

**Identification des canidés du Parc national du Mont-  
Tremblant et de sa périphérie à l'aide de marqueurs  
microsatellites**



**Rapport technique**

**Novembre 2014**

Université   
de Montréal

Ministère des Forêts,  
de la Faune  
et des Parcs  
Québec 

**Rapport présenté à**

Hugues Tennier

Parc national du Mont-Tremblant,

**Identification des canidés du Parc national du Mont-Tremblant et  
de sa périphérie à l'aide de marqueurs microsatellites**

**Université de Montréal**

**MFFP**

Novembre 2014

Photo : Valérie Patenaude, Parc national du Mont-Tremblant, 2008

#### **Référence à citer**

---

Rogic, A., N. Tessier, et F.-J. Lapointe. 2014. Identification des canidés du Parc national du Mont-Tremblant et de sa périphérie à l'aide de marqueurs microsatellites. Université de Montréal, Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs. Rapport présenté au responsable du service de la conservation et de l'éducation du Parc national du Mont-Tremblant. Montréal. 30 p.

---

## RÉSUMÉ

Le Parc national du Mont-Tremblant est le plus grand parc provincial au sud du Québec comprenant un large éventail d'espèces fauniques. La conservation est une des orientations où l'enjeu le plus important des dernières années, est la présence de loups devenus familiers avec les visiteurs. La direction a donc développé depuis 2008 des lignes directrices pour prévenir et gérer les cas de loups familiers afin d'augmenter la sécurité des touristes, tout en favorisant les efforts de conservation du loup.

Ainsi, afin de clarifier l'identification des canidés présents sur le territoire, de nombreux échantillons (tissus et matières fécales) ont été recueillis dans le Parc national du Mont-Tremblant ou à proximité depuis 2007. Ces échantillons ont été analysés, à l'aide d'outils génétiques, pour vérifier la présence de coyotes (*Canis latrans*), de loups de l'Est (*C. lycaon*), de loups gris (*C. lupus*) ou d'individus hybrides.

Les résultats obtenus ont permis d'identifier génétiquement 14 échantillons provenant du Parc national du Mont-Tremblant et de sa périphérie. Deux individus sont des coyotes, sept des loups de l'Est et il y a cinq individus hybrides. Il est intéressant de constater qu'au moins un coyote semble fréquenter une meute de loup au nord des limites du parc. La présence d'un individu hybride à proximité de ce groupe permet de se poser des questions sur les liens de parenté possible entre eux. Ces résultats préliminaires soulèvent plusieurs questions intéressantes au sujet de la dynamique des populations en lien avec la présence de différentes espèces de canidés ainsi que le partage de la ressource et du territoire. Le plus important est toutefois l'acquisition de connaissance sur l'aire de répartition du loup de l'Est au Québec et la présence possible d'une population distincte au sein d'un grand territoire, dont le Parc national du Mont-Tremblant.

## INTRODUCTION

Le Parc national du Mont-Tremblant est le plus grand parc provincial (1510 km<sup>2</sup>) au sud du Québec. Il est composé de plus de 400 lacs et rivières et d'un large éventail d'espèces fauniques (Sépaq 2014). Ce parc est également une grande attraction touristique et offre de nombreuses activités de plein air pour chaque saison. De 2002 à 2008, des observations et des mentions sur la présence de loups dans le parc ont connu une augmentation graduelle et les interactions entre les touristes et les loups ont généré une certaine crainte (Tennier 2008). La direction a depuis développé des lignes directrices pour prévenir et gérer les cas de loups familiers, qui ont contribué à augmenter la sécurité des touristes tout en favorisant les efforts de conservation du loup. Afin de clarifier l'identification des canidés présents sur le territoire, de nombreux échantillons (tissus et matières fécales) ont été recueillis dans le Parc national du Mont-Tremblant ou à proximité de ce dernier depuis 2007. Ces échantillons seront analysés, à l'aide d'outils génétiques, pour vérifier la présence de coyotes (*Canis latrans*), de loups de l'Est (*C. lycaon*) ou de loups gris (*C. lupus*) ainsi que leur niveau d'hybridation.

## MÉTHODES

### *Échantillonnage*

Des échantillons de canidés ont été recueillis au sein et autour du Parc national du Mont-Tremblant par le personnel entre 2007 et 2013 (Annexe 1). Des morceaux de muscles et des matières fécales ont été récoltés et conservés congelés, mais pour le Loup 13, seuls des poils étaient disponibles pour les analyses. Pour les identifications, une priorité sur les échantillons provenant des limites du Parc a été déterminée par Hugues Tennier, biologiste responsable du

service de la conservation et de l'éducation au Parc national du Mont-Tremblant, en fonction de leur potentiel d'appartenance à une des meutes utilisant le territoire. La cote de priorité 1 a été accordée aux échantillons provenant de l'intérieur du parc ou ayant été piégés dans les quelques centaines de mètres adjacents à sa limite. La cote de priorité 2 a été donnée aux échantillons, qui selon la connaissance du territoire et la distance de leur site de prélèvement porte à croire qu'il devait fort probablement utiliser le territoire du parc à un moment ou un autre de l'année. La cote de priorité 3 a été attribuée à des échantillons provenant de la périphérie mais dont l'appartenance à une des meutes utilisant le territoire du parc n'était pas certaine. Toutefois, advenant le cas où les échantillons de fèces n'étaient pas de bonne qualité pour les analyses génétiques, les autres échantillons pouvaient être utilisés pour répondre aux questions sur l'identification des canidés.

Les profils génétiques des échantillons de loups et de coyotes provenant des données de Astrid Vik Stronen (Stronen *et al.* 2012) ont été combinés, comme données de références, avec la matrice du présent projet, afin de pouvoir identifier les échantillons de canidés (Annexe 2).

### ***Méthodes d'extraction***

L'ADN de tous les échantillons fécaux (niveau de priorité n ° 2) et de tous les tissus des échantillons de priorités n ° 1 et n ° 3 fut extrait (à noter que l'échantillon des poils du Loup 13 a également été répertorié comme priorité n ° 1). La méthode d'extraction Quicklysis (Olsen *et al.* 1996) a été utilisée pour extraire l'ADN de tous les échantillons de tissus. Pour quelques échantillons, dont il était plus difficile d'obtenir un ADN de qualité, le kit Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA mini kit (protocole pour le tissu de mammifère avec une élution dans 75 ul) a été privilégié.

