

## Signatures de goulots d'étranglement démographiques dans les populations Européennes de loups

Conserv Genet  
DOI 10.1007/s10592-010-0177-6

RESEARCH ARTICLE

### Signatures of demographic bottlenecks in European wolf populations

Natalia Sastre · Carles Vilà · María Salinas ·  
Vladimir V. Bologov · Vicente Urios ·  
Armand Sánchez · Olga Francino · Oscar Ramírez

#### Résumé

La surveillance de la perte de diversité génétique dans les populations sauvages après un **goulot d'étranglement** est une priorité dans les plans de conservation et de gestion. Ici, nous avons utilisé divers marqueurs moléculaires pour rechercher des **signatures de goulots d'étranglement démographiques** dans deux populations de loups : une population isolée de la péninsule Ibérique et une population non isolée de la Russie Européenne. La diversité autosomique, mtDNA et Y- chromosomique ainsi que la taille effective de la population ( $N_e$ ) étaient significativement plus faibles dans la population Ibérique. Les tests de neutralité utilisant les séquences d'ADNmt, tels que  $R_2$ ,  $F_u$  et  $L_i$ 's  $F^*$ , Tajima's D et  $F_u$ 's  $F_s$ , étaient positivement significatifs dans la population Ibérique, suggérant un déclin de la population, mais n'étaient pas significatifs pour la population Russe, probablement en raison de sa taille de population effective plus grande. Cependant, trois tests utilisant des données autosomiques ont confirmé l'occurrence du goulot d'étranglement génétique dans les deux populations. Le test du rapport M a été le seul à fournir des résultats significatifs pour les deux populations. Étant donné le manque de cohérence entre les différents tests, nous recommandons d'utiliser plusieurs approches pour étudier les éventuels goulots d'étranglement passés. La petite taille effective de la population (environ 50) dans la péninsule Ibérique par rapport à la taille présumée de la population existante pourrait indiquer que le goulot d'étranglement était plus puissant que ce que l'on soupçonnait initialement ou une surestimation de la population actuelle. Les risques associés aux petites tailles de population effectives suggèrent que le changement génétique dans cette population devrait être étroitement surveillé à l'avenir. D'autre part, la taille effective relativement faible de la population de loups Russes (quelques centaines d'individus) pourrait indiquer une certaine **fragmentation**, contrairement à ce qui est communément admis.

#### INTRODUCTION

Le déclin des populations d'animaux sauvages vivant en liberté est souvent imputable à la persécution humaine, à la dégradation de l'habitat, à la disparition des ressources et/ou aux maladies, ce qui entraîne une mise en danger, voire une extinction. Dans une population qui a subi un **goulot d'étranglement démographique**, le risque d'extinction est lié à la réduction de la diversité génétique et à l'augmentation subséquente des effets néfastes de la consanguinité, ce qui diminue le **potentiel d'adaptation** (Saccheri et al. 1999 ; Reed et al. 2002). Par conséquent, la détection des populations en goulot d'étranglement est importante pour la mise en œuvre de plans de conservation et de gestion appropriés.

En utilisant des marqueurs moléculaires tels que les microsatellites, trois méthodes simples sont couramment appliquées pour détecter les goulots d'étranglement passés : les tests d'excès d'hétérozygotie, de décalage de mode et de rapport  $M$  (Cornuet et Luikart 1996 ; Luikart et Cornuet 1997 ; Garza et Williamson 2001). L'approche de l'excès d'hétérozygotie est basée sur l'attente que dans une population en goulot d'étranglement, comme le nombre d'allèles est réduit plus rapidement que la diversité génétique, l'hétérozygotie observée sera plus élevée que celle attendue pour une population à l'équilibre mutation-dérive (Cornuet et Luikart 1996). Notez que cet excès d'hétérozygotie ne doit pas être confondu avec l'excès d'hétérozygotes résultant des déviations des attentes de l'équilibre de Hardy-Weinberg. L'approche de l'indicateur de changement de mode est basée sur la détection des changements dans les distributions de fréquence des allèles en considérant que dans une population goulotée, les allèles de fréquence intermédiaire seront les plus abondants en raison de la perte d'allèles rares (Luikart et al. 1998). Enfin, le test  $M$ -ratio, met en relation le nombre total d'allèles ( $k$ ) et la gamme globale des tailles d'allèles ( $r$ ). En supposant que  $k$  est réduit plus rapidement que  $r$  pendant un goulot d'étranglement, le rapport  $M = k/r$  sera plus petit dans les populations qui ont subi un déclin que dans les populations qui sont en équilibre mutation-dérive (Garza et Williamson 2001). Le test du rapport  $M$  permet de distinguer les populations ayant subi un goulot d'étranglement de celles qui sont restées petites pendant une longue période (Garza et Williamson 2001). De plus, le test  $M$ -ratio détecte les changements de  $N_e$  jusqu'à 100 générations auparavant, alors que les tests d'excès d'hétérozygotie et de mode-shift détectent les goulots d'étranglement récents.

