

Vivre en bordure : reconstitution de l'histoire génétique de la population de loups Finlandais

Jansson et al. *BMC Evolutionary Biology* 2014, **14**:64
<http://www.biomedcentral.com/1471-2148/14/64>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Living on the edge: reconstructing the genetic history of the Finnish wolf population

Eeva Jansson, Jenni Harmoinen, Minna Ruokonen[^] and Jouni Aspi^{*}

Résumé

Contexte - De nombreuses populations de carnivores d'Europe occidentale ont été presque ou complètement éradiquées au cours des ~200 dernières années, mais elles se rétablissent aujourd'hui. L'élimination des loups a commencé en Finlande au 19^{ème} siècle, et depuis plus de 150 ans, la taille de la population est restée faible. Pour étudier les modèles historiques de variation génétique, nous avons extrait l'ADN de 114 échantillons de loups collectés dans des musées zoologiques au cours des ~150 dernières années. Quinze loci microsatellites ont été utilisés pour étudier la variation génotypique dans cet échantillon historique. En outre, nous avons amplifié une séquence de 430 pb de la région de contrôle de l'ADNmt à partir des mêmes échantillons. Des échantillons de loups contemporains ($N = 298$) obtenus après le rétablissement de la population au milieu des années 1990 ont été utilisés comme référence.

Résultats - Nos analyses de l'ADNmt ont révélé une variation réduite dans la région de contrôle de l'ADNmt par la perte d'haplotypes historiques observés avant le déclin des populations de loups. L'hétérozygotie au niveau des loci microsatellites autosomiques n'a pas diminué de manière significative. Cependant, près de 20% des allèles microsatellites étaient uniques aux loups prélevés avant les années 1960. La composition génétique de la population a changé progressivement, les changements les plus importants se produisant avant 1920. La moitié des échantillons historiques les plus anciens formaient un groupe génétique distinct non détecté dans les échantillons Finlandais ou Russes d'aujourd'hui, et pourraient donc représenter une variation génétique nordique perdue dans le pool génétique actuel. Les estimations ponctuelles de N_e étaient faibles (13,2 et 20,5), ce qui suggère une fragmentation de la population. Des preuves d'un goulot d'étranglement génétique de la population ont également été détectées.

Conclusions - Nos analyses génétiques confirment des changements dans la composition génétique de la population de loups Finlandaise au fil du temps, malgré l'interconnexion géographique avec une population beaucoup plus importante en Russie. Nos résultats soulignent la nécessité de restaurer la connectivité historique entre les populations de loups actuelles afin de garantir la viabilité à long terme. Cela pourrait toutefois s'avérer difficile, car les politiques de gestion entre l'Europe de l'Ouest et l'Europe de l'Est sont souvent très différentes. En outre, la conservation des loups reste une question assez controversée, et la pression anthropogénique sur les loups reste forte.

CONTEXTE

Les influences directes et indirectes des activités humaines ont provoqué des changements radicaux dans la composition génétique de nombreuses populations sauvages. **Le déclin et la fragmentation de populations autrefois continues en populations locales isolées soulèvent plusieurs problèmes génétiques, tels que la perte de variation génétique et ses effets associés sur la taille effective des populations locales (N_e)**. L'augmentation de la consanguinité dans les petites populations peut en fin de compte conduire à un potentiel évolutif plus faible et à un risque d'extinction plus élevé [1,2]. Les populations d'espèces très mobiles devraient être moins sujettes aux effets génétiques négatifs car les individus peuvent se disperser et échanger des gènes à travers de vastes zones géographiques. Les loups sont connus pour leur grande capacité d'adaptation [3] et leur grande capacité de dispersion (plus de mille kilomètres, par exemple [4,5]). Par conséquent, on peut s'attendre à des flux de gènes et à des similitudes génétiques entre des populations de loups adjacentes, et les grandes populations voisines peuvent servir de tampon contre la perte de variation dans les populations plus petites [6].

Le loup gris (*Canis lupus*) est l'un des animaux les plus controversés et a fait l'objet d'intenses campagnes d'éradication en Europe occidentale [7] et en Amérique du Nord [8] depuis le XVIII^{ème} siècle. À la fin du XIX^{ème} siècle, la plupart des populations de loups d'Europe occidentale avaient disparu [9], ou du moins avaient été repoussées dans des parcelles d'habitat isolées et fragmentées [7,10]. Après la seconde guerre mondiale, les modifications des pratiques forestières ont également eu des effets importants sur la taille des populations de loups en raison de leur impact sur l'abondance de l'espèce proie la plus importante des loups, l'élan [13,14]. **Les études génétiques révèlent une fragmentation récente de la population de loups d'Europe de l'Est, qui se traduit par des populations effectives relativement petites (locales)** [10], une différenciation génétique importante et de faibles taux de migration entre les régions [13,15]. Les effets historiques de la **fragmentation** sur la réduction de la taille des populations et la perte de variation génétique sont actuellement inconnus.

Il a été estimé que, rien qu'en Finlande, 23 000 loups ont été tués au cours des 150 dernières années ([16] ; Figure 1). Avant que la persécution active ne commence vers les années 1850, le loup était réparti sur l'ensemble du territoire Finlandais. En raison d'une chasse intensive, les loups ont rapidement disparu des parties occidentales et centrales du pays [12,16]. Située en marge d'une grande population de loups Russes (actuellement ~40 000 loups ; [10]), la population Finlandaise n'a vraisemblablement pas disparu complètement, mais a connu plusieurs **goulots d'étranglement** consécutifs. Par exemple, dans les années 1920 et 1970, la population de loups ne comptait que quelques individus [12,16,17]. Il a été suggéré que l'ensemble de la population avait disparu dans les années 1920 en raison d'une épidémie d'herpès labial [18]. En 1973, le loup a été protégé en Finlande en dehors de la zone de gestion du renne du nord. Jusqu'aux années 1990, la taille de la population était principalement régulée par l'importance de l'immigration en provenance de la population source du nord-ouest de la Russie [13,19]. Cependant, lorsque les loups ont commencé à se reproduire régulièrement en Finlande après le milieu des années 1990, la population Finlandaise s'est quelque peu différenciée génétiquement de la population Russe [13,20], et

les chiffres de la population Finlandaise n'ont plus reflété les variations d'abondance de la population Russe [19].

L'utilisation de collections de musées dans les études de génétique des populations peut fournir une perspective historique précieuse pour la conservation et la gestion des populations actuelles. Les spécimens des collections de musées fournissent souvent des informations sur la diversité génétique avant le déclin des populations en réponse aux effets anthropogéniques [21], et constituent donc une base de référence pour l'évaluation du statut génétique actuel de l'espèce. Les échantillons historiques ont été utilisés avec succès dans de nombreuses études génétiques depuis le début des années 1990 (pour des revues, voir [22-24]), généralement pour étudier les conséquences génétiques de différents facteurs anthropiques, tels que la surexploitation [25-27], la fragmentation de l'habitat [28-30] ou même la persécution directe [6], sur la diversité et la structure génétiques des populations.

Dans la présente étude, nous avons utilisé de l'ADN extrait d'échantillons de loups provenant de musées zoologiques pour examiner les modèles historiques de variabilité et de structure génétiques dans la population de loups Finlandaise, qui a connu un déclin spectaculaire sur une période d'environ 150 ans. Nous nous sommes également intéressés à l'effet stabilisateur possible du flux génétique provenant de la grande population orientale voisine, c'est-à-dire que le flux génétique provenant de la population Russe aurait-il pu être suffisamment important pour prévenir les conséquences négatives (par exemple la perte de variation génétique et petite N_e) associées au déclin de la population.

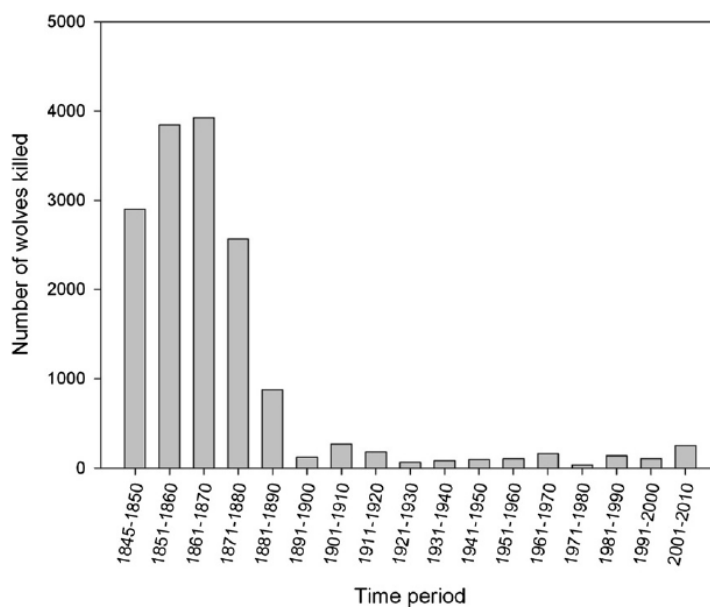


Figure 1. Nombre d'abattages de loups enregistrés en Finlande entre 1845 et 2010 (tiré de [16], les données pour 1991-2010 ayant été obtenues auprès de l'Institut Finlandais du jeu et de la pêche). Notez que la période de temps dans la première barre (1845-1850) est plus courte que dans les périodes suivantes

RESULTATS

Extraction et amplification de l'ADN

Un total de 114 échantillons (Figure 2 ; Fichier supplémentaire 1 : Tableau S1) a été extrait et 89 (78,1%) ont été amplifiés avec succès à l'aide d'amorces mitochondriales et 66 (57,9%) avec au moins 8 des 15 loci microsatellites. Le succès de l'amplification a varié entre les groupes temporels et les types d'échantillons (Fichier supplémentaire 2 : Tableau S2). En

accord avec les études précédentes, le taux de réussite était plus élevé pour l'ADNmt que pour les microsatellites, les échantillons d'os amplifiaient en moyenne mieux que les échantillons de peaux [31], et les échantillons de tissus provenant de cavités dentaires étaient une très bonne source d'ADN utilisable [6].

