

# ÉTUDE DE LA STRUCTURATION GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DE LIONS DE TANZANIE À L'AIDE D'OUTILS GÉNOMIQUES

OLIVIA JOUVENET

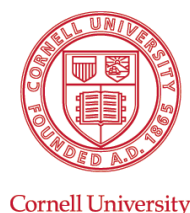
Sous la supervision du Dr. Johan Michaux et du Dr. Nathalie Smitz



DEPARTEMENT BIOLOGIE, ÉCOLOGIE, ÉVOLUTION – FACULTE DES SCIENCES – UNIVERSITÉ DE LIÈGE

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention du grade de Master  
en Biologie des Organismes et Ecologie

Septembre 2016







**Faculté des Sciences**  
**Département des Sciences de la Vie**  
Laboratoire de Génétique de la Conservation

---

**ÉTUDE DE LA STRUCTURATION GENÉTIQUE DES POPULATIONS DE  
LIONS DE TANZANIE A L'AIDE D'OUTILS GENOMIQUES**

---

— Année académique 2015-2016 —

Membres du jury :

Professeur Patrick **DAUBY**  
Docteur Johan **MICHAUX**  
Docteur Annick **WILMOTTE**  
Docteur Lise-Marie **PIGNEUR**  
Docteur Alain **VANDERPOORTEN**

# REMERCIEMENTS

---

*Avant tout, je voudrais remercier mes promoteurs. Dr. Johan Michaux, grâce à qui j'ai pu enrichir mes connaissances et mes compétences en génétique de la conservation à travers ce sujet de mémoire et l'espèce passionnante qu'est le lion. Merci pour votre encadrement, vos conseils judicieux, votre disponibilité et votre confiance. Dr. Nathalie Smitz, sans qui j'aurais été perdue plus d'une fois dans des complexités techniques et théoriques si nouvelles pour moi. Merci pour ta patience, ta disponibilité, tes encouragements et ton enthousiasme !*

*Egalement un grand merci aux Dr. Philippe Chardonnet et Dr. William Crosmar, ainsi qu'à la fondation IGF, pour la récolte et l'acheminement des échantillons, sans lesquels cette belle étude aurait été difficile à réaliser. Aussi, merci pour le partage de vos précieuses connaissances de terrain, qui ont permis d'éclaircir certains résultats et d'enrichir nos informations.*

*Ensuite, je voudrais remercier l'équipe du Laboratoire de Génétique de la Conservation de l'ULg, pour le temps passé à m'encadrer et à m'aider dans mon apprentissage technique et dans le traitement de mes échantillons. Un merci particulier à François Gillet et à Laurent Gohy.*

*Merci à mes parents, qui m'ont permis de réaliser ce master au sein de l'Université de Liège et qui sont toujours restés à l'écoute et encourageants ces dernières années depuis la France lors des coups durs ou des trop pleins que j'ai vécu ici en Belgique. Je remercie notamment mon papa, pour avoir essayé ces derniers mois de toujours plus rapprocher la « fin » avec ses fameux « Aller, tu tiens le bon bout » ou « Encore un effort, après c'est la quille ». Je n'ai sûrement pas fini de les entendre !*

*Merci à mon compagnon, mon Guillaume, pour avoir su supporter mes sautes d'humeur, mes nuits agitées, mes longs descriptifs sur mes résultats d'étude, mon planning, ou encore ma rédaction. Tu ne devais pas tout comprendre, mais ton écoute était apaisante. Ce travail marque la fin de mes études en Belgique et nous promet un nouveau départ, enfin réunis.*

*Enfin, merci à Nathalie Simon, mon amie, qui lors de ses visites occasionnelles sur Facebook afin de « prendre la température » ou de jauger de mon avancement, se montrait encourageante ou du moins compatissante ;)*

**Source photo de couverture :**

Martha Rosenberg, de The Greenville Post.



# RESUME

---

## ETUDE DE LA STRUCTURATION GENETIQUE DES POPULATIONS DE LIONS DE TANZANIE A L'AIDE D'OUTILS GENOMIQUES

---

**Promoteurs : Dr. Johan Michaux et Dr. Nathalie Smitz**

**Olivia Jouenet**

Laboratoire de Génétique de la Conservation  
Année académique 2015-2016

Les populations de lions d'Afrique, *Panthera leo leo*, ont décliné de manière importante ces dernières décennies. Les menaces telles que la dégradation de l'habitat et les conflits homme-lion, toujours grandissantes, auxquelles le lion d'Afrique fait face même dans les aires protégées, impactent le flux génique existant naturellement entre les populations de lions. Ceci conduit en principe à un épuisement progressif de la diversité génétique au sein des populations, fragilisant potentiellement les populations, et menaçant la survie de l'espèce sur le long terme. La Tanzanie abrite la population de lions la plus importante d'Afrique et présente ainsi un intérêt tout particulier pour la mise en place de stratégies de conservation adaptées afin de contribuer à la protection de l'espèce.

Les analyses de la présente étude ont été réalisées sur base de deux marqueurs moléculaires, à savoir 11 microsatellites et 9 184 SNPs, et d'un échantillonnage de 104 lions issus de 6 pays d'Afrique, dont 74 provenaient de Tanzanie.

Le principal objectif de cette étude a été d'étudier la diversité génétique des individus de Tanzanie afin d'évaluer leur degré de différenciation et de quantifier le risque de consanguinité au sein des populations fragmentées. Les analyses statistiques basées sur les SNPs ont permis de mettre en évidence trois populations bien distinctes au sein de la Tanzanie : une au Nord, une à l'Ouest et une au Sud-Est. Par ailleurs, ces populations tanzaniennes présentent une bonne diversité génétique et le risque de consanguinité n'apparaît pas important sur base des microsatellites ; les valeurs de  $F_{IS}$  obtenues sur base des SNPs sont importantes mais difficilement interprétables étant donné l'absence de données de références pour les félins en général et pour les lions en particulier.

Le second objectif de notre étude a été de préciser le statut taxonomique des populations de lions à l'échelle de l'Afrique. Les résultats obtenus confirment la présence de deux lignées génétiquement différentes, à savoir une lignée Ouest/Centre et une lignée Est/Sud, déjà mises en évidence lors d'études antérieures. Cette distinction confirme que le statut taxonomique de *Panthera leo leo* serait à revoir et que les deux lignées, nettement différenciées, devraient constituer des unités de gestion distinctes en ce qui concerne leur conservation.

Enfin, cette étude a permis la comparaison des deux marqueurs moléculaires utilisés. Sur base des résultats obtenus, les marqueurs SNPs semblent être beaucoup plus fins que les microsatellites en ce qui concerne l'étude de la structure génétique du lion.

# LEXIQUE DES ABREVIATIONS

---

**ACP** : Analyse en Composantes Principales

**ADN** : Acide DésoxyRibonucléique (ou DNA)

**ADNmt** : ADN mitochondrial

**AMOVA** : Analyse Moléculaire de la Variance

**Ar** : Richesse allélique

**ARN** : Acide Ribonucléique

**CDV** : Canine Distemper Virus

**CITES** : Convention on International Trade of Endangered Species

**CLUMPAK** : Cluster Markov Packager Across K

**e.g.** : *exempli gratia*

**F<sub>IS</sub>** : coefficient de consanguinité

**FIV** : Feline Immunodeficiency Virus

**F<sub>CT</sub>** : indice de fixation entre les lignées

**F<sub>SC</sub>** : indice de fixation entre les populations/lignée

**F<sub>ST</sub>** : indice de fixation entre les populations

**GCA** : Game Controlled Area

**GR** : Game Reserve

**GBS** : Genotyping-By-Sequencing

**uH<sub>E</sub>** : Hétérozygotie attendue non biaisée

**H<sub>NB</sub>** : Hétérozygotie attendue non biaisée

**H<sub>O</sub>** : Hétérozygotie observée

**IBD** : Isolation-By-Distance

**IUPAC (code)** : International Union of Pure and Applied Chemistry

**K** : groupe génétique

**LCU** : Lion Conservation Unit

**Ma** : Million(s) d'années

**MCMC** : Markov Chain Monte Carlo

**mnMAF** : Minimum Allele Frequency

**N** : nombre d'individus

**N<sub>A</sub>** : nombre total d'allèles

**NGS** : Next-Generation-Sequencing

**NJ** : Neighbor Joining

**NP** : National Park

**OA** : Open Area

**P<sub>A</sub>** : nombre d'allèles privés

**pb** : paire(s) de bases

**PAC** : Problem Animal Control

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**p-value** : valeur de probabilité

**QS (Pred)** : Phred Quality Score

**RCA** : République Centrafricaine

**rpm** : rotation per minute

**SNP** : Single Nucleotide Polymorphism

**IUCN** : International Union for Conservation of Nature

**ZC** : Zone de chasse

**ZCV** : Zones Cynégétiques Villageoise

# LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

---

- Figure 1 :** Carte représentant le nombre d'espèces en danger sur la planète, allant de 0 espèces menacées (en bleu) à plus de 100 espèces menacées (en rouge). Source : Vignieri (2014). .....2
- Figure 2 :** Carte de la distribution géographique de *Panthera leo* en Afrique et en Inde selon les sous-espèces décrites par Hemmer, 1974 et Nowell and Jackson, 1996. (1 : *P. leo azandica*, 2 : *P. leo bleyenberghi*, 3 : *P. leo krugeri* et *P. leo melanochaita*, 4 : *P. leo nubica*, 5 : *P. leo persica*, 6 : *P. leo senegalensis*). (Source : Haas et al. 2005). .....7
- Figure 3 :** Carte représentant la possible distribution géographique actuelle de l'espèce *Panthera leo* (en rouge : zones possiblement éteintes, en jaune : zones actuellement occupées). Source : *Panthera and WCS 2016. Panthera leo*. (IUCN 2016).....8
- Figure 4 :** Représentation de l'estimation du nombre de lions selon Riggio et al. (2013) sur les différentes aires de répartition. .... 10
- Figure 5 :** Carte représentant les 5 LCUs de Tanzanie, à savoir : 19 : Serengeti Mara, 20 : Maasai Steppe, 23 : Ruaha-Rungwa, 24 : Selous et 66 : Dar-Biharamulo. Modifiée de *The IUCN SSC Cat Specialist Group (2006a)*. ..... 16
- Figure 6 :** Carte de la Tanzanie illustrant la localisation des 74 échantillons tanzaniens de cette étude..... 19
- Figure 7 :** Graphique représentant la structure ( $K=2$ ) identifiée au niveau continental, incluant 103 échantillons (Structure v.2.3.4) et réalisée sur base de 11 microsatellites. Chaque barre verticale représente un individu et chaque couleur représente sa probabilité d'appartenir à chacun des clusters identifiés..... 31
- Figure 8 :** Graphique issu de l'Analyse Factorielle des Correspondances (Genetix v.4.05) effectuée à l'échelle continentale sur base des 11 microsatellites de l'étude. En jaune : la lignée Ouest/Centre, en bleu : la lignées Est/Sud. .... 31
- Figure 9 :** Graphique représentant la structure ( $K=2$ ) observée au sein des 66 échantillons à l'échelle continentale d'après le programme Structure v.2.3.4 et sur base des 9 184 SNPs génotypés. Chaque barre verticale représente un individu et chaque couleur représente sa probabilité d'appartenir à chacun des clusters identifiés..... 32
- Figure 10 :** Graphique de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) réalisée sur base des 9 184 SNPs et illustrant les deux lignées structurant les 66 échantillons, analyse. En orange : lignée Ouest/Centre, en bleu : lignée Est, en orange/bleu : échantillons intermédiaires de République Centrafricaine. .... 32
- Figure 11 :** Courbes représentant l'évolution de la taille effective des populations au fil des générations de lions en Tanzanie (bleu) et au Burkina Faso (orange), selon les 9 184 SNPs de l'étude et grâce au logiciel SNeP v1.1..... 32
- Figure 12 :** Graphique obtenu à l'aide du programme CLUMPAK reflétant la structuration existant en Tanzanie. L'analyse a été effectuée sur base de 9,184 SNPs. Cluster 1 : zone sud-est, cluster 2 : zone nord et cluster 3 : zone sud-ouest. Chaque barre verticale représente un individu et chaque couleur représente sa probabilité d'appartenir à chacun des clusters identifiés. .... 33
- Figure 13 :** Graphique de l'ACP réalisée avec Tassel permettant de visualiser la structuration existant au sein des échantillons tanzanien ( $n=51$  et 9 184 SNPs). ..... 34
- Figure 14 :** Carte de la Tanzanie illustrant la répartition géographique des 66 échantillons analysés sur base des 9184 SNPs de l'étude, et structurés selon les 3 clusters définis..... 34

