



## Diversité génétique et structuration de la population de loups gris des Balkans centraux d'après les variations de l'ADN mitochondrial



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

**Mammalian Biology**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mambio](http://www.elsevier.com/locate/mambio)



---

Short Communication

**Genetic diversity and structuring of the grey wolf population from the Central Balkans based on mitochondrial DNA variation**

Mihajla Djan<sup>a,\*</sup>, Vladimir Maletić<sup>b</sup>, Igor Trbojević<sup>c</sup>, Dunja Popović<sup>a</sup>, Nevena Veličković<sup>a</sup>, Jelena Burazerović<sup>d</sup>, Duško Ćirović<sup>d</sup>

<sup>a</sup> University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Department of Biology and Ecology, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Serbia  
<sup>b</sup> University of Kiril and Metodij, Faculty of Forestry, Bul. Aleksandar Makedonski bb, 1000 Skopje, The Former Yugoslav Republic of Macedonia  
<sup>c</sup> University of Banja Luka, Faculty of Science, Mladena Stojanovića 2, 51000 Banja Luka, Bosnia and Herzegovina  
<sup>d</sup> University of Belgrade, Faculty of Biology, Studentski Trg 16, 11000 Belgrade, Serbia

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mambio.2014.03.001>

### Résumé

La population de loups gris Dinariques et des Balkans se situait autrefois à la frontière entre les grandes populations encore présentes en Europe de l'Est et les populations d'Europe occidentale, largement éradiquées. Au cours des dernières décennies, nous avons assisté au rétablissement de la population de loups en Europe occidentale. Une variation génétique importante a déjà été signalée au sein de la population de loups des Balkans, mais aucune caractérisation génétique rigoureuse n'a été effectuée pour ses **parties centrales**. Les objectifs de cette recherche étaient de déterminer la diversité génétique sur la base de la variabilité des séquences d'ADNmt, de déduire une éventuelle structuration de la population, de trouver des signaux génétiques d'expansions ou de goulots d'étranglement de la population et d'évaluer la position phylogénétique de la population de loups gris des Balkans centraux. Six **haplotypes** ont été détectés, dont trois n'ont été trouvés que dans la région des Balkans. Ces haplotypes appartiennent aux deux haplogroupes précédemment identifiés en Europe. D'après nos analyses de séquences d'ADNmt, la population de loups des Balkans Dinariques est différenciée verticalement en sous-populations « occidentales » (Croatie/Bosnie-Herzégovine) et « orientales » (Serbie/Macédoine). Aucun des résultats ne corrobore l'hypothèse d'une expansion de la population. **Au contraire**, les valeurs significativement positives pour le  $D$  de Tajima et le  $F_s$  de Fu pourraient suggérer un goulot d'étranglement démographique récent. Les données obtenues pourraient être utiles pour déterminer dans quelle mesure le patrimoine génétique des Balkans contribue aux populations nouvellement établies en Europe occidentale.

© 2014 Publié par Elsevier GmbH pour le compte de la Deutsche Gesellschaft für Säugetierkunde.

**Mots-clés** : Loup gris, Balkans, ADNmt, Structure de population

Le loup gris (*Canis lupus*) était abondant et largement répandu en Eurasie, en Amérique du Nord et en Afrique du Nord jusqu'à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle et au début du XX<sup>ème</sup> siècle (Boitani, 2000). La destruction généralisée de ses habitats, son extermination directe et la diminution de ses proies naturelles ont entraîné sa disparition d'Europe centrale et occidentale (Delibes, 1990 ; Randi et al., 2000 ; Randi, 2011). Seules deux populations isolées ont survécu, l'une en Italie (Boitani, 1992) et l'autre dans la péninsule Ibérique (Delibes, 1990), tandis que des populations plus importantes subsistaient dans les Balkans et en Europe de l'Est (Boitani, 2000 ; Lucchini et al., 2004 ; Gomercic et al., 2010). **La population de loups gris des Balkans constituait la frontière entre la population d'Europe de l'Est et la population d'Europe occidentale, largement éteinte.**

La protection juridique, associée au fort potentiel de dispersion et de reproduction des loups, a conduit au rétablissement du loup en Europe au cours des dernières décennies (Boitani, 1992 ; Salvatori et Linnell, 2005 ; Hausknecht et al., 2010). Les loups se sont rapidement étendus le long de la chaîne des Apennins, recolonisant les Alpes occidentales Italiennes et Françaises (Valière et al., 2003 ; Lucchini et al., 2004). **La surveillance génétique de ces populations a suggéré que les loups d'Italie sont partiellement isolés des autres populations Européennes.** Lucchini et al. (2004) ont indiqué que des loups présentant des génotypes distincts provenant de l'est se sont propagés depuis la Slovénie vers la frontière Italienne dans les Alpes orientales (Lucchini et al., 2004). **Plusieurs études génétiques antérieures suggèrent que la ou les populations de loups de la région des Balkans ont conservé une part significative de la variation historique à l'échelle paneuropéenne** (Randi et al., 2000 ; Lucchini et al., 2004 ; Gomercic et al., 2010). Aucune caractérisation génétique à grande échelle des populations de loups gris de la région des Balkans centraux n'a été réalisée à ce jour. Seuls quelques individus de cette région ont été inclus dans des études génétiques de population antérieures (Vilà et al., 1999 ; Randi et al., 2000 ; Pilot et al., 2010). Milenkovic (1997) a suggéré, sur la base d'analyses morphométriques, que les caractéristiques biogéographiques de la région des Balkans centraux, en particulier la vallée de la Morava-Vardar, influencent la structure de la population de loups gris Dinariques-Balkaniques.

