

## Le rétablissement récent de la population de loups en Italie : une étude génétique à l'aide de microsatellites

Mamm. biol. 66 (2001) 321–331  
© Urban & Fischer Verlag  
<http://www.urbanfischer.de/journals/mammbiol>



**Mammalian Biology**  
Zeitschrift für Säugetierkunde

### Original investigation

### Recent recovery of the Italian wolf population: a genetic investigation using microsatellites

By M. SCANDURA, M. APOLLONIO and L. MATTIOLI

Department of Zoology and Anthropology, University of Sassari, Sassari, Italy and Wildlife Management Unit, Provincial Administration of Arezzo, Arezzo, Italy

### Résumé

La différenciation génétique au sein de la population de loups Italiens a été étudiée par analyse microsatellite de 38 individus provenant de 4 sites d'échantillonnage distincts situés dans l'aire de répartition actuelle du loup sur toute la péninsule. Un ensemble de 6 loci microsatellites a été utilisé, présentant un niveau élevé de polymorphisme et une probabilité combinée d'identité comprise entre  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$ . La variabilité globale de l'ADN détectée était considérable et seulement légèrement inférieure à celle observée chez les loups gris d'Amérique du Nord.

Les deux plus grandes sous-populations Italiennes prises en compte, celles des Apennins Toscans et des Apennins centro-meridionaux, se sont révélées modérément divergentes ; les données concordent avec une origine de la sous-population des Alpes occidentales à partir de la première, tandis que cette dernière présentait une grande similitude avec la sous-population de la côte occidentale. Le flux génétique était relativement élevé au sein de la population Italienne et nos données ont confirmé la présence d'un isolement lié à la distance, les mesures de distance génétique concordant avec la répartition géographique des sites d'échantillonnage. Des niveaux élevés de divergence ont été observés entre les échantillons Italiens et les autres échantillons Européens. Ces résultats suggèrent que, malgré leur monomorphisme absolu de l'ADN mitochondrial, les loups Italiens ont conservé une grande hétérogénéité de l'ADN nucléaire et une identité génétique bien définie. Un nouvel élargissement de l'aire de répartition, auquel on peut s'attendre compte tenu de la dispersion importante des loups, pourrait mettre fin à leur isolement historique d'ici quelques décennies, favorisant ainsi un échange génétique avec le pool génétique d'Europe de l'Est.

**Mots-clés :** *Canis lupus*, microsatellites, variabilité, structure de population, Italie

### INTRODUCTION

Depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, les populations de grands prédateurs ont décliné en Italie en raison de la dégradation progressive de leur habitat et de la persécution directe par l'homme.

**En conséquence**, plusieurs espèces ont frôlé l'extinction (notamment l'ours brun, le loup et le lynx).

L'évolution des activités humaines, de la gestion de la faune sauvage et des forêts, ainsi que de l'opinion publique, a conduit au rétablissement de conditions environnementales plus favorables et à une protection accrue de ces espèces. Grâce à ces améliorations, au cours des 30 dernières années, une espèce prédatrice importante, le loup (*Canis lupus*), a vu ses effectifs augmenter et a étendu son aire de répartition (Francisci et GUBERTI 1993 ; BOITANI et Crucci 1993 ; MERIGGI et LOVARI 1996). Dans le milieu Italien, les loups jouent un rôle clé au sein des communautés sauvages, car ce sont les seuls grands mammifères bien répartis qui se nourrissent principalement d'ongulés sauvages (MATTIOLI et al. 1995). Au cours des deux derniers siècles, la population Italienne s'est retrouvée isolée des autres populations Européennes, en raison de l'extirpation de l'espèce dans l'ensemble des Alpes (CAGNOLARO et al. 1974). La limite nord de son aire de répartition s'est d'abord déplacée vers le sud, en direction des régions centrales, et sa présence s'est limitée aux zones les moins accessibles des Apennins et à une zone boisée le long de la côte tyrrhénienne (CAGNOLARO et al. 1974 ; ZIMEN et BOITANI 1975). En 1973, le nombre de loups peuplant la péninsule Italienne était estimé à environ 100 individus (ZIMEN et BOITANI 1975), après quoi la population s'est rétablie, atteignant une taille estimée entre 400 et 500 individus (BOITANI 1992).

Le rétablissement démographique de l'espèce s'est accompagné d'une expansion vers le nord de son aire de répartition, ce qui a conduit, au cours des dix dernières années, à la recolonisation des Alpes occidentales et à l'apparition consécutive du loup en France (BREITENMOSE 1998).

Les effets du déclin de la population et de l'extension ultérieure de l'aire de répartition sur la diversité génétique de la population de loups Italiens ont été étudiés à l'aide d'analyses d'allozymes et d'ADN mitochondrial (ADNmt) (RANDI et al. 1993 ; WAYNE et al. 1992 ; RANDI et al. 1995 ; VILÀ et al. 1999 ; RANDI et al. 2000). RANDI et ses collaborateurs (1993), en utilisant un ensemble de 40 allozymes sur un échantillon de 38 loups, ont constaté un niveau de polymorphisme et d'hétérozygotie comparable à celui de populations nord-Américaines plus importantes (KENNEDY et al. 1991). En revanche, les séquences consensuelles d'ADNmt ont révélé la présence d'un seul haplotype chez tous les loups Italiens échantillonnés. Cette contradiction apparente résulte probablement des différents modes de transmission héréditaire, fondés exclusivement sur la transmission maternelle de l'ADNmt.