<b>Figure 15</b> : Courbe représentant l'évolution de la taille effective de la population Sud-Ouest (cluster 3) de Tanzanie au fil des générations de lions, selon les 9 184 SNPs de l'étude et grâce au logiciel SNeP v1.1.....	35
<b>Figure 16</b> : Secteurs graphiques représentant les pourcentages de variance moléculaire qui expliquent la variabilité génétique des 62 individus analysés sur base des 9 184 SNPs selon l'indice de fixation considéré $F_{CT}$ , $F_{SC}$ ou $F_{ST}$ .....	37
<b>Figure 17</b> : Représentation visuelle du tableau des $F_{ST}$ (tableau 8) réalisée avec le package « heatmap.plus » sur RStudio v.3.3.1 (R Core Team, 2016). Plus la couleur tend vers le rouge, plus les populations sont proches. ....	37
<b>Figure 18</b> : Corrélogramme représentant la moyenne des coefficients d'autocorrélation « r » en fonction des 18 classes de 50 en 50 km. Les tirets bleus représentent les valeurs moyennes de « r ». Les tirets rouges représentent les limites supérieure et inférieure de 95% de la distribution nulle, c'est-à-dire sans structure spatiale. Les barres d'erreur représentent 95% de l'intervalle de confiance pour « r ».....	38
<b>Figure 19</b> : Carte représentant la limite approximative qui distinguerait les lignées Ouest/Centre et Est/Sud (en jaune) et les 3 clades identifiés dans chacune des 2 lignées (en pointillés noirs) par Bertola et al. (2016). Modifié depuis Bertola et al. (2016). ....	41
<b>Figure 20</b> : Structure géographique des échantillons tanzaniens en fonction des 3 haplotypes identifiés pour la Tanzanie sur base de l'analyse des séquences de cyt b (ADNmt). En rouge : haplotype 2, en vert : haplotype 13 et en jaune haplotype 17 (Bertrand, 2013). ....	43
<b>Figure 21</b> : Carte de la Tanzanie représentant la localisation des cultures de maïs au sein du pays. Les 3 zones encadrées font référence aux 3 clusters identifiés sur base des 9,184 SNPs lors des analyses de structure. ....	45
<b>Figure 22</b> : Carte de la Tanzanie représentant les différences de densités humaines au sein du pays. Les 3 zones encadrées font référence aux 3 clusters identifiés sur base des 9,184 SNPs lors des analyses de structure. ....	45
<b>Tableau 1</b> : Résumé de quelques caractéristiques des 5 LCUs présentes en Tanzanie. En gris clair : aucun, en gris moyen : quelques-uns, en gris foncé : beaucoup, *** large, ** modérée, * faible. Source des données : The IUCN SSC Cat Specialist Group (2006a). ....	16
<b>Tableau 2</b> : Recette par échantillon pour la digestion avec l'enzyme HindIII.....	22
<b>Tableau 3</b> : Détail des 4 mix utilisés reprenant les 11 microsatellites avec leurs amorces F (forward) et R (reverse) décrites par Menotti-Raymond et al. (1999) pour <i>Felis catus</i> , les fluorochromes et la coloration qui leur sont associés, l'hétérozygotie et la taille théorique des allèles attendus.....	26
<b>Tableau 4</b> : Quantités de chacun des réactifs nécessaires par échantillon pour la réalisation de la PCR. Modifié à partir de Bertrand (2013). ....	27
<b>Tableau 5</b> : Etapes du programme PCR utilisé pour l'amplification des microsatellites, selon Bertrand (2013). ....	27
<b>Tableau 6</b> : Tableau récapitulatif des statistiques descriptives illustrant la variabilité génétique pour chaque lignée calculée à l'aide de Genetix v.4.05 ( $A_R$ , $H_O$ , $H_{NB}$ , $F_{IS}$ ) et de Genepop v.4.2 ( $N_A$ , $P_A$ ) estimée à partir des 11 microsatellites inclus dans la présente étude.....	36
<b>Tableau 7</b> : Résultats de l'analyse AMOVA réalisée avec Arlequin sur base des 9 184 SNPs et des lignées et populations identifiées à l'aide du logiciel Structure.....	36
<b>Tableau 8</b> : Pairwise $F_{ST}$ avec (*) p-value < 0,05, (**) p-value < 0,01 et (***) p-value < 0,001. ....	37
<b>Tableau 9</b> : Hétérozygoties et indices de consanguinité calculés avec GenAlex v.6.502 sur une base de données acceptant 9% de données manquantes parmi les SNPs génotypés, soit un nombre de 3 097 SNPs après réduction.....	38

# TABLE DES MATIERES

---

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>L'ESPECE <i>PANTHERA LEO</i>.....</b>	<b>5</b>
<b>1. ORIGINES ET TAXONOMIE.....</b>	<b>5</b>
1.1. <i>Position actuelle</i> .....	5
1.2. <i>Histoire phylogéographique du lion</i> .....	5
1.3. <i>Sous-espèces</i> .....	6
<b>2. REPARTITION GEOGRAPHIQUE .....</b>	<b>7</b>
2.1. <i>Distribution</i> .....	7
2.2. <i>Etat de la population</i> .....	8
2.2.1. <i>Evolution démographique</i> .....	8
2.2.2. <i>Recensements d'individus</i> .....	9
<b>3. ECOLOGIE : STRUCTURE SOCIALE, HABITAT ET MENACES .....</b>	<b>9</b>
3.1. <i>Structure sociale</i> .....	9
3.2. <i>Habitat</i> .....	10
3.3. <i>Augmentation de la densité humaine</i> .....	11
3.3.1. <i>Menace</i> .....	11
3.3.2. <i>Conséquences</i> .....	11
3.4. <i>Braconnage et conflit homme-animal</i> .....	12
3.4.1. <i>Menace</i> .....	12
3.4.2. <i>Conséquences</i> .....	12
3.5. <i>Causes naturelles</i> .....	14
<b>4. CONSERVATION .....</b>	<b>14</b>
4.1. <i>Zones de conservation</i> .....	14
4.2. <i>Lion Conservation Units</i> .....	15
4.3. <i>Améliorations face aux menaces de l'espèce</i> .....	16
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>18</b>
<b>1. MATERIEL UTILISE .....</b>	<b>18</b>
1.1. <i>Origines des échantillons</i> .....	18
1.1. <i>Extractions d'ADN</i> .....	18
1.2. <i>Quantifications d'ADN</i> .....	20
<b>2. GENOTYPAGE DES MARQUEURS MOLECULAIRES SNPs .....</b>	<b>20</b>
2.1. <i>Aperçu de la technique</i> .....	20
2.2. <i>Choix des échantillons et reconcentrations d'ADN</i> .....	21
2.2.1. <i>Prérequis pour la technique du GBS</i> .....	21
2.2.2. <i>Reconcentrations d'ADN</i> .....	21
2.3. <i>Préparation des échantillons et vérification des profils</i> .....	22
2.3.1. <i>Digestion à la RNase</i> .....	22
2.3.2. <i>Vérification des profils d'ADN par électrophorèse</i> .....	22
2.4. <i>Identification des SNPs</i> .....	22
2.4.1. <i>Filtrage et alignement des séquences</i> .....	23
2.4.2. <i>Identification et filtrage des sites polymorphes</i> .....	23

2.5. Analyses statistiques .....	24
<b>3. GENOTYPAGE DES MARQUEURS MICROSATELLITES.....</b>	<b>26</b>
3.1. Choix des microsatellites .....	26
3.1. Amplifications PCR et vérification .....	26
3.1.1. Amplification PCR .....	26
3.1.2. Electrophorèses .....	27
3.2. Génotypage des microsatellites .....	27
3.3. Analyses statistiques .....	28
<b>RESULTATS .....</b>	<b>29</b>
<b>1. IDENTIFICATION DES SNPs.....</b>	<b>29</b>
1.1. Filtrage et alignement des séquences.....	29
1.2. Identification des SNPs et filtrage.....	29
1.3. Tests préliminaires.....	30
1.3.1. Marqueurs microsatellites .....	30
1.3.2. Marqueurs SNPs .....	30
<b>2. STRUCTURE DE L'ECHANTILLONNAGE.....</b>	<b>30</b>
2.1. Sur base des microsatellites.....	30
2.1.1. Echelle continentale .....	30
2.1.1. Echelle nationale au sein de la Tanzanie.....	31
2.2. Sur base des SNP's.....	31
2.2.1. Echelle continentale .....	31
2.2.1. Echelle régionale .....	33
<b>3. DIVERSITE GENETIQUE.....</b>	<b>35</b>
3.1. Sur base des microsatellites.....	35
3.2. Sur base des SNP's.....	36
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>39</b>
<b>1. COMPARAISON DES 2 MARQUEURS UTILISES POUR CETTE ETUDE.....</b>	<b>39</b>
<b>2. STRUCTURATION ET DIVERSITE GENETIQUE DE L'ESPECE .....</b>	<b>40</b>
<b>3. PROPOSITIONS POUR LA CONSERVATION DU LION EN TANZANIE .....</b>	<b>46</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>51</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>61</b>



# INTRODUCTION

---

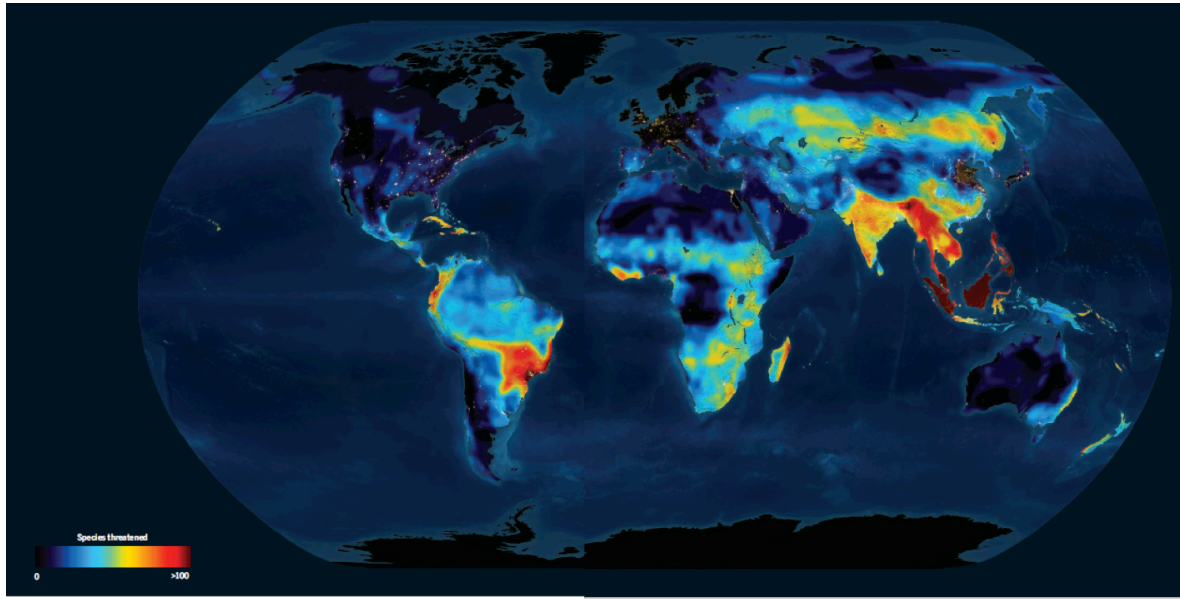
Notre planète a connu 5 grandes extinctions massives de la biodiversité ces 540 derniers millions d'années, la dernière ayant eu lieu il y a 65 millions d'années, marquée par la disparition des dinosaures lors de la crise Crétacé-Tertiaire. Ces extinctions ont eu la particularité d'être rapides à l'échelle des temps géologiques et d'éliminer à chaque fois entre 70% et 90% de la biodiversité alors installée. Cependant, une extinction massive a toujours permis par la suite l'émergence de nouvelles formes de vie et la colonisation de nouveaux espaces ; elles ont donc eu un rôle déterminant dans la diversification de la vie au cours du temps et ont en un sens contribué à la biodiversité que nous connaissons de nos jours.

