

# Rôle des régions du Caucase, des Carpates et des Balkans Dinariques dans la préservation de la diversité génétique des loups

Mammalian Biology

<https://doi.org/10.1007/s42991-023-00357-4>

ORIGINAL ARTICLE



## The role of the Caucasus, Carpathian, and Dinaric–Balkan regions in preserving wolf genetic diversity

Dragana Šnjegota<sup>1</sup> · Magdalena Niedziałkowska<sup>2</sup> · Astrid Vik Stronen<sup>3,4</sup> · Tomasz Borowik<sup>2</sup> · Kamila Plis<sup>2</sup> · Marine Arakelyan<sup>5</sup> · Duško Ćirović<sup>6</sup> · Gabriel Danila<sup>7</sup> · Mihajla Djan<sup>8</sup> · Astghik Ghazaryan<sup>5</sup> · Zurab Gurielidze<sup>9</sup> · Tigran Hayrapetyan<sup>5</sup> · Zsolt Hegyeli<sup>10</sup> · Alexandros A. Karamanlidis<sup>11,12</sup> · Natia Kopaliani<sup>9</sup> · Josip Kusak<sup>13</sup> · Dmitry Politov<sup>14</sup> · Maya Talala<sup>14</sup> · Elena Tsingarska<sup>15</sup> · Bogumiła Jędrzejewska<sup>2</sup>

Received: 6 December 2022 / Accepted: 19 March 2023

© The Author(s) under exclusive licence to Deutsche Gesellschaft für Säugetierkunde 2023

### Résumé

Les régions montagneuses sont depuis longtemps importantes pour le maintien des populations et de la diversité génétique des espèces sauvages, en particulier celles qui ont besoin de vastes zones pour maintenir des populations viables. Nous avons examiné les loups (*Canis lupus*) dans les régions du Caucase, des Carpates et des Balkans Dinariques, en nous attendant à ce que ces populations persistantes présentent une grande diversité génétique et un chevauchement des principaux haplogroupes détectés lors d'études antérieures à grande échelle. Nous avons analysé 926 séquences de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial, dont 533 nouveaux échantillons dont la distribution géographique nous a permis de réduire les lacunes d'échantillonnage observées dans les études antérieures à grande échelle. Nous avons estimé la variabilité génétique, la structure des populations et les relations phylogéographiques afin d'évaluer la diversité et la connectivité des populations dans les régions étudiées.

Nous avons détecté des haplogroupes H1 et H2 qui se chevauchent dans les régions étudiées. L'haplogroupe H1 peut être divisé en trois sous-groupes : H1A et H1B qui se chevauchent partiellement dans les régions étudiées, et H1C qui n'a été trouvé que chez les loups d'Arménie. L'haplogroupe H2 était largement confiné aux régions des Carpates et Dinaric-Balkan. Nos analyses de la structure de la population concordent en partie avec la distribution des haplogroupes et produisent quatre groupes génétiques principaux. Nos résultats ont démontré une grande diversité génétique dans les régions étudiées, ce qui confirme leur rôle dans le maintien de la variabilité intraspécifique chez les loups et d'autres espèces qui ont besoin de vastes zones pour maintenir des populations viables. La diversité unique et la structure nord-sud observées dans le Caucase soulignent la nécessité de poursuivre les recherches et les efforts de conservation dans cette région à la biodiversité très riche. Nos conclusions soulignent le rôle de la planification à grande échelle dans la conservation des processus évolutifs dans cette région et dans d'autres régions transfrontalières.

### INTRODUCTION

Le loup gris (*Canis lupus*), historiquement répandu en Europe, a connu un déclin de sa distribution au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, principalement en raison de diverses activités humaines, notamment la chasse excessive, le braconnage et la fragmentation de l'habitat (p. ex. Mech et Boitani 2007 ; Dufresnes et al. 2018 ; Musto et al. 2021). Ces activités ont été particulièrement préjudiciables aux petites populations isolées et à celles qui vivent à proximité des humains (p. ex. Chapron et al. 2014 ; Nowak et al. 2021). En conséquence, la distribution et la taille de certaines populations ont considérablement diminué jusqu'à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle (par exemple, la population d'Europe centrale, Andersen et al. 2015, Reinhardt et al. 2015 ; la population Italienne, Lucchini et al. 2004 ; Fabbri et al. 2007 ; la population Balte, Jędrzejewski et al. 2005), tandis que certaines ont fini par s'éteindre (par exemple, la population de la Sierra Morena, López-Bao et al. 2015). Par conséquent, la diversité génétique de ces populations a diminué ou a été définitivement perdue, ce qui devrait avoir un impact négatif sur le potentiel adaptatif de l'espèce (par exemple, Frankham 2005). Les populations des régions où les habitats sauvages, y compris les montagnes, sont plus abondants, comme les Carpates (ci-après Carpates), les Monts Dinariques (ci-après Dinariques, comme décrit dans Šnjegota et al. 2021), et les Balkans (ci-après Balkans, comme décrit dans Djan et al. 2014), ont été moins exposées à l'impact négatif de l'activité humaine et sont restées plus stables au fil du temps (par exemple, Filonov 1989 ; Okarma 1993). Ces régions et leurs populations ont été des **réservoirs** de diversité génétique pour la récente recolonisation remarquable de l'Europe par les loups (Chapron et al. 2014 ; Gula et al. 2009 ; Raženet al. 2016 ; Nowak et al. 2017).

Les populations des Carpates et des Dinaric-Balkan ont également été considérées comme des liens potentiels sud-nord et est-ouest entre les populations de loups (e.g., Stronen et al. 2013 ; Pilot et al. 2014), en raison de leur position centrale en Europe. Il a été démontré que les loups d'Europe de l'Est étaient connectés avec les loups d'Asie de l'Ouest via la région du Caucase (Pilot et al. 2014). Malgré le rôle important du Caucase en tant que région transfrontalière, les études de génétique des populations sur les loups de cette région ont été sporadiques jusqu'à présent (par exemple, Pilot et al. 2014 ; Kopaliani et al. 2014 ; Shakarashvili et al. 2020). A l'inverse, plusieurs études de génétique des populations ont été menées sur les loups des Carpates, des Dinarics et des Balkans, bien que la plupart d'entre elles soient caractérisées par une zone d'échantillonnage discontinue ou limitée. Dans les Carpates, par exemple, les études de génétique des populations ont principalement inclus les régions montagneuses du nord (Pilot et al. 2006, 2010 ; Gula et al. 2009 ; Czarnomska et al. 2013 ; Bakan et al. 2014 ; Rigg et al. 2014), tandis que dans les Balkans, les zones d'étude ont été largement fragmentées (Pilot et al. 2010 ; Gomerčić et al. 2010 ; Djan et al. 2014 ; Stronen et al. 2013 ; Šnjegota 2019).

