

Chasse non réglementée et récupération génétique à la suite d'un grave déclin de la population : le cas édifiant des loups Bulgares

Conserv Genet (2014) 15:405–417
DOI 10.1007/s10592-013-0547-y

RESEARCH ARTICLE

Unregulated hunting and genetic recovery from a severe population decline: the cautionary case of Bulgarian wolves

Andre E. Moura · Elena Tsingarska ·
Michał J. Dąbrowski · Sylwia D. Czarnomska ·
Bogumiła Jędrzejewska · Małgorzata Pilot

Résumé

Les populations de loups d'Europe (*Canis lupus*) ont subi un déclin important et une contraction de leur aire de répartition en raison de l'abattage anthropogénique. En Bulgarie, bien que les loups soient encore en train de se remettre d'un grave goulot d'étranglement démographique survenu dans les années 1970, la chasse est autorisée avec peu de contraintes. L'augmentation récente de la pression de chasse a soulevé des inquiétudes quant à la viabilité à long terme de l'espèce. Nous avons donc réalisé une analyse génétique complète de la conservation en utilisant des marqueurs microsatellites et ADNmt. Nos résultats ont montré des niveaux élevés d'hétérozygotie (0,654, SE 0,031) et de faibles signaux de goulot d'étranglement génétique, suggérant une bonne récupération depuis le déclin des années 1970. Cependant, nous avons trouvé des niveaux élevés de consanguinité ($F_{IS} = 0,113$, SE 0,019) et un rapport N_e/N inférieur à celui attendu pour une population de loups non perturbée (0,11, 95% CI 0,08-0,29). Nous avons également trouvé des preuves d'hybridation et d'introgession à partir de chiens sauvages (*C. familiaris*) chez 10 loups sur 92 (9,8%). Nos résultats suggèrent également un mélange entre les loups et les populations locales de chacals dorés (*C. aureus*), mais moins important que le mélange avec les chiens. Nous avons détecté une structure de population locale qui peut s'expliquer par les schémas de fragmentation au cours du déclin des années 1970 et par les différences dans les caractéristiques écologiques locales, un échantillonnage plus étendu étant nécessaire pour évaluer la sous-structure de la population. Nous concluons que les niveaux élevés de consanguinité et d'hybridation avec d'autres espèces de canidés, qui résultent probablement d'une chasse non réglementée, peuvent compromettre la viabilité à long terme de cette population malgré sa grande diversité génétique actuelle. L'existence d'une subdivision de la population justifie une évaluation de la nécessité d'unités de gestion séparées pour les différentes sous-populations. Notre étude met en évidence les menaces de conservation pour les populations dont les effectifs augmentent mais qui sont soumises à une chasse non réglementée.

INTRODUCTION

Les loups Européens (*Canis lupus*) ont fait l'objet d'un abattage anthropique systématique. Après avoir subi une contraction plus importante de leur aire de répartition (Randi 2011), ils subissent aujourd'hui un processus de recolonisation naturelle dans plusieurs régions, notamment dans les Alpes (e.g. Fabbri et al. 2007), la péninsule Ibérique (e.g. Blanco et al. 1992 ; Echegaray et Vilà 2010), la péninsule Scandinave (e.g. Wabakken et al. 2001) et

certaines parties de l'Europe centrale et orientale (e.g. Boitani 2003). Dans la plupart des cas, cette recolonisation a suivi la protection légale de l'espèce. **Cependant, les loups sont toujours chassés légalement dans de nombreux pays d'Europe de l'Est, généralement avec des effectifs importants (Boitani 2003), ce qui signifie que la plupart des populations Européennes de loups restent soumises à la pression de la chasse.** Malgré cela, la plupart des études génétiques de conservation menées à ce jour se sont concentrées sur les populations protégées (voir Randi 2011 pour une revue).

En **Bulgarie**, les loups peuvent être trouvés dans la majeure partie du pays, et les enregistrements depuis le 19^{ème} siècle suggèrent une chasse répandue utilisant diverses méthodes. A la fin des années 1950, l'utilisation intensive de poisons pour lutter contre la rage a entraîné une forte contraction de l'aire de répartition des loups qui s'est réduite à cinq zones faiblement occupées par l'homme au début des années 1970, avec un maximum estimé à 100-150 loups restants dans tout le pays (Spiridonov et Spassov 1985). **Les interdictions de poison qui ont suivi, combinées à l'inclusion du loup dans le livre rouge Bulgare et à l'augmentation des proies ongulées, ont permis à la population de se rétablir à plus de 1 000 individus à la fin des années 1990.** Cependant, les chiffres ont diminué depuis, avec 700-800 individus restants selon les estimations les plus récentes (Spiridonov et Spassov 2011). La chasse au loup n'a jamais été interdite en Bulgarie (à l'exception de trois parcs nationaux), et est actuellement toujours autorisée tout au long de l'année sans qu'aucun quota spécifique ne soit défini. **Les registres de chasse tirés des statistiques annuelles de l'Agence exécutive Bulgare des forêts (<http://www.nug.bg/lang/2/index>) suggèrent une moyenne de 250 à 400 individus (25 à 50% de la population recensée) tués chaque année entre 2000 et 2009.** Une analyse indépendante réalisée par la BALKANI Wildlife Society a estimé le nombre de loups tués annuellement entre 2006 et 2009 à 234-249 individus (Elena Tsingarska-Sedefcheva, communication personnelle). Après l'arrêt du paiement des primes pour les loups tués en 2010, la plupart des chasseurs ont cessé de déclarer les individus tués ; par conséquent, les estimations officielles du nombre de loups tués en Bulgarie ces dernières années ne sont pas aussi précises qu'avant 2010 (Tsingarska-Sedefcheva 2013). En plus de la chasse légale, les loups sont également tués par les braconniers par empoisonnement et piégeage. Cependant, les chiffres exacts ne sont pas disponibles, ce qui fait de l'évaluation de l'état de conservation des loups Bulgares une priorité importante. En Finlande, où le prélèvement légal annuel ne dépasse pas 15% de la population recensée, un récent effondrement démographique et génétique a été documenté, avec un déclin important et significatif de l'hétérozygotie observée et une augmentation de la consanguinité (Jansson et al. 2012). Cet effondrement a été précédé par plus de 10 ans de forte expansion démographique et spatiale, et résulte probablement d'une chasse et d'un braconnage excessifs (Jansson et al. 2012). Cela soulève des inquiétudes quant aux populations de loups qui subissent une pression de chasse beaucoup plus élevée et non réglementée, et justifie la nécessité d'une étude génétique de la population de loups Bulgare.

Des études sur l'ADN mitochondrial (ADNm) et la variabilité des microsatellites chez les loups Européens ont révélé un partage des haplotypes et des allèles entre les populations locales de parties éloignées du continent (Lucchini et al. 2004 ; Pilot et al. 2006, 2010). Cependant, une structure génétique à l'échelle locale peut être détectée dans différentes régions d'Europe (Pilot et al. 2006 ; Aspi et al. 2008 ; Czarnomska et al. 2013) et ailleurs dans la distribution de l'espèce, **et semble être déterminée principalement par des caractéristiques**

écologiques plutôt que par des barrières géographiques (e.g. Carmichael et al. 2001 ; Geffen et al. 2004 ; Pilot et al. 2006). Des études génétiques antérieures suggèrent que les loups Bulgares présentent des niveaux élevés de diversité génétique par rapport à d'autres régions d'Europe (Lucchini et al. 2004 ; Pilot et al. 2006, 2010). Cela pourrait refléter la présence d'une population écologiquement diversifiée, de grandes tailles de populations effectives, ou des facteurs historiques, les Balkans étant un refuge glaciaire du Pléistocène. Par ailleurs, l'introgression génétique à partir de chiens sauvages pourrait avoir artificiellement augmenté la diversité génétique des loups Bulgares. Cependant, cette explication n'est valable que si l'hybridation est plus fréquente dans ce pays que dans d'autres parties de l'Europe.

Aucune étude à ce jour n'a examiné la structure génétique du loup en Bulgarie à une échelle fine. Bien que le nombre de loups ait augmenté depuis les années 1970, cette population est toujours confrontée à des menaces pressantes en matière de conservation. La tendance récente à la diminution de la taille du recensement ainsi que les tensions croissantes au sein des communautés locales en raison de la prédation sur les animaux domestiques (Tsingarska-Sedefcheva 2007) justifient une évaluation plus détaillée. Ceci est particulièrement pertinent dans le contexte des rapports de l'UICN identifiant la Bulgarie comme un point chaud Européen pour la conservation des mammifères en raison de la présence abondante de mammifères menacés (Temple et Terry 2007), et de l'inclusion du loup Bulgare dans l'annexe II de la directive Européenne sur les habitats (Temple et Terry 2007). La détection de la structure génétique à l'échelle locale est d'une importance majeure pour la conservation efficace de cette espèce. Si l'homogénéité génétique sur de grandes distances est la norme, l'impact de la mortalité localisée sera réduit. Cependant, si une forte division de la population à petite échelle est au contraire répandue, la mortalité localisée pourrait conduire à la disparition de lignées génétiques uniques qui ne seraient pas facilement remplacées (Leonard et al. 2007).