Afin d'étudier les effets réels du goulot d'étranglement et de la fragmentation de la population sur la structure et la variabilité génétiques des loups, les marqueurs génétiques nucléaires, tels que les microsatellites, sont plus informatifs. Différentes études menées sur des populations de loups nord-Américaines ont démontré l'efficacité des loci microsatellites en tant qu'outil moléculaire pour évaluer les paramètres de structure des populations (ROY et al. 1994 ; FORBES et BOYD 1997), pour le génotypage d'animaux dans le cadre de programmes de réintroduction (GARCIA-MORENO et al. 1996), pour évaluer le degré de parenté entre individus (SMITH et al. 1996) et pour estimer la variation génétique à la suite de colonisations naturelles (FORBES et BOYD 1996).

Les objectifs de la présente étude étaient les suivants : 1) reconstituer la dynamique du rétablissement du loup Italien en comparant le profil génétique de différentes sous-populations ; 2) évaluer la diversité de l'ADN nucléaire entre et au sein des sous-populations ; 3) estimer le degré de flux génétique entre différentes zones. Des loups provenant de « bastions » historiques et de régions récemment colonisées ont été échantillonnés à des fins de comparaison.

## MATERIEL et METHODES

### Description et collecte des échantillons

Les échantillons de loups Italiens ont été prélevés dans quatre régions (Fig. 1) :

**AR** – Apennins Toscans, qui ont probablement constitué pendant un demi-siècle la limite nord de l'aire de répartition du loup Italien le long des Apennins (CAGNOLARO et al. 1974) ;

**AB** – Apennins du centre-sud, la partie de l'Italie où l'espèce a toujours été présente depuis des temps immémoriaux ;

**VC** – Alta Maremma, où la présence de l'espèce a toujours été signalée au cours du siècle dernier, mais où la zone a été marquée par l'installation continue de nouvelles meutes reproductrices, suivie d'une éradication totale ou partielle (abattage illégal) ;

**FR** – Alpes-Maritimes, en France, dont la population trouve son origine au début des années 1990 à partir d'individus venus d'Italie (Randi et al. 2000). Sa taille actuelle est d'environ 20 à 30 individus, parmi lesquels des individus en dispersion colonisent de nouvelles zones des Alpes occidentales.

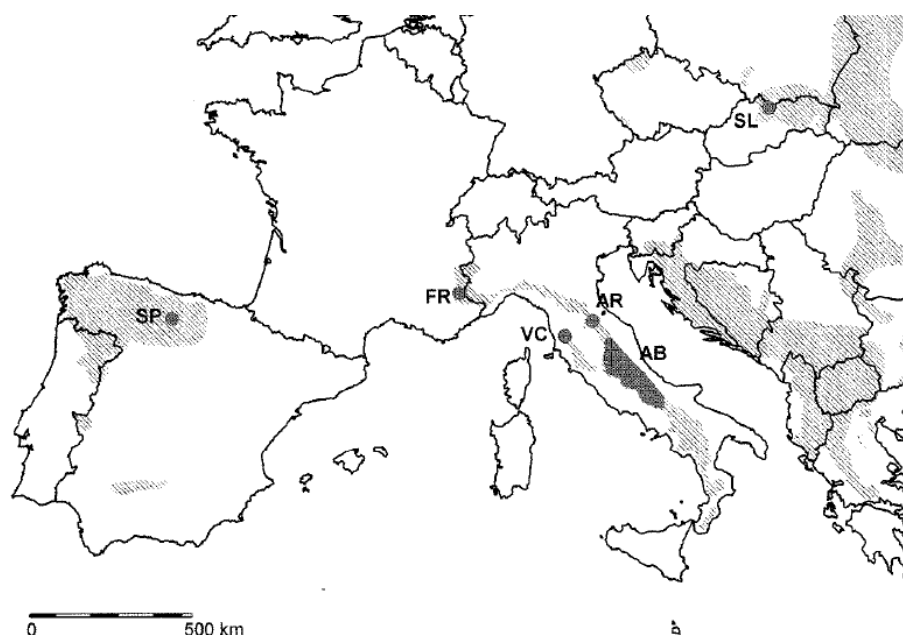


Fig. 1. Localisation géographique des sites d'échantillonnage (en gris plein) et aire de répartition actuelle des loups (en hachures)

Dix-sept échantillons de tissus provenaient de loups tués illégalement, récupérés avant 1992 dans le centre et le sud de l'Italie et fournis par le professeur G. B. Har'TL (Université de Kiel, Allemagne). Treize spécimens proviennent du nord des Apennins, principalement de la province d'Arezzo : 12 (3 échantillons de tissus et 9 poils), fournis par l'administration provinciale d'Arezzo (Toscane) ou par le Corpo Forestale dello Stato, provenant d'animaux

morts entre 1991 et 1999, tandis qu'un échantillon de poils a été prélevé sur le terrain lors d'un relevé effectué dans le parc national des Foreste Casentinesi. Trois échantillons de la population de l'Alta Maremma ont été obtenus auprès du Service vétérinaire de Volterra (Pise) et un échantillon de poil a été prélevé dans une réserve naturelle près de Volterra. Pour la population Alpine, 4 échantillons de tissus ont été fournis par Valiere Nathaniel (Université de Grenoble, France). **De plus**, dix échantillons de loups provenant des Asturies, en Espagne (SP), et trois de Slovaquie (SL) ont été analysés à des fins de comparaison.

