

## L'expansion dynamique de l'aire de répartition conduit à l'établissement d'une nouvelle population de loups, génétiquement distincte, en Europe centrale

**SCIENTIFIC  
REPORTS**

natureresearch

OPEN

### Dynamic range expansion leads to establishment of a new, genetically distinct wolf population in Central Europe

Maciej Szewczyk<sup>1,2,3</sup>, Sabina Nowak<sup>2</sup>, Natalia Niedźwiecka<sup>2</sup>, Pavel Hulva<sup>4,5</sup>, Renata Špinkytė-Bačkaitienė<sup>6</sup>, Klára Demjanovičová<sup>5</sup>, Barbora Černá Bolfiková<sup>7</sup>, Vladimír Antal<sup>8</sup>, Viktor Fenchuk<sup>9</sup>, Michał Figura<sup>2</sup>, Patrycja Tomczak<sup>2,10</sup>, Przemysław Stachyra<sup>11</sup>, Kinga M. Stępniaik<sup>1,2</sup>, Tomasz Zwijacz-Kozica<sup>12</sup> & Robert W. Mysłajek<sup>1\*</sup>

#### Résumé

Des événements locaux d'extinction et de recolonisation peuvent façonner la structure génétique de populations animales subdivisées. Le loup gris (*Canis lupus*) a disparu de la majeure partie de l'Europe, mais a récemment recolonisé une grande partie de son aire de répartition historique. Une expansion exceptionnellement dynamique de la population de loups est observée dans la partie occidentale de la grande plaine Européenne. Néanmoins, les conséquences génétiques de ce processus n'ont pas encore été entièrement comprises. Nous avons cherché à évaluer la diversité génétique de cette population de loups récemment établie en Pologne occidentale (WPL), à déterminer son origine et à fournir de nouvelles données concernant la structure génétique de la population de loups gris en Europe centrale. Nous avons utilisé des approches de regroupement bayésien spatialement explicites et non explicites, ainsi qu'une méthode multivariée indépendante du modèle, la DAPC, pour déduire la structure génétique d'un vaste ensemble de données (881 individus identifiés) de génotypes microsatellites de loups. Pour placer les modèles observés dans la population étudiée dans un contexte biogéographique plus large, nous avons également analysé un fragment de la région de contrôle de l'ADNmt largement utilisé dans des études antérieures. **Par rapport à une population source, nous avons constaté une richesse allélique et une hétérozygotie légèrement réduite dans les zones récemment recolonisées à l'ouest de la Vistule.** Nous avons découvert une structuration ouest-est relativement forte chez les loups des plaines, reflétant probablement le flux des fondateurs et le surf des allèles au cours de l'expansion de l'aire de répartition, ce qui a permis de distinguer clairement les groupes génétiques de la WPL, des plaines orientales et des Carpates. Il est intéressant de noter que les loups provenant de zones montagneuses récemment recolonisées (Sudètes, sud-ouest de la Pologne) se sont regroupés avec les populations de loups des plaines, mais pas avec celles des Carpates. Nous avons également identifié une zone en Pologne centrale qui semble être un point de fusion des loups de l'ouest, des plaines de l'est et des Carpates. **Nous concluons que le processus de**

recolonisation dynamique des plaines d'Europe centrale a conduit à la formation d'une nouvelle population de loups **génétiquement distincte**. Avec l'installation et l'établissement de meutes dans les montagnes par des loups de plaine et vice versa, cela suggère que la dynamique démographique et peut-être des barrières anthropogéniques plutôt que des facteurs écologiques (par exemple, des modèles de dispersion liés à l'habitat natal) façonnent la structure génétique actuelle des loups en Europe centrale.

## INTRODUCTION

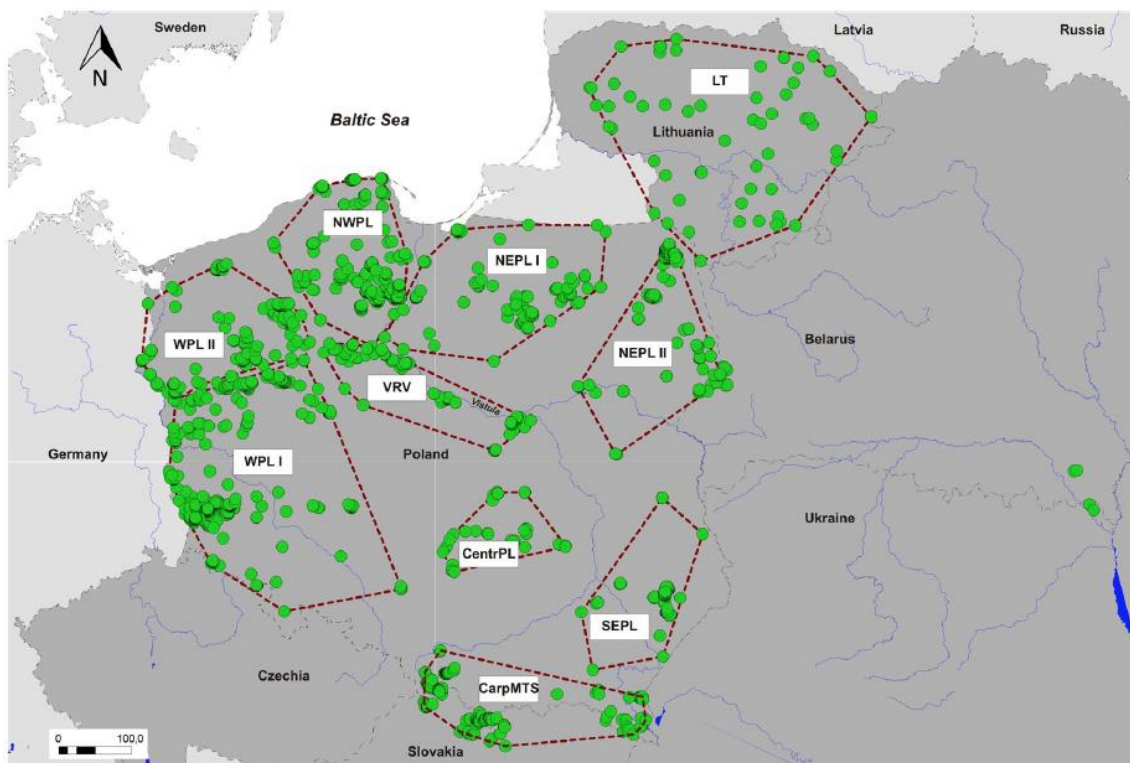
L'expansion de l'aire de répartition dans un environnement hétérogène peut façonner la diversité et la structure génétiques des populations d'une espèce<sup>1-3</sup>. Les **effets fondateurs** au cours des expansions sont l'un des principaux **moteurs** de la structuration génétique, conduisant à l'établissement de nouvelles populations génétiquement distinctes<sup>4-8</sup>. D'autre part, l'expansion rapide d'une population peut favoriser les flux de gènes et les mélanges<sup>9,10</sup>, aboutissant parfois à une structure génétique presque homogène<sup>11</sup>.

Les loups étaient historiquement les grands carnivores terrestres les plus répandus dans l'hémisphère nord. Cependant, des siècles de persécution ont conduit à l'effondrement de nombreuses populations de loups, entraînant une réduction globale de son aire de répartition historique à 68%, y compris la majeure partie de l'Europe occidentale et centrale<sup>12</sup>. En Pologne, les loups n'ont jamais été complètement exterminé malgré un programme d'extermination intentionnel mené pendant plusieurs décennies après la Seconde Guerre mondiale. Cependant, la population a été sévèrement réduite à moins d'une centaine d'individus qui ont survécu aux confins orientaux du pays<sup>13</sup>.

Après la mise en place d'une protection stricte sur l'ensemble du territoire Polonais en 1998, les loups ont commencé à repeupler les vastes étendues forestières situées à l'ouest de la Vistule. La **première phase** de recolonisation a été caractérisée par une **dispersion par bonds** menant à l'établissement de quelques meutes dans des endroits éloignés, et un rythme relativement lent de rétablissement de la population. Cependant, au cours de la **deuxième phase**, le modèle de dispersion a évolué vers un **mélange de diffusion** et de **dispersion par bonds**, entraînant la création de meutes à proximité de groupes existants et une croissance beaucoup plus dynamique de la population<sup>14</sup>. La population vivant dans l'ouest de la Pologne (WPL), ainsi que les loups recolonisant l'Allemagne, l'ouest de la République Tchèque, le Danemark et les Pays-Bas, sont considérés comme une unité de gestion distincte appelée population de loups d'Europe centrale<sup>15</sup>. Cependant, les résultats des études génétiques des populations de loups Polonais<sup>16</sup>, réalisées au cours de la première phase de recolonisation de la WPL et comprenant des échantillons collectés de 2002 à 2009 dans les neuf meutes de loups vivant à l'époque à l'ouest de la Vistule, suggèrent que les loups habitant l'ouest de la Pologne et l'est de l'Allemagne constituent une seule population avec ceux de la partie nord-est de la Pologne, qui sont classés comme appartenant à la population Baltique (sensu Chapron et al.<sup>15</sup>).