Nous avons donc effectué une caractérisation génétique des loups Bulgares en utilisant à la fois l'ADNmt et les microsatellites. Nous avons cherché à : (1) identifier les modèles de structure de la population en Bulgarie et le besoin conséquent d'unités distinctes de gestion de la conservation ; (2) quantifier la diversité génétique et évaluer la récupération génétique des loups Bulgares depuis l'épuisement démographique des années 1970 sur la base de données contemporaines, ainsi que les effets de l'augmentation de la pression de chasse au cours des 10 dernières années ; (3) évaluer l'étendue de l'hybridation avec les chiens sauvages.

METHODE

Zone d'étude

La Bulgarie est située dans la zone de transition entre le climat méditerranéen et le climat continental tempéré. Elle est principalement montagneuse, avec des plaines d'altitude relativement basse au nord et au sud-est, et deux grands systèmes montagneux, la Stara Planina (chaîne des Balkans) qui traverse le centre-nord du pays, et le massif du Rila-Rhodopean qui descend au centre-sud-ouest (Figure S1). Les forêts occupent environ 30% du territoire Bulgare et sont dominées par le chêne (*Quercus* sp.) et le hêtre (*Fagus sylvatica*). Une zone de conifères située entre 1 300 et 2 200 m d'altitude est composée de pin sylvestre (*Pinus sylvestris*), d'épicéa commun (*Picea abies*) et de sapin blanc (*Abies alba*) (Aladzhem 2000). Quatre espèces indigènes d'ongulés existent en Bulgarie : le sanglier (*Sus scrofa*) et le chevreuil (*Capreolus capreolus*) présents dans tout le pays ; le chamois (*Rupicapra rupicapra*) présent

uniquement sur les hauts plateaux de Rila, de Pirin, du Balkan central et des Rhodopes occidentales, et le cerf élaphe (*Cervus elaphus*) dont la répartition est beaucoup plus limitée. De petites populations de daims (*Dama dama*) et de mouflons (*Ovis musimon*) ont été introduites dans différentes parties du pays, principalement dans des réserves de chasse (Peshev et al. 2004). Outre les loups gris, deux autres espèces du genre *Canis* sont présentes, le chien domestique sauvage *Canis familiaris* et le chacal doré *Canis aureus*, tous deux répartis dans l'ensemble du pays.

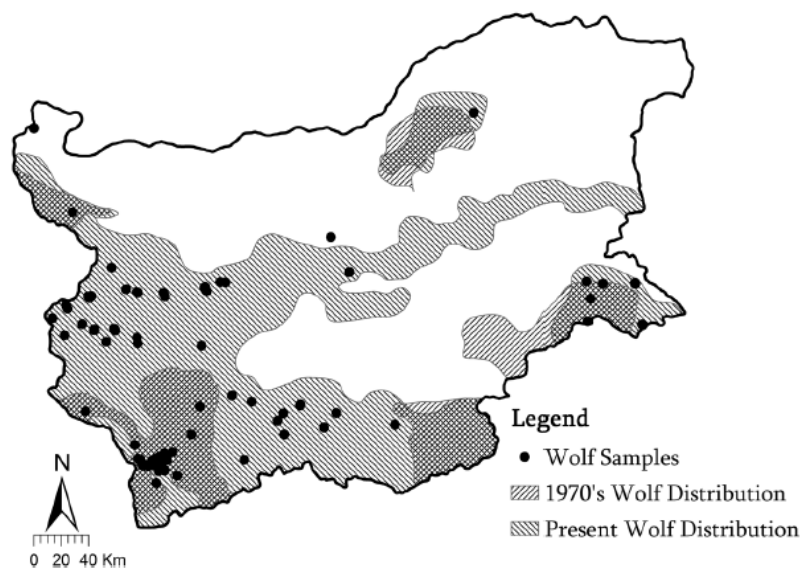


Fig. 1. Carte de distribution de tous les échantillons de loups prélevés dans le cadre de cette étude, superposée à la distribution des loups, à la fois actuelle (Spiridonov et Spassov 2011) et pendant le déclin de la population dans les années 1970 (Spiridonov et Spassov 1985)

Collecte d'échantillons

Des échantillons de tissus musculaires ont été obtenus auprès de chasseurs locaux entre mai 2000 et janvier 2011, et des échantillons de peaux non tannées ont été obtenus entre 2007 et 2011. Tous les échantillons ont été placés dans de l'éthanol à 95% après la collecte et stockés à -80°C . La localisation des échantillons par rapport à la distribution actuelle des loups est présentée dans la Fig. 1. Les coordonnées exactes n'étant pas disponibles pour certains échantillons, la localisation reflète souvent la zone (généralement un village) autour de laquelle le loup a été capturé. L'ensemble des données comprenait 112 loups gris putatifs (voir résultats), bien que tous n'aient pas été utilisés dans toutes les analyses (voir Tableau 1). En outre, 14 échantillons de chiens sauvages ont été obtenus à partir de carcasses d'animaux tués sur la route, principalement dans la partie occidentale du pays, et de la race locale de chiens de berger (Karakachandog), incluse dans les analyses d'hybridation loup-chien (voir détails ci-dessous).

Nous avons également inclus dix échantillons de loups de Grèce génotypés dans une étude précédente (Pilot et al. 2006), qui ont été utilisés pour évaluer le niveau de différenciation génétique entre les loups Bulgares et les populations voisines. Nous n'avons pas eu accès à des échantillons de loups d'autres pays voisins de la Bulgarie, et donc seule la comparaison avec les loups Grecs a été possible.

Tableau 1. Estimations de N_e pour tous les échantillons de loups avec les intervalles de confiance à 95 % correspondants en utilisant NeEstimator, LDNe et OneSamp

Method	NeEstimator	LDNe- 0.01	LDNe- 0.02	LDNe- 0.05	OneSamp
5 % CI	133.7	86.2	66.4	50.5	63.7
Mean N_e	161.1	106.7	80.2	64.9	90.0
95 % CI	200.1	136.6	99.1	86.3	214.8

In the LDNe analysis, results are shown for the analysis using only alleles with a minimum frequency of 0.01, 0.02 and 0.05

Procédures de laboratoire et analyse des données

Nous avons analysé un fragment de 257 pb de la région de contrôle de l'ADNmt et 14 loci microsatellites : FH2001, FH2010, FH2017, FH2054, FH2079, FH2088, FH2096 (Francisco et al. 1996), C213, C250, C253, C436, C466, C642 (Ostrander et al. 1993), AHT130 (Holmes et al. 1995) et VWF (Shibuya et al. 1994). Les protocoles de laboratoire ont été décrits par Pilot et al. (2006). Les loci microsatellites ont été amplifiés dans des réactions PCR multiplex. Dans les cas où deux loci ou plus n'ont pas été amplifiés, nous avons répété la PCR multiplex pour cet échantillon particulier jusqu'à trois fois. Si l'amplification d'un locus d'un ensemble multiplex échouait, nous avons effectué une PCR séparée (non multiplex) pour ce locus. Des réactions PCR séparées ont également été effectuées en cas d'incertitude concernant un génotype particulier à un locus amplifié dans le multiplex (par exemple, en raison de bégaiements ou de grandes différences de taille entre deux pics d'allèles). En outre, nous avons répliqué le génotypage de 14 échantillons (12,5% de l'ensemble d'échantillons) pour les 14 loci. Sur la base de ces répétitions, le taux estimé d'abandon d'allèles était de 0,04 et le taux estimé de faux allèles (taille d'allèle erronée notée en raison d'un bégaiement, d'artefacts PCR ou d'une erreur humaine) était de 0,01. La présence potentielle d'allèles nuls a été évaluée à l'aide de MICROCHECKER (VanOosterhout et al. 2004), les calculs ayant été effectués pour l'ensemble des données sur les loups et pour un ensemble de données subdivisé par groupes de population (voir les résultats).

Pour l'ADNmt, nous avons calculé le nombre moyen de différences nucléotidiques (k), la diversité des haplotypes (H_d), la diversité nucléotidique (π), les statistiques D de Tajima, D^* et F^* de Fu et Li en utilisant DNASP (Librado et Rozas, 2009). La structure génétique de l'ADNmt a été évaluée à l'aide du logiciel GENELAND (Guillot et al. 2008), qui intègre des informations spatiales dans le modèle. Cette analyse a été réalisée avec quatre chaînes indépendantes pour 100 000 000 de générations après 10 000 000 de déverminage pour des valeurs de K comprises entre 1 et 5.

Pour les données microsatellites, nous avons estimé l'hétérozygotie attendue et observée, le coefficient de consanguinité (F_{IS}) et l'indice d'information de Shannon à l'aide de GENALEX (Peakall et Smouse 2006), tandis que la richesse allélique a été calculée à l'aide de FSTAT (Goudet 2001). Les tests exacts d'équilibre de Hardy-Weinberge (HWE) ont été réalisés dans GENEPOP (Rousset 2008) en utilisant la méthode MCMC avec 10 000 pas de mémorisation suivis de 1 000 lots avec 10 000 itérations par lot. La F_{ST} par paire entre les clusters identifiés dans STRUCTURE a été calculée en utilisant ARLEQUIN (Excoffier et al. 2005), avec une signification testée en utilisant 10 000 mutations.