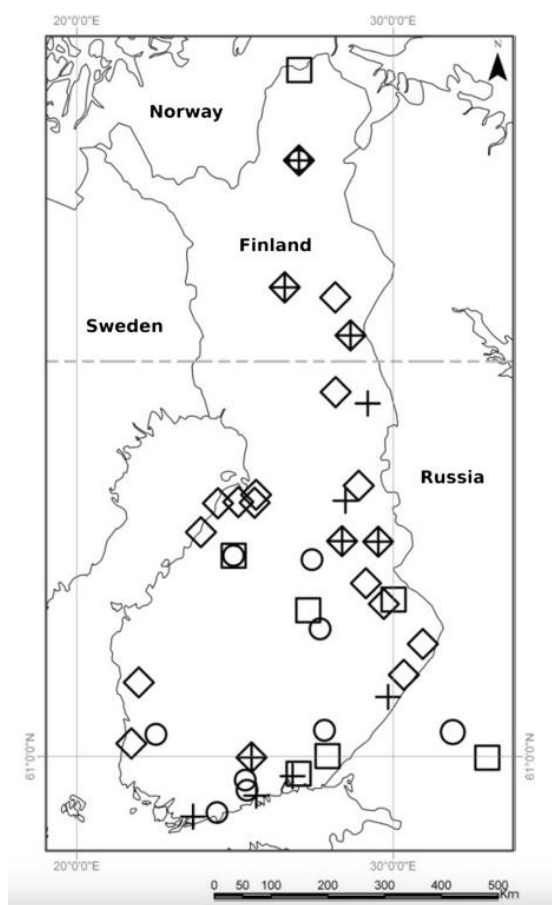


Figure 2. Localisation géographique des échantillons utilisés. Les échantillons prélevés avant 1920 sont représentés par des cercles, ceux de 1920 à 1959 par des carrés, ceux de 1960 à 1979 par des losanges et ceux de 1980 à 1993 par des croix. Deux échantillons situés en dehors de la Finlande se trouvaient à l'intérieur des frontières du pays à la date de l'échantillonnage

Nous n'avons pas observé de corrélation significative entre la longueur de l'amplicon microsatellite (mesurée par la taille maximale de l'allèle) et les taux d'erreur (le nombre d'abandons et de faux allèles ; Figure 3). En revanche, le succès de l'amplification a été fortement réduit sur les loci avec des tailles d'allèles longues (~170 bp ou plus ; « taux de données manquantes » dans la Figure 3). L'analyse MICROCHECKER [32] n'a pas révélé d'erreurs de notation dues au bégaiement ou à des pertes alléliques importantes dans aucun des groupes temporels. Des allèles nuls étaient peut-être présents au locus CPH12 dans les populations échantillonnées en 1980-1993, avec 13 homozygotes observés par rapport aux 10,6 attendus. Étant donné que des allèles nuls à ce locus n'ont pas été détectés dans les autres groupes temporels, ce locus a été inclus dans les analyses ultérieures.

Dix échantillons ont été éliminés de l'ensemble des données avant les analyses génétiques. Sur ces dix échantillons, huit ont été écartés en raison de leur étroite parenté (c'est-à-dire que les pseudo-répliques ont été supprimées ; [33]) indiquée par leurs génotypes. Deux échantillons avaient des génotypes et des informations de collecte identiques, et l'un d'entre eux a été écarté. En outre, une séquence mitochondriale n'a pas été incluse dans la suite de

l'analyse en raison d'un double pic amplifié de manière répétée dans deux positions nucléotidiques, peut-être dû à une désamination C→T post-mortem [34,35]. Dans le premier groupe temporel (échantillons collectés avant 1920), 18 séquences d'ADNmt et 12 génotypes de microsatellites ont été analysés, dans le deuxième (1920 - 1959) 6 des deux types, dans le troisième (1960 -1979) 29 et 22, et dans le quatrième (1980 - 1993) 28 et 18.

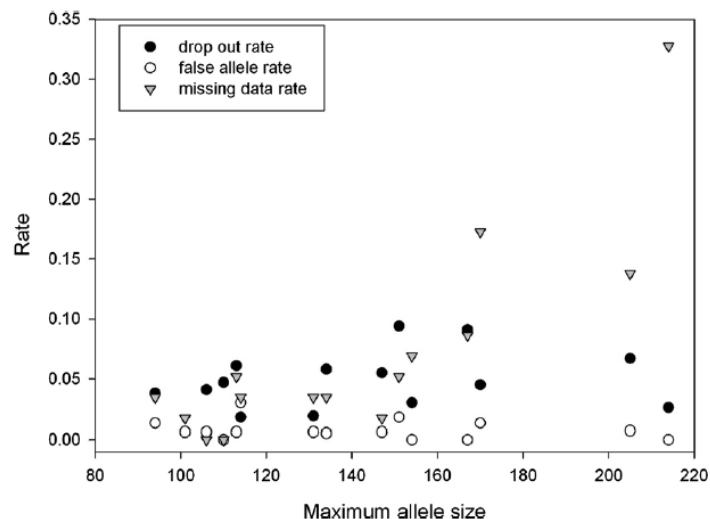


Figure 3. Succès d'amplification et taux d'erreurs détectées comparés à la taille maximale des allèles dans les 15 loci microsatellites utilisés. La longueur de l'amplicon a eu un effet significatif sur le succès de l'amplification (corrélation entre le taux de données manquantes et la taille maximale de l'allèle dans le locus : $r = 0,828$, $P < 0,001$), mais pas sur les taux d'erreurs détectées ($P > 0,05$)

Analyses de la séquence mitochondriale

Variation de l'ADNmt et différenciation génétique entre les groupes temporels

Un total de 23 positions nucléotidiques ont été trouvées polymorphes dans les séquences d'ADNmt amplifiées de 431 pb, produisant huit haplotypes distincts (Figure 4). Les trois haplotypes les plus communs (OW63, OW40 et OW104) chez les loups historiques étaient ceux présents également dans la population actuelle de loups [36]. Ces haplotypes étaient présents chez 43, 26 et 6 loups historiques (respectivement). Les cinq haplotypes restants étaient rares et n'ont été trouvés que dans un (OW17, OW36, OW37 et OW102) ou deux (OW35) échantillons.

La diversité mitochondriale mesurée par le nombre d'haplotypes et le nombre de sites polymorphes était la plus élevée (Tableau 1) au début de la période d'échantillonnage (jusqu'en 1959) malgré des tailles d'échantillons plus faibles. D'autres estimations de la diversité des haplotypes ont suivi le même schéma et étaient clairement ou légèrement plus élevées dans les échantillons collectés avant 1960 (voir le Tableau 1 pour plus de détails). La différenciation génétique basée sur les fréquences des haplotypes (Φ_{ST}) était importante (0,329-0,514) et hautement significative ($P < 0,001$) entre le premier (avant 1920) et tous les autres groupes temporels (Tableau 2), mais pas dans d'autres comparaisons par paire. Trois haplotypes principaux (OW40, OW63 et OW104 ; Figure 4) ont été trouvés dans tous les groupes, à l'exception du deuxième groupe (1920-1959, $N = 6$), dans lequel quatre individus portaient l'haplotype OW63 et deux autres avaient des haplotypes uniques (OW17 et OW36). La grande différence entre le premier et les autres groupes est principalement due au changement entre les deux haplotypes dominants ; dans le premier groupe, 12 des 18 individus (66,6%) avaient l'haplotype OW40 et seulement un OW63 (5,6%), alors que chez

les loups collectés après 1960, les abondances étaient inversées. En 1960-1979, dix individus sur 29 (34,5%) avaient l'haplotype OW40 et 17 (56,6%) OW63, et en 1980-1993 les proportions (respectivement) étaient de 4/28 (14,3%) et 21/28 (75,0%).