Actuellement, les loups ont déjà colonisé la plupart des habitats appropriés dans la WPL<sup>17</sup>. Une étude antérieure<sup>16</sup> a indiqué une structuration concordante de l'ADN mitochondrial et nucléaire entre les loups des plaines Polonaises et les loups des Carpates, qui pourrait être attribuée soit à la fragmentation du paysage et aux barrières de dispersion, soit à des différences écologiques entre les populations étudiées, entraînant une dispersion liée à

l'habitat natal. Cependant, il existe des cas documentés de dispersion de loups sur de longues distances dans des paysages Européens dominés par l'homme, avec un grand nombre de barrières de dispersion<sup>18-20</sup>. En outre, plusieurs cas d'installation de loups de plaine dans des régions montagneuses ont été signalés<sup>20</sup>, ce qui remet en question les deux hypothèses. En outre, il existe des exemples de structuration cryptique des populations de loups qui ne peuvent pas être simplement expliqués par des barrières géographiques et anthropogéniques à la dispersion ou par des facteurs écologiques<sup>21-24</sup>, ce qui montre que les mécanismes qui déterminent la structure génétique des loups ne sont pas encore totalement compris. Les zones actuellement recolonisées dans la WPL sont **stratifiées** en termes de pression anthropogénique et de caractéristiques du paysage, puisqu'elles sont composées principalement de basses terres très boisées, mais aussi de quelques hautes terres, de la chaîne de montagnes des Sudètes et de zones dominées par des terres arables<sup>17,25</sup>. Le processus de recolonisation est donc une occasion unique d'étudier les relations entre la sélection de l'habitat et les origines génétiques des loups.



**Figure 1.** Distribution des échantillons génétiques utilisés dans la présente étude (points verts). Les frontières des États sont indiquées par des lignes pointillées grises, les principaux cours d'eau par des lignes continues bleues et les frontières des régions prédéfinies par des lignes pointillées rouges. WPL\_I - Pologne occidentale, partie centre-sud (y compris les monts Sudètes) ; WPL\_II - Pologne occidentale, partie centre-nord ; NWPL - Pologne du nord-ouest ; VRV - Vallée de la Vistule ; CentrPL - Pologne centrale ; NEPL\_I - Pologne du nord-est, partie centre-nord ; NEPL\_II - Pologne du nord-est, partie la plus orientale ; SEPL - Pologne du sud-est ; LT - Lituanie ; CarpMTS - Montagnes des Carpates

Profitant d'un grand nombre d'échantillons non invasifs collectés pendant huit ans dans la WPL, le centre, le nord-est et l'est de la Pologne, la Lituanie, la Biélorussie et les Carpates (Fig. 1), nous avons examiné la structure génétique spatiale des populations de loups d'Europe centrale, en nous concentrant plus particulièrement sur la population récemment établie à l'ouest de la Vistule, qui n'a pas été suffisamment étudiée. Nous avons combiné différentes méthodes bayésiennes de regroupement et multivariées pour identifier les groupes génétiques et examiner les schémas de répartition de la diversité génétique entre ces

groupes et les régions géographiques. Nous avons supposé qu'en dépit de son origine orientale présumée, la population de loups de l'ouest de la Pologne pouvait émerger en tant que groupe distinct, parce que la population a été initiée à la suite de la dispersion à longue distance (saut) de nouveaux individus qui ont formé les premières meutes dans le WPL<sup>14</sup> et que de tels événements démographiques peuvent entraîner des fréquences d'allèles fortement différentes des populations sources en raison de **l'effet fondateur** et du surf d'allèles<sup>26,27</sup>. Nous avons également tenté d'actualiser la délimitation des unités de gestion des loups en Europe centrale, en tenant compte des résultats de toutes les analyses récentes de la structure génétique des loups dans cette région.

## RESULTATS

### Variabilité génétique

Des génotypes consensus multilocus de qualité suffisante (au moins 9 loci génotypés) ont été obtenus pour 1514 échantillons, dans lesquels nous avons identifié au total 881 individus loups (en moyenne 1,72 échantillons/individu, intervalle 1-18). Les hybrides putatifs loup-chien identifiés n'ont pas été inclus dans cet ensemble de données (voir Méthodes supplémentaires et Fig. Supplémentaire S1 pour plus de détails). Le taux moyen global d'abandon allélique était de 0,036 et variait de 0,014 dans le locus FH2088 à 0,105 dans le locus FH2017. Les allèles nuls n'ont pas été détectés. La probabilité cumulative d'identité ( $P_{ID}$ ) pour tous les génotypes était très faible et égale à  $4,9 \times 10^{-12}$  (intervalle  $1,2 \times 10^{-9}$ - $1,3 \times 10^{-13}$  selon la région) pour les individus non apparentés et  $2,4 \times 10^{-5}$  (intervalle  $1,3 \times 10^{-4}$ - $9,0 \times 10^{-6}$ ) pour les pleins frères et sœurs.

**Tableau 1.** Statistiques sommaires des microsatellites pour les 10 régions géographiques prédéfinies. N - nombre d'individus, Na - nombre moyen d'allèles, A<sub>R</sub> - richesse allélique raréfiée, H<sub>O</sub> - hétérozygotie observée, H<sub>E</sub> - hétérozygotie attendue, uH<sub>E</sub> - hétérozygotie attendue non biaisée, F<sub>IS</sub> - coefficient de consanguinité, PA - nombre d'allèles privés

Region	N	Na	A <sub>R</sub>	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	uH <sub>E</sub>	F <sub>IS</sub>	PA
WPL I	255	5.615	4.331	0.597	0.592	0.593	-0.007	0
WPL II	103	5.385	4.583	0.645	0.645	0.649	0.007	0
NWPL	104	6.154	4.954	0.627	0.644	0.647	0.031	2
VRV	51	4.615	4.062	0.614	0.577	0.583	-0.052	0
CentrPL	22	5.385	5.356	0.693	0.671	0.687	-0.008	1
NEPL I	75	6.000	5.051	0.589	0.618	0.622	0.054	1
NEPL II	60	6.231	5.514	0.694	0.696	0.702	0.011	1
LT	58	6.846	6.112	0.738	0.733	0.740	0.002	1
SEPL	34	5.385	4.981	0.655	0.656	0.667	0.017	0
CarpMTS	112	6.923	5.698	0.650	0.675	0.678	0.042	3
total/mean	874	5.854	5.658	0.650	0.651	0.657	0.010	—

Lorsque nous avons estimé les statistiques de base de la variabilité des microsatellites entre les régions d'échantillonnage (résumées dans le Tableau 1 ; les détails pour chaque locus se trouvent dans le Tableau supplémentaire S1), tous les loci étaient polymorphes dans chaque région. Le nombre thématique d'allèles, la richesse allélique et l'hétérozygotie observée étaient les plus élevés en Lituanie (LT ; 6,846, 6,110 et 0,738, respectivement), tandis que les régions présentant la plus faible H<sub>O</sub> étaient NEPL I et WPL I (0,589 et 0,597, respectivement). **En général, la richesse allélique était significativement plus faible dans les régions récemment recolonisées** (moyenne de 4,333 dans les régions WPL I, WPL II, NWPL, VRV et Centr PL, contre 5,171 dans les régions NEPL I, NEPL II, LT et SEPL ;  $p = 0,015$ ), mais

l'hétérozygotie moyenne observée ne différait pas significativement par rapport aux régions des plaines orientales ( $p = 0,08$ ). Les valeurs du coefficient de consanguinité ( $F_{IS}$ ) étaient faibles et comprises entre  $-0,052$  et  $0,054$ .

Les valeurs de  $F_{ST}$  par paire entre les 10 régions géographiques prédéfinies (Fig. 1) varient de  $0,014$  à  $0,172$  (Tableau 2). Toutes les valeurs par paire sont restées significatives après la correction de Bonferroni (basée sur 1000 permutations ;  $p < 0,05$ ), mais pour la plupart des régions de l'ouest et du nord de la Pologne, nous avons observé des valeurs de  $F_{ST}$  généralement considérées comme faibles ( $< 0,0528$ ). Les valeurs de  $F_{ST}$  par paire les plus élevées ont été enregistrées entre les Carpates et les régions récemment recolonisées dans l'ouest et le nord de la Pologne. De même, la région SEPL était relativement fortement différenciée des autres régions de plaine, tandis qu'un niveau de différenciation relativement faible a été constaté entre la Lituanie et les régions CarpMTS et SEPL ( $0,085$  et  $0,055$ , respectivement). Les valeurs  $R_{ST}$  par paire étaient généralement plus élevées que les valeurs  $F_{ST}$  correspondantes, comme on peut s'y attendre dans le cas de marqueurs microsatellites hautement polymorphes<sup>28</sup>. Cependant, le schéma général observé était très similaire, avec une différenciation très faible (souvent insignifiante) entre les régions occidentales, une différenciation modérée à élevée entre les basses terres occidentales et orientales et des valeurs  $R_{ST}$  par paire très élevées entre CarpMTS et les régions occidentales, en particulier WPL I.