### Isolation et amplification de l'ADN

Des protocoles standard de digestion à la protéinase K et au phénol/chloroforme ont été utilisés pour l'isolation de l'ADN génomique à partir des tissus. L'ADN nucléaire a été extrait des bulbes pileux soit selon la méthode de HIGUCHI et al. (1988), soit par isolation Chelex (WALSH et al. 1991). Les échantillons ont été génotypés pour cinq loci microsatellites polymorphiques dinucléotidiques (AC)<sub>n</sub> et un locus tétranucléotidique, préalablement caractérisés chez le chien (OSTRANDER et al. 1993 ; FRANCISCO et al. 1996). Les amplifications ont été réalisées dans un volume de 20 µl, contenant 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1% de « Triton X-100 », 200 µM de chaque dNTP, 0,5 unité de Taq ADN polymérase (Promega), 5 pmol de chaque amorce et 1 à 4 µl de solution d'ADN. Une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 3 min a été suivie de 35 cycles d'amplification comprenant chacun 45 s à 92 °C, 45 s à la température d'hybridation (55-58°C) et 60 s à 72°C. La réaction s'est terminée par une étape de polymérisation à 72°C pendant 5 min.

Afin de vérifier la réussite des produits de chaque PCR, 5 µl de solution réactionnelle ont été électrophorés sur un gel d'agarose à 2% (Biorad) contenant du bromure d'éthidium, et la présence de fragments correctement amplifiés a été détectée en comparant leur longueur à celle d'un marqueur de taille d'ADN.

La taille des allèles individuels a été déterminée en soumettant les produits de PCR dénaturés à une électrophorèse capillaire dans un séquenceur automatique ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer).

### Analyse statistique

En combinant les allèles à chaque locus, on a obtenu les génotypes individuels. Le logiciel GENEPOP version 3.2a (RAYMOND et ROUSSET 1995) a été utilisé pour calculer les fréquences alléliques et pour tester les ensembles de données quant à un éventuel écart par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE) ainsi qu'au déséquilibre de liaison génotypique. En raison de la présence de nombreux allèles rares, les écarts par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg ont également été testés « par regroupement » (HARRL et CLARK, 1989), en classant les génotypes en trois catégories : les homozygotes pour l'allèle le plus fréquent, les hétérozygotes pour un allèle fréquent et un allèle rare, et tous les autres génotypes.

## RESULTATS

Au total, 51 loups ont fait l'objet d'un génotypage au niveau de six loci microsatellites. Tous les loci ont présenté un polymorphisme dans les **quatre** sous-populations Italiennes étudiées,

à l'exception du locus 377 dans l'échantillon Alpin, où l'allèle A était fixé. Les fréquences alléliques sont présentées dans le **Tableau 1**. La valeur moyenne de  $H_e$  variait de  $0,505 \pm 0,106$  à  $0,680 \pm 0,038$ , tandis que la probabilité d'identité variait de  $1/1\ 700$  pour l'échantillon Alpin à moins de  $1/100\ 000$  pour la sous-population des Apennins centro-meridionaux (**Tableau 2**). Dans trois des quatre échantillons Italiens, la valeur moyenne de  $H_e$  était inférieure à celle observée (**Tableau 3**), ce qui s'explique peut-être par une **exogamie limitée**. Les valeurs négatives de  $F_{is}$  confirment cette hypothèse (la moyenne de  $F_{is}$  sur 6 loci pour l'ensemble de la population Italienne est égale à  $-0,039$ ), ce qui indique des accouplements entre individus non apparentés. Les écarts par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg pour les différents échantillons se sont révélés non significatifs sur tous les loci. **Cependant, comme le montre le Tableau 3, une zone colonisée récemment (FR) et une population soumise à de fortes fluctuations (VC) ont présenté un excès marqué d'hétérozygotes, bien que non significatif sur le plan statistique.**

Le déséquilibre de liaison pour chaque paire de loci a été confirmé par une analyse de test de probabilité dans GENEPOP. En se référant à l'analyse restreinte (sur 5 loci), l' $H_e$  moyen pour l'échantillon Italien était de  $0,619 \pm 0,039$ , avec un nombre moyen d'allèles par locus (A) de  $5,4 \pm 0,4$ . Une comparaison avec d'autres populations de loups et avec deux espèces de canidés (le loup d'Éthiopie, *Canis simensis*, et le chien domestique, *Canis lupus familiaris*) est présentée dans le **Tableau 4**.

Les niveaux de différenciation entre les **sous-populations** et les populations ont été mis en évidence en comparant les distributions de fréquences alléliques et génotypiques entre les loci. Des niveaux significatifs de divergence au sein de l'aire de répartition italienne n'ont été observés qu'à partir de la comparaison entre les échantillons AR et AB (données alléliques : test exact de Fisher,  $p = 0,00044$  ; données génotypiques : test G,  $p = 0,00042$ ). **En revanche**, l'ensemble de la population Italienne a présenté une divergence statistiquement significative, tant au niveau génétique qu'au niveau génotypique, par rapport aux échantillons Espagnols et Slovaques (données alléliques : test exact de Fisher,  $p < 0,001$  ; données génotypiques : test G,  $p < 0,001$ ). Les comparaisons sur un seul locus permettent de distinguer les sous-populations grâce à la présence d'allèles privés. Les sous-populations AR et AB présentaient toutes deux des allèles exclusifs sur différents loci. Tous les allèles, à l'exception d'un seul (l'allèle H au locus 204), présents dans l'échantillon VC appartiennent également à la sous-population AB. **En revanche, l'échantillon FR comporte des allèles présents à la fois dans les populations AR et AB, à l'exception de trois allèles au locus 123 – un exclusif à AR et deux à AB, respectivement – et de l'allèle L au locus 2158, absent des autres échantillons Italiens.** La valeur moyenne de  $D_{as}$  (proportion d'allèles non partagés) au sein de la population Italienne était de  $0,466$ , tandis que les valeurs moyennes des  $D_{as}$  dérivés pour les paires de sous-populations variaient entre  $0,049$  et  $0,162$  (**Tableau 5**).