La taille effective de la population (N_e) a été calculée à l'aide de deux méthodes de déséquilibre de liaison, mises en œuvre dans les logiciels NEESTIMATOR (Hill 1981 ; Ovenden

et al. 2007), LDNE (Waples et Do 2008) et ONESAMP (Tallmon et al. 2008) avec 50 000 itérations et une fourchette initiale de N_e comprise entre 10 et 1 000. Les échantillons présentant des données manquantes ont été exclus (Tableau S1). Les signaux de goulot d'étranglement ont été évalués à l'aide du logiciel BOTTLENECK (Cornuet et Luikart 1996), les tests de signification étant effectués avec 1 000 itérations et avec une proportion de 70% du modèle à allèles infinis pour le modèle à deux phases. Un test de changement de mode dans les fréquences alléliques a également été effectué.

Nous avons utilisé le logiciel STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) pour l'analyse de la structure de la population à l'aide de données microsatellites. STRUCTURE n'est pas bien adapté aux données où l'isolement par la distance est présent, et peut déduire la structure génétique avec la plupart des individus ayant une ascendance mixte (Structure Manual-Pritchard et al. 2010). Par conséquent, nous avons testé l'isolement par la distance à l'aide d'un test de Mantel et de l'autocorrélation spatiale, tel qu'implémenté dans le logiciel GENALEX (Peakall et Smouse 2006).

L'analyse STRUCTURE a été réalisée avec quatre runs indépendants pour le nombre prédéfini de populations (K) entre 1 et 15, avec 100 000 000 répliqués après 10 000 000 de burn-in. Nous n'avons utilisé aucune information préalable sur les populations et un modèle de mélange avec des fréquences d'allèles corrélées. Cette analyse a été répétée avec l'ajout des échantillons de chiens sauvages, afin d'évaluer la présence d'une hybridation loup-chien, ainsi que d'autres analyses dédiées à cet objectif (voir ci-dessous). STRUCTUREHARVESTER (Earl et vonHoldt 2011) a été utilisé pour évaluer les résultats et appliquer la modification (Evanno et al. 2005) le cas échéant. La structure génétique a été évaluée en utilisant le modèle spatial implémenté dans GENELAND (Guillot et al. 2008). Nous avons exécuté quatre chaînes indépendantes pour 10 000 000, après 1 000 000 de rodage, pour des valeurs de K de 1 à 15.

Étant donné que STRUCTURE et GENELAND tentent tous deux de maximiser le HWE pour chaque valeur de K, les résultats peuvent être biaisés dans les populations en déséquilibre (par exemple, les populations connaissant de fortes fluctuations démographiques), nous avons également déduit le nombre de grappes en utilisant la méthode d'analyse discriminante multivariée des composantes principales (DAPC ; Jombart et al. 2010) employée dans le paquetage R ADEGENET (Jombart et Ahmed 2011). Nous avons également utilisé ADEGENET pour effectuer une analyse en composantes principales pour un ensemble d'échantillons comprenant les loups bulgares et 10 échantillons de Grèce, afin d'évaluer le niveau de leur spécificité.

Les mélanges possibles entre les loups et les autres canidés ont été évalués à l'aide du programme NEWHYBRIDS (Anderson et Thompson 2002). Comme trois des échantillons de loups supposés ont été identifiés comme des chacals dorés (*C. aureus*) (voir ci-dessous), l'analyse a été effectuée indépendamment pour l'hybridation loup-jackal et l'hybridation loup-chien. L'ensemble de données loup-chien a été analysé en utilisant 30 000 000 itérations après 10 000 000 burn-in, tandis que l'ensemble de données loup-jackal a été analysé en utilisant 40 000 000 itérations après 12 000 000 burn-in. Pour les deux ensembles de données, les classes d'hybrides testées allaient des espèces pures aux rétrocroisements de niveau trois pour chaque espèce, y compris les croisements F1 et F2 (soit un total de 10 classes de mélange différentes).

Nous avons évalué la parenté pour l'ensemble de données sur les loups Bulgares afin d'identifier les individus étroitement apparentés qui formaient probablement des groupes familiaux centraux (qui pourraient inclure des membres de la meute et des individus qui se sont dispersés de leur meute natale). Nous avons utilisé la méthode de reconstruction de la parenté complète mise en œuvre dans le logiciel KINGROUP (Konovalov et al. 2004) pour identifier les groupes d'individus apparentés au niveau des paires parent-parent, des membres à part entière ou des membres à demi-part. Nous avons également procédé à l'attribution de la parenté à l'aide du logiciel CERVUS (Kalinowski et al. 2007). Trois analyses différentes ont été effectuées : (1) Analyse de maternité avec tous les individus comme progéniture potentielle, et toutes les femelles comme mères potentielles ; (2) Analyse de paternité avec tous les individus comme progéniture potentielle, et tous les mâles comme pères potentiels ; (3) Analyse de paires de parents avec tous les individus considérés à la fois comme mères ou pères potentiels et comme progéniture (parce que l'âge des individus était inconnu).

Dans l'analyse CERVUS, un individu était accepté comme parent potentiel s'il était assigné à la progéniture avec un degré de confiance de 95% et avec pas plus de deux loci non concordants. Cependant, dans quelques cas, un critère plus souple a été utilisé (comme expliqué ci-dessous), parce que notre objectif était d'identifier des groupes familiaux centraux en utilisant des informations combinées de CERVUS, KINGROUP et des haplotypes ADNmt, plutôt que d'établir des généalogies exactes au sein de chaque groupe familial. Étant donné qu'une meute de loups se compose généralement d'un seul couple et de sa progéniture, la plupart des individus (à l'exception du père) devraient avoir le même haplotype d'ADNmt, en plus d'être tous apparentés. Par conséquent, un groupe d'individus partageant le même haplotype d'ADNmt, attribué à la même mère dans CERVUS et au même groupe de frères et sœurs dans KINGROUP, a été considéré comme un groupe familial. Si l'un des frères et sœurs identifiés dans KINGROUP n'a été attribué à la mère présumée qu'avec un niveau de confiance modéré (80%), il a tout de même été considéré comme appartenant au groupe familial, car différentes analyses l'ont identifié de manière cohérente comme un proche parent d'autres membres du groupe et parce que l'identification du lien de parenté exact n'était pas essentielle à nos fins.

RESULTATS

Variabilité génétique des loups Bulgares

Trois des loups supposés avaient des haplotypes d'ADNmt de chacal doré ; cette classification taxonomique a été confirmée par les données microsatellites (voir ci-dessous). Ces trois individus ont été exclus de toutes les analyses ultérieures, sauf mention explicite.

Parmi les loups, nous avons trouvé **six haplotypes d'ADNmt différents** (w6, w10, w13, w16, w17, w27 ; fréquences dans la Figure S2), tous précédemment décrits par Pilot et al. (2010) et représentant les **deux haplogroupes** principaux définis dans ces derniers. Les niveaux de diversité étaient élevés : $k = 5,03$ (variance = 0,12) ; $Hd = 0,75$ (SE = 0,019) ; $\pi = 0,022$ (SE = 0,00029). Les valeurs positives du D de Tajima (2,71, $P < 0,01$), du F^* de Fu et Li (0,91, $P > 0,10$) et du D^* (1,86, $P < 0,05$) reflètent probablement le goulot d'étranglement des années 1970, étant donné qu'il était récent et qu'il impliquait une fragmentation en cinq endroits isolés.

La diversité génétique des loci microsatellites était également relativement élevée ($I = 1,57$; richesse allélique = 8,5). L'hétérozygotie observée (0,654, SE 0,031) était inférieure à l'hétérozygotie attendue (0,734, SE 0,026), ce qui a entraîné un coefficient de consanguinité élevé F_{IS} (0,113, SE 0,019) et des écarts par rapport à HWE (Tableau S2). Pour évaluer les biais potentiels du F_{IS} dus à l'inclusion d'individus apparentés, nous avons retiré tous les individus sauf un de chaque groupe familial identifié dans l'analyse de parenté. Cela donne un ensemble de données de 62 individus et n'a pas modifié de manière significative l'hétérozygotie observée (0,633, SE 0,030) et attendue (0,732, SE 0,025), ni le F_{IS} (0,139, SE 0,020).