Aujourd'hui, plusieurs études s'accordent à dire que nous vivons actuellement la 6<sup>ème</sup> extinction de masse (Ceballos et al., 2015). En effet, les populations de toutes les espèces auraient diminué en moyenne de 25% depuis ces derniers 500 ans. Et, si l'extinction qui est en cours est autant au centre des préoccupations, c'est parce que sa principale cause, contrairement aux cinq précédentes, est liée aux activités anthropiques. En effet, si les extinctions font partie de l'évolution naturelle de la vie sur Terre, on observerait actuellement un taux d'extinction 100 à 1000 fois supérieur (selon les avis) par rapport aux taux d'extinction naturels (Ceballos et al., 2015). En effet, des facteurs tels que le réchauffement climatique, l'explosion démographique de l'espèce humaine, l'expansion de l'agriculture et des élevages, la surpêche, la chasse ou encore le braconnage, ont un effet direct sur les écosystèmes : l'espace et les ressources que nous prenons sans cesse sont aussi nécessaires aux autres êtres vivants, qui n'ont alors d'autres choix que de subir la perte de leur milieu naturel, qui se rétrécit et se fragmente dangereusement. La taille de la population humaine serait passée de 1 milliard d'individus à 7 milliards en à peine 200 ans (<https://ourworldindata.org/>). Par exemple, l'illustration de la relation entre la démographie humaine et le nombre d'espèces menacées sur la Terre peut être visualisée grâce à la *figure 1*. Ainsi, les espèces s'éteignent progressivement parce que les écosystèmes disparaissent et inversement. Tous les continents sont plus ou moins touchés par ces causes directes, bien que les régions les plus touchées se situent actuellement sur les continents africain, asiatique et sud-américain. Or il se trouve que ces continents abritent la majorité de la biodiversité planétaire. De plus, ils sont souvent associés à des espèces-phares, motrices de tourisme et de conservation.

## **L'Afrique, une arche de biodiversité**

Le continent africain possède ainsi ses propres espèces-phares, dont certaines sont connues à travers le nom de « Big Five », un ensemble de 5 mammifères africains mis en relief par les autorités touristiques, qui comprend le léopard, le buffle, le lion, l'éléphant et le rhinocéros. Le fait que le lion soit repris dans les cinq « Big Five » permet d'obtenir une certaine écoute afin de mettre en place des mesures de conservation : en effet, en plus d'être un animal emblématique de l'Afrique, favorisant le tourisme, il est aussi très important d'un point de vue économique pour sa chasse. Il fait également partie de la chaîne des grands prédateurs et joue ainsi un rôle dans l'écologie de son milieu naturel. Or le lion fait partie des espèces africaines dont les populations ont

diminuées drastiquement ces dernières années et qui font face à une sérieuse fragmentation de leur milieu naturel (Chardonnet, 2002; Nowell and Jackson, 1996).



**Figure 1** : Carte représentant le nombre d'espèces en danger sur la planète, allant de 0 espèces menacées (en bleu) à plus de 100 espèces menacées (en rouge). Source : Vignieri (2014).

Le statut « vulnérable » auquel l'IUCN a indexé l'espèce n'en fait pas une des espèces les plus menacées à l'heure actuelle. En effet, les mesures de conservation du lion étant différentes à travers le continent africain, ce statut reflète l'état total et non régional des populations, qui s'avère être alarmant dans certains pays. La biologie de la conservation, en s'appuyant sur des données génétiques, permettrait d'établir la situation génétique de l'espèce en Afrique, à plusieurs échelles, dans le but de soutenir des actions de conservation plus adaptées et ciblées.

En effet, si une espèce en déclin voit son nombre d'individus chuter, il s'en suit également une perte importante de sa diversité génétique. Celle-ci est normalement entretenue grâce aux échanges génétiques entre les individus et permet l'établissement de processus évolutifs permettant de s'adapter à leur environnement. Ces échanges ne sont possibles qu'avec un nombre minimum acceptable d'individus et lorsque ces individus peuvent se déplacer dans le milieu naturel entre les différentes populations. Une diminution des effectifs d'une espèce et la fragmentation de son habitat auront ainsi un impact direct sur sa diversité génétique. Cette diminution de la diversité génétique conduira elle-même à la diminution de la fitness (ou valeur sélective) des populations c'est-à-dire que la proportion d'individus hétérozygotes diminuera (e.g. perte ou fixation d'allèles) en faveur de l'augmentation en individus homozygotes. Ce processus peut conduire progressivement au phénomène de dépression de consanguinité qui, a terme, peut contribuer à l'extinction de l'espèce (Lacy, 1997; O'Brien, 1994). En effet, avec une faible diversité génétique, les individus ne sont plus aptes à s'adapter efficacement à leur environnement et deviennent fragiles face aux éventuelles menaces de leur milieu (e.g. changement climatique, épidémies) (Trinkel et al. 2011; Trinkel et al. 2010; Packer et al. 1990 in Haas et al. 2005). Par ailleurs, la consanguinité modifie souvent les performances reproductrices et nuit ainsi à la bonne perpétuité de l'espèce (Lacy 1997; Munson et al. 1996; Brown et al. 1993 in Haas et al. 2005). Les effets de la consanguinité ont également été observés chez les lions : Stephen

O'Brien (1994) a ainsi démontré, lors d'une étude effectuée sur 3 populations de lions, que plus la population était restreinte, moins les individus présentaient de variabilité génétique, de testostérone et de spermatozoïdes viables. Actuellement, la variabilité génétique de l'espèce n'est pas uniforme :

- Les populations d'Inde et d'Afrique centrale et de l'ouest, sont très réduites et fragmentées, et sont souvent victimes d'une mauvaise gestion des espaces protégés et de menaces non contrôlées (e.g. harcèlement par les éleveurs). Il en résulte une diminution importante de leur variabilité génétique ;

- Les populations du Sud et de l'Est de l'Afrique, bénéficient au contraire d'une meilleure gestion, favorisant des effectifs plus importants et une diversité génétique significativement meilleure. Ces populations seraient cependant divisées en plusieurs sous-groupes à l'échelle régionale ayant peu de contacts entre eux. Antunes et al., (2008); Dubach et al., (2013); O'Brien, (1994); Spong et al., (2002) ont ainsi démontré l'existence de plusieurs sous-populations génétiquement différenciées au sein de la région Sud-Est de l'Afrique, et parfois au sein d'une même aire protégée (e.g. Parc National du Serengeti, Zone de Conservation du Ngorongoro). Ces travaux démontrent l'impact de la fragmentation de l'habitat au sein d'une même région. Aussi, si la mobilité connue de l'espèce permettait aux individus de se déplacer et d'échanger entre eux, les conditions actuelles pourraient instaurer des microévolutions spécifiques aux endroits où sont confinés les lions, et induire une forte pression de sélection qui n'était pas présente jusqu'à maintenant dans l'évolution de l'espèce (Yamaguchi et al., 2004).

### **Les outils génétiques pour étudier la biodiversité**

Les études relevant du domaine de la génétique de la conservation appliquent les grandes lois de la génétique à travers des techniques biomoléculaires d'analyse de l'ADN, afin de maintenir la biodiversité planétaire (O'Brien, 1994). Mais les résultats peuvent varier selon la méthode employée et la structure génétique de l'échantillonnage ; les statuts et stratégies de conservation qui en ressortent ne sont donc pas toujours adaptés à la réalité *in situ*. La génétique de la conservation s'appuie sur deux disciplines complémentaires : la phylogéographie et la génétique des populations. La phylogéographie permet d'étudier la structure et les liens de parenté des différentes populations génétiques d'une espèce dans l'espace et dans le temps afin d'en retracer son histoire à travers les événements passés (e.g. changements climatiques). Cette discipline apporte donc des informations quant à l'histoire évolutive d'une espèce depuis son origine jusqu'à son aire de répartition actuelle (O'Brien, 1994). La génétique des populations, elle, permet d'étudier l'état de santé génétique d'une population par l'étude de la transmission des caractères génétiques des individus dans les conditions naturelles de leur environnement, c'est-à-dire sous l'influence de pressions évolutives (e.g. sélection naturelle, dérive génétique, mutation, migration). De son côté, cette discipline apporte donc des informations quant à la structure génétique de l'espèce, aux changements de fréquence des allèles (état de sa diversité) et au flux génique avec les autres individus (O'Brien, 1994). Les changements de fréquence des allèles sont déterminants dans le processus évolutif, en effet la fixation ou la perte de certains allèles peut conduire à des modifications génétiques d'une population ; si ces changements s'avèrent nombreux et au sein de plusieurs populations, cela peut conduire au processus de spéciation. Ainsi, cette discipline est basée sur la loi d'Hardy-Weinberg qui stipule qu'au sein d'une population idéale les fréquences allélique et génotypique sont stables d'une génération à une autre. Le terme « population idéale »

fait appel à 5 conditions à respecter : une population vaste, non soumise à la sélection, à la mutation ou à la migration, et où règne la panmixie (croisements au hasard). On parle alors de population à l'équilibre. Mais comme cet équilibre concerne une population sans pression sélective, et que ce n'est jamais le cas dans la réalité, le fait de comparer les données d'un échantillonnage avec l'équilibre d'Hardy-Weinberg permet de calculer sa structure génétique.

Si la phylogéographie et la génétique des populations sont les deux piliers de la génétique de la conservation, les outils moléculaires utilisés pour les analyses ont aussi leur importance dans le type de résultat obtenu : en effet, on peut parfois observer des incongruences entre les marqueurs moléculaires utilisés. Les marqueurs les plus connus pour les analyses en génétique sont l'ADN mitochondrial et les marqueurs microsatellites. L'ADN mitochondrial présente l'avantage d'être transmis de manière matrilineaire et sans recombinaison (Avisé et al., 1987). Il permet ainsi de retracer des histoires évolutives sur de longues périodes, mais uniquement d'un point de vue maternel. De plus, il possède un haut polymorphisme intraspécifique dû à son taux de mutation élevé, permettant de suivre l'évolution des populations au sein d'une espèce (Avisé et al., 1987). Les microsatellites, eux, sont de petites séquences d'ADN, caractérisées par de très nombreuses répétitions de nucléotides en tandem. Ces séquences sont non codantes et sont très souvent modifiées suite à des erreurs lors de la réplication de l'ADN. Les microsatellites évoluent donc très vite et sont un outil sensible pour étudier des individus inter- et intrapopulation, ou encore des liens de parenté, ici la transmission n'étant pas seulement matrilineaire. Beaucoup d'études associent des analyses combinées avec ces deux marqueurs moléculaires (Antunes et al., 2008; Dubach et al., 2013; Heller et al., 2008; Lorenzen et al., 2007; Smitz et al., 2014, 2013). Il existe aujourd'hui un 3<sup>ème</sup> type de marqueur moléculaire, peu répandu dans les études de génétiques car encore très récent : les Single Nucleotide Polymorphism (ou SNP). Ce polymorphisme ne concerne la variation que d'une seule paire de base dans le génome d'individus appartenant à la même espèce. Ce sont des polymorphismes très fréquents et présents partout dans le génome. Ils peuvent ainsi résulter de changements génétiques intraspécifiques récents dans le temps (Brumfield et al., 2003).