Les distances non biaisées de Nei étaient inférieures à  $0,2$  pour toutes les comparaisons entre échantillons italiens (**Tableau 6a**, en dessous de la diagonale), et supérieures à  $0,6$  pour toutes les comparaisons par paires entre populations (**Tableau 6b**, en dessous de la diagonale). Dans le premier cas, les valeurs minimales ont été obtenues entre les échantillons AB et VC ( $0,051$ ) et entre les échantillons AR et FR ( $0,054$ ). Sur la base de la distance non biaisée de Nei, un arbre cophénetique peut être tracé (**Fig. 2**).

**Tableau 1.** Répartition des fréquences alléliques au niveau de 6 loci microsatellites dans des échantillons de loups (AR – Apennins toscans ; AB – Apennins centro-meridionaux ; VC – Alta Maremma ; FR – Alpes-Maritimes ; SP – Espagne ; SL – Slovaquie)

|            | AR    | AB    | VC    | FR    | SP    | SL    |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Locus 109  |       |       |       |       |       |       |
| A          | 0.115 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.100 | 0.000 |
| B          | 0.538 | 0.618 | 0.750 | 0.500 | 0.350 | 0.500 |
| C          | 0.038 | 0.059 | 0.125 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| D          | 0.038 | 0.176 | 0.000 | 0.375 | 0.400 | 0.000 |
| E          | 0.269 | 0.147 | 0.125 | 0.125 | 0.000 | 0.000 |
| F          | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.500 |
| G          | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.150 | 0.000 |
| Locus 123  |       |       |       |       |       |       |
| A          | 0.240 | 0.353 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| B          | 0.000 | 0.059 | 0.125 | 0.125 | 0.000 | 0.000 |
| C          | 0.160 | 0.206 | 0.375 | 0.000 | 0.278 | 0.667 |
| D          | 0.080 | 0.000 | 0.000 | 0.250 | 0.056 | 0.000 |
| E          | 0.000 | 0.029 | 0.000 | 0.250 | 0.389 | 0.333 |
| F          | 0.520 | 0.324 | 0.500 | 0.375 | 0.167 | 0.000 |
| G          | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.111 | 0.000 |
| H          | 0.000 | 0.029 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Locus 204  |       |       |       |       |       |       |
| A          | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.350 | 0.000 |
| B          | 0.038 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.250 | 1.000 |
| C          | 0.308 | 0.529 | 0.375 | 0.375 | 0.300 | 0.000 |
| D          | 0.000 | 0.088 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| E          | 0.654 | 0.382 | 0.500 | 0.625 | 0.050 | 0.000 |
| G          | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.050 | 0.000 |
| H          | 0.000 | 0.000 | 0.125 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Locus 250  |       |       |       |       |       |       |
| A          | 0.077 | 0.206 | 0.000 | 0.286 | 0.500 | 0.667 |
| B          | 0.115 | 0.147 | 0.375 | 0.286 | 0.150 | 0.000 |
| C          | 0.000 | 0.029 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| D          | 0.692 | 0.324 | 0.500 | 0.429 | 0.150 | 0.000 |
| E          | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.333 |
| F          | 0.077 | 0.294 | 0.125 | 0.000 | 0.150 | 0.000 |
| G          | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.050 | 0.000 |
| H          | 0.038 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Locus 377  |       |       |       |       |       |       |
| A          | 0.846 | 0.471 | 0.500 | 1.000 | 0.050 | 0.333 |
| E          | 0.115 | 0.176 | 0.500 | 0.000 | 0.050 | 0.000 |
| F          | 0.038 | 0.088 | 0.000 | 0.000 | 0.200 | 0.167 |
| J          | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.333 |
| K          | 0.000 | 0.088 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| N          | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.050 | 0.000 |
| O          | 0.000 | 0.176 | 0.000 | 0.000 | 0.400 | 0.167 |
| P          | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.050 | 0.000 |
| Q          | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.200 | 0.000 |
| Locus 2158 |       |       |       |       |       |       |
| A          | 0.000 | 0.059 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| B          | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.167 |
| C          | 0.042 | 0.059 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| D          | 0.458 | 0.324 | 0.000 | 0.500 | 0.000 | 0.667 |
| E          | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.444 | 0.000 |
| F          | 0.000 | 0.088 | 0.250 | 0.000 | 0.111 | 0.000 |
| G          | 0.083 | 0.265 | 0.375 | 0.375 | 0.000 | 0.000 |
| H          | 0.083 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.167 |
| I          | 0.333 | 0.147 | 0.375 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| J          | 0.000 | 0.059 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| L          | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.125 | 0.444 | 0.000 |