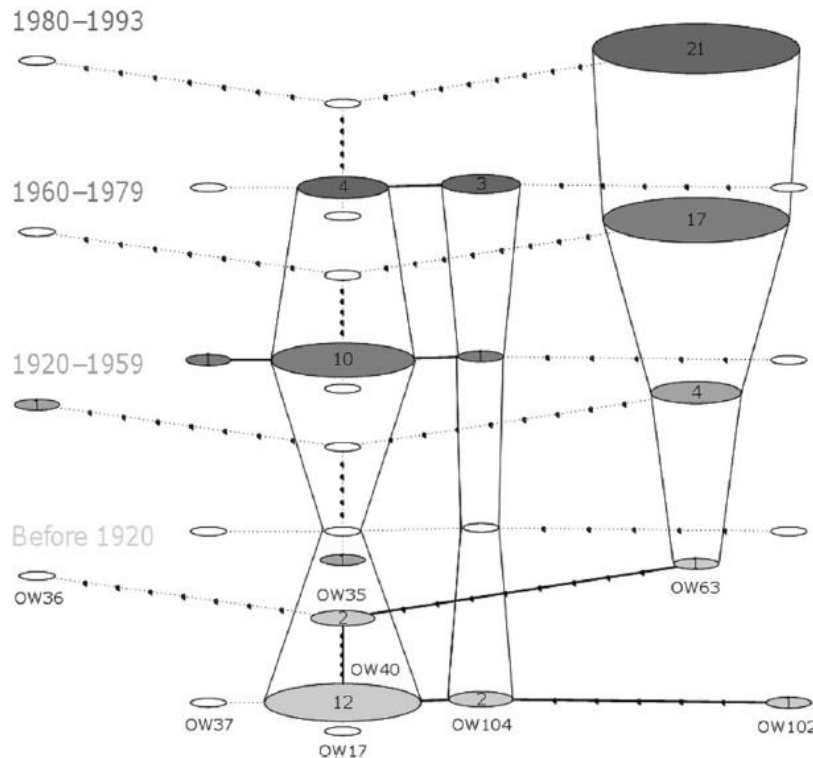


Figure 4. Réseau temporel d'haplotypes pour les loups finlandais historiques. Chaque cercle représente un haplotype différent dont les noms sont indiqués à côté des cercles dans la couche inférieure. Le nombre d'individus porteurs de chaque haplotype est indiqué à l'intérieur des cercles. Les cercles blancs indiquent les haplotypes manquants pour cette période. Le nombre de points +1 reliant les haplotypes correspond aux différences de nucléotides. La divergence évolutive maximale (c'est-à-dire les substitutions de bases par site) était de 0,055 (OW36-OW102) et la minimale de 0,003 (OW40-OW17/OW37/OW104)

Tests de goulot d'étranglement de la population d'ADNmt

Les tests de neutralité suggèrent des changements démographiques significatifs dans la population de loups à la fin de la période d'échantillonnage historique (Tableau 1). Les deux tests de neutralité étaient significatifs dans les groupes temporels collectés en 1960-1979 (pour le D de Tajima, $P = 0,0013$ et pour le F_S de Fu, $P = 0,011$), alors que pour le groupe collecté en 1980-1993, la valeur du test de Fu F_S était significative ($P = 0,006$), mais le D de Tajima montrait une tendance à la baisse ($P = 0,059$).

Tableau 1. Diversité mitochondriale et tests de neutralité pour les groupes temporels de loups Finlandais

Temporal sample	N	H	H_R	P_R	H_d	π	S	D (P)	F_S (P)
Before 1920	18	5	2.80	1.13	0.556 ± 0.130	0.0070	15	-1.17 (0.89)	1.71 (0.18)
1920-1959	6	3	3.00	2.00	0.600 ± 0.215	0.0132	14	-0.47 (0.61)	3.27 (0.06)
1960-1979	29	4	2.35	0.25	0.554 ± 0.064	0.0108	11	2.15 (< 0.01**)	6.62 (0.01*)
1980-1993	28	3	2.17	0.18	0.421 ± 0.103	0.0086	10	1.41 (0.06)	7.02 (0.01*)

N sample size, H number of haplotypes, H_R haplotype richness, P_R private haplotype richness, H_d haplotype diversity, π nucleotide diversity, S number of polymorphic sites, D Tajima's D and F_S Fu's F_S with corresponding P value; * < 0.05, ** < 0.01.

Phylogénie de l'ADNmt à l'échelle Européenne

L'ensemble des données, y compris nos 81 échantillons historiques, comprenait 497 séquences avec une longueur de séquence de l'ADNmt de 287 pb. Au total, 21 haplotypes

différents ont été détectés parmi les loups Européens (Figure 5 ; la phylogénie basée sur les séquences de 390 pb figure dans le fichier supplémentaire 3 : Figure S1).

Deux haplotypes historiques de loups que l'on trouve également dans la population Finlandaise contemporaine (OW40 et OW104 ; Figure 4) ont été fusionnés en un seul lorsque les séquences ont été tronquées. Il est intéressant de noter que les haplotypes de loups Finlandais encore existants (OW63 et OW40/104 ; Figure 4) ont été trouvés principalement dans les pays voisins (Russie et Estonie), alors que les haplotypes historiques qui ont disparu de la population Finlandaise moderne semblent avoir une distribution géographique beaucoup plus large (Figure 5).

Tableau 2. Différenciation génétique entre les groupes temporels de loups Finlandais

	Before 1920	1920-1959	1960-1979	1980-1993	1995-2009
Before 1920	–	0.487***	0.329***	0.514***	NA
1920-1959	0.052*	–	–0.014 NS	–0.050 NS	NA
1960-1979	0.096***	0.038*	–	0.023 NS	NA
1980-1993	0.066***	0.061***	0.033***	–	NA
1995-2009	0.089***	0.041***	0.024***	0.022***	–

In upper right corner Φ_{ST} values for mtDNA, in lower left corner F_{ST} - values for microsatellite markers.
P - values: ***< 0.001, *< 0.05, NS not significant, NA, data not available.

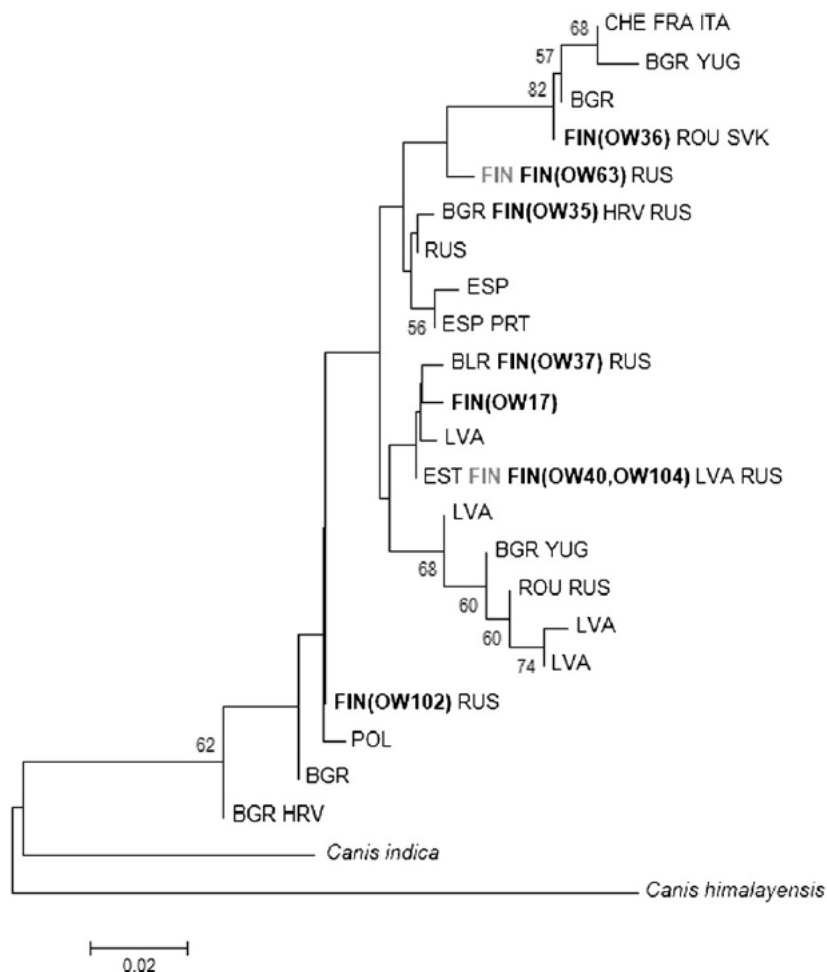


Figure 5. Arbre des haplotypes de l'ADNmt du loup à l'échelle européenne ($N_{\text{séquences}} = 497$; 287 pb, NJ) avec les haplotypes trouvés dans la population historique de loups Finlandais FIN (en noir) et ceux qui existent encore aujourd'hui FIN (en gris). Les noms des séquences renvoient à la terre ou à la zone géographique qui leur est attribuée. Les valeurs de Bootstrap supérieures à 50 sont indiquées

Analyses des microsatellites

Équilibre HW et déséquilibre de liaison entre les loci

Les groupes temporels les plus anciens (avant 1920) et les plus récents (1980-1993) se sont écartés de manière significative de l'équilibre HW, plusieurs loci présentant un déficit d'hétérozygotie (tests multilocus globaux $P = 0,016$ et $0,002$, respectivement), alors que les groupes temporels historiques 1920-1959, 1960-1979 et l'échantillon de référence moderne (1995-2009) étaient en équilibre HW. Aucun des 15 loci ne présentait un schéma de déviation constant (indiquant par exemple des erreurs d'amplification). Un déséquilibre de liaison significatif ($P < 0,001$) entre les loci a été détecté dans 7 des 105 comparaisons par paire dans les échantillons collectés avant 1920, 2/105 en 1920-1959, 2/105 en 1960-1979, 3/105 en 1980-1993 et 1/105 en 1995-2009.