### **Objectifs du mémoire**

L'étude effectuée dans le cadre de ce mémoire porte sur l'étude de la structuration génétique des populations de lions de Tanzanie et d'Afrique de l'Ouest à l'aide d'outils génomiques. Les deux outils choisis ont été les marqueurs microsatellites et les marqueurs SNPs. Ces marqueurs ont été utilisés sur un échantillonnage comportant 104 individus, répartis sur l'Afrique de l'ouest, du centre, de l'est et du sud. Un focus a été effectué sur la Tanzanie où 74 échantillons ont été collectés. Les travaux portés sur la Tanzanie s'inscrivent dans le cadre du protocole d'accord entre la Wildlife Division, du Ministère des Ressources Naturelles et du Tourisme de Tanzanie, et la fondation IGF, en partenariat avec le Tanzania Wildlife Research Institute (TAWIRI).

Ainsi les objectifs du présent travail ont été (i) de revoir les relations phylogénétiques et le statut taxonomique des populations de lions à l'échelle de l'Afrique, (ii) d'étudier la diversité génétique des individus en Tanzanie afin d'évaluer leur degré de différenciation, (iii) de quantifier la consanguinité au sein des populations fragmentées et d'en mesurer les risques, et enfin (iv) d'établir une comparaison entre les deux outils moléculaires utilisés, à savoir les microsatellites et les SNPs, sur base des résultats obtenus.

# L'ESPECE *PANTHERA LEO*

---

## 1. ORIGINES ET TAXONOMIE

### 1.1. Position actuelle

L'espèce *Panthera leo*, appelée communément « lion », fait partie de la classe des mammifères et de l'ordre des carnivores. Dans la famille des *Felidae*, elle est une des cinq espèces de grands félins qui composent le genre *Panthera* avec le tigre (*Panthera tigris*), le léopard (*Panthera pardus*), le jaguar (*Panthera onca*) et la panthère des neiges (*Panthera uncia*) (Davis et al., 2010). Un des caractères distinctifs de l'espèce par rapport aux quatre autres est la présence d'un dimorphisme sexuel (les mâles adultes sont caractérisés par le port d'une crinière) (Guggisberg 1975 in Yamaguchi et al. 2004) et d'une queue touffue à son extrémité (caractère partagé par les 2 sexes, à partir de 7 mois) (Rudnai 1973 in Haas et al. 2005).

### 1.2. Histoire phylogéographique du lion

Le Pléistocène est marqué par plusieurs grands changements climatiques qui ont façonné l'environnement et modelé la distribution des grands mammifères (e.g. migration, extinction ou spéciation par dérive génétique), notamment en Afrique (Lorenzen et al., 2012). En effet, ces événements, principalement dus aux oscillations de l'orbite terrestre, ont induit une alternance de périodes humides et de périodes sèches, de périodes froides et de périodes chaudes (DeMenocal, 1995). Lors des événements majeurs du Pléistocène, la faune africaine a su se préserver dans 4 zones refuges, à savoir une à l'Ouest, une à l'Est, une au Sud-Ouest et enfin une au Sud (Lorenzen et al., 2012, 2007; Smitz et al., 2013). A plusieurs époques du Quaternaire, une barrière biogéographique majeure composée d'une forêt équatoriale dense est apparue et a littéralement coupé le continent africain en deux, isolant l'Ouest et le Centre de l'Afrique, des régions situées à l'Est et au Sud. Si les périodes humides ne rendaient que plus dense cette forêt, les périodes sèches permettaient au contraire les échanges par une ouverture à l'Est de la ceinture (Lorenzen et al., 2012). Ainsi, les populations animales ont totalement été séparées durant de longues périodes, ce qui a permis un phénomène de différenciation propre à chaque côté de la ceinture équatoriale (Bertola et al., 2016). Ce phénomène a visiblement modelé la structure génétique de nombreuses espèces de la grande faune africaine, et le lion ne semble pas déroger à cette règle, en fonction des dernières études génétique effectuées sur l'espèce.

Plusieurs études récentes tendent ainsi à démontrer que *Panthera leo* serait divisée en deux lignées : une Ouest/Centre et une Est/Sud (Bertola et al. 2011). *Panthera leo* serait en fait apparue en Afrique il y a plusieurs millions d'années, le plus ancien fossile retrouvé datant de 3,5 Ma, en Tanzanie (Turner and Antón, 1997 in Haas et al. 2005; Barry 1987 in Yamaguchi et al. 2004). A partir de là, elle se serait étendue en Europe et en Asie (Yamaguchi et al., 2004). Les premiers fossiles européens, trouvés en France, dateraient de 900 000 ans (Pléistocène moyen) avec la description de la sous-espèce *Panthera leo fossilis* (Turner and Antón 1997 in Haas et al. 2005; Burger et al. 2004). C'est de cette sous-espèce que dériverait *Panthera leo spelaea*, répartie dans le Nord et l'Ouest de l'Europe il y a environ 300 000 ans. Cette sous-espèce aurait perduré

jusqu'au Pléistocène tardif, il y a environ 10 000 ans, avant de s'éteindre suite aux conséquences de la dernière glaciation (Burger et al., 2004; Haas et al., 2005). Une sous-espèce a également vécu sur le continent américain, *Panthera leo atrox*. Sa distribution s'étendait du Canada au Pérou pendant le Pléistocène jusqu'à son extinction définitive il y a 10 000 ans. Cette espèce serait voisine de *Panthera leo spelaea* dont des individus auraient été isolés lors de la 3<sup>ème</sup> glaciation du Pléistocène (Illinoien) au niveau du détroit de Béring. Ils se seraient ensuite dispersés à travers le Nord du continent américain (Barnett et al., 2009; Yamaguchi et al., 2004). Même si le statut de ces différentes sous-espèces n'est pas reconnu à l'unanimité, on observe, de manière générale, que les différentes populations de lions dans le monde auraient subi un étranglement (ou « bottleneck ») et que seule la population africaine aurait persisté. Elle serait donc l'origine unique à partir de laquelle la population de lions moderne serait issue (Barnett et al., 2006a, 2006b; Yamaguchi et al., 2004). Plus précisément, des études phylogéographiques montrent que les ancêtres du lion actuel seraient originaires du Sud-Est de l'Afrique (Antunes et al., 2008; Barnett et al., 2006a, 2006b). Il a été estimé que l'ancêtre commun le plus récent au lion moderne date de 245 000 ans, période où la ceinture de forêt équatoriale a été à son maximum suite à une grande période de mousson (Bertola et al., 2016).

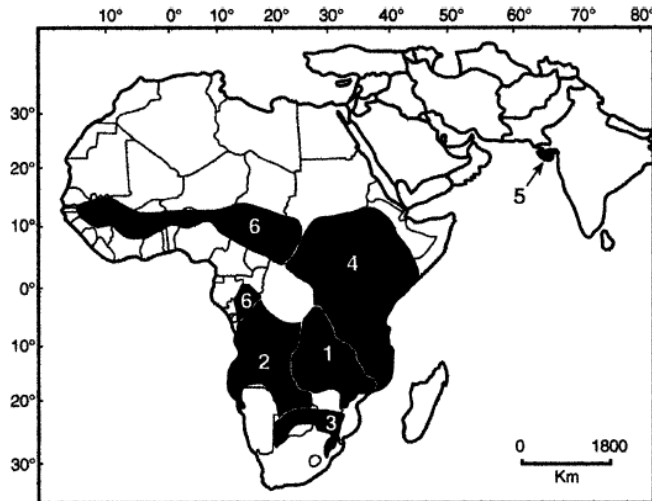
### 1.3. Sous-espèces

Pendant longtemps et aujourd'hui encore, deux sous-espèces ont été reconnues pour diviser l'espèce *Panthera leo* : *Panthera leo leo*, regroupant les lions d'Afrique et *Panthera leo persica*, regroupant les lions d'Asie. Cependant, un total de douze sous-espèces ont été décrites et reconnues depuis l'Holocène. Mais les caractéristiques utilisées pour la description de ces sous-espèces étaient trop variables (e.g. morphométrie, crinière), et seules huit sont actuellement vraiment acceptées (Barnett et al. 2006a; Burger et al. 2004; Hemmer 1974 in Haas et al. 2005) ; à savoir : *P. leo leo* (ou lion de Barbarie, de l'Atlas), *P. leo persica* (ou lion asiatique, d'Inde), *P. leo senegalensis* (ou lion de l'ouest africain, du Sénégal), *P. leo nubica* (ou lion de l'est africain, de Tsavo ou Massai), *P. leo azandica* (ou lion du nord-est africain, du Congo), *P. leo bleyenberghi* (ou lion du sud-ouest africain, de Katanga), *P. leo krugeri* (ou lion du sud-est africain, de Transvaal) et *P. leo roosevelti* (ou lion éthiopien, d'Addis Ababa). *P. leo melanochaita*, décrite comme la sous-espèce de la région du Cap, pourrait être invalide pour certains (Barnett et al., 2006b), ou du moins éteinte (Christiansen, 2008). Le lion de Barbarie est aujourd'hui éteint à l'état sauvage (Black et al., 2013; Haas et al., 2005), et le lion éthiopien n'existe qu'en captivité (Bruche et al., 2013) (figure 2).

Récemment, une nouvelle révision de la taxonomie du lion a été effectuée. Elle a confirmé le statut de la sous-espèce *P. leo persica* pour les populations asiatiques. Mais les six autres sous-espèces d'Afrique subsaharienne ne se distinguant pas nettement ont été regroupées dans la sous-espèce *Panthera leo leo*. Plus récemment encore, et à l'appui d'études génétiques, les lions d'Afrique ont plutôt été répartis en deux lignées : les lions d'Afrique centrale se sont montrés être proches des lions de l'ouest, et les lions du sud se sont montrés être proches des lions de l'est (Bertola et al., 2016, 2015, 2011).

De manière surprenante, il semblerait que la lignée Ouest/Centre soit plus apparentée au lion asiatique *P. leo persica* par rapport à la lignée Sud/Est (Antunes et al., 2008; Bertola et al., 2016, 2011). Ceci serait expliqué par une extinction des lions de la lignée Ouest/Centre au Pléistocène tardif, où les conditions climatiques de l'ouest





**Figure 2** : Carte de la distribution géographique de *Panthera leo* en Afrique et en Inde selon les sous-espèces décrites par Hemmer, 1974 et Nowell and Jackson, 1996. (1 : *P. leo azandica*, 2 : *P. leo bleyenberghi*, 3 : *P. leo krugeri* et *P. leo melanochaita*, 4 : *P. leo nubica*, 5 : *P. leo persica*, 6 : *P. leo senegalensis*). (Source : Haas et al. 2005).

africain étaient alors très arides ; la région aurait ensuite été recolonisée par les individus ayant trouvé refuge au Moyen-Orient (Bertola et al., 2011). Concernant la lignée Sud/Est, deux groupes semblent se distinguer entre l'ouest et l'est de la grande vallée du Rift : les lions à l'est du Kenya (*P. leo nubica*) seraient plus proches génétiquement des lions d'Afrique du Sud (*P. leo krugeri*) que les lions à l'ouest du Kenya (Antunes et al., 2008; Barnett et al., 2006a; Dubach et al., 2005).

Enfin, en fonction des dernières données génétiques (Barnett et al., 2014; Dubach et al., 2013), le SSC Cat Specialist Group (IUCN) a proposé deux sous-espèces pour répartir les lions de l'espèce *Panthera leo* : *Panthera leo leo* pour les individus d'Asie et d'Afrique du nord, de l'ouest et du centre ; et *Panthera leo melanochaita* pour les individus du sud et de l'est de l'Afrique. Cependant, comme cette distinction taxonomique est toujours à l'état de proposition, les sous-espèces actuellement utilisées restent *P. leo leo* et *P. leo persica*.

