque haplotype dans l'ensemble de données historiques. Les haplotypes trouvés uniquement dans les ensembles de données modernes du Paléarctique occidental sont représentés par des carrés. Les couleurs représentent les principaux haplogroupes composés d'haplotypes étroitement liés. La correspondance avec l'étude phylogéographique de Pilot et al. [17] est fournie dans le matériel supplémentaire électronique, Figure S1. La carte historique représente la distribution des haplogroupes basée sur notre ensemble de données (cercles avec traits blancs, la taille étant proportionnelle à la taille des échantillons ; $n = 155$) et sur les données de [20] pour la Finlande (cercle avec trait noir ; $n = 22$), couvrant la période 1795-1945. Les cercles annotés des codes officiels des pays (voir matériel supplémentaire électronique, Figure S4 pour plus de détails) indiquent les spécimens pour lesquels les informations géographiques étaient limitées au pays d'origine. À cette époque, les loups étaient répartis sur toute l'Europe continentale. **La carte moderne** trace la distribution actuelle des haplogroupes sur la base des données de fréquence d'haplotype publiées par 20 études utilisant des séquences d'ADNmt comparables ($n = 1814$; grands cercles avec traits noirs ; voir Matériel et Méthodes). Les régions où seule l'occurrence des haplotypes a été rapportée (mais pas leurs fréquences relatives) sont également indiquées (petits cercles avec traits blancs). L'aire de répartition actuelle distingue les régions où les loups ont toujours persisté (lignes unies et zones en pointillés) de celles où l'espèce s'est éteinte et qui ont été récemment recolonisées (lignes en pointillés).

Tableau 1. Indices de diversité historiques et modernes (diversité des haplotypes H_d et diversité des nucléotides π) calculés à partir de tous les loups du Paléarctique occidental et séparément pour l'Europe occidentale et orientale

	H_d		π	
	historical	modern (95% CI)	historical	modern (95% CI)
overall	0.94	0.78 (0.73–0.83)	0.017	0.015 (0.014–0.016)
West	0.90	0.28 (0.17–0.39)	0.016	0.006 (0.004–0.008)
East	0.90	0.85 (0.81–0.88)	0.015	0.016 (0.015–0.017)

95% confidence intervals (CIs) after 10 000 resampling of the modern dataset (to the sample size of the corresponding historical one) are given.

En considérant l'ensemble du Paléarctique occidental, les estimations de la diversité génétique, c'est-à-dire la diversité des haplotypes (H_d) et la diversité des nucléotides (π), étaient globalement plus élevées dans les échantillons historiques ($H_d = 0,94$ et $\pi = 0,017$, $n = 177$) que dans les échantillons contemporains ($H_d = 0,78$ et $\pi = 0,015$, $n = 1814$). Le rééchantillonnage des estimations modernes montre que ces différences sont statistiquement robustes et indépendantes de la taille inégale des échantillons (Tableau 1 ; matériel supplémentaire électronique, Figure S3). La tendance a été confirmée en analysant chaque population séparément (Figure 2 ; matériel électronique supplémentaire, Tableau S1).

Les populations de loups modernes sont fortement structurées ($\Phi_{st} = 0,50 \pm 0,30$ par paire ; matériel électronique supplémentaire, Tableau S2 et Figure S4), par rapport aux populations historiques ($\Phi_{st} = 0,24 \pm 0,17$ par paire ; matériel électronique supplémentaire, Tableau S2 et Figure S3 ; test de Wilcoxon signé par paire entre Φ_{st} modernes et historiques : $p < 0,001$, $n = 45$ comparaisons). En effet, la plupart des principaux haplogroupes mitochondriaux coexistaient historiquement dans toute l'Europe (Figure 1).

Ces tendances varient entre l'Europe occidentale ($n = 85$ échantillons historiques et 865 échantillons modernes) et l'Europe centrale/de l'Est ($n = 84$ échantillons historiques et 931 échantillons modernes), que nous avons analysées indépendamment (voir sections suivantes).

Notez que les échantillons Scandinaves ($n = 5$ échantillons historiques et 18 échantillons modernes) n'ont été attribués à aucune des deux régions (voir Discussion).