Quantité de variation génétique et coefficient de consanguinité

Nous n'avons pas trouvé de différences significatives dans la quantité d'hétérozygotie attendue ou observée parmi les groupes temporels, et il n'y avait pas de preuve de consanguinité (Tableau 3 ; voir Fichier additionnel 4 : Tableau S3 pour les résultats spécifiques aux locus et pour les résultats de F_{IS}). Les estimations de la richesse allélique étaient également assez similaires tout au long de la période d'étude, tandis que la richesse allélique privée était clairement plus élevée dans les échantillons collectés avant 1960 (0,59 et 0,45 contre 0,22-0,27 ; Tableau 3). Lorsque nous avons comparé les indices de diversité (H_o , H_e et A_R) des échantillons collectés avant et après 1960 en utilisant le test de randomisation, aucune différence notable n'a été trouvée entre les deux groupes, à l'exception d'une richesse allélique légèrement plus élevée (mais non significative ; $P = 0,092$) dans le groupe le plus ancien (3,947 contre 3,655).

Tableau 3. Diversité des microsatellites et estimations ponctuelles de N_e pour les groupes temporels de loups Finlandais

Temporal sample	N	H_e (σ)	H_o (σ)	A	A_R	P_R	LD- N_e (95% CIs)	N_e by ONE-SAMP (95% CIs)
Before 1920	12	0.669 (0.131)	0.624 (0.148)	5.00	3.72	0.59	20.5 (13.5 - 35.2)	13.2 (10.8 - 19.6)
1920 - 1959	6	0.721 (0.061)	0.741 (0.238)	4.73	4.18	0.45	NA	NA
1960 - 1979	22	0.686 (0.088)	0.729 (0.113)	5.47	3.60	0.22	76.4 (48.1 - 159.0)	24.3 (20.9 - 32.7)
1980 - 1993	18	0.676 (0.139)	0.622 (0.178)	5.53	3.70	0.27	45.2 (30.4 - 78.4)	23.1 (18.5 - 36.3)
1995 - 2009	30	0.697 (0.067)	0.712 (0.095)	5.93	3.67	0.23	99.2 (65.1 - 176.0)	37.2 (31.2 - 58.3)

N sample size, H_e expected heterozygosity (standard deviation), H_o observed heterozygosity, A number of alleles, A_R allelic richness, P_R private allelic richness, LD- N_e effective population size estimate based on linkage disequilibrium, NA not analysed due to small sample size.

Allèles fantômes

Cent sept allèles ont été trouvés dans tous les échantillons avec les 15 loci microsatellites utilisés (Fichier additionnel 5 : Figure S2). Vingt-et-un allèles (19,6%) présents chez les loups historiques n'ont pas été trouvés dans l'échantillon de référence moderne beaucoup plus important (1995-2009, $N = 298$), alors que seulement quatre (3,7%) allèles étaient uniques à la population de loups actuelle. Sur ces 21 allèles historiques, neuf (42,9%) ont été trouvés uniquement dans les échantillons antérieurs à 1960 ($N = 18$) et quatre (19,0%) dans les échantillons collectés entre 1960 et 1993 ($N = 40$). Comme l'échantillonnage de la population actuelle de loups est assez complet (en moyenne 42% des loups nés à cette époque ; [20]), il est légitime de supposer que ces allèles ont disparu de la population moderne de loups Finlandais, qu'ils représentent de véritables « allèles fantômes » et qu'ils suggèrent une population historique plus diversifiée. Outre l'occurrence élevée d'allèles uniques aux

échantillons du musée, nous avons détecté d'importants changements de fréquence dans de nombreux allèles (Fichier supplémentaire 5 : Figure S2), ce qui indique une dérive génétique.

Différenciation génétique

La composition génétique de la population de loups Finlandaise a clairement changé au fil du temps. La différenciation génétique entre les groupes temporels était faible ou modérée ($F_{ST} = 0,022-0,096$; Tableau 2), mais statistiquement significative dans tous les cas. Les distances génétiques par paire (F_{ST}) entre les groupes temporels étaient significativement corrélées avec le temps écoulé (c'est-à-dire les différences dans l'année médiane d'échantillonnage des groupes ; test de Mantel : $r = 0,838$, $P = 0,048$; Figure 6). La relation entre les distances génétiques et temporelles était linéaire, ce qui suggère que le changement dans le patrimoine génétique de la population peut être décrit comme un changement graduel. Selon l'AMOVA, $\sim 5,2\%$ de la variation génétique totale a été détectée entre les groupes temporels et $\sim 94,8\%$ à l'intérieur des groupes ($P \approx 0$).

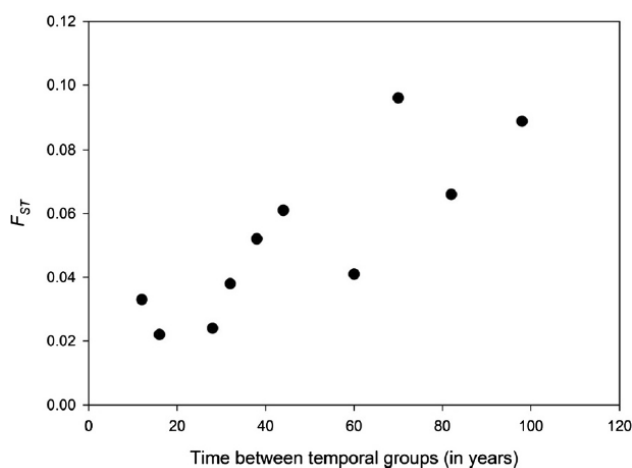


Figure 6. Le degré de différenciation génétique (F_{ST}) entre les paires d'échantillons temporels sur la base des marqueurs microsatellites. Pour chaque groupe temporel, l'année médiane a été calculée et utilisée comme point temporel pour l'ensemble de l'échantillon. Test de Mantel pour la corrélation des matrices : $r = 0,838$, $Z_{\text{data}} = 30,61$, $Z_{\text{(moyenne de 9999 permutations)}} = 25,04$, $p = 0,048$

Le graphique FCA bidimensionnel de la distribution de la variation génétique entre les loups (Figure 7) suggère également un changement progressif dans la population. La plus grande distance a été observée entre les loups les plus anciens (avant 1920) et les loups actuels (1995-2009). Les moyennes et les variances observées des modèles de distribution diffèrent significativement entre les groupes temporels le long des deux axes FCA, ce qui indique que les loups historiques étaient génétiquement différents des loups actuels. Des écarts types beaucoup plus élevés des scores FCA parmi les échantillons les plus anciens par rapport aux échantillons actuels montrent que la distribution de la variation génétique a été beaucoup plus large au cours de l'histoire. Les tests statistiques pour les modèles de distribution sont donnés dans le Fichier additionnel 6 : texte S1.

L'analyse de l'assignation a montré un degré variable de similarité génétique entre les groupes du musée (Figure 8). Tous les individus ont été assignés avec la plus grande probabilité à leur propre groupe temporel. Il est intéressant de noter que les probabilités d'affectation des échantillons à d'autres groupes temporels que le leur varient considérablement. En particulier, la proportion d'assignations au premier groupe temporel (avant 1920) était faible

(5,4% - 7,9%) parmi les individus des groupes suivants, ce qui indique des changements génétiques relativement importants entre la première période et les périodes suivantes. Les loups des autres groupes temporels avaient également des probabilités moyennes assez faibles (< 12,5%) d'appartenir au deuxième groupe temporel, ce qui suggère une composition plutôt unique de ce groupe. D'autre part, les probabilités moyennes d'affectation des loups du deuxième groupe temporel aux derniers groupes étaient assez élevées, ce qui suggère qu'au cours des périodes suivantes, il y avait encore une quantité substantielle de variation génétique qui était présente dans le deuxième groupe temporel. Les échantillons prélevés après 1959 ont montré beaucoup plus de mélange et les probabilités moyennes d'affectation des loups à des groupes autres que le premier ou le premier groupe temporel étaient de 0,29-0,47.