Pour une espèce très mobile, nous nous attendons à ce qu'un échantillonnage plus continu et plus étendu de populations persistantes démontre une grande diversité génétique et un **chevauchement** des **haplogroupes** signalés dans les études précédentes. Nous avons échantillonné des loups de la région du Caucase à l'est, à travers les steppes Ukrainiennes jusqu'aux Carpates, et vers le sud à travers la région Dinarique et les Balkans. Nous avons analysé **(i)** la diversité génétique, **(ii)** la structure de la population et **(iii)** les relations phylogéographiques des loups de ces régions, afin de mieux comprendre leur connectivité et leur rôle dans le maintien de la diversité génétique.

## MATERIELS ET METHODES

### Zone d'étude et échantillonnage

Les loups ont été échantillonnés de 1998 à 2018, entre 13° - 50° de longitude Est et 33° - 50° de latitude Nord, une zone s'étendant sur environ 2800 km d'est en ouest et 1300 km du nord au sud (Fig. 1, Annexe Tableau A1), dans les Carpates au nord, les Dinaric-Balkans au sud-ouest et le Caucase à l'est (plus de détails sur la zone d'étude sont fournis dans l'Annexe Note A1). Les altitudes maximales varient de 1500 à 2925 m au-dessus du niveau de la mer (a.s.l.) dans la partie sud-ouest à 5642 m a.s.l. dans les montagnes du Grand Caucase sur la rive nord de la mer Noire. Entre le Caucase et les Carpates se trouvent les basses terres de Ciscaucasie, les basses terres de la mer Noire et les hautes terres de Volyn-Podolian. Nous avons également collecté des échantillons dans la région des basses terres de la mer Noire, située presque entièrement dans le sud de l'Ukraine, qui se caractérise par un paysage de steppe et qui est donc appelée steppe Ukrainienne dans cette étude (plus de détails sur ce site d'étude sont fournis dans la note A1 de l'annexe). Notre échantillonnage comprenait 14 pays au total : 4 dans les Carpates (Pologne, Slovaquie, Ukraine et Roumanie), 7 dans la région Dinaric-Balkan (Croatie, Serbie, Bosnie-Herzégovine (ci-après B&H), Monténégro, Bulgarie, Macédoine du Nord et Grèce) et 3 pays dans le Caucase (Russie, Géorgie et Arménie).

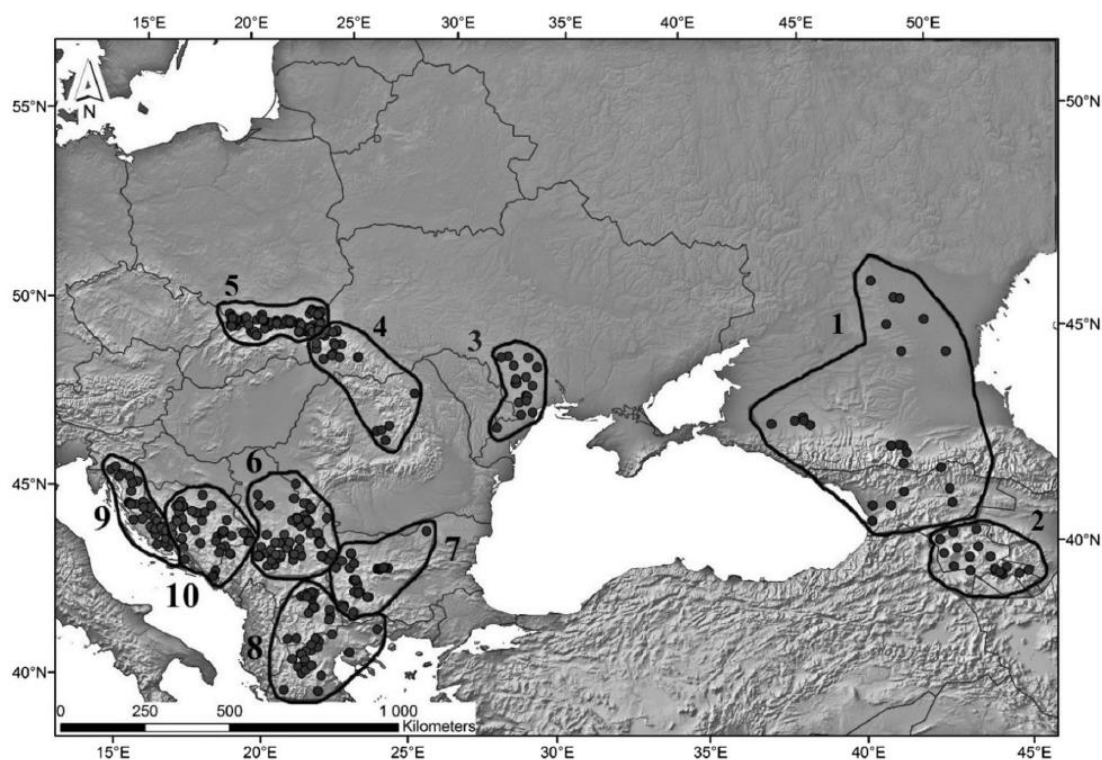


Fig. 1 Sites d'échantillonnage du loup étiquetés conformément au Tableau 1

Le climat varie de montagnoux et tempéré dans les parties nord à méditerranéen dans le sud, et la saisonnalité est bien marquée dans toute la région d'étude. Les températures moyennes journalières dépendent de la latitude et de l'altitude, et varient de - 12° à 10°C en janvier et de 10° à 26°C en juillet (Agence Européenne pour l'environnement 2009a).