**Tableau 2.** Valeurs  $F_{ST}$  (en dessous de la diagonale) et  $R_{ST}$  (au-dessus de la diagonale) par paire entre 10 régions géographiques prédéfinies. Les valeurs statistiquement significatives sont en gras

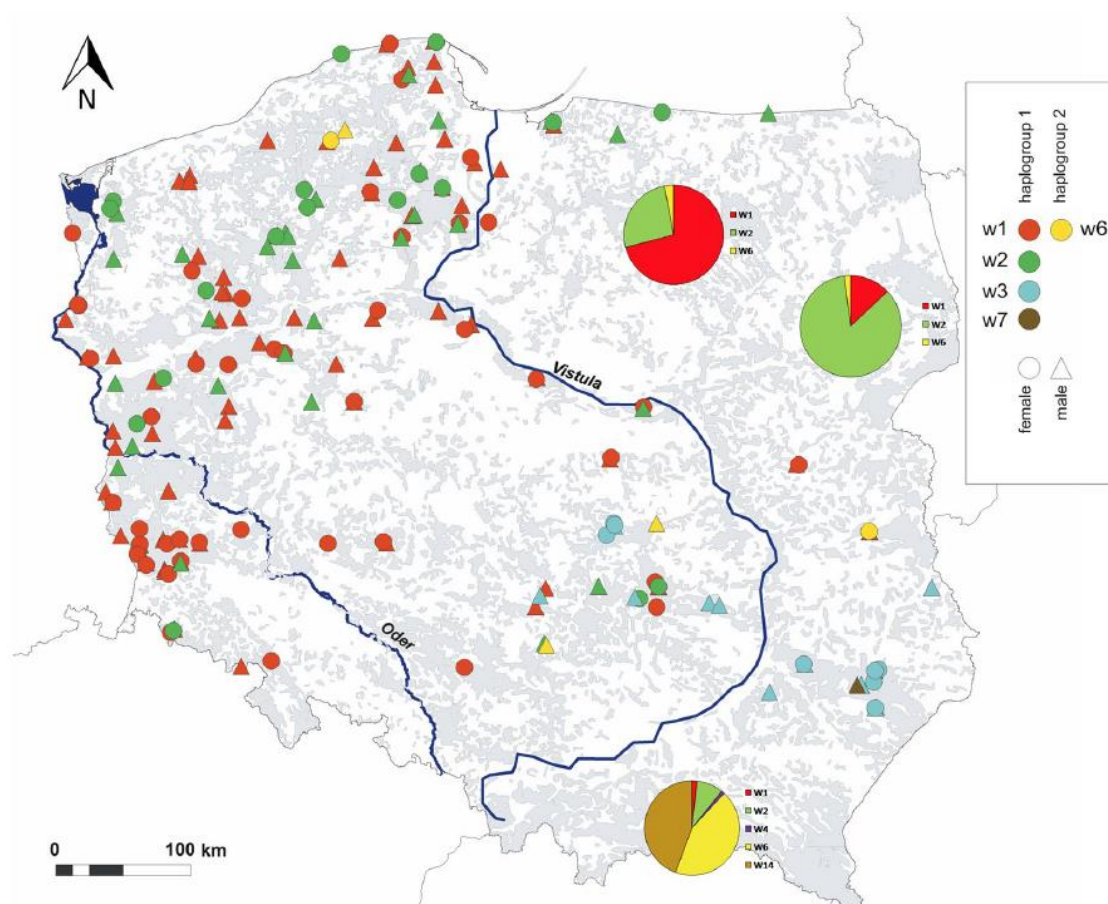
Region	WPL I	WPL II	NWPL	VRV	CentrPL	NEPL I	NEPL II	LT	SEPL	CarpMTS
WPL I	*	<b>0.022</b>	<b>0.053</b>	<b>0.029</b>	<b>0.041</b>	<b>0.046</b>	<b>0.088</b>	<b>0.224</b>	<b>0.188</b>	<b>0.283</b>
WPL II	<b>0.023</b>	*	<i>0.006</i>	<i>0.000</i>	<i>0.010</i>	<i>0.008</i>	<b>0.021</b>	<b>0.103</b>	<b>0.082</b>	<b>0.168</b>
NWPL	<b>0.030</b>	<b>0.014</b>	*	<b>0.036</b>	<i>0.018</i>	<i>0.009</i>	<b>0.016</b>	<b>0.092</b>	<b>0.084</b>	<b>0.164</b>
VRV	<b>0.036</b>	<b>0.030</b>	<b>0.045</b>	*	<b>0.083</b>	<b>0.039</b>	<b>0.059</b>	<b>0.223</b>	<b>0.255</b>	<b>0.214</b>
CentrPL	<b>0.036</b>	<b>0.019</b>	<b>0.022</b>	<b>0.042</b>	*	<i>0.023</i>	<i>0.018</i>	<b>0.105</b>	<b>0.078</b>	<b>0.117</b>
NEPL I	<b>0.035</b>	<b>0.025</b>	<b>0.021</b>	<b>0.039</b>	<b>0.036</b>	*	<i>0.009</i>	<b>0.105</b>	<b>0.094</b>	<b>0.163</b>
NEPL II	<b>0.057</b>	<b>0.033</b>	<b>0.035</b>	<b>0.056</b>	<b>0.029</b>	<b>0.032</b>	*	<b>0.040</b>	<b>0.042</b>	<b>0.111</b>
LT	<b>0.087</b>	<b>0.051</b>	<b>0.049</b>	<b>0.082</b>	<b>0.034</b>	<b>0.053</b>	<b>0.017</b>	*	<b>0.073</b>	<b>0.082</b>
SEPL	<b>0.110</b>	<b>0.080</b>	<b>0.078</b>	<b>0.119</b>	<b>0.052</b>	<b>0.094</b>	<b>0.070</b>	<b>0.055</b>	*	<b>0.132</b>
CarpMTS	<b>0.172</b>	<b>0.139</b>	<b>0.135</b>	<b>0.167</b>	<b>0.085</b>	<b>0.146</b>	<b>0.123</b>	<b>0.085</b>	<b>0.130</b>	*

Nous avons trouvé une diversité d'ADNmt relativement faible dans la plupart des zones récemment recolonisées (WPL I et II, NWPL et VRV), avec presque tous les individus analysés portant les haplotypes w1 et w2, tous deux appartenant à l'haplogroupe 1<sup>29</sup> (Fig. 2). Les seules exceptions étaient deux loups étroitement apparentés découverts dans la région NWPL qui portaient l'haplotype w6, commun dans les Carpates. Les régions du sud-ouest ainsi que les Sudètes étaient fortement dominées par l'haplotype w1, tandis que dans le nord-ouest de la Pologne, les fréquences des haplotypes w1 et w2 étaient similaires (55% et 42%, respectivement). Nous avons principalement observé un **modèle insulaire** de distribution des haplotypes de l'ADNmt (par exemple, l'île de l'haplotype w2 dans la région WPL II ou plusieurs îles d'haplotypes w1 dans les régions WPL I et VVR), mais dans la région NWPL, les haplotypes étaient distribués de manière plus homogène.

Nous avons enregistré la plus grande diversité d'ADNmt dans la région relativement petite de CentrPL qui ne possède pas de grandes étendues forestières continues. Nous y avons

déte t  deux meutes portant l'haplotype w6 des Carpates. C'est également la seule région à l'ouest de la Vistule où l'haplotype w3 est présent. Dans trois meutes de cette région dans lesquelles nous avons identifié des couples reproducteurs, les femelles reproductrices avaient des haplotypes ADNmt différents de ceux des mâles.

Dans la région SEPL, l'haplotype w3, rare ailleurs, était dominant. La seule exception était deux individus de la partie la plus septentrionale de la région (qui n'est pas directement connectée aux principales parcelles forestières du SEPL) portant les haplotypes w1 et w6 et un individu avec l'haplotype w7 typique de l'est de la Biélorussie<sup>21</sup>. **Il s'agit du seul cas de w7 dans notre ensemble de données.** Nous n'avons pas détecté d'individu avec l'haplotype w2 qui a été signalé comme l'haplotype le plus fréquent dans les parties centrales et septentrionales de l'est de la Pologne<sup>16</sup>.



**Figure 2.** Distribution des haplotypes de la région de contrôle de l'ADNmt des loups polonais séquencés dans cette étude. En outre, pour les régions où l'aire de répartition du loup n'a pas beaucoup changé récemment, les fréquences des haplotypes publiées précédemment sont présentées sous forme de diagrammes circulaires (nord-est de la Pologne - Czarnomska et al., 2013 ; Carpates - Hulva et al., 2018). Les forêts (en gris) et les principaux cours d'eau sont indiqués

### Analyses de regroupement génétique

L'analyse bayésienne de regroupement avec le logiciel STRUCTURE a révélé que dans notre ensemble de données de 881 individus de loups provenant des populations d'Europe centrale, de la Baltique et des Carpates (sensu Chapron et al.<sup>15</sup>), le nombre optimal de regroupements génétiques est de trois (tel que déterminé par la méthode Evann<sup>30</sup> ; Suppl. Fig. S2A, B).   K = 2, nous n'avons pas observé de séparation claire entre les loups des Carpates et ceux des plaines, comme cela a été rapport  précédemment<sup>16,20</sup>, car les individus

de l'est de la Pologne et de la Lituanie se sont regroupés principalement avec ceux des Carpates. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse DAPC, où DA1 a clairement séparé les loups des Carpates de toutes les autres régions, tandis que DA2 a différencié les loups des plaines orientales (régions SEPL et LT) de ceux des plaines occidentales (Suppl. Fig. S2C).