Cependant, les goulots d'étranglement démographiques ne laissent pas toujours une signature génétique qui peut être détectée à l'aide de marqueurs à transmission autosomique, car la migration et/ou la mutation peuvent effacer les signatures du goulot d'étranglement en quelques générations seulement (Keller et al. 2001 ; Busch et al. 2007). De plus, dans un goulot d'étranglement affectant chaque sexe de manière différente, on peut s'attendre à une réduction inégale de la taille effective de la population  $N_e$  selon le marqueur utilisé (Fay et Wu 1999). Pour cette raison, les marqueurs génétiques hérités maternellement (mitochondrial) et/ou paternellement (chromosome Y) devraient être analysés simultanément afin de mieux comprendre l'histoire et/ou la diversité de la population. Ici, nous avons utilisé des séquences d'ADN mitochondrial (ADNmt) pour détecter les fluctuations démographiques en appliquant plusieurs tests de neutralité, tels que  $R_2$ ,  $F^*$  de Fu et Li,  $D$  de Tajima,  $F_s$  de Fu et MAE. Ces tests sont basés sur l'hypothèse que la plupart des mutations qui contribuent à la variation génétique dans les populations naturelles sont neutres (Kimura 1983). Les marqueurs du chromosome Y ont été utilisés pour comparer la diversité génétique paternelle et maternelle dans les populations étudiées.

Dans cette étude, nous avons comparé la performance de différentes méthodes analytiques pour détecter l'existence de goulots d'étranglement démographiques passés dans deux populations Européennes de loups gris (*Canis lupus*). Les deux populations sélectionnées proviennent de la péninsule Ibérique (Espagne et Portugal) et de la Russie Européenne. Écologiquement différente, la population de loups Ibérique est isolée et a subi un seul goulot d'étranglement démographique principal dans la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, tandis que la population de loups de Russie Européenne n'a jamais été isolée et a connu plusieurs fluctuations démographiques au cours du siècle dernier (Aspi et al. 2009). Nous avons quantifié et comparé les niveaux de variabilité génétique des deux populations en utilisant

des marqueurs moléculaires microsatellites, mitochondriaux et du chromosome Y et vérifié la performance et la cohérence des tests de goulot d'étranglement. Les deux événements de goulot d'étranglement peuvent avoir été similaires en intensité relative, mais comme la population Ibérique a une taille de population effective plus faible et est plus isolée, nous nous attendions à des preuves plus fortes du déclin de la population.

### **Contexte historique des populations de loups**

La plus grande population de loups d'Europe occidentale est située dans la péninsule Ibérique (Boitani 2003), et elle a été isolée des autres populations de loups Européennes au moins depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, lorsque les loups de France et d'Europe centrale ont disparu (Valière et al. 2003). Au début du vingtième siècle, les loups Ibériques étaient distribués dans toute la Péninsule. Cependant, au milieu du siècle, après des campagnes d'éradication du loup utilisant principalement du poison, la population a disparu sur la plupart de son ancienne aire de répartition (Valverde 1971). Au début des années 1970, la population était réduite à un niveau historiquement bas, estimé grossièrement à environ 700 individus (Grande del Brio 1984). Néanmoins, une nouvelle prise de conscience populaire et des politiques de conservation dans les années 1970 ont apporté une protection légale aux loups en Espagne (UICN 1973), augmentant leur aire de répartition et la taille de leur population. Les loups Ibériques, confinés principalement au nord-ouest de la péninsule dans les années 1980, se sont étendus sur plus de 100 000 km<sup>2</sup> atteignant, au début du XXI<sup>ème</sup> siècle, 254-322 meutes et plus de 2 000 individus (Alvares et al. 2005).

D'autre part, le loup est un prédateur abondant dans la Fédération de Russie (Bibikov et al. 1983). Les loups n'ont jamais été protégés mais ils n'étaient pas non plus en danger dans cette région (Bibikov 1994). Leur présence était continue sur une zone énorme, probablement en raison de la forte densité de proies naturelles et des forêts boréales de conifères larges et denses. De plus, les désordres économiques et politiques couplés à la faiblesse des programmes de contrôle des loups (principalement en raison de la taille de l'aire de répartition des loups) ont facilité leur prévalence (Bibikov 1994). **Au cours du vingtième siècle, trois pics démographiques ont été signalés pour les loups dans l'ancienne Union soviétique.** Le premier pic a été enregistré en 1946, avec une estimation de plus de 40 000 individus (Gubar 1996). Après la Seconde Guerre mondiale, une campagne efficace d'éradication des loups a été lancée et, entre 1960 et 1970, la population de loups est tombée à un niveau historiquement bas (Bibikov et al. 1983). Le second pic s'est produit dans les années 1980, atteignant approximativement le même nombre que dans les années 1940 (Gubar 1996). Cependant, au début des années 1990, le nombre de loups est tombé à 22 000 individus en raison d'une nouvelle campagne d'extermination centralisée (Ovsyanikov et al. 1998). A partir de là, le nombre de loups a augmenté régulièrement pour atteindre plus de 45 000 individus à la fin des années 1990. Aujourd'hui, les plus grandes populations de loups sont réparties dans les régions du Nord-Ouest et du Nord-Caucase de la Russie Européenne (Lomanov et al. 2000). En fait, la Russie Européenne contient un plus grand nombre de loups que la Russie Asiatique (Bibikov 1994 ; Lomanov et al. 2000). Dans cette étude, nous avons choisi quatre régions voisines de la Russie Européenne, où le nombre de loups au moment de l'échantillonnage était d'environ 1 843 (Borisov et al. 1992 ; Lomanov et al. 1995, 2000).

