

# Diversité génétique, structure et histoire démographique de lignées de loups uniques et anciennes en Inde

Conservation Genetics  
<https://doi.org/10.1007/s10592-023-01553-y>

RESEARCH ARTICLE



## Genetic diversity, structure, and demographic histories of unique and ancient wolf lineages in India

Yellapu Srinivas<sup>1</sup>  · Yadvendradev Jhala<sup>1</sup> 

### Résumé

L'évaluation de la diversité génétique, de la connectivité des populations, des modèles démographiques et des relations phylogéographiques est essentielle pour comprendre l'histoire évolutive des espèces et ainsi aider à prendre des décisions en matière de gestion de la conservation. Les loups indiens (actuellement *Canis lupus pallipes* et *Canis lupus chanco*) sont considérés comme des lignées anciennes, uniques et divergentes parmi les loups gris, mais la génétique de leurs populations est mal connue. Pour combler cette lacune, nous avons collecté des échantillons de loups de la péninsule Indienne ( $n = 77$ ) et de l'Himalaya ( $n = 24$ ) et utilisé une combinaison de marqueurs maternels (ADNmt CR et Cyt *b*) et biparentaux (microsatellites nucléaires) pour estimer les niveaux de diversité génétique, examiner les schémas de structuration génétique entre eux et au sein de leur aire de distribution, et évaluer leurs histoires démographiques. Les deux populations de loups ont montré des niveaux modérés de variabilité génétique, comparables à ceux d'autres loups gris. De faibles niveaux de différenciation génétique ont été observés chez les loups de la péninsule Indienne et de l'Himalaya, ce qui indique des niveaux élevés de flux de gènes au sein de leurs populations. L'analyse moléculaire a mis en évidence le caractère unique des deux loups Indiens, confirmé par la présence d'haplotypes uniques indiquant qu'il n'y a pas eu de métissage entre eux. L'analyse démographique utilisant à la fois l'ADNmt et les microsatellites a révélé un déclin de la taille des populations des deux lignées de loups, qui ont toutes deux subi des goulots d'étranglement. Les estimations de la taille effective de la population dans le passé ont révélé des déclinés récents de la population des deux lignées de loups Indiens à environ 25-50 générations, ce qui correspond à il y a environ 100-200 ans. Nos résultats soutiennent la désignation des deux lignées de loups Indiens comme deux espèces distinctes *Canis pallipes* et *Canis himalayensis* et suggèrent d'accroître les efforts de conservation pour sauver de l'extinction ces espèces de loups uniques et anciennes.

### INTRODUCTION

La modification de l'habitat et la persécution directe par l'homme sont considérées comme la principale raison du récent déclin historique de la plupart des carnivores au cours des derniers siècles (Ripple et al. 2014). Les espèces à faible densité sont très vulnérables à la perte et à la fragmentation de l'habitat, qui, par le biais de la stochasticité démographique et génétique, augmente les risques d'extinction des populations locales (Lande 1993 ; Crooks 2002). Les changements d'utilisation des terres à l'échelle du paysage peuvent gravement affecter la capacité des animaux à se déplacer entre des parcelles d'habitat appropriées,

entraînant ainsi une fragmentation de la population, un isolement reproductif et une perte d'aptitude (Frankham 2006 ; Allendorf et al. 2013). La diversité génétique joue un rôle important dans l'aptitude des individus et des populations en leur donnant la possibilité de s'adapter aux changements environnementaux (Hughes et al. 2008). La diversité génétique et la taille des populations sont négativement corrélées et, par conséquent, les petites populations qui ont une diversité génétique réduite sont plus sujettes aux événements d'extinction en raison de la stochasticité démographique et de la dépression de consanguinité (Reed et Frankham 2003 ; Frankham 2006). Une faible diversité génétique est donc préoccupante, en particulier pour les espèces qui existent en petites populations et dont le flux génétique entre elles est limité (Roelke et al. 1993 ; Banks et al. 2013). L'évaluation de la diversité génétique et de la connectivité des populations d'espèces est donc essentielle pour formuler des politiques de conservation et de gestion.

Le loup gris *Canis lupus* est généralement considéré comme l'un des grands carnivores les plus largement distribués, habitant la majeure partie de l'hémisphère nord, du Haut-Arctique aux déserts et aux terres arbustives sèches du Moyen-Orient et du sud de l'Amérique du Nord (Mech 1974 ; Mech et Boitani 2010). Bien que considéré comme abondant, une réduction globale de l'aire de répartition historique du loup de 68% et l'élimination totale de quelques zones ont été enregistrées au cours des derniers siècles en raison de la persécution (Musiani et al. 2010 ; Ripple et al. 2014). Trente-deux sous-espèces de *Canis lupus* ont été reconnues dans leur aire de répartition mondiale (Wilson et Reeder 2005). De nombreuses analyses morphologiques, de l'ADN mitochondrial (ADNmt), des marqueurs nucléaires et des analyses génomiques ont amélioré notre compréhension de l'histoire évolutive des loups gris. L'analyse du **mitogénome** entier a révélé que certaines des lignées mitochondriales observées chez les loups anciens étaient absentes chez les loups contemporains, indiquant l'extinction ou le remplacement de ces anciennes lignées (Thalmann et al. 2013 ; Koblmüller et al. 2016). De même, l'analyse du génome dans son ensemble a révélé un métissage généralisé entre les espèces de *Canis*, notamment entre les loups gris et les chiens, les chacals dorés et les loups gris, les coyotes et les loups gris, ainsi que des espèces actuelles de lignées fantômes non définies (VonHoldt et al., 2011 ; Fan et al. 2016 ; VonHoldt et al. 2016 ; Gopalakrishnan et al. 2018 ; Pilot et al. 2019 ; Wang et al. 2020).

Malgré la vaste répartition du loup gris et son histoire évolutive complexe, la majorité des études moléculaires ont été réalisées en Amérique du Nord et en Europe, et relativement peu en Asie. Sur la base d'une analyse phylogénétique utilisant l'ADNmt, les lignées de loups sont les suivantes : Le loup africain *Canis lupaster*, le loup himalayen *Canis lupus himalayensis* et le loup Indien *Canis lupus pallipes* ont divergé en tant que clades sœurs monophylétiques et sont proposés comme génétiquement distincts des loups gris holarctiques contemporains (*C. lupus*) et méritent un statut d'espèce distinct (Aggarwal et al. 2003, 2007 ; Sharma et al. 2003 ; Rueness et al. 2011 ; Gaubert et al. 2012 ; Werhahn et al. 2017, 2018 ; Hennelly et al. 2021 ; Wang et al. 2022). Les estimations de la divergence des dates basées sur les séquences mitochondriales répartissent les loups de l'Himalaya et les autres loups entre 0,55 et 0,8 Mya (millions d'années) et les loups de la péninsule Indienne et les autres loups entre 0,27 et 0,4 Mya (Sharma et al. 2003 ; Werhahn et al. 2018). En revanche, Fan et al. (2016) ont estimé que la séparation entre les loups d'Eurasie et d'Amérique du Nord remontait à 12 500 ans en utilisant des données génomiques nucléaires. Sur la base de cette analyse, il semble probable que les temps de séparation entre les loups Indiens et les autres loups pourraient être plus

récents par rapport aux estimations antérieures obtenues à partir des données séquencées de l'ADNmt.

