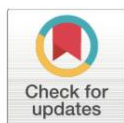


Combinaison des inférences phylogénétiques et démographiques pour évaluer l'origine de la diversité génétique d'une population de loups isolée

Combining phylogenetic and demographic inferences to assess the origin of the genetic diversity in an isolated wolf population

Luca Montana¹*, Romolo Caniglia¹, Marco Galaverni¹, Elena Fabbri¹, Atidje Ahmed², Barbora Černá Bolfíková³, Sylwia D. Czarnomska⁴, Ana Galov⁵, Raquel Godinho^{6,7}, Maris Hindrikson⁸, Pavel Hulva^{9,10}, Bogumiła Jędrzejewska⁴, Maja Jelenčić¹¹, Miroslav Kutal^{12,13}, Urmas Saarma⁸, Tomáš Skrbinšek¹², Ettore Randi^{1,14}



OPEN ACCESS

Citation: Montana L, Caniglia R, Galaverni M, Fabbri E, Ahmed A, Bolfíková BČ, et al. (2017) Combining phylogenetic and demographic inferences to assess the origin of the genetic diversity in an isolated wolf population. PLoS ONE 12(5): e0176560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176560>

1 Laboratorio di Genetica, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy, **2** Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria, **3** Faculty of Tropical AgriSciences, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic, **4** Mammal Research Institute Polish Academy of Sciences, Białowieża, Poland, **5** Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb, Zagreb, Croatia, **6** CIBIO/InBIO - Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Campus de Vairão, Universidade do Porto, Vairão, Portugal, **7** Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal, **8** Department of Zoology, Institute of Ecology and Earth Sciences, University of Tartu, Tartu, Estonia, **9** Department of Zoology, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic, **10** Department of Biology and Ecology, Ostrava University, Ostrava, Czech Republic, **11** Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, **12** Department of Forest Ecology, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, Brno, Czech Republic, **13** Friends of the Earth Czech Republic, Olomouc Branch, Olomouc, Czech Republic, **14** Department 18/ Section of Environmental Engineering, Aalborg University, Aalborg, Denmark

* These authors contributed equally to this work.

✉ Current address: Département de Biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada

* luca.montana@usherbrooke.ca

Résumé

La survie de petites populations isolées est menacée par des facteurs tant démographiques que génétiques. Les grands carnivores ont décliné pendant des siècles dans la plupart des pays Européens en raison de la modification de leur habitat, de la chasse excessive de leurs proies naturelles et de la persécution directe. Cependant, les tendances actuelles de ré-ensauvagement poussent de nombreuses populations de carnivores à se développer à nouveau, ce qui pourrait inverser l'érosion de leur diversité génétique. Dans cette étude, nous avons réévalué l'étendue et l'origine de la variation génétique de la population Italienne de loups, qui est en expansion après des siècles de déclin et d'isolation. Nous avons génotypé des loups d'Italie et de neuf autres populations dans quatre régions de l'ADNmt (région de contrôle, ATP6, COIII et ND4) et 39 microsatellites autosomiques. Les résultats des analyses phylo-génétiques et des procédures d'assignation ont confirmé chez les loups Italiens un deuxième haplotype d'ADNmt privé, qui appartient à un haplogroupe distribué principalement en Europe du Sud. Les analyses de coalescence ont montré que les haplotypes d'ADNmt uniques des loups Italiens sont probablement apparus à la fin du Pléistocène. Les simulations ABC ont montré de manière concordante que les populations de loups existantes en Italie et dans le sud-ouest de l'Europe ont commencé à être isolées et à décliner juste après le dernier maximum glaciaire. Ainsi, la variation génétique actuelle chez les loups Italiens résulte principalement de l'isolement historique au sud des Alpes.

INTRODUCTION

Les activités humaines ont profondément façonné la structure des paysages de l'Europe continentale depuis des millénaires, réduisant souvent l'extension des écosystèmes vierges à de petits fragments isolés [1]. De nos jours, la fragmentation de l'habitat est une menace majeure pour la survie des populations animales naturelles [2]. Les carnivores et les ongulés, en particulier, ont besoin de vastes étendues d'habitats appropriés et sont parmi les espèces les plus sensibles à la

fragmentation de l'habitat. Les ongulés ont été intensivement chassés pour leur viande tandis que les grands carnivores ont été persécutés en tant que prédateurs nuisibles, et tous deux ont décliné pendant des siècles en même temps que la fragmentation et la modification de leurs habitats naturels [3]. Cependant, la vague de ré-ensauvagement en cours en Europe continentale démontre que les tendances au déclin des populations peuvent être interrompues et même inversées : les prédateurs supérieurs et les ongulés menacés sont maintenant abondants localement, et les chaînes alimentaires des écosystèmes forestiers sont partiellement restaurées [4]. Il est donc intéressant de comprendre les conséquences des déclinés et de la fragmentation passés dans la perspective de l'expansion de la population et de sa reconstitution prochaine.

Les conséquences génétiques des déclinés prolongés de populations sont théoriquement bien connues mais difficilement prévisibles dans les études de cas empiriques [5,6]. En fonction de la force des goulots d'étranglement et du temps d'isolement, la diversité génétique (nombre d'allèles, hétérozygotie) est progressivement perdue par dérive aléatoire. La perte de diversité génétique sélectivement neutre est corrélée à la taille effective de la population (N_e), qui est généralement beaucoup plus faible que la taille observée de la population de recensement (N_c) [7]. L'estimation de N_c dans les populations naturelles n'est pas simple, et l'estimation de N_e est encore plus difficile en raison de la variabilité de ses différents déterminants : succès reproducteur, sex-ratio, écarts par rapport à l'accouplement aléatoire et variations de ces facteurs d'une génération à l'autre. Diverses méthodes de simulation, dont le Calcul Bayésien Approximatif (ABC) [8], ont été mises en œuvre pour évaluer le rôle des paramètres démographiques dans la détermination de la dynamique de la diversité génétique dans des scénarios historiques complexes [9]. Cependant, si N_e n'est pas trop faible, les résultats de la dérive génétique peuvent être contrastés par une sélection équilibrante ou dépendante de la fréquence et par l'auto-stop sur des complexes génétiques fonctionnels [10]. Bien que les conséquences sur l'aptitude d'un petit N_e et d'une faible variation génétique permanente soient controversées, **l'hypothèse selon laquelle le potentiel adaptatif et l'évolutivité sont positivement corrélés à l'hétérozygotie est un principe de précaution largement accepté en génétique de la conservation** [11].

Dans cette étude, nous avons réévalué la quantité et l'origine de la variation génétique dans une population de loups (*Canis lupus*) qui est restée isolée et a décliné dans la péninsule Italienne pendant des siècles [12,13]. Les loups ont disparu des Alpes au début des années 1900 et ont été fortement réduits dans les régions péninsulaires jusqu'au début des années 1970, lorsque moins de 100 individus ont survécu dans deux sous-populations isolées dans des zones montagneuses éloignées des Apennins centraux et méridionaux [14]. Tant la protection légale (accordée au loup dans les années 1970) que les profonds changements socio-écologiques (industrialisation, urbanisation et abandon des terres agricoles marginales dans les montagnes et les collines) ont favorisé des ré-expansions spectaculaires des forêts, des ongulés sauvages et par conséquent des loups [4]. **Des meutes de loups permanentes se sont rapidement établies le long de toute la chaîne des Apennins, atteignant les Alpes occidentales au début des années 1990, puis colonisant de nouvelles zones dans les plaines et également dans le sud de l'Italie.** Actuellement, la population Italienne de loups compte environ 1500 (\pm 300) individus et au moins 320 meutes documentées [15].