Les valeurs  $F_{ST}$  représentaient la proportion de la variation totale due à la diversité entre les échantillons. Globalement, la valeur  $F_{ST}$  pour l'ensemble de la population Italienne était de 0,053, une valeur faible si l'on considère qu'une valeur nulle exprime l'identité des fréquences alléliques entre toutes les sous-populations. Les valeurs de  $F_{ST}$  obtenues pour chaque sous-population et chaque paire de populations sont présentées respectivement dans les **Tableaux 6a et 6b** (au-dessus de la diagonale). L'estimation multilocus de  $N_m$  pour l'ensemble de la population Italienne a donné un nombre d'environ 2,0 migrants par génération, ce qui suggère un flux génétique important entre les sous-populations. Le calcul de  $N_m$  entre les deux sous-populations les plus représentatives, AR et AB, a donné une valeur de 1,7. Une corrélation positive a été mise en évidence, à l'aide du test de Mantel, uniquement entre les valeurs de  $D'$ as et la distance géographique (coefficient de corrélation de rang de

Spearman,  $p = 0,038$ ), ce qui suggère la présence d'un isolement modéré lié à la distance. Aucune corrélation significative n'a été observée entre la distance de Nei et le  $F_{ST}$ .

**Tableau 2.** Hétérozygotie attendue (nombre d'allèles entre parenthèses) et probabilité d'identité dans des échantillons de loups Italiens (AR – Apennins Toscans ; AB – Apennins centro-meridionaux ; VC – Alta Maremma ; FR – Alpes-Maritimes)

| Locus    | Heterozygosity |           |           |           | Probability of Identity |                      |                      |                      |
|----------|----------------|-----------|-----------|-----------|-------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|          | AR             | AB        | VC        | FR        | AR                      | AB                   | VC                   | FR                   |
| 109      | 0.621 (5)      | 0.562 (4) | 0.406 (3) | 0.594 (3) | 0.197                   | 0.236                | 0.388                | 0.248                |
| 123      | 0.640 (4)      | 0.723 (6) | 0.594 (3) | 0.719 (4) | 0.182                   | 0.125                | 0.248                | 0.130                |
| 204      | 0.476 (3)      | 0.566 (3) | 0.594 (3) | 0.469 (2) | 0.357                   | 0.277                | 0.248                | 0.392                |
| 250      | 0.494 (5)      | 0.744 (5) | 0.594 (3) | 0.653 (3) | 0.282                   | 0.110                | 0.248                | 0.194                |
| 377      | 0.269 (3)      | 0.701 (5) | 0.500 (2) | 0.000 (1) | 0.555                   | 0.128                | 0.375                | 1.000                |
| 2 158    | 0.663 (5)      | 0.785 (7) | 0.656 (3) | 0.594 (3) | 0.170                   | 0.076                | 0.193                | 0.248                |
| All Loci | 0.527          | 0.680     | 0.557     | 0.505     | $3.4 \times 10^{-4}$    | $8.7 \times 10^{-6}$ | $4.3 \times 10^{-4}$ | $6.1 \times 10^{-4}$ |

**Tableau 3.** Variation génétique au niveau de 6 loci microsatellites et écart par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg. N : taille de l'échantillon ; A : nombre moyen d'allèles par locus ;  $H_o$  : hétérozygotie observée (comptage direct) ;  $H_e$ , hétérozygotie attendue selon le modèle de Hardy-Weinberg ; HWE, significativité du test du chi carré pour l'équilibre de Hardy-Weinberg sans regroupement ; HWE<sub>p</sub>, significativité du test du chi carré pour l'équilibre de Hardy-Weinberg avec regroupement ; SE, erreur-type ; n. s., non significatif

| Subpopulation/Population        | N  | A (SE)    | $H_o$ | $H_e$ (SE)    | HWE   | HWE <sub>p</sub> |
|---------------------------------|----|-----------|-------|---------------|-------|------------------|
| AR – Tuscan Apennines           | 13 | 4.0 (0.4) | 0.579 | 0.527 (0.061) | n. s. | n. s.            |
| AB – Central-southern Apennines | 17 | 5.0 (0.6) | 0.676 | 0.680 (0.038) | n. s. | n. s.            |
| VC – Alta Maremma               | 4  | 2.8 (0.2) | 0.792 | 0.557 (0.036) | n. s. | n. s.            |
| FR – Alpes Maritimes            | 4  | 2.7 (0.4) | 0.652 | 0.505 (0.106) | n. s. | n. s.            |
| Total (Italian population)      | 38 | 6.0 (0.7) | 0.664 | 0.644 (0.040) | n. s. | n. s.            |
| SP – Spain                      | 10 | 4.8 (0.5) | 0.683 | 0.693 (0.023) | n. s. | n. s.            |
| SL – Slovakia                   | 3  | 2.3 (0.4) | 0.389 | 0.435 (0.097) | n. s. | n. s.            |

**Tableau 4.** Comparaison de la variation génétique au niveau de 5 loci microsatellites entre différentes populations de loups et des espèces de canidés apparentées (N : taille de l'échantillon ; A : nombre moyen d'allèles par locus  $\pm$  erreur-type ;  $H_e$  : hétérozygotie attendue selon le modèle de Hardy-Weinberg  $\pm$  erreur-type).

<sup>a</sup> recalculé à partir des données de fréquences par locus

## DISCUSSION

Les échantillons de population Italiens ont révélé une grande diversité intra-groupe, les marqueurs  $H_e$  et  $P_{id}$  s'avérant tous deux pertinents au sein de chaque sous-population. Bien que l'erreur-type ait parfois été considérable, en raison de la petite taille des échantillons, l'indice A était élevé pour la plupart des loci, même dans les petits échantillons.