Pour les échantillons de matières fécales, de nombreux tests d'extraction ont été essayés. Dans un premier temps, les échantillons ont été rincés avec de l'eau stérile. Cette eau était par la suite récupérée pour extraire l'ADN des cellules épithéliales du colon restées collées sur les fèces. L'ADN a été extrait en utilisant le kit QIAamp® Fast DNA Stool mini kit et l'ADN était élué dans 200 µl de tampon d'éluion (selon les recommandations du protocole) ou dans 100 µl. Devant l'échec pour obtenir de l'ADN en quantité suffisante pour la suite des analyses, d'autres méthodes furent testées. Un sous échantillon de cinq individus a par la suite été utilisé, à des fins de test, en utilisant l'eau de rinçage et en grattant le long d'une petite portion de la matière fécale d'environ 3 cm x 2 cm. Le premier essai consistait à utiliser la méthode de 3 jours phénol/chloroforme, une procédure classique d'extraction, telle que décrite par Sambrook *et al.* (1989). Pour le deuxième test, on a utilisé le kit Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA mini kit en suivant le protocole pour les tissus de mammifère et avec une éluion de l'ADN dans 50 µl de tampon. Enfin, le troisième test était fait en utilisant à nouveau le kit de mini-rapide DNA Stool QIAamp® pour vérifier si l'ajout de matières fécales à l'eau de rinçage contribuait à augmenter la qualité des extractions et en éluant l'ADN dans seulement 50 µl de tampon.

### ***Amplifications des microsatellites***

Les mêmes onze marqueurs microsatellites utilisés par Stronen *et al.* (2012) ont été utilisés pour permettre la comparaison avec les profils génétiques des données témoins. Ces marqueurs sont: PEZ15, PEZ19, FH2001, FH2422, *Canis*20, *Canis*109, *Canis*172, *Canis*204, *Canis*225, *Canis*250 et *Canis*377. Toutes les amorces F étaient associées à une queue de M13. Une troisième amorce M13 était utilisée et marquée en fluorescence (6-Fam ou Hex) pour permettre de visualiser les allèles lors du génotypage.

Les amplifications, qui correspondent à l'augmentation exponentielle du nombre de copies de l'ADN nucléaire bordé par les amorces des marqueurs microsatellites, ont été réalisées dans des volumes de 18 µL par RPC (réaction de polymérase en chaîne). La solution comprenait : 100-200 ng d'ADN génomique par échantillon, 1X tampon de réaction, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,20 mM de chaque dNTP, 0,16 µM de l'amorce Reverse et de l'amorce en M13, 0,07 µM de l'amorce Forward, 0,5 unité de Taq ADN polymérase (1 U ≈ 16,67 nkat), et 13,83 µL d'eau stérile. Les profils thermiques pour la RPC ont été réalisés sur un thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) et différaient pour certains marqueurs. Pour PEZ15, PEZ19, FH2001 et FH2422, les conditions étaient: une première étape de dénaturation à 94°C pendant 15 minutes, 38 cycles à 94°C pendant 30 secondes, 58°C pendant 90 secondes, 72°C pendant 1 minute et une dernière étape d'élongation à 72°C pendant 30 minutes. Pour tous les marqueurs *Canis*, les conditions suivantes ont été utilisées: une première étape de dénaturation à 94°C pendant 1 minute, 38 cycles à 94°C pendant 1 minute avec une température d'élongation, soit à 52°C (Canis20, 109, 204 & 377) ou à 58°C (Canis172, 225 & 250) pendant 45 secondes et à 74°C pendant 1 minute avec une dernière étape d'élongation à 72°C pendant 5 minutes. Le succès de l'amplification était visualisé par la coloration du produit de RPC avec du SYBR® Green I acides nucléiques (Invitrogen™ Inc., de Burlington, Canada) migré sur un gel d'agarose 2% et exposé à une lumière UV. Le produit de l'amplification était ensuite visualisé par un séquenceur automatique de type ABI-3730XL Analyseur d'ADN (Applied Biosystems) au centre d'innovation de Génome Québec de l'Université McGill. Tous les allèles ont été regardés visuellement trois fois indépendamment en utilisant GeneMarker v. 1.91 (SoftGenetics intel® LLC, Pennsylvanie, USA).



### *Analyses statistiques*

Les échantillons provenant de l'étude Stronen *et al.* (2012) ont été inclus dans les différentes analyses comme échantillons témoins, afin d'identifier les différentes espèces de canidés présentes au Parc national du Mont-Tremblant et dans sa périphérie. Le nombre le plus vraisemblable de groupes (k) génétiquement distincts est estimé à l'aide du logiciel STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000, 2010). Différentes hypothèses représentant un à six groupes ont été testées avec 1 000 000 d'itérations de chaînes de Markov. Dix répliquas ont été calculés pour chacune des hypothèses (k = 1 à 6); la solution maximisant la valeur de vraisemblance étant retenue comme solution finale  $\Delta K$  (Evanno *et al.* 2005, Martien *et al.* 2007). La proportion d'appartenance aux différents groupes (Q) pour chaque individu est représentée graphiquement, chaque colonne étant le profil génétique d'un individu. La figure obtenue avec STRUCTURE permet de visualiser la représentation des différents génomes retrouvés chez les groupes de canidés. Les valeurs de Q pour l'appartenance à chaque regroupement sont également présentées dans un tableau pour chaque individu. L'information pour le groupe d'échantillon provenant de la région du Parc national du Mont-Tremblant a été ajoutée à la matrice des échantillons témoins, ce qui permettait de créer les regroupements suivants : Coyotes (*C. latrans*), loups gris (*C. lupus*) Ontario, loups gris Québec, loups de l'Est (*C. lycaon*) de l'Ontario, loups de l'Est du Québec et les échantillons du Parc national du Mont-Tremblant et de ses environs.

Une analyse en composantes principales (PCA) a été réalisée à l'aide de l'outil "adegenet" (Jombart 2008) dans le logiciel R (R Development Core Team 2012) à des fins de comparaison. Le pourcentage de la variance total expliqué par chaque composante des génotypes a aussi été

calculé ainsi que des ellipses d'intervalle de confiance de 95% pour les groupes d'individus regroupés selon le type de canidé.