Indépendamment de la force de la tendance actuelle à l'expansion du loup, la quantité de variabilité génétique existante devrait avoir été largement déterminée par la durée du dernier **goulot d'étranglement**, car il n'y a pas eu assez de temps pour que les mutations reconstituent la variation perdue [13]. Cependant, la période d'isolement effective de la population de loups Italiens au sud

des Alpes est controversée. Les données génétiques et génomiques suggèrent qu'elle aurait pu être effectivement isolée pendant 9500 à 19 000 ans (estimation à partir des données microsatellites, en fonction des valeurs N_e déduites) [13], 3200 à 5600 ans (estimation à partir des données SNP à l'échelle du génome) [16], ou 2800 à 7000 ans (à partir des séquences du génome entier, en fonction du taux de mutation appliqué [17]), soit beaucoup plus longtemps que les 100 ans environ estimés à partir de l'isolement observé au sud des Alpes. Les analyses génétiques indiquent que la diversité génétique autosomique des loups Italiens est inférieure d'environ 30% à celle des autres populations de loups en Europe [16]. La diversité génétique de l'ADNmt est limitée à un seul haplotype de la région de contrôle (RC) appelé W14 qui est répandu uniquement chez les loups Italiens [18], bien qu'une étude récente suggère qu'un second haplotype rare appelé W16 est également présent naturellement dans la population [19]. Les programmes de surveillance et les analyses moléculaires ont révélé une augmentation de l'hybridation des loups avec les chiens domestiques en liberté dans certains secteurs de l'aire de répartition des loups en Italie péninsulaire [20,21]. La durée incertaine de l'isolement et l'occurrence de l'hybridation rendent difficile de comprendre si la diversité génétique observée s'explique par le dernier goulot d'étranglement ou par des mélanges.

Dans cette étude, nous avons génotypé des loups provenant de la population Italienne et de neuf autres populations en Europe dans quatre régions de l'ADNmt (la région de contrôle CR, et trois gènes codants : ATP6, COIII et ND4) et 39 microsatellites autosomiques [20]. Afin d'identifier les génotypes éventuellement mélangés et de clarifier l'origine de la diversité génétique observée, nous avons également inclus 69 chiens de village et 74 hybrides loup-chien connus, échantillonnés dans des zones situées dans l'aire de distribution du loup en Italie et en Estonie. Plus précisément, nous avons cherché à : **1) confirmer l'attribution de l'haplotype rare CR ADNmt W16 à la population Italienne de loups** [19], en augmentant la taille de l'échantillon de loups et de canidés hybrides provenant de différentes populations Européennes, et **2) tester si la variation génétique existante chez les loups Italiens est principalement déterminée par un isolement historique au sud des Alpes remontant à la fin de la dernière glaciation pléistocène, ou par le goulot d'étranglement anthropique le plus récent, il y a environ un siècle.** Afin de valider les hypothèses les plus probables, nous avons effectué des analyses d'assignation bayésiennes pour étudier la partition de la diversité génétique autosomale entre les populations de loups, puis nous avons appliqué des procédures phylogénétiques bayésiennes pour estimer les temps de divergence entre les séquences d'ADNmt des loups et des chiens et nous avons effectué des simulations ABC pour reconstruire les scénarios démographiques passés et déduire les dates de division des populations de loups existantes en Europe.

MATERIEL ET METHODES

Déclaration éthique

Aucun animal n'a été sacrifié pour les seuls besoins de cette étude. En Italie, tous les échantillons de loups trouvés morts ont été collectés par des techniciens spécialisés pour le compte du ministère Italien de l'Environnement (MATTM) et de l'Institut Italien pour la protection et la recherche environnementales (ISPRA). Les échantillons de crottes de loups de République Tchéque et de Slovaquie ont été collectés par l'organisation Friends of the Earth (FoE CZ), qui surveille la population de loups dans les Carpates. En Slovaquie, FoE CZ a l'autorisation de collecter des échantillons non invasifs de loups, délivrée par le bureau régional de Trenčín, département de l'environnement, n° OU-TN-OSZP1- 2014/49/3475. Les échantillons de tissus de loups des

Carpates ont été abattus légalement pendant la saison de chasse ouverte en Slovaquie, dans le cadre d'un quota fixé par les autorités locales, conformément au règlement n° 344/2009 Coll. Les loups ont été abattus lors de patrouilles individuelles ou de chasses collectives. L'utilisation d'appâts empoisonnés ou de pièges à pattes est strictement interdite selon la loi sur la chasse. Tous les chasseurs avaient l'autorisation de chasser et nous avons confirmé que les abattages ont été déclarés avant la réalisation des quotas. Les échantillons Croates et Slovènes ont été obtenus à partir d'animaux tués dans des accidents de la route ou abattus lors de la gestion régulière de la chasse selon les quotas définis par la Commission Croate de surveillance des populations de grands carnivores et approuvés par le ministère Croate de la protection de l'environnement et de la nature. Les échantillons de loups Ibériques du Portugal proviennent d'individus trouvés morts, collectés par des techniciens spécialisés pour le compte de l'Institut Portugais pour la conservation de la nature (ICNF). Les échantillons de loups d'Espagne ont été obtenus à partir d'animaux tués sur la route ou abattus lors de la gestion régulière de la chasse selon les quotas définis par les autorités du Principado de Asturias. Les échantillons d'Estonie, de Lettonie, de Finlande, de Pologne, de Grèce et de Bulgarie ont également été prélevés sur des animaux trouvés morts ou abattus légalement par des chasseurs à des fins autres que ce projet. Aucun permis d'éthique n'a été requis puisque la collecte des échantillons concernait des animaux morts. Tous les échantillons ont été collectés par du personnel technique spécialisé. Aucun permis d'éthique n'est également requis pour collecter des échantillons de crottes dans ces pays. Les échantillons de sang de chiens ont été obtenus par des vétérinaires avec l'aide des propriétaires et en faisant tous les efforts possibles pour minimiser la souffrance des animaux. Les propriétaires des chiens ont donné leur autorisation pour que leurs animaux soient utilisés dans cette étude. Les échantillons salivaires ont été obtenus par écouvillonnage buccal par des techniciens spécialisés.