Les résultats de STRUCTURE obtenus pour des valeurs supérieures à  $K = 3$  suggèrent la présence d'une sous-structure supplémentaire à l'intérieur du groupe des plaines occidentales (par exemple, un groupe distinct correspondant à une grande parcelle de forêt dans la région WPL I à  $K = 5$ ). Toutefois, un tel schéma n'a pas été observé dans l'analyse du DAPC. Comme STRUCTURE a été conçu pour placer les individus dans des populations d'équilibre de Hardy-Weinberg/liaison<sup>31</sup> et que la DAPC est indépendante du modèle<sup>32</sup>, nous avons supposé que cette divergence entre les résultats des deux méthodes est due à la présence d'un grand nombre d'individus étroitement apparentés dans notre ensemble de données qui pourraient interférer avec les algorithmes de regroupement bayésien<sup>33</sup>. Nous avons donc réduit ce biais possible en équilibrant le nombre d'individus analysés par meute. Sur la base des données de terrain et de l'analyse de la parenté génétique, nous avons identifié 80 groupes familiaux de loups avec  $\geq 3$  individus échantillonnés. Lorsque cela était possible, nous avons déduit les couples reproducteurs les plus probables et ces parents ont été conservés dans l'ensemble de données, tandis que leur progéniture a été supprimée, comme cela a été fait dans d'autres études<sup>34</sup>. Dans le cas contraire, nous avons conservé un mâle et une femelle aléatoires avec les génotypes de meilleure qualité par meute. Cette procédure a permis de réduire l'ensemble de données de 881 à 451 individus. Le sous-ensemble de la région WPL I, où les plus grands groupes de parents étaient présents en raison de la collecte intensive d'échantillons à long terme, a été réduit de plus de 3 fois (de 255 à 81 individus). En revanche, les plus petits sous-ensembles des régions CentrPL et SEPL ont été les moins affectés (27% et 34% de réduction, respectivement). Nous avons également noté que certains loups adultes tués dans des accidents de la route en Pologne occidentale n'étaient pas liés à des meutes locales ou sont morts en dehors de l'aire de répartition connue des loups. Nous avons donc supposé qu'il s'agissait de loups flottants et qu'ils ne pouvaient donc pas être attribués à des populations locales. Un examen détaillé des données génétiques et de terrain a permis d'identifier 27 individus de ce type (20 mâles et 7 femelles), qui ont été conservés dans les analyses non spatiales (en tant que groupe distinct « disperseurs putatifs »), mais exclus des analyses spatiales. En outre, pour améliorer la couverture de l'échantillonnage des populations orientales, nous avons ajouté à l'analyse des échantillons provenant de l'ouest de la Biélorussie et des parties Biélorusses et Ukrainiennes de la zone d'exclusion de Tchernobyl (ci-après région BY-UA).

Les résultats de l'analyse STRUCTURE de cet ensemble de données réduit étaient généralement conformes à ceux obtenus pour l'ensemble des données,  $K = 3$  obtenant à nouveau le soutien le plus élevé de la méthode Evanno (Suppl. Fig. S3A, B). Les trois groupes identifiés (Fig. 3A) correspondaient aux Carpates, aux basses terres orientales (régions LT, BY-UA, NEPL II et SEPL) et aux basses terres occidentales (régions WPL I et VRV, la plus grande partie de WPL II, NWPL et NEPL I). **La région CentrPL était la plus diversifiée, avec des proportions similaires de chaque groupe et plusieurs individus mélangés.**

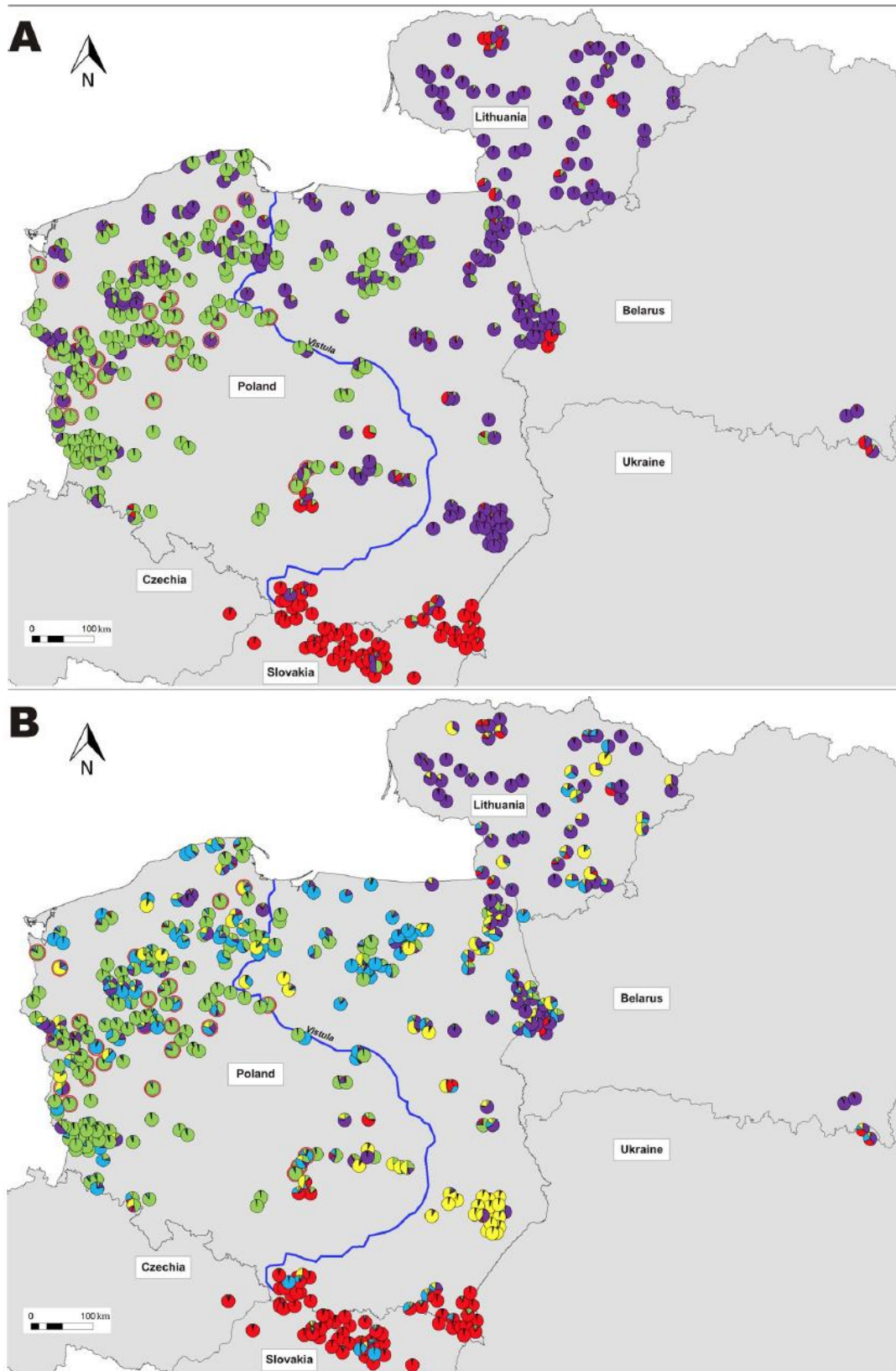
Toutefois, il n'est pas toujours facile de déterminer le « véritable » nombre de grappes à partir des exécutions de STRUCTURE. Se fier uniquement à la méthode  $\Delta K$  peut conduire à une

sous-estimation de la structure génétique de la population<sup>35</sup>. Les valeurs de log-vraisemblance observées ont encore augmenté considérablement pour  $K \geq 4$ , ce qui indique l'existence d'une sous-structure supplémentaire. Ainsi, nous avons effectué une analyse semi-hiérarchique. Tout d'abord, nous avons refait l'analyse après avoir exclu tous les individus assignés au groupe des Carpates, car 1) notre objectif principal était d'explorer la structure génétique dans les basses terres récemment recolonisées, et 2) la sous-structuration de la population des Carpates avait déjà été étudiée auparavant<sup>20</sup>. Ensuite, le changement le plus important de  $\Delta K$  a été observé à  $K = 2$ , reflétant la répartition des loups de plaine entre les populations de l'est et de l'ouest (les affectations individuelles étaient conformes à celles de  $K = 3$  dans l'analyse précédente). Cependant, un changement substantiel de  $\Delta K$  a également été observé à  $K = 4$  (Suppl. Fig. S3C, D). De même, c'est le  $K$  le plus élevé qui a donné le même schéma de regroupement dans les 10 itérations. Une analyse hiérarchique plus poussée, dans laquelle chacun des groupes identifiés à  $K = 2$  a été analysé séparément, a confirmé ce résultat : le groupe 1 (« ouest ») n'avait pas de sous-partition significative, indiquant  $K = 1$ , tandis que pour le groupe 2 (« est »), le meilleur nombre de  $K$  déterminé par la méthode Evann était de 3 (Suppl. Fig. S4). Les schémas d'affectation des individus étaient très similaires pour  $K = 4$  dans l'analyse excluant les Carpates et pour  $K = 5$  dans l'analyse générale. A ce niveau de partitionnement de la population (Fig. 3B), les loups des Carpates forment à nouveau un groupe presque homogène et la plupart des zones situées à l'ouest de la Vistule sont dominées par des loups appartenant au groupe 1 (ouest). Cependant, les loups des plaines orientales étaient divisés en trois groupes : sud-est (groupe 5 - dominant dans la région SEPL, seulement de petites îles dans d'autres régions), nord-est (groupe 2 - dominant dans les régions LT, NEPL II et BY-UA) et nord (groupe 4 - dominant dans la région NEPL I ; fréquence relativement élevée également dans les régions NWPL et WPL II).