L'hétérozygotie moyenne sur 5 loci s'est avérée très proche des valeurs obtenues pour les populations nord-Américaines (ROY et al. 1994 ; FORBES et BOYD 1997), et le nombre moyen d'allèles par locus était également tout à fait comparable. Ce résultat concorde avec les données allozymatiques, qui ont révélé un niveau d'hétérozygotie relativement élevé pour la population Italienne (RANDI et al. 1993).

En comparant le loup Italien à une population d'une espèce apparentée, le loup d'Éthiopie (GORTIELLI et al. 1994), qui a connu un isolement prolongé, on constate une différence considérable dans l'hétérozygotie calculée sur les mêmes loci.

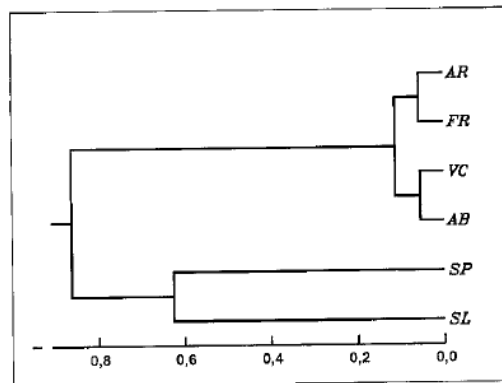


**Fig. 2.** Phénogramme UPGMA des populations de loups, établi à partir des distances génétiques non biaisées de Nei

**Tableau 5.** Distances génétiques par paires selon les allèles partagés ( $D'_{AS}$ )

| Subpopulation                   | AR    | AB    | VC    |
|---------------------------------|-------|-------|-------|
| AR – Tuscan Apennines           | *     | *     | *     |
| AB – Central-southern Apennines | 0.049 | *     | *     |
| VC – Alta Maremma               | 0.070 | 0.061 | *     |
| FR – Alpes Maritimes            | 0.062 | 0.089 | 0.162 |

**Tableau 6.** Distance génétique non biaisée de Nei (en dessous de la diagonale) et valeurs  $F_{ST}$  par paires (au-dessus de la diagonale) parmi les sous-populations italiennes (a) et parmi les populations de loups européennes (b)

a)

| Subpopulation                   | AR    | AB    | VC    | FR    |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| AR – Tuscan Apennines           |       | 0.058 | 0.071 | 0.051 |
| AB – Central-southern Apennines | 0.094 |       | 0.022 | 0.042 |
| VC – Alta Maremma               | 0.081 | 0.051 |       | 0.121 |
| FR – Alpes Maritimes            | 0.054 | 0.093 | 0.162 |       |

b)

| Population    | IT    | SP    | SL    |
|---------------|-------|-------|-------|
| IT – Italy    |       | 0.199 | 0.262 |
| SP – Spain    | 0.764 |       | 0.181 |
| SL – Slovakia |       | 0.851 | 0.610 |

Tous les échantillons répondaient aux attentes du modèle de Hardy-Weinberg, que le test  $\chi^2$  ait été réalisé avec ou sans regroupement. L'excès d'hétérozygotes dans les sous-populations fortement fluctuantes ou récemment colonisées, VC et FR, s'est avéré élevé mais non significatif. Cela peut s'expliquer par l'assemblage aléatoire des génotypes fondateurs occupant de nouveaux territoires.

L'hétérozygotie attendue selon le modèle de Hardy-Weinberg, **élevée** par rapport à celle observée dans les échantillons Italiens, pourrait résulter d'une exogamie limitée, comme le confirme la valeur négative de  $F_{is}$ . **La reproduction entre individus non apparentés est une**

tendance courante dans les populations naturelles de loups (SMITH et al. 1996) ; **néanmoins**, des niveaux élevés de mortalité induite peuvent accentuer le renouvellement naturel des membres de la meute et favoriser l'exogamie.

L'indicateur le plus immédiat de la différenciation génétique est la distribution des fréquences alléliques. **Un niveau significatif de divergence entre les échantillons Italiens a été constaté sur l'ensemble des 6 loci uniquement pour la paire AB-AR, tant en comparant les fréquences alléliques que génotypiques.** Les microsatellites étant particulièrement sensibles à la différenciation des fréquences alléliques, ces différences ne peuvent à elles seules être considérées comme une preuve d'isolement génétique.

En ce qui concerne la distribution des fréquences alléliques, on observe généralement que la fréquence la plus élevée est celle observée dans l'ensemble des populations, et que la diffusion spatiale est la plus large. Plusieurs allèles rares étaient présents, avec parfois une spécificité locale.

En examinant la présence d'allèles uniques, les échantillons AR et AB ont montré un niveau modéré de diversité dû à la présence d'allèles privés (5 pour AR et 10 pour AB). Les échantillons VC et FR semblent compatibles avec une dérivation possible des deux autres sous-populations, mais ils possèdent également des allèles exclusifs. L'allèle H au locus 204, présent dans l'échantillon VC, n'avait jamais été observé auparavant chez des loups, alors qu'il s'est avéré être l'allèle prévalent dans les échantillons de chiens (données non présentées). **On ne peut exclure un éventuel événement d'hybridation loup-chien parmi les ancêtres de la femelle présentant cet allèle. En revanche, l'allèle L au locus 2158 de l'échantillon Alpin a été observé chez d'autres loups Européens (par exemple en Espagne) et pourrait également être présent à faible fréquence dans la population Italienne ; toutefois, il n'a pas été détecté dans le cadre de ce travail en raison de la taille limitée de l'échantillon.**