Tableau 1. Caractéristiques moléculaires des loups répartis sur les dix sites d'échantillonnage

No	Sampling regions and sites	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>π</i>	<i>Hd</i>	<i>B</i>
The Caucasus						
1	Georgia, Russia	42	8	0.015	0.763	3.77
2	Armenia	33	5	0.019	0.716	3.27
	In total	75	6.5	0.017	0.739	3.52
3	Ukrainian steppe (in total)	27	6	0.019	0.553	3.17
The Carpathians						
4	Ukrainian and Romanian	50	6	0.013	0.709	2.25
5	Polish and Slovakian	228	9	0.022	0.665	3.01
	In total	279	7.5	0.017	0.687	2.63
The Balkans						
6	Serbia	181	9	0.015	0.508	2.01
7	Bulgaria	103	10	0.021	0.726	3.56
8	North Macedonia, Greece	71	9	0.019	0.614	2.53
	In total	355	9.3	0.018	0.616	2.7
The Dinarics						
9	Croatia	112	6	0.018	0.67	2.96
10	Bosnia & Herzegovina, Montenegro	79	5	0.019	0.727	3.54
	In total	191	5.5	0.019	0.698	3.25
In total		926	7.3	0.018	0.665	3.01

*n* number of individuals, *Na* number of haplotypes, *π* nucleotide diversity, *Hd* haplotype diversity, *B* index of haplotype diversity

Les zones montagneuses des régions étudiées, à l'exception de la partie sud du Petit Caucase, sont fortement boisées (les forêts couvrent généralement > 50%, et souvent > 75% de la surface des terres), tandis que les plaines et les basses terres, utilisées pour l'agriculture, ont un couvert forestier inférieur à 25% (Agence Européenne pour l'environnement 2009b). Les principales espèces d'arbres dans les forêts des régions des Carpates et des Balkans Dinariques sont le hêtre (*Fagus sylvatica*), l'épicéa commun (*Picea abies*) et le sapin blanc (*Abies alba*), tandis que les forêts de pins méditerranéens (*Pinus* spp.) poussent dans les régions les plus méridionales (par exemple, en Grèce). Le Caucase est caractérisé par des forêts mixtes où dominent le hêtre oriental *Fagus orientalis*, l'épicéa du Caucase *Picea orientalis*, le sapin du Caucase *Abies nordmanniana* et l'orme du Caucase *Zelkova caprinifolia* (Bohn et al. 2007).

Le matériel analysé comprenait au total 533 échantillons collectés lors de chasses régulières et/ou sur des individus tués sur la route, ainsi qu'un échantillonnage non invasif de fèces (Annexe Tableau A1). Aucun animal n'a été tué dans le cadre de cette étude. Après la collecte, les échantillons ont été conservés dans de l'éthanol à 96% à - 20°C avant l'extraction de l'ADN. Nous avons complété notre ensemble de données avec 393 séquences supplémentaires de la région de contrôle de l'ADNmt du loup gris provenant de nos régions d'étude et téléchargées à partir de GenBank (Tableau A2 de l'Annexe).

### Analyses de laboratoire...

#### Analyses statistiques

Des analyses statistiques ont été effectuées sur l'ensemble de données final ( $n = 926$  séquences), qui a été divisé en dix sites d'étude (Tableau 1). Les paramètres de base du polymorphisme de l'ADNmt (*Na*-le nombre d'haplotypes, *Hd*-la diversité des haplotypes,  $\pi$ -la diversité des nucléotides) ont été calculés dans Arlequin v.3.5.2 (Excoffier et Lischer 2010), ainsi que les valeurs de  $\Phi_{st}$  par paire entre les populations de loups des sites d'étude (Annexe Tableau A3) et les clusters génétiques détectés par GENELAND (Annexe Tableau A4). Les

niveaux de signification des valeurs de  $\Phi_{st}$  par paire ont été calculés en utilisant 10 000 permutations. Le niveau de diversité des haplotypes a également été évalué en calculant l'indice de diversité  $B$  (Levins 1968). La différence entre les indices de diversité Band  $Hd$  se situe dans l'intervalle de leurs valeurs minimales et maximales ;  $Hd$  varie de 0 à 1 alors que  $B$  varie de 1 à la valeur maximale qui est équivalente au nombre d'haplotypes dans l'échantillon. Par conséquent,  $B$  peut être interprété comme le nombre effectif d'haplotypes dans l'échantillon (Niedzialkowska et al. 2014).

L'analyse spatiale de la variance moléculaire, implémentée dans SAMOVA v.2.0 (Dupanloup et al. 2002), a été utilisée pour détecter la structure génétique des populations. Cette méthode permet d'identifier des sous-populations géographiquement homogènes et différenciées les unes des autres, en maximisant la proportion de la variabilité génétique totale ( $\Phi_{CT}$ ) due aux différences entre les groupes de populations. L'analyse nécessite une définition a priori de  $K$  (le nombre de groupes) et a été effectuée avec  $K$  allant de 2 à 10, en suivant le manuel du programme. Le nombre le plus probable de groupes a été identifié en fonction du mode de changement des valeurs du paramètre statistique  $\Phi$ . En outre, la structure génétique des populations a été explorée avec GENELAND v.4.0.5 (Guillot et al. 2005) dans l'environnement R 1.8.6. (R Core Team 2019), qui intègre également la distribution spatiale des échantillons. GENELAND a été exécuté avec  $K$  allant de 2 à 10 ; MCMC (Markov Chain Monte Carlo) a été exécuté avec  $10^6$  itérations et un intervalle d'amincissement de 100 itérations, et en appliquant le modèle corrélé des fréquences des allèles. Les premiers 20% des itérations initiales ont été rejetés en tant que période de rodage. Le  $K$  le plus probable a été choisi en fonction de la probabilité postérieure d'appartenance à la population et de l'histogramme des valeurs  $K$  estimées pour chaque itération. Les mêmes paramètres ont été utilisés pour les analyses hiérarchiques afin d'explorer la sous-structure des groupes détectés par GENELAND.