Selon des estimations récentes, on compte aujourd'hui environ 700 à 800 loups en Serbie, plus de 1 000 en Macédoine, environ 400 en Bosnie-Herzégovine (Boitani, 2000 ; Milenkovic et al., 2007) et environ 250 en Croatie (Fabbri et al., 2013). Les loups ont connu un déclin sévère en Croatie au cours du XX<sup>ème</sup> siècle, mais depuis lors, la population a atteint sa taille estimée actuelle au cours des deux dernières décennies (Kusak et Huber 2010 ; Fabbri et al. 2013). Un déclin de la population a également été signalé en Bosnie-Herzégovine (Boitani, 2000). **À l'inverse, en Serbie et en Macédoine, les populations de loups sont en augmentation** (Boitani, 2000 ; Milenkovic et al., 2007).

Les loups d'Europe ne présentent pas de structure phylogéographique à grande échelle (Vilà et al., 1999 ; Randi et al., 2000 ; Pilot et al., 2010). Le réseau généalogique des populations de loups d'Europe de l'Est ne semble pas présenter de schéma géographique explicite dans la distribution des haplotypes d'ADN mitochondrial (Hausknecht et al., 2010) ; il en va de même pour la population Dinarique-Balkanique (Gomercic et al., 2010).

Les principaux objectifs de cette recherche étaient les suivants : (1) analyser la variabilité des séquences d'ADNmt de la population de loups gris des Balkans centraux, (2) déduire la

structuration possible de la population de loups gris des Balkans Dinariques causée par les caractéristiques biogéographiques des Balkans centraux (par exemple, la vallée de la Morava-Vardar), (3) étudier l'histoire démographique et mettre en évidence les signaux génétiques d'expansions ou de goulots d'étranglement de la population et (4) évaluer la position phylogénétique des loups des Balkans centraux.

L'ensemble de données sur les loups gris des Balkans Dinariques comprenait **192 séquences** de la région de contrôle de l'ADNmt. Des échantillons de tissu musculaire provenant de 87 loups gris de Serbie (53), de Macédoine (18) et de Bosnie-Herzégovine (16) ont été prélevés lors de chasses légales, pendant les saisons hivernales (1997-2010), et analysés dans le cadre de cette recherche (Fig. 1). Les 114 séquences restantes ont été extraites de GenBank (Gomercic et al., 2010 ; Vilà et al., 1999 ; Randi et al., 2000) et le nombre d'individus par haplotype a été déduit à partir de la référence originale. L'haplotype lu9 rapporté par Vila et al. (1999) et identifié chez un individu originaire de Croatie n'a pas été téléchargé dans GenBank et n'a donc pas été inclus dans notre ensemble de données.

L'ADN total a été extrait d'échantillons de tissu musculaire conservés dans l'éthanol à l'aide d'une méthode standard d'extraction au phénol-chloroforme-isoamylalcool avec digestion par la protéinase K (Sambrook et Russel, 2001). Un fragment partiel de la région de contrôle mitochondriale a été amplifié à l'aide des amorces CR1 et CR2R publiées par Palomares et al. (2002), avec une longueur de séquence cible de 280 pb. Environ 100 ng d'ADN génomique ont été amplifiés dans un volume total de 25 µl contenant 0,2 mM de dNTP, 0,5 µM de chaque amorce, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de Taq polymérase et 1× de tampon de réaction. Les conditions d'amplification par PCR ont été définies comme suit : étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 5 min, suivie de 35 cycles d'amplification – chaque cycle comprenant 40 s à 94°C, 50 s à 55°C et 1 min à 72°C – et une étape finale d'extension à 72°C pendant 10 min. Les produits de la PCR ont été purifiés à l'aide du kit de purification QIAquick PCR (QIAGEN). Le séquençage a été réalisé sur un analyseur génétique ABI3730xl (Applied Biosystems).

Les séquences ont été alignées à l'aide de l'algorithme Clustal W (Thompson et al., 1994) implémenté dans BioEdit 7.0.9.0. (Hall, 1999), et les ajustements finaux ont été effectués à l'œil nu. La longueur des séquences analysées après alignement était de 261 pb. Le polymorphisme de l'ADN (h-diversité des haplotypes, -diversité nucléotidique, k-nombre moyen de différences par paires), les paramètres de la variabilité génétique globale, les fréquences des haplotypes et les distances entre les haplotypes ont été calculés à l'aide d'ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier et Lischer, 2010). La diversité nucléotidique pour l'ensemble des données a été calculée selon le modèle de substitution nucléotidique de Kimura 2P (Kimura, 1980) avec une correction Gamma pour la variation inter-sites des taux de substitution ( $\gamma = 0,05$ ), comme suggéré par un test de modèle dans MEGA version 5 (Tamura et al., 2011).