(a) Loups d'Europe occidentale

Les spécimens historiques d'Europe occidentale présentaient une variation d'ADNmt très diversifiée dans toute la région ($H_d = 0,90$ et $\pi = 0,016$) (Tableau 1 ; matériel supplémentaire électronique, Tableau S1). Les estimations modernes sont significativement plus faibles en comparaison ($H_d = 0,28$ et $\pi = 0,006$; Tableau 1 ; matériel électronique supplémentaire, Figure S3). **Environ trois quarts (17 sur 22) des mitotypes originaux ont disparu de la région.** Ce constat est bien reflété par les comparaisons entre populations, qui confirment également statistiquement une réduction de H_d chez les loups modernes d'Europe occidentale (Figure 2a ; matériel électronique complémentaire, Tableau S1). **Par exemple, la population Italienne de loups est aujourd'hui caractérisée par un haplotype privé largement prédominant (H18) et un second haplotype rare (H11), mais au moins 10 haplotypes différents étaient autrefois présents dans tout le pays.** Il en va de même pour la France et la Suisse, où l'on trouvait respectivement 15 et 8 haplotypes, avant que ces populations ne disparaissent. Le goulot d'étranglement génétique a été moins drastique en Ibérie, où plusieurs haplotypes RC se sont maintenus (matériel électronique supplémentaire, Tableau S1). L'analyse de la diversité des haplotypes (H_d) à travers le temps a révélé

un effondrement spectaculaire au début du vingtième siècle (de 0,9 à 0,3), atteignant les niveaux de diversité extrêmement bas enregistrés chez les individus contemporains (Figure 2b).

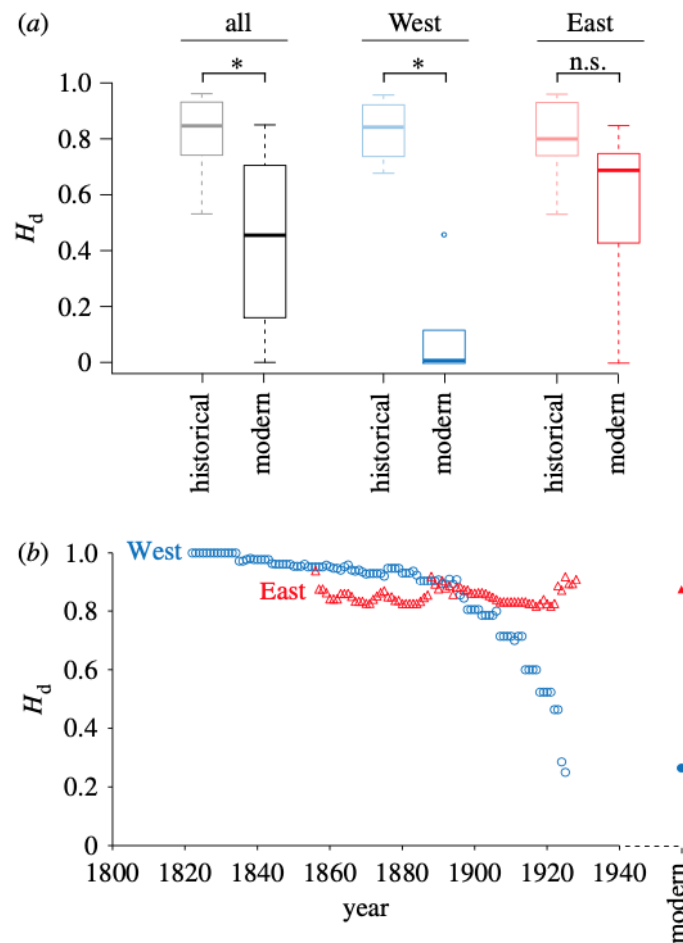


Figure 2 : (a) Comparaisons de la H_d basée sur la région entre les périodes historiques (1795-1945) et modernes (après 1990) et (b) diversité des haplotypes (H_d) au fil du temps en Europe occidentale (bleu) et orientale (rouge). (a) La comparaison entre les estimations historiques et modernes a été effectuée à l'aide d'ANOVA non paramétriques (10000 permutations) et s'est avérée significative pour l'ensemble des données ($n = 10$ et 20 estimations historiques et modernes, respectivement ; $p = 0,001$) et pour l'Europe de l'Ouest ($n = 4$ et 5 estimations historiques et modernes, respectivement ; $p = 0,016$) mais pas pour l'Europe de l'Est ($n = 5$ et 14 estimations historiques et modernes, respectivement ; $p = 0,095$). Sur le boxplot : * $p < 0,05$, n.s., non significatif. Des comparaisons par paires plus rigoureuses (test non paramétrique de Wilcoxon signé) n'étaient significatives que pour l'ensemble des données ($n = 10$ comparaisons, $p = 0,0020$) mais pas pour l'Europe occidentale ($n = 4$ comparaisons ; $p = 0,12$) et orientale ($n = 5$ comparaisons, $p = 0,062$). (b) Les analyses sont basées sur des fenêtres glissantes de 30 ans, calculées uniquement pour $n \geq 5$, incluant des échantillons avec des informations de date précises uniquement ($n = 110$). Les zones occidentale et orientale sont également distinguées par des cercles et des triangles, respectivement, et les séries temporelles par des symboles vides (historiques) et pleins (modernes)