Les relations phylogéographiques entre les haplotypes ont été analysées en créant un réseau de jonction médiane (MJ) et un arbre phylogénétique bayésien. **L'approche par réseau est plus pratique que l'approche par arbre car elle permet la présence d'haplotypes ancestraux dans un échantillon, alors que dans les arbres, toutes les séquences sont traitées comme des taxons terminaux** (Posada et Crandall, 2001). Un réseau MJ a été créé dans PopArt v.1.7 (Bandelt et al. 1999). L'arbre bayésien a été généré en utilisant BEAST 1.8.0 (Drummond et Rambaut 2007), et en appliquant le modèle évolutif HKY + G, suggéré comme le modèle le plus approprié pour notre jeu de données par MEGA6 (Tamura et al. 2013). La taille constante de la population a été supposée comme un antécédent d'arbre coalescent, car, selon Drummond et Rambaut (2007), c'est le plus approprié pour les arbres décrivant les relations entre les individus d'une même population et/ou espèce. Le MCMC a été exécuté avec  $10^7$  itérations et un échantillonnage toutes les 104 générations. Les premiers 10% des arbres initiaux de chaque exécution ont été éliminés en tant que périodes de rodage. Tracer v.1.5 (Drummond et Rambaut 2007) a été utilisé pour résumer les résultats et pour vérifier la convergence de tous les paramètres. L'arbre a été visualisé à l'aide de FigTree v.1.4.0 (Rambaut 2012) et enraciné avec une séquence du coyote (Canislatrans, GenBank Accession no DQ480510.1).

## RESULTATS

### Variabilité génétique

Après avoir analysé les séquences de la région de contrôle de l'ADNmt du loup d'une longueur totale de 223 pb, 26 haplotypes d'ADNmt ont été détectés, dont 5 nouveaux haplotypes (c'est-à-dire non publiés dans des études antérieures) identifiés chez des individus uniques de Serbie, de B&H, de Croatie, de la steppe Ukrainienne et de Russie (Tableau A2 de l'Annexe). Le nombre d'haplotypes de l'ADNmt par site d'échantillonnage variait de 5 à 10 et le nombre total de sites polymorphes était de 27 (7 sites variables de singleton et 20 sites informatifs de parcimonie). Le nombre le plus élevé d'haplotypes a été détecté en Bulgarie ( $N_a = 10$ ), tandis que les valeurs les plus élevées des indices de diversité des haplotypes  $Hd$  et  $B$  ont été détectées dans le Caucase (Russie et Géorgie) ( $Hd = 0,76$ ,  $B = 3,77$ ). Le plus petit nombre d'haplotypes a été détecté en B&H, au Monténégro et en Arménie, tandis que les valeurs les plus faibles de la diversité  $Hd$  et  $B$  ont été enregistrées en Serbie (Tableau 1). Globalement, le plus grand nombre d'haplotypes a été détecté dans les Balkans, suivis par les Carpates et le Caucase, la steppe Ukrainienne et enfin les Dinariques. La diversité des haplotypes a diminué à partir du Caucase, suivi par les Dinariques et les Balkans, pour atteindre les valeurs les plus faibles dans les Carpates ( $B$ ) et la steppe Ukrainienne ( $Hd$ ).

### Structure de la population

Les résultats des analyses SAMOVA et GENELAND ont suggéré quatre ( $K = 4$ ) groupes génétiques (Fig. 2), ce qui a été confirmé par des valeurs de  $\Phi_{st}$  statistiquement significatives par paire (Tableau A4 en Annexe). Dans l'analyse SAMOVA, la valeur de  $\Phi_{CT}$  a connu la plus forte augmentation entre  $K = 3$  et  $K = 4$ , atteignant son plateau à  $K = 4$  (Figure A2 en Annexe). Par conséquent,  $K = 4$  semble être le nombre de grappes le plus plausible. Le même nombre de groupes ( $K = 4$ ) a également été suggéré par l'analyse GENELAND (Annexe Fig. A3), et nous avons utilisé ces résultats pour délimiter quatre groupes, C1-C4. C1 comprenait les loups de Croatie, de B&H et du Monténégro ; C2 les loups des Carpates Polonaises, Slovaques, Roumaines et Ukrainiennes, de la steppe Ukrainienne, de la Serbie, de la Bulgarie, de la Macédoine du Nord et de la Grèce ; C3 les loups de Russie et de Géorgie, et le groupe C4 comprenait les loups d'Arménie (Fig. 2).

Compte tenu des résultats d'études antérieures dans ces régions (Pilot et al. 2006 ; Czarnomska et al. 2013 ; Stronen et al. 2013 ; Szewczyk et al. 2019), nous avons étudié la présence éventuelle d'une sous-structure supplémentaire au sein du grand groupe C2. GENELAND a montré une division de l'amas C2 entre la steppe Ukrainienne de basse altitude (sous-ampleur C2A) et les zones essentiellement montagneuses des Carpates et des Balkans (sous-ampleur C2B), la limite de la division longeant les Carpates (Fig. 2). Les résultats d'une éventuelle sous-structure additionnelle du sous-groupe C2B n'ont pas été concluants et nécessiteraient un échantillonnage plus détaillé.

La distribution spatiale des deux haplogroupes détectés H1 et H2 concorde partiellement avec les résultats de SAMOVA et GENELAND (Fig. 3 et 4, Annexe Fig. A1). Dans l'haplogroupe H1, trois sous-groupes ont été définis : H1A, H1B et H1C (Figures 3 et 4, annexe Figure A1, Tableau A2). La distribution spatiale des sous-groupes H1A et H1B incluait l'ensemble de la zone d'étude, mais avec la prédominance de différents haplotypes dans les diverses régions. Par exemple, les haplotypes w2, w7 et w3/78 ont dominé dans les Carpates, w77 dans le Caucase, w13 dans les Balkans, w23 et w10 dans la région Dinarique,

w4 et w7 dans la steppe Ukrainienne, et certains d'entre eux se chevauchent dans toutes les régions étudiées, comme prévu (Figure 4, Tableau A2 en Annexe). Les sous-groupes H1A et H1B avaient la distribution la plus large dans les Carpates et les Balkans, suivis par le Caucase et en dernier lieu par la région Dinarique (Tableau A2 en Annexe). Le sous-groupe H1C est apparu comme le plus différencié, les haplotypes formant un clade monophylétique (Annexe Fig. A1), et ces haplotypes n'ont été trouvés que chez les loups Arméniens (Fig. 4).