L'UICN classe ces deux lignées de loups Indiens parmi les moins préoccupantes (Boitani et al. 2020), car elles ne sont pas officiellement considérées comme des espèces ou des sous-espèces distinctes. Mais au niveau régional, ils sont tous deux considérés comme en danger et protégés par l'annexe I de la loi Indienne sur la protection de la faune et de la flore, 1972, et par l'annexe 1 de la Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction (CITES). **La plupart des recherches menées sur les loups Indiens se limitent à l'écologie et peu d'études sur la phylogénétique moléculaire mettent en évidence leur caractère unique.** Srinivas et Jhala (2021) ont analysé les mesures crâniennes de spécimens de loups Indiens de musée et ont trouvé que les loups de l'Himalaya avaient les crânes les plus larges mais n'ont pas pu les distinguer de manière fiable des loups péninsulaires Indiens même après avoir pris en compte les mesures crâniennes et la morphologie structurelle des poils. La population de loups de la péninsule Indienne est estimée à 3200 individus (Jhala et al., 2022) et celle des loups de l'Himalaya à 400-1000 individus (Fox et Chundawat 1995). L'empoisonnement des loups, le braconnage pour les peaux dans l'Himalaya, l'hybridation et l'envahissement des pools génétiques des loups sauvages par les chiens, et les maladies propagées par les chiens sont considérés comme des menaces majeures pour la survie des loups Indiens (Jhala et Giles 1991 ; Jhala 2003 ; Vanak et Gompper 2009).

Les études de génétique des populations et d'hybridation suggèrent que les loups se dispersent sur de longues distances et peuvent s'hybrider avec d'autres membres du genre *Canis*, un processus qui favorise le flux génétique, conserve un niveau élevé de diversité génétique et réduit les niveaux de diversification des populations (Vilà et Wayne 1999 ; Pilot et al. 2010 ; Fan et al. 2016). Cependant, en raison de l'augmentation des activités anthropogéniques telles que la modification des paysages et le développement des infrastructures, la dispersion peut être compromise, fragmentant ainsi les populations de loups et entraînant une diminution de la diversité génétique. De plus, les loups de l'Inde sont considérés comme uniques et anciens, mais on ne sait toujours rien de la génétique de leurs populations. C'est pourquoi, dans cette étude, nous utilisons le génotypage de microsatellites nucléaires et le séquençage de l'ADNmt pour les loups de la péninsule Indienne et de l'Himalaya afin d'estimer les niveaux de diversité génétique, d'examiner les modèles de structuration génétique dans leur aire de répartition et d'évaluer leurs paramètres démographiques au cours de l'histoire.

## MATERIELS ET METHODES

### Échantillonnage et extraction d'ADN

Les échantillons de tissus, de sang et de poils (loups Indiens,  $n = 77$  ; loups de l'Himalaya,  $n = 24$ ) utilisés dans cette étude ont été prélevés entre 1995 et 2020 dans le cadre d'une étude de radiotélémétrie sur les loups Indiens, de collections de loups d'origine connue dans des parcs zoologiques et de celles fournies par les départements forestiers des États (Fig. 1A). Les autorisations de capture et d'équipement radio-collier ont été obtenues auprès du directeur de la conservation de la faune sauvage du gouvernement Indien et du gardien en chef de la faune sauvage des États, conformément à la loi sur la protection de la faune sauvage

(Wildlife (Protection) Act) de 1972. La recherche a été approuvée par le Conseil de la formation, de la recherche et de l'enseignement du Wildlife Institute of India, qui examine également les aspects éthiques de la recherche avant de donner son accord. Les échantillons ont été conservés dans de l'éthanol à 90% ou dans des solutions tamponnées, puis transférés au laboratoire pour être stockés à - 20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN. L'ADN génomique a été extrait du kit DNeasy pour le sang et les tissus (Qiagen, Allemagne) en suivant les conditions du fabricant. Toutes les extractions ont été effectuées dans des lots comprenant des contrôles négatifs afin de surveiller toute contamination potentielle.

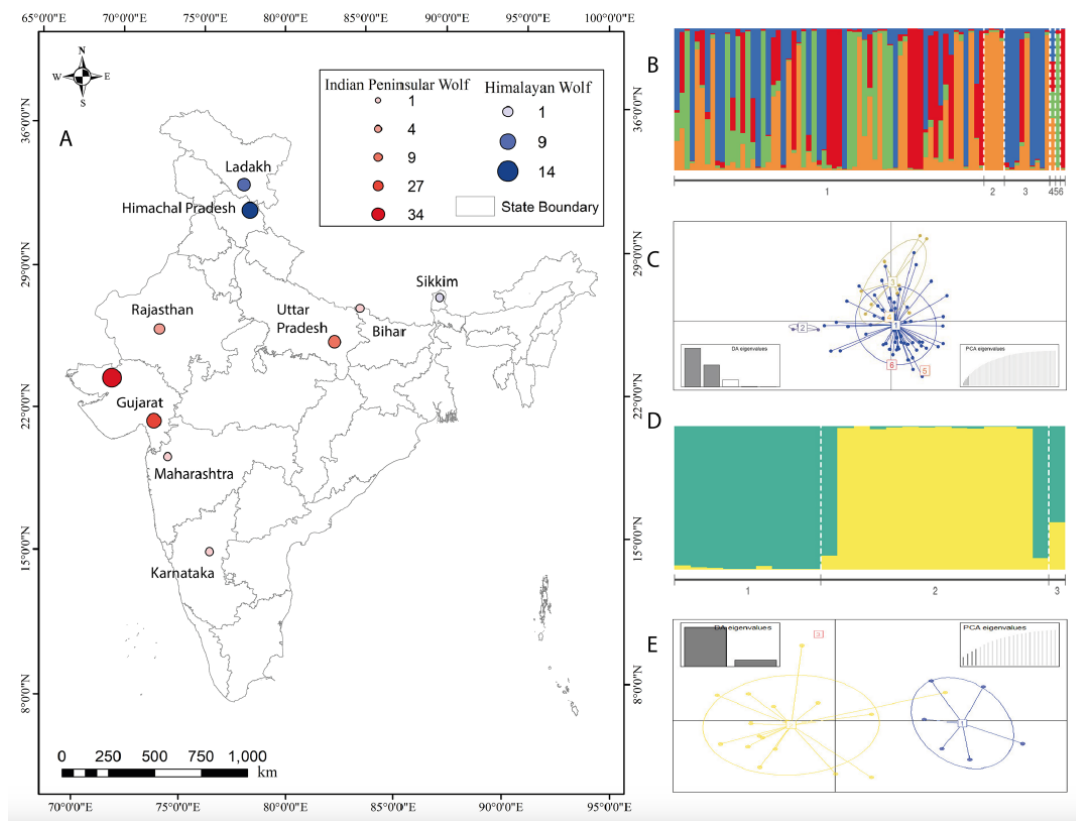
### Séquençage mitochondrial...