La différenciation des populations à travers l'Europe occidentale semble plus faible historiquement (Φ_{st} moyen par paire = $0,22 \pm 0,17$; matériel supplémentaire électronique, Tableau S2 et Figure S4) qu'actuellement (Φ_{st} moyen par paire = $0,53 \pm 0,43$; matériel supplémentaire électronique, Tableau S2) ; toutefois, cette différence n'était pas significative, peut-être en raison du petit nombre de comparaisons (test de Wilcoxon signé par paire entre les Φ_{st} modernes et historiques : $p = 0,40$, $n = 6$ comparaisons). Par exemple, la lignée privée moderne d'ADNmt de *C. l. italicus* (H18) était présente dans le nord de la France. Les loups Ibériques historiques portaient des allèles qui ne sont pas spécifiques au *C. l. signatus* moderne, mais qui étaient également présents ailleurs (par exemple H1 en France et en Suisse). En conséquence, les Φ_{st} par paire entre les populations historiques et

modernes ne sont pas corrélés (test de Mantel, $p = 0,29$), ce qui indique que les relations génétiques entre les populations ont changé.

De plus, nous rapportons de forts changements dans la composition génétique de ces populations. Les loups modernes d'Europe occidentale sont génétiquement différents de ceux présents à l'origine (France : $\Phi_{st} = 0,60$; Suisse : $\Phi_{st} = 0,70$; Italie : $\Phi_{st} = 0,73$; matériel électronique supplémentaire, Tableau S1 et Figure S3). Le déplacement était modéré en Espagne, où plusieurs haplotypes de *C. l. signatus* ont persisté ($\Phi_{st} = 0,08$).

b) Loups d'Europe centrale et orientale

La diversité mitochondriale des loups d'Europe orientale et centrale est restée élevée au cours des siècles passés ($H_d = 0,90$ et $\pi = 0,015$; Figure 2). Les estimations modernes étaient marginalement inférieures ($H_d = 0,85$) ou similaires ($\pi = 0,016$) (Tableau 1 ; matériel supplémentaire électronique, Figure S3). En conséquence, les H_d basés sur la population étaient généralement plus faibles dans les populations modernes que dans les populations historiques, mais la différence n'était pas significative (Figure 2 ; matériel supplémentaire électronique, Tableau S1).

Les modèles de différenciation entre les populations sont restés stables entre les ensembles de données historiques et modernes, avec des estimations similaires ($\Phi_{st} = 0,30 \pm 0,12$ avant 1945 contre $\Phi_{st} = 0,32 \pm 0,22$ parmi les populations modernes ; test de Wilcoxon signé par paires : $p = 0,19$, $n = 10$ comparaisons de Wilcoxon ; matériel électronique supplémentaire, Tableau S2 et Figure S4) et des relations (corrélation significative entre les Φ_{st} historiques et modernes par paires, $p = 0,016$).

En conséquence, de faibles variations de la composition génétique ont généralement été observées (Pologne : $\Phi_{st} = 0,14$; Turquie : $\Phi_{st} = 0,21$; Caucase : $\Phi_{st} = 0,02$; Russie : $\Phi_{st} = 0,02$; matériel supplémentaire électronique, Tableau S1 et Figure S4). La Finlande fait exception, avec de forts décalages de fréquences entre les deux principaux haplotypes H15 et H29 ($\Phi_{st} = 0,39$, d'après les données de Jansson et al. [20]).

3. DISCUSSION

Nos analyses ont montré que la diversité génétique des loups gris du Paléarctique occidental était remarquablement plus élevée il y a un siècle qu'aujourd'hui (Figure 2). En parallèle, la différenciation des populations était plus faible, ce qui indique une meilleure connectivité historique et des tailles effectives plus importantes. Ces schémas constituent des signatures génétiques claires des persécutions humaines auxquelles le loup a été confronté jusqu'au XX^{ème} siècle à l'échelle continentale et suggèrent que le goulot d'étranglement du Pléistocène supérieur qui entraîne la perte de la diversité préhistorique [17,25] n'est pas le seul responsable. Il est important de noter que ces signatures diffèrent remarquablement entre l'Europe occidentale et l'Europe centrale et orientale, à la lumière des histoires contrastées de cette espèce controversée dans l'Ancien Monde.