Un F_{IS} positif pourrait potentiellement résulter de la présence d'allèles nuls. MICROCHECKER a détecté des allèles nuls putatifs dans 7 loci microsatellites lorsqu'il a été appliqué à l'ensemble des données sur les loups. Cependant, l'estimation des allèles nuls est basée sur l'hypothèse que toute déviation observée de l'HWE vers le déficit en hétérozygotes résulte uniquement de la présence d'allèles nuls (voir par exemple Chapuis et Estoup 2007). Cela peut conduire à des **faux positifs** dans les populations qui s'écartent de l'équilibre, par exemple en raison de la structure de la population (effet Wahlun). Lorsque nous avons appliqué MICROCHECKER à deux sous-populations identifiées dans STRUCTURE (voir ci-dessous), le nombre de loci identifiés comme ayant des allèles nuls a été réduit à deux dans chacune de ces sous-populations et ces loci n'étaient pas cohérents entre les sous-populations (Tableau S3), ce qui suggère que les allèles nuls sont des faux positifs résultant de violations de l'équilibre héréditaire dans notre population d'étude.

Taille effective de la population et analyse du goulot d'étranglement

Les estimations de N_e varient de 162 calculées avec NEESTIMATOR à 66 calculées avec LDNE en utilisant uniquement les allèles dont la fréquence est supérieure à 0,05 (Tableau 1). ONESAMP a fourni une estimation dont la fourchette englobe toutes les valeurs obtenues avec les autres méthodes. Nous utilisons donc la moyenne de N_e obtenue avec ONESAMP dans la discussion de nos résultats concernant N_e . Nous avons trouvé des preuves d'un goulot d'étranglement uniquement pour le modèle de mutation I.A.M. mis en œuvre dans BOTTLENECK (Tableau S4), et il n'y a pas eu de changement dans la distribution attendue de la classe de taille des allèles.

Isolement par la distance et autocorrélation spatiale

Le test de Mantel a montré une corrélation faible et non significative entre les distances génétiques et géographiques ($R^2 = 0,0222$; $P = 0,992$; Figure S3A). Nous sommes donc convaincus que les résultats de l'analyse de la structure de la population (voir ci-dessous) ne sont pas affectés par l'isolement par la distance. Les valeurs d'autocorrélation spatiale étaient faibles pour toutes les classes de distance ($r \leq 0,069$), avec des valeurs positives significatives trouvées pour les deux plus petites classes de distance (25 km et 50 km ; Figure S3B). Les corrélations positives sur les petites distances sont probablement dues à la présence de groupes de parents, mais cela est contrebalancé par une dispersion subadulte sur des distances modérées (50-100 km) et parfois longues (jusqu'à environ 1 000 km) (Wabakken et al. 2007).

Structure de la population

Pour l'ensemble de données sans chiens, bien que la probabilité a posteriori la plus élevée de STRUCTURE soit pour $K = 6$ (Figure S4), aucun autre groupe avec des individus assignés n'a été ajouté à partir de $K = 3$, qui était également le K le plus probable après la correction ΔK (Evanno et al. 2005) (Figure S5). Pour $K = 3$ (Figure 2a), la plupart des individus se sont regroupés en deux groupes différents, quelques individus formant un cline d'appartenance mixte. Le troisième groupe était composé de trois individus identifiés comme des chacals dorés sur la base de l'ADNmt, ce qui confirme leur identification spécifique. Cinq loups présentaient une ascendance mixte avec le groupe de chacals, ce qui pourrait être la signature d'une hybridation récente entre les loups et les chacals (Fig. 2).

L'ensemble des données comprenant des échantillons de chiens sauvages a révélé un modèle similaire de structure de la population. Bien que $K = 9$ ait la probabilité postérieure la plus élevée (Figure S6), aucun groupe avec des individus assignés n'a été ajouté au-dessus de $K = 4$ (Figure 2). La division au sein des échantillons de loups est cohérente avec celle obtenue à partir de l'analyse sans les échantillons de chiens (Fig. 2). Dans tous les diagrammes à barres pour $K = 2-4$, la présence d'un flux génétique entre les chiens et les loups peut être détectée (Fig. 2), tandis que dans le diagramme à barres pour $K = 4$, l'introgression de l'ADN de chacal dans certains des échantillons de loups est clairement visible (Fig. 2).

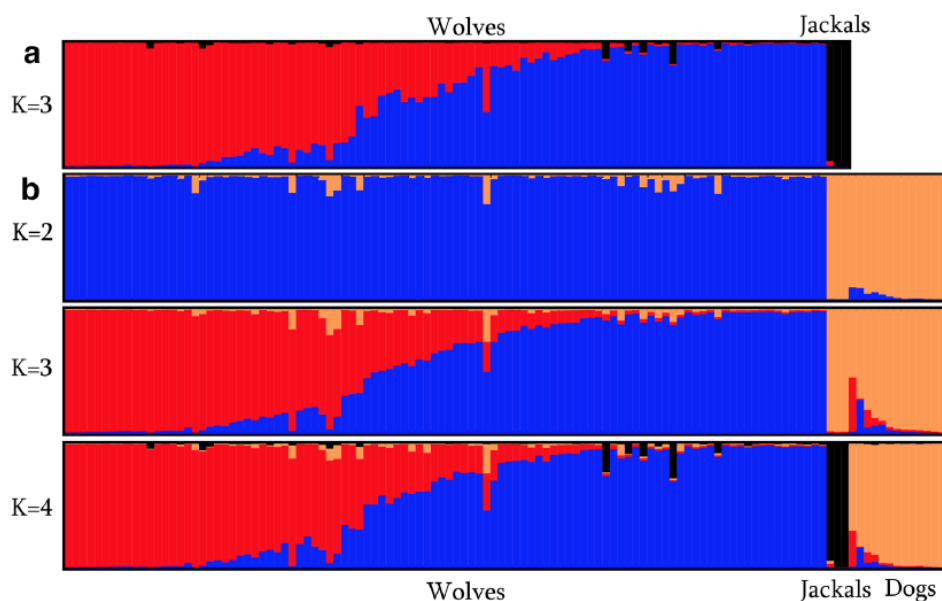


Fig. 2. Diagramme à barres de la structure pour : **a)** $K = 3$ obtenu à partir de l'ensemble de données sans les échantillons de chiens sauvages ; **b)** $K = 2-4$ obtenu à partir de l'ensemble de données avec les échantillons de chiens sauvages ajoutés

Aucune division nette entre les deux principaux groupes de loups n'a été identifiée dans STRUCTURE, c'est-à-dire que la plupart des individus ont montré un certain niveau de mélange entre ces groupes. Pour les besoins du calcul de la F_{ST} par paire, les individus ont été assignés à l'un de ces groupes s'ils avaient 60% ou plus d'ascendance dans ce groupe, ce qui a donné un groupe avec $N = 50$ (groupe A) et un autre avec $N = 41$ (groupe B). La F_{ST} par paire entre les deux groupes était modérée, mais significative ($F_{ST} = 0,052$, $P < 0,001$). La valeur F_{IS} était inférieure à la valeur globale dans la grappe A ($F_{IS} = 0,063$, SE 0,021), mais n'a pas changé de manière significative dans la grappe B ($F_{IS} = 0,110$, SE 0,042) ; les deux valeurs étaient suffisamment élevées pour entraîner des écarts significatifs par rapport au HWE ($P < 0,001$ dans chaque grappe).

La DAPC a également identifié $K = 2$ comme le nombre le plus probable de grappes dans la population de loups, bien qu'avec un soutien marginal par rapport à $K = 3$ (Figure S7). Le diagramme d'affectation de la DAPC (Figure S8) était en grande partie cohérent avec celui obtenu avec STRUCTURE (Figure 2), bien que la DAPC ait inféré un plus grand degré de séparation entre les deux grappes.

Analyses spatiales

Les résultats de GENELAND pour l'ensemble des données microsatellites suggèrent un K optimal de 13, avec peu de soutien pour $K = 14$ et 15. Cependant, la carte d'affectation des grappes qui en résulte reflète largement la distribution des groupes familiaux (Figure S11) plutôt que la structure de la population. Nous nous sommes donc concentrés sur les résultats pour K compris entre 2 et 4, afin de les comparer avec les résultats obtenus dans STRUCTURE et avec les résultats de GENELAND obtenus pour l'ADNmt (voir ci-dessous). Une carte de l'affectation des groupes pour $K = 2$ révèle une division principale entre la partie sud-ouest et le reste de la zone d'étude, avec quelques ancêtres mixtes dans la zone géographique centrale (Fig. 3a). Pour $K = 3$, nous avons obtenu deux grands clusters correspondant à ceux identifiés pour $K = 2$, et le troisième cluster qui n'était pas cohérent entre les runs. Les groupes obtenus pour $K = 4$ (Figure S9) correspondaient largement aux groupes basés sur l'ADNmt décrits ci-dessous.

Les résultats de GENELAND pour l'ADNmt ont été les plus favorables à $K = 4$ (Figure S10). Cependant, la distribution géographique du groupe 4 englobait principalement une zone de faible couverture d'échantillonnage et n'était pas cohérente entre les séries (Figure S10). Le schéma général était cohérent avec celui obtenu avec les microsatellites pour $K = 2$ (Figure 3a), impliquant la séparation des échantillons du sud-ouest, avec une division supplémentaire entre les échantillons de l'ouest et ceux de l'est (Figure 3b).