Échantillonnage

Nous avons génotypé 190 loups vivant à l'état sauvage, 69 chiens de village et 74 hybrides loup-chien connus provenant d'Italie et de plusieurs autres pays d'Europe (Tableau 1). En outre, nous avons analysé cinq autres loups non apparentés vivant à l'état sauvage, échantillonnés dans différentes régions des Apennins centraux-nord, qui présentaient l'haplotype d'ADNmt rare W16 [19,20] (Tableau 1). Les échantillons de loups ont été collectés de 1990 à 2015 en Italie (taille de l'échantillon $n = 34$), en Espagne et au Portugal (péninsule Ibérique ; $n = 20$), en Slovénie (20), en Croatie (20), en Grèce (15), en Bulgarie (17), en République Tchèque et en Slovaquie (20), en Pologne (16), en Estonie (10), en Lettonie (10) et en Finlande (9). Les 69 chiens de village ont été échantillonnés en Italie dans les régions du nord et du centre des Apennins, ils avaient une taille et une forme similaires à celles des chiens de berger, n'appartenaient pas à des races certifiées et ont été sélectionnés indépendamment des informations génotypiques. Les hybrides connus loup × chien ont été échantillonnés en Italie (68) et en Estonie (6), et ont été précédemment identifiés par des analyses génétiques ou morphologiques [20,22]. Tous les loups avaient le motif typique de la couleur du pelage du loup et ne présentaient aucun signe morphologique apparent d'hybridation. Nous avons conservé les échantillons de tissus et de sang dans 10 volumes d'éthanol à 95 % ou cinq volumes d'un tampon Tris/SDS [23] à -20°C , respectivement. Nous avons extrait les échantillons d'ADN à l'aide du kit d'extraction de tissus QIAGEN DNeasy (Qiagen Inc, Hilden, Allemagne) dans un système robotisé de manipulation de liquides MULTIP-ROBE IIEX (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Allemagne). Tous les échantillons d'ADN utilisés dans les études précédentes ont été réanalysés. Des contrôles d'extraction négatifs (pas d'ADN dans les tubes à essai) ont été utilisés pour vérifier l'absence de contamination du laboratoire.

Tableau 1. Pays d'origine et taille des échantillons de loups, de chiens et d'hybrides loup × chien analysés dans cette étude

Taxon	Country	Genetic cluster ^a	Acronym	mtDNA ^b	STR ^c	Total
Wolves	Italy ^d	Italian wolves	WIT	39	39	39
	Portugal, Spain	Iberian wolves	WIB	20	20	20
	Slovenia	Dinaric wolves	WDIN	20	20	20
	Croatia ^e	Dinaric wolves	WDIN	---	20	20
	Greece	Balkanic wolves	WBALK	15	10	15
	Bulgaria	Balkanic wolves	WBALK	17	17	17
	Czech & Slovakia ^e	Carpathian wolves	WCARP	---	20	20
	Poland ^f	---	---	16	---	16
	Estonia	Baltic wolves	WBALT	10	10	10
	Latvia	Baltic wolves	WBALT	10	10	10
	Finland	Baltic wolves	WBALT	9	9	9
Dogs	Italy	Italian dogs	DIT	8	69	69
Hybrids	Estonia	Hybrids	HY	6	6	6
	Italy	Hybrids	HY	40	68	68
Total				210	318	339

^a Genetic clusters and their acronyms, as defined by Bayesian cluster analyses (see: Results);

^b mtDNA = samples sequenced at the mtDNA CR, ATP6, COIII and ND4 regions;

^c STR = samples genotyped at 39 autosomal microsatellite (STR);

^d The five wild-living wolves, sampled in Italy, showed a rare mtDNA haplotype, named W16 [18] and recently attributed to the Italian wolf population [19];

^e Wolves from Croatia, Czech Republic and Slovakia were only used in Bayesian cluster analyses and ABC simulations;

^f Wolves from Poland were not genotyped at the STR loci due to their low DNA quality, and were not assigned to any genetic cluster.

Génotypage des microsatellites

Nous avons sélectionné un panel de 39 microsatellites autosomiques canins (sept tétranucléotides et 32 dinucléotides) qui ont été utilisés dans certaines des études les plus récentes sur la génétique et l'hybridation des populations de loups en Europe ([24] et les références qui y figurent). Ces microsatellites sont cartographiés sur 26 chromosomes différents (Tableau S1) et ne sont pas en déséquilibre de liaison dans les populations étudiées. Le panel comprend 15 marqueurs du kit multiplex Finnzymes Canine Genotypes™ Panel 1.1 (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlande). L'un d'entre eux, l'Ame-logenin, a été utilisé pour déterminer le sexe des individus. Les microsatellites ont été amplifiés dans huit multiplexes PCR à l'aide du kit PCR multiplex Qiagen (Qiagen, GmbH-Hilden, Allemagne). Des contrôles PCR négatifs (pas d'ADN) et positifs (échantillons avec des génotypes connus) ont été utilisés pour vérifier l'absence de contaminations de laboratoire. Pour confirmer les appels d'allèles, tous les échantillons ont été analysés indépendamment deux fois afin de vérifier l'absence d'abandon d'allèles et de faux allèles, qui n'ont jamais été observés. Les amplicons ont été analysés dans un séquenceur automatique ABI 3130XL (Applied Biosystems ; Foster City, Californie, USA) et les tailles des allèles ont été estimées à l'aide du logiciel GENEMAPPER 4.0. Des détails sur les marqueurs sélectionnés, les amorces et les profils PCR sont disponibles dans l'Annexe S1A.

Variabilité des microsatellites, regroupement des génotypes et tests d'assignation

Les nombres d'allèles observés et effectifs (A_o et A_e), l'hétérozygotie observée et attendue (H_o et H_e), les statistiques F [25] et les tests d'écart par rapport aux équilibres de Hardy-Weinberg (HWE) et de liaison (LE) ont été calculés dans GENALEx 6.01 [26] et GENETIX 4.05 [27]. Les génotypes multilocus individuels ont été regroupés et assignés à leur population d'origine la plus probable en utilisant : **1**) une analyse des coordonnées principales (PCoA dans GENALEx) ; **2**) une analyse discriminante en composantes principales (DAPC dans ADEGENET) [28] ; et **3**) un modèle de regroupement bayésien (minimisant les écarts par rapport à HWE et LE dans les groupes génétiques) mis en œuvre dans STRUCTURE 2.3.4 [29,30]. Nous avons utilisé STRUCTURE pour déduire la partition génétique optimale des groupes échantillonnés, en supposant que K va de 1 à 15, avec quatre exécutions indépendantes pour chaque K , avec 500 000 étapes de chaînes de

Markov de Monte Carlo (MCMC) et en rejetant les 50 000 premières étapes pour le burn-in, en utilisant les modèles de mélange et de fréquence d'allèles indépendants, et sans information préalable (option usepopinfo non activée). Nous avons utilisé CLUMPAK (<http://clumpak.tau.ac.it>) pour identifier le taux d'augmentation le plus élevé de la probabilité postérieure $\ln P(D)$ des clusters entre chaque K consécutif [31] et pour agréger la probabilité d'appartenance individuelle (q_i) à partir des quatre répliques MCMC [32].

Séquençage de l'ADN mitochondrial...

Analyses phylogénétiques...

Estimation des temps de divergence des haplotypes d'ADNmt...

Simulations ABC

Nous avons utilisé les données microsatellites pour effectuer des simulations de Calcul Bayésien Approximatif (ABC) [49] implémentées dans le logiciel DIYABC 2.1.0 [50] afin de modéliser des scénarios démographiques plausibles et d'estimer les temps de divergence (en générations) entre les populations de loups échantillonnées dans les pays Européens et correspondant aux clusters identifiés par STRUCTURE.