Au cours des analyses initiales, les échantillons ont été organisés en sept groupes d'échantillonnage en fonction de leur proximité géographique et des caractéristiques biogéographiques des zones d'échantillonnage : Serbie occidentale, Serbie orientale, Serbie méridionale, Macédoine orientale, Macédoine occidentale, Bosnie-Herzégovine et Croatie.

Les indices génétiques de base pour chaque groupe d'échantillonnage, l'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) entre et au sein des groupes analysés, ainsi que le calcul des valeurs  $F_{st}$  par paires entre les sept groupes d'échantillonnage ont été effectués à l'aide d'ARLEQUIN 3.5.1.2. Les valeurs  $\Phi_{st}$  par paires ont été utilisées pour la construction d'un arbre UPGMA dans MEGA version 5.



**Bosnie-Herzégovine** : 1 Banja Luka (N=4), 2 Mrkonjić Grad (N=1), 3 Sipovo (N=1), 4 Kupres (N=1), 5 Donji Vakuf (N=1), 6 Knezevo (N=2), 7 Kotor Varos (N=1), 8 Trebinje (N=2), 9 Tjentiste (N=1), 10 Vlasenica (N=2)

**Serbie occidentale** : 11 Bajina Basta (N=3), 12 Zlatibor (N=2), 13 Sjenica (N=12), 14 Zupanjevac (N=1), 15 Raska (N=3), 16 Ivanjica (N=1)

**Serbie du Sud** : 17 Leposavic (N=3), 18 Kosovska Mitrovica (N=1)

**Serbie orientale** : 19 Svilajnac (N=3), 20 Braničevci (N=1), 21 Majdanpek (N=2), 22 Covdin (N=1), 23 Zagubica (N=3), 24 Negotin (N=1), 25 Boljevac (N=1), 26 Knjazevac (N=4), 27 Bela Palanka (N=9), 28 Pirot (N=2)

**Macédoine orientale** : 29 Kumanovo (N=6), 30 Sveti Nikole (N=5), 31 Radovis (N=3)

**Macédoine occidentale** : 32 Veles (N=2), 33 Bitola (N=1), 34 Prespa (N=1)

**Fig. 1.** Position géographique des localités échantillonnées dans cette étude. Les localités ont été réparties en six groupes d'échantillonnage en fonction de leur situation géographique : Bosnie-Herzégovine, Serbie occidentale, Serbie orientale, Serbie méridionale, Macédoine orientale et Macédoine occidentale. Le nombre d'individus échantillonnés par localité est indiqué entre parenthèses (N)

Nos analyses initiales ont clairement confirmé la présence de **deux** groupes génétiques distincts ou sous-populations au sein de la population de loups Dinariques-Balkaniques (Tableau 1). **Par conséquent**, les analyses susmentionnées et d'autres analyses ont été menées séparément pour ces sous-populations ainsi que pour l'ensemble des données. Les

indices génétiques de base pour chaque sous-population ont été calculés et l'analyse de la variance moléculaire entre et au sein des sous-populations a été réalisée dans ARLEQUIN 3.5.1.2.

**Tableau 1.** Répartition des haplotypes et indices moléculaires pour les sous-populations occidentales et orientales de la population de loups gris des Dinarides et des Balkans

	Western subpopulation	Eastern subpopulation	Total
Total number of samples	114	78	192
Total number of haplotypes	4	5	6
BLK1 (% of total sample)	7.02%	73.08%	65 (33.85%)
BLK2 (% of total sample)	22.81%	–	26 (13.54%)
BLK3 (% of total sample)	–	11.54%	9 (4.69%)
BLK4 (% of total sample)	–	12.82%	10 (5.21%)
BLK5 (% of total sample)	34.21%	1.28%	40 (20.83%)
BLK6 (% of total sample)	35.96%	1.28%	42 (21.88%)
No. of polymorphic sites	10	12	12
No. of transitions	10	12	12
No. of transversions	–	–	0
Haplotype diversity (h)	0.703 ± 0.016	0.442 ± 0.063	0.775 ± 0.014
Nucleotide diversity ( $\pi$ )	0.020 ± 0.011	0.014 ± 0.008	0.020 ± 0.011
Average number of nucleotide differences ( <i>k</i> )	5.479 ± 2.656	3.763 ± 1.918	5.444 ± 2.632
Ssd ( <i>p</i> )	0.124 (0.020)	0.198 (0.020)	0.044 (0.020)
Tajima's <i>D</i>	3.281 <sup>**</sup>	0.889	2.272 <sup>**</sup>
Fu's <i>F<sub>s</sub></i>	11.320 <sup>*</sup>	4.910 <sup>*</sup>	8.450 <sup>**</sup>

\*  $p < 0.05$ .

\*\*  $p < 0.01$ .