En accord avec les analyses réalisées par Benson *et al.* (2012), un regroupement des individus selon leur identité coyote (N=64), loup de l'Est (N=64) et loup gris (N=27) a été réalisé en tenant compte des valeurs de Q. Les individus étaient classés « purs » si  $Q \geq 0,8$  pour un regroupement particulier et les individus dont la valeur  $Q < 0,8$  étaient identifiés comme des hybrides, conformément aux autres études réalisées sur l'identification des Canidés (Verardi *et al.* 2006, Rutledge *et al.* 2010, Wheeldon *et al.* 2010, Benson *et al.* 2012). Ces données ont été utilisées pour vérifier si les trois groupes de *Canis* étaient génétiquement distincts. Ainsi, des tests exacts de Fisher (Raymond et Rousset 1995a) ont été calculés, afin de vérifier si la distribution des fréquences alléliques est différente entre paires de regroupement pour chaque locus. Une différence statistique significative indique que les groupes de canidés sont génétiquement distincts pour ce locus. Ces tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GENEPOP version 4.0 (Raymond et Rousset 1995b, Rousset 2001). Les valeurs des probabilités ont été ajustées par une méthode séquentielle de Bonferroni, ceci afin de minimiser les erreurs de type I lors du calcul de plusieurs tests impliquant les mêmes données (Rice 1989).

Une analyse moléculaire de variance (AMOVA) a été calculée à l'aide du logiciel Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.* 2005) pour vérifier si la variation génétique était plus grande au sein d'un groupe ou entre les groupes. Enfin, pour compléter les analyses et confirmer les résultats des tests précédents, on a calculé des  $F_{ST}$  et les probabilités associées avec le même logiciel avec un test de permutation pour 1000 itérations. Ces indices ne se basent pas que sur les fréquences alléliques pour un locus comme pour les tests exacts de Fisher, mais ils utilisent l'ensemble de l'information disponible pour tous les locus. L'indice  $F_{ST}$  (ou  $\Theta$  de Weir et Cockerham 1984)

tient compte du processus de la dérive génétique et il est basé sur les différences entre les fréquences alléliques.

## RÉSULTATS & DISCUSSION

### *Extractions*

L'ADN a été extrait pour un total de 35 échantillons (14 tissus musculaires, 20 échantillons fécaux et un échantillon de poils). Pour certains échantillons, des problèmes sont toutefois survenus.

Tissus - Curieuse # 0838: le tissu original fourni pour cet individu ne ressemblait pas à du tissu, mais plutôt à une substance blanche gluante. L'extraction de l'ADN de cet échantillon n'a donc pas fonctionné. Pour ce qui est de l'échantillon de Junior 33, l'échantillon dégageait une odeur nauséabonde et l'extraction a été refaite à deux reprises.

Matières fécales - CFL009, 010 et 011 n'ont pas fait l'objet d'extraction vu les dates de récoltes et le non succès d'amplification pour les fèces. De plus, les échantillons CFL020 et CFL022 n'étaient pas dans le sac d'échantillons et n'ont donc pas été extraits.

La méthode d'extraction la plus efficace pour les échantillons fécaux a été celle avec le Kit Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA mini kit (volume final d'élution 50 µl).

### *Amplifications*

Bien que l'extraction d'ADN a été une réussite pour la plupart des échantillons, les amplifications n'ont pas fonctionné pour plusieurs d'entre eux, dont les fèces. Le tableau 1 présente les individus pour qui un minimum de huit microsatellites ont été amplifiés avec succès, ce qui est le critère minimal pour permettre de réaliser les analyses statistiques.

Tableau 1. Date de collecte, emplacement et type d'échantillon des spécimens du Mont-Tremblant pour lesquels les données d'un minimum de huit microsattellites sont disponibles.

Nom échantillon	Type d'échantillon	Nom du Site	Coordonnées UTM		Date
			Est	Nord	
Loup1	Tissu musculaire	Lac Bouloc	541672	5161208	Novembre 2011
Loup4	Tissu musculaire	Lac Bouloc	541672	5161208	Novembre 2011
Loup5	Tissu musculaire	Lac Bouloc	541672	5161208	Novembre 2011
Voyou 0833	Tissu musculaire	Lac Chat	536501	5128645	Été 2007
Tremblante 0813	Tissu musculaire	Lac de la fourche	540857	5126386	Hiver 2007
Loup6	Tissu musculaire	St-Donat	558680	5139421	Hiver 2009-2010
Loup8	Tissu musculaire	Lac Cing-Doigt	530860	5157093	Décembre 2012
Loup18	Tissu musculaire	Lac Mirault	579533	5130957	Novembre 2011
Loup23	Tissu musculaire	Lac Supérieur	540619	5117929	Hiver 2013
Loup24	Tissu musculaire	Lac Macaza	540677	5117889	Hiver 2013
Loup25	Tissu musculaire	Lac Macaza	540677	5117889	Hiver 2013
CFL001	Matières fécales	Petite cachée	527191	5126639	Février 2013
Croc-Blanc 0823*	Tissu musculaire	Lac Chat	536501	5128645	Été 2007
Curieuse 0838*	Tissu musculaire	Lac Chat	536501	5128645	Été 2007

\*Déjà identifié comme un loup hybride du Québec - A. V. Stronen

L'ADN a été extrait pour les 17 échantillons de matières fécales disponibles, mais pour 16 d'entre eux les amplifications ne fonctionnaient pas et moins de deux marqueurs microsattellites ont eu du succès. Des tentatives d'amplifications ont été menées jusqu'à trois reprises pour chaque marqueur. Par la suite, l'extraction de l'ADN de l'individu était jugée inutilisable, afin d'éviter des

dépassements des coûts de laboratoire et permettre de se concentrer sur les individus qui avaient plus de potentiel. L'échantillon de fèces CFL001 était le seul échantillon pour lequel les onze marqueurs microsatellites ont amplifié avec succès. Il est important de préciser que cet échantillon a été recueilli en Février 2013 (l'un des mois les plus froids au Québec), ce qui a probablement contribué à une meilleure conservation de l'ADN et par la suite, à son succès d'amplification. La grande majorité de tous les autres échantillons de matières fécales ont été prélevés de Mars à Septembre de la même année, peut-être dans des journées plus chaudes. Certains paramètres devraient être pris en considération lors de la collecte des échantillons fécaux, tels que les températures extérieures et le temps écoulé entre la collecte et l'analyse, afin de s'assurer d'une bonne conservation du matériel génétique et maximiser ainsi le taux de succès pour les analyses ultérieures. L'entreposage à long terme des échantillons sensibles (échantillons fécaux dans ce cas) ainsi que leur manutention à plusieurs reprises (gel-dégel) peut également provoquer une dégradation de l'ADN et affecter les analyses génétiques.