Nous avons sélectionné trois échantillons de populations de loups pour modéliser des scénarios de simulation ABC complets : WIT (pop1), WIBP (pop2) et WDIN (pop3), en excluant tout échantillon présentant d'éventuelles traces de mélange avec des chiens (Tableau S2). Les échantillons de WBALK, WCARP et WBALT n'ont pas été utilisés dans les simulations car ces populations sont toujours en relation entre elles et avec des populations de loups non échantillonnées en Europe de l'Est [51,52].

Selon Pilot et al. [16] et Fan et al. [53], les populations d'Europe du Sud ont divergé très étroitement dans le temps, et leurs tailles effectives ont régulièrement diminué au cours des dernières dizaines de milliers d'années. Nous avons donc testé quatre scénarios démographiques (Fig. S5), en supposant que les trois populations se sont séparées simultanément (scénarios 1 et 2) ou séquentiellement (scénarios 3 et 4) et que les trois populations ont traversé un goulot d'étranglement (scénarios 2 et 4) ou non (scénarios 1 et 3).

Nous avons effectué 6×10^6 simulations pour chaque scénario en utilisant des distributions antérieures uniformes de la taille de la population effective et des paramètres de temps avec des paramètres de mutation par défaut. Nous avons sélectionné les statistiques sommaires suivantes pour tous les microsatellites : **a**) un échantillon : nombre moyen d'allèles, diversité génétique moyenne, variance de la taille moyenne ; **b**) deux échantillons : nombre moyen d'allèles, diversité génétique moyenne, F_{st} , distance entre allèles partagés (Tableau S4).

Les scénarios ont été comparés en estimant les probabilités postérieures avec la méthode de régression logistique dans DIYABC en utilisant 1% des ensembles de données simulées. Pour les meilleurs modèles, les distributions postérieures des paramètres ont été estimées avec une régression linéaire transformée en logit sur les ensembles de données simulées à 1% les plus proches des données observées. La confiance des scénarios a été évaluée en comparant les statistiques sommaires observées et simulées. Enfin, la qualité de l'ajustement des paramètres

postérieurs pour les scénarios les plus performants a été testée via l'option de vérification du modèle avec les paramètres par défaut, et la signification a été évaluée après correction de Bonferroni pour les tests multiples [54].

RESULTATS

Variabilité des microsatellites et analyse des clusters

Les 39 microsatellites étaient tous polymorphes dans les groupes échantillonnés, ce qui confirme les résultats publiés précédemment [20]. **Le tracé PCoA des génotypes multilocus a montré que les loups et les chiens Italiens sont nettement distincts les uns des autres et de toutes les autres populations de loups** (Fig. 1A). Le tracé DAPC a confirmé ce modèle de regroupement des populations (non montré). La première fonction discriminante de la DAPC a également montré que les loups de la péninsule Ibérique se sont regroupés dans un secteur distinct des autres régions d'Europe (Fig. 1B). Les résultats des analyses multivariées sont confirmés par les résultats de STRUCTURE, où les meilleurs regroupements ont été obtenus à $K = 3$ et à $K = 7$, où la subdivision optimale pour les populations de loups Européennes a été observée (Fig. 2 ; Fig. S1). Les chiens et les loups se regroupent séparément à $K = 2$, et les loups Italiens ont été les premiers à se regrouper séparément des autres loups à $K = 3$, suivis par les loups Ibériques à $K = 4$, puis par les loups de Slovénie et de Croatie à $K = 5$, de Grèce et de Bulgarie à $K = 6$, de la région des Carpates, d'Estonie, de Lettonie et de Finlande à $K = 7$ (Fig. S2). Nous supposons que ces **sept clusters** représentent la principale subdivision génétique parmi les populations échantillonnées, et nous ferons référence ci-après aux populations de loups suivantes : Péninsule Italienne (WIT), Péninsule Ibérique (Espagne et Portugal ; WIB), régions Dinariques (Slovénie et Croatie ; WDIN), régions Balkaniques (Grèce et Bulgarie ; WBALK), Carpates (République Tchèque ; WCARP), et Pays Baltes (Estonie et Lettonie plus Finlande ; WBALT) (Tableau 1). WIT et WIB ne présentaient pas de signatures d'ascendance mixte, ce qui était toutefois apparent chez certains individus échantillonnés dans d'autres clusters (Fig. 2). **Les cinq loups portant l'haplotype W16 CR ont été totalement assignés au cluster WIT avec $q_{wit} > 0,99$ et 90% CI = 0,95-1,00** (échantillons W943, W1223, H1122, W1816 et W1906 listés à la fin du Tableau S2) et ont été confirmés comme appartenant à la population WIT (Italienne).

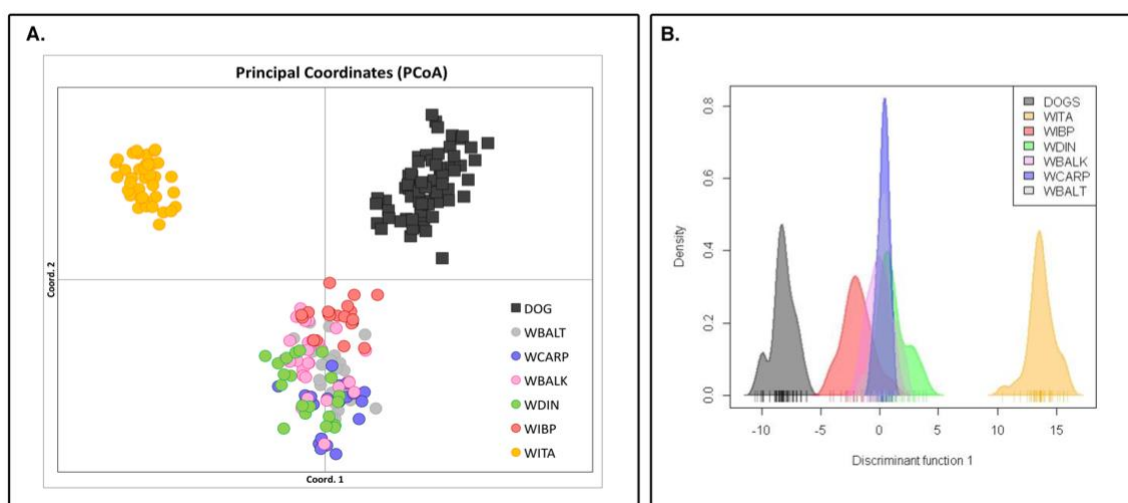


Fig. 1. Analyse des coordonnées principales du génotype multilocus microsatellite du loup et du chien. **(A)** Deux premières composantes d'une PCoA calculée dans GENALEX [26] des 39 génotypes multilocus microsatellites du loup et du chien. **(B)** Génotypes multilocus microsatellites de loup et de chien projetés sur la première fonction d'une analyse PC discriminante (DAPC calculée dans ADEGENET [28]). Identification des échantillons de loups : WBALT = Pays baltes ; WCARP : Carpates ; WBALK = Balkans ; WDIN = Dinariques ; WIBP = Péninsule Ibérique ; WITA = Italie.