La différenciation génétique entre la population actuelle de loups de Carélie (1995-2010) et le plus ancien groupe temporel de loups Finlandais (avant 1920) était significative, mais plus petite ($F_{ST} = 0,047$, $P = 0,002$) que n'importe quelle estimation entre le plus ancien et les autres groupes temporels finlandais ($F_{ST} = 0,052-0,096$; Tableau 2). Cela suggère que la variation génétique historique pourrait être mieux préservée dans la grande population Russe voisine. Cependant, l'inspection de la distribution de la variation (Fichier additionnel 7 : Figure S3) a révélé un schéma très similaire à celui observé chez les loups Finlandais (Figure 7). Il y a très peu de chevauchement entre ces deux groupes et la distribution actuelle en Carélie est plus compacte que les scores de la population historique de loups Finlandais.

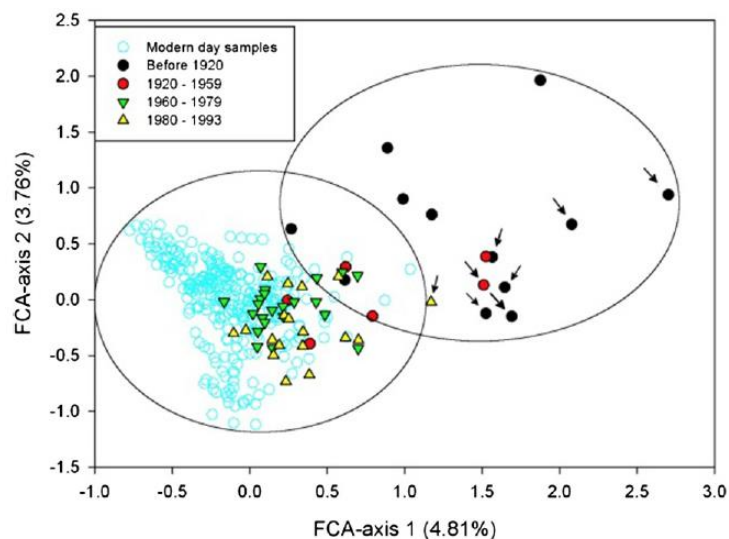


Figure 7. Graphique FCA pour les groupes temporels historiques avec les échantillons de loups prélevés après le rétablissement de la population ($N = 298$ de 1995 à 2009 ; [20]). La distribution approximative des groupes les plus anciens (collectés avant 1920) et des groupes modernes est indiquée par des ovales. Les flèches montrent les loups du nord qui forment un groupe distinct dans l'analyse de la structure

Structure cachée de la population

L'analyse de la structure a révélé une **structure cachée** de la population spatiale et temporelle au sein de la population historique de loups Finlandais. Selon la quantité ad hoc ΔK [37], le nombre le plus probable de grappes était de trois (Fichier supplémentaire 8 : Figure S4). 80,7% des individus ont été inférés dans ces groupes avec un niveau d'affectation d'au moins 0,7, et pour plus de la moitié des échantillons (55,7%), le niveau était supérieur à 0,9 (Figure 9). La contribution des trois groupes déduits à la composition génétique dans différents

groupes temporels était très concordante entre les différentes séries (données non montrées) et indiquait un changement de la structure génétique au fil du temps. En particulier, le premier groupe (avant 1920) a montré une composition très distincte par rapport aux périodes ultérieures : la moitié des échantillons (6/12) appartenait à un groupe avec très peu de mélange avec les deux autres groupes ($q > 0,9$; barres noires dans la Figure 9), et seulement deux loups ont été inféodés à ce groupe par la suite (un individu mélangé avec $q \sim 0,4$ échantillonné en 1954 et un autre avec une assignation de 0,97 de 1990). Il est intéressant de noter que tous ces loups ont été échantillonnés dans le nord de la Finlande (alors qu'aucun modèle de distribution géographique n'a été détecté pour les deux autres groupes ; données non montrées). En outre, les loups appartenant à un autre sous-groupe génétique (barres grises) étaient communs dans les échantillons à partir de 1920 et les plus communs parmi les échantillons de référence modernes (1995-2009 ; dans 21 sur 30 avec $q \geq 0,7$), mais étaient presque absents dans le premier groupe temporel.

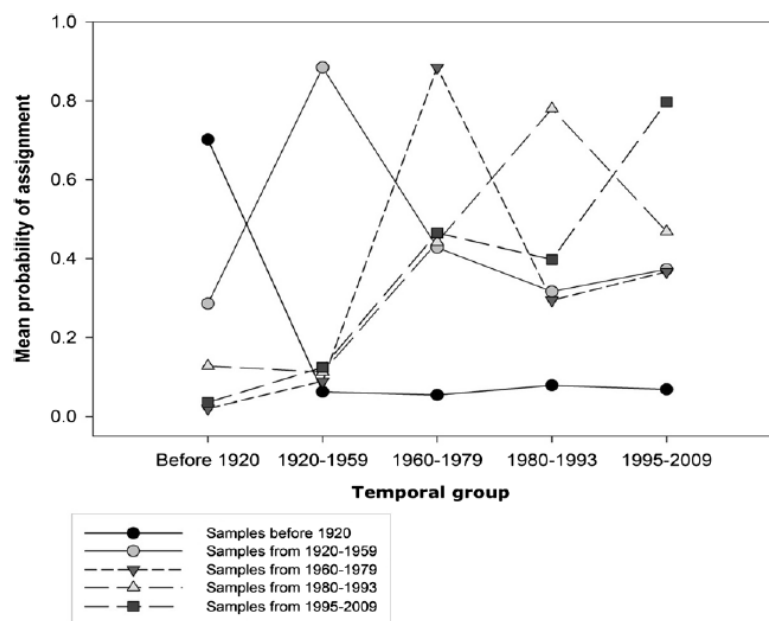


Figure 8. Probabilité d'affectation des loups Finlandais à différents groupes temporels

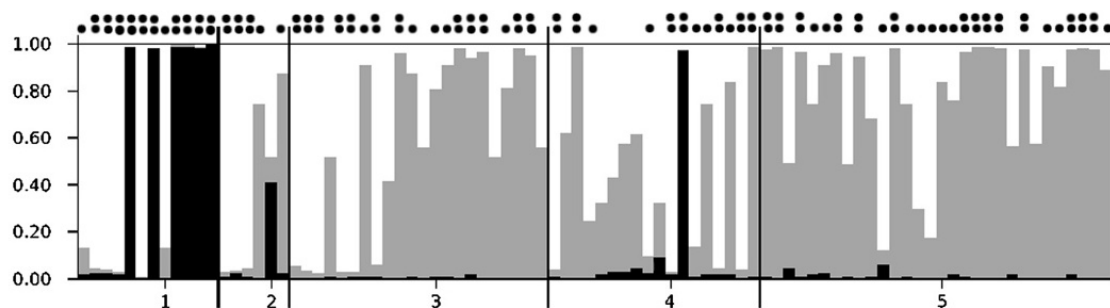


Figure 9. Affectation des loups finlandais dans chaque groupe temporel avec le nombre le plus probable de groupes génétiques ($K = 3$). Chaque barre verticale représente un individu avec différents segments en niveaux de gris montrant la probabilité d'appartenir à des groupes définis (1 = échantillons collectés avant 1920, 2 = 1920-1959, 3 = 1960-1979, 4 = 1980-1993, 5 = 1995-2009). Les cercles noirs au-dessus des barres indiquent les niveaux d'affectation de $q = 0,7-0,9$ (un cercle) ou $q > 0,9$ (deux cercles)

Changements démographiques

Les tests de **goulot d'étranglement** basés sur la méthode de l'excès d'hétérozygotie n'ont pas indiqué de goulots d'étranglement antérieurs graves dans aucun des groupes temporels

ou dans l'échantillon de référence actuel. La distribution des fréquences alléliques en forme de L, typique des populations non goulotées (Fichier additionnel 9 : Figure S5) a été observée et les tests unilatéraux de Wilcoxon pour l'excès d'hétérozygotie ont donné une valeur $P > 0,05$ dans tous les groupes sauf le deuxième groupe temporel (1920-1959, $P = 0,0206$), qui était trop petit pour des tests fiables ($N = 6$). Même si la distribution de la fréquence des allèles était en forme de L dans tous les groupes, la proportion d'allèles rares (fréquence $\leq 0,1$) était plus faible dans les deux premiers groupes temporels (avant 1920 et 1920-1959, $F = 0,333$ et $0,254$, respectivement) que dans les échantillons suivants ($F = 0,390/0,386/0,472$) et, par conséquent, la distribution était plus superficielle.