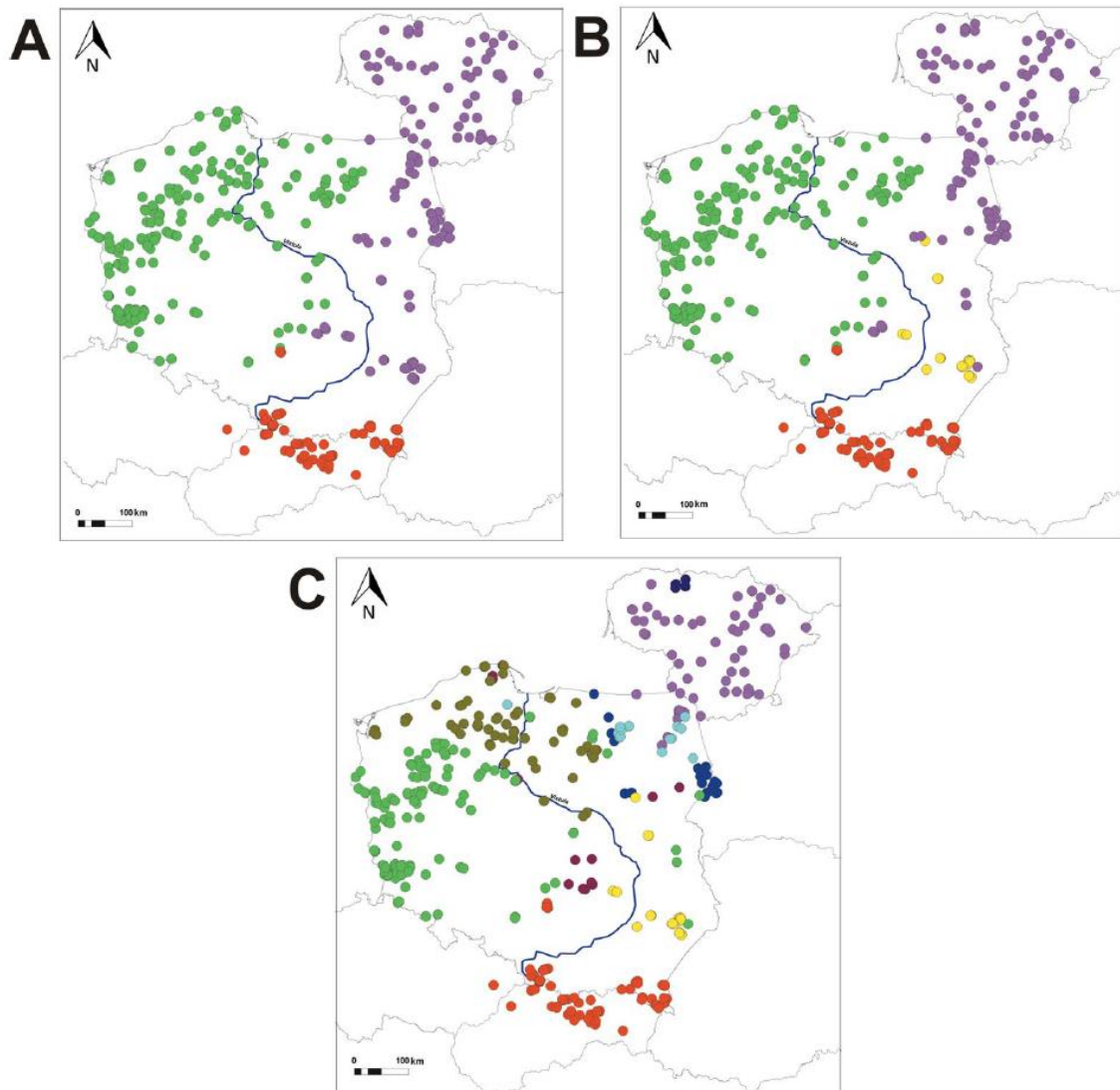
Ensuite, nous avons utilisé une méthode de regroupement spatialement explicite implémentée dans GENELAND pour déduire la structure spatiale dans l'ensemble de données de 434 individus (la même que dans les analyses STRUCTURE, sauf que les disperseurs putatifs n'ont pas été inclus). Lors des premières exécutions de GENELAND, nous avons observé l'apparition de « populations fantômes ». Nous avons donc exclu par la suite 4 individus de la zone de Tchernobyl - une région distante de plus de 300 km de notre zone d'étude principale. Lors d'une analyse ultérieure utilisant un modèle de fréquence d'allèle non corrélé, GENELAND a identifié 3 groupes dans 6 des 10 séries, et 4 groupes dans les séries restantes. Par ailleurs, les deux séries présentant la probabilité a posteriori la plus élevée étaient celles qui identifiaient  $K = 4$ . Notamment, la comparaison des affectations individuelles a révélé que les résultats de toutes les séries étaient généralement congruents, à la seule exception des loups du sud-est qui formaient un groupe distinct à  $K = 4$  et qui, à un  $K$  inférieur, étaient regroupés avec des individus du nord-est (Fig. 4A, B, Suppl. Fig. S5). Les affectations aux groupes de l'ouest et des Carpates ont été les mêmes dans toutes les séries. Nous avons ensuite effectué une analyse à l'aide du modèle corrélé. Nous avons observé une très grande variance entre les itérations, avec  $K$  identifié variant de 7 à 13 et des différences dans les affectations individuelles même entre les itérations avec la même valeur de  $K$  sélectionnée. Dans les itérations avec  $K \geq 10$ , le logiciel a identifié plusieurs populations sans signification correspondant à quelques individus, généralement étroitement liés. Cependant, certains schémas étaient reproductibles dans toutes les séries, comme la division observée des loups de l'ouest en groupes du sud-ouest et du nord-ouest. Les résultats de la série



identifiant  $K = 9$ , qui présentait la densité de probabilité moyenne-postérieure la plus élevée, sont présentés sur la Figure 4C.



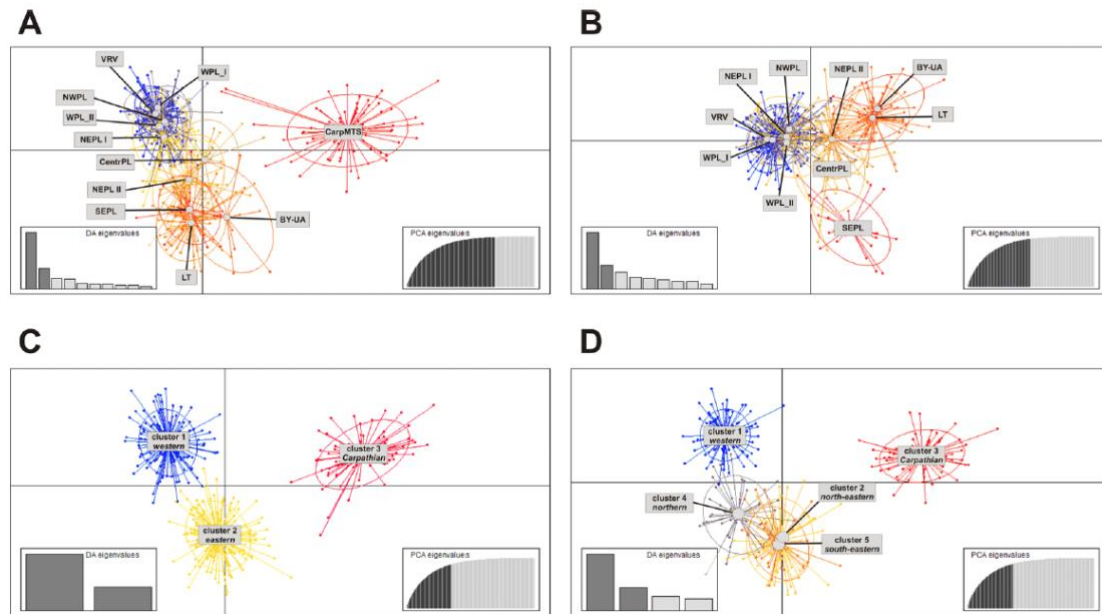
**Figure 3.** Proportions d'appartenance à un groupe de loups échantillonnés dans le cadre de cette étude, selon l'analyse STRUCTURE pour  $K = 3$  (panneau A) et  $K = 5$  (panneau B). Les disperseurs putatifs (loups adultes tués sur la route qui n'ont pas été assignés à des meutes locales) sont marqués d'un liseré rouge



**Figure 4.** Projection spatiale des résultats de GENELAND. Panneau **A** - modèle de fréquence des allèles non corrélés,  $K = 3$  ; panneau **B** - modèle de fréquence des allèles non corrélés,  $K = 4$  ; panneau **C** - modèle de fréquence des allèles corrélés,  $K = 9$

Enfin, nous avons effectué la DAPC pour déduire la distance génétique entre les régions géographiques prédéfinies et les groupes identifiés par STRUCTURE. Dans l'analyse incluant toutes les régions (mais excluant les disperseurs putatifs), les loups des Carpates étaient clairement séparés de tous les loups des plaines par l'axe DA1, tandis que l'axe DA2 reflétait la division ouest-est dans les plaines (Fig. 5A). Les régions LT, BY-UA et SEPL formaient un groupe sur l'axe DA2, tandis que WPL I, WPLII, NWPL, VRV et NEPL I en formaient un autre. NEPL II et CentrPL se situent entre les deux. L'analyse n'incluant pas les Carpates a donné des résultats similaires en termes de différenciation est-ouest, mais a en outre clairement séparé la région SEPL des autres régions orientales (Fig. 5B). Nous avons ensuite utilisé le DAPC pour vérifier les résultats de STRUCTURE. Dans cette analyse, nous n'avons pris en compte que les loups assignés à un groupe donné avec  $q > 0,7$ , tandis que les individus identifiés comme mélangés ( $N = 54$  dans le cas de  $K = 3$  et  $N = 119$  pour  $K = 5$ ) ont été exclus. Les trois principaux groupes identifiés dans STRUCTURE ont été clairement séparés par DAPC (Fig. 5C). Cependant, dans le cas de  $K = 5$ , l'amas du sud-est a largement chevauché celui du nord-est et l'amas du nord a été identifié comme un intermédiaire entre les amas de l'ouest et du nord-est (Fig. 5D). Ce dernier résultat concorde avec les valeurs  $F_{ST}$  identifiées entre les groupes, où le groupe du nord présente une distance relativement faible

par rapport aux groupes de l'ouest et du nord-est (Tableau 3). Toutefois, l'amas du sud-est s'est révélé au moins modérément différencié de tous les autres groupes. Cela a été confirmé par une analyse DAPC supplémentaire, où DA3 a séparé l'amas 5 des autres amas (Suppl. Fig. S6).