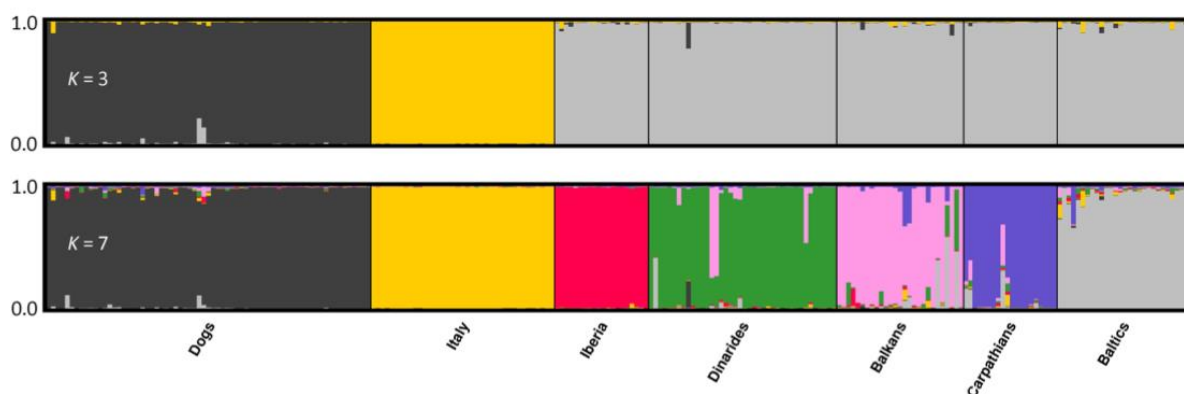


Fig. 2. Regroupement bayésien d'échantillons de chiens et de loups provenant de différents pays et génotypés à l'aide de 39 loci microsatellites autosomiques, obtenu par STRUCTURE [29,30] en supposant que $K = 3$ et $K = 7$. Avec $K = 3$, les trois groupes sont composés de chiens, de loups Italiens et de tous les autres loups Européens regroupés, tandis qu'avec $K = 7$, les loups sont répartis en six groupes de populations géographiques différentes

Le nombre d'allèles microsatellites observés et effectifs était le plus faible dans la population WIT ($A_o = 3,9$; $A_e = 2,3$) et le plus élevé dans la population WBALT ($A_o = 6,7$; $A_e = 4,1$). Ces deux populations ont également montré les valeurs les plus faibles (WIT : $H_o = 0,44$; $H_e = 0,50$) et les plus élevées (WBALT : $H_o = 0,68$; $H_e = 0,73$) d'hétérozygotie. Les valeurs de H_o étaient légèrement inférieures à celles attendues dans tous les groupes de population, à l'exception de WCARP qui présentait des valeurs de H_o et H_e identiques. Ainsi, les valeurs F au sein des clusters étaient positives, indiquant des écarts par rapport à HWE (Tableau 2).

Tableau 2. Estimation de la variabilité génétique dans six groupes de loups identifiés par les analyses bayésiennes

	Microsatellites		mtDNA		CR	ND4	COIII	ATP6	MF
	n		n						
WIT	n	39	n	39					
	Ao/Ae	3.9/2.3	N		2	1	1	1	2
	Ho/He	0.44/0.50	H		0.229	0.000	0.000	0.000	
	F	0.117	π		0.00046	0.00000	0.00000	0.00000	
WIB	n	20	n	20					
	Ao/Ae	4.5/3.1	N		4	3	2	1	5
	Ho/He	0.52/0.61	H		0.711	0.416	0.100	0.000	
	F	0.127	π		0.00299	0.00052	0.00043	0.00000	
WDIN	n	40	n	20					
	Ao/Ae	6.1/3.6	N		2	2	2	2	3
	Ho/He	0.62/0.69	H		0.337	0.337	0.337	0.337	
	F	0.117	π		0.00747	0.00119	0.00583	0.00286	
WBALK	n	27	n	32					
	Ao/Ae	6.6/3.9	N		7	6	3	3	10
	Ho/He	0.66/0.71	H		0.843	0.760	0.589	0.679	
	F	0.085	π		0.01408	0.00208	0.00866	0.00448	
WCARP	n	20	n	n.a.					
	Ao/Ae	4.7/3.1	N						
	Ho/He	0.64/0.64	H						
	F	0.000	π						
WBALT	n	28	n	28					
	Ao/Ae	6.7/4.1	N		5	5	3	2	6
	Ho/He	0.68/0.73	H		0.605	0.510	0.446	0.353	
	F	0.073	π		0.00947	0.00304	0.00763	0.00699	

La composition des clusters et les acronymes sont décrits dans le Tableau 1. Microsatellites = 39 microsatellites autosomiques ; n = échantillons génotypés ; Ao/Ae = nombre moyen d'allèles observé/effectif ; Ho/He = hétérozygotie moyenne observée/attendue ; F = coefficient de consanguinité. ADNmt = séquences des régions d'ADNmt CR, ND4, COIII et ATP6 ; n = échantillons séquencés ; N = nombre d'haplotypes ; H = diversité des haplotypes ; π = diversité nucléotidique. MF = nombre d'haplotypes multi-fragment concaténés détectés dans les six clusters de loups

Analyses phylogénétiques

Nous avons séquencé 498 pb de l'ADNmt CR (numéro d'accèsion GeneBank KY549989-KY550013), 588 pb de l'ATP6 (numéro d'accèsion GeneBank KY549946-KY549953), 231 pb du COIII (numéro d'accèsion GeneBank KY549954-KY54960) et 847 pb du ND4 (numéro d'accèsion GeneBank. KY549961-KY549974 pour les 414 premiers pb et no. KY549975-KY549988 pour les derniers 433 pb) des gènes mitochondriaux dans 210 échantillons de canidés (2164 pb au total ; Tableau S2). Les loups Italiens (WIT) présentaient le plus petit nombre d'haplotypes (N) et la plus faible diversité d'haplotypes et de nucléotides (H et π) dans chacune des quatre régions de l'ADNmt (Tableau 2). La diversité nucléotidique était inférieure à 1,4 % dans toutes les populations échantillonnées, ce qui suggère des origines récentes de leur diversité d'ADNmt. Les séquences d'ADNmt concaténées ont donné deux haplotypes distincts chez les loups Italiens, cinq chez WIB, trois chez WDIN, 10 chez WBALK et six chez WBALT (Tableau 2). Les deux haplotypes de loups Italiens, WH14 et WH19, différaient par une seule substitution nucléotidique en position 15 629 du génome mitochondrial complet de *Canis lupus* (GenBank access no AB499825). L'haplotype WH14 comprend l'haplotype CR ADNmt plus court W14 décrit à plusieurs reprises dans la population Italienne de loups [13,18,20,52]. L'haplotype concaténé WH19 comprend l'haplotype CR ADNmt plus court W16 déjà décrit par Boggiano et al. [55] et Randi et al. [20] (Tableaux S2 et S5) dans cinq de nos échantillons analysés. Nous n'avons détecté WH19 chez aucun autre individu (Tableau S6). Les 40 hybrides loup \times chien séquencés échantillonnés en Italie présentaient tous le même haplotype de loup WH14, suggérant une hybridation préférentielle loup-maternelle [22].