## MATERIEL ET METHODES

### Échantillons

Nous avons analysé 47 échantillons de loups provenant de quatre régions autonomes géographiquement connectées du nord-ouest de l'Espagne, totalisant environ 139 723 Km<sup>2</sup> (Asturias : 6 échantillons ; Cantabria : 4 ; Galicia : 2 et Castilla y León : 35), et 47 provenant de quatre régions géographiquement connectées du nord de la Russie Européenne, couvrant environ 308 281 km<sup>2</sup> (Kaluzshkaya : 2 ; Smolenskaya : 12 ; Vologodskaya : 5 et Tverskaya : 28) (Fig. 1). En supposant que le **temps moyen de génération** pour les loups est de 3,4 ans (Aspi et al. 2006), les échantillons de loups Ibériques ont été collectés environ 7 à 11 générations après le principal événement de goulot d'étranglement (de 1994 à 2008) tandis que les échantillons Russes ont été collectés environ 4 à 8 générations après le principal événement (de 1984 à 1996). Les échantillons Ibériques ont été obtenus à partir de carcasses échantillonnées par le personnel du gouvernement local. Les échantillons Russes correspondaient à des dents provenant de crânes déposés à la collection scientifique de la Réserve nationale de la forêt centrale (Zapovednik, région de Tverskaya). Alors que les échantillons Ibériques représentent une population isolée, les échantillons Russes représentent une partie d'une aire de population de loups beaucoup plus vaste. Cependant, nous avons considéré ici les loups de Russie comme une population unique par rapport à celle de la péninsule Ibérique (voir ci-dessous).



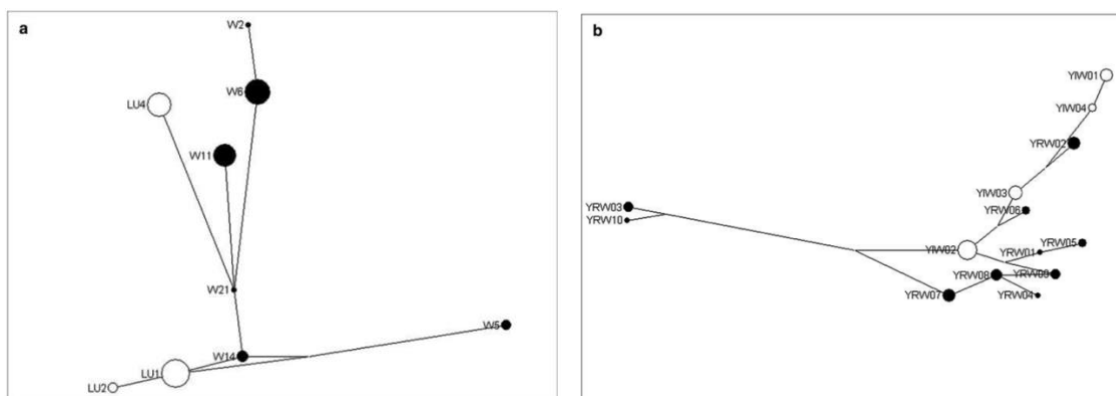
Fig. 1. Répartition de l'aire de répartition du loup en Eurasie selon l'IUCN ([www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)), et régions d'échantillonnage

## RESULTATS

### Séquences d'ADNmt

Nous avons identifié un total de **6 haplotypes** dans la population Russe, tous décrits dans des études précédentes ; W6, W14 (Vilà et al. 1999), W11 (Valière et al. 2003), W2, W5 et W21 (Pilot et al. 2006). Nous avons également trouvé trois (lu1, lu2, lu4) des quatre haplotypes précédemment rapportés chez les loups Ibériques (Vilà et al. 1999) (Fig. 2a). Seul l'haplotype lu3, identifié par Vilà et al. (1999) chez un individu du Portugal n'a pas été retrouvé dans nos échantillons.

La diversité des haplotypes et le nombre de sites polymorphes étaient plus importants chez les loups Russes que chez leurs homologues Ibériques. Malgré cela, un seul haplotype était prédominant dans chaque population, W6 en Russie (présent dans 45% des échantillons) et lu1 en Espagne (55%) (Tableau 1 ; Fig. 2a). La différenciation génétique entre les populations était hautement significative ( $F_{ST} = 0,396$  ;  $P < 0,001$ ) en raison du fait qu'elles ne partageaient pas d'haplotypes. Cependant, le réseau de portée minimale a montré un faible niveau de divergence de séquence entre les populations et les haplotypes observés dans chaque population n'ont pas formé de groupes distincts (Fig. 2a).



**Fig. 2.** Réseau de jonction médian des haplotypes (a) de l'ADNmt et (b) haplotypes du chromosome Y chez les loups Russes (cercles noirs) et Ibériques (cercles blancs). La taille des cercles est proportionnelle à la fréquence des haplotypes, et la longueur des branches est proportionnelle au nombre de différences nucléotidiques

La distribution des différences par paires a montré des schémas de distribution similaires dans les deux populations, ce qui n'indique pas une expansion de la population (données non présentées). Les tests de neutralité n'étaient pas significatifs pour la population Russe ( $P > 0,05$  dans tous les cas), ce qui n'indique pas une réduction de la population. En revanche, dans la population Ibérique, les tests de neutralité de classe I et II étaient significatifs ( $P < 0,05$ ), suggérant un déclin de la taille de la population en raison de leur valeur positive, tandis que le test basé sur la distribution de mésappariement n'était pas significatif (MAE ;  $P > 0,05$ ) (Tableau 1).