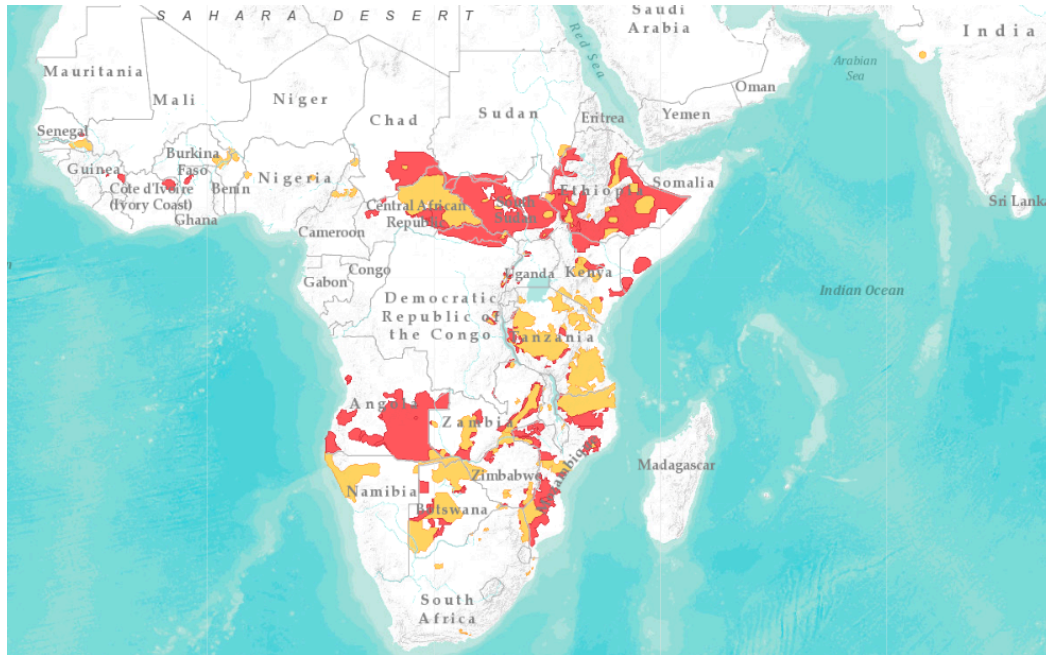
## 2. REPARTITION GEOGRAPHIQUE

### 2.1. Distribution

Au Quaternaire, l'espèce *Panthera leo* était largement étendue : elle se trouvait dans toute l'Afrique, dans le Sud-Est de l'Europe, au Moyen-Orient, en Asie et aux Amériques. C'est l'espèce qui présente la plus grande distribution de l'histoire après l'espèce humaine (Yamaguchi et al., 2004). La présence de l'espèce en Europe et en Amérique a duré jusqu'au Pléistocène tardif. L'extinction du lion en Europe de l'est remonte à 2 000 ans et a pour cause le développement des forêts denses (Guggisberg 1961 in Haas et al. 2005) et la chasse par les hommes. Jusqu'au début du XX<sup>ème</sup> siècle, le lion était largement réparti dans le Sud-Ouest de l'Asie, notamment dans plusieurs états d'Inde, mais le développement de l'agriculture intensive et la chasse ont diminué drastiquement leur population (Chellam and Johnsingh 1993 in Haas et al. 2005). Ainsi, avant les activités anthropiques, l'espèce *Panthera leo* était encore répartie de manière homogène en Afrique et en Asie du sud-ouest (Yamaguchi et al., 2004).

Aujourd'hui, en ce qui concerne le continent africain, l'espèce se retrouve uniquement en Afrique sub-saharienne (sauf dans les forêts du Congo), les populations du Nord de l'Afrique et de la région du Cap étant éteintes (Christiansen, 2008; Haas et al., 2005). En ce qui concerne le continent asiatique, les derniers individus existants sont confinés sur 1412 km<sup>2</sup> dans le Parc National (258 km<sup>2</sup>) et Wildlife Sanctuary (1153 km<sup>2</sup>) de la Forêt du Gir (état de Gujarat, en Inde). Même s'il ne s'agit que d'une seule

population, elle serait divisée en 4 aires de répartition dont une seule se trouverait en zone protégée. Riggio et al. (2013) a recensé 67 lieux de présence du lion en Afrique subsaharienne, représentant 3,4 millions de km<sup>2</sup>, soit 17% de leur surface de répartition ancestrale. Cependant, d'après l'IUCN, les populations d'environ 52% de cette surface seraient probablement éteintes. L'espèce ne survivrait ainsi que sur 1,65 millions de km<sup>2</sup> du territoire africain, soit à peine 8% de leur surface de répartition ancestrale (*figure 3*). Même si la surface occupée actuellement par le lion en Afrique se montre assez fragmentée (particulièrement en Afrique de l'ouest et centrale ; voir carte en *annexe 1*) (Bauer, 2003; Chardonnet, 2002; Henschel et al., 2014, 2010), l'IUCN ne place pas l'espèce en situation de fragmentation sévère.



**Figure 3** : Carte représentant la possible distribution géographique actuelle de l'espèce *Panthera leo* (en rouge : zones possiblement éteintes, en jaune : zones actuellement occupées). Source : Panthera and WCS 2016. *Panthera leo*. (IUCN 2016).

## 2.2. Etat de la population

### 2.2.1. Evolution démographique

Afin d'estimer le nombre d'individus de la population actuelle de l'espèce *Panthera leo*, l'IUCN a établi le recensement de 46 sous-populations (Bauer et al., 2015) de lions en Afrique et d'une sous-population en Inde. Les résultats de cette étude ont montré une possible diminution du nombre d'individus de 62% entre 1993 et 2014 pour les régions Ouest/Centre/Est de l'Afrique regroupant 11 pays différents. Au contraire, les 6 populations de la région Sud seraient plutôt stables avec un déclin de seulement 11%. Cette stabilité ne serait cependant pas homogène, avec, par exemple, un déclin de 46% de la population de lions dans l'Okavango (Botswana). La sous-population d'Inde montrerait une bonne stabilité depuis 1993 dans la réserve de la forêt du Gir (zone clôturée) avec même une expansion de plus de 400% des populations « satellites » situées autour de la zone protégée. Cette augmentation serait notamment due au retour d'une bonne densité de proies dans la région (Singh and Gibson, 2011).

Ainsi, même si le nombre d'individus est actuellement en déclin de manière générale (Bauer et al., 2015; Brugière et al., 2015), on observe une évolution différente selon la sous-population considérée et le statut de l'espèce au sein de l'IUCN reste ainsi classé « vulnérable ». En effet, en ce qui concerne les lions d'Afrique (excepté au sud de l'Afrique), le déclin observé est d'environ 60%, ce qui placerait ces populations en statut « en danger » au sein de la liste rouge de l'IUCN, voire « en danger critique » pour les individus de l'Ouest qui ont aujourd'hui perdu 99% de leur aire de répartition ancestrale (Henschel et al., 2014). Au contraire, les lions du sud de l'Afrique (Botswana, Namibie, Afrique du Sud et Zimbabwe) et d'Inde montrent plutôt une hausse de la population et viennent contrebalancer ce déclin. La population d'Inde reste classée « en danger » car même si on observe une bonne stabilité dans le Parc National de la forêt du Gir ces dernières années, le faible nombre d'individus qui la constitue justifie ce statut.

### 2.2.2. *Recensements d'individus*

Les recensements de lions sont rares ou imprécis, il est donc difficile de retracer leur évolution démographique. Mais dans les années 2000, deux études ont permis de chiffrer la population de lions. La première a estimé une population moyenne de 39 000 individus (extrêmes de 29 000 à 47 000) en Afrique, dont 14 432 en Tanzanie (Chardonnet, 2002). La deuxième estimait plutôt une population moyenne de 23 000 individus (extrêmes de 16 500 à 30 000) en Afrique, dont 7 073 en Tanzanie (Bauer and Van Der Merwe, 2004). Au niveau de la Tanzanie, une troisième étude propose une estimation de 16 800 individus, dont 13 600 se trouveraient dans des zones protégées (Mésochina et al., 2010).

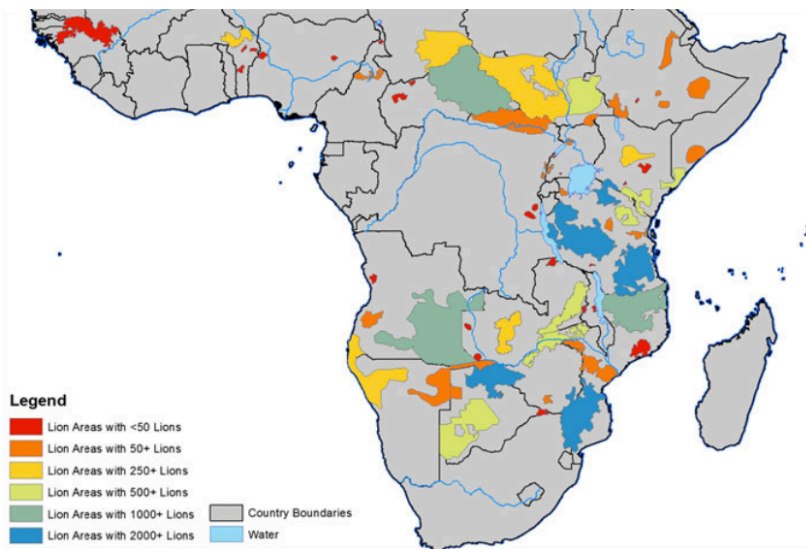
De son côté, la Liste Rouge de l'IUCN a estimé l'évolution du nombre d'individus depuis 1993. De manière générale, le nombre d'individus que comprend l'espèce serait passé de 9 615 (dont 312 en Asie) en 1993 à 7 455 (dont 445 en Asie) en 2014. Ils ont aussi estimé une tendance démographique à partir de deux recensements distincts effectués au cours de ces 12 dernières années sur les 47 sous-populations monitorées. En appliquant cette tendance aux études de Chardonnet (2002) et de Bauer & Van Der Merwe (2004), l'IUCN pencherait pour une population totale située autour de 20 000 individus plutôt qu'au-dessus de 30 000 individus.

Cependant, une étude récente de recensement de la présence du lion en Afrique subsaharienne (Riggio et al., 2013) a estimé une population totale de 32 000 individus sur les 67 aires étudiées (*figure 4*) et semblerait être la plus fiable à l'heure actuelle.

## 3. ECOLOGIE : STRUCTURE SOCIALE, HABITAT ET MENACES

### 3.1. Structure sociale

Les lions vivent en groupe, sous forme de « troupe », ils sont les plus sociaux des félins sauvages. L'organisation sociale la plus commune consiste en une troupe ayant une unité de femelles matrilineaires, agissant tel un socle, où les femelles adultes et des autres membres de la troupe (Haas et al., 2005). La cohésion est telle que les femelles de troupes différentes ne sont pas tolérées (Schaller, 2009). Cette troupe est dite polygyne territoriale, c'est-à-dire qu'elle est fondée sur un harem de femelles, occupant un territoire défini, et monopolisé tour à tour par des mâles. Il n'y a pas de dominance entre les femelles puisque leur organisation repose sur la coopération (e.g. chasse organisée, synchronicité des oestrus, partage des soins des petits).



**Figure 4** : Représentation de l'estimation du nombre de lions selon Riggio et al. (2013) sur les différentes aires de répartition.

Au sein de cette structure polygyne se retrouve généralement un seul mâle dominant (voire plusieurs dans certains cas) dont le rôle est d'exclure tout autre mâle, ou prédateur, du territoire de la troupe. La rotation des mâles dominants se fait lors de combats en duel, où soit le mâle défié garde sa place en gagnant le combat, soit le mâle défié est chassé de la troupe en cas de défaite, laissant alors la dominance au mâle vainqueur. Toujours dans ce fonctionnement, les lionceaux mâles approchant de leur maturité sexuelle, c'est-à-dire vers l'âge de 2 ou 3 ans, sont chassés de la troupe par le mâle dominant, qui les considère alors comme des compétiteurs potentiels (Grinnell et al., 1995; Schaller, 2009). De plus, ce comportement permet d'éviter la consanguinité au sein de la troupe, puisque les autres membres ne partent pas. Ainsi, la composition du harem ne change que lorsqu'un nouveau mâle succède à un autre, ou que les lionceaux mâles quittent la troupe (Schaller, 2009). Cependant, la troupe peut être divisée en sous-groupes de taille et de composition variables, caractérisés par des phénomènes de fission-fusion assez fréquents (Mosser and Packer, 2009). La dimension de la troupe peut aller de 3 à 30 individus, comprenant 1 à 18 femelles et 1 à 9 mâles (Haas et al., 2005; Mosser and Packer, 2009; Packer et al., 1991); mais généralement un groupe comprend 5 à 6 femelles, leurs petits des deux sexes et 1 à 2 mâles (Schaller, 2009). Lorsque plusieurs mâles coexistent dans la troupe, on parle de coalition temporaire.