### Génotypage de microsatellites...

### Analyse des données...

*ADN mitochondrial...*

*Microsatellites...*



**Fig. 1.** Carte montrant les lieux d'échantillonnage des loups de la péninsule Indienne et de l'Himalaya utilisés dans cette étude (A). Résultats de l'analyse de la structure génétique des populations de loups de la péninsule indienne (B, C) et de l'Himalaya (D, E) sur la base de 25 loci microsatellites. Les diagrammes à barres récapitulatifs indiquent la structure génétique de 77 loups péninsulaires indiens individuels à l'aide des séries STRUCTURE à K = 4 (B). Chaque individu est représenté par une barre verticale et la longueur colorée de chaque barre indique la probabilité d'appartenance à chaque groupe. Diagramme de dispersion de l'analyse DAPC (C) avec chaque population de loups de la péninsule Indienne indiquée par des codes de couleur différents et des ellipses d'inertie indiquées sur les deux premiers axes. Les populations 1, 2, 3, 4, 5 et 6 représentent respectivement le Gujarat, le Rajasthan, l'Uttar Pradesh, le Bihar, le Maharashtra et le Karnataka. Les diagrammes à barres récapitulatifs indiquent la structure génétique de 24 loups de l'Himalaya en utilisant les séries STRUCTURE à K = 2 (D). Chaque individu est représenté par une barre verticale, et la longueur colorée de chaque barre indique la probabilité d'appartenance à chaque groupe. Différenciation des populations de loups de l'Himalaya (E) telle que représentée sur le premier axe de l'analyse discriminante des composantes principales. Les localités d'échantillonnage 1, 2 et 3 représentent respectivement le Ladakh, l'Himachal Pradesh et le Nord Sikkim

## RESULTATS

### Analyse du séquençage mitochondrial

#### *Unicité des loups indiens*

Les arbres phylogénétiques bayésiens construits en utilisant séparément les séquences CR et Cyt *b* convergent pour montrer l'unicité des loups de la péninsule Indienne et de l'Himalaya. L'arbre phylogénétique bayésien construit à l'aide de la séquence CR regroupait tous les loups de l'Himalaya dans un clade de base unique par rapport à tous les autres loups et chiens holarctiques. Les loups Indiens (*Canis lupus pallipes*), qui comprennent les loups de la péninsule Indienne et les loups du Bangladesh, se sont regroupés au sein d'un seul clade, mais se sont séparés du grand clade composé des loups et des chiens holarctiques. Cependant, les loups du Pakistan et de l'Iran se sont regroupés au sein du clade des loups holarctiques (Fig. 2). D'autre part, l'arbre phylogénétique construit à partir des fragments du gène Cyt *b* regroupait les loups de l'Himalaya et les loups de la péninsule Indienne en position basale et distincte du clade des loups gris holarctiques et des chiens (Fig. 1 supplémentaire).

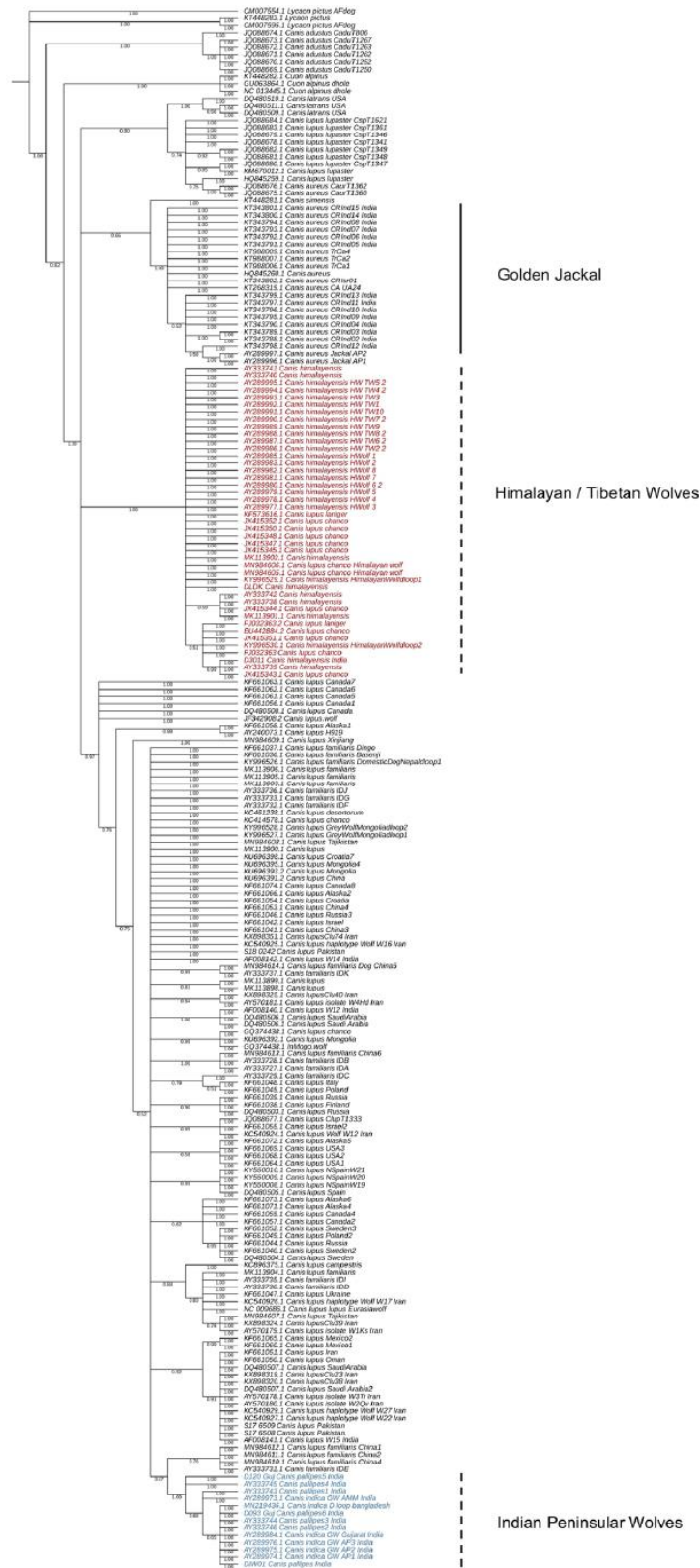
#### *Loup de la péninsule Indienne*

Les loups de la péninsule Indienne ( $n = 105$ ) présentaient des valeurs de diversité de l'ADNmt de  $H = 0,704 \pm 0,029$ ,  $\pi = 0,003 \pm 0,002$ , avec un nombre moyen de différences par paire de  $1,085 \pm 0,719$  et sept sites polymorphes dans le fragment de gène CR de 336 pb. Au total, six haplotypes ont été observés pour le fragment de gène CR, y compris les quatre haplotypes signalés précédemment (Tableau 1 et Tableau supplémentaire 2). De même, dans le fragment de 329 pb du gène Cyt *b*, une diversité génétique de  $H = 0,694 \pm 0,038$ ,  $\pi = 0,003 \pm 0,002$  ( $n = 88$ ), un nombre moyen de différences par paire de  $1,089 \pm 0,7223$  et cinq sites polymorphes ont été observés. Six haplotypes ont été identifiés dans le segment génique Cyt *b* et tous les haplotypes ont été rapportés pour la première fois pour les loups de la péninsule Indienne (Tableau 1 et Tableau supplémentaire 3). Les statistiques démographiques basées sur les valeurs *D* de Tajima ( $-0,441$ ,  $p = 0,388$ ) et *F*s de Fu ( $-0,072$ ,  $p = 0,556$ ) étaient négatives en utilisant CR pour les loups de la péninsule Indienne, mais les valeurs n'étaient pas significatives, indiquant un équilibre de la population. D'autre part, la distribution des valeurs d'inadéquation observées a montré une bonne adéquation avec les valeurs de distribution attendues, confirmée par l'indice d'irrégularité de Harpending, faible et non significatif, avec une valeur de  $r = 0,095$  ( $p = 0,53$ ) rejetant l'hypothèse nulle d'expansion de la population (Fig. 2A supplémentaire).