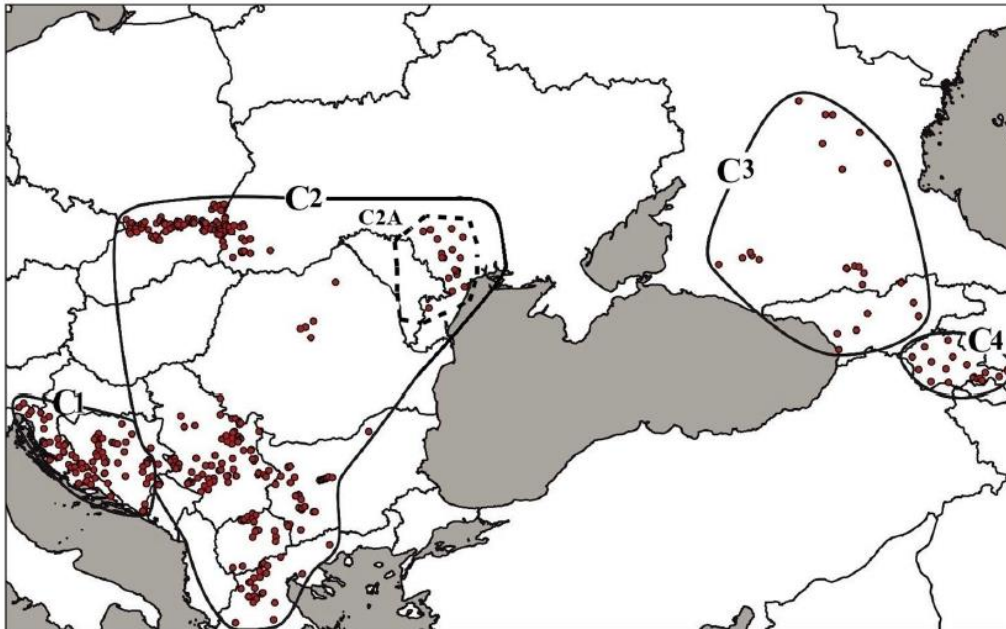
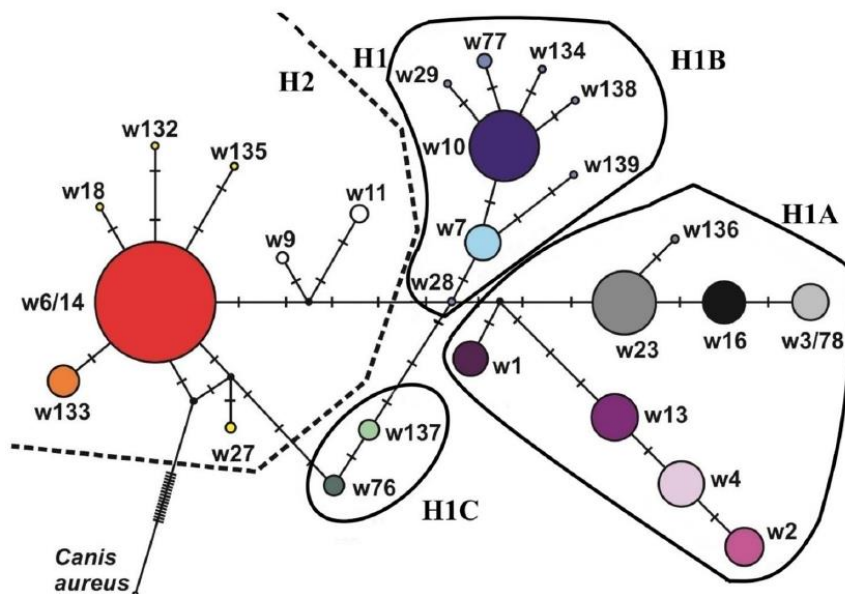


Fig. 2. Clusters ( $K = 4$ ) détectés avec SAMOVA et GENELAND sur la base des analyses des haplotypes de la région de contrôle de l'ADN du loup. La ligne en pointillé indique le sous-groupe C2A, tandis que tous les autres échantillons du groupe C2 appartiennent au sous-groupe C2B, selon l'analyse hiérarchique de ce groupe

L'haplogroupe H2 a été détecté dans toutes les régions étudiées, dominant dans les Carpates et les Balkans avec l'haplotype w6/14. Cet haplotype était sporadique ou complètement absent dans d'autres régions (Fig. 4, Tableau A2 de l'Annexe). Le deuxième haplotype H2 le plus fréquent, W133, avait la fréquence la plus élevée dans la région Dinarique (Tableau A2 de l'Annexe). Les haplotypes w9 et w11 ont été différenciés des autres haplotypes de cet haplogroupe, ayant des positions distinctes dans le réseau (Fig. 3) et formant un clade frère amonophylétique avec les autres haplotypes de l'haplogroupe H2 (Annexe Fig. A1).

## DISCUSSION

La distribution des haplogroupes H1 et H2, qui ont été détectés dans l'ensemble des régions étudiées, coïncide partiellement avec la distribution spatiale des groupes génétiques identifiés ( $K = 4$ ). L'haplogroupe H1 a été divisé en trois sous-groupes : H1A, H1B et H1C. Les sous-groupes H1A et H1B se chevauchent dans toutes les régions étudiées, tandis que le H1C n'a été trouvé que dans le sud du Caucase, chez les loups d'Arménie. L'haplogroupe H2 était largement confiné aux Carpates et aux Balkans. De même, nous avons observé des structures régionales correspondantes dans certains endroits. La diversité des haplotypes a diminué dans le Caucase, les Dinariques et les Balkans, pour atteindre son niveau le plus bas dans les Carpates (B) et la steppe Ukrainienne (Hd), respectivement.