Les valeurs de distance non biaisées de  $D_{AS}$  et de Nei confirment l'origine attendue de la sous-population Alpine, provenant du nord des Apennins. Le profil allélique de l'échantillon VC, combiné aux mesures de distance, est compatible avec une colonisation en provenance des régions méridionales (AB). Cette zone représente l'extrémité la plus septentrionale de la sous-population de la côte Tyrrhénienne, qui aurait maintenu des liens jusqu'à la première moitié du siècle dernier avec la sous-population du centre-sud et les aurait peut-être rétablis au cours des dernières décennies. Les données obtenues dans la présente étude semblent confirmer cette hypothèse. **La valeur globale de  $F_{ST}$  était faible (0,053), ce qui suggère une structuration très limitée de la population Italienne.**

Le flux génétique est significatif car, avec plus d'un migrant par génération, les différences entre les sous-populations s'atténuent, contrebalançant ainsi l'effet de la dérive génétique (SLATKIN 1987). Une valeur de 1,7, dérivée des sous-populations AR et AB, est plus fiable en ce qui concerne l'estimation pour l'ensemble de la population Italienne. **En effet**, ces sous-populations représentent des zones où l'espèce n'a probablement jamais été éradiquée, et elles sont suffisamment proches pour maintenir un niveau suffisant de flux génétique. Ces aspects rendent plausible l'hypothèse d'un équilibre migration-dérive (SLATKIN 1993).

Des preuves d'un isolement lié à la distance au sein de la population Italienne ont été mises en évidence en comparant les valeurs  $D'_{AS}$  aux distances géographiques entre les différentes sous-populations. Des facteurs historiques et la configuration géographique de la région ont joué un rôle clé dans l'établissement d'un flux génétique continu et directionnel à travers la péninsule.

**En résumé**, nous avons montré que la population de loups Italienne constitue une population naturelle bien définie et viable, au sein de laquelle un flux génétique élevé garantit un échange génétique suffisant entre les différentes zones. **L'origine des noyaux de population s'étant implantés dans les Alpes-Maritimes devrait être attribuée aux mouvements d'individus en dispersion provenant des Apennins du nord, comme le suggère la similitude entre les échantillons alpins et les spécimens des Apennins Toscans.** La sous-population Tyrrhénienne a peut-être rétabli sa continuité avec les Apennins centraux, mais la mortalité d'origine humaine menace en permanence sa stabilité, favorisant un renouvellement élevé et, à terme, l'exogamie, au moins dans les zones périphériques de l'aire de répartition du loup. **La diversité globale des microsatellites est importante et comparable à celle des populations nord-Américaines.** La dépression consanguine semble loin de menacer les loups Italiens. **Cependant**, des facteurs démographiques, difficiles à prévoir, pourraient affecter la viabilité de la population davantage que les aspects génétiques, entraînant des changements spectaculaires, notamment dans certaines situations locales. Il serait donc souhaitable de maintenir un flux génétique élevé à travers la péninsule, afin de contrebalancer l'effet des goulots d'étranglement locaux.

On peut s'attendre à une différenciation à long terme entre les sous-populations Alpines et méridionales en raison de l'isolement dû à la distance, tandis qu'un élargissement progressif de l'aire de répartition nord le long des Alpes rapprochera progressivement le loup Italien des populations des Balkans.

L'ensemble des six loci microsatellites polymorphes utilisés dans ce travail a constitué un **outil efficace** pour étudier l'état génétique réel des populations de loups sauvages. La faible probabilité d'identité entre les individus (de l'ordre de 10 à 10%) révèle un pouvoir de résolution élevé pour établir les généalogies, c'est-à-dire pour l'analyse des liens de parenté.

## References

- BARTON, N. H.; SLATKIN, M. (1986): A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity* **56**, 409–415.
- BOITANI, L. (1992): Wolf research and conservation in Italy. *Biol. Conserv.* **61**, 125–132.
- BOITANI, L.; CIUCCI, P. (1993): Wolves in Italy: critical issues for their conservation. In: *Wolves in Europe, Status and Perspectives*. Ed. by C. PROMBERGER and W. SCHRÖDER. Munich: Munich Wildlife Society. Pp. 74–90.
- BOWCOCK, A. M.; RUIZ-LINARES, A.; TOMFOHRDE, J.; MINCH, E.; KIDD, J. R.; CAVALLI-SFORZA, L. L. (1994): High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* **368**, 455–457.
- FORBES, S. H.; BOYD, D. K. (1997): Genetic structure and migration in native and reintroduced Rocky Mountain wolf populations. *Cons. Biol.* **11**, 1226–1234.
- FRANCISCI, F.; GUBERTI, V. (1993): Recent trends of wolves in Italy as apparent from kill figures and specimens. In: *Wolves in Europe, Status and Perspectives*. Ed. by C. PROMBERGER and W. SCHRÖDER. Munich: Munich Wildlife Society. Pp. 91–102.
- FRANCISCO, L. V.; LANGSTON, A. A.; MEL-LEERSH, C. S.; NEAL, C. L.; OSTRANDER, E. A. (1996): A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mamm. Genome* **7**, 359–362.
- GARCIA-MORENO, J. M.; MATOCQ, M. D.; ROY, M. S.;