**Figure 5.** Diagrammes de dispersion représentant les résultats des analyses DAPC. Panneaux **A, B** - analyse des régions géographiques prédéfinies (**A** - toutes les régions analysées, **B** - analyse excluant les Carpates), panneaux **C, D** - analyse des grappes identifiées dans STRUCTURE (**C** - à  $K = 3$ , **D** - à  $K = 5$ )

**Tableau 3.** Valeurs  $F_{ST}$  (en dessous de la diagonale) et  $R_{ST}$  (au-dessus de la diagonale) par paire entre les groupes identifiés dans les analyses STRUCUTRE. Les valeurs statistiquement significatives sont en gras

clusters identified at $K = 3$					
	western	eastern		Carpathian	
western	*	0.134		0.394	
eastern	0.064	*	0.219		
Carpathian	0.174	0.099		*	
clusters identified at $K = 5$					
	western	northern	north-eastern	south-eastern	Carpathian
western	*	0.081	0.205	0.209	0.416
northern	0.093	*	0.134	0.197	0.347
north-eastern	0.097	0.081	*	0.078	0.156
south-eastern	0.107	0.121	0.070	*	0.308
Carpathian	0.189	0.167	0.100	0.145	*

Après avoir identifié les principaux groupes génétiques de loups et leur distribution géographique, nous avons étudié le taux de flux génétique contemporain entre eux en utilisant BayesAss 3.0<sup>36</sup>. Tout d'abord, nous avons analysé le taux et la direction du flux génétique entre les zones recolonisées par les loups au cours des deux dernières décennies (régions WPL I, WPL II, NWPL, VRV et CentrPL traitées comme une seule population) et celles occupées en permanence par les loups dans les basses terres orientales (NEPL I, NEPL II, LT, BY-UA et SEPL) et dans les Carpates, reflétant grosso modo le regroupement STRUCTURE à  $K = 3$ . En accord avec les résultats de STRUCTURE, nous avons trouvé un niveau modéré de flux de gènes bidirectionnel entre les populations orientales et les régions recolonisées, un faible flux de gènes des basses terres vers les Carpates et des Carpates

vers les basses terres orientales, et presque aucun flux de gènes des Carpates vers les basses terres occidentales (Tableau 4). Nous avons également effectué une analyse où, comme suggéré par GENELAND (à K = 4) et STRUCTURE (à K = 5), la région SEPL a été traitée comme une population discrète. Cette analyse suggère une immigration modérée des populations de l'ouest et du nord-est vers le sud-est, mais un flux génétique beaucoup plus faible dans la direction opposée (Suppl. Table S2). Toutefois, ces résultats doivent être traités avec prudence en raison de la faible taille de l'échantillon du groupe génétique du sud-est, car il est connu que les inégalités dans la taille des échantillons affectent les résultats de BayesAss<sup>37</sup>. Comme les résultats de STRUCTURE et de DAPC suggèrent que la région du CentrPL pourrait être un « creuset » de différentes populations de loups et que la région NEPL I est une zone de transition entre le groupe génétique de l'est et celui de l'ouest, nous avons réanalysé les données après exclusion des deux régions susmentionnées, dans le but d'évaluer le taux de flux de gènes sur de longues distances. Comme prévu, les taux de migration estimés étaient plus faibles que dans l'analyse incluant les zones de transition (Tableau 4, Suppl. Tableau S2). Il est intéressant de noter que si l'estimation du flux génétique de l'est vers l'ouest n'était inférieure que d'environ 30% à la variante incluant les zones de transition, dans le sens inverse, l'estimation était plus de trois fois inférieure, ce qui suggère que les loups de l'ouest de la Pologne se dispersent vers l'est, mais rarement plus loin que la région NEPL I. Pour approfondir cette question, nous avons effectué des analyses supplémentaires dans lesquelles les zones de transition supposées (c'est-à-dire les régions NEPL I et CentrPL) ont été définies comme des groupes distincts (Tableau supplémentaire S3) ou pour l'ensemble des 11 régions géographiques prédéfinies traitées comme des populations distinctes (Tableau supplémentaire S4). Bien que les valeurs exactes des taux de migration estimés doivent être traitées avec prudence en raison de la taille inégale des échantillons, ce qui entraîne de larges intervalles de confiance à 95%, la tendance générale était la même dans toutes les analyses : taux élevé de flux génétique vers l'est depuis les régions occidentales vers les « zones de transition », flux génétique modéré vers l'ouest depuis la région NEPL I et dispersion modérée depuis les régions les plus orientales à la fois vers les « zones de transition » et vers la Pologne occidentale.

**Tableau 4.** Taux de migration entre les populations, estimés avec BayesAss 3.0. Recolonisé - régions regroupées WPL I, WPL II, NWPL, VRV et CentrPL, oriental - régions regroupées NEPL I, NEPL II, LT, BY-UA et SEPL. 0.000\* indique la valeur négative de l'intervalle de confiance inférieur à 95%. Zones de transition exclues - analyses n'incluant pas les régions CentrPL et NEPL I

clusters identified at K = 3					
	western	eastern		Carpathian	
western	*	0.134		0.394	
eastern	0.064	*		0.219	
Carpathian	0.174	0.099		*	
clusters identified at K = 5					
	western	northern	north-eastern	south-eastern	Carpathian
western	*	0.081	0.205	0.209	0.416
northern	0.093	*	0.134	0.197	0.347
north-eastern	0.097	0.081	*	0.078	0.156
south-eastern	0.107	0.121	0.070	*	0.308
Carpathian	0.189	0.167	0.100	0.145	*

**Tableau 5.** Statistiques sommaires des microsatellites pour les groupes identifiés dans les analyses STRUCUTRE

	N	Na	A <sub>R</sub>	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	uH <sub>E</sub>	F <sub>IS</sub>	PA
<b>clusters at K = 3</b>								
1 - western	145	5.154	4.816	0.598	0.587	0.589	-0.015	0
2 - eastern	166	7.538	7.103	0.699	0.719	0.721	0.030	15
3 - Carpathian	69	6.615	6.604	0.670	0.677	0.682	0.018	7
<b>clusters at K = 5</b>								
1 - western	113	4.692	4.223	0.605	0.577	0.579	-0.044	0
2 - north-eastern	61	7.077	6.578	0.744	0.731	0.737	-0.010	11
3 - Carpathian	62	6.308	5.926	0.660	0.667	0.673	0.019	7
4 - northern	44	5.154	4.820	0.579	0.590	0.597	0.030	2
5 - south-eastern	35	5.231	5.183	0.687	0.659	0.669	-0.028	3

## DISCUSSION

### Diversité génétique de la population de loups dans les régions récemment recolonisées

Les mesures de diversité des microsatellites telles que la richesse allélique étaient généralement plus faibles dans les régions récemment colonisées à l'ouest de la Vistule par rapport aux populations de loups de la Baltique et des Carpates (sensu Chapron et al.<sup>15</sup>). Cependant, nous avons observé des différences régionales importantes. Dans le nord-ouest de la Pologne (régions NWPL et WPL II), la diversité était relativement élevée par rapport aux régions du sud-ouest (principalement WPL I, mais aussi VRV). Ces résultats correspondent bien aux schémas de diversité de l'ADNmt : dans les régions septentrionales, les haplotypes w1 et w2 étaient présents à une fréquence similaire, et un troisième haplotype, w6, a également été détecté, tandis que le sud-ouest était fortement dominé par un seul haplotype (w1). Cela peut être attribué à un taux d'immigration différent en provenance de l'est, étant donné que davantage d'individus assignés aux populations de l'est dans les analyses de regroupement ont été détectés dans le nord-ouest.

Malgré la diversité plus faible dans les régions recolonisées, nous n'avons détecté aucune preuve de consanguinité, car les valeurs FIS étaient généralement proches de 0. Au contraire, dans les deux régions ayant la plus faible richesse allélique microsatellitaire (WPL I et VVR), les hétérozygosités observées étaient plus élevées que prévu et les valeurs FIS étaient légèrement négatives. Un schéma similaire a été trouvé lorsque la diversité des grappes identifiées dans STRUCTURE a été analysée : les grappes occidentales aux deux niveaux de partitionnement (K = 3 et K = 5) avaient le plus faible A<sub>R</sub>, mais H<sub>O</sub> dépassait H<sub>E</sub> et F<sub>IS</sub> était négatif (Tableau 5). Ces résultats sont en accord avec des recherches antérieures suggérant l'évitement de la consanguinité chez les canidés<sup>38</sup> et en particulier chez les loups<sup>39-41</sup>. De plus, l'ouest de la Pologne est généralement bien relié par des corridors écologiques<sup>42</sup>, ce qui permet un flux génétique élevé dans cette région. Cela se reflète dans l'absence de sous-structure interne détectable au sein du groupe génétique occidental.

Les valeurs d'hétérozygotie observées étaient beaucoup plus élevées que celles rapportées par Czarnomska et ses collègues<sup>16</sup>, qui ont également détecté des valeurs élevées d'un coefficient de consanguinité chez les loups Polonais. Ces divergences sont assez surprenantes, étant donné que les ensembles de marqueurs microsatellites utilisés ici et dans les travaux susmentionnés se chevauchent largement. Cependant, l'ensemble de données utilisé par

Czarnomska et ses collègues présentait un niveau relativement élevé d'abandon d'allèles (jusqu'à 36% de données manquantes pour certains marqueurs), alors que nos procédures d'isolement et d'amplification de l'ADN à partir d'échantillons non invasifs ont permis de réduire le taux d'abandon moyen à moins de 4%. Ainsi, les valeurs observées d'hétérozygotie et de coefficient de consanguinité enregistrées dans cette étude représentent mieux la diversité réelle des populations étudiées. Les valeurs d'hétérozygotie attendues dans l'étude de Czarnomska et de ses collègues, qui sont moins biaisées par des taux d'abandon importants, sont similaires à celles rapportées ici.