### Microsatellites du chromosome Y

Nous avons identifié 10 haplotypes chez les loups Russes et 4 haplotypes chez les loups Ibériques (Tableau 2). Aucun haplotype n'était partagé entre les populations. L'haplotype



YIW02 était présent chez la moitié (50%) des individus testés dans la péninsule Ibérique. Comme pour les données de l'ADNmt, la diversité du chromosome Y était plus élevée chez les loups Russes que chez les loups Ibériques (Tableau 2) et, comme pour l'ADNmt, le réseau de jonction médian minimum n'a pas révélé de séparation entre les populations (Fig. 2b).

**Tableau 1.** Diversité mitochondriale et tests de neutralité pour deux populations de loups Européens

Mitochondrial DNA sequences										
	N	H	Hd	$\pi$	S	Class I			Class II	Class III
						R <sub>2</sub>	F*	D	F <sub>s</sub>	MAE
Russian wolf	47	6	0.672 ± 0.043	0.016	10	0.157	1.073	1.151	2.932	0.905
Iberian wolf	47	3	0.555 ± 0.041	0.010	6	0.211*	1.770*	2.236*	6.061*	1.083

*N* sample size, *H* haplotype number, *Hd* haplotype diversity,  $\pi$  nucleotide diversity, *S* number of polymorphic sites

\*  $P < 0.05$

**Tableau 2.** Haplotypes du chromosome Y et diversité chez les loups Russes et Ibériques pour cinq loci microsattellites

Haplotype	MS34A	MS34B	MS41A	MS41B	990	Frequency (%)
Russian wolves						
YRW01	181	179	207	222	126	3.7
YRW02	175	179	207	228	126	18.5
YRW03	173	183	207	216	130	11.1
YRW04	181	177	207	218	124	3.7
YRW05	181	179	209	222	126	7.4
YRW06	177	179	209	224	126	7.4
YRW07	179	177	207	216	124	18.5
YRW08	179	177	207	218	124	14.9
YRW09	179	177	207	220	124	11.1
YRW10	173	181	207	214	130	3.7
Where N = 27; N <sub>a</sub> = 12; H = 10; Hd = 0.602 ± 0.095						
Iberian wolves						
YIW01	175	177	207	224	124	19.2
YIW02	177	179	207	222	126	50.0
YIW03	177	179	207	226	126	23.1
YIW04	175	177	207	226	124	7.7
Where N = 26; N <sub>a</sub> = 1; H = 4; Hd = 0.360 ± 0.100						

*N* sample size, *N<sub>a</sub>* number of unique alleles per population, *H* haplotype number, *Hd* haplotype diversity  
Alleles are represented by their sizes

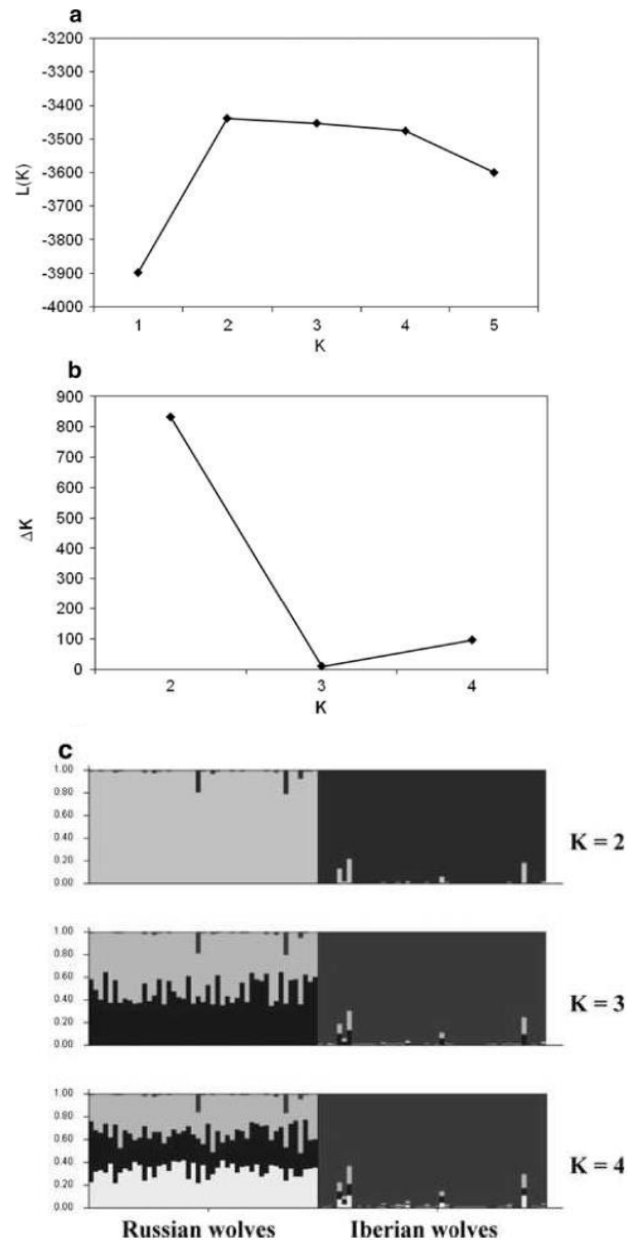
### Microsatellites autosomiques : analyses préliminaires

Le programme MICRO-CHECKER a identifié 3 loci présentant un déficit d'hétérozygotie ( $P < 0,01$ ) dans les populations Russe (CXX 366, CXX2130 et CXX2158) et Ibérique (CXX2001, CXX403 et CXX2158), ce qui suggère la présence d'allèles nuls dans ces loci. Les allèles nuls peuvent être détectés comme un excès d'homozygotes conduisant les loci à des déviations de HWE (Carlsson 2008). Le test d'excès d'hétérozygotie exige que les marqueurs moléculaires soient dans HWE (Busch et al. 2007). Pour cette raison, nous avons écarté le locus CXX2158 des analyses ultérieures car il s'écartait significativement de HWE dans les deux populations ( $P < 0,001$ ). De plus, pour évaluer l'impact de l'inclusion des marqueurs qui montrent une déviation significative de l'équilibre par population, les tests de goulot d'étranglement ont été répétés en incluant et en excluant ces marqueurs (voir Tableau 4).