Avant leur extermination presque complète, les loups d'Europe occidentale présentaient une variation d'ADNmt très diversifiée et privée, comparable à celle du reste du continent (Figure 2 ; matériel supplémentaire électronique, Tableau S1). La plus grande partie de cette diversité a rapidement disparu au début du vingtième siècle, peu de temps avant que les dernières meutes de loups ne disparaissent de France, de Suisse, d'Allemagne et d'une grande partie de l'Italie et de

l'Ibérie. Comme on pouvait s'y attendre, ces goulots d'étranglement sévères, détectés dans les données nucléaires actuelles [15,26,27], ont eu des conséquences considérables sur la composition et la structure génétiques des populations modernes. Les loups qui ont recolonisé les Alpes occidentales et centrales proviennent exclusivement de la population Italienne (*C. l. italicus*) qui a survécu dans les Apennins [28,29] et sont génétiquement différents de ceux présents il y a un siècle (matériel supplémentaire électronique, Tableau S1 et Figure S3). La population ibérique (*C. l. signatus*), en revanche, a conservé une plus grande diversité [30,31]. Pourtant, l'identité mitochondriale de ces populations semble être très récente et en partie due à la forte dérive qui sous-tend les processus de déclin et de recolonisation ; avant les déclin, la lignée privée d'ADNmt de *C. l. italicus* n'était pas limitée à l'Italie ; les loups Ibériques tués au XIX^{ème} siècle portaient des allèles non « *signatus* ». Plus généralement, les populations contemporaines partagent beaucoup moins d'haplotypes qu'auparavant (en raison de la déconnexion des populations et de la diminution de la taille effective des populations), ce qui entraîne une différenciation génétique extrêmement élevée.

En revanche, les spécimens historiques d'Europe centrale et orientale racontent une histoire très différente. Leur diversité est restée élevée tout au long des siècles passés (Figure 2 ; matériel électronique supplémentaire, Tableau S1), et ni leur structure génétique ni leur identité n'ont substantiellement changé. Par rapport à l'Europe de l'Ouest, cette stabilité reflète bien le relâchement de la pression subie par le loup en Europe centrale et orientale. Le seul changement majeur observé dans la population Finlandaise est probablement dû à une migration vers l'ouest depuis la Russie pour remplacer les loups chassés en Finlande [20].

Les échantillons Scandinaves (représentés ici par les loups Suédois) ont été considérés indépendamment en raison de leurs connexions phylogéographiques orientales mais de leurs régimes d'éradication semblables à ceux de l'Ouest. De manière surprenante, notre ensemble historique de spécimens présentait une grande diversité (matériel supplémentaire électronique, Tableau S1), alors qu'une étude précédente n'a documenté qu'un seul haplotype fixé avant 1945 ($n = 33$, de 1829 à 1939). Les différentes origines géographiques des échantillons peuvent expliquer cette divergence. Contrairement à [19], nos échantillons proviennent principalement de populations du nord (Figure 1), qui ont été les dernières à disparaître en 1966 (Suède) et 1976 (Norvège). Alors que les populations méridionales semblaient avoir subi un goulot d'étranglement précoce [19], les populations septentrionales ont peut-être encore présenté des tailles effectives élevées au cours du XIX^{ème} et du début du XX^{ème} siècle, ce qui expliquerait leur forte variation génétique historique.

Les modèles génétiques documentés dans notre étude sont donc en corrélation avec les pressions différentielles auxquelles sont confrontées les populations de loups d'Europe occidentale et orientale. Les régions d'Europe occidentale les plus persécutées ont subi de fortes pertes de diversité génétique, une augmentation de la structure génétique ainsi que de profonds changements dans leur nature génétique suite à la dynamique de recolonisation. En revanche, les régions d'Europe centrale et orientale n'ont pas connu de changements aussi radicaux, vraisemblablement parce que les persécutions ont eu des effets moindres sur leur démographie. Ces conclusions générales sont en accord avec les données microsatellites contemporaines des populations locales d'Ibérie et de Carélie Russe, qui n'ont détecté un goulot d'étranglement génétique que dans la première [31]. Il est important de noter qu'étant donné la grande diversité maintenue dans toute l'Europe il y a moins de 150 ans, nous pouvons clairement exclure l'hypothèse d'une variation