### 3.2. Habitat

Une troupe de lions occupe un territoire défini, protégé par ses membres et délimité par des marquages olfactifs et des rugissements (Haas et al., 2005). Le mâle surveille la venue d'intrus en patrouillant le long des frontières du territoire et a pour rôle de les chasser. En effet, son physique fort et imposant favorise la défense, mais tous les membres peuvent participer à la protection du territoire (Haas et al., 2005). Ce dernier peut être de superficie très variable selon l'environnement et la taille de la troupe, s'étalant ainsi de 20 à 500 km<sup>2</sup>; cependant, il est en moyenne d'environ 50 km<sup>2</sup> (Haas et al., 2005). Cette espèce tolère une grande gamme d'habitats, à l'exception des forêts tropicales et du désert du Sahara (Haas et al., 2005; Nowell and Jackson, 1996). Des individus ont même été trouvés à plus de 4 000 m d'altitude dans les hauteurs du Mont Kilimandjaro, en Tanzanie, et dans les hauteurs du Mont Balé, en Ethiopie (IUCN, 2016). Néanmoins, l'habitat qui lui est le plus favorable reste la savane boisée, notamment car c'est là que les conditions de chasse y sont optimales. Le lion peut adapter son territoire selon les conditions pendant l'année, par exemple lors d'un changement de saison ou de la variation en densité de proies. Sur ce territoire, tous les

animaux peuvent représenter une proie potentielle. En effet, le lion étant un prédateur avec une bonne technique de chasse, organisée en coalition ou non, il peut s'attaquer à tous types de proies. Si les gnous, les antilopes et les zèbres figurent parmi les proies plus chassées, ils n'hésitent pas à s'attaquer à des proies plus imposantes telles que les buffles, les girafes ou les éléphants lorsqu'ils sont assez nombreux (Haas et al., 2005; IUCN, 2016). Ils se nourrissent également de carcasses qu'ils prennent à d'autres charognards, tels que les hyènes ; en effet, les charognes peuvent représenter jusqu'à 50% de leur alimentation (Haas et al., 2005).

En Inde, le lion occupe un habitat légèrement différent puisqu'il s'agit principalement de forêts d'arbres à feuilles caduques qui, du à la pratique de la sylviculture dans l'état de Gujarat, se trouvent être principalement des teks (Haas et al., 2005; Nowell and Jackson, 1996). Même si la superficie que couvrait la forêt a diminué de plus de moitié depuis le début du siècle, l'aire que couvre la forêt actuellement comprend notamment le Parc National du Gir et le Wildlife Sanctuary et caractérise donc le type d'habitat de *P. l. persica* (Nowell and Jackson, 1996). Ces aires forestières sont entourées de cultures, d'élevages et des populations humaines qui y s'en occupent (Meena et al., 2014). Par conséquent, même si la proie naturelle du lion d'Inde se trouve être le Cerf axis (Chellam and Johnsingh 1993; Khan 1990 *in* Haas et al. 2005), une bonne partie de son alimentation provient du bétail environnant son territoire.

### **3.3. Augmentation de la densité humaine**

#### ***3.3.1. Menace***

L'explosion démographique humaine, notamment en Afrique, nécessite une grande quantité de terres ces dernières années. En effet, en plus de la superficie nécessaire à la formation de villes et de villages, l'espace naturel qui a le plus été réquisitionné avait pour but d'établir des cultures et des élevages. La démographie humaine ne diminuant toujours pas en Afrique, les territoires sauvages continuent de diminuer actuellement.

#### ***3.3.2. Conséquences***

L'occupation de ces terres par les hommes a pour conséquence de faire reculer les territoires des animaux sauvages, qui font alors face à une perte d'habitat sévère et à sa fragmentation progressive. Comme tous les animaux sont concernés par cette perte d'habitat, cela conduit également à une diminution de la densité en proies, notamment pour le lion. En effet, on observe que les régions où les populations de lions ont le plus diminué sont également celles avec les plus fortes densités humaines (Packer et al., 2013). Par exemple, on peut citer pour la région Centre/Ouest des densités humaines variant de 78 personnes/km<sup>2</sup> (Bénin) à 57/km<sup>2</sup> (Burkina Faso). Pour la région Est, les densités sont également élevées avec 67/km<sup>2</sup> (Kenya), 48/km<sup>2</sup> (Tanzanie) ou encore 137/km<sup>2</sup> (Ouganda). En revanche, la région Sud présente des densités beaucoup plus basses avec par exemple 2,5/km<sup>2</sup> (Namibie), 45/km<sup>2</sup> (Zambie) et 3,4/km<sup>2</sup> (Botswana).

La colonisation des territoires sauvages par l'homme n'étant pas uniforme, l'habitat est de plus en plus dégradé et fragmenté. Les populations sauvages sont ainsi retranchées dans des zones protégées, de plus en plus isolées les unes des autres, suite à la régression, voire de la disparition, des corridors naturels qui les reliaient. Ceci entrave la circulation des individus (e.g. libre circulation, migration) et a pour



conséquence de couper les flux géniques entre les populations. Or il est connu qu'une population isolée, sans échanges génétiques avec d'autres, est exposée à des risques de consanguinité qui, à terme, peut lui être fatale (Björklund, 2003; Trinkel et al., 2010).

### 3.4. Braconnage et conflit homme-animal

#### 3.4.1. *Menace*

Si la taille de la population humaine africaine augmente, le niveau de vie de cette population reste faible et fait place à une pauvreté assez élevée. Cette pauvreté incite à la pratique de la chasse de viande de brousse, pour se nourrir ; et au braconnage, pour retirer les bénéfices de la commercialisation de produits sauvages. De plus, les territoires occupés par les Hommes et par les lions sont souvent proches et les cas où les lions chassent le bétail ne sont pas rares. Les pertes de l'éleveur contribuent à sa pauvreté et entretiennent l'animosité envers les lions. Cette proximité a également déjà donné lieu à des attaques de lion sur les humains (« lions mangeurs d'hommes »), qui aggravent aussi le conflit homme-animal depuis des générations (Packer et al., 2005).

L'Afrique en général fait face à de nombreuses tensions. Qu'elles soient à l'échelle régionale, nationale ou continentale, elles sont souvent source de violence et de conflits armés, voire de terrorisme. Ceci a notamment pour conséquence de faire passer les questions de conservation au second plan politique, où les nouvelles mesures qui seraient nécessaires ne sont pas instaurées. De plus, d'un point de vue interne, les populations de lions et les espaces sauvages et/ou proies qui leur sont associés sont souvent très mal gérées. Les raisons en sont une mauvaise structure institutionnelle, un manque de connaissances et une surveillance inefficace des animaux dans certaines aires protégées. Enfin, deux facteurs augmentent la perception négative des lions par les populations locales : le premier, d'ordre social, comprend le manque de motivation pour tolérer les lions, résultant d'une faible participation locale aux prises de décision pour établir un plan de cohabitations ; le second, d'ordre économique, reflète une répartition non équitable des gains générés par les activités liées aux lions, renforçant ainsi le manque de motivation des habitants locaux quant à leur conservation (Hemson et al., 2009; MacLennan et al., 2009; Nelson et al., 2013).

#### 3.4.2. *Conséquences*

Le braconnage de lions est une cause importante de la diminution de la population. En effet, s'il existe une chasse au lion légale, ou « trophy hunting », celle-ci reste réglementée et ne concerne que peu d'individus prélevés par an. Par exemple, le prélèvement annuel de lions en Tanzanie s'élève à environ 40 individus ; et ne concerne que des lions mâles et d'âge adulte (> 6 ans) (P. Chardonnet, pers. com. 2016 ; Whitman et al. 2004). La chasse au trophée permet de générer des financements relativement importants pour les gouvernements et les communautés locales, participant ainsi à la conservation des espaces sauvages et donc du lion.

Une première sorte de braconnage touchant le lion est de type indiscriminée, à travers des pièges (e.g. carcasses empoisonnées) visant d'autres animaux. Aussi, si la chasse de viande de brousse ne concerne pas les lions à proprement parler, elle concerne en revanche des animaux faisant partie de son régime alimentaire, notamment les grands herbivores. En effet, ces derniers sont de plus en plus chassés pour l'auto-consommation et la commercialisation, contribuant ainsi à diminuer grandement la



densité en proies disponibles pour la chasse des grands prédateurs (Becker et al., 2013; Lindsey et al., 2013a). Ainsi, l'évolution d'une population de lions est étroitement corrélée à l'évolution des populations de ses proies. Or celles-ci diminuent souvent, comme le montrait par exemple une étude en 2010 sur 78 populations d'herbivores monitorés, avec par exemple une chute de 52% des individus dans l'Est de l'Afrique et une chute de 85% des individus dans l'Ouest de l'Afrique entre 1970 et 2005 (Craigie et al., 2010). Les lions se servent donc souvent dans le bétail des éleveurs et ceci a pour conséquence la persécution des lions par les éleveurs, qui chassent le lion par représailles ou parfois même par anticipation d'une potentielle autre attaque (Bauer and de Jongh, 2005; Hazzah et al., 2009; Hemson et al., 2009; Holmern et al., 2007; Kissui, 2008; Kushnir et al., 2010; MacLennan et al., 2009; Patterson et al., 2004). Ce braconnage de représailles peut aussi avoir lieu dans les cas enregistrés d'attaques de lions sur l'homme. En effet, les cas de « lions mangeurs d'hommes » ne sont pas rares en Afrique et sont connus depuis des générations, notamment depuis le cas des deux lions du Tsavo (Kenya) en 1898. Si plusieurs hypothèses tentent d'expliquer ces attaques, la cause la plus probable serait le manque de proies dans le milieu naturel. Au final, même si le nombre de lions tués par représailles est peu connu, c'est le conflit homme-animal qui représente la première cause de mortalité des lions en dehors des aires protégées, et non la chasse légale contrairement à ce qui est souvent prétendu (P. Chardonnet, pers. com. 2016). Aussi, les raisons à l'origine du braconnage de lions peuvent être la recherche de profit dû à la pauvreté. Récemment, un type grandissant de braconnage consiste en l'alimentation du marché noir des médecines traditionnelles (Bauer et al., 2015; Riggio et al., 2013). En effet, certaines parties du corps du lion (e.g. peau, os, graisse) auraient des vertus médicinales et de nombreux sondages en Afrique rapportent un usage par le passé de ces parties (IUCN, 2016). Ce type de braconnage touche autant les lions africains qu'asiatiques, mais on voit la demande asiatique (notamment pour les os de lions africains) augmenter, en vue de la fabrication d'un vin médicinal traditionnel, réalisé initialement à partir d'os de tigres (IUCN, 2016). Aussi, à cause d'une demande importante, beaucoup de faux matériel circule sur le marché noir.

Il existe également une chasse au lion traditionnelle chez certaines ethnies où abattre un lion constitue un rite de passage (e.g. ethnie Massai) (Goldman et al., 2013; Mésochina et al., 2010). Même si cette forme de chasse fait partie de pratiques culturelles, elle n'en reste pas moins du braconnage : en effet, d'une part, la chasse traditionnelle est souvent interdite (en Tanzanie par exemple), et d'autre part, les chasseurs des ethnies s'en servent parfois comme prétexte afin d'abattre les lions menaçant le bétail (Goldman et al., 2013; Hazzah et al., 2009).

Par ailleurs, les conflits présents en Afrique ont pour conséquence une décroissance du tourisme international. Le tourisme étant une source de revenus des plus importantes pour beaucoup de pays africains, une diminution des fonds disponibles à la gestion et à la conservation des populations sauvages est de plus en plus fréquente, les rendant souvent inefficaces, et participant ainsi au déclin des populations censées être préservées. Par exemple, en Afrique de l'ouest, la plupart des lions se trouvent dans des aires protégées, censées aider à leur conservation. Or le manque de gestion de ces zones participe à la diminution des proies disponibles et permet même les représailles des éleveurs à l'intérieur des zones protégées (Henschel et al., 2014). A long terme, les zones mal gérées pourraient déplorer une extinction locale en lions. De plus, cela pourrait impacter encore plus le tourisme puisque celui-ci est principalement motivé par des espèces-phare telles que le lion.