Parenté et répartition spatiale de la parenté

Nous avons identifié 14 groupes familiaux principaux dans la zone d'étude. 7 d'entre eux étaient constitués d'individus tués ensemble, représentant donc probablement des meutes. La taille moyenne des groupes familiaux identifiés était de 3,5 individus (SD = 1,7 ; range 2-8). Il s'agit du nombre moyen de membres de la famille détectés plutôt que de la taille de la meute, car il est peu probable que tous les membres de la meute aient été échantillonnés et parce que les individus qui se sont dispersés peuvent toujours être assignés à leur meute natale. La plupart des individus ont été localisés dans une zone cohérente avec la distance moyenne de dispersion individuelle de 100 km (Aspi et al. 2006 ; Fabbri et al. 2007 ; Figure S11). Les exceptions représentent probablement une dispersion sur de longues distances.

Hybridation entre les loups et les autres canidés

Les résultats de NEWHYBRIDS suggèrent que bien que l'hybridation entre les loups et les chiens soit apparente, l'introggression de gènes de chiens dans le pool génétique des loups est limitée (Fig. 4a). Cependant, aucun des chiens sauvages échantillonnés ne présentait d'ascendance canine pure, bien que cela puisse refléter une ascendance commune récente entre les deux espèces (voir Verginelli et al. 2005). Dix individus présentant un phénotype de loup gris ont montré des signes de mélange avec des chiens. Ils représentaient 9,8% des échantillons de loups analysés (voir Tableau S5 ; Figure S12 pour plus de détails).

Les preuves d'hybridation entre les loups et les chacals étaient beaucoup plus faibles, mais STRUCTURE et NEWHYBRIDS ont identifié plusieurs loups auxquels on a attribué une faible probabilité d'avoir des ancêtres chacals (Fig. 4b). Cependant, les individus ayant une ascendance de chacal n'étaient pas cohérents entre STRUCTURE et NEWHYBRIDS. Un plus grand nombre d'échantillons de chacals est nécessaire pour obtenir des résultats plus concluants.

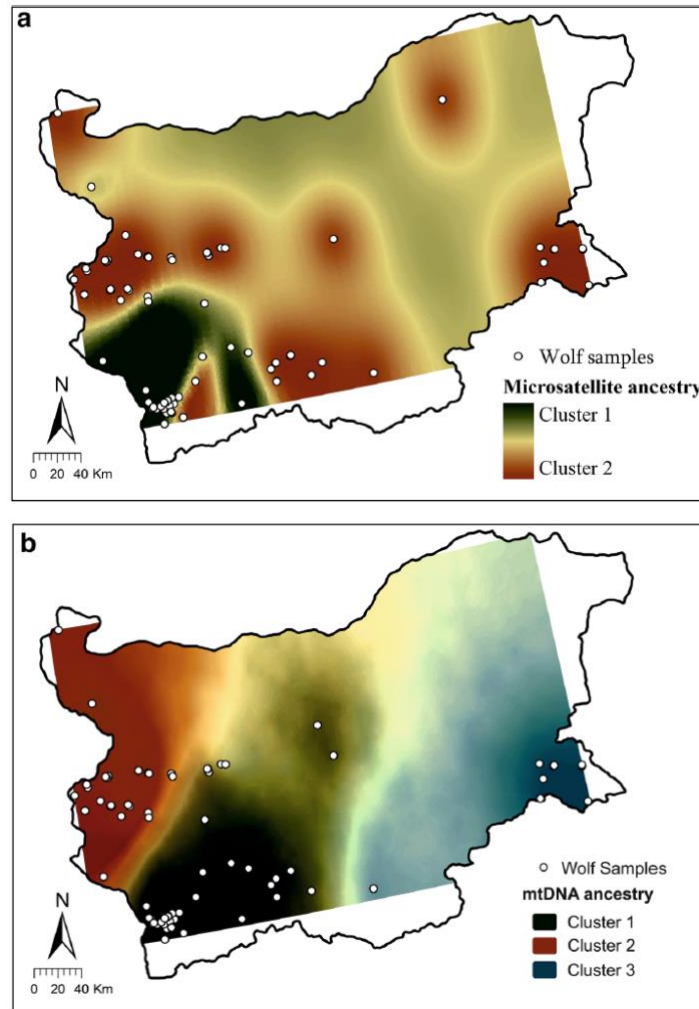


Fig. 3. Distribution de la probabilité d'appartenance à un groupe obtenue dans GENELAND sur la base **a)** des loci microsatellites pour $K = 2$; **b)** sur la base de l'ADNmt. Il s'agit d'une image composite basée sur l'interprétation des cartes d'affectation des grappes individuelles. Voir la figure S10 pour les cartes d'affectation des grappes individuelles et le texte principal pour les détails de l'interprétation

DISCUSSION

Diversité génétique de la population de loups Bulgares

Les niveaux de diversité des loups Bulgares dans la région de contrôle de l'ADNmt ($H_d = 0,75$, $\pi = 0,022$) étaient élevés par rapport à d'autres populations Européennes de loups de Russie Européenne, de Pologne et de la péninsule Ibérique, avec H_d compris entre 0,34 et 0,67 et π compris entre 0,009 et 0,016 (Sastre et al. 2011, Czarnomska et al. 2013) (Tableau S6). L'hétérozygotie observée au niveau des microsatellites (0,654) était comparable aux populations du nord-est de l'Europe (par exemple, 0,663 pour la Russie Européenne, Sastre et al. 2011 ; 0,680 pour la Finlande, Aspi et al. 2006), mais plus élevée que dans la péninsule des Apennins, la péninsule Ibérique et la Pologne (0,52-0,62 ; Fabbri et al. 2007 ; Sastre et al.

2011 ; Czarnomska et al. 2013) (Tableau S6). Bien que les comparaisons de la diversité génétique entre les différentes études ne soient pas linéaires, étant donné que différentes longueurs de séquences de l'ADNmt et différents loci microsatellites ont été utilisés, des informations importantes peuvent néanmoins être obtenues par de telles comparaisons, en particulier si l'histoire de la population et l'état de conservation actuel sont pris en compte.

Le coefficient de consanguinité F_{IS} (0,113) était comparable à ceux de la population de loups Finlandais après le récent accident (0,108 ; Jansson et al. 2012), et des populations isolées d'Italie (0,127 ; Verardi et al. 2006) et de la péninsule Ibérique (0,177 ; Sastre et al. 2011) (Tableau S6). Bien que les niveaux de F_{IS} puissent être gonflés en raison de l'effet Wahlund et de la présence d'individus étroitement apparentés dans l'ensemble des données, cela est vrai pour toutes les populations mentionnées ci-dessus, dans lesquelles la reproduction a été confirmée de manière indépendante en utilisant d'autres méthodes (par exemple, voir Randi 2011 pour une revue des études sur les loups Italiens). Dans notre étude, le F_{IS} est resté élevé après l'élimination des individus apparentés de l'ensemble des données. De plus, comme pour la population de loups Finlandaise (Aspi et al. 2006), nous avons détecté des groupes génétiques à petite échelle composés de groupes familiaux (en utilisant GENELAND), ce qui peut refléter une homogénéité génétique accrue des meutes due à la consanguinité.

Les niveaux d'hétérozygotie observés et d'autres mesures de la diversité génétique sont élevés malgré la déviation de l'HWE vers un déficit d'hétérozygotes. Les niveaux élevés de F_{IS} observés ainsi que les niveaux élevés d'hétérozygotie peuvent se produire si une augmentation récente de la pression de chasse entraîne des accouplements incestueux et l'adoption de mâles immigrés non apparentés qui ne se reproduisent pas (du moins pas immédiatement après avoir rejoint la meute). L'accouplement incestueux et la présence d'adoptés non apparentés ont été documentés dans d'autres populations de loups (e.g. Jedrzejewski et al. 2005 ; Liberg et al. 2005 ; vonHoldt et al. 2008 ; Rutledge et al. 2010). L'accouplement incestueux peut se produire si un individu reproducteur est perdu à l'approche de la saison de reproduction (Liberg et al. 2005 ; vonHoldt et al. 2008), tandis que l'adoption peut se produire en dehors de la saison de reproduction. Jedrzejewski et al. (2005) ont documenté à la fois des accouplements incestueux et la présence d'un mâle non apparenté et non reproducteur dans une meute au sein d'une population intensément chassée. Rutledge et al. (2010) ont constaté que le pourcentage de meutes avec des adoptés non apparentés dans la même population de loups a diminué de 80 à 6% après une interdiction de chasse. Ces études apportent un soutien indirect à l'hypothèse selon laquelle la forte consanguinité détectée chez les loups Bulgares résulte d'une forte pression de chasse. Une relation causale n'a pu être testée directement qu'en comparant les niveaux de consanguinité et la structure des meutes chez les loups Bulgares avant et après l'interdiction de la chasse. Cette étude fournit des données avant l'interdiction de la chasse, et si une interdiction de la chasse est introduite en Bulgarie, une autre étude pourrait être réalisée sur la base d'un échantillonnage non invasif.