génétique historiquement faible, un facteur de confusion majeur lorsqu'il s'agit de distinguer les pertes de diversité dues à l'homme des pertes biogéographiques [32 - 34]. Cet aspect est particulièrement pertinent pour le loup, puisque des analyses démographiques récentes basées sur des échantillons modernes ont estimé un déclin à long terme initié dès le Pléistocène tardif, il y a au moins 30 000 ans [21 - 23], conduisant à la conclusion biaisée que les populations restantes avaient une faible diversité au départ, notamment en Italie [24]. En effet, de nombreux haplotypes d'ADNmt préhistoriques [25] avaient déjà disparu au XIX^{ème} siècle (matériel supplémentaire électronique, Figure S2), mais les pressions humaines ont clairement entraîné un goulot d'étranglement de la diversité restante, sur une échelle de temps remarquablement courte. Par conséquent, en ajoutant un nouveau point temporel entre la préhistoire [25] et l'époque moderne [17], notre étude fournit des preuves directes d'au moins deux étapes dans le déclin du loup à travers l'Europe : un goulot d'étranglement au Pléistocène supérieur, suivi d'un effondrement rapide et drastique causé par l'homme au cours des derniers siècles.

Nos résultats correspondent bien à l'analyse historique de l'ADN de 34 spécimens de loups dispersés en Amérique du Nord, où seuls 4 des 13 haplotypes d'ADNmt ont survécu parmi les populations contemporaines [35]. Des déclin de la diversité génétique au cours des derniers siècles ont été observés chez d'autres mammifères décimés par la chasse et le braconnage, comme les castors d'Eurasie [36], les loutres de mer [37], les renards de l'Arctique [38], les ours bruns [39,40], les tigres Indiens [41], les rhinocéros noirs [42], les otaries à fourrure de Guadalupe [43], les éléphants de mer du Nord [44], les dauphins d'Hector [45] et les baleines grises [46]. Dans quelques autres cas, la diversité était faible au départ, en raison de goulots d'étranglement plus anciens ou d'une diversité historiquement faible (par exemple, les koalas [47] et les tigres de Tasmanie [48]). Des changements dans la structure génétique ont également été fréquemment rapportés (par exemple, la rétraction de l'aire de répartition a déclenché une différenciation des populations chez les tamias alpins [49]). Les analyses de l'ADN historique ont également mis en évidence une réduction de la diversité et/ou des modifications de la composition et de la structure génétiques chez un large éventail d'autres animaux en déclin, notamment les oiseaux [50-53], les poissons [54] et les insectes [55,56]. Cependant, par rapport à la plupart de ces études régionales, notre phylogéographie historique présente l'avantage d'analyser les fluctuations génétiques à petite échelle en utilisant un grand nombre d'échantillons historiques sur une région biogéographique étendue et constitue l'une des études spatio-temporelles les plus exhaustives de l'ADN historique à ce jour. De plus, tous les polymorphismes génétiques ont été validés par clonage et séquençage à haut débit pour faire face aux dommages post-mortem de l'ADN (voir Matériel et Méthodes). Enfin, il convient de noter que nos conclusions sont basées uniquement sur de courtes séquences d'ADNmt transmises par la mère, une restriction nécessaire lorsqu'il s'agit d'ADN historique très dégradé et de faible quantité, et que les schémas de la diversité nucléaire passée chez nos loups historiques doivent encore être documentés.

Les divergences entre les modèles phylogéographiques historiques et modernes des loups, extrêmes en Europe occidentale, soulèvent des questions intéressantes sur ce qui devrait être considéré comme une référence pour les directives de conservation. Des efforts supplémentaires doivent-ils être déployés pour restaurer la diversité originelle des populations occidentales, où les lignées orientales modernes coexistent ? Cela impliquerait une amélioration de la connectivité au niveau Européen et/ou des actions de translocation de loups d'Europe de l'Est. Actuellement, la dispersion à longue distance entre les populations des Balkans et des Alpes [16,57] représente des étapes encourageantes vers une résilience naturelle. Plus généralement, on sait que des anomalies

similaires ont affecté plusieurs organismes qui ont connu des déplacements récents et rapides de leur aire de répartition en raison d'une dynamique complexe de déclin/recolonisation en réponse aux impacts anthropiques et au changement climatique (voir [10]). Les inférences phylogéographiques et de conservation, basées sur des échantillons modernes pourraient donc ne pas tout dire.