### Structure de la population et taille effective de la population

La  $F_{ST}$  a montré une différenciation significative entre les deux populations de loups ( $F_{ST} = 0,131$  ;  $P < 0,05$ ). L'analyse factorielle des correspondances a également indiqué que les

loux Ibériques étaient distincts des loups Russes sur le premier axe factoriel, FA-I, expliquant 7,86% de la diversité génétique totale (Figure non montrée). De la même manière, la méthode de regroupement basée sur un modèle bayésien a montré un pic dans DK (Fig. 3a, b ; Evanno et al. 2005) pour  $K = 2$ , qui séparait en deux clusters clairs les loups Russes et Ibériques (Fig. 3c). Les valeurs de  $F_{ST}$  entre les quatre régions Ibériques ( $F_{ST} = 0,049$ ) et Russes ( $F_{ST} = 0,037$ ) étaient très faibles indiquant une sous-structure très faible et non significative au sein des populations.



**Fig. 3.** Approche de clustering bayésien pour deux populations de loups. **a** Vraisemblance moyenne  $L(K)$  sur 20 passages en supposant  $K$  clusters ( $K=1-5$ ). **b**  $\Delta K$  suivant Evanno et al. 2005, où la valeur modale de la distribution est le plus haut niveau de structuration. **c** Affectation des individus en utilisant  $K = 2$ ,  $K = 3$  et  $K = 4$  clusters. Chaque individu est représenté par une barre verticale divisée en  $K$  segments colorés, dont la longueur est proportionnelle à la probabilité d'affectation au  $K$  cluster

La diversité génétique était significativement plus élevée chez les loups Russes que chez les loups Ibériques ( $A$ ,  $R_s$ ,  $H_E$  ; tests  $W$ ,  $P < 0,05$  dans tous les cas). Les deux populations présentaient  $H_E > H_O$  à presque tous les loci, et des valeurs  $F_{IS}$  positives (Tableau 3), non significativement différentes entre les populations (test  $W$ ,  $P > 0,05$ ). Enfin, les deux

programmes basés sur le déséquilibre de liaison entre les 12 loci microsatellites ont donné des estimations similaires de  $N_e$  pour la population Ibérique (NEESTIMATOR,  $N_e = 53,8$  [intervalle de confiance à 95% : 41,4-73,8] ; LDN $_e$ ,  $N_e = 43,2$  [29,9-68,5]) mais moins similaires pour la population Russe (NEESTIMATOR,  $N_e = 312,5$  [167,1-1741,6] ; LDN $_e$ ,  $N_e = 138,0$  [75,9-490,4]).

**Tableau 3.** Diversité génétique pour chaque microsatellite dans deux populations de loups

Locus	Russian wolf ( $n = 47$ )						Iberian wolf ( $n = 47$ )					
	A	$N_a$	$R_s$	$H_o$	$H_E$	$F_{IS}$ (95% CI)	A	$N_a$	$R_s$	$H_o$	$H_E$	$F_{IS}$ (95% CI)
CXX2001	7	2	6.936	0.702	0.749	0.051	6	1	6.000	0.468	0.784	0.401***
CXX2010	8	5	7.745	0.745	0.729	-0.034	3	0	2.997	0.574	0.512	-0.124
CXX2054	14	8	13.992	0.638	0.819	0.222***	7	1	6.936	0.447	0.552	0.166
CXX403	10	5	9.809	0.702	0.864	0.179*	5	0	4.997	0.277	0.630	0.549***
CXX410	9	4	8.809	0.787	0.820	0.034	5	0	5.000	0.489	0.747	0.341***
CXX442	4	2	4.000	0.511	0.664	0.225	3	1	3.000	0.467	0.407	-0.148
CPH5	6	2	5.872	0.553	0.658	0.161	7	3	7.000	0.689	0.747	0.078**
CXX366	7	4	6.933	0.468	0.755	0.372***	4	1	4.000	0.477	0.539	0.116
CPH9	13	7	13.000	0.841	0.870	0.033***	6	0	6.000	0.636	0.766	0.156*
CXX2130	12	6	11.910	0.717	0.875	0.180	8	2	7.913	0.652	0.754	0.132*
CXX474	8	5	7.929	0.617	0.786	0.215*	4	1	3.936	0.468	0.488	0.011
CXX459	9	2	8.954	0.674	0.793	0.138	8	1	7.933	0.660	0.810	0.182***
Total	8.9	52	8.824	0.663	0.782	0.147 (0.07-0.20)*	5.5	11	5.476	0.525	0.645	0.177 (0.10-0.23)*

Deviations from Hardy–Weinberg equilibrium were assessed from the fixation index  $F_{IS}$  for each locus

A allele number,  $N_a$  number of unique alleles per locus and population,  $R_s$  allelic richness ( $n = 44$ ),  $H_o$  observed heterozygosity,  $H_E$  expected heterozygosity