Le réseau d'haplotypes de jonction médian construit pour les loups de la péninsule Indienne à l'aide des séquences CR a révélé un réseau d'haplotypes faiblement structuré avec six haplotypes distribués dans de multiples connexions alternatives (Fig. 3A). Les six haplotypes étaient séparés les uns des autres par une à quatre substitutions d'une seule paire de bases. L'hap\_1 a été observé comme étant le plus dominant dans le Gujarat ( $n = 38$ ), l'Uttar Pradesh ( $n = 2$ ), le Maharashtra ( $n = 2$ ), le Tamil Nadu ( $n = 4$ ) et les échantillons anciens ( $n = 2$ , collectés au Rajasthan et au Bengale occidental), suivi par les haplotypes Hap\_2 ( $n = 21$ ) et Hap\_4 ( $n = 21$ ) (Tableau complémentaire 2 et Figure 3A). Le réseau d'haplotypes de jonction médiane construit à partir des séquences de Cyt *b* a également révélé un réseau d'haplotypes faiblement structuré avec six haplotypes répartis dans de multiples connexions alternatives (Fig. 3C). Les six haplotypes étaient séparés les uns des autres par une ou deux substitutions d'une seule paire de bases. L'hap\_2 a été observé comme étant l'anthapotype le plus



dominant dans les régions du Gujarat ( $n = 27$ ), du Rajasthan ( $n = 3$ ), de l'Uttar Pradesh ( $n = 5$ ) et du Tamil Nadu ( $n = 4$ ), suivi par l'hap\_1, qui est distribué dans les régions du Gujarat ( $n = 18$ ), du Rajasthan ( $n = 3$ ) et du Maharashtra ( $n = 1$ ) (Tableau complémentaire 3 et Figure 3B).



**Fig. 2.** Relations phylogénétiques bayésiennes entre les loups de la péninsule indienne et de l'Himalaya, les loups holarctiques et d'autres espèces de *Canis*, sur la base des séquences d'ADN CRD avec les numéros d'accèsion GenBank

**Tableau 1.** Mesures des estimations de la diversité génétique (microsatellites et ADNmt) pour les loups de la péninsule Indienne et de l'Himalaya

Diversity estimates	Indian Peninsular wolf	Himalayan wolf
<i>mtDNA control region</i>		
Sample size	105	49
No. of haplotypes	6	6
Haplotype diversity	0.704 (0.029)	0.751 (0.038)
Nucleotide diversity	0.003 (0.002)	0.136 (0.066)
Tajima's D ( <i>p</i> -value)	(- 0.441 (0.388))	(- 0.072 (0.556))
Fu's Fs ( <i>p</i> -value)	(- 0.072 (0.556))	(- 3.067 (0.718))
<i>Microsatellite DNA</i>		
Sample size	77	24
Mean alleles/locus	7 (1.658)	4.24 (0.831)
Allelic range	21.440 (8.973)	12.960 (5.660)
Expected heterozygosity	0.702 (0.065)	0.638 (0.057)
Observed heterozygosity	0.686 (0.079)	0.695 (0.097)
FIS	0.153	- 0.079

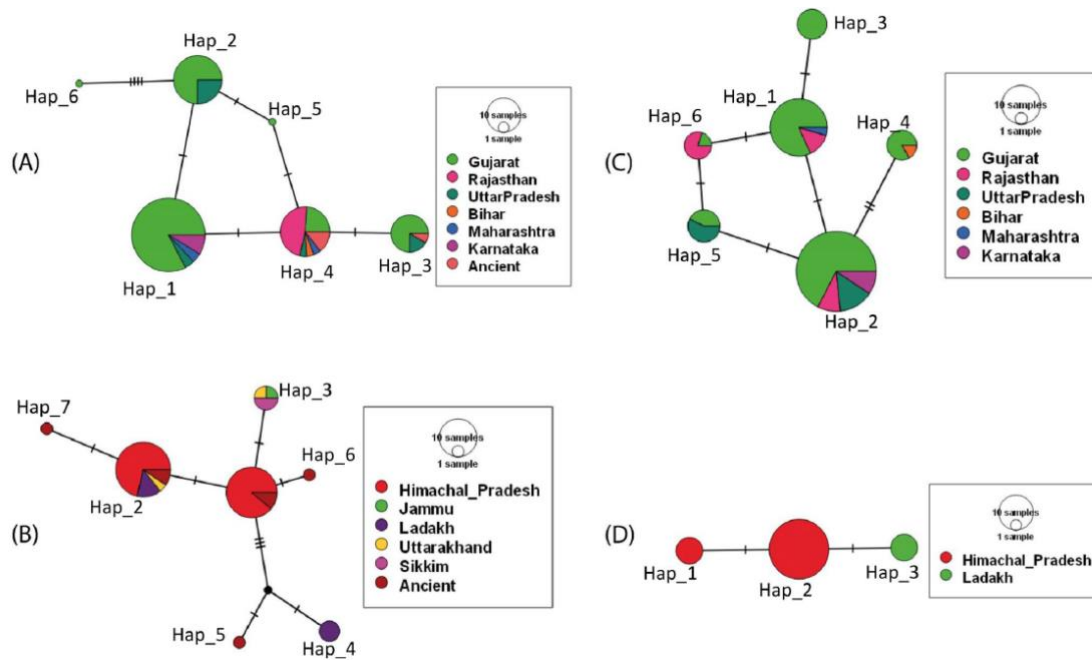
\*SD values are denoted in brackets

### *Loup de l'Himalaya*

Les loups de l'Himalaya ( $n = 49$ ) présentaient des valeurs de diversité de l'ADNmt de  $H = 0,751 \pm 0,038$ ,  $\pi = 0,136 \pm 0,066$  avec un nombre moyen de différences par paire de 5,275  $\pm$  3,961 et 10 sites polymorphes observés dans le fragment de gène CR de 335 pb. Au total, **sept haplotypes** ont été observés dans le fragment de gène CR, y compris les six haplotypes signalés précédemment (Tableau 1 et Tableau complémentaire 4). De même, une faible diversité génétique a été observée pour le fragment de 279 pb du gène Cyt *b* ( $n = 42$ ;  $H = 0,459 \pm 0,080$ ,  $\pi = 0,001 \pm 0,001$ ) avec un nombre moyen de différences par paire de 0,501  $\pm$  0,435 et deux polymorphismes observés. Trois haplotypes ont été identifiés dans le fragment du gène du Cyt *b*, y compris les deux haplotypes signalés précédemment (Tableau 1 et Tableau supplémentaire 5). Les valeurs D de Tajima (- 0,072,  $p = 0,556$ ) et Fs de Fu (- 3,067,  $p = 0,718$ ) pour CR étaient négatives et non significatives pour les loups de l'Himalaya, ce qui indique un équilibre de la population. Les valeurs observées de la distribution des différences par paire parmi tous les loups de l'Himalaya ont montré un pic multimodal. La distribution des valeurs d'inadéquation observées a montré une bonne adéquation avec les valeurs attendues, ce qui a été confirmé par la valeur significative de l'indice d'irrégularité de Harpending de  $r = 0,125$  ( $p = 0,02$ ), indiquant l'équilibre de la population (Fig. supplémentaire 2B).

Le réseau d'haplotypes de jonction médian construit pour les loups de l'Himalaya en utilisant des séquences CR a révélé un réseau d'haplotypes faiblement structuré avec sept haplotypes distribués dans de multiples connexions alternatives (Fig. 3B). Les sept haplotypes étaient séparés les uns des autres par des substitutions d'une à trois paires de bases. Hap\_2 a été observé comme l'haplotype le plus dominant distribué dans l'Himachal Pradesh ( $n = 15$ ), l'Uttarakhand (1), le Ladakh (5) et les échantillons anciens ( $n = 2$ ), suivi par Hap\_1 ( $n = 18$ ) qui a été observé dans l'Himachal Pradesh ( $n = 16$ ) et les échantillons anciens ( $n = 2$ , collectés au Népal) (Tableau supplémentaire 4 et fig. 3B). Le réseau d'haplotypes de jonction médiane construit à partir des séquences de Cyt *b* a également révélé un réseau d'haplotypes faiblement structuré avec trois haplotypes (Fig. 3D). Les trois haplotypes étaient séparés les uns des autres par une seule paire de bases. L'hap\_2 a été observé comme étant l'haplotype le plus dominant distribué dans l'Himachal Pradesh ( $n = 30$ ), suivi de l'hap\_1, limité à l'Himachal

Pradesh ( $n = 6$ ), et de l'hap\_3 limité à la région du Ladakh ( $n = 6$ ) (Tableau supplémentaire 5 et Figure 3D).