Afin de mieux comprendre les changements démographiques historiques possibles chez les loups gris des Balkans centraux, des analyses de distribution des mésappariements ont été réalisées, sous l'hypothèse nulle selon laquelle les données observées s'inscrivent dans le modèle d'expansion soudaine. L'analyse de la distribution des mésappariements a été réalisée dans ARLEQUIN 3.5.1.2. La signification de l'ajustement de la distribution des mésappariements observée par rapport à celle attendue a été estimée à l'aide de la somme des écarts au carré (SSD). **De plus**, deux tests de neutralité, souvent utilisés pour étudier les changements démographiques, ont été effectués dans DnaSP v5 (Librado et Rozas, 2009). L'analyse de la distribution des mésappariements et le test *F<sub>s</sub>* ont été effectués avec un rapport de pondération transition-transversion de 1:1.

Afin d'effectuer une analyse des relations phylogénétiques entre les haplotypes d'ADNmt du loup, nous avons collecté tous les haplotypes disponibles dans GenBank et les avons combinés avec notre ensemble de données Dinaric-Balkan. Cet ensemble de données comprenait 84 haplotypes et l'alignement final de cet ensemble de données était de 223 pb. Quelques haplotypes publiés précédemment ont été regroupés dans cet alignement de fragments (pour plus de détails, voir le Tableau S1). Afin d'éviter toute complication supplémentaire dans la désignation des haplotypes, nous avons adopté dans notre étude la désignation présentée par Pilot et al. (2010). Pour l'analyse des relations phylogénétiques de notre ensemble de données combiné, un réseau de type « median-joining » (MJ) (Bandelt et al., 1999) a été construit à l'aide du logiciel Network 4.6.0.0 (disponible sur <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>). Les approches par réseau sont plus adaptées pour déterminer les relations entre les haplotypes dans les études intraspécifiques, car elles tiennent compte de la présence d'haplotypes ancestraux dans un échantillon (Posada et Crandall, 2001 ; Hausknecht et al., 2010 ; Zachos et al., 2010).

L'analyse menée sur 192 séquences de la région de contrôle de l'ADNmt provenant de la population de loups gris des Dinarides et des Balkans, d'une longueur totale de 261 nucléotides, a révélé six haplotypes différents (Tableau 1). On a dénombré au total 12 sites polymorphiques, qui étaient tous des transitions informatives au sens parcimonieux. La

valeur de diversité des haplotypes était de  $0,775 \pm 0,014$ . La diversité nucléotidique ( $\pi$ ) était de  $0,020 \pm 0,011$  et le nombre moyen de différences nucléotidiques ( $k$ ) était de  $5,444 \pm 2,632$ . Nous avons observé une variation relativement élevée de l'ADNmt au sein de la population de loups gris des Dinarides et des Balkans. Les niveaux de diversité génétique d'autres loups des Balkans au niveau de la région de contrôle de l'ADNmt étaient également élevés (Randi et al., 2000 ; Pilot et al., 2010 ; Gomercic et al., 2010 ; Moura et al., 2013 ; Fabbri et al., 2013) par rapport à d'autres populations de loups Européens (Randi et al., 2000 ; Valière et al., 2003 ; Ellegren et al., 1996 ; Hausknecht et al., 2010 ; Sastre et al., 2011). La forte variabilité génétique observée dans les Balkans pourrait provenir d'une ancienne population importante et continue de loups gris, qui s'est maintenue malgré les influences humaines et environnementales, comme cela a été indiqué pour les loups gris Bulgares (Randi et al., 2000), les loups Croates (Gomercic et al., 2010 ; Fabbri et al., 2013) et de toutes les populations des Balkans (Pilot et al., 2010). De plus, l'utilisation de marqueurs microsatellites dans les études de génétique des populations de loups gris a également permis de détecter la plus grande diversité dans les échantillons provenant des loups des Balkans (Lucchini et al., 2004 ; Moura et al., 2013).

Aucun élément n'est venu étayer la subdivision présumée de la population le long de la vallée de la Morava-Vardar sur la base de la variation de l'ADNmt (Tableau S2), malgré les différences morphométriques observées (Milenkovic 1997). Les valeurs  $\Phi_{st}$  par paires étaient significatives entre deux groupes d'échantillonnage (Bosnie-Herzégovine et Croatie) et tout autre groupe d'échantillonnage (non représenté). L'arbre UPGMA construit à partir des valeurs  $\Phi_{st}$  par paires des sept groupes d'échantillonnage de loups gris des Balkans centraux a séparé les loups gris de Bosnie-Herzégovine et de Croatie en un cluster distinct de tous les autres, formant une deuxième branche, avec un pourcentage significatif de variation entre les sous-populations (Fig. S1).

Nous avons détecté une subdivision génétique claire au sein de la population de loups des Balkans Dinariques et ces deux groupes ont été reconnus comme deux sous-populations et ont été nommés sous-populations « occidentale » et « orientale ». Les indices génétiques de base pour ces deux sous-populations ont été calculés (Tableau 1). La sous-population « orientale » présente une diversité inférieure à celle de la sous-population « occidentale ». La sous-population « orientale » possède un haplotype dominant (BLK1) et quatre haplotypes rares, tandis que la sous-population « occidentale » possède trois haplotypes de fréquence intermédiaire et un haplotype de fréquence plus faible. De plus, le test  $F_s$  de  $F_u$  s'est révélé significatif dans les deux sous-populations et dans l'échantillon total (Tableau 1), reflétant des goulots d'étranglement démographiques récents. Des valeurs positives de Tajima  $D$  suggèrent également une diminution de la taille des populations, bien que cette valeur n'ait pas été statistiquement significative dans la sous-population « orientale ».