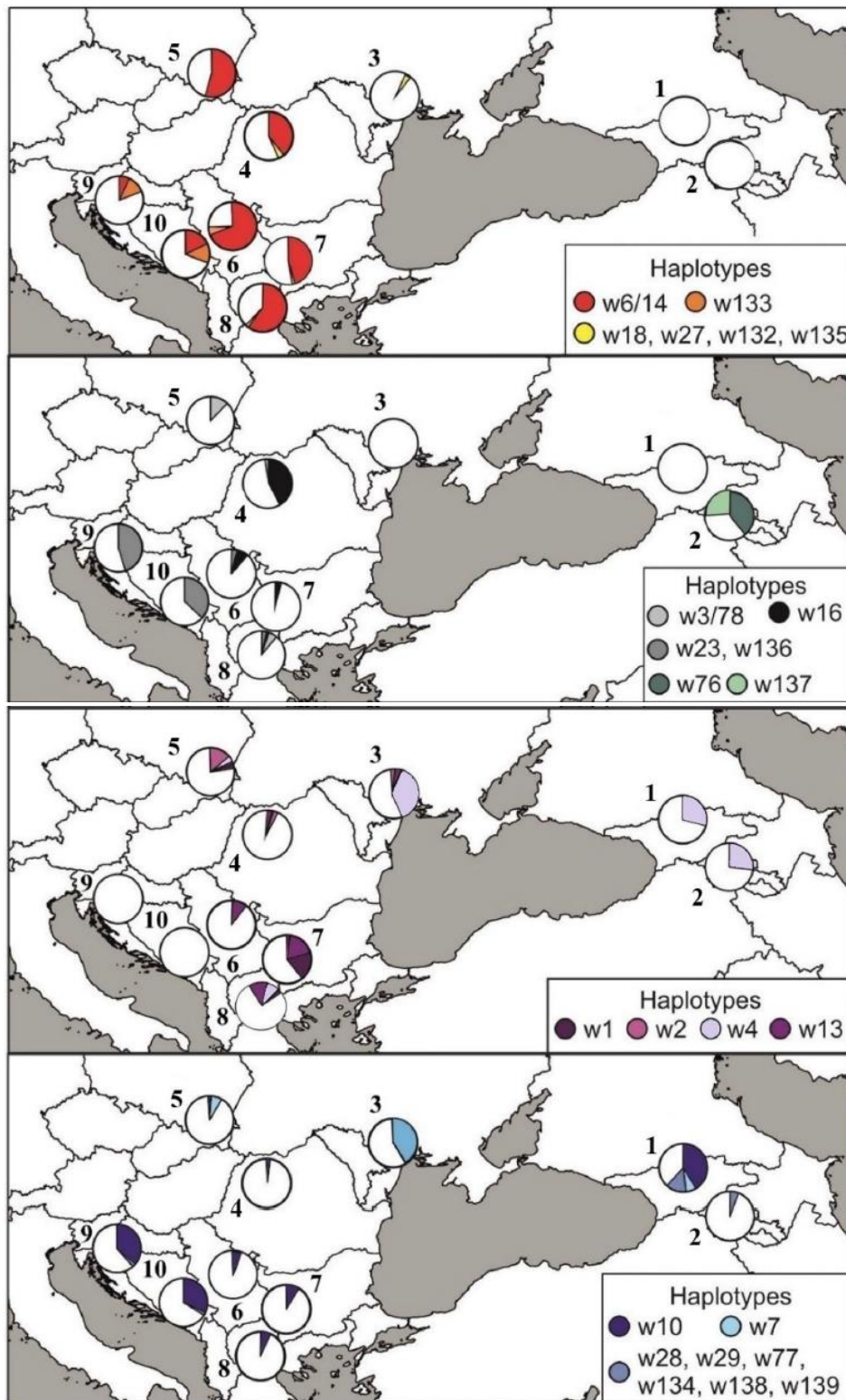
**Fig. 3.** Réseau montrant les relations phylogénétiques entre les haplotypes de la région de contrôle de l'ADNmt du loup, y compris le nombre d'étapes de mutation. La taille des cercles correspond au nombre de séquences par haplotype, tandis que la similarité des couleurs correspond aux haplogroupes définis H1A, H1B, H1C et H2. La ligne en pointillé indique la limite entre les deux haplogroupes principaux (H1 et H2)

### Les loups du Caucase : différenciation génétique entre l'Arménie et la Géorgie

Les loups du Caucase ont montré la plus grande diversité d'haplotypes (B et H<sub>d</sub>). Bien que certains haplotypes se chevauchent entre le Caucase et les autres régions (c'est-à-dire w<sub>4</sub>, w<sub>10</sub>), les haplotypes nouvellement détectés et ceux trouvés précédemment uniquement dans le Caucase (Pilot et al. 2014), indiquent la présence de variantes distinctes dans cette région. La distribution spatiale des haplotypes H1 et H2 a montré une division génétique modérée, tandis que GENELAND a révélé une différenciation prononcée au sein des loups du Caucase, entre la Géorgie et l'Arménie. Nos résultats contrastent avec ceux de Pilot et al. (2014) qui n'ont trouvé aucune preuve de différenciation au sein du Caucase, mais nos sites d'échantillonnage étaient légèrement différents ; les deux études ont inclus des loups de Géorgie, alors que dans le Caucase du Sud, Pilot et al. (2014) ont inclus du matériel du Nagorno-Karabakh, et nous avons analysé des échantillons d'Arménie. Cependant, ils sont en accord avec les résultats de Kopalani et al. (2014) et Shakarashvili et al. (2020) qui ont mentionné l'immigration de l'est vers l'ouest, et la possibilité que les loups du Caucase, y compris l'Arménie, soient connectés à des populations plus à l'est.

Les conditions contrastées du nord et du sud du Caucase pourraient affecter le gradient nord-sud en orientant les mouvements des loups Caucasiens dans des directions opposées, ceux de Géorgie vers le nord et les loups Arméniens vers le sud. En effet, le climat contrasté et les conditions environnementales dans les différentes parties du Caucase ont été considérés comme des facteurs affectant le gradient nord-sud visible dans les structures de population d'autres espèces habitant cette région, y compris le hérisson à poitrine blanche (*Erinaceus concolor*; Seddon et al. 2002), le bouquetin des Alpes et le tur du Caucase oriental (*Capra ibex caucasica*, *C. cylindricornis*; Manceau et al. 1999), la salamandre du Caucase (*Mertensiella caucasica*; Tarkhnishvili et al. 2012), le triton crête (*Triturus karelini*; Wallis et Arntzen 1989), l'ours brun (*Ursus arctos*; Murtskhvaladze et al. 2010), de nombreux oiseaux, papillons et reptiles (Harrison 1982; Higgins et Hargreaves 1983; Orth et al. 1996).