### 3.5. Causes naturelles

Parmi les causes naturelles, celle qui a le plus d'impact est le développement de maladies telles que la maladie de Carré (CDV pour Canine Distemper Virus). Des épidémies de CDV ont particulièrement touché les populations de lions du Nord-Est de la Tanzanie, comme au Serengeti, ces dernières décennies (Kissui and Packer, 2004; Munson et al., 2008). La tuberculose bovine a également un impact important sur les populations de lions d'Afrique australe, par ingestion de viande de bovidés contaminés. Sachant qu'une population sévèrement touchée par une épidémie peut fortement être réduite, un risque de consanguinité peut alors apparaître, et nuire à la survie à long terme de l'espèce (Trinkel et al., 2011).

Aussi, les évènements naturels (e.g. incendies, épidémies) ont d'autant plus d'impact sur une population que celle-ci est restreinte. Cette raison est une justification supplémentaire pour adapter le statut de conservation d'une sous-population dont le nombre d'individus a chuté, comme cela a été fait avec *P. l. persica*.

Enfin, des facteurs naturels tels que les compétitions intraspécifique et interspécifique ont également pour effet de réguler les populations. Si ces facteurs ont toujours été présents dans le monde du vivant, ils pourraient augmenter significativement avec le temps sous la pression anthropique croissante, notamment sur le règne animal.

## 4. CONSERVATION

La sous-espèce *Panthera leo leo* est classée « vulnérable » depuis 1996 selon la liste rouge de l'IUCN, et est indexée à l'annexe II de la CITES depuis 1975. Cette dernière contrôle le commerce international des espèces, afin de les protéger contre la surexploitation. L'annexe II comprend les espèces qui pourraient être menacées d'extinction dans le futur si une étroite surveillance de leur commerce n'est pas appliquée. La sous-espèce *Panthera leo persica* est classée « en danger » par l'IUCN et est indexée à l'annexe I de la CITES (pour les espèces menacées d'extinction). Elle est maintenant totalement protégée (Nowell and Jackson, 1996). La situation du lion ayant évolué depuis la dernière indexation, le statut de *P. l. leo* au sein de la CITES pourrait être revu prochainement.

### 4.1. Zones de conservation

Une aire protégée est une zone géographiquement limitée, dont la gestion permet d'atteindre des objectifs spécifiques de conservation et de développement durable pour les ressources choisies. Parmi toutes les aires protégées qui peuvent exister (e.g. réserves forestières, réserves marines, parcs privés), 3 types peuvent concerner les lions en Afrique : les parcs nationaux, les réserves naturelles telles que les « game reserve » (GR) et les différents types de zones de chasse. Les parcs nationaux, couvrent environ 15% du territoire africain, leur nombre total s'élevant autour de 270. La chasse y est strictement interdite mais les parcs nationaux ne sont pas pour autant clôturés (sauf en Afrique du Sud), ce qui permet aux animaux de se déplacer dans les zones adjacentes. La chasse est parfois autorisée dans les « Game Reserve » et les zones de chasse protégées, mais subit un contrôle et une régulation par les autorités (Mésochina et al., 2010). Malgré le grand nombre d'aires protégées en Afrique, celles-ci

ne sont pas toujours de grande superficie et interconnectées. Ainsi, les populations s'y trouvant sont souvent confinées, sans possibilité d'échanges géographique et génétique, ce qui participe à leur fragmentation. La protection que ces aires sont censées offrir est ainsi perturbée par les problèmes de surpopulation (et donc de manque de proies), de consanguinité et de maladies (épidémies). A cela s'ajoutent les conflits homme-animal lorsque les aires protégées recoupent des territoires occupés par les humains ou le pastoralisme.

La Tanzanie est un des pays africains regroupant le plus de parcs nationaux, qui sont au nombre de 12, ce qui correspond à environ 7% de la superficie totale du pays (P. Chardonnet, pers. com. 2016). Le plus connu est le Parc National du Serengeti, couvrant 14,763 km<sup>2</sup> et abritant les 5 fameux Big Five. Le deuxième plus grand Parc National est celui du Ruaha, couvrant 10,300 km<sup>2</sup>. Mais la Tanzanie possédant également beaucoup de zones de chasse protégées (avec par exemple la Selous Game Reserve couvrant à elle seule 44,800 km<sup>2</sup>), compte encore 32% de sa superficie totale en zones de chasse protégées (P. Chardonnet, pers. com. 2016). Or l'aire de répartition des lions est plus vaste hors des parcs nationaux qu'à l'intérieur (P. Chardonnet, pers. com. 2016). Ainsi, même si environ 40% du territoire national est classé protégé (selon les niveaux de conservation associés aux différents types de zones), la pratique de la chasse au lion n'a pas intérêt à être supprimée : en effet, dans ce cas-ci les zones de chasse ne bénéficieraient plus de leur protection actuelle et seront libres d'être utilisées à d'autres fins, telles que l'agriculture intensive, ce qui aurait pour conséquence d'augmenter la dégradation et la fragmentation des territoires sauvages en Tanzanie et le confinement des populations de lions (P. Chardonnet, pers. com. 2016).

## 4.2. Lion Conservation Units

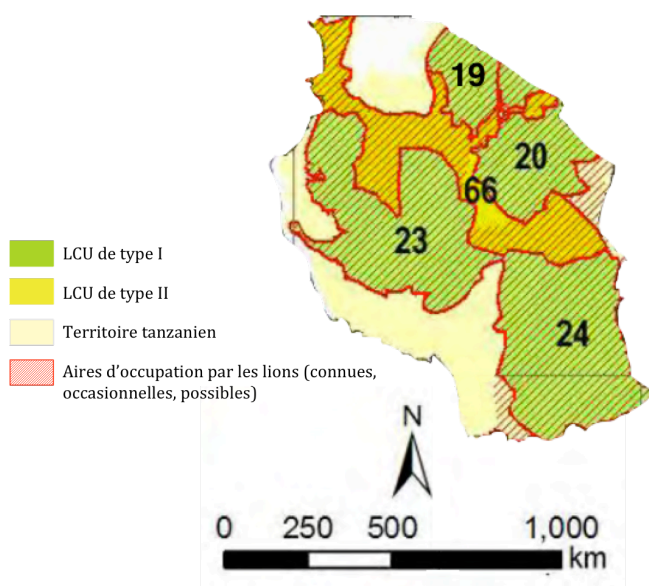
Les « Lion Conservation Unit », ou LCUs, ont été créées en 2006 dans le but de définir avec précision les aires occupées par les lions qui pourraient faire l'objet de zones de conservation. L'idée suivait un premier projet similaire, mené par Sanderson et al. (2002), qui a ainsi établi les « jaguar conservation units ». Lors de leur création, le SSC Cat Specialist Group de l'IUCN a identifié 86 LCUs en Afrique : 20 en Afrique de l'ouest et centrale et 66 en Afrique de l'est et du sud (The IUCN SSC Cat Specialist Group, 2006a, 2006b). Elles ont alors été définies comme des « areas of known or probable lion range that can be considered an ecological unit of importance for lion conservation » (The IUCN SSC Cat Specialist Group, 2006a, 2006b). Les LCUs ne sont pas assignées à un seul type de territoire, ainsi elles peuvent chevaucher autant les parcs nationaux que les zones de chasse par exemple. Pour chacune d'entre elles, la présence de lions devait être positive pour les 10 années écoulées jusque là, la taille et les futures tendances de la population de lions devaient être estimées, ainsi que les menaces potentielles et les facteurs limitant (The IUCN SSC Cat Specialist Group, 2006a, 2006b). Aussi, les critères tels que la taille de la population, la disponibilité en proies, le degré de menace présent et la qualité de l'habitat ont permis de catégoriser les LCUs en 3 classes, à savoir : classe I pour les LCUs viables, classe II pour les LCUs potentiellement viables, et classe III pour les LCUs de viabilité significative mais douteuse.

Cependant, il semblerait que les LCUs ne soient pas officiellement acceptées dans les stratégies de conservation, servant plutôt d'appui pour les décisions de conservation (The IUCN SSC Cat Specialist Group, 2006b). Or, les LCUs pourraient être un outil de référence international pour une conservation homogène du lion au sein de l'Afrique.

Mais aujourd'hui, les facteurs responsables du déclin dans les populations de lions ont sûrement modifié ces LCU initiales, comme le suggère l'étude de Riggio et al. (2013). De plus, les LCU chevauchent souvent plusieurs pays, ainsi leur gestion n'est pas aisée et demanderait une coopération inter-états (The IUCN SSC Cat Specialist Group, 2006a). En Tanzanie se trouvent 5 LCU, décrites dans le *tableau 1* et illustrées par la *figure 5*.

N° LCU	Nom	Aire (en km <sup>2</sup> )	Classe	Taille de la population	Maladies	Chasse sans discrimination	PAC	Trophy hunting	Disponibilité en proies	Empiètement avec le bétail	Conversion de l'habitat	Extractions de ressources
19	Serengeti Mara	57,800	I	+++					+++			
20	Maasai Steppe	144,690	I	+++					++			
23	Ruaha-Rungwa	185,540	I	+++					+++			
24	Selous	190,380	I	+++					+++			
66	Dar-Biharamulo	164,980	II	+++					+			

**Tableau 1** : Résumé de quelques caractéristiques des 5 LCU présentes en Tanzanie. En gris clair : aucun, en gris moyen : quelque-uns, en gris foncé : beaucoup, \*\*\* large, \*\* modérée, \* faible. Source des données : The IUCN SSC Cat Specialist Group (2006a).



**Figure 5** : Carte représentant les 5 LCU de Tanzanie, à savoir : 19 : Serengeti Mara, 20 : Maasai Steppe, 23 : Ruaha-Rungwa, 24 : Selous et 66 : Dar-Biharamulo. Modifiée de The IUCN SSC Cat Specialist Group (2006a).

### 4.3. Améliorations face aux menaces de l'espèce

Un des outils de conservation qui pourrait répondre au problème de la fragmentation de l'aire de répartition du lion serait la création de corridors écologiques, permettant aux populations de circuler entre plusieurs zones interrompues entre elles. Aussi, l'établissement au minimum de 2 populations sauvages pouvant communiquer, plutôt qu'une seule, permettrait de maintenir la diversité génétique et d'éviter une hausse de la consanguinité dans les régions critiques (Trinkel et al., 2011). Cette

stratégie peut être réalisée au moyen de la translocation de quelques individus d'une population. Il y a enfin la possibilité de réintroduire l'espèce dans un milieu favorable à son développement et à son maintien. Ceci a par exemple été planifié en Inde où les individus sont de plus en plus confinés sur le territoire de la forêt du Gir, ce qui augmente la compétition intraspécifique et leur fragilité face aux menaces naturelles. Le gouvernement indien a donc initié en 1995 le « Asiatic Lion Reintroduction Project » afin d'établir une deuxième population indépendante de lions en Inde.