Seul un échantillon de tissu (Junior 33) et le seul échantillon de poils (Loup 13) ont été exclus de l'analyse, car moins de huit marqueurs microsatellites ont été amplifiés pour ces individus. L'ADN des échantillons de poils est beaucoup plus difficile à extraire et à amplifier que les tissus. Le poil est une structure kératinisée et le matériel génétique présent est fragmenté et en faible quantité. De plus, les échantillons de poils récoltés sont sans follicule (base racinaire où l'ADN est abondant). Bien que pour l'échantillon Croc-Blanc # 0823 moins de huit marqueurs aient fonctionné, les données ont été complétées en utilisant ceux obtenus dans l'étude de Stronen *et al.* (2012), puisqu'il s'agissait du même échantillon.

## ***STRUCTURE***

Le profil génétique de chaque individu provenant du Mont-Tremblant ou à proximité du parc a été comparé aux échantillons des cinq groupes témoins. La valeur la plus élevée pour  $\Delta K$  est une division en deux groupes, suivie par  $\Delta K = 3$ . Dans le premier cas, cette division en deux groupes permet de différencier les coyotes des loups, comme les résultats observés dans Stronen *et al.* (2012). Afin d'obtenir une plus grande précision pour l'identification des individus, tout en considérant des différences morphologiques représentées par trois groupes, la solution  $\Delta K = 3$  a été retenue. Les résultats sont illustrés dans la Figure 1, chaque colonne étant le profil génétique d'un individu.

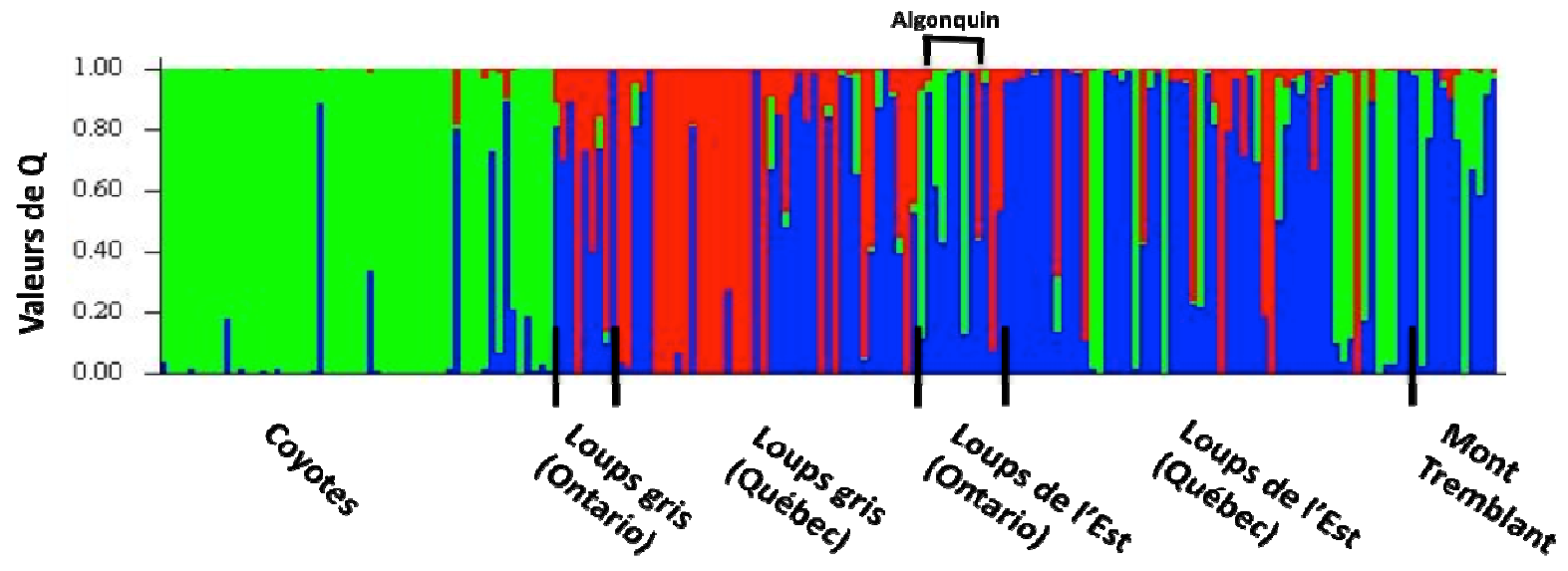


Figure 1. Résultats de STRUCTURE pour  $\Delta K=3$ . Les huit premiers loups de l'Est de l'Ontario ont été récoltés dans le parc Algonquin. Les divisions entre les groupes sont indiquées par les lignes noires épaisses.



La figure 1 montre que les échantillons du Parc national du Mont-Tremblant et de sa périphérie sont principalement dominés par le génotype bleu, qui constitue la majorité du génotype dans les groupes de loups de l'Est de l'Ontario et du Québec. Les individus du Mont-Tremblant dominés en grande partie ou entièrement par le génotype vert ressemblent au groupe de coyotes. Pour ce qui est des loups dont le génotype est partagé par le rouge et le vert, ce sont des hybrides. Les loups gris seraient le plus souvent représentés par le génotype rouge. Quelques individus du Mont-Tremblant présentent une petite proportion du génotype rouge, mais les valeurs d'assignement à ce groupe sont <10%. Cela peut indiquer un croisement ancien avec les loups gris.

Les valeurs de Q associées aux individus représentent des coefficients d'appartenance pour les différents groupes (Tableau 2). Ainsi, des individus dont la valeur de  $Q \geq 0,8$  pour un génotype donné sont des individus considérés comme étant « purs » pour ce groupe (Rutledge *et al.* 2010, Benson *et al.* 2012, Stronen *et al.* 2012). En tenant compte de ce critère, deux individus provenant des échantillons du Parc national du Mont-Tremblant et de sa périphérie seraient des coyotes (Loup 4, Loup 18) et sept individus seraient des loups de l'Est du Québec (Loup 1, Loup 5, Voyou # 0833, Tremblante # 0813, Loup 6, Loup 25 et CFL001). Les échantillons Loup 8, Loup 23 et 24 seraient des hybrides de coyote et de loup de l'Est. Pour ce qui est de l'échantillon Croc-Blanc (# 0823), il avait déjà été identifié dans l'étude de Mme Stronen comme un hybride avec une forte proportion du génome de loup de l'Est (64%), ainsi que pour Curieuse (# 0838) avec une hybridation à 45% loup de l'Est et coyote respectivement. Les résultats obtenus dans les données de Mme Stronen pour les échantillons Tremblante (#0813) et Voyou (# 0833) sont légèrement différents de ceux obtenus dans le présent projet. Ainsi, on avait obtenu pour le génome de Tremblante une proportion de 75 % appartenant au loup de l'Est versus 93%

maintenant et pour Voyou une différence de 92 % versus 100 % maintenant comme génome du loup de l'Est. Ces différences dans les résultats viennent principalement du fait qu'on a réussi à obtenir le profil génétique pour les 11 microsatellites, tandis que Mme Stronen avait obtenu l'information pour neuf d'entre eux.