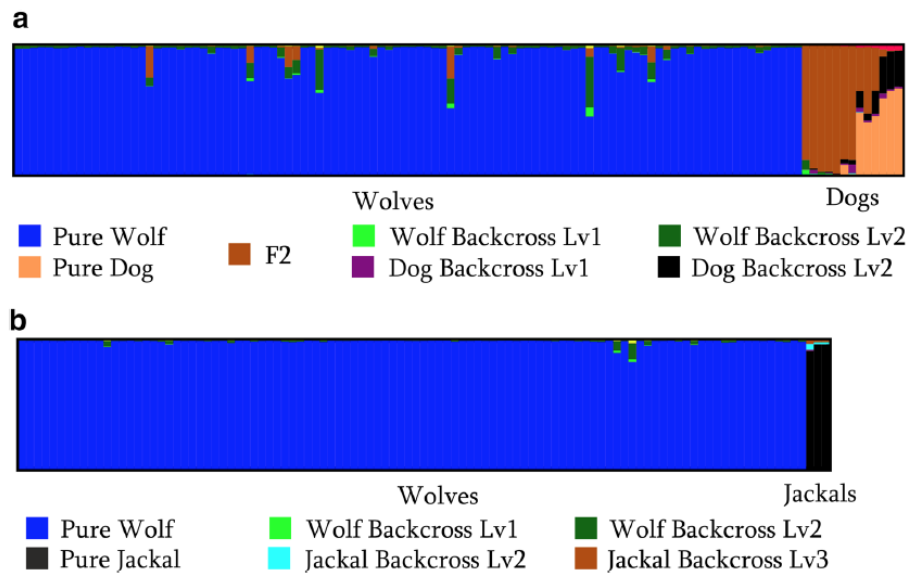


Fig. 4. Graphique d'hybridation obtenu à l'aide du logiciel NewHybrids entre : **a)** les loups et les chiens ; **b)** les loups et les chacals

Il convient de noter que les niveaux d'hétérozygotie gonflés pourraient s'expliquer en partie par l'immigration d'une population génétiquement différenciée située en dehors de la zone d'étude. La comparaison avec des échantillons de Grèce n'a révélé aucune différenciation avec les populations Bulgares (Figure S13), bien que la puissance soit limitée par la petite taille de l'échantillon (Grèce $N = 10$). Des études antérieures basées sur l'ADNmt ont montré une composition similaire des haplotypes dans différents pays des Balkans (Randi et al. 2000 ; Pilot et al. 2010 ; Gomercic et al. 2010). Milenkovic et al. (2010) ont révélé une différenciation morphologique significative entre les loups des Balkans et des Carpates, mais il est peu probable que l'immigration des Carpates vers la Bulgarie soit répandue sur de si grandes distances. Une étude plus étendue incluant l'ensemble de la région des Balkans est nécessaire pour analyser les schémas de différenciation génétique et de flux de gènes dans cette zone. Des données supplémentaires sur les loups Bulgares sont également nécessaires compte tenu de la grande diversité génétique détectée et du peu de restrictions légales à la chasse au loup. On peut s'attendre à ce qu'une pression de chasse continue, accompagnée d'une perturbation de la structure de la parenté et de niveaux de consanguinité élevés, réduise l'hétérozygotie à l'avenir (Nilsson 2004 ; Liberg et al. 2005 ; Temple et Terry 2007). Cela a été observé en Finlande, où la population de loups en expansion soumise à une pression de chasse modérée (~15% de la population recensée) a connu un déclin démographique soudain combiné à une perte significative d'hétérozygotie (Jansson et al. 2012). En Bulgarie, la pression de chasse légale estimée est beaucoup plus élevée (25-50%), et la mortalité supplémentaire due au braconnage, bien que difficile à quantifier, ne peut être ignorée (voir Lieberg et al. 2012).

Hybridation

L'hybridation avec introgression entre les loups sauvages et les chiens sauvages a été observée dans d'autres parties de l'Europe (Vila et al. 2003 ; Verardi et al. 2006 ; Godinho et al. 2011) et constitue une préoccupation urgente en matière de conservation (Boitani 2003). On craint que l'introgression de variantes de gènes de chiens dans des populations de loups épuisées ne conduise au déplacement de variantes de gènes exclusives aux loups, et ne compromette ainsi leur survie à long terme dans la nature (Butler 1994 ; Rhymer et Simberloff 1996). Bien que l'hybridation entre les loups et les chiens sauvages puisse être détectée dans nos données,

elle n'a pas été étendue car la plupart des individus ont été identifiés comme des loups purs, peu ont montré des signes de rétrocroisement, et aucun hybride de première génération n'a été détecté.

Un autre résultat remarquable est que STRUCTURE et NEWHYBRIDS suggèrent une hybridation récente entre les loups et les chacals dorés. Les loups sont connus pour s'hybrider avec d'autres espèces de canidés, en particulier dans les zones de chevauchement des aires de répartition et dans les cas où l'épuisement de la population réduit la disponibilité des partenaires (Hailer et Leonard 2008). L'aire de répartition du loup gris et du chacal doré se chevauche dans le sud de l'Asie, au Moyen-Orient et dans les Balkans, et aucune étude d'hybridation n'a été réalisée dans les zones où ces deux espèces coexistent. Certains canidés d'Afrique du Nord initialement classés comme chacals dorés (*C. aureus*) se sont avérés porter des haplotypes d'ADNmt appartenant au clade du loup gris (Rueness et al. 2011 ; Gaubert et al. 2012). Ceci a été interprété comme une erreur d'identification taxonomique, mais pourrait également résulter de l'hybridation et de l'introgression de l'ADNmt du loup gris dans les populations de chacals dorés ; une analyse de l'ADN nucléaire est nécessaire pour clarifier ce point.

Notre analyse était d'une puissance limitée en raison du petit nombre de chacals, mais elle indique la nécessité d'une enquête plus approfondie sur l'hybridation possible entre le loup et le chacal en Bulgarie. Les estimations annuelles du nombre de chacals et de chiens sauvages par l'Agence forestière Bulgare suggèrent que plus de 40 000 chacals et 20 000 chiens sauvages existent dans le pays (bien que ces chiffres puissent être surestimés). La distribution des chacals s'est considérablement étendue au cours des 20-30 dernières années et elle chevauche largement la distribution des loups (Popov 2003). Il existe donc de nombreuses possibilités d'hybridation entre les loups et les chacals, en particulier si la diminution du nombre de loups rend plus difficile la recherche de partenaires appropriés pour l'accouplement. Il convient de noter que le mécanisme comportemental conduisant à l'hybridation peut être le même que dans le cas d'un accouplement incestueux, c'est-à-dire qu'il peut être déclenché par la perte d'un individu reproducteur à l'approche de la saison de reproduction.

Évaluation démographique

Les résultats de l'analyse BOTTLENECK sont cohérents avec l'histoire démographique connue des loups Bulgares. Le goulot d'étranglement génétique n'a pas été confirmé par tous les tests, mais la méthode utilisée ici est connue pour ne pas détecter les goulots d'étranglement récents dans les populations qui se sont rétablies depuis la réduction de la taille (Le Page et al. 2000 ; Whitehouse et Harley 2001). Bien que le goulot d'étranglement des années 1970 puisse être considéré comme récent (il y a environ 13 générations de loups, compte tenu d'un temps de génération moyen de 3 ans ; Mech et Seal 1987), il n'a pas duré longtemps, car les estimations antérieures de 1900 suggèrent une taille de recensement plus importante de 1 000 à 1 600 individus (Spiridonov et Spassov 1985). Il est donc crédible que le goulot d'étranglement des années 1970 soit détecté dans les échantillons génétiques modernes, mais que son signal ait été affaibli en raison du rétablissement de la diversité génétique depuis lors.

La taille actuelle du recensement des loups Bulgares est estimée entre 700 et 800 individus (Spiridonov et Spassov, 2011), ce qui implique un rapport N_c/N moyen de 0,12 (95% CI

0,08-0,29 ; basé sur les valeurs N_e des résultats de l'ONESAMP). Ce ratio est plus important que celui obtenu pour les loups Ibériques (0,025-Blanco et al. 1992 ; 0,024-Sastre et al. 2011) mais similaire à celui obtenu pour les loups Russes (proche de 0,12 ; Sastre et al. 2011). Il est cependant inférieur au rapport N_e/N calculé pour les loups Finlandais avant l'effondrement de la population ($\sim 0,28$; Jansson et al. 2012) et pour la population de loups de Yellowstone réintroduite (0,26-0,33 ; vonHoldt et al. 2008) (Tableau S6). Le rapport N_e/N moyen attendu pour différents taxons est de 0,11 (Frankham et al. 2002), mais les rapports N_e/N plus élevés observés chez les loups de Finlande et de Yellowstone suggèrent que c'est la valeur attendue pour les populations soumises à une pression de chasse faible (Finlande) ou nulle (Yellowstone). Bien que les ratios pour la Finlande et le Yellowstone aient été obtenus pour des populations encore en croissance, le biais introduit par cela devrait diminuer le ratio N_e/N plutôt que de l'augmenter. Notamment, le ratio N_e/N dans la population Finlandaise a chuté à 0,097 après le crash démographique (Jansson et al. 2012). Nos estimations suggèrent que le ratio N_e/N chez les loups Bulgares est plus petit que les valeurs observées dans des populations plus stables, ce qui peut indiquer que les loups Bulgares réalisent leur plein potentiel reproductif. Cependant, nous devons noter qu'il y a actuellement une incertitude considérable dans les estimations de la taille du recensement en Bulgarie, et les intervalles de confiance pour les estimations de N_e étaient relativement élevés (conduisant à des intervalles de confiance pour le rapport N_e/N se chevauchant avec les estimations de Yellowstone et de la Finlande). De plus, bien que nous ayons comparé nos estimations avec celles obtenues en utilisant les mêmes méthodes dans d'autres études lorsqu'elles étaient disponibles, une telle comparaison directe n'était pas possible pour les loups de Yellowstone (vonHoldt et al. 2008). Une comparaison directe des rapports N_e/N entre les loups Bulgares et une autre population d'Europe de l'Est non chassée pourrait aider à évaluer si et comment ce rapport est affecté par la chasse.