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$

### Tests de goulot d'étranglement

Le test de Wilcoxon pour l'excès d'hétérozygotie était significatif pour la population Russe ( $P = 0,026$ ) (Tableau 4). Les loups Ibériques ont également montré un excès d'hétérozygotie à la majorité des loci mais les tests de signe et de Wilcoxon n'étaient pas significatifs ( $P > 0,05$ ) (Tableau 4). Cependant, la contraction de la population en Espagne a été confirmée par l'indicateur de changement de mode (Tableau 4 ; Fig. 4). Une perte d'allèles rares a été détectée car la proportion d'allèles rares ( $q < 0,05$ ) était de 24,4% tandis que la proportion de la troisième classe d'allèles ( $0,1 < q < 0,2$ ) était de 26,8% (également supérieure à la fréquence des allèles de la classe  $[0,05 < q < 0,1]$ ). Nous en avons donc déduit que la population Ibérique n'était pas en équilibre mutation-dérive. En revanche, la distribution des fréquences alléliques pour la population Russe était plus en forme de L, comme on peut s'y attendre pour les populations qui n'ont pas subi de goulots d'étranglement récents (Fig. 4).

Le rapport  $M$  pour les échantillons Ibériques était de 0,615, ce qui indique que de nombreux allèles étaient absents de la population par rapport au nombre total attendu selon le modèle MTP (Tableau 4).  $M$  était significativement inférieur à  $M_c$  sur une large gamme de valeurs de  $N_e$  (de  $N_e = 50$  à 3 000), indiquant de manière cohérente la présence d'un goulot d'étranglement. Le rapport  $M$  pour les échantillons Russes était de 0,715, toujours légèrement inférieur aux valeurs critiques  $M_c$ , bien que supérieur au seuil de 0,68 suggéré par (Garza et Williamson 2001) pour déduire sans risque les goulots d'étranglement passés.

Pour évaluer si les résultats ont été influencés par l'inclusion de deux loci qui ne sont pas en équilibre HWE au sein de chaque population, les analyses ont été répétées en incluant seulement 10 microsatellites qui ne semblaient pas présenter de déviations significatives par rapport à HWE. Les résultats obtenus en utilisant 10 ou 12 loci microsatellites étaient



similaires (Tableau 4). Par conséquent, nous sommes d'accord avec Carlsson (2008) que la présence d'allèles nuls ne semble pas affecter les tests effectués.

**Tableau 4.** Tests de détection de goulots d'étranglement dans deux populations de loups en utilisant un taux de mutation de  $5,0 \times 10^{-4}$

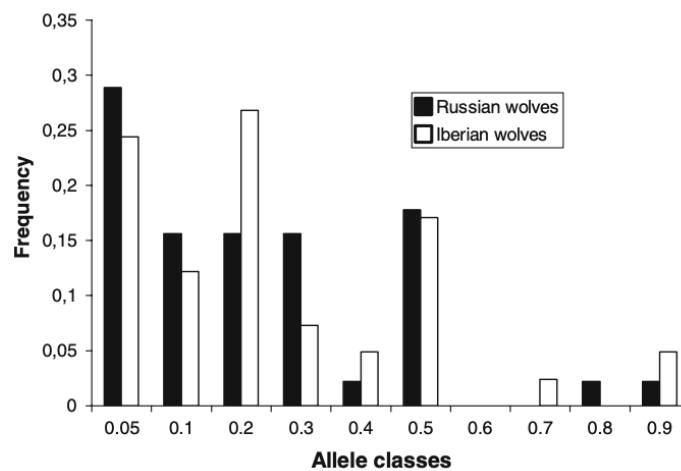
Test (12 microsatellite loci)	Parameters		Russian wolves ( $n = 47$ )	Iberian wolves ( $n = 47$ )
Heterozygosity excess	$\sigma^2 = 12$ $p_g = 0.10$	Sign test	10:2 ( $P = 0.06$ ) <sup>a</sup>	9:3 ( $P = 0.163$ )
		Wilcoxon	$P = 0.026$	$P = 0.088$
M-ratio	$\Delta_g = 3.5$ $p_g = 0.10$ $\theta = 0.1, N_e = 50$ $\theta = 0.6, N_e = 300$ $\theta = 1.0, N_e = 500$ $\theta = 6.0, N_e = 3000$	$M_c = 0.85$	$M = 0.715$	$M = 0.615$
		$M_c = 0.81$	$P = 0.0000$ <sup>b</sup>	$P = 0.0000$
		$M_c = 0.79$	$P = 0.0026$	$P = 0.0000$
		$M_c = 0.72$	$P = 0.0029$	$P = 0.0000$
			$P = 0.0422$	$P = 0.0001$
Mode-shift			Normal L-shaped distribution	Shifted mode
Test (10 microsatellite loci) <sup>c</sup>				
Heterozygosity excess	$\sigma^2 = 12$ $p_g = 0.10$	Sign test	9:1 ( $P = 0.032$ )	7:3 ( $P = 0.294$ )
		Wilcoxon	$P = 0.042$	$P = 0.161$
M-ratio	$\Delta_g = 3.5$ $p_g = 0.10$ $\theta = 0.1, N_e = 50$ $\theta = 0.6, N_e = 300$ $\theta = 1.0, N_e = 500$	$M_c = 0.84$	$M = 0.710$	$M = 0.594$
		$M_c = 0.80$	$P = 0.0004$	$P = 0.0000$
		$M_c = 0.78$	$P = 0.0023$	$P = 0.0000$
			$P = 0.0049$	$P = 0.0000$
Mode-shift			Normal L-shaped distribution	Shifted mode