**Fig. 4.** Distribution des haplotypes de la région de contrôle de l'ADN du loup dans les sites d'étude, basée sur les relations phylogénétiques des haplotypes comme indiqué dans la Fig. 3. Les haplotypes w9 et w11 sont exclus en raison de leur position incertaine dans le réseau et de leur faible signification statistique dans l'arbre bayésien (Figure S1). Les sites d'échantillonnage sont étiquetés conformément au Tableau 1

Les loups Arméniens étaient distincts de ceux de Géorgie, et de tous les autres loups Européens. Le sous-groupe H1C, trouvé uniquement chez les loups Arméniens, a été observé également au Nagorno-Karabakh (Pilot et al. 2014) et en Turquie (İbiş et al. 2016). On peut supposer que les haplotypes H1C se sont étendus vers le sud et l'est, et que leur aire de répartition devrait être étudiée plus avant. En Europe, l'haplogroupe H2, autrefois

dominant, a été largement remplacé par l'haplogroupe H1 au cours de l'Holocène (Ciucani et al. 2019). Pendant le dernier maximum glaciaire (LGM), le Caucase était mieux relié à l'Europe du Sud, l'Anatolie servant de pont terrestre (Tzedakis et al. 1997 ; Aksu et al. 1999). Après le LGM, la connexion entre le Caucase et l'Europe du Sud-Est était plus ténue en raison des changements de paysage induits par le niveau de la mer postglaciaire (Hewitt 2000). En supposant que l'haplogroupe H1C s'est développé au cours des derniers milliers d'années parallèlement à l'expansion de l'haplogroupe H1 en Europe (Pilot et al. 2010 ; Ciucani et al. 2019) et en Amérique du Nord (Leonard et al. 2007), la différenciation observée chez les loups d'Arménie pourrait être le résultat d'un flux génétique limité entre l'Europe du Sud et l'Anatolie.

Des études sur les hérissons du Caucase ont suggéré que la bande étroite le long de la côte sud de la mer Noire (dans le nord de la Turquie), et l'extension régionale vers le sud-ouest du Caucase, représentaient un refuge pour la population méridionale de cette espèce (Seddon et al. 2002). On a également émis l'hypothèse d'une situation similaire pour la présence de différentes espèces de *Quercus* révélée par les enregistrements polliniques (Huntley 1990, 1992), ce qui renforce l'idée que le nord de la Turquie était un refuge pour les lignées méridionales du Caucase pendant le LGM.

### **Le groupe des Carpates et des Balkans**

Les Carpates et les Balkans ont montré une diversité haplotypique légèrement plus faible que les autres régions étudiées. Ceci est probablement dû aux persécutions humaines intenses et constantes que les deux populations ont subies (Hindrikson et al. 2016 ; Hulva et al. 2018), ainsi qu'à la fragmentation substantielle de l'habitat des loups dans les Carpates au cours du siècle dernier (par exemple, Babai et Molnár 2014 ; Butsic et al. 2017). La taille de la population et l'aire de distribution des populations de loups des Carpates et des Balkans ont ensuite diminué (p. ex. Hell et al. 2001 ; Djan et al. 2014), mais leur existence n'a pas été sérieusement compromise. Par conséquent, ces populations ont préservé une quantité considérable de diversité génétique historique et ont été plus diversifiées génétiquement que d'autres populations Européennes (p. ex. Pilot et al. 2010 ; Hindrikson et al. 2016). Cela concerne en particulier les populations qui ont subi une forte pression humaine dans le passé, y compris les loups de plaine (par exemple, la population d'Europe centrale, Andersen et al. 2015 ; Reinhardt et al. 2015 ; la population Balte ; Jędrzejewski et al. 2005) et les populations de loups isolées (par exemple, la population Italienne, Lucchini et al. 2004 ; Fabbri et al. 2007 ; la population Ibérique, Vilà et al. 1999). Les populations des Carpates et des Balkans se sont donc révélées être d'importants réservoirs de variabilité génétique historique pour les populations voisines, facilitant leur rétablissement (par exemple, Gula et al. 2009 ; Ražen et al. 2016).

La persistance à long terme des loups dans les Carpates et les Balkans a également été démontrée par la fréquence la plus élevée de l'haplogroupe H2 dans les deux régions. Cet haplogroupe est considéré comme le plus ancien haplogroupe de loups en Europe (Pilot et al. 2010) et sa prévalence dans les Carpates et les Balkans n'est pas surprenante, étant donné le rôle de ces régions en tant que refuges lors de divers événements environnementaux, géologiques et anthropogéniques au cours de l'histoire (Hewitt 2000 ; Schmitt 2009). L'absence ou la présence occasionnelle de cet haplogroupe ailleurs (Pilot et al. 2010) peut suggérer que les populations de loups des Carpates et des Balkans sont parmi les plus

persistantes d'Europe. L'haplogroupe H1, subdivisé en sous-groupes H1A et H1B, était moins répandu dans ces régions et montrait un gradient nord-sud, en accord avec les résultats des marqueurs de polymorphisme nucléotidique simple (Stronen et al. 2013).

Les Carpates et les Balkans ont montré une sous-structure régionale dans la direction ouest-est. Dans les Carpates, nous avons observé une diversité d'haplotypes considérablement plus élevée chez les loups des Carpates occidentales (Pologne, Slovaquie) que dans les Carpates orientales (Roumanie, Ukraine). La distribution des haplotypes suggère une plus grande similarité génétique entre les loups des Carpates occidentales et ceux des plaines Européennes (par exemple, la population des plaines d'Europe centrale et les loups de la steppe Ukrainienne) qu'avec les loups des Carpates orientales. On s'y attendait, étant donné que les études précédentes sur les loups des Carpates occidentales indiquaient une (re)connexion graduelle avec les populations de plaine voisines (Hulva et al. 2018 ; Szewczyk et al. 2019 ; Fehér et al. 2022). D'autre part, des études incluant des loups des Carpates septentrionales ont indiqué leur isolement et leur différenciation par rapport aux loups du sud et du sud-est des Carpates et aux loups des plaines du nord et du nord-ouest de l'Europe (Pilot et al. 2006, 2010 ; Gula et al. 2009 ; Czarnomska et al. 2013 ; Bakan et al. 2014 ; Rigg et al. 2014). Les loups des Carpates orientales ont montré une plus grande similarité génétique avec les Balkans (plus particulièrement la Serbie) (Djan et al. 2014) et la Turquie plus à l'est (Pilot et al. 2010 ; Randi et al. 2000 ; Montana et al. 2017) suggérant un flux génétique entre les Carpates et les Balkans. Bien que des études antérieures sur les loups aient indiqué une forte différenciation entre les Carpates et les Balkans (par exemple, Stronen et al. 2013 ; Bakan et al. 2014), des études de génétique des populations d'autres espèces très mobiles, telles que le chacal doré (Rutkowski et al. 2015 ; Pyšková et al. 2016 ; Kowalczyk et al. 2020) et le lynx des Carpates (par exemple, Paunović et al. 2001), fournissent des preuves d'un flux génétique continu entre ces régions. Cependant, il est important de noter que le groupe Carpates-Balkans observé dans notre étude doit être interprété avec prudence. Des recherches récentes sur les mitogénomes entiers du bétail domestique taurin (*Bos taurus*) ont révélé une diversité génétique et des modèles historiques de flux de gènes qui n'ont pas été observés dans les analyses de la région de contrôle de l'ADNmt (Cubric-Curik et al. 2022), et les analyses des mitogénomes peuvent fournir une résolution supplémentaire de la structure régionale (Shamblin et al. 2012). L'évaluation future des mitogénomes des loups entiers et des profils de l'ensemble du génome dans cette région et au-delà pourrait donc découvrir davantage de variations et améliorer la résolution de la structure génétique spatiale.