Structure de la population

Les groupes de population identifiés correspondent bien à 3 des 5 zones où les loups ont survécu en plus grand nombre pendant la contraction extrême de l'aire de répartition dans les années 1970 (les deux autres zones ne sont pas échantillonnées dans cette étude ; Spiridonov et Spassov 1985). Les individus ayant une ascendance mixte entre les sous-populations détectées représentent soit un polymorphisme ancestral, soit des niveaux résiduels de flux de gènes au fur et à mesure que les populations divergent. Les niveaux modérés mais significatifs de F_{ST} entre les deux groupes STRUCTURE suggèrent cette dernière hypothèse, tandis que le scénario alternatif d'un mélange important après un contact secondaire conduirait à un excès d'hétérozygotes (l'effet de rupture d'isolement ; Hartl et Clark 1997), ce qui n'a pas été observé dans nos données. Cependant, la connectivité entre les sous-populations pourrait n'avoir été établie que récemment à la suite de l'expansion de l'aire de répartition. Il est également possible que des individus d'autres régions Européennes aient migré en Bulgarie pendant le goulot d'étranglement des années 1970, augmentant ainsi la différenciation apparente, mais les données disponibles dans cette étude ne sont pas suffisantes pour l'évaluer. Nous notons également que les méthodes de regroupement bayésien utilisées ont montré quelques preuves d'une sous-structure plus poussée chez les loups Bulgares, à la fois dans les microsatellites et dans l'ADNmt. Cependant, quatre aspects clés de nos résultats nous ont amenés à adopter une stratégie conservatrice dans l'identification des groupes de population : **premièrement**, les résultats de STRUCTURE pour

des valeurs de K plus élevées n'ont pas apporté de résolution supplémentaire malgré des scores de vraisemblance plus élevés ; **deuxièmement**, les résultats de STRUCTURE pour $K = 3$ n'ont pas montré de division génétique et spatiale claire entre les groupes de loups, suggérant ainsi un certain niveau de flux génétique ; **troisièmement**, l'approche multivariée mise en œuvre dans DAPC (qui ne repose pas sur des hypothèses HWE) n'a pas trouvé de soutien pour plus de deux groupes dans les échantillons de loups ; enfin, les résultats de GENELAND avec la vraisemblance la plus élevée ($K = 12$) correspondaient en grande partie à la distribution des groupes de parenté.

Néanmoins, il y a des indications que notre approche pourrait ne pas tenir compte de la structure de la population. Les résultats de DAPC ont montré un mélange beaucoup moins important entre les deux groupes, et le soutien à l'existence de trois groupes n'était que marginalement inférieur à celui de deux groupes. Les résultats de l'ADNmt suggèrent en outre l'existence de trois (voire quatre) groupes, ce qui serait attendu dans le cas d'une différenciation récente, car les fréquences des haplotypes de l'ADNmt se fixent plus rapidement dans une population en raison d'un N_e plus faible. Notre échantillonnage était opportuniste et la couverture de l'aire de répartition du loup en Bulgarie était donc inégale et incomplète, ce qui aurait pu compromettre la détection d'une différenciation de population à petite échelle.

La structure des populations de loups est connue pour être en corrélation avec les différences environnementales (e.g. Geffen et al. 2004 ; Pilot et al. 2006). Un chevauchement entre les trois groupes d'ADNmt identifiés (Fig. 3b) et les régions de topographie distincte (Figure S1) peut être observé, les différences d'altitude pouvant refléter des habitats différents avec des communautés d'ongulés distinctes et, en tant que telles, refléter des différences dans la disponibilité des ressources en proies. Par conséquent, la possibilité d'une sous-structure de la population détectée ultérieurement serait pertinente à des fins de conservation, étant donné que les perturbations de l'habitat local pourraient affecter les populations adaptées localement et réduire davantage la diversité génétique de cette espèce. Bien que les données de cette étude soient insuffisantes pour faire des déclarations fermes concernant la subdivision de la population à petite échelle et ses causes, elles soulignent la nécessité d'études supplémentaires sur la génétique de la conservation du loup en Bulgarie et dans la région des Balkans en général.

CONCLUSIONS DE L'ETUDE

Bien que les loups Bulgares semblent bien se remettre d'un goulot d'étranglement sévère, avec des niveaux élevés d'hétérozygotie, les rapports N_e/N sont faibles par rapport aux populations de loups protégées ailleurs et nous suggérons donc que la pression de chasse non réglementée a un effet notable sur la structure de la meute et la consanguinité, et peut compromettre la viabilité à long terme de la population Bulgare. L'hybridation avec les chiens semble être répandue mais insuffisante pour provoquer une forte introgression génétique dans le pool génétique des loups. De manière inattendue, nous avons également identifié des signes d'hybridation des loups avec les chacals dorés. Nos résultats soulignent la nécessité de mettre en place des efforts de conservation complets pour les loups Bulgares et mettent en évidence des considérations importantes pour la gestion de la chasse dans les populations de mammifères en voie de rétablissement en Europe.

References

- Aladzhem S (2000) Miracles in the world of plants of Bulgaria. In: Aladzhem S (ed) The green gold of Bulgaria. ABV-tech Limited, Sofia, pp 59–60
- Anderson EC, Thompson EA (2002) A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160:1217–1229
- Aspi J, Roininen E, Ruokonen M, Kojola I, Vilà C (2006) Genetic diversity, population structure, effective population size and demographic history of the Finnish wolf population. *Mol Ecol* 15:1561–1576
- Aspi J, Roininen E, Kiiskilä J, Ruokonen M, Kojola I, Bljudnik L, Danilov P, Heikkinen S, Pulliainen E (2008) Genetic structure of the northwestern Russian wolf populations and gene flow between Russia and Finland. *Conserv Genet* 10:815–826
- Blanco JC, Reig S, de la Cuesta L (1992) Distribution, status and conservation problems of the wolf *Canis lupus* in Spain. *Biol Conserv* 60:73–80
- Boitani L (2003) Wolf conservation and recovery. In: Mech LD, Boitani L (eds) Wolves: behaviour, ecology and conservation. University of Chicago Press, Chicago, pp 317–340
- Butler D (1994) Bid to protect wolves from genetic pollution. *Nature* 370:497
- Carmichael LE, Nagy JA, Larter NC, Strobeck C (2001) Prey specialization may influence patterns of gene flow in wolves of the Canadian Northwest. *Mol Ecol* 10:2787–2798
- Chapuis M-P, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol* 24:621–631
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001–2014
- Czamomska SD, Jędrzejewska B, Borowik T, Niedzialkowska M, Stronen AV, Nowak S, Mysłajek RW, Okarma H, Konopiński M, Pilot M, Śmietana W, Caniglia R, Fabbri E, Randi E, Pertoldi C, Jędrzejewski W (2013) Concordant mitochondrial and microsatellite DNA structuring between Polish lowland and Carpathian Mountain wolves. *Conserv Genet* 14:573–588
- Echegaray J, Vilà C (2010) Noninvasive monitoring of wolves at the edge of their distribution and the cost of their conservation. *Anim Conserv* 13:157–161
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47–50
- Fabbri E, Miquel C, Lucchini V, Santini A, Caniglia R, Duchamp C, Weber J-M, Lequette B, Marucco F, Boitani L, Fumagalli L,