Tableau 2. Résultats de STRUCTURE ( $\Delta K= 3$ ) pour les échantillons du Parc national du Mont-Tremblant et de sa périphérie avec le coefficient d'appartenance à des groupes (Q) où le groupe #1 = génotype vert, #2 = génotype rouge et #3 = génotype bleu.

Individus (Parc national du Mont-Tremblant et sa périphérie)	Groupes		
	#1 <i>Canis latrans</i>	#2 <i>Canis lupus</i>	#3 <i>Canis lycaon</i>
Loup 1	0,012	0,003	0,984
Loup 4	0,960	0,001	0,039
Loup 5	0,187	0,001	0,812
Voyou #0833	0.000	0.000	1,000
Tremblante #0813	0,028	0,046	0,926
Loup 6	0,003	0,083	0,914
Loup 8	0,359	0,023	0,618
Loup 18	1,000	0.000	0.000
Loup 23	0,367	0,004	0,629
Loup 24	0,530	0,007	0,463
Loup 25	0,088	0.000	0,912
CFL001	0,012	0,007	0,981

Graphiquement, on peut projeter ces résultats sur une carte pour comparer les lieux de captures avec l'identité génétique des individus (Figure 2). On observe que le coyote (loup 4) est présent avec deux loup de l'Est (loups 5 et 1) en plus de la présence d'un hybride (loup 8) dans la même région. Afin de mieux visualiser les résultats, les tartes ont été séparées mais dans les faits, les échantillons 1, 4 et 5 sont situés à la même place. Cette situation est également vraie pour les échantillons 24 et 25.

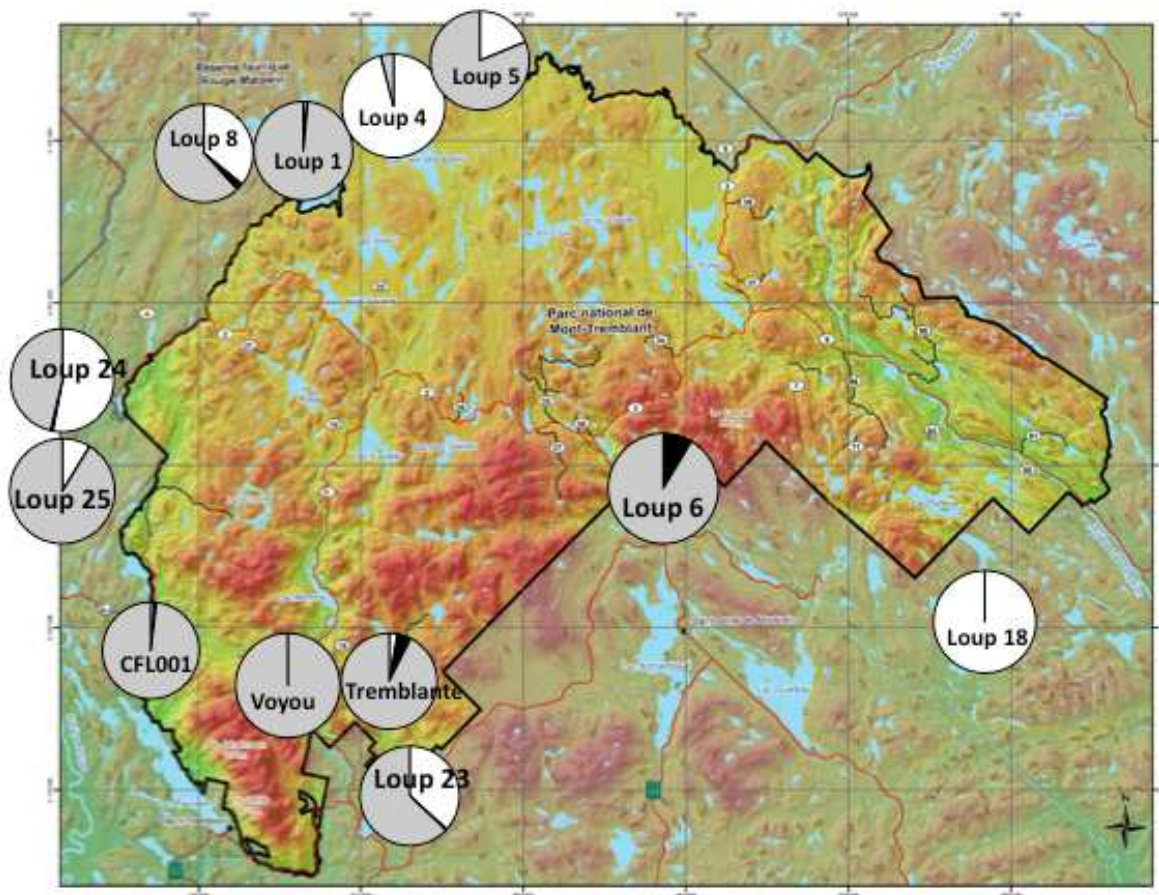


Figure 2. Localisation des canidés identifiés au Parc national du Mont-Tremblant et dans sa périphérie. La portion blanche représente les valeurs de Q obtenues avec STRUCTURE pour les génotypes de *C. latrans*, le noir *C. lupus* et le gris *C. lycaon*.

## **PCA**

Des analyses de PCA (analyse en composantes principales) permettent également de vérifier comment et avec qui les canidés du Mont-Tremblant se regroupent et ont donc une plus grande ressemblance génétique. Chaque point est un individu. Les résultats montrent que les coyotes (*C. latrans*) et les loups gris (*C. lupus*) du Québec forment des groupes distincts à chaque extrémité du graphique (Figure 3). Les loups gris de l'Ontario, les loups de l'Est (*C. lycaon*) du Québec et de l'Ontario se positionnent entre ces deux groupes. Les individus isolés en position intermédiaire sont probablement des hybrides. Cette analyse de PCA suggère pour les individus du Mont-Tremblant, qu'au moins deux individus sont des coyotes (deux points mauves dans les points verts) et que les autres sont près génétiquement des loups de l'Est du Québec.