Les arbres phylogénétiques BT, NJ et ML des séquences d'ADNmt concaténées présentaient des topologies très similaires, bien que les supports de nœuds et les relations entre les haplotypes les moins divergents diffèrent (Figures S3A, S3B et S4). Les deux haplotypes de loup Italien WH14 et WH19, étroitement apparentés, appartiennent au même clade basal nommé A1 dans les arbres phylogénétiques. Le clade A1 est fortement soutenu dans les arbres NJ (bootstrap = 84,7), ML (bootstrap = 70) et BT (probabilité postérieure = 1,0), et comprend cinq autres haplotypes (nommés WH15, WH17, WH18, WH20 et WH21) qui ont été échantillonnés chez des loups de Slovénie, de Grèce, de Bulgarie et de Pologne. Tous ces haplotypes partagent les mêmes haplotypes ATP6 (A3) et COIII (C3), mais WH14, WH17 et WH19 sont les seuls haplotypes qui portent l'haplotype ND4 N5, alors que les quatre autres haplotypes portent l'haplotype N4 (Tableau S5). Aucun de ces haplotypes n'a été trouvé dans aucune autre population de loups existants analysée jusqu'à présent. Le clade A1 est le clade jumeau du clade A2, fortement soutenu, qui comprend cinq haplotypes trouvés uniquement dans d'anciennes races de chiens (ékhounds Suédois et Norvégiens ; Tableau S3) et l'haplotype S14.5k qui a été identifié dans un ancien échantillon de loup de Suisse daté d'environ 14 500 ans [56]. Le clade A est un clade frère de tous les autres clades de loups et de chiens modernes dans le BT, ce qui suggère qu'il comprend des ADNmt anciens actuellement distribués principalement dans les populations de loups d'Europe du Sud. Les clades A1-A2 sont étroitement liés à l'haplogroupe A2, mais ne sont pas imbriqués dans celui-ci, tel que défini par Pilot et al [57]. A quelques exceptions près, les autres clades sont composés exclusivement d'haplotypes de chiens ou de loups [58,59].

Estimations bayésiennes du TMRCA de l'ADNmt

L'arbre bayésien généré par BEAST (Fig. 3) était similaire aux autres arbres. Toutes les probabilités postérieures des principaux entre-nœuds étaient $> 0,81$, à l'exception du nœud 2 ($P = 0,54$) et du nœud 6 ($P = 0,53$). En accord avec Thalmann et al. [56], les anciens spécimens de type loup de

Belgique (B30k) et de Russie (R18k) étaient les haplotypes les plus basiques de l'arbre (nœud 1 et 2). Les haplotypes de loups existants se sont divisés en deux clades, A et B, il y a 45 400 ans (nœud 3). Les haplotypes du clade B ont fusionné il y a 41 100 ans (nœud 4), tandis que les clades A1 et A2 ont fusionné il y a 28 300 ans (nœud 5). Le clade A2 comprend la séquence historique S14.5k [56] et les haplotypes de chiens Dog1, qui ont divergé il y a 26 000 ans, tandis que les haplotypes inclus dans le clade A1 ont fusionné il y a 6800 ans (nœud 7).

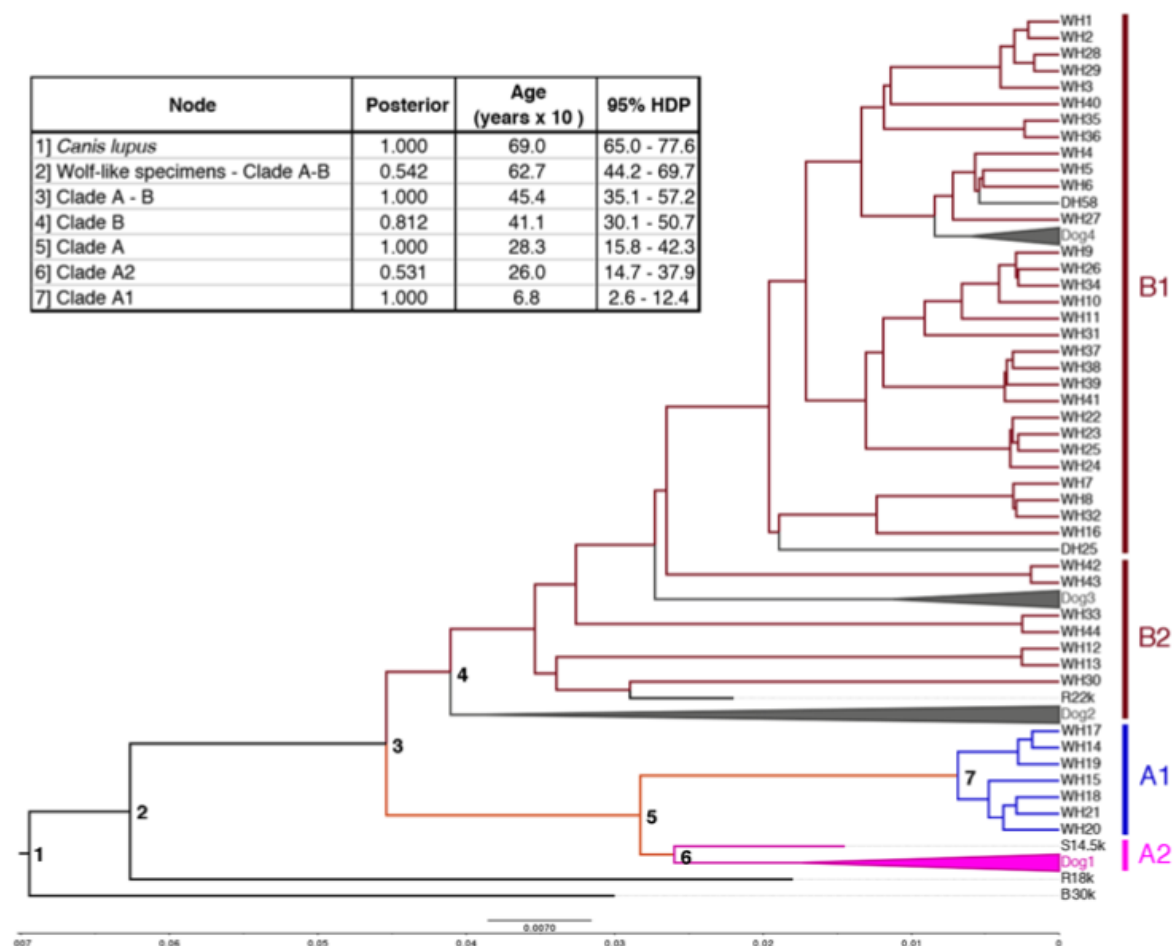


Fig. 3. Arbre phylogénétique bayésien de l'ADNmt (calculé dans BEAST) [47] avec un tableau indiquant le support bootstrap et le TMRCA estimé (et leur HDP à 95%) des principaux internodes. Les quatre clades principaux A1, A2, B1 et B2 sont indiqués. Tous les haplotypes de chiens qui forment un monophylum ont été regroupés (voir les Tableaux S3 et S5 pour les détails sur les haplotypes et la composition des clades)

Résultats des simulations ABC

Les simulations ABC ont fourni le meilleur soutien pour le scénario 2 (division simultanée de la population avec goulots d'étranglement) qui a été nettement plus performant que les trois autres (Fig. S6).