**Fig. 3.** Réseau d'haplotypes de jonction médiane construit à partir de mtDNACR (A) et de Cyt b (C) chez les loups de la péninsule Indienne et de mtDNA CR (B) et Cyt b (D) chez les loups de l'Himalaya. Les cercles d'haplotypes sont codés par couleur en fonction de la localité géographique, et la taille des cercles est proportionnelle à la fréquence des haplotypes

## Analyse du génotypage des microsatellites

### Structure génétique entre les loups Indiens

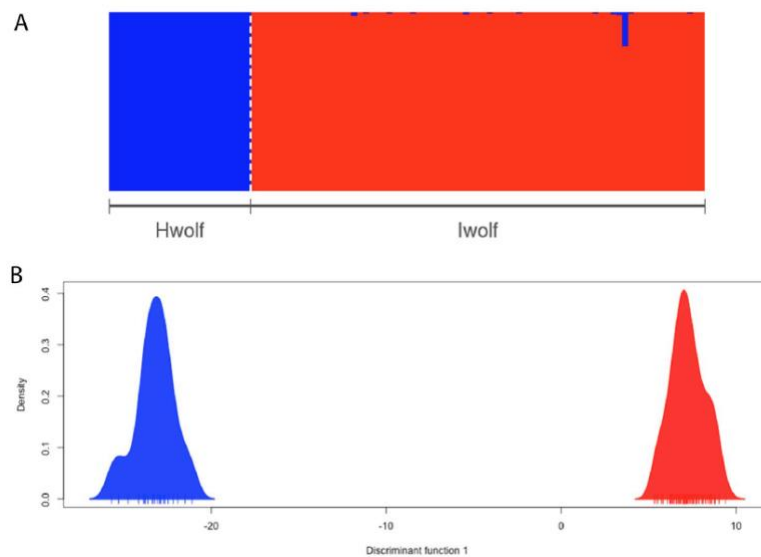
L'analyse STRUCTURE v 2.3 portant à la fois sur les loups de la péninsule Indienne et de l'Himalaya a suggéré que le nombre le plus probable de groupes génétiques était de deux ( $k = 2$ ) sur la base des valeurs  $\Delta K$  en n'utilisant aucune localisation antérieure dans le modèle (locprior = 0) selon le critère d'Evanno. Le diagramme à barres montre clairement que les loups de la péninsule Indienne et de l'Himalaya sont regroupés séparément, ce qui indique l'absence de mélange ou de flux génétique entre eux (Fig. 4A). L'analyse DAPC a également suggéré la présence de deux groupes génétiques, sans chevauchement, ce qui confirme les résultats de l'analyse STRUCTURE (Fig. 4B).

### Loup de la péninsule Indienne

Des génotypes multilocus ont été obtenus pour les 25 microsatellites chez les loups de la péninsule Indienne et de l'Himalaya, tous les individus ayant été typés pour les 25 loci (taux de réussite de 100%). Le nombre d'allèles chez les loups de la péninsule Indienne variait entre 4 (VBUFX) et 11 (F2140) avec un nombre moyen d'allèles par locus de sept, la gamme de taille allélique était de 21,40, les valeurs d'hétérozygotie observée et attendue étaient respectivement de 0,68 et 0,70, et la valeur PIC était de 0,76 (Tableau 1 et Tableau supplémentaire 6). Le panel de marqueurs microsatellites utilisés pour l'identification des individus avait une valeur de probabilité cumulative ( $P_{ID}$ ) de  $1,13 \times 10^{-30}$  et la probabilité d'identifier correctement les frères et sœurs ( $P_{ID-sibs}$ ) les uns des autres était de  $1,33 \times 10^{-11}$ , ce qui indique une puissance suffisante des microsatellites pour discriminer les individus et les frères et sœurs. Les taux d'erreur de génotypage variaient selon les loci microsatellites, avec un taux moyen d'abandon allélique par génotype de 0,007 et un taux de faux allèles par



génotype de 0,014. La présence d'allèles nuls a été détectée à quatre loci (CXX436, CXX253, MCPH2 et CXX279) sans aucune preuve de bégaiement et de faible dominance d'allèle. Le coefficient de consanguinité moyen ( $F_{IS}$ ) était positif (0,15) pour les loups de la péninsule Indienne (Tableau 1 et Tableau supplémentaire 6).



**Fig. 4.** Structure génétique des loups de la péninsule indienne et de l'Himalaya basée sur 25 microsatellites nucléiques. Résultats de STRUcTURE pour les loups Indiens ( $N = 77$ ) et les loups de l'Himalaya ( $N = 24$ ) en prenant en compte le modèle de mélange mis en œuvre dans STRUcTURE v 2.3 sans information préalable sur la localisation (A). Diagramme de dispersion du DAPC avec chaque loup indiqué par des codes de couleur différents et des ellipses d'inertie montrées sur les deux premiers axes (B). La couleur rouge représente les loups de la péninsule indienne et la couleur bleue représente les loups de l'Himalaya pour les deux figures

L'analyse bayésienne dans STRUcTURE v 2.3 sans données de localisation préalables ( $locprior = 0$ ) a suggéré que le nombre le plus probable de grappes génétiques basé sur le delta K ( $\Delta K$ , Fig. 3A supplémentaire) et les valeurs de log vraisemblance pour K ( $\ln(K) = -6310,62$ ) était de quatre ( $K = 4$ ). Les diagrammes à barres STRUcTURE n'ont montré aucun schéma de regroupement clair entre les populations, ce qui indique des niveaux élevés de mélange (Fig. 1B et Fig. 3C supplémentaire). L'analyse DAPC a suggéré la présence de deux groupes génétiques avec des individus du Rajasthan montrant un caractère distinctif alors que les autres populations ont montré un mélange (Fig. 1C).

L'analyse des goulots d'étranglement utilisant le test du signe pour détecter l'excès d'hétérozygotie a montré des preuves de goulots d'étranglement génétiques. Le test de Wilcoxon pour l'excès d'hétérozygotie était également significatif pour deux modèles de mutation microsatellites, à savoir TPM et SMM (Tableau supplémentaire 8). D'autre part, le rapport M ou les valeurs de l'indice G-W pour les loups péningulaires Indiens étaient de 0,33, ce qui est inférieur à 0,68 et indique un goulot d'étranglement génétique (Tableau supplémentaire 8). Les estimations de la population effective passée basées sur l'approche MCMC mise en œuvre dans Vareff ont indiqué une taille de population effective moyenne ( $N_e$ ) de  $\sim 3500$  à  $\sim 5000$  générations (intervalle de quantification de 5 et 95% : 51-15 219), a montré une tendance à la baisse jusqu'à  $\sim 1100$  générations avant le présent. La population a ensuite montré une inclinaison avec une augmentation massive de la taille effective de la population jusqu'à  $\sim 800$  générations et a ensuite maintenu la taille effective de la population jusqu'à presque les dernières  $\sim 50$  générations ( $N_e$  : 8421, intervalle de quantile : 1382-20,000) qui correspond à environ 225 Ybp. La population a ensuite montré un déclin drastique ou

un goulot d'étranglement au cours des 25-50 dernières générations, ce qui correspond à  $\sim 115-225$  Ybp si l'on considère que le temps de génération des loups est de 4,5 ans (Fig. 5A).