Pour le moment, notre phylogéographie des loups gris du Paléarctique occidental constitue une référence complète à l'échelle du continent parmi la riche littérature sur la génétique des populations de loups, dont les modèles modernes ont été examinés et discutés ailleurs [15,17,18] (voir matériel supplémentaire électronique, Figure S1 pour la correspondance des haplogroupes avec l'étude de Pilot et al. Les divisions des populations de loups sont généralement basées sur des données de distribution [14], qui devraient être complétées par des études moléculaires, en attendant une couverture géographique et des plans d'échantillonnage adéquats [15], comme notre méta-analyse le prévoit pour l'ADNmt moderne. Les outils génétiques sont essentiels pour appréhender les schémas de recolonisation et les effets de la **déconnexion** des populations, pour estimer la taille des populations ainsi que pour détecter l'hybridation avec les chiens. Les principales menaces qui pèsent sur les loups sont la surexploitation et le braconnage, les conflits dus à la prédation sur le bétail, la fragmentation de l'habitat et la faible acceptation du public qui résulte, en partie, d'un manque de connaissances. Ainsi, les études moléculaires jouent un rôle central dans le suivi et la gestion des populations afin d'améliorer la situation de la conservation des loups Européens [18]. En particulier, la forte structure génétique en Europe de l'Ouest est préoccupante compte tenu des étonnantes capacités de dispersion du loup, soulignant la nécessité d'efforts supplémentaires pour restaurer la connectivité entre les populations actuelles. Même si, comme pour les autres grands carnivores, la situation s'est améliorée au cours des deux dernières décennies [14], les aspects économiques, politiques et culturels de la gestion du loup restent un sujet de controverse extrême dans la plupart des pays européens.

4. MATERIEL ET METHODES

(a) Analyses génétiques des spécimens historiques

Des échantillons d'os ou de peau (principalement des os maxilloturbinaux, et des échantillons de peau d'oreille ou de pattes provenant de spécimens montés ou de peaux, respectivement) ont été obtenus à partir d'un total de 250 spécimens de loups gris *C. lupus* généreusement fournis par 69 musées et collections Européens (matériel supplémentaire électronique, Tableau S3). À l'exception d'un échantillon datant du treizième siècle (daté par stratigraphie), tous les autres échantillons couvraient principalement le dix-neuvième et le début du vingtième siècle (1795 - 1945), lorsque la persécution en Europe continentale a atteint son apogée. Nous avons sélectionné des spécimens provenant en grande partie de la région du Paléarctique occidental (à l'exception de l'Afrique du Nord et de la péninsule Arabique), et pour lesquels des informations sur l'origine géographique et la date étaient disponibles. Nous avons également inclus deux spécimens historiques (1938) du loup de l'Himalaya (*C. l. chanco*), un proche parent monophylétique de *C. l. lupus* [58,59], qui ont été utilisés en tant qu'outgroup dans les analyses phylogénétiques (voir le matériel supplémentaire électronique pour les détails des échantillons).

En raison du faible nombre de copies et de la nature dégradée de l'ADN historique, des précautions spéciales pour éviter la contamination et authentifier les résultats ont été prises pendant toute la procédure de laboratoire. L'extraction de l'ADN et la préparation de la PCR ont été effectuées dans

un laboratoire physiquement séparé, exclusivement consacré à l'analyse d'échantillons de musée et d'échantillons à faible teneur en ADN, où l'ADN amplifié n'a jamais été présent. Lors de chaque session d'extraction et de préparation de la PCR, un maximum de huit échantillons (y compris les blancs négatifs) ont été manipulés simultanément dans une hotte en plexiglas dédiée par du personnel portant des vêtements et des masques de protection jetables. Tout le matériel utilisé a été éclairé aux UV plusieurs heures avant l'extraction et les surfaces de travail ont été nettoyées à l'eau de Javel avant et après chaque extraction et chaque cycle de PCR. Les échantillons d'os ont été traités en enlevant la couche extérieure avec une lame de scalpel stérile. Les échantillons ont ensuite été réduits en poudre dans un petit mortier, qui a été blanchi et exposé aux UV à ondes courtes après chaque utilisation. Les échantillons de peau (environ 1 × 1 cm) ont été découpés en petits fragments avec une lame de scalpel stérile, après avoir retiré les poils. L'ADN a ensuite été extrait de la poudre d'os et des fragments de peau à l'aide du QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

...