Le test de neutralité  $F_s$  de  $F_u$  repose sur la distribution des fréquences des haplotypes et est très sensible aux changements démographiques (Fu, 1997), tandis que le test de neutralité  $D$  de Tajima (Tajima, 1989) est moins puissant que le test  $F_s$  et repose sur la distribution des fréquences de mutation. L'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) a montré une plus grande variabilité génétique entre les sous-populations qu'au sein des groupes d'échantillonnage au sein des sous-populations, et la valeur  $\Phi_{st}$  entre les sous-populations

était significative (Tableau 2). Plusieurs causes pourraient expliquer la structure génétique cryptique à une échelle géographique fine. Les loups en Europe présentent une structuration génétique sur des distances relativement courtes (Pilot et al., 2006 ; Stronen et al., 2012 ; Hindrikson et al., 2013 ; Moura et al., 2013). On pourrait avancer que la rivière Drina (qui marque également la frontière entre la Serbie et la Bosnie-Herzégovine) agit peut-être comme une barrière fine séparant dans une certaine mesure une sous-population de la région péridinarique à l'est, mais cela est peu probable car la rivière ne constitue pas une barrière de déplacement évidente. Nous ne disposons d'aucune donnée sur une éventuelle dispersion limitée des femelles ni d'aucune influence anthropique enregistrée susceptible de limiter la migration des loups. Plusieurs processus pourraient expliquer ce type de différences génétiques sur des distances géographiques aussi courtes chez les loups gris Dinariques-Balkaniques. Les données publiées suggèrent que les programmes de chasse et d'éradication du XX<sup>ème</sup> siècle ont entraîné un grave déclin de la taille de la population en Croatie, qui est désormais en phase de rétablissement, et qu'un déclin a été enregistré en Bosnie-Herzégovine (Boitani, 2000). La distribution multimodale observée et les valeurs positives des tests de neutralité pourraient indiquer ces événements passés et récents au sein de la sous-population « occidentale ». Nous avons mis en évidence un signal génétique de goulot d'étranglement dans la sous-population « occidentale » et nos résultats reflètent clairement le déclin de la taille de la population survenu en 1980. Pour les loups Serbes et Macédoniens (sous-population « orientale »), il n'existe pas de données disponibles sur un déclin notable de la taille de la population, mais nous avons également détecté un signal génétique de goulot d'étranglement dans la sous-population « orientale ». Les histoires démographiques différentes de ces sous-populations pourraient expliquer ce résultat. Il semble que les deux sous-populations aient connu des goulots d'étranglement, mais leur chronologie pourrait différer et/ou le déclin de la taille de la population n'a pas été aussi sévère dans la sous-population « orientale » que dans la sous-population « occidentale ». L'excès d'haplotypes à fréquences intermédiaires dans la sous-population « occidentale » pourrait être une conséquence de la dérive génétique après un goulot d'étranglement sévère ou d'un mélange d'haplotypes provenant de populations génétiquement différenciées.

**Tableau 2.** Analyse AMOVA entre les sous-populations « occidentale » et « orientale ». La sous-population « occidentale » comprend les groupes d'échantillonnage de Croatie et de Bosnie-Herzégovine, tandis que la sous-population « orientale » comprend tous les autres groupes d'échantillonnage

Source of variation	Percentage of variation	$\Phi_{st}$	<i>p</i>
Among subpopulations	21.43	0.214	0.037
Among sampling groups within subpopulation	1.36	0.017	0.137
Within sampling groups	77.21	0.227	0.001

La population de loups de cette région est toujours restée et reste encore aujourd'hui en contact avec la petite population voisine de loups en Slovénie (Strbenac et al., 2005, 2008 ; Gomercic et al., 2010 ; Fabbri et al., 2013), et un flux génétique continu a été présumé entre tous les autres groupes régionaux des Balkans orientaux (Gomercic et al., 2010). Un haplotype dominant et plusieurs haplotypes rares dans la sous-population « orientale », associés aux résultats des tests de neutralité, pourraient indiquer qu'un goulot d'étranglement démographique s'est produit plus tôt ou n'a pas été significatif, et pourraient constituer un signal génétique de croissance démographique. Le test de distribution de mésappariements ( $S_{sd} = 0,044$  ;  $p = 0,020$ ) et les tests de neutralité  $F_s$  de  $F_u$  et  $D$  de Tajima n'ont pas corroboré le modèle d'expansion soudaine de la population totale analysée, ni dans les sous-populations « occidentale » et « orientale » (Tableau 1 ; Fig. S2). La distribution irrégulière des