### **Les résultats du regroupement génétique soutiennent la désignation de la population de loups d'Europe centrale**

Les solutions de regroupement des différentes analyses sont généralement compatibles, montrant une séparation relativement claire des populations de loups des Carpates, des basses terres de l'est et de l'ouest. Les seules divergences concernent la sous-structure à l'intérieur de la grappe orientale : la grappe septentrionale identifiée dans STRUCTURE n'a pas été reconnue dans l'analyse spatiale de GENELAND, alors que les résultats du DAPC suggèrent qu'il pourrait s'agir d'une grappe intermédiaire entre les grappes occidentale et nord-orientale. Cependant, la désignation d'un groupe génétique sud-est distinct a été bien étayée, car les assignations de STRUCTURE à  $K = 5$  et de GENELAND à  $K = 4$  étaient concordantes, et tant la région SEPL que le groupe sud-est ont été séparés des autres groupes dans DAPC (par DA3 dans les analyses générales ou DA2 lorsque les Carpates ont été exclues).

De manière surprenante, dans les analyses STRUCTURE à  $K = 2$ , les loups des plaines orientales se sont regroupés avec les Carpates, ce qui indique une très forte différenciation du groupe occidental. Cependant, il n'y avait pas d'allèles privés, car tous les allèles apparaissant dans ce groupe étaient présents dans le pool génétique du groupe oriental (au niveau de partitionnement  $K = 3$ ). Ceci est en accord avec les résultats d'une étude antérieure<sup>16</sup>, qui suggérait une origine nord-est des quelques groupes familiaux de premiers loups déjà établis à l'ouest de la rivière Vistule. Cependant, les fréquences alléliques ont été fortement modifiées, certains allèles (par exemple l'allèle 157 dans le locus FH2137) ayant une fréquence relativement faible à l'est mais étant dominants à l'ouest, ce qui indique un événement de chasse aux fondateurs<sup>43</sup> et un surf allélique<sup>26</sup>. Il convient de noter que les régions occidentales étaient beaucoup plus différenciées de la population de loups des Carpates que les régions de plaine orientales.

D'autres recherches génomiques, écologiques et comportementales sont nécessaires pour déterminer si la spécificité génétique observée chez les loups de l'ouest de la Pologne n'est qu'un effet des processus stochastiques pendant l'expansion de l'aire de répartition et la croissance démographique, lié par exemple à un potentiel de propagation plus élevé des allèles « surfant » sur le front de l'expansion, comme décrit dans plusieurs études empiriques<sup>44-46</sup> ou si elle est liée à des adaptations fonctionnelles aux nouveaux habitats (par exemple, une tolérance plus élevée à l'anthropo-pression). Plusieurs études récentes ont également décrit une combinaison de processus démographiques et adaptatifs dans les populations en expansion<sup>47</sup>, liés par exemple à « l'effet village olympique »<sup>48</sup>. Malgré cette ambiguïté, il ne fait aucun doute que la population de loups nouvellement établie à l'ouest de la Vistule diffère génétiquement des loups habitant la Lituanie, la Biélorussie et les régions

les plus à l'est de la Pologne et ne peut donc pas être considérée comme faisant partie de la population Balte. Nos résultats sont également corroborés par une étude récente suggérant que la population de loups vivant dans l'est de l'Allemagne (adjacente à l'ouest de la Pologne) est génétiquement distincte des loups de la Baltique<sup>49</sup>. Ainsi, le statut actuel d'une unité de conservation distincte (la population des plaines d'Europe centrale) pour les loups de l'ouest de la Pologne et de l'Allemagne semble être pleinement justifié.

### **La Pologne centrale - une zone de contact et un creuset de populations de loups distinctes**

La Pologne centrale est caractérisée par une forte fragmentation du paysage<sup>50,51</sup>, avec une seule parcelle de forêt relativement grande indiquée comme un bon habitat pour les loups par le modèle d'adéquation<sup>25</sup>. Bien que des loups y aient été recensés au moins depuis la première décennie du 21<sup>ème</sup> siècle<sup>52</sup>, leur origine génétique n'a jamais été étudiée auparavant. Nous avons constaté que cette région se caractérise par une grande diversité génétique des loups, tant au niveau de l'ADN mitochondrial que de l'ADN nucléaire. C'est la seule région que nous ayons étudiée où les quatre principaux haplotypes de l'ADNmt étaient présents. De plus, nous y avons trouvé des loups représentant chacun des cinq clusters identifiés dans les analyses STRUCTURE, ainsi que plusieurs individus mélangés. Selon les analyses GENELAND, il s'agit de la région où les frontières délimitées de toutes les populations (à la fois à  $K = 3$  et  $K = 4$ ) se rencontrent. L'analyse de Bayes a indiqué un taux élevé de flux génétique en provenance des régions occidentales et orientales vers la région CentrPL, et une migration plus faible, mais non négligeable, en provenance des Carpates. Nos résultats suggèrent donc que la Pologne centrale est une zone de contact entre les Carpates, les basses terres du sud-est (qui, comme l'indique la fréquence élevée de l'haplotype w3, pourraient être d'origine pontique), le nord-est (Baltique) et les groupes génétiques de loups de l'ouest. Il semble également s'agir d'un point chaud de mélange, car nous y avons identifié des meutes de loups dans lesquelles les individus reproducteurs ont été assignés à différents groupes. L'évolution de la population de loups dans cette région est particulièrement intéressante et mérite des recherches génétiques et écologiques plus approfondies.

### **Recolonisation de zones montagneuses par des loups de plaine**

Notre ensemble de données comprenait six loups des trois groupes familiaux résidents dans les Sudètes (sud-ouest de la Pologne), recolonisés par cette espèce après plus de 200 ans d'absence<sup>53</sup>. Tous ces individus présentaient un haplogroupe 1 d'ADNmt (w1 - cinq loups, et w2 - un loup) typique des plaines d'Europe centrale et orientale<sup>29</sup>. De manière concordante, ils ont été assignés à des populations de plaine dans toutes les analyses de regroupement bayésiennes et dans la DAPC. Ce résultat est particulièrement significatif car l'une des explications les plus probables de la différenciation entre les loups Polonais des plaines et les loups des Carpates est l'hypothèse de dispersion biaisée par l'habitat natal<sup>16,21</sup>. Les zones des Sudètes occupées par les loups sont séparées de la bordure ouest des Carpates par moins de 200 km et les caractéristiques de leur paysage ressemblent beaucoup plus à celles des Carpates qu'à celles des plaines de l'ouest de la Pologne<sup>54,55</sup>. Même si nous sommes conscients que nos résultats doivent être traités avec prudence car la recolonisation des Sudètes est très récente et l'ensemble des données comprend un petit nombre de loups, ils sont soutenus par une autre étude qui a trouvé que la partie Tchéque de cette chaîne de montagnes a été colonisée par des loups assignés à la population de plaine<sup>20</sup>. Ainsi, le cas des Sudètes met en évidence la grande plasticité écologique de la population de loups d'Europe centrale en pleine

expansion. Cela met également en évidence l'importance possible des facteurs anthropogéniques, car la bordure orientale des Sudètes est séparée des Carpates par la porte de Moravie relativement étroite, mais densément peuplée et urbanisée<sup>42,55</sup>.

D'autre part, nous avons également détecté des dispersions probables de loups des Carpates vers les basses terres. Une meute dans la région du Centre a été classée avec concordance comme étant d'origine des Carpates dans les analyses ADNmt, STRUCTURE, GENELAND et DAPC. Une meute de loups portant l'haplotype w6 des Carpates a également été détectée dans la région NWPL, mais les données microsatellites ont révélé leur origine nord-est, suggérant un flux génétique passé entre la population des Carpates et celle de la Baltique. Cette hypothèse a été confirmée par l'analyse bayésienne de la population de loups de Lituanie, où plusieurs individus portaient des traces de **mélange** avec la population des Carpates. Des individus **mélangés** ont également été détectés en Biélorussie, en Ukraine et dans de petites parcelles forestières de la région NEPL II, mais pas dans les principales parcelles forestières de la Pologne de basse altitude, y compris la région SEPL adjacente aux Carpates. Cela peut s'expliquer par un effet de blocage dû à une forte densité<sup>27,56</sup> : les grandes forêts Polonaises sont saturées de meutes de loups, ce qui laisse peu d'espace aux disperseurs des Carpates, les obligeant à se déplacer sur de longues distances vers des régions moins saturées, avec des territoires vacants en raison des prélèvements importants de loups en Ukraine, en Biélorussie et en Lituanie.

### **Implications des résultats du regroupement génétique pour les futurs plans de gestion et de conservation**

L'une des étapes les plus importantes de la planification de la conservation des populations d'espèces sauvages est la reconnaissance de leur diversité intraspécifique, suivie de la délimitation d'unités de gestion (UG)<sup>57</sup> adéquates. L'identification des UG se justifie principalement par le degré de divergence génétique à partir duquel les populations deviennent démographiquement indépendantes<sup>58</sup>. Cependant, pour éviter les échecs de gestion, l'identification des UG doit prendre en compte non seulement les caractéristiques biologiques ou géographiques, mais aussi les facteurs sociaux et politiques<sup>59</sup>. Plusieurs UG ont été identifiées pour les loups d'Europe<sup>60,61</sup>, pour lesquelles des actions clés spécifiques ont déjà été proposées<sup>62</sup>. À l'origine, la délimitation de ces UG (appelées populations) reposait principalement sur des données relatives à la répartition des loups, aux caractéristiques géographiques (par exemple, l'existence de barrières), à la qualité de l'habitat, aux capacités de dispersion et à différentes conditions de gestion. Cependant, les auteurs ont appelé à des recherches plus approfondies sur la génétique des populations pour permettre la révision de la structuration des populations<sup>60</sup>.