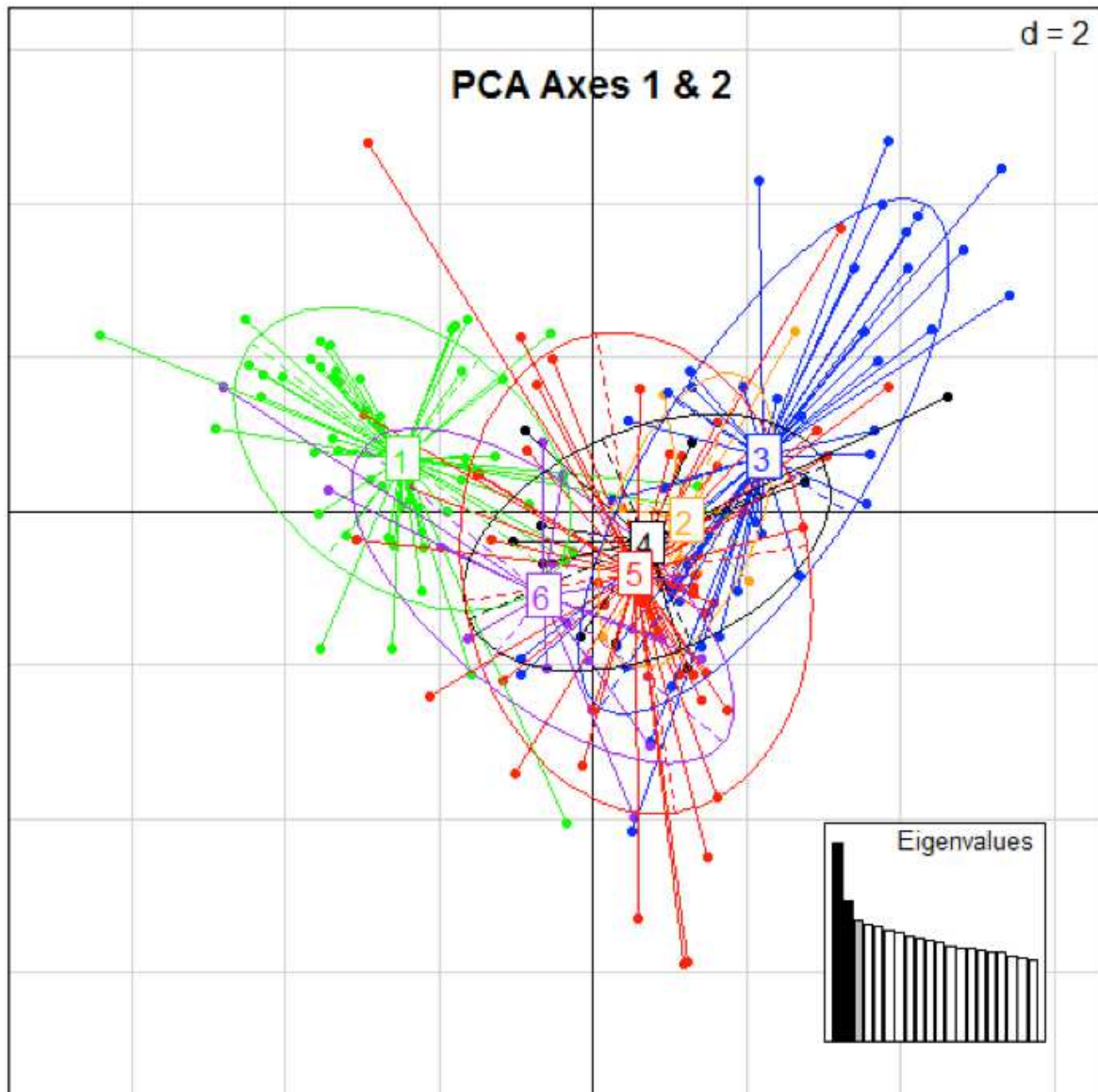


Figure 3. Résultats du PCA d'axes 1 & 2 qui a occupé les plus hautes valeurs propres. Population 1: Coyotes, 2 : Loups gris (Ontario), 3 : Loup gris (Québec), 4: Loups de l'Est (Ontario), 5: Loups de l'Est (Québec), 6 : Mont-Tremblant.

Afin de préciser les relations entre les groupes et l'appartenance des échantillons du Mont-Tremblant, une autre analyse de PCA a été effectuée, mais en excluant les deux groupes de loups gris (Figures 4). Les résultats montrent encore que les individus du Mont-Tremblant sont généralement plus près génétiquement des loups de l'Est du Québec.