La sous-structure des Carpates observée dans cette étude et dans les études précédentes pourrait être influencée par la division géomorphologique en trois sections principales : les Carpates occidentales, orientales et méridionales (Mráz et Ronikier 2016). Cette division a largement coïncidé avec notre étude et pourrait avoir affecté nos résultats et les résultats d'autres études incluant des taxons différents (par exemple, *Hypochaeris uniflora* ; Mráz et al. 2007), le sanglier (*Sus scrofa* ; Mihalik et al. 2020), le lynx d'Eurasie (*Lynx lynx* ; Krojerová-Prokešová et al. 2019), et le sorbier d'Europe (*Sorbus aucuparia* ; Yousefzadeh et al. 2021)).

Bien que principalement situé dans le cluster Carpates-Balkans (C2), une étude plus approfondie (analyses hiérarchiques) de la structure de la population a montré que les loups de la steppe Ukrainienne de plaine forment un groupe génétique distinct (C2A). Cette

division est en accord avec les résultats d'études antérieures (e.g., Pilot et al. 2006 ; Czarnomska et al. 2013 ; Stronenet al. 2013 ; Szweczyk et al. 2019). Nos données indiquent également qu'il y a eu quelques connexions génétiques à travers la steppe Ukrainienne entre les loups des régions des Carpates et du Caucase sur la base de la distribution des haplotypes de l'ADNmt (w4, w7). **Nous concluons que cette région a joué un rôle important dans le flux génétique des loups et qu'elle agit comme un carrefour entre l'Eurasie occidentale et orientale.**

### **Le groupe Dinarique**

Les loups Dinariques forment un groupe distinct au sein de la population Dinarique-Balkanique, considérée comme l'une des plus grandes populations de loups en Europe (Hindrikson et al. 2016). A l'échelle Européenne, les loups de la région Dinaric-Balkan sont généralement considérés comme une seule population (par exemple, Kaczensky et al. 2013 ; Chapron et al. 2014), bien que des analyses récentes de l'ADNmt et des marqueurs microsatellites montrent également une sous-structure régionale entre les loups de l'est (Balkans) et de l'ouest (Dinaric) (Djan et al. 2014 ; Šnjegota 2019 ; Šnjegota et al. 2021, cette étude). Les loups Dinariques ont montré des valeurs *Hd* et *B* nettement plus élevées que les loups des Balkans, ainsi qu'un nombre d'haplotypes nettement plus faible. **Ces résultats pourraient indiquer l'augmentation du nombre de loups Dinariques après un fort goulot d'étranglement à la fin des années 1980** (Boitani 2000 ; Kusak et al. 2000). La différenciation observée pourrait également avoir été influencée par divers autres facteurs, y compris des adaptations locales (par exemple, Pilot et al. 2006 ; Czarnomska et al. 2013 ; Kusak et al. 2018 ; Werhahn et al. 2018). Cette sous-structure nécessite des recherches plus approfondies à l'aide de marqueurs moléculaires à plus haute résolution, tels que les SNP, et de données spatiales sur le paysage et les caractéristiques environnementales.

### **Importance des régions étudiées pour le maintien de la diversité génétique des loups**

Les régions étudiées ont été continuellement habitées par des loups, ce qui leur a permis de maintenir une diversité génétique considérable. **Les Carpates et les Balkans sont devenus des réservoirs de diversité génétique historique, avec des lignées génétiques modernes qui se chevauchent et des loups qui se dispersent vers les populations voisines** (par exemple, Hulva et al. 2018, cette étude). Les Dinariques ont servi de conduit pour le flux génétique intra-population (Šnjegota et al. 2021) et ont contribué à la recolonisation des régions voisines, y compris les Alpes Italiennes (Fabbri et al. 2014 ; Ražen et al. 2016) et probablement vers le nord dans des régions telles que l'Allemagne (Für Umwelt 2021) et l'Autriche (Montana et al. 2017). Les Alpes ont également servi de corridor principal pour la dispersion des loups de la péninsule Italienne vers la France, la Suisse, le Luxembourg et le Danemark (Fabbri et al. 2007 ; Boitani et Linnell 2015 ; Hindrikson et al. 2016 ; Schley et al. 2021). Le Caucase est apparu comme un conduit probable pour le flux génétique intercontinental, car il a été démontré qu'il était connecté à l'Asie occidentale et à l'Europe de l'Est (Pilot et al. 2014 ; cette étude).

Les régions étudiées ont également fourni un habitat approprié et des sources de population pour d'autres grands carnivores au cours de circonstances environnementales et anthropologiques variables, y compris les ours bruns (par exemple, Chapron et al. 2014 ; Diserens et al. 2020) et le lynx Eurasien (par exemple, Breitenmoser et al. 1998 ; Palmero et al. 2021), et les ongulés sauvages en général (Linnell et al. 2020).

Bien que le loup soit une espèce écologiquement flexible capable de vivre dans des zones où la présence humaine est considérable, les régions étudiées ont été vitales pour préserver des populations relativement importantes et, par conséquent, une diversité génétique importante pour cette espèce et d'autres espèces à large répartition. Ces régions transfrontalières jouent donc un rôle essentiel dans la planification à grande échelle de la conservation du potentiel évolutif des espèces sauvages dans un environnement en mutation rapide.