Les tests de rapport M ont révélé des rapports M moyens élevés dans tous les groupes temporels (0,794-0,910 ; Tableau 4). La comparaison des ratios observés avec les attentes simulées d'équilibre mutation-dérive a cependant montré que, à moins que la proportion de mutations ne se produisant pas en une seule étape ne soit élevée ($\geq \sim 0,3$) et/ou que la taille effective de la population ne soit importante ($N_e \geq 500$ et valeur Θ correspondante de 0,4 ou plus), l'apparition d'un goulot d'étranglement génétique dans le premier échantillon temporel a été confirmée. Dans les scénarios évolutifs étudiés, les goulots d'étranglement pour d'autres groupes temporels ne sont confirmés que si le modèle de mutation suit un modèle strict de mutation pas à pas (SMM) ou si la proportion de mutations plus importantes que les mutations à pas unique est au maximum de $\sim 10\%$.

Tableau 4. Simulations du rapport M pour les groupes temporels

Table a) shows the proportion of simulated equilibrium populations with smaller than observed M -ratio									Table b) shows the corresponding M_c -values (limit for 5% of simulations with lowest M -ratio)								
a)	Before 1920, $N = 12$, $M = 0.794$				1960 - 1979, $N = 22$, $M = 0.910$				b)	Before 1920, $N = 12$, $M = 0.794$				1960 - 1979, $N = 22$, $M = 0.910$			
	Θ				Θ					Θ				Θ			
pg	0.04	0.08	0.2	0.4	0.04	0.08	0.2	0.4	pg	0.04	0.08	0.2	0.4	0.04	0.08	0.2	0.4
0.0	0	0	0	0	0	0	0	0.002	0.0	0.978	0.978	0.956	0.940	0.978	0.978	0.960	0.948
0.05	0	0	0	0	0.030	0.039	0.059	0.112	0.05	0.919	0.914	0.901	0.887	0.921	0.916	0.904	0.892
0.1	0.001	0.002	0.003	0.005	0.149	0.166	0.224	0.342	0.1	0.878	0.875	0.862	0.846	0.881	0.876	0.863	0.848
0.2	0.025	0.035	0.049	0.088	0.510	0.552	0.642	0.754	0.2	0.813	0.807	0.794	0.774	0.812	0.809	0.797	0.780
0.3	0.147	0.166	0.217	0.327	0.803	0.832	0.889	0.944	0.3	0.752	0.752	0.736	0.719	0.755	0.749	0.737	0.717
	1980 - 1993, $N = 18$, $M = 0.856$				1995-2009, $N = 30$, $M = 0.869$					1980 - 1993, $N = 18$, $M = 0.856$				1995-2009, $N = 30$, $M = 0.869$			
0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.978	0.978	0.957	0.944	0.978	0.978	0.961	0.951
0.05	0.002	0.001	0.004	0.009	0.003	0.004	0.008	0.016	0.05	0.919	0.913	0.904	0.890	0.919	0.916	0.906	0.894
0.1	0.021	0.025	0.040	0.071	0.032	0.037	0.064	0.104	0.1	0.878	0.877	0.862	0.848	0.880	0.877	0.866	0.850
0.2	0.182	0.199	0.264	0.380	0.243	0.255	0.331	0.468	0.2	0.812	0.806	0.795	0.778	0.812	0.811	0.795	0.778
0.3	0.487	0.587	0.597	0.719	0.561	0.594	0.688	0.782	0.3	0.756	0.752	0.740	0.721	0.756	0.750	0.739	0.720

Valeurs constantes utilisées pour les simulations : $\mu = 2 \times 10^{-4}$ et $\delta g = 3,1$. Les valeurs MC significatives dans le tableau b) sont en gras. L'échantillon de 1920-1959 n'a pas été testé en raison de la petite taille de l'échantillon. N = nombre d'échantillons, M = rapport M moyen sur tous les loci, $\Theta = 4Ne\mu$, pg = proportion de mutations ne se produisant pas en une seule étape et δg = taille moyenne de l'étape

Taille effective de la population

Les deux estimations de N_e par des méthodes à échantillon unique pour les loups antérieurs à 1920 étaient très faibles : LD- $N_e = 20,5$ (13,5-35,2) et 13,2 (10,8-19,6) avec la méthode ONeSAMP. L'approche ONeSAMP a fourni des estimations de N_e systématiquement plus basses que la méthode basée sur le déséquilibre de liaison pour d'autres groupes temporels également (Tableau 3). Les limites de confiance des deux estimations ne se chevauchaient pas pour les échantillons de 1960-1979 (76,4 et 24,3) et pour la population de référence actuelle (99,2 et 37,2), ce qui suggère une différence significative entre les deux.

Les estimations temporelles à partir des données historiques (intervalle de ~25 générations entre les échantillons) suggèrent une N_e allant de 86 à 176,4 (Tableau 5). L'incorporation d'échantillons de loups modernes après la reconstitution de la population en 1995 a prolongé notre intervalle d'échantillonnage de cinq générations supplémentaires, mais n'a pas changé de manière significative l'ampleur des estimations de l'une ou l'autre des méthodes utilisées. Bien qu'il y ait eu une différence de plus de 2 fois entre la plus petite et la plus grande estimation de N_e sur l'intervalle d'échantillonnage du musée, les intervalles de confiance étaient plutôt larges et se chevauchaient, et les estimations n'étaient donc pas significativement différentes.

Tableau 5. Estimations temporelles de N_e avec des intervalles de confiance à 95% pour les loups finlandais avec l'échantillon de la population de référence moderne inclus (~30 générations) et pour les échantillons historiques seulement (~25 générations)

Sampling interval	Method		
	Moment based (1)	Pseudo-ML (2)	Coalescent Bayesian (3)
~25 generations	86 (63–139)	153.2 (102.3 - 249.1)	176.4 (119.8 - 283.0)
~30 generations	77 (58–115)	129.8 (100.4 - 172.3)	188.3 (136–271.8)

References to methods (1) [38], (2) [39], (3) [40].

DISCUSSION

Les analyses génétiques de l'ADN extrait des spécimens de musée nous ont permis d'évaluer directement les modèles de variation et de structure génétiques dans la population historique de loups Finlandais. Les changements démographiques dus aux récentes perturbations anthropogéniques de la population sauvage sont souvent si importants que l'utilisation de données actuelles uniquement pour reconstruire l'histoire de la population pourrait être trompeuse [22,23]. Si l'on considère les statistiques de chasse comme un indicateur de l'abondance des loups, la réduction la plus importante semble s'être produite avant le 20^{ème} siècle (Figure 1). Bien que nous ne disposions pas d'un échantillonnage suffisant pour cette période, nous avons pu détecter des changements **intrigants** dans la composition génétique de la population de loups Finlandaise au cours des 150 dernières années.

La perte de diversité génétique est supposée être associée à un fort déclin de la taille de la population si le flux génétique est insuffisant pour empêcher la **dérive génétique** locale [1]. Nos résultats confirment un changement génétique progressif (Figure 6 ; Fichier additionnel 5 : Figure S2) et une augmentation de la différenciation génétique (Tableau 2 ; Figures 7 et 8) au sein de la population de loups Finlandais au fil du temps. Les changements génétiques les plus radicaux ont été la disparition d'allèles (Fichier complémentaire 5 : Figure S2) et d'haplotypes (voir les Tableaux 1 et 3 pour les richesses privées des haplotypes et des allèles, respectivement). Près de 20% des allèles microsatellites présents dans la population historique de loups Finlandais n'ont pas été retrouvés dans les analyses complètes de la population moderne (cette étude ; [20,41]), et seules trois (37,5 %) lignées d'haplotypes mitochondriaux [36] sur les huit trouvées dans cette étude ont subsisté (Figure 4).

Comparé aux populations de loups d'Europe de l'Est, qui ont probablement été moins affectées par la persécution historique des loups que les populations occidentales (voir Contexte), le nombre d'haplotypes mitochondriaux était du même ordre ou même plus élevé dans notre groupe temporel le plus ancien : Dans les échantillons de loups Finlandais collectés avant 1920, 5 haplotypes ont été trouvés parmi 18 échantillons (Tableau 1), alors

que Sastre et al. [10] ont découvert 6 haplotypes parmi 47 individus dans la partie Européenne de la Russie et Randi et al. [42] ont rapporté 7 haplotypes parmi 26 individus dans la population Bulgare. Au total, 21 haplotypes ont été détectés parmi les séquences d'ADNmt de loups de l'Europe actuelle et les haplotypes historiques de cette étude (Figure 5). L'un des haplotypes historiques Finlandais était unique, ce qui suggère qu'une certaine variation pourrait être perdue même à une plus grande échelle géographique. En outre, les haplotypes perdus dans la population de loups Finlandaise moderne, mais encore présents ailleurs en Europe, présentent une distribution géographique beaucoup plus large que les haplotypes existants. Cette observation est cohérente avec le déclin substantiel et la fragmentation à grande échelle de la population Européenne de loups.