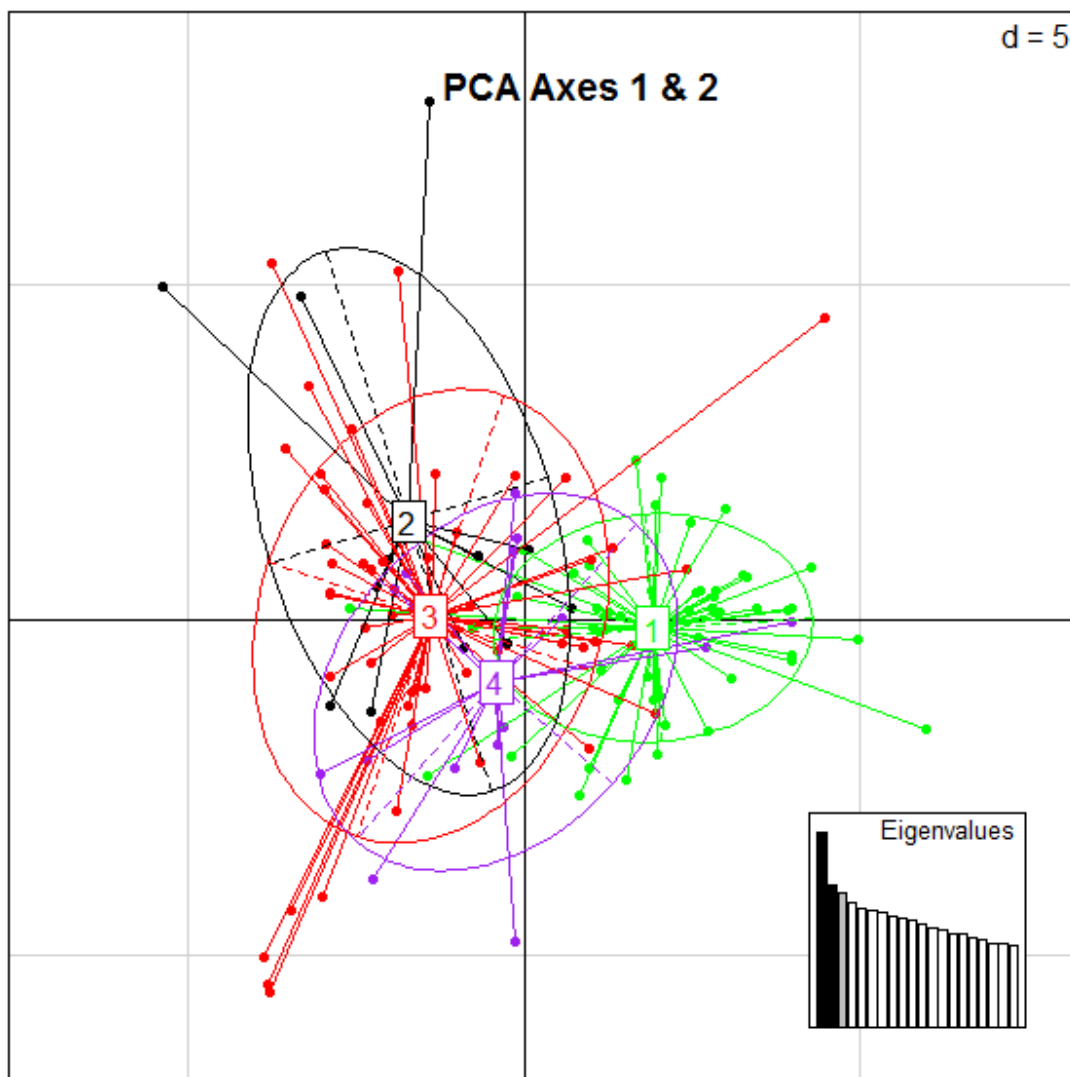


Figure 4. Résultats PCA d'axes 1 & 2 qui a occupé les plus hautes valeurs propres. Population 1: Coyotes, 2 : Loups de l'Est (Ontario), 3: Loups de l'Est (Québec), 4 : Mont-Tremblant.

Les tests exacts de Fisher montrent un grand degré de différenciation dans les fréquences alléliques pour chacun des locus entre les trois espèces de canidés (Tableau 3). Chaque locus microsatellites permet de discriminer les trois groupes.

Tableau 3. Résultats des tests exacts de Fisher. Nombre de locus significativement différents sur le nombre total de locus analysés.

	Coyotes	Loups de l'Est	Loups gris
Coyotes	-		
Loups de l'Est	11/11	-	
Loups gris	11/11	10/11	-

Les analyses d'AMOVA montrent que la majorité de la variance dans ce modèle se trouve à l'intérieur des groupes (i.e. au sein de chaque espèce), mais cette variation n'est pas statistiquement significative. Toutefois, même si la variance est moins grande entre les groupes, celle-ci est significativement différente, ce qui indique que les trois groupes de canidés sont génétiquement distincts (Tableau 4).

Tableau 4. Résultats des différences génétiques entre les trois espèces de canidés selon un AMOVA. \*:  $p < 0.001$ .

Source de variation	d.f.	Variance	% variance
Entre groupes	2	0.3233*	9.31
À l'intérieur des groupes	309	3.1497	90.69

Les tests de  $F_{ST}$  vont également dans le même sens (Tableau 5) avec des différences statistiquement significatives particulièrement entre les loups gris et les coyotes, ainsi qu'avec les loups de l'Est.

Tableau 5. Valeur des  $F_{ST}$  pour chacune des trois espèces testées. \*:  $p < 0.001$ .

	Coyotes	Loups de l'Est	Loups gris
Coyotes	-		
Loups de l'Est	0.0884*	-	
Loups gris	0.1347*	0.1044*	-



## CONCLUSION

Les résultats obtenus pour ce rapport doivent être considérés comme des données préliminaires, car ils n'ont pas été publiés dans un article scientifique révisé par des pairs. L'augmentation du nombre de marqueurs microsatellites utilisés pour ces analyses ou un plus grand nombre d'individus témoins pour former les groupes, pourraient préciser les génotypes, particulièrement pour les hybrides. De plus, en utilisant des marqueurs beaucoup plus variables comme les SNPs, on pourrait obtenir une meilleure définition des groupes de canidés présents au Québec et valider l'importance de l'hybridation (Benson *et al.* 2012).

La collecte et la préservation des échantillons pourraient faire l'objet de recherches méthodologiques plus poussées. Par exemple, certaines techniques de récolte des fèces (Stenglein *et al.* 2011) ou la collecte de poils (Bekaert *et al.* 2012), semblent prometteuses comme méthode non invasives, mais la quantité et la qualité de l'ADN obtenu à partir de ce type d'échantillons demandent des efforts plus importants pour les analyses génétiques. Ainsi, le nombre de reprises pour atteindre un nombre suffisant de marqueurs qui ont fonctionné peut engendrer des coûts élevés en laboratoire. On pourrait aussi être obligé de diminuer le nombre de marqueurs à utiliser, ce qui va à l'encontre des recommandations pour maximiser la précision des résultats d'identification. Ainsi, à ce jour, la prise de sang sur des individus vivants ou l'opportunité de prélever du tissu sur les canidés morts restent les types d'échantillons à privilégier. On ne peut écarter la collecte de fèces prélevées pendant les périodes les plus froides de l'hiver, qui peuvent également constituer des échantillons intéressants.

Dans les résultats obtenus lors de ce projet, il est intéressant de constater qu'au moins un coyote semble fréquenter une meute de loup. En effet, les échantillons loups 1, 4 et 5 ont tous été capturés au mois de novembre 2011, au lac Bouloc par le même piégeur sur la limite du parc. Ils proviendraient d'un coyote et de 2 loups de l'Est. Le loup 8 a été prélevé à 11,5 km du même site l'année suivante. On pourrait donc émettre l'hypothèse que cet individu hybride présente des liens de parenté avec les autres individus et qu'il pourrait y avoir hybridation entre le coyote et un des loups de l'Est. Il est peu probable que ces individus soient simplement des migrants. Des analyses plus poussées devraient être réalisées pour vérifier les liens de parenté entre ces canidés. Deux autres situations amènent le même questionnement sur la présence de loups de l'Est accompagnés d'individus hybrides. Ainsi, la capture des loups 24 et 25, soit un hybride et un loup de l'Est, a été réalisée par un même piégeur, sur un même site à l'hiver 2013. Croc-Blanc (hybride), quant à lui, était un loup familial prélevé durant l'opération de piégeage de l'été 2008 et il provient du même site que Voyou (loup de l'Est). Tremblante, un loup de l'Est, a été retrouvée morte gelée sur un lac en hiver à 5 km du lieu de capture de Voyou. Il semblerait que plusieurs individus représentant des loups de l'Est soient présents en même temps sur le territoire, ce qui ne supporte pas l'hypothèse d'individus qui ne seraient que de passage.