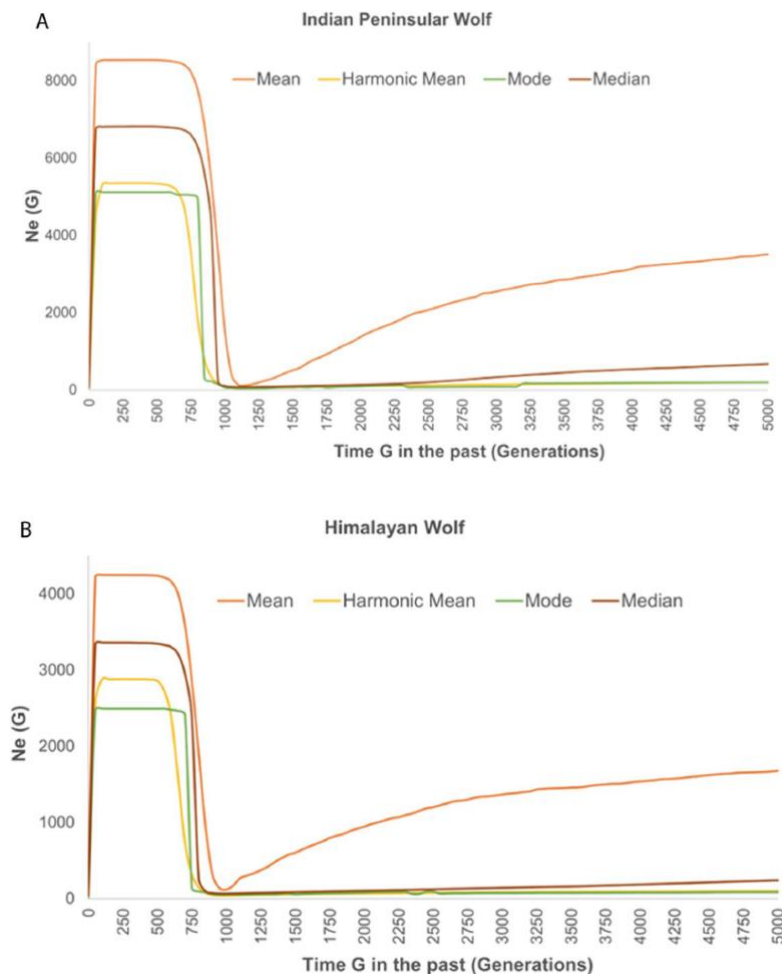
### *Loup de l'Himalaya*

Le nombre d'allèles chez les loups de l'Himalaya se situait entre 3 et 6 avec un nombre moyen d'allèles par locus de 4,24, la taille moyenne des allèles était de 12,96, les valeurs d'hétérozygotie observée et attendue étaient respectivement de 0,69 et 0,63, et la valeur PIC était de 0,67 (Tableau 1 et Tableau supplémentaire 7). L'hétérozygotie moyenne observée ( $H_o = 0,69$ ) était légèrement supérieure à l'hétérozygotie attendue ( $H_e = 0,63$ ). Le panel de marqueurs microsatellites utilisés pour l'identification individuelle avait une valeur cumulative de probabilité d'identité ( $P_{ID}$ ) de  $1,38 \times 10^{-23}$  et une valeur de probabilité d'identité des frères et sœurs ( $P_{ID-sibs}$ ) de  $3,66 \times 10^{-10}$ , **ce qui indique que la puissance des microsatellites pour discriminer les individus apparentés est insuffisante**. Les taux d'erreur de génotypage variaient selon les loci microsatellites, avec un taux moyen d'abandon d'allèles par génotype de 0,001 et un taux de faux allèles par génotype de 0,006 (Tableau 1 et Tableau supplémentaire 7). Aucun des loci n'a montré la présence d'allèles nuls avec aucune preuve de bégaiement et de petite dominance d'allèle. Après les corrections de Bonferroni, aucun des loci ne s'est écarté du HWE et aucun LD n'a été détecté entre les paires de loci. La valeur du coefficient de consanguinité moyen ( $F_{IS}$ ) était négative (- 0,07) pour les loups de l'Himalaya (Tableau 1).

L'analyse bayésienne non spatialement explicite dans STRUCTURE v 2.3 a suggéré que le nombre le plus probable de groupes génétiques, basé sur les valeurs du delta K ( $\Delta K$ ), était de deux ( $K = 2$ ) sans modèle de localisation préalable (locprior = 0) (Fig. 4A supplémentaire). D'autre part, les valeurs du logarithme de vraisemblance sans information préalable ( $\ln(K) = -1599,46$ ) ont atteint un point d'inflexion à  $K = 3$  (Figure supplémentaire 4B), mais avec une courbe plate comportant de larges marges d'erreur, et n'étaient donc pas très informatives. Les diagrammes à barres ont montré des schémas de regroupement clairs à travers les populations où quelques échantillons de la région de Spiti ont montré un regroupement séparé tandis que les échantillons des zones restantes de North Sikkim, Ladakh et quelques échantillons de Spiti ont montré un deuxième regroupement (Fig. 1D et Fig. supplémentaire 4C). L'analyse DAPC a également suggéré la présence de groupes biogénétiques avec des schémas similaires à l'analyse de STRUCTURE (Fig. 1E).

L'analyse du goulot d'étranglement utilisant le test du signe pour détecter l'excès d'hétérozygotie a mis en évidence des signatures significatives de goulot d'étranglement génétique. Le test de Wilcoxon pour l'excès d'hétérozygotie était également significatif pour les deux modèles de mutation microsatellites, à savoir TPM et SMM (Tableau supplémentaire 8). La courbe de distribution de la fréquence allélique était décalée pour les loups de l'Himalaya, ce qui indique un déclin de la population et un goulot d'étranglement génétique. Le rapport M ou la valeur de l'indice G-W était de 0,33, ce qui indique un goulot d'étranglement génétique (Tableau supplémentaire 8). Les estimations de la population effective passée ( $N_e$ ) étaient de 1676 loups à  $\sim 5000$  générations (quantile de 5 et 95% : 28-6631), montrant une tendance à la baisse jusqu'à environ  $\sim 1000$  générations avant le présent. La population a augmenté considérablement entre  $\sim 1000$  générations et  $\sim 600$  générations et est restée stable à cette abondance élevée jusqu'aux  $\sim 50$  dernières générations ( $N_e : 4221$ , quantile range : 1476-9739), ce qui correspond à environ 225 Ybp. La population a ensuite

montré un déclin drastique ou un goulot d'étranglement au cours des 25-50 dernières générations, ce qui correspond à ~ 115-225 Ybp si l'on considère que le temps de génération des loups est de 4,5 ans (Fig. 5B).



**Fig. 5.** Estimations de la taille effective de la population ( $N_e$ ) de loups de la péninsule Indienne (A) et de loups de l'Himalaya (B) sur la base de 25 microsatellites polymorphes en utilisant l'approche MCMC de vraisemblance approximative dans le paquetage VarEff v.1.2 de R. Les lignes colorées indiquent respectivement la moyenne arithmétique de  $N_e$  (rouge), la moyenne harmonique (orange), le mode (bleu) et la médiane (noir)

## DISCUSSION

Les loups péninsulaires Indiens et les loups de l'Himalaya sont considérés comme ancestraux et partagent un ancêtre commun avec les loups holarctiques contemporains et ont divergé en tant que lignées séparées (Sharma et al. 2003 ; Aggarwal et al. 2007 ; Werhahn et al. 2017 ; Hennelly et al. 2021). Il est intéressant de noter que les deux anciennes lignées existent en Inde et sont géographiquement séparées, les loups de l'Himalaya étant limités aux hautes altitudes tandis que les loups de la péninsule Indienne sont limités aux plaines de basse altitude. Nos résultats constituent la première étude des estimations de la diversité génétique, de la structure génétique de la population et de l'histoire démographique des loups de la péninsule Indienne et de l'Himalaya.