Le meilleur scénario a montré des valeurs P non significatives pour tous les paramètres postérieurs après correction de Bonferroni (Tableau S7). Dans ce scénario, les valeurs médianes du temps de divergence ont montré que les trois populations de loups ont été génétiquement isolées pendant les 6830 dernières générations (quantile 5% (q_{050}) = 3240 générations-quantile 95% (q_{950}) = 9600 générations) (Tableau 3). En supposant un temps de génération du loup de trois ans [60,61], le TMRCA de ces populations est de 20 490 ans, alors que leurs goulots d'étranglement ont été estimés à environ 15 030 ans (Fig. S7 ; Tableau 3). Les tailles effectives actuelles des populations

(N1, N2 et N3 ; Fig. S5) étaient beaucoup plus faibles que les tailles effectives correspondantes des populations avant le déclin démographique (Tableau 4, Fig. 4). En particulier, le goulot d'étranglement a entraîné un déclin de la population de loups Italiens d'environ 1,9 fois, tandis que les populations Ibériques et Dinariques ont été multipliées par 4,4-3,0, respectivement.

Tableau 3. Estimation des paramètres originaux et statistiques (médiane et quantiles) de la distribution postérieure pour le scénario présentant les probabilités postérieures les plus élevées

Parameters Scenario 2	median	q050	q950
N1	3.38E+03	1.50E+03	7.76E+03
N2	3.24E+03	7.85E+02	8.28E+03
N3	5.48E+03	1.51E+03	9.29E+03
t1	6.83E+03	3.42E+03	9.60E+03
db	5.01E+03	6.51E+02	9.28E+03
N1b	6.40E+03	7.46E+02	2.65E+04
N2b	1.44E+04	3.47E+03	2.85E+04
N3b	1.65E+04	4.60E+03	2.87E+04
NA	3.27E+03	3.55E+02	8.29E+03
$\hat{\mu}_{mic_1}$	1.72E-04	1.10E-04	3.48E-04
pmic_1	1.04E-01	1.00E-01	1.36E-01
snimic_1	2.67E-06	5.44E-07	7.53E-06

N1-N2-N3 = tailles de population effectives post-bloquement italo-ibéro-dinarique ; N1b-N2b-N3b = tailles de population effectives pré-bloquement Italo-Ibéro-Dinarique ; NA = taille de population effective de la population de départ ; t1 = temps de divergence depuis l'ancêtre commun en milliers de générations (3 ans par génération chez *C. lupus*) ; db = durée du goulot d'étranglement ; $\hat{\mu}_{mic_1}$ = taux de mutation moyen ; pmic_1 = coefficient P moyen ; snimic_1 = taux de SNI moyen.

Tableau 4. Taille du goulot d'étranglement dans quatre populations de loups, telle qu'estimée par DIYABC selon les deux meilleurs scénarios démographiques décrits dans la Figure S5

Scenario	Italian Peninsula (N1b/N1)	R	Iberian Peninsula (N2b/N2)	R	Dinaric regions (N3b/N3)	R
2	6400/3380	1.9	14.400/3240	4.4	16.500/5480	3.0

N = post-bottleneck effective population size. Nb = pre-bottleneck effective population size. R = Nb/N ratio.

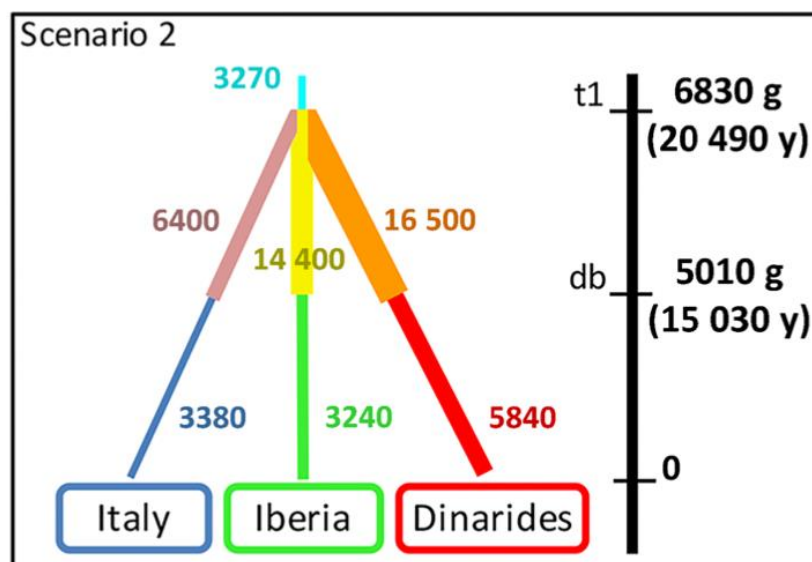


Fig. 4. Les meilleurs scénarios tels que déduits par DIYABC. Représentation graphique des tailles de population résultantes et des temps de divergence estimés pour les deux meilleurs scénarios simulés, en utilisant un temps de génération $g = 3$ ans. La largeur des branches est proportionnelle à la taille effective des populations déduites

DISCUSSION

Au cours des derniers siècles, les grands carnivores et les ongulés ont décliné dans le sud-ouest de l'Europe en raison de la déforestation, de la chasse excessive et de la persécution directe [4,62].