Ces résultats préliminaires soulèvent plusieurs questions intéressantes sur les liens de parenté des individus, la dynamique de population avec la présence de coyote pur au sein des meutes ou en relation avec le piégeage comme pour les études réalisées en Ontario (Benson *et al.* 2012, Benson et Patterson 2013). L'orignal (*Alces alces*), la proie préférentielle des loups gris, est présent sur l'ensemble du territoire, tandis que le cerf de

virginie (*Odocoileus virginianus*) se retrouve principalement à l'Ouest du Parc (Hugues Tennier, comm pers.). Ces faits amènent à se poser des questions également sur l'utilisation de cette ressource par les coyotes et les hybrides. La présence de plusieurs loups de l'Est ensemble sur ce territoire suggère la présence d'une population probablement distincte de celle retrouvée au Parc national de la Mauricie. Effectivement, parmi les loups de l'Est identifiés au Québec, les analyses ont montré que 11 individus sur les 12 étudiés étaient des loups de l'Est purs ( $Q \geq 0,8$ ). La poursuite de l'acquisition de connaissances sur le sujet au Québec permettra peut-être éventuellement de résoudre le débat sur l'aire de répartition et le nombre d'individus formant le groupe des loups de l'Est (Seddon *et al.* 2005, Anderson *et al.* 2006, Kyle *et al.* 2006, VonHoldt *et al.* 2011, Benson *et al.* 2012).

## RÉFÉRENCES

- Anderson DH, Fabbri EA, Santini A, Paget S, Cadieu E, Galibert F, André C, Randi E (2006). Characterization of 59 canine single nucleotide polymorphisms in the Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Molecular Ecology Notes*, 6:1184-1187.
- Bekaert B, Larmuseau MHD, Vanhove MPM, Opdekamp A, Decorte R (2012). Automated DNA extraction of single dog hairs without roots for mitochondrial DNA analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 6: 277-281.
- Benson JF, Patterson BR (2013). Inter-specific territoriality in a *Canis* hybrid zone: spatial segregation between wolves, coyotes, and hybrids. *Oecologia*, 173 :1539-1550.
- Benson JF, Patterson BR, Wheelodon TJ (2012). Spatial genetic and morphologic structure of wolves and coyotes in relation to environmental heterogeneity in a *Canis* hybrid zone. *Molecular Ecology*, 21 : 5934-5954.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14:2611-2620.
- Jombart, T (2008). Adegnet: an R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24:1403-1405.
- Kyle CJ, Johnson AR, Patterson BR, Wilson PJ, Shami K, Grewal SK & White BN (2006). Genetic nature of eastern wolves: Past, present and future. *Conservation Genetics*, 7:273-287.
- Martien K, Givens G, Archer E (2007). A note on the ability of STRUCTURE to correctly infer the number of populations for Bering-Chukchi-Beaufort Seas bowhead whales. *Whaling Commission, Paper SC/5*, 1-8.
- Olsen JB, Wenburg JK, Bentzen P (1996). Semi-automated multilocus genotyping of Pacific Salmon (*Oncorhynchus* spp.) using microsatellites. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5:259-272.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945-959.
- Pritchard JK, Wex X, Falush D (2010). Documentation for structure software: Version 2.3. <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>.
- R Development Core Team (2012). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- Raymond M, Rousset F (1995a). An exact test for population differentiation. *Evolution* 49(6): 1280-1283.
- Raymond M, Rousset F (1995b). GENEPOP (4.0.10): Population genetics software for exact test and ecumenism. *Journal of Heredity* 86: 248-249 .
- Rousset F (2001). Inferences from spatial population genetics. *Handbook of Statistical Genetics*. Eds. Balding D., Bishop M. et Cannings C., John Wiley and Sons. 239-269 pages.
- Rice WE (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Rutledge LY, Garraway CJ, Loveless KM, Patterson BR (2010). Genetic differentiation of eastern wolves in Algonquin Park despite bridging gene flow between coyotes and grey wolves. *Heredity*, 105:520-531.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Chapter 6 - Preparation and Analysis of Eukaryotic Genomic DNA. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Seddon JM, Parker HG, Ostrander A, Ellegren H (2005). SNPs in ecological conservation studies: A test in the Scandinavian wolf population. *Molecular Ecology*, 14:503-511.
- Sépaq (2014). Parc national du Mont-Tremblant, Parcs Québec. <http://www.sepaq.com/pq/mot/index.dot> [Accessed September 14th, 2014].
- Strenglein JL, Waits LP, Ausband DE, Zager P, Mack CM (2011). Estimating gray wolf pack size and family relationships using noninvasive genetic sampling at rendezvous sites. *Journal of Mammalogy*, 92 : 784-795.
- Stronen AV, Tessier N, Jolicoeur H, Paquet PC, Hénault M, Villemure M, Patterson BR, Sallows T, Goulet G, Lapointe FJ (2012). Canid hybridization : Contemporary evolution in human-modified landscapes. *Ecology and Evolution*, 2:2128-2140.
- Tennier, H (2008). Lignes directrices pour la prévention et la gestion des loups familiaux au Parc national du Mont-Tremblant, Parc national du Mont-Tremblant, Parcs Québec, Société des établissements de plein air du Québec, Lac Supérieur, 53p.
- 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. *Molecular Ecology*, 15, 2845–2855.
- VonHoldt BM, Pollinger JP, Earl DA, Knowles JC, Boyko AR, Parker H, Geffen E, Pilot M, Jedrzejewski W, Jedrzejewska B, Sidorovich V, Greco C, Randi E, Musiani M, Kays R, Bustamante CD, Ostrander EA, Novembre J, Wayne R

(2011). A genome-wide perspective on the evolutionary history of enigmatic wolf-like canids. *Genome Research*, 21:1294-1305.

Wheeldon TJ, Patterson BR, White BN (2010). Sympatric wolf and coyote populations of the western Great Lakes region are reproductively isolated. *Molecular Ecology*, 19, 4428–4440.