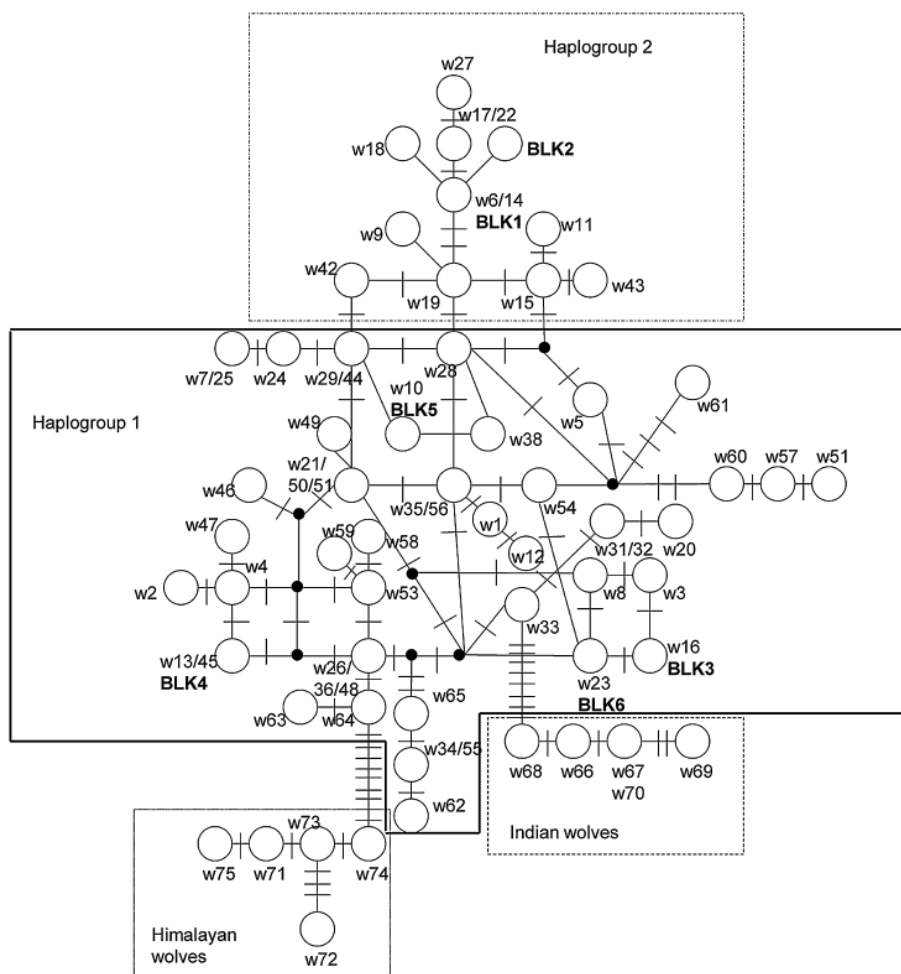
mésappariements dans la population Dinarique-Balkanique et dans les deux sous-populations définies indique également un **déclin récent** de la population (Fig. S2). Aucune donnée disponible n'indique de déclin récent de la taille de la population dans la sous-population « orientale », et une augmentation constante de la taille de la population est rapportée pour les loups gris en Serbie et en Macédoine (Boitani, 2000 ; Milenkovic et al., 2007). Le seul déclin récent de la taille de la population (bien que moins grave que dans la population « occidentale ») a eu lieu au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle en Serbie et en Macédoine, en raison d'un empoisonnement (Milenkovic, 1997). Cet événement a pu entraîner un goulot d'étranglement, comme le suggèrent nos résultats.

Une subdivision similaire entre les échantillons occidentaux et orientaux a été rapportée pour les loups Bulgares à l'aide d'un marqueur de la région de contrôle de l'ADNmt (Moura et al., 2013), ce qui reflète peut-être une **fragmentation** survenue pendant la période de faible taille de population et des différences environnementales locales. Pilot et al. (2006) ont également indiqué que les populations de loups en Europe de l'Est présentent une structure génétique spatiale non aléatoire et que les différences écologiques jouent un rôle important dans la structuration des populations. **Cependant**, une structuration de la population de loups Dinariques-Balkaniques due à des caractéristiques écologiques locales est peu probable. **Hindrikson et al. (2013) ont découvert une structure de population cryptique chez les loups d'Estonie et de Lettonie, ce qui était inattendu, et ont proposé que la forte pression de chasse soit le facteur principal susceptible de maintenir cette sous-structuration de la population.** La chasse au loup n'a jamais été interdite en Serbie et en Macédoine, et reste autorisée toute l'année. En Bosnie-Herzégovine, la chasse au loup est autorisée toute l'année pour les mâles, mais restreinte pour les femelles. La population de loups Croate a été placée sous protection légale en 1995 et un plan national de gestion des loups a été mis en œuvre en 2005 (Gomercic et al., 2010). **Par conséquent**, ces différences de pression de chasse ne peuvent être exclues comme cause possible de la fragmentation de la population. **Toutefois**, toute spéculation supplémentaire sur les raisons du regroupement observé est empêchée par la limitation des déductions basées sur un marqueur à locus unique, et des études supplémentaires utilisant des marqueurs génétiques plus variés sont nécessaires pour confirmer ce résultat et obtenir des informations plus détaillées sur la structure de la population de loups gris des Balkans Dinariques.