Dans la péninsule Italienne, les loups ont survécu de manière isolée après une contraction prolongée de leur aire de répartition et un fort déclin démographique. Dans la première moitié des années 1970, lors du dernier **goulot d'étranglement**, il ne restait qu'une centaine d'individus dans les zones montagneuses isolées du centre-sud de l'Italie [14]. Plusieurs sources de données génétiques ont souligné de manière concordante les conséquences du goulot d'étranglement de la population. **Les marqueurs microsatellites et les criblages SNP à l'échelle du génome ont montré que les loups Italiens présentent une variabilité génétique autosomique inférieure d'environ 33 % à 42 % à celle de toutes les autres populations de loups en Europe** [13, 16, 52]. Une exception est la population isolée de loups Ibériques, qui présente également une faible variabilité génétique [16,63]. En outre, la diversité génétique uniparentale est également très faible chez les loups Italiens, et jusqu'à récemment, seuls un CR ADNmt et deux haplotypes du chromosome Y ont été décrits [20,64]. Les déductions tirées de ces estimations de la variabilité génétique indiquent que les loups pourraient avoir été isolés dans la péninsule Italienne pendant des milliers de générations, excluant ainsi un effet prédominant du plus récent goulot d'étranglement anthropique [13,53]. Cependant, la date de l'isolement génétique effectif au sud des Alpes est controversée, avec des estimations allant de 3000 à 19 000 ans selon les marqueurs moléculaires (microsatellites, SNP ou génomes entiers), ou selon les hypothèses sur la taille effective de la population et les taux de mutation [13,17,53]. Les conséquences génétiques des goulots d'étranglement de la population et l'origine de la variabilité génétique permanente chez les loups Italiens ne sont toujours pas comprises de manière satisfaisante. **Les résultats de notre étude confirment que l'haplotype CR WH19 de l'ADNmt n'est pas issu d'une hybridation introgressive avec les chiens, mais qu'il était probablement déjà présent dans la population Italienne avant le goulot d'étranglement du 20^{ème} siècle** [19]. Dans les analyses bayésiennes de mélange, les génotypes multilocus autosomiques des cinq échantillons avec l'haplotype WH19 ont été entièrement assignés à la population de loups Italienne (Tableau S2). **De plus, nous n'avons trouvé cet haplotype dans aucune autre population de loups dans le monde, ni chez les chiens.** L'haplotype WH19 est identique à WH14, à l'exception d'un SNP dans la région de contrôle. L'haplotype WH17, trouvé chez deux loups de Grèce, est étroitement lié à ces deux haplotypes. Ces trois haplotypes appartiennent au même clade monophylétique d'ADNmt A1 (Fig. 3), qui comprend quatre autres haplotypes apparentés identifiés chez des loups échantillonnés principalement en Europe du Sud et dans les Balkans : L'Italie péninsulaire (haplotypes WH14 et WH19), la Grèce (WH15, WH17 et WH18), la Bulgarie (WH18), la Slovénie (WH20) et la Pologne (WH21), en accord avec Pilot et al [57]. **Ce schéma phylogéographique pourrait représenter d'anciennes lignées reliques, comme l'indique la position basale du clade A dans les arbres phylogénétiques** (Fig. 3 et Fig. S4). L'origine du clade A1 semble extrêmement récente, remontant à 6800 ans (95% HDP = 2600-12 400 ans), lorsqu'il a fusionné avec son clade frère A2. Ce dernier comprend l'haplotype S14.5k, qui a été identifié dans un ancien échantillon de loup provenant de Suisse et daté d'environ 14 500 ans [56], et cinq haplotypes trouvés uniquement dans d'anciennes races de chiens Scandinaves (Tableau S3 ; Figure 3). Le clade B peut également être divisé en deux sous-clades, le clade B1 comprenant les haplotypes trouvés dans le clade 1 de Pilot et al. [57], et le clade B2 contenant des haplotypes intermédiaires entre les clades 1 et 2 de Pilot et al. [57], conformément à Thalmann et al. De plus, nos clades A et B ont coalescé il y a 45 400 ans (HDP 95 % = 35 100-57 200 ans), ce qui est cohérent avec Thalmann et al. et al. [56] et Koblmüller et al. [65], suggérant que toute la diversité de l'ADNmt dans les populations de loups existantes a été générée pendant les dernières glaciations (la glaciation de Würm en Europe), au début de l'Holocène.

D'un point de vue géographique, les haplotypes de l'haplogroupe B, très diversifié, sont répandus en Europe, en Asie et en Amérique du Nord (ce qui confirme [57]). **En revanche, les haplotypes du clade A ont une distribution plus limitée, centrée sur les pays d'Europe centrale et méridionale.** Ce schéma, ainsi que les découvertes archéologiques, morphologiques et génétiques, suggèrent que les populations existantes de loups de l'Ancien et du Nouveau Monde se sont étendues pendant ou juste après la dernière période glaciaire, équilibrant l'extinction locale des anciens écomorphes de loups [53,56,65-68]. Cependant, on ne sait pas si le renouvellement des populations de loups a été la conséquence d'une vague généralisée d'extinction de la mégafaune due aux changements climatiques ou à la pression de chasse et/ou à la concurrence avec les populations humaines modernes en expansion [69-71]. Les schémas historiques de recolonisation ont pu être brouillés par l'extrême potentiel de dispersion des loups ou par l'éradication anthropique récente de nombreuses populations locales [72]. Les échantillons et les données génétiques des loups d'Europe de l'Est et d'Asie sont encore peu nombreux, ce qui empêche la reconstruction de la dynamique de population vraisemblablement complexe dans ces régions. **Par exemple, alors que l'Italie est la seule région où l'on ne trouve que l'haplogroupe A, les secteurs peu échantillonnés des Carpates, des Balkans et du Caucase montrent la présence d'haplotypes des haplogroupes A et B, ce qui suggère qu'il s'agit (ou qu'il s'agissait) de zones de mélange ancien de populations** (cette étude et [52,57]). En outre, l'extinction d'anciennes lignées d'ADNmt et **d'écomorphes** de loups spécialisés a été documentée en Amérique du Nord, mais elle n'est pas bien décrite en Europe [67,73,74]. Le manque d'informations sur l'étendue de la variation génétique et phénotypique des populations de loups paléolithiques en Eurasie rend difficile l'identification des populations de loups et des zones d'origine des chiens domestiques [75]. Une meilleure compréhension de ces phénomènes aidera à reconstruire la phylogéographie du loup en Eurasie qui, à l'heure actuelle, est encore incomplète.

Les modèles phylogéographiques émergeant des données de l'ADNmt sont complétés par des analyses multivariées et bayésiennes des génotypes autosomiques multilocus du loup. **Les résultats indiquent que les principales populations géographiques d'Europe centrale et du sud sont génétiquement distinctes.** Les loups Italiens et Ibériques ont été les premiers à se regrouper séparément dans les analyses multivariées et bayésiennes, confirmant ainsi les résultats de Lucchini et al [13], Stronen et al [52] et Pilot et al [16]. Les loups échantillonnés dans les populations des pays de l'Est, et en particulier dans les régions des Balkans et des Carpates, présentent des signatures de mélange, ce qui confirme les résultats précédents concernant l'ADNmt et les SNP autosomiques [16,52]. Des analyses génomiques récentes [17] suggèrent que le scénario démographique le plus plausible devrait supposer des goulots d'étranglement de la population de loups se séparant de manière étroitement séquentielle. Les simulations ABC indiquent que les populations de loups du sud de l'Europe (Ibérique, Italienne et Dinarique) pourraient s'être séparées simultanément à 20 490 ans et avoir subi un goulot d'étranglement à 15 030 ans (Tableau 3 ; Figure 4). Les simulations ont également montré que toutes les tailles effectives actuelles des populations de loups d'Europe du Sud sont significativement inférieures aux tailles avant le goulot d'étranglement, la population Italienne ayant diminué d'environ 1,9 fois et les autres populations d'environ 3,0 à 4,4 fois, ce qui est cohérent avec les déductions tirées des données génomiques [53].

CONCLUSIONS

Malgré l'incertitude qui est généralement associée aux estimations TMRCAs calculées à partir d'un nombre limité de marqueurs (comme dans cette étude), ou d'un nombre limité d'échantillons

(comme dans les études génomiques publiées jusqu'à présent [17,53]), les résultats montrent de manière concordante que les populations de loups actuellement fragmentées dans le sud-ouest de l'Europe ont été effectivement isolées juste après le dernier maximum glaciaire (il y a environ 20 000-16 000 ans). Au cours de ce processus, la population Italienne a subi un fort déclin démographique, qui a fortement réduit sa diversité génétique. Ainsi, le résultat de l'isolement ancien a compromis le pool génétique des loups Italiens bien avant le plus récent goulot d'étranglement anthropique. Cependant, ces résultats n'excluent pas la possibilité qu'un récent déclin démographique ait appauvri encore plus la variation génétique de cette population.