L'examen du modèle de distribution de la variation historique des microsatellites a également révélé une variation génétique significativement plus importante parmi les échantillons de loups les plus anciens (Fichier additionnel 5 : Figure S2) et un changement temporel progressif dans le pool génétique des loups Finlandais (Figure 7). Dans le plan FCA, seuls quelques loups du groupe le plus ancien (avant 1920) se trouvaient dans l'aire de répartition de la population de loups moderne (1995-2009). Un schéma de distribution similaire a été observé entre les loups actuels de Carélie et les loups historiques les plus anciens (Fichier additionnel 7 : Figure S3), ce qui indique qu'une partie de la variation passée a probablement été perdue dans les régions voisines également. L'analyse d'assignation (Figure 8) a montré une très faible probabilité de mélange (< 8%) de l'échantillon temporel Finlandais le plus ancien avec les groupes suivants, ce qui renvoie également à des changements notables dans le pool génétique de la population. Les tests de goulot d'étranglement de la population ont suggéré un déclin précoce de N_e (avant 1920 ; Tableau 4) ainsi que pour les loups historiques collectés après 1959 (Tableau 1). Bien qu'il soit probable que la population de loups Finlandaise ait subi un fort déclin local dans les années 1920 et 1970 [12,16,17], nos résultats indiquent que les changements génétiques les plus importants sont probablement d'origine plus ancienne et liés au déclin brutal supposé de la population au tournant des 19^{ème} et 20^{ème} siècles (Figure 1).

Un changement génétique précoce a été confirmé par une analyse de regroupement : trois groupes génétiques (Figure 9) ont été trouvés parmi les loups Finlandais historiques, dont l'un était presque exclusif aux échantillons les plus anciens, et tous les individus assignés à ce groupe étaient originaires du nord de la Finlande (voir également la Figure 7). Il est intéressant de noter que dans une étude de cas historique similaire portant sur une population de loups Scandinave voisine [6], une différenciation génétique entre les loups du nord et du sud a également été signalée. Bien que nous ne puissions pas être certains que les loups historiques typiques de la Scandinavie étaient similaires aux loups Finlandais, il est possible que certaines variations historiques typiques du nord de la Fennoscandie aient été perdues. Le nord de la Finlande et de la Scandinavie sont des zones traditionnelles de gestion du renne semi-nomade, où la tolérance aux loups est faible [16,43,44]. L'élimination efficace des loups de ces zones ne diminue pas seulement la possibilité de migration vers la Scandinavie aujourd'hui [43,44], mais pourrait avoir causé la perte détectée de la variation génétique au cours des périodes historiques.

Contrairement à Flagstad et al. [6] - dans lesquels une diminution d'environ 30% de l'hétérozygotie ainsi qu'une réduction de 40% de la diversité allélique ont été rapportées en

raison du déclin de la population - la quantité de diversité génétique mesurée au moyen de l'hétérozygotie n'a pas changé de manière significative dans la population de loups Finlandaise au cours de la période d'étude (Tableaux 1 et 3). Cependant, l'hétérozygotie est relativement insensible aux effets des goulots d'étranglement de courte durée, et même dans le cas le plus extrême, lorsqu'un seul couple reproducteur survit, 75% de l'hétérozygotie génétique demeure dans la génération suivante [1]. En outre, la croissance de la population après le goulot d'étranglement et surtout l'apport de gènes d'une autre population à la population après le goulot d'étranglement peuvent effectivement contrecarrer la perte (supplémentaire) d'hétérozygotie [45-47]. Par exemple, Nyström et al [27] ont montré qu'à la suite d'un goulot d'étranglement démographique sévère au début du 20^{ème} siècle, la population de renards arctiques Scandinaves a perdu environ 25% de ses allèles microsatellites et quatre des sept haplotypes de l'ADNmt, alors que le niveau d'hétérozygotie n'a pas changé de manière significative, très probablement en raison d'un flux de gènes en provenance de Russie. L'immigration en provenance de Russie peut également avoir été suffisante pour empêcher la perte d'hétérozygotie et l'extinction locale, mais pas pour limiter complètement la perte d'allèles et d'haplotypes dans la population de loups Finlandaise. Il est également possible que l'hétérozygotie ait effectivement diminué dans la population de loups Finlandaise pendant le goulot d'étranglement démographique le plus important à la fin du 19^{ème} et au début du 20^{ème} siècle (Figure 1), mais en raison du nombre très limité d'échantillons de cette période, nous ne sommes pas en mesure de confirmer cette hypothèse.

Les méthodes génétiques actuelles de détection des goulots d'étranglement à partir d'échantillons d'une seule population sont toutes basées sur la détection des écarts par rapport aux attentes dans le cadre de l'équilibre mutation-dérive, et opposent deux indices de diversité différents, dont l'un est plus affecté par la dérive génétique que l'autre [48]. Indépendamment du fait que la proportion d'allèles rares était ~15-45% plus faible dans les échantillons collectés avant 1960 que dans les échantillons ultérieurs, la méthode de l'hétérozygotie n'a pas permis d'indiquer des goulots d'étranglement dans la population historique de loups Finlandais (Fichier supplémentaire 9 : Figure S5). Dans les cas de goulots d'étranglement sévères et durables associés à une grande taille de population antérieure - ce qui est le scénario probable pour les loups Finlandais (Figure 1) - les goulots d'étranglement génétiques sont plus susceptibles d'être correctement détectés avec le test du rapport M [49]. Les rapports M observés étaient élevés dans tous les groupes temporels (0,794-0,910) et bien supérieurs à la valeur critique souvent utilisée de 0,68 typique des populations sauvages putativement stables [50]. Les valeurs simulées de l'espérance de mutation-dérive pour le premier échantillon temporel (avant 1920, $M = 0,794$) étaient beaucoup plus élevées que cette valeur critique à l'équilibre dans les scénarios évolutifs les plus réalistes (Tableau 4), ce qui plaide en faveur d'un goulot d'étranglement antérieur. Il est possible que les rapports M typiques de certaines populations sauvages soient nettement plus élevés (cette étude ; [28,46,51]), ce qui souligne l'importance d'estimer les valeurs du rapport M sur une gamme variable de valeurs de paramètres lorsque le modèle de mutation et N_e ne sont pas connus dans le détail [48].

Les séquences mitochondriales n'ont que $1/4$ de N_e par rapport aux marqueurs autosomiques et n'ont pas de recombinaison. Elles sont donc plus sujettes à la dérive génétique. Contrairement aux microsatellites qui montrent un goulot d'étranglement probable dans la période temporelle la plus ancienne, les changements dans la diversité mitochondriale ont

été plus progressifs, et un signal significatif de changement démographique n'a été détecté que dans les groupes temporels collectés dans les années 1960's ou après (Tableau 1). En conclusion - un goulot d'étranglement génétique était probable dans les échantillons les plus anciens sur la base des marqueurs microsatellites, et la population a atteint un nouvel état d'équilibre dans les générations ultérieures. D'autre part, les tests de neutralité avec l'ADNm suggèrent une dérive génétique continue et une perte de variation génétique plus récemment (à partir des années 1960's).

Nos estimations de N_e basées sur le déséquilibre de liaison ont toujours été plus importantes que celles données par l'approche ONeSAMP (Tableau 3). Les résultats de LD- N_e sont probablement plus corrects, car des études antérieures [20,52,53] ont montré que la variation de la taille des échantillons peut conduire à des estimations biaisées de l'ONeSAMP, et le nombre de loups dans nos groupes temporels était assez limité. Si le déséquilibre de liaison entre les loci est le résultat d'autre chose que la petite taille effective précédente - y compris la sous-structure et les générations qui se chevauchent - les méthodes basées sur le DL peuvent également donner des estimations biaisées de N_e [54,55]. Comme nos échantillons temporels ont été collectés sur une longue période, il y avait évidemment des individus de plusieurs générations de loups dans chaque groupe, mais le biais est probablement assez similaire dans les différents groupes temporels. Les estimations ponctuelles de N_e dans le premier groupe temporel (Tableau 3) pourraient également avoir été biaisées vers le bas parce qu'il y avait deux groupes génétiques distincts avec très peu de mélange parmi les échantillons collectés avant 1920 (Figure 9).

Certaines hypothèses de l'estimation N_e avec des méthodes temporelles étaient susceptibles d'être violées, et donc ces estimations pouvaient également être quelque peu biaisées. En particulier, la violation des hypothèses d'absence d'immigration et de non-chevauchement des générations aurait pu fausser nos résultats. En cas de chevauchement des générations, les méthodes temporelles tendent à donner une surestimation importante (~50%) de N_e , par exemple pour les grands mammifères, qui ont une faible fécondité et une courbe de survie de type I [55,56]. D'un autre côté, ce biais est susceptible d'être fortement atténué par la longue période (~25/30 générations) des groupes temporels [2,56]. Le biais causé par l'immigration, en revanche, est susceptible d'être important et son effet dépend de la fréquence des allèles dans la population d'origine : Si les immigrants proviennent d'une population source génétiquement similaire (ce qui est le scénario probable dans notre étude), N_e est biaisé à la hausse lorsque l'immigration réduit le signal de dérive [55]. Dans ce cas, en fonction du taux d'immigration, l'estimation tend à refléter davantage la N_e de l'ensemble de la métapopulation et pas seulement la N_e locale [2,54].