$\sigma^2$  Variance,  $p_g$  proportion of multi-step mutation (IAM),  $\Delta_g$  average size of multi-step mutations,  $M_c$  critical value

<sup>a</sup> Heterozygosity excess versus heterozygosity deficit loci

<sup>b</sup>  $P$  = probability values for a greater  $M$  ratio

<sup>c</sup> CPH9 and CXX366 loci and CXX2001 and CXX403 loci deviated significantly from HWE in the Russian and Iberian populations respectively and were discarded from the second part of the analysis



**Fig. 4.** Distribution de fréquence des classes d'allèles pour les loups Ibériques et Russes

## DISCUSSION

La variation mitochondriale et celle du chromosome Y étaient plus élevées dans la population Russe non isolée que dans la population Ibérique isolée (Tableaux 1, 2). Cependant, la variabilité constatée chez les loups Ibériques était environ deux fois supérieure à celle des populations isolées et génétiquement dépourvues de population décrites dans des études précédentes. Pilot et al. (2006) ont constaté que les populations de loups d'Europe de l'Est présentaient de multiples haplotypes d'ADNmt largement distribués, alors que les loups d'Italie, isolés comme les loups Ibériques, présentaient un haplotype unique (Randi et al. 2000). Nous avons observé trois haplotypes dans la péninsule Ibérique, les haplotypes lu1 et lu2 n'étant pas observés ailleurs en Europe (Valière et al. 2003). De la même manière, Sundqvist et al. (2001) ont rapporté 9-10 haplotypes du chromosome Y parmi les populations

de loups de l'Est et seulement 2 haplotypes chez les loups Scandinaves, qui proviennent d'un événement fondateur impliquant seulement deux mâles (voir aussi Vilà et al. 2003). Pour la population de loups Ibériques, le nombre d'haplotypes du chromosome Y était intermédiaire (quatre haplotypes).

Comme pour les marqueurs uniparentaux, les mesures de la variabilité des microsatellites autosomiques, telles que la diversité allélique ( $A$ ) et l'hétérozygotie attendue ( $H_E$ ) étaient plus élevées chez les loups Russes ( $A = 8,9$  ;  $H_E = 0,78$ ) que chez les loups Ibériques ( $A = 5,5$  ;  $H_E = 0,65$ ), mais toutes deux étaient proches des valeurs trouvées dans les populations de loups non isolées d'Amérique du Nord ( $A = 5,9$ ,  $H_E = 0,74$ , Carmichael et al. 2007 ;  $A = 7,9$ ,  $H_E = 0,67$ , Musiani et al. 2007 ;  $A = 7,0$ ,  $H_E = 0,72$ , Kobmüller et al. 2009) ou du nord-ouest de la Russie ( $A = 5,7$ ,  $H_E = 0,71$  ;  $A = 4,7$ ,  $H_E = 0,64$ , Aspi et al. 2009), et plus élevé que celui observé pour les populations isolées d'Italie ( $A = 4,4$ ,  $H_E = 0,49$ , Lucchini et al. 2004) ou de Scandinavie ( $A = 3,1$ ,  $H_E = 0,52$ , Flagstad et al. 2003). Par conséquent, même si la variabilité génétique était plus faible dans la population Ibérique isolée, elle ne semble pas extrêmement appauvrie en diversité. Cependant, les comparaisons des mesures de diversité dérivées de différents ensembles de marqueurs ne peuvent être considérées que comme une approximation grossière.

La preuve génétique qu'un goulot d'étranglement s'est produit dans la population Ibérique a été fournie par des marqueurs maternels et biparentaux : tests de neutralité positifs pour les séquences d'ADNmt et tests significatifs de rapport  $M$  et de décalage de mode pour les microsatellites autosomiques. Seuls deux tests n'ont pas réussi à mettre en évidence le déclin démographique de cette population isolée : le test de neutralité basé sur la distribution des mésappariements (MAE), probablement parce qu'il est très conservateur (Ramos-Onsins et Rozas 2002), et le test d'excès d'hétérozygotie qui compare l'hétérozygotie observée avec la valeur attendue en supposant que la population est à l'équilibre mutation-dérive (Cornuet et Luikart 1996). Comme la diversité allélique est rapidement réduite, un excès d'hétérozygotie peut être observé à la suite d'un goulot d'étranglement. Plusieurs raisons peuvent contribuer à l'absence de signification : présence d'allèles nuls, consanguinité, substructuration de la population (effet Wahlund) et faible puissance statistique. Les allèles nuls ne semblent pas expliquer le résultat puisque les mêmes résultats ont été observés après avoir exclu deux loci qui n'étaient pas en HWE dans chaque population (Tableau 4). En ce qui concerne la **consanguinité**, elle ne semble pas non plus être la raison des résultats : nous avons trouvé des valeurs de  $F_{IS}$  élevées dans les deux populations (0,147 et 0,177) et non significativement différentes (test  $W$ ,  $P > 0,05$ ), mais le test n'était significatif que pour la population Russe. La **fragmentation** ne semble pas non plus expliquer les résultats car les échantillons ont été collectés sur une zone relativement plus petite (et continue) que pour la population Russe. De même, le manque de puissance statistique ne semble pas être la raison puisque le nombre d'échantillons typés se situe dans la fourchette recommandée par Luikart et al. (1998) pour obtenir une puissance élevée dans le test (entre 15-40 individus et entre 10-15 microsatellites). Cependant, il est possible que le nombre inférieur d'allèles dans la population Ibérique (voir Tableau 3) ait réduit la puissance du test dans cette population, ou que le goulot d'étranglement soit trop récent pour produire un excès d'hétérozygotie détectable dans cette population (voir Cornuet et Luikart 1996).