Notre analyse phylogénétique exhaustive des séquences d'ADNmt de loups (Fig. 2) a indiqué que les six haplotypes identifiés dans cette étude avaient déjà été décrits (Tableau 1). **Trois de ces haplotypes semblent être caractéristiques de la région des Balkans (Fig. 2).**

Par rapport à l'étude la plus complète à ce jour sur l'histoire phylogéographique des loups gris en Europe (Pilot et al., 2010), un **nouvel haplotype** a été détecté (BLK2). **Cet haplotype est unique aux Balkans et l'analyse de réseau l'a classé dans l'haplogroupe III, tout comme l'haplotype BLK1.** Les haplotypes BLK3, BLK4, BLK5 et BLK6 appartenaient tous à l'haplogroupe I. Étant donné que l'haplogroupe II est plus ancien sur le plan évolutif et a été largement remplacé par l'haplogroupe I (Pilot et al., 2010), **nous pouvons conclure que, dans la population des Balkans centraux analysée, un mélange d'haplotypes anciens et nouveaux a été détecté.** Les haplotypes trouvés dans les populations des Balkans centraux n'ont pas permis de définir un schéma phylogéographique clair, contrairement à ce qui avait été suggéré précédemment (Randi et al., 2000 ; Pilot et al., 2010). Pour l'ensemble des loups gris

Européens, il a été démontré que les haplotypes représentant deux haplogroupes se chevauchent géographiquement, mais diffèrent en fréquence entre les populations d'Europe du Sud-Ouest et d'Europe de l'Est (Pilot et al., 2010).



**Fig. 2.** Réseau de jonction médiane des haplotypes d'ADNmt de la région de contrôle, basé sur une séquence de 223 pb. Les haplotypes détectés dans cette étude sont désignés par BLK 1 à 6. Des détails sur les haplotypes w1 à 75 sont fournis dans le matériel supplémentaire, Tableau S1

Nos analyses de la variation de l'ADNmt chez les loups Dinariques-Balkaniques ont révélé une **diversité génétique relativement élevée**. Nous avons détecté une divergence génétique claire sur un axe ouest-est divisant la population en deux sous-populations : les échantillons de Serbie et de Macédoine dans l'une (« orientale ») et ceux de Croatie et de Bosnie-Herzégovine dans l'autre (« occidentale »). **Aucun des résultats ne corrobore l'hypothèse d'une expansion de la population, mais suggère des goulots d'étranglement démographiques récents.**

Nous avons mis en évidence de profondes différences génétiques entre les sous-populations « orientales » et « occidentales » des loups gris Dinariques-Balkaniques, qui pourraient refléter des histoires démographiques différentes ou résulter de différences dans la pression de chasse. Les différences à petite échelle détectées pourraient contribuer à l'élaboration de stratégies de conservation et de gestion pour la population Dinarique-Balkanique, ainsi que pour les populations européennes de loups gris. Ces données pourraient être utiles pour retracer le flux génétique entre les populations en Europe et dans le processus de

recolonisation des Alpes, afin d'observer dans quelle mesure le patrimoine génétique des Balkans contribue aux populations nouvellement établies dans cette région. Afin d'obtenir un aperçu encore plus précis de la variabilité réelle du patrimoine génétique de ces populations, nous pensons que l'analyse des marqueurs microsatellites chez les loups gris des Balkans pourrait constituer une prochaine étape utile.