- Taberlet P, Randi E (2007) From the Apennines to the Alps: colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Mol Ecol* 16:1661–1671
- Francisco LV, Langsten AA, Mellersh CS, Neal CL, Ostrander EA (1996) A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mamm Genome* 7:359–362
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge
- Gaubert P, Bloch C, Benyacoub S, Abdelhamid A, Pagani P et al (2012) Reviving the African wolf *Canis lupus lupaster* in north and west Africa: a mitochondrial lineage ranging more than 6,000 km wide. *PLoS ONE* 7:e42740
- Geffen E, Anderson MJ, Wayne RK (2004) Climate and habitat barriers to dispersal in the highly mobile grey wolf. *Mol Ecol* 13:2481–2490
- Godinho R, Llaneza L, Blanco JC, Lopes S, Álvares F, García EJ, Palacios V, Cortés Y, TALEGÓN J, Ferrand N (2011) Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Mol Ecol* 20:5154–5166
- Gomerčić T, Sindičić M, Galov A, Arbanasić H, Kusak J, Kocijan I, Gomerčić MD, Huber D (2010) High genetic variability of the grey wolf (*Canis lupus L.*) population from Croatia as revealed by mitochondrial DNA control region sequences. *Zool Studies* 49:816–823
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Guillot G, Santos F, Estoup A (2008) Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics* 24:1406–1407
- Hailer F, Leonard JA (2008) Hybridization among three native North American *Canis* species in a region of natural sympatry. *PLoS ONE* 3:e3333
- Hartl DL, Clark AG (1997) Principles of population genetics. Sinauer Associates, Sunderland
- Hill WG (1981) Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genet Res* 38:209–216
- Holmes NG, Dickens HF, Parker HL, Binns MM, Mellersh CS, Sampson J (1995) Eighteen canine microsatellites. *Anim Genet* 26:132–133
- Jansson E, Ruokonen M, Kojola I, Aspi J (2012) Rise and fall of wolf population: genetic diversity and structure during recovery, rapid expansion and drastic decline. *Mol Ecol* 21:5178–5193
- Jędrzejewski W, Branicki W, Veit C, Medugorac I, Pilot M, Bunevich AN, Jędrzejewska B, Schmidt K, Theuerkauf J, Okarma H, Gula R, Szymura L, Förster M (2005) Genetic diversity and relatedness within packs in an intensely hunted population of wolves *Canis lupus*. *Acta Theriol* 50:3–22
- Jombart T, Ahmed I (2011) ADEGENET 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 27:3070–3071
- Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet* 11:94
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16:1099–1106
- Kononov DA, Manning C, Henshaw MT (2004) Kingroup: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Mol Ecol Notes* 4:779–782
- Le Page SL, Livermore RA, Cooper DW, Taylor AC (2000) Genetic analysis of a documented population bottleneck: introduced Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus rufogriseus*) in New Zealand. *Mol Ecol* 9:753–763
- Leonard JA, Vilà C, Fox-Dobbs K, Koch PL, Wayne RK, Van Valkenburgh B (2007) Megafaunal extinctions and the disappearance of a specialized wolf ecomorph. *Curr Biol* 17:1146–1150
- Liberg O, Andrén H, Pedersen H-C, Sand H, Sejberg D, Wabakken P, Åkesson M, Bensch S (2005) Severe inbreeding depression in a wild wolf (*Canis lupus*) population. *Biol Lett* 1:17–20
- Liberg O, Chapron G, Wabakken P, Pedersen HC, Hobbs NT, Sand H (2012) Shoot, shovel and shut up: cryptic poaching slows restoration of a large carnivore in Europe. *P Roy Soc B-Biol Sci* 279:910–915
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452
- Lucchini V, Galov A, Randi E (2004) Evidence of genetic distinction and long-term population decline in wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines. *Mol Ecol* 13:523–536
- Mech LD, Seal US (1987) Premature reproductive activity in wild wolves. *J Mammal* 68:871
- Milenkovic M, Sipetic VJ, Blagojevic J, Totovic S, Vujosevic M (2010) Skull variation in Dinaric-Balkan and Carpathian gray wolf populations revealed by geometric morphometric approaches. *J Mammal* 91:376–386
- Nilsson T (2004) Integrating effects of hunting policy, catastrophic events, and inbreeding depression, in PVA simulation: the Scandinavian wolf population as an example. *Biol Conserv* 115:227–239
- Ostrander EA, Sprague GF, Rine J (1993) Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)_n markers for genetic mapping in dog. *Genomics* 16:207–213
- Ovenden JR, Peel D, Street R, Courtney AJ, Hoyle SD, Peel SL, Podlich H (2007) The genetic effective and adult census size of an Australian population of tiger prawns (*Penaeus esculentus*). *Mol Ecol* 16:127–138
- Peakall ROD, Smouse PE (2006) Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288–295
- Peshev T, Peshev D, Popov V (2004) Fauna of Bulgaria. Marin Drinov Press, Sofia
- Pilot M, Jędrzejewski W, Branicki W, Sidorovich VE, Jędrzejewska B, Stachura K, Funk SM (2006) Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Mol Ecol* 15:4533–4553
- Pilot M, Branicki W, Jędrzejewski W, Goszczynski J, Jędrzejewska B, Dykyy I, Shkvyrya M, Tsingarska E (2010) Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Evol Biol* 10:104
- Popov V (2003) Mammals in Bulgaria. Vitosha Nature Park Directorate, Sofia
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959
- Pritchard JK, Wen X, Falush D (2010) Documentation for Structure software: Version 2.3. Available from: http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure_software/release_versions/v2.3.4/structure_doc.pdf
- Randi E (2011) Genetics and conservation of wolves *Canis lupus* in Europe. *Mammal Rev* 41:99–111
- Randi E, Lucchini V, Christensen MF, Mucci N, Funk SM, Dolf G, Loeschke V (2000) Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conserv Biol* 14:464–473
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annu Rev Ecol Syst* 27:83–109
- Rousset F (2008) Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8:103–106
- Ruane EK, Asmyhr MG, Sillero-Zubiri C, Macdonald DW, Bekele A, Atickem A, Stenseth NC (2011) The cryptic African wolf:

- Canis aureus lupaster* is not a golden jackal and is not endemic to Egypt. *PLoS ONE* 6:e16385
- Rutledge LY, Patterson BR, Mills KJ, Loveless KM, Murray DL, White BN (2010) Protection from harvesting restores the natural social structure of eastern wolf packs. *Biol Conserv* 143:332–339
- Sastre N, Vilà C, Salinas M, Bologov VV, Urios V, Sánchez A, Francino O, Ramírez O (2011) Signatures of demographic bottlenecks in European wolf populations. *Conserv Genet* 12:701–712
- Shibuya H, Collins BK, Huang THM, Johnson GS (1994) A polymorphic (AGGAAT), tandem repeat in an intron of the canine von Willebrand factor gene. *Anim Genet* 25:122
- Spiridonov G, Spassov N (1985) Wolf—*Canis lupus* L., 1758. In: Botev, Peshev (eds) *Red Data Book of Bulgaria*. Bulgarian Academy of Science, Sofia, p 132
- Spiridonov G, Spassov N (2011) *Canis lupus* L., 1758. In: Golemanski V (ed) *Red Data Book of the Republic of Bulgaria*. Bulgarian Academy of Sciences & Ministry of Environment and Water, Sofia
- Tallmon DA, Koyuk A, Luikart G, Beaumont MA (2008) OneSamp: a program to estimate effective population size using approximate Bayesian computation. *Mol Ecol Resour* 8:299–301
- Temple HJ, Terry A (Compilers) (2007) *The status and distribution of European mammals*. Office for Official Publications of the European Communities: Luxembourg
- Tsingarska-Sedefcheva E (2007) Wolf activity towards livestock in two study areas in West Bulgaria and consequential conflict with livestock breeders. In: IIIrd Congress of Ecologists of the Republic of Macedonia, Struga
- Tsingarska-Sedefcheva E (2013) Wolf—Bulgaria. In: Kaczensky P, Chapron G, von Arx M, Huber D, Andren H, Linnell J (eds) *Status, management and distribution of large carnivores—bear, lynx, wolf & wolverine—in Europe*. European Commission, N°070307/2012/629085/SER/B3
- van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538
- Verardi A, Lucchini V, Randi E (2006) Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Mol Ecol* 15:2845–2855
- Verginelli F, Capelli C, Coia V, Musiani M, Falchetti M, Ottini L, Palmirotta R, Tagliacozzo A, Mazzorin ID-G, Mariani-Costantini R (2005) Mitochondrial DNA from prehistoric canids highlights relationships between dogs and South-East European wolves. *Mol Biol Evol* 22:2541–2551
- Vilà C, Walker C, Sundqvist AK, Flagstad Ø, Andersone Z, Casulli A, Kojola I, Valdmann H, Halverson J, Ellegren H (2003) Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf–dog hybrids. *Heredity* 90:17–24
- vonHoldt BM, Stahler DR, Smith DW, Earl DA, Pollinger JP, Wayne RK (2008) The genealogy and genetic viability of reintroduced Yellowstone grey wolves. *Mol Ecol* 17:252–274
- Wabakken P, Sand H, Liberg O, Bjärvall A (2001) The recovery, distribution, and population dynamics of wolves on the Scandinavian peninsula, 1978–1998. *Can J Zool* 79:710–725
- Wabakken P, Sand H, Kojola I et al (2007) Multistage, long-range natal dispersal by a global positioning system-collared Scandinavian wolf. *J Wildl Manag* 71:1631–1634
- Waples RS, Do CHI (2008) LDne: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Mol Ecol Resour* 8:753–756
- Whitehouse AM, Harley EH (2001) Post-bottleneck genetic diversity of elephant populations in South Africa, revealed using microsatellite analysis. *Mol Ecol* 10:2139–2149