Les estimations de la diversité génétique basée sur l'ADN mitochondrial pour les loups de la péninsule Indienne et les loups de l'Himalaya étaient modérées et presque similaires. Les indices de diversité de l'ADN mitochondrial basés sur la CR des loups Indiens étaient élevés par rapport à d'autres populations de loups Européens de Russie, de Pologne et de la

péninsule Ibérique dont les indices de diversité étaient  $H = 0,34-0,67$  et  $\pi = 0,009-0,016$  pour le même fragment de CR (Czarnomska et al. 2013 ; Sastre et al. 2011). La diversité génétique basée sur les nucléomicrosatellites chez les loups de l'Himalaya ( $H_o = 0,69$ ) et les loups de la péninsule Indienne ( $H_o = 0,68$ ) était similaire (Tableau 1). Les valeurs d'hétérozygotie observées (0,69) étaient légèrement supérieures à la valeur attendue (0,63) chez les loups de l'Himalaya (Tableau 1). Un tel scénario n'est pas difficile à visualiser chez les loups de l'Himalaya, où souvent les hautes chaînes de montagnes séparant les habitats des vallées seraient devenues des barrières au flux génétique avec l'avènement d'un climat plus frais et le pergélisol de ces chaînes, tout en permettant aux populations des vallées de se mélanger pendant les régimes climatiques plus chauds. Les niveaux d'hétérozygotie observés chez les loups Indiens étaient comparables à ceux des loups des populations Européennes (intervalle  $H_o : 0,65-0,75$ ) de Pologne, de Bulgarie, de Serbie, des États Baltes et de Russie centrale (Sastre et al. 2011 ; Czarnomska et al. 2013 ; Hindrikson et al. 2013 ; Moura et al. 2014 ; Szewczyk et al. 2019 ; Korablev et al. 2021). Les niveaux d'hétérozygotie chez les deux loups Indiens dépassaient la gamme d'hétérozygotie rapportée dans les populations de loups d'Italie, de Finlande, d'Espagne, de Slovaquie, d'Estonie et des territoires Sibériens ( $H_o : 0,44-0,61$ ) (Lucchini et al. 2002 ; Aspi et al. 2006 ; Plumer et al. 2016 ; Montana et al. 2017 ; Talala et al. 2020). Bien que les estimations de la diversité génétique entre les différentes populations de loups ne soient strictement pas comparables en raison des différentes longueurs de séquences de l'ADNmt et des différents microsatellites utilisés, les estimations suggèrent que la variabilité génétique observée chez les loups Indiens est comparable à celle d'autres populations de loups. La valeur négative de  $F_{IS}$  (- 0,07) observée chez les loups de l'Himalaya pourrait être due à la présence de valeurs élevées d'hétérozygotie observée et un schéma similaire a également été observé chez les loups de Sibérie (- 0,057 ; Talala et al. 2020). D'autre part, les valeurs positives du  $F_{IS}$  observées chez les loups de la péninsule Indienne (0,15) dénotent l'absence d'événements de consanguinité et pourraient être attribuées à la grande capacité de dispersion des loups, provoquant ainsi un flux génétique important. Les valeurs moyennes du coefficient de consanguinité trouvées chez les loups de la péninsule Indienne sont comparables à celles des loups d'Ibérie, de Bulgarie, de Serbie et de Slovaquie (0,10-0,25) (Verardi et al. 2006 ; Sastre et al. 2011) mais comparativement plus élevées que celles des loups de Russie, d'Arkhangelsk et des Apennins ( $F_{IS} = 0,03-0,06$  ; Aspi et al. 2006 ; Korablev et al. 2021).

L'utilisation d'une combinaison de clustering bayésien et d'analyse multivariée, basée sur les individus et les populations, a révélé une faible différenciation génétique au sein des populations de loups de la péninsule Indienne et de l'Himalaya (Fig. 1B et D). La faible différenciation génétique observée pourrait être attribuée à la grande capacité de dispersion des loups (Mech et Boitani 2010) et à l'absence de barrières au flux génétique à l'intérieur et entre les paysages occupés par les loups de la péninsule Indienne et de l'Himalaya (Jhala et Giles 1991 ; Jhala 2003 ; Jhala et al., 2022). De plus, la structuration observée chez les loups de l'Himalaya, en particulier cette séparation de la population de l'Himachal Pradesh, était probablement due à une surreprésentation d'échantillons provenant d'une population de zoo connue pour être issue d'une seule paire de frères et sœurs d'origine sauvage, c'est-à-dire de la vallée de Spiti, Himachal Pradesh (Fig. 1D). Les loups de l'Himalaya sont en danger critique d'extinction et il était extrêmement difficile d'obtenir des échantillons, c'est pourquoi nous avons choisi d'inclure ces échantillons potentiellement apparentés dans l'analyse.

Les loups de la péninsule Indienne ont également montré une faible différenciation génétique au niveau géographique, où les individus de tous les sites échantillonnés, c'est-à-dire Gujarat, Rajasthan, Bihar, Maharashtra et Karnataka, se sont regroupés avec des niveaux élevés de mélange entre eux. Cependant, les loups du Rajasthan se sont séparés en un groupe de population distinct (Fig. 1B). Nous pensons que les loups échantillonnés au Rajasthan ont peut-être subi une introgression d'ADN de chien, puisque nous avons enregistré plusieurs hybrides morphologiques loup-chien dans cette région (Jhala unpublished data). L'analyse mitochondriale n'a pas non plus révélé de flux génétique historique entre les loups de l'Himalaya et de l'Inde péninsulaire, mais on a observé que des individus de différentes populations de loups de la même lignée partageaient des haplotypes (Fig. 3A-D), ce qui suggère une forte dispersion et des croisements au sein des populations de loups de la même lignée.

La structuration de la population basée sur les microsatellites a montré l'absence totale de mélange entre les loups de la péninsule Indienne et les loups de l'Himalaya, ce qui suggère l'absence de flux génétique entre eux. Ce résultat est surprenant car il n'y a pas de barrières physiques à la dispersion entre les zones géographiques de ces deux loups (Fig. 4A et B). Un schéma similaire a également été observé entre les loups de la toundra/taïga et les loups des forêts boréales de conifères (Musiani et al. 2007) et les loups de la Colombie-Britannique côtière et du sud-est de l'Alaska (Weckworth et al. 2011). Les loups de l'Himalaya sont spécialisés pour vivre dans des conditions désertiques de haute altitude (Werhahn et al. 2018 ; Wang et al. 2020), alors que les loups de la péninsule Indienne préfèrent les habitats ouverts des terres semi-arides (Jhala et Giles 1991 ; Jhala 2003 ; Jhala et al. 2022). Les loups de l'Himalaya n'ont pas été signalés dans la zone tempérée et forestière de l'Himalaya, tandis que les loups de la péninsule Indienne n'ont pas été signalés dans les contreforts de l'Himalaya. Les loups Indiens les plus proches de la chaîne de montagnes de l'Himalaya ont été signalés dans les contreforts du Shivalik et du Shivalik dans la réserve de tigres de Rajaji (<https://www.newsclick.in/Photo-captures-Indian-grey-wolfnorthern-Himalayas>) et dans les collines de Churya de la réserve de tigres de Valmiki (Maurya et al. 2021) en Inde. Ainsi, il semble y avoir une large bande des chaînes forestières de l'Himalaya dépourvue de loups séparant les deux lignées de loups de l'Inde. Les loups de l'Himalaya se reproduisent en été alors que les loups de la péninsule Indienne sont les seuls à se reproduire en hiver (Jhala 2003), il est également possible que ces lignées de loups aient des barrières comportementales au métissage.