Nos différentes estimations de N_e dans la population de loups Finlandais au cours des 150 dernières années suggèrent une taille effective historique allant de 86 à 176,4 (Tableau 5). Avec des rapports N_e / N_c typiques de ~0,2-0,3 pour les loups [20,57], cela suggérerait une taille moyenne de population de recensement d'au moins ~300-900 loups. Il est donc clair que l'immigration de la population Russe a eu un effet explicite sur la taille effective de la population de loups Finlandaise au cours de l'histoire. D'autre part, une étude précédente d'Aspi et al [41] a suggéré une taille effective ancienne encore plus importante d'environ 590 loups, qui a commencé à décliner de façon exponentielle à la fin du 19^{ème} ou au début du 20^{ème} siècle (voir la Figure 1, qui confirme le déclin antérieur). Le nombre limité d'échantillons

de cette période dans notre étude (Fichier supplémentaire 1 : Tableau S1 et Fichier supplémentaire 10 : Tableau S5) est susceptible de limiter la puissance de nos analyses, car nous ne pouvons détecter qu'une fraction des signaux génétiques historiques les plus anciens. Comparée à nos estimations de la taille effective de la population de loups Finlandais contemporains [20], la taille effective historique moyenne de 86-176 est toutefois relativement élevée. En général, les estimations correspondantes de la population moderne sont 50-85% plus basses (à l'exception de la phase de très forte croissance de la population en 2001-2006 avec très peu de dérive génétique) et en accord avec l'hypothèse d'un isolement génétique très récent de la population Russe de Carélie [13,20].

CONCLUSIONS

La population de loups Finlandaise a longtemps été démographiquement dépendante de la population de loups Russe voisine. La persécution active des loups en Finlande a duré plus de 150 ans et les loups ont été, et sont toujours, activement chassés dans les régions voisines de Russie. **Il a été démontré qu'une pression anthropogénique de longue durée pouvait restreindre le flux génétique entre les populations et provoquer une fragmentation des populations, même chez des espèces très mobiles comme les loups** [58,59]. Ainsi, l'hypothèse d'une homogénéité génétique et d'un afflux positif constant en provenance d'une population source plus importante peut ne pas tenir, surtout si la population source est elle-même soumise à une pression de chasse continue.

Cette étude a fourni une perspective historique à long terme de la génétique de la population de loups Finlandaise. La **connectivité** avec la population Russe, beaucoup plus importante, a permis de conserver une grande diversité génétique nucléaire dans la petite population Finlandaise, et aucune diminution significative de l'hétérozygotie n'a été détectée. Cependant, la majorité des haplotypes mitochondriaux historiques et un grand nombre d'allèles autosomiques semblent avoir été perdus et un type de loup nordique spécifique a probablement disparu du patrimoine génétique actuel. En outre, les effets de la dérive génétique entraînant des changements dans les fréquences des allèles au fil du temps étaient évidents, et les estimations ponctuelles de la taille effective de la population en général sont plutôt petites et soutiennent la fragmentation de la population [60]. Les différences génétiques les plus importantes ont été observées entre les groupes temporels les plus anciens (avant 1920) et les plus récents, ce qui suggère que la majorité des changements génétiques détectés ont été accompagnés d'un fort déclin de la population au tournant des XIX^{ème} et XX^{ème} siècles. Ce fort déclin a également été observé avec les marqueurs microsatellites, le rapport de masculinité étant plus faible que prévu pour les échantillons prélevés avant 1920. En l'absence d'échantillonnage historique correspondant en Russie, nous ne sommes pas en mesure de confirmer si des changements démographiques et génétiques similaires se sont également produits dans les régions d'origine. Toutefois, étant donné que la population actuelle de Carélie diffère notablement des échantillons historiques Finlandais, il est probable que les changements détectés s'appliquent à une région géographique un peu plus vaste.

La population actuelle de loups Finlandais s'est rétablie grâce à une immigration naturelle en provenance de Russie après 1994 et la population a augmenté rapidement jusqu'en 2006, mais elle a ensuite rapidement décliné [20]. **Selon les dernières estimations (2014) du Finnish Game and Fisheries Research Institute, il n'y a plus que 140-155 loups en Finlande et l'espèce**

est classée comme menacée. Après l'effondrement de la population, la consanguinité dans la population a augmenté de manière significative [20] et le flux génétique entre les populations Russes de Carélie et Finlandaises semble être faible à l'heure actuelle [13,20]. Afin de maintenir une population de loups génétiquement saine et viable à long terme, il est clair que la population devrait être plus importante et/ou mieux connectée à la population Russe. La population historique de loups Finlandais était probablement beaucoup plus importante, génétiquement plus diversifiée et plus uniforme avec la population Russe que la population actuelle (cette étude ; [41]). Ainsi, le but ultime de la gestion devrait être de restaurer cette connexion. Ceci ne peut probablement être réalisé qu'avec une réduction substantielle de la pression anthropogénique sur les loups qui prévaut encore des deux côtés de la frontière.

METHODES D'ECHANTILLONNAGE

Échantillonnage

Cent quatorze échantillons historiques de loups datant de 1845-1993 ont été prélevés dans les musées zoologiques d'Oulu, d'Helsinki et de Kuopio en Finlande. L'année et le lieu de collecte étaient connus pour la plupart des échantillons (Fichier supplémentaire 1 : Tableau S1), à l'exception de quatre échantillons dont l'année de collecte n'était pas exacte et de cinq échantillons dont le lieu de collecte ne l'était pas non plus. Le matériel d'étude consistait en plusieurs types d'os (principalement des dents, quelques os pelviens, des vertèbres, des morceaux d'os du crâne et des fémurs). Si elles étaient disponibles, les canines étaient préférées pour l'extraction de l'ADN en raison de leur grande taille, mais si elles étaient cassées ou manquantes, d'autres dents étaient utilisées. Les autres types d'échantillons inclus étaient des coussinets plantaires, des griffes, des échantillons de peaux séchées et du sang sec/tissu neural obtenu à l'intérieur des dents traitées (Fichier additionnel 1 : Tableau S1). Les échantillons ont été classés en quatre groupes temporels pour l'analyse : les échantillons antérieurs à 1920 dans le premier groupe ($N = 35$), 1920-1959 dans le deuxième ($N = 10$), 1960-1979 dans le troisième ($N = 33$) et 1980-1993 dans le quatrième groupe ($N = 36$).

Un sous-ensemble aléatoire d'échantillons de loups Finlandais contemporains ($N = 30$, de 1995 à 2009 ; [20]) collectés après le rétablissement de la population en 1995 a été utilisé comme référence dans les analyses génétiques. Un plus grand ensemble de données de loups modernes ($N = 298$) a été utilisé pour illustrer et comparer la distribution de la variation génétique dans différents groupes temporels, et pour comparer la quantité d'allèles privés entre les loups historiques et les loups actuels. Les lieux de collecte des échantillons historiques analysés ainsi que les groupes temporels correspondants sont présentés dans la Figure 2. Des échantillons de la population voisine actuelle de loups de Carélie (1995-2010, $N = 37$; pour les informations sur les échantillons, voir [13,20]) ont été utilisés pour évaluer la spécificité génétique de la population historique de loups.

Préparation des échantillons et extraction de l'ADN à partir d'échantillons historiques

L'analyse génétique de l'ADN extrait de spécimens de musée ou d'autres matériaux anciens est difficile et nécessite des précautions particulières. La dégradation post mortem et les substances inhibitrices produisent souvent un ADN cible de faible qualité et/ou quantité, et les échantillons sont susceptibles d'être contaminés par de l'ADN étranger [21,61]. Un ADN

de faible qualité/quantité peut, par exemple, entraîner des paires de bases erronées dans les séquences d'ADN [34], ce qui gonfle l'ampleur de la variation génétique. D'autre part, la variation génétique mesurée par les marqueurs microsatellites peut être sous-estimée, car les échantillons de faible qualité sont plus enclins à l'abandon d'allèles, ce qui entraîne des estimations erronées des génotypes homozygotes. L'âge de l'échantillon, le type d'échantillon [21,31], les méthodes de conservation utilisées [62,63] et les conditions de stockage [64] peuvent avoir un effet important sur le succès de l'amplification. Pour garantir l'authenticité de nos résultats, plusieurs précautions ont été prises tout au long de cette étude.

...

Méthodes moléculaires...

ADN mitochondrial...

Amplification des microsatellites...

Analyse des données génétiques...

Analyses de séquences mitochondriales...

Analyses des microsatellites...

Variation génétique, équilibre HW et déséquilibre de liaison...

Différenciation génétique et distribution de la variation...

Structure cachée de la population...

Changements démographiques...

Taille effective de la population...