Les sous-populations délimitées par notre étude répondent aux critères de l'unité monétaire définis par Moritz<sup>63</sup>, qui les décrit comme des « populations présentant une divergence significative des fréquences des allèles au niveau des loci nucléaires ou mitochondriaux, indépendamment du caractère distinctif des allèles sur le plan phylogénétique ». Dans cette étude, nous avons confirmé la séparation des populations de loups des Carpates, de la Baltique et de l'Europe centrale, et soutenu la proposition de Linnell et de ses collègues<sup>60</sup> de les traiter comme des UG distinctes. En outre, nous suggérons de considérer une UG supplémentaire (population de loups du sud-est de l'Europe) située dans le sud-est de la Pologne, que nous avons trouvée génétiquement différente de toutes les autres sous-



populations (Suppl. Fig. S6). Ceci est en accord avec les résultats précédents<sup>16,21</sup>, qui ont décrit une sous-population discrète située latitudinalement entre les régions des Carpates et de la Baltique et s'étendant vers l'est, au-delà de la frontière de l'État Polonais, à travers les basses terres de l'Ukraine et de la Biélorussie et plus loin dans la steppe pontique. Cette différenciation génétique est liée à des variables environnementales spécifiques<sup>21</sup> et à des préférences en matière de proies<sup>64</sup>. Nous proposons donc une mise à jour des UG pour les loups en Europe centrale, en prenant en considération toutes les études antérieures ainsi que les résultats de notre analyse (Suppl. Fig. S7). Nous sommes conscients que les frontières exactes entre les UG doivent être traitées avec prudence en raison de l'échange d'individus, qui est le plus intense à leurs bords. Néanmoins, nous pensons que notre suggestion sera utile pour la gestion future des populations de loups en Europe centrale et qu'elle alimentera une coopération internationale plus large pour la conservation de ce carnivore.

## CONCLUSIONS

Le résultat le plus important de cette étude est la distinction génétique de la population de loups vivant dans l'ouest de la Pologne par rapport aux populations voisines. La diversité génétique de la population de l'ouest de la Pologne est plus faible que celle de la population de la Baltique, en raison de l'effet fondateur et d'un flux génétique est-ouest limité. Les modèles de recolonisation révélés (par exemple, l'expansion des loups de plaine vers les zones montagneuses) confirment que la structure génétique détectée de la population de loups en Europe centrale est davantage façonnée par l'histoire démographique récente que par des facteurs écologiques.

## METHODES DE TRAVAIL

### Zone d'étude

Bien que notre étude se soit principalement concentrée sur la population de loups Polonais, nous avons également analysé des échantillons collectés en Lituanie, en Biélorussie, en Slovaquie et dans l'est de la République Tchèque. La zone d'étude totale s'étend donc entre 48°5'-56°4'N et 14°1'-30°5'E. Le paysage de cette partie de l'Europe a été profondément façonné par les glaciations du Pléistocène et se compose principalement de basses terres, jusqu'à 200 m au-dessus du niveau de la mer, avec quelques collines frontales et morainiques qui, dans les parties septentrionales, sont accompagnées de lacs. La partie sud de la zone d'étude comprend deux chaînes de montagnes : les Sudètes (altitude maximale de 1 603 m au-dessus du niveau de la mer) et les Carpates (altitude maximale de 2 655 m au-dessus du niveau de la mer).

La région bénéficie d'un climat continental-atlantique de transition, avec des températures moyennes de -1,1 à 0,6°C en janvier et de 18,1 à 19,5°C en juillet. Les précipitations moyennes varient de 500 à 800 mm. La majorité de la zone est une terre agricole, mais la couverture forestière varie de 30% en Pologne à près de 40% en Biélorussie. Les forêts sont dominées par des peuplements gérés de pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) et d'épicéa commun (*Picea abies*), mais dans les parties sud et ouest, on trouve de plus grandes parcelles de forêts mixtes et de forêts de feuillus avec une prédominance de hêtres (*Fagus sylvatica*), de bouleaux (*Betula* sp.), de charmes (*Carpinus betulus*), de chênes (*Quercus* sp.), d'aulnes (*Alnus* sp.) et de peupliers (*Populus* sp.).

En Europe centrale, le loup cohabite avec deux autres grands carnivores - le lynx eurasiens (*Lynx lynx*), plus répandu, et l'ours brun (*Ursus arctos*), qui est limité aux Carpates et aux basses terres des États baltes<sup>15</sup>. En outre, la région est caractérisée par d'abondantes populations d'ongulés sauvages qui sont les principales proies du loup<sup>64</sup> - cerf élaphe (*Cervus elaphus*), chevreuil (*Capreolus capreolus*) et sanglier (*Sus scrofa*), avec moins d'élans (*Alces alces*), de bisons européens (*Bison bonasus*) réintroduits localement, et de chamois (*Rupicapra rupicapra*) limités aux montagnes. Il existe également des populations isolées d'espèces exotiques introduites à des fins de chasse, telles que le daim (*Dama dama*), le cerf sika (*C. nippon*) et le mouflon (*Ovis musimon*), ainsi qu'une importante population de castors d'Eurasie (*Castor fiber*).

La région présente un gradient évident de densité de population humaine du nord-est au sud-ouest, allant d'environ 45 habitants/1km<sup>2</sup> en Lituanie et au Belarus à 110-130 habitants/1km<sup>2</sup> en Pologne, en Slovaquie et en République Tchèque. Des tendances similaires sont observées en ce qui concerne l'urbanisation et la densité des infrastructures de transport<sup>65,66</sup>.

### Stratégie d'échantillonnage

Notre objectif principal était d'obtenir un échantillonnage dense et représentatif des zones précédemment non étudiées à l'ouest de la Vistule qui ont été recolonisées par les loups au cours de la dernière décennie<sup>14</sup>. Comme référence, nous avons recueilli l'ADN de loups habitant les principaux massifs forestiers de l'est de la Pologne et de l'ouest des Carpates. En outre, nous avons recueilli des échantillons de groupes familiaux de loups qui se sont récemment établis dans des complexes forestiers relativement petits du nord-est de la Pologne (régions NEPL\_I et NEPL\_II, voir Fig. 1) qui sont particulièrement intéressants car ces habitats ont été classés comme suboptimaux<sup>25</sup>, ainsi que des meutes habitant le sud-est de la Pologne (SEPL), une région qui s'est avérée abriter une sous-population de loups distincte sur la base d'une analyse précédente de l'ADNmt<sup>16</sup>. Pour comparer la structure génétique de la population de loups Polonaise avec les régions adjacentes, nous avons également analysé des échantillons recueillis en Lituanie, en Biélorussie, en Ukraine (zone de Tchernobyl), en Slovaquie et dans l'est de la République Tchèque.

Des échantillons non invasifs N = 2110 (principalement des excréments - N = 1792 mais aussi de l'urine - N = 139, des poils - N = 139, du sang d'œstrus - N = 29 et des prélèvements sur des loups tués - N = 11) ont été collectés de 2011 à 2018 par les auteurs et des volontaires formés tout au long de l'année, lors de suivis de loups sur de longues distances sur des routes forestières, des sentiers touristiques et autour de loups connus et de sites de rendez-vous (voir<sup>14</sup> pour plus de détails). Nous avons également recueilli des échantillons de tissus et de poils de loups tués lors d'accidents de circulation (N = 97), abattus illégalement ou pris au piège (N = 29) ou trouvés morts à la suite de maladies ou d'autres causes naturelles (N = 16). En outre, nous avons analysé des échantillons de sang et de poils d'animaux blessés dans des accidents de la circulation ou par des braconniers (N = 9). Enfin, nous avons analysé des échantillons de tissus provenant de loups chassés légalement en Lituanie (N = 63) et en Slovaquie (N = 23). Aucun animal n'a été spécifiquement tué ou capturé pour cette étude. La distribution des lieux d'échantillonnage est présentée sur la Figure 1. Les échantillons ont été divisés en groupes correspondant à des régions géographiques, dont les frontières étaient basées sur d'éventuelles barrières de dispersion (par exemple la rivière Vistule), sur les résultats de recherches antérieures concernant la structure génétique des populations de loups en Europe centrale<sup>16,20,21</sup> ou, dans le cas de régions non étudiées auparavant, sur la

dynamique de leur recolonisation par les loups<sup>14,17</sup>. Comme la présence d'allèles spécifiques aux chiens peut potentiellement interférer dans les analyses de la structure des populations en aval, nous avons cherché à éliminer de notre ensemble de données tous les hybrides putatifs entre loups et chiens. Ainsi, 50 échantillons de chiens (poils, sang ou tissus) ont été collectés auprès de vétérinaires et de propriétaires privés, ainsi qu'auprès d'individus tués par des véhicules, et ont été utilisés comme groupe de référence pour détecter d'éventuels hybrides chien-loup. Les propriétaires de chiens nous ont donné l'autorisation d'utiliser ces échantillons dans le cadre de la recherche. Les détails de cette procédure se trouvent dans les méthodes supplémentaires.

Les échantillons de crottes et de tissus ont été fixés avec de l'éthanol à 96% et conservés à +4°C, tandis que les poils, les écouvillons et le sang collectés sur des cartes FTA (Whatman) ont été conservés à température ambiante dans des enveloppes de papier sec contenant un dessiccateur. Les échantillons d'urine ont été mélangés avec 2 volumes d'éthanol à 96% et d'acétate de sodium (concentration finale de 100 mM) et conservés à -20°C.