**Dans la population Russe**, nous avons détecté la signature génétique du goulot d'étranglement en utilisant les données autosomiques et malgré le fait que la migration et/ou la mutation pourrait effacer les signatures du goulot d'étranglement en quelques générations (Keller et al. 2001 ; Busch et al. 2007), mais nous n'avons pas réussi à détecter une telle signature en utilisant l'ADNmt. Les quatre régions Russes échantillonnées présentent une continuité écologique et physique, le paysage n'étant pas fragmenté par des barrières topographiques notables et permettant donc apparemment des taux élevés de flux génétique. Comme les lieux d'échantillonnage se situent dans une distribution beaucoup plus large, le flux génétique est également possible avec les régions voisines. Nous avons trouvé un excès d'hétérozygotie dans la population, que l'on utilise 10 ou 12 loci microsatellites (Tableau 4). De plus, même si  $M(0,72) > 0,68$ , et donc qu'une réduction de la taille ne peut être supposée avec certitude (Garza et Williamson 2001), la perte d'allèles était évidente car  $M < M_c$  (Tableau 4). Cependant, la distribution des fréquences alléliques était biaisée en faveur des allèles rares (en forme de L), ne montrant pas une grande perte d'allèles rares ou indiquant une certaine récupération due à une mutation ou une migration. **De la même manière, aucun déclin génétique n'a été mis en évidence en utilisant les marqueurs hérités maternels.** Peut-être que la taille effective de la population en Russie est suffisamment grande pour rendre difficile l'identification du goulot d'étranglement en utilisant de courtes séquences d'ADNmt comme celles utilisées ici.

Enfin, les données officielles ont montré que, de 1984 à 1995, le nombre total de loups à Kaluzskaya (178), Smolenskaya (347), Volgodsckaya (708) et Tverskaya (635) était d'environ 1 843 individus (Borisov et al. 1992 ; Lomanov et al. 1995, 2000). Frankham et al. (2002) ont estimé que, en moyenne et sur une très large gamme d'espèces, la valeur moyenne de  $N_e/N$  était de 0,11. Avec cette estimation, et compte tenu de la taille de la population de loups dans la région étudiée, nous pourrions nous attendre à des valeurs de  $N_e$  autour de 203, similaires aux valeurs que nous avons estimées (312,5 et 138,0). Cependant, il s'agit de la valeur à laquelle on devrait s'attendre si la population de loups était isolée de la population du reste de la Russie. Si la région était largement connectée par flux génétique avec le reste de la population Russe, avec une population totale estimée à près de 40 000 loups, nous nous attendrions à une taille de population effective beaucoup plus importante. Par conséquent, nos estimations relativement faibles de la taille effective de la population sont cohérentes avec la fragmentation (England et al. 2010). De même, la grande valeur observée pour le  $F_{IS}$  indique l'existence d'un certain degré de fragmentation dans la zone d'étude. Des études génétiques de population plus détaillées comprenant des échantillons de l'ensemble de l'aire de répartition des loups en Russie permettraient d'identifier les discontinuités et les unités appropriées pour la gestion.

**Dans le cas de la population Ibérique**, la taille effective estimée de la population est d'environ 50 (deux estimations, 53,8 et 43,2), ce qui représente environ 2,5% de l'estimation mentionnée de 2 000 individus, bien en dessous des 11% ( $N_e/N = 0,11$ ) estimés par Frankham et al. (2002). Dans ce cas, on peut considérer que notre échantillon représente l'ensemble de l'aire de distribution du loup en Espagne (à l'exception de deux noyaux très petits et isolés dans le sud et le nord-est ; Alvares et al. 2005, Sastre et al. 2007) et que la petite taille effective de la population ne peut être interprétée comme le résultat d'une distribution biaisée des échantillons (ne représentant pas l'ensemble de la population). Cela pourrait indiquer que la taille de la population a été surestimée (par exemple, en incluant des juvéniles ;

Vilà 2010) et/ou que la diversité génétique a été réduite de manière plus dramatique par le goulot d'étranglement qu'initialement suspecté.

**En résumé,** nous avons détecté des goulots d'étranglement démographiques dans les deux populations, indépendamment du taux de croissance élevé des populations de loups (la population Ibérique aurait pu être multipliée par deux ou trois en 30 ans). Les marqueurs maternels tels que les séquences d'ADNmt ont permis de détecter le déclin démographique dans la petite population isolée mais pas dans la grande. En revanche, les marqueurs biparentaux ont été efficaces pour montrer les effets du goulot d'étranglement dans les deux populations, le test du rapport  $M$  étant utile pour les deux. Cependant, en raison des différents résultats obtenus avec les tests, nous recommandons de réaliser des approches multiples, en utilisant également différents types de marqueurs génétiques, afin de détecter les goulots d'étranglement. De plus, étant donné la petite taille de la population effective estimée pour la population Ibérique, nous suggérons une surveillance continue car son isolement peut conduire à une perte rapide de la diversité génétique et du potentiel adaptatif. Toute fragmentation au sein de cette population accélérerait encore cette perte. D'un autre côté, la taille effective de la population de loups Russes pourrait indiquer qu'une certaine fragmentation existe, ce qui signifie que la totalité de la population de loups Russes ne doit pas être considérée comme une unité de gestion unique.