L'analyse phylogénétique bayésienne basée sur les marqueurs mitochondriaux (Fig. 2 et Fig. 1 supplémentaire) confirme également les rapports antérieurs qui suggéraient des lignées distinctes de loups péningulaires Indiens et Himalayens qui étaient basales par rapport aux loups gris holarctiques (Aggarwal et al. 2003, 2007 ; Sharma et al. 2003 ; Werhahn et al. 2017, 2018). L'aire de répartition de ces deux loups et du clade chien-loup holarctique est susceptible de se chevaucher et d'être proche dans les provinces du Baluchistan et du Waziristan au Pakistan, et un échantillonnage génétique plus poussé dans cette région géographique pourrait fournir de meilleures informations sur le flux génétique entre ces loups. Un échantillon de loup du Pakistan présentait une séquence CR similaire à celle du clade holarctique loup-chien (Fig. 2). Hennelly et al. (2021), en utilisant les séquences génomiques complètes des loups de la péninsule Indienne et de l'Himalaya, ont également trouvé que les loups de la péninsule Indienne et de l'Himalaya forment des lignées évolutives



distinctes et anciennes, basales par rapport à d'autres populations de loups gris. Les mêmes auteurs ont également souligné que l'Asie du Sud a servi de refuge aux loups de la péninsule Indienne et de l'Himalaya pendant la période de glaciation.

Des signes de déclin ou d'équilibre de la population ont été observés chez les loups Indiens à l'aide de marqueurs mitochondriaux et microsattellites. Les valeurs négatives non significatives des statistiques  $D$  de Tajima,  $F$  de Fu, les pics unimodaux avec une valeur non significative de l'indice de traînage (loup péninsulaire Indien, Figure supplémentaire 2A) et les pics multimodaux (loup de l'Himalaya, Figure supplémentaire 2B) dans les tests de distribution des inadéquations sont des caractéristiques de la contraction démographique. De même, l'analyse du goulot d'étranglement avec le test de rang de Wilcoxon pour tester l'excès d'hétérozygotie et la courbe de distribution de la fréquence des allèles en mode décalé, ainsi que les valeurs du rapport  $M$  ou de l'indice  $G-W$ , étaient en faveur d'un déclin de la population et d'un goulot d'étranglement génétique dans un passé récent (Tableau supplémentaire 8). L'analyse plus fine du goulot d'étranglement utilisant l'approche MCMC sur les données des microsattellites a encore corroboré une tendance à la baisse de la taille effective de la population jusqu'à il y a environ 1100 générations pour le loup de la péninsule Indienne (Fig. 5A), et environ 800 générations pour le loup de l'Himalaya (Fig. 5B). Ce déclin est probablement dû aux fluctuations climatiques qui ont entraîné des changements dans la végétation, ainsi qu'à la large diffusion des premiers hommes. Le déclin coïncide également avec l'événement de Meghalayan qui a provoqué une sécheresse prolongée de plus de 200 ans, il y a environ 4500 ans, affectant plusieurs civilisations dans le monde entier (Góis-Marques et al. 2020). Plus tard, la taille effective de la population a augmenté jusqu'à ~ 600-800 générations et a ensuite montré un déclin drastique ou un goulot d'étranglement au cours des 25-50 dernières générations, ce qui correspond à 100-250 Ybp (Fig. 4A et B). Le dernier déclin des deux populations de loups Indiens est probablement dû à l'augmentation des activités anthropogéniques, aux pratiques agricoles intenses, aux modifications subséquentes de l'habitat et à la persécution au cours des 100 à 150 dernières années.

### Conséquences pour la conservation

Nos données améliorent les déductions antérieures basées sur l'ADNmt en ajoutant des marqueurs nucléaires qui montrent clairement que l'Inde possède deux loups anciens distincts sans mélange entre eux. Nous montrons également que les deux loups ont eu des histoires démographiques différentes. Les deux loups ont connu un déclin substantiel de la taille de leur population dans un passé récent. Une diversité génétique raisonnable et des preuves de flux de gènes entre les populations régionales sont de bon augure pour la conservation de ces lignées de loups uniques et anciennes. Toutefois, la tendance récente à la diminution de la taille effective des populations est préoccupante et doit faire l'objet d'une politique de conservation, d'une gestion active et d'une protection. Certaines preuves d'introgession génétique potentielle à partir de chiens parmi les loups péninsulaires Indiens du Rajasthan et les loups de l'Himalaya sont également préoccupantes (Wang et al. 2022, Jhala, données non publiées). Les chiens sauvages sont un problème majeur de conservation en Inde qui abrite plus de 30 millions de chiens (Vanak et Gompper 2009). Les études futures sur les loups Indiens avec des ensembles de données génomiques à l'échelle de régions géographiques représentatives seront utiles pour évaluer la structure génétique de la population à une échelle fine et permettre d'étudier les loci qui sont adaptatifs pour des traits écologiques et des régimes climatiques spécialisés.

Des analyses génomiques récentes (Hennelly et al. 2021 ; Wang et al. 2022) ont montré que les deux lignées de loups Indiens étaient distinctes et basales par rapport aux loups et chiens holarctiques. Ces loups ont divergé des loups holarctiques entre environ 80 (loups de l'Himalaya) et 150 (loups de la péninsule) il y a mille ans et montrent des trajectoires démographiques historiques distinctes des autres loups (Hennelly et al. 2021 ; Wang et al. 2022). En outre, Wang et al. (2020) suggèrent qu'un ancêtre canidé inconnu a contribué à hauteur de 39% à la composition génétique du loup de l'Himalaya, ce qui a donné à l'espèce un avantage adaptatif pour une vie en haute altitude. Les loups péninsulaires Indiens sont la seule espèce de loups qui se reproduit en hiver (Jhala 2003). En raison des différences morphologiques qui suggèrent une adaptation à la survie en haute altitude, Hodgson (1847) avait classé le loup de l'Himalaya comme une espèce distincte (*Canis laniger*). Bien que notre panel de microsatellites n'ait pas détecté de mélange entre les loups de l'Himalaya et les loups de la péninsule Indienne, les données de séquençage du génome ont révélé un certain niveau de flux génétique des loups de la péninsule Indienne vers les loups Persans et les loups de l'Himalaya (Hennelly et al. 2021 ; Wang et al. 2022). Étant donné la capacité de dispersion du loup, l'absence de barrières physiques au flux génétique entre les trois lignées de loups et la propension des canidés à se croiser, il n'est pas surprenant que ce niveau de flux génétique ait été détecté. Ce qui est surprenant, c'est que le loup de l'Himalaya et les loups de la péninsule Indienne ont conservé leur caractère unique et distinct des loups holarctiques, ce qui suggère des mécanismes d'isolation comportementale ou génétique. *C. l. chanco* (loup de l'Himalaya) et *C. l. pallipes* (loup de la péninsule Indienne), ce qui les classe avec les loups holarctiques de Chine et d'Asie occidentale, que l'UICN considère comme les moins préoccupants (Boitani, Phillips et Jhala 2018). Considérant que ces anciennes lignées de loups ont probablement survécu de manière isolée dans les refuges pléistocènes du sous-continent Indien et qu'elles ont conservé leur spécificité génétique, elles méritent le statut d'espèces distinctes. Cette reconnaissance en tant qu'espèces distinctes augmenterait leur valeur de conservation et encouragerait la communauté mondiale et les pays de l'aire de répartition à développer une politique et à allouer des ressources pour donner la priorité à leur conservation.