## References

- Bandelt, H.-J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37–48.
- Boitani, L., 1992. Wolf research and conservation in Italy. *Biol. Conserv.* 60, 125–132.
- Boitani, L., 2000. Action Plan for the conservation of the wolves (*Canis lupus*) in Europe. Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats (Bern Convention). Nature and environment, No. 113. Council of Europe Publishing, Strasbourg.
- Delibes, M., 1990. Status and conservation needs of the wolf (*Canis lupus*) in the Council of Europe member states. Nature and Environment Series, No. 47. Council of Europe, Strasbourg, France.
- Ellegren, H., Savolainen, P., Rosen, B., 1996. The genetical history of an isolated population of the endangered grey wolf *Canis lupus*: a study of nuclear and mitochondrial polymorphisms. *Philos. Trans. R. Soc. B* 351, 1661–1669.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564–567.
- Fabbri, E., Caniglia, R., Kusak, J., Galov, T., Gomerčić, T., Arbanasić, H., Huber, D., Randi, E., 2013. Genetic structure of expanding wolf (*Canis lupus*) populations in Italy and Croatia, and the early steps of the recolonization of the Eastern Alps. *Mamm. Biol.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mambio.2013.10.002>.
- Fu, Y., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitch-hiking, and background selection. *Genetics* 147, 915–925.
- Gomerčić, T., Sindičić, M., Galov, A., Arbanasić, H., Kusak, J., Kocijan, I., Đuras Gomerčić, M., Huber, Đ., 2010. High genetic variability of the grey wolf (*Canis lupus* L.) population from Croatia as revealed by mitochondrial DNA control region sequences. *Zool. Stud.* 49 (6), 816–823.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Hausknecht, R., Szabó, Á., Firmánszky, G., Gula, R., Kuehn, R., 2010. Confirmation of wolf residence in Northern Hungary by field and genetic monitoring. *Mamm. Biol.* 75, 348–352.
- Hindrikson, M., Remm, J., Männil, P., Ozolins, J., Tammeleht, E., Saarma, U., 2013. Spatial genetic analyses reveal cryptic population structure and migration patterns in a continuously harvested Grey Wolf (*Canis lupus*) population in North-Eastern Europe. *Plos ONE* 8 (9), e75765.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- Kusak, J., Huber, Đ., 2008. Dinamika, brojnost i trend populacije vuka od 1992. do 2008. godine. In: Štrbenac, A (Ed.), Plan upravljanja vukom u Republici Hrvatskoj. DZZP, Zagreb, pp. 21–23.
- 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.
- Milenković, M., (Ph.D. thesis) 1997. Taxonomic-biogeographic status and ecological/economical significance of the wolf (*Canis lupus* Linnaeus 1758) in Yugoslavia. University of Belgrade, Serbia.
- Milenković, M., Paunović, M., Čirović, D., 2007. Action plan for wolf *Canis lupus* L., 1758 conservation in Serbia. Phase I – strategic plan. Institute for Biological Research Siniša Stanković, Belgrade, Ministry of Environmental Protection Republic of Serbia. Project report.
- Moura, A.E., Tsingarska, E., Dabrowski, M.J., Czarnomska, S.D., Jedrzejevska, B., Pilot, M., 2013. Unregulated hunting and genetic recovery from a severe population decline: the cautionary case of Bulgarian wolves. *Conserv. Genet.*, <http://dx.doi.org/10.1007/s10592-013-0547-y>.
- Palomares, F., Godoy, J.A., Piriz, A., O'Brien, S.J., Johnson, W.E., 2002. Fecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Mol. Ecol.* 11, 2171–2182.
- Pilot, M., Jedrzejewski, W., Branicki, W., Sidorovich, V.E., Jedrzejevska, B., Stachura, K., Funk, S.M., 2006. Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Mol. Ecol.* 15, 4533–4553.
- Pilot, M., Branicki, W., Jedrzejewski, W., Goszczyński, J., Jedrzejevska, B., Dykyy, I., Shkvyrya, M., Tsingarska, E., 2010. Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Evol. Biol.* 10, 104.
- Posada, D., Crandall, K.A., 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol. Evol.* 16, 37–45.
- Randi, E., Lucchini, V., Christensen, M.F., Mucci, N., Funk, S.M., Dolf, G., Loeschcke, 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.

- Randi, E., 2011. Genetics and conservation of wolves *Canis lupus* in Europe. *Mammal Rev.* 41 (2), 99–111.
- Salvatori, V., Linnell, J., 2005. Report on the conservation status and threats for wolf (*Canis lupus*) in Europe. Council of Europe T-PVS/Inf 2005, pp. 16.
- Sambrook, J.F., Russel, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA.
- Sastre, N., Vilà, C., Salinas, M., Bologov, V.V., Urios, V., Sánchez, A., Francino, O., Ramírez, O., 2011. Signatures of demographic bottlenecks in European wolf populations. *Conserv. Genet.* 12, 701–712.
- Štrbenac, A., Huber, Đ., Kusak, J., Majić-Skrbinšek, A., Frković, A., Štahan, Ž., Jeremić-Martinko, J., Desnica, S., Štrbenac, P., 2005. *Wolf Management Plan for the Republic Croatia*. State Institute for Nature Protection, Zagreb, Croatia.
- Štrbenac, A., Huber, Đ., Kusak, J., Oković, P., Sindičić, M., Jeremić, J., Frković, A., Gomerčić, T., 2008. Large carnivore conservation in Croatia bulletin. State Institute for Nature Protection, Zagreb, Croatia.
- Stronen, A.V., Jedrzejewska, B., Pertoldi, C., Demontis, D., Randi, E., Niedziałkowska, M., Pilot, M., Sidorovich, V.E., Dykyy, I., Kusak, J., Tsingarska, E., Kojola, I., Karmanlidis, A.A., Ornicans, A., Lobkov, V.A., Dumenko, V., Czarnomska, S.D., 2012. North-South differentiation and a region of high diversity in European Wolves (*Canis lupus*). *Plos ONE* 8 (10), e76454.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585–595.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Valière, N., Fumagali, L., Gielly, L., Miquel, C., Lequette, B., Poulle, M.L., Weber, J.M., Arlettaz, R., Taberlet, P., 2003. Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years. *Anim. Conserv.* 6, 83–92.
- Vilà, C., Amorim, I.R., Leonard, J.A., Posada, D., Castroviejo, J., Petrucci-Fonseca, F., Crandall, K.A., Ellegren, H., Wayne, R.K., 1999. Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Mol. Ecol.* 8, 2089–2103.
- Zachos, F.E., Ben Slimen, H., Hackländer, K., Giacometti, M., Suchentrunk, F., 2010. Regional genetic in situ differentiation despite phylogenetic heterogeneity in Alpine mountain hares. *J. Zool.* 282, 47–53.