- BREITENMOSER, U. (1998): Large predators in the Alps: fall and rise of man's competitors. *Biol. Conserv.* **83**, 279–289.
- CAGNOLARO, L.; ROSSO, D.; SPAGNESI, M.; VENTURI, B. (1974): Investigation on the wolf (*Canis lupus*) distribution in Italy and in Canton Ticino and Canton Grigioni (Switzerland). *Ric. Biol. Selvaggina* **59**, 1–75 (in Italian).
- FORBES, S. H.; BOYD, D. K. (1996): Genetic variation of naturally colonizing wolves in the Central Rocky Mountains. *Cons. Biol.* **10**, 1082–1090.
- SET, F. (1996): Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* **144**, 1933–1940.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. (1989): *Principles of Population Genetics*. 2<sup>nd</sup> ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- HIGUCHI, R.; BEROLDINGEN, C. H. VON; MELLERSH, C. S. (1988): DNA typing from single hairs. *Nature* **332**, 543–546.
- KENNEDY, P. K.; KENNEDY, M. L.; CLARKSON, P. L.; LIEPINS, I. S. (1991): Genetic variability in natural populations of gray wolf, *Canis lupus*. *Can. J. Zool.* **69**, 1183–1188.
- MATTIOLI, L.; APOLLONIO, M.; MAZZARONE, V.; CENTOFANTI, E. (1995): Wolf food habits and wild ungulate availability in the Foreste Casentinesi National Park, Italy. *Acta Theriol.* **40**, 387–402.
- MELLERSH, C. S.; LANGSTON, A. A.; ACLAND, G. M.; FLEMING, M. A.; RAY, K.; WIEGAND, N. A.; FRANCISCO, L. V.; GIBBS, M.; AGUIRRE, G. D.; OSTRANDER, E. A. (1997): A linkage map of the canine genome. *Genomics* **46**, 326–336.
- MERIGGI, A.; LOVARI, S. (1996): A review of wolf predation in southern Europe: does the wolf prefer wild prey to livestock? *J. Appl. Ecol.* **33**, 1561–1571.
- NEI, M. (1972): Genetic distance between populations. *Am. Nat.* **109**, 283–292.
- NEI, M. (1978): Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**, 583–590.
- OSTRANDER, E. A.; SPRAGUE, G. F.; RINE, J. (1993): Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)<sub>n</sub> markers for genetic mapping in dog. *Genomics* **16**, 207–213.
- GEFFEN, E.; WAYNE, R. K. (1996): Relationships and genetic purity of the endangered Mexican wolf based on analysis of microsatellite loci. *Cons. Biol.* **10**, 376–389.
- GOTTELLI, D.; SILLERO-ZUBIRI, C.; APPLEBAUM, G. D.; ROY, M. S.; GIRMAN, D. J.; GARCIA-MORENO, J.; OSTRANDER, E. A.; WAYNE, R. K. (1994): Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. *Mol. Ecol.* **3**, 301–312.
- GOUDET, J.; RAYMOND, M.; DE MEEÛS, T.; ROUS-ROY, M. S.; GEFFEN, E.; SMITH, D.; OSTRANDER, E. A.; WAYNE, R. K. (1994): Patterns of differentiation and hybridization in North American wolflike canids by analysis of microsatellite loci. *Mol. Biol. Evol.* **11**, 553–570.
- SLATKIN, M. (1985): Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* **39**, 53–65.
- SLATKIN, M. (1987): Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* **236**, 787–792.
- SLATKIN, M. (1993): Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* **47**, 264–279.
- SMITH, D.; MEIER, T.; GEFFEN, E.; MECH, L. D.; BURCH, J. W.; ADAMS, L. G.; WAYNE, R. K. (1996): Is incest common in gray wolf packs? *Behav. Ecol.* **8**, 384–391.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. (1995): *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3<sup>rd</sup> Ed., New York: W. H. Freeman and Company.
- SWOFFORD, D. L.; SELANDER, R. B. (1997): *Biosys-2: a computer program for the analysis of allelic variation in genetics*. User manual.
- 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.
- WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. (1991): Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* **10**, 506–513.
- WAYNE, R. K.; LEHMAN, N.; ALLARD, N. W.; HONEYCUTT, R. L. (1992): Mitochondrial DNA varia-

- PAETKAU, D.; STROBECK, C. (1994): Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Mol. Ecol.* **3**, 489–495.
- RANDI, E.; FRANCISCI, F.; LUCCHINI, V. (1995): Mitochondrial DNA restriction-fragment-length monomorphism in the Italian wolf (*Canis lupus*) population. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **33**, 97–100.
- RANDI, E.; LUCCHINI, V.; FRANCISCI, F. (1993): Allozyme variability in the Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Heredity* **71**, 516–522.
- RANDI, E.; LUCCHINI, V.; CHRISTENSEN, M. F.; MUCCI, N.; FUNK, S. M.; DOLF, G.; LOESCHKE, V. (2000): Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. *Cons. Biol.* **14**, 464–473.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. (1995): An exact test for population differentiation. *Evolution* **49**, 1280–1283.
- bility of the grey wolf genetic consequences of population decline and habitat fragmentation. *Cons. Biol.* **6**, 559–569.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. (1984): Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358–1370.
- ZIMEN, E.; BOITANI, L. (1975): Number and distribution of wolves in Italy. *Z. Säugetierkunde* **40**, 102–112.

#### Authors' addresses:

M. SCANDURA, M. APOLLONIO, Dipartimento di Zoologia e Antropologia Biologia, Università di Sassari, Via Muroni 25, I-07100 Sassari, Italy (e-mail: marcoapo@discau.unipi.it)

L. MATTIOLI, Ufficio Piano Faunistico, Provincia di Arezzo, Piazza della Libertà 3, I-52100 Arezzo, Italy