La chasse étant un enjeu socio-économique dans beaucoup de pays africains, elle ne peut pas être interdite totalement (Kiffner, 2008; Lindsey et al., 2013b; Whitman et al., 2004). De plus la chasse apporte, d'une part, un gain financier élevé, et d'autre part le maintien des habitats naturels et de la base-proie du lion dans les zones de chasse protégées. Elle peut donc constituer un outil important pour la conservation. Ainsi, elle ne doit pas être considérée comme une menace à éradiquer mais plutôt comme un outil à bien gérer : en effet, une bonne gestion des populations permet le prélèvement d'un certain nombre d'individus sans mettre en danger la population (Kiffner, 2008; Whitman et al., 2004). Des améliorations de la gestion du « trophy hunting » sont donc nécessaires. En effet, si celui-ci participe positivement à la conservation du lion, ce n'est que dans la mesure où il ne devient pas une menace pour les populations (Loveridge et al., 2007; Packer et al., 2011; Whitman et al., 2004). Même si beaucoup de réformes sont proposées afin d'instaurer une durabilité au sein de la pratique de la chasse légale, elles n'amélioreront peut-être pas le déclin actuel des populations, puisque la chasse légale n'est pas la première menace de l'espèce (Croes et al., 2011; Edwards et al., 2014; Lindsey et al., 2013b; Packer et al., 2011, 2009; Rosenblatt et al., 2014). Une des méthodes qui permettrait de limiter le braconnage serait une meilleure surveillance des animaux, voire une surveillance constante. Aussi, le monitoring des individus serait une manière de recenser les individus d'une zone et donc d'avoir une idée de la densité en lions à un moment donné. Cela permettrait donc d'adapter les quotas de chasse afin que cette dernière n'amplifie pas sans le savoir le déclin d'une population déjà peu nombreuse à la base (Edwards et al., 2014). Une technique de conservation plutôt efficace, mais très controversée, serait également de clôturer les zones à protéger (Packer et al., 2013). En effet, si toutes les zones protégées sont clôturées en Afrique du Sud par exemple, ce n'est pas le cas dans le reste du continent. Cela rend plus facile les illégalités participant au déclin des populations. En revanche, cela pourrait entraver les flux de migrations naturels et donc à l'écologie et au brassage génétique de certaines espèces (Cushman et al., 2015; Riggio et al., 2013).

En ce qui concerne le conflit homme-animal, des mesures de gestion du bétail devraient être mises en œuvre à l'aide de matériel fourni et en collaboration avec les éleveurs afin de limiter les attaques de lions (Hazzah et al., 2014; Schuette et al., 2013). Un exemple consisterait à construire des enclos plus solides afin de protéger le bétail la nuit (P. Chardonnet, pers. com. 2016). Aussi, des aides compensatoires aux pertes annuelles des éleveurs devraient être proposées afin de ne pas nourrir le sentiment de perte qui conduirait à un désintéressement de la conservation du lion (Hazzah et al., 2014). Par exemple, cette pratique a été instaurée en Inde : les éleveurs tolèrent qu'une certaine quantité de leur bétail soit prise par les lions chaque année (et donc perdue) ; en contrepartie, ils se voient compensés d'une somme annuelle par le gouvernement en accord avec leurs pertes (Banerjee et al., 2013).

# MATERIELS ET METHODES

---

## 1. MATERIEL UTILISE

### 1.1. Origines des échantillons

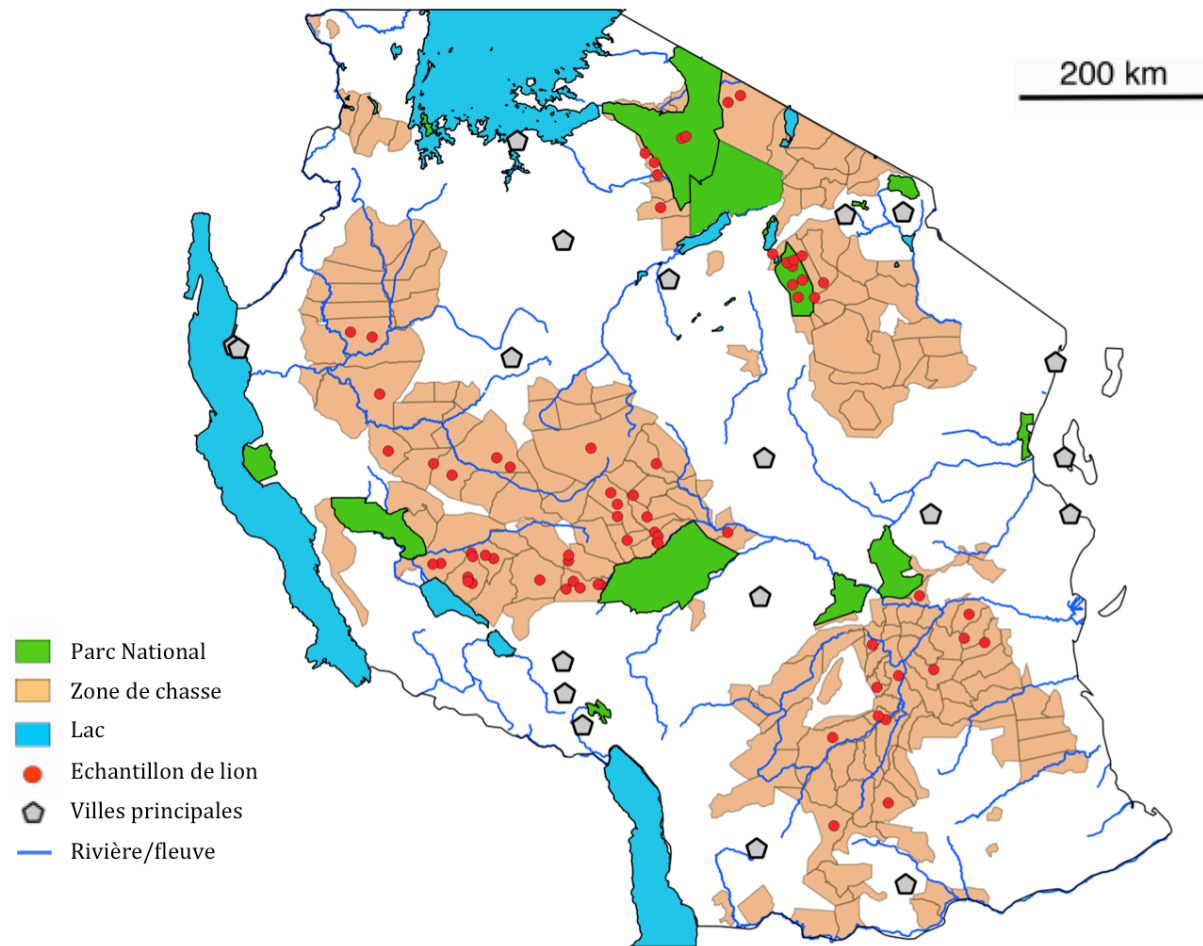
Les échantillons utilisés pour cette étude provenaient tous d'Afrique et ont été prélevés uniquement sur des individus mâles adultes, issus de la chasse légale, conformément aux réglementations en vigueur. Ces échantillons ont été collectés par les membres de la Fondation Internationale de la Gestion de la Faune dont le siège se trouve à Paris (fondation IGF, 58 rue Beaubourg, Paris, France). Il s'agit pour la plupart de prélèvements de tissus de l'oreille externe, excepté pour 8 d'entre eux qui correspondent à des prélèvements de racines de poils. Les échantillons ont été récoltés le jour où l'animal a été abattu et conservés dans un tube rempli d'éthanol 96%, selon les conditions du terrain. Parmi le lot d'échantillons reçus pour notre mémoire, 27 provenaient de Tanzanie et 9 du Burkina Faso. En outre, nous avons également inclus des échantillons plus anciens conservés au laboratoire de génétique de la conservation de l'ULg, utilisés à l'époque dans le cadre d'un autre mémoire de Master réalisé par Laura Bertrand (2013). Ce dernier incluait un lot de 44 échantillons de Tanzanie, 11 du Burkina Faso, 1 du Bénin, 2 du Congo-Brazzaville et 4 de la République Centrafricaine. Par ailleurs, 6 nouveaux échantillons supplémentaires ont été fournis par Mario Melletti (chercheur indépendant, Via Di Villa Chigi, Rome, Italie), dont 3 provenaient de Tanzanie et les 3 autres d'Afrique du Sud. Au total, les échantillons inclus dans la présente étude s'élèvent au nombre de 104, répartis sur 6 pays différents d'Afrique, ce qui en fait une des études les plus complètes ayant jamais été effectuées sur le lion d'Afrique. Les détails concernant les échantillons, tels que le pays d'origine, les zones de chasse associées et le type de tissu prélevé, nous ont été fournis par la fondation IGF et sont repris en *annexe 2*. De plus, grâce à la connaissance exacte de la provenance de chacun des échantillons (e.g. zones de chasse), nous avons pu reconstituer une carte précise de la Tanzanie localisant chacun des spécimens abattus (*figure 6*).

### 1.1. Extractions d'ADN

La suite des manipulations nécessitant de travailler avec de l'ADN, des extractions d'ADN ont été réalisées sur chaque échantillon avec le kit DNA Qiagen « DNeasy® Blood & Tissue Kit » selon le protocole « Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol) » détaillé dans le manuel du kit.

Premièrement, un morceau de quelques millimètres a été prélevé sur chaque échantillon dans un environnement stérile, puis ces morceaux ont été réduits par découpe manuelle en petits fragments afin d'optimiser sa digestion. L'étape suivante consistait en la lyse du tissu : pour cela, les fragments ont été placés dans un tube Eppendorf® 1,5 ml avec 180 µl de buffer ATL (tampon de lyse) et 20 µl de protéinase K et ont été incubés à 56°C pendant 3h sous agitation à l'aide d'un « Thermomixer compact » Eppendorf®. Pour les 8 échantillons constitués de poils, cette étape nécessitait préalablement d'isoler les bulbes des poils.





**Figure 6** : Carte de la Tanzanie illustrant la localisation des 74 échantillons tanzaniens de cette étude.

Ils ont ensuite été incubés une nuit (ou « over-night ») afin d'optimiser la lyse. A la fin de la lyse, un mélange de 200  $\mu$ l de buffer AL (tampon de lyse) et de 200  $\mu$ l d'éthanol a été ajouté à chaque échantillon. Après homogénéisation et centrifugation, le contenu de chaque tube a été transféré dans une colonne « Mini Spin Column » fournie avec le kit, en prenant soin de ne pas prélever les résidus qui n'avaient pas été lysés, tels que les fragments de poils ou d'os. Ensuite, les colonnes ont été centrifugées une première fois pendant 1 minute à 8 000 rpm et le tube collecteur avec le filtrat de chaque colonne a été retiré et jeté. Afin d'éliminer les résidus d'éthanol rémanents, les colonnes ont été placées dans un nouveau tube collecteur et 500  $\mu$ l de buffer AW1 (premier tampon de lavage) ont été ajoutés. Un premier lavage est effectué par une centrifugation à 8 000 rpm pendant 1 minute. De même, les tubes collecteurs ont été remplacés par des nouveaux. Un deuxième lavage visant à sécher la membrane de la colonne a été effectué avec 500  $\mu$ l de buffer AW2 (deuxième tampon de lavage) et en centrifugeant 3 minutes à 14 000 rpm. Les tubes collecteurs ont été là encore éliminés. La dernière étape a consisté en l'extraction de l'ADN jusqu'alors retenu sur la membrane de la colonne. Pour cela, les colonnes ont été placées dans un tube Eppendorf® 1,5 ml et incubées pendant 5 minutes à température ambiante avec 100  $\mu$ l de buffer AE (buffer d'éluion). Une centrifugation à 8 000 rpm pendant 1 minute a permis l'éluion de l'ADN dans le filtrat obtenu. Afin de récolter tout l'ADN, cette étape a été effectuée une seconde fois en plaçant la colonne dans un nouveau tube Eppendorf® 1,5 ml. Ainsi, deux tubes ont été conservés par échantillon, le premier contenant une quantité d'ADN naturellement plus élevée que celui de la deuxième éluion.

## 1.2. Quantifications d'ADN

Après les extractions d'ADN, chaque échantillon a été systématiquement dosé pour connaître la concentration exacte d'ADN qu'il contenait. Cette étape était en effet indispensable afin de pouvoir présélectionner les échantillons qui pourraient potentiellement être intégrés dans notre manipulation de séquençage à haut débit, la technique de génomique employée dans le présent travail requérant une quantité d'ADN minimale stricte. Les contraintes liées à l'utilisation des outils de génomique seront plus amplement détaillées ci-après. Les quantifications ont été réalisées avec le kit « Quant-iT™ Picogreen® dsDNA Assay Kit » et suivant le protocole associé. Le kit contient un « lambda DNA standard » qui, réparti à différentes concentrations sur les deux dernières colonnes de la microplaque 96 puits, assure une lecture des standards de concentrations d'ADN connues qui va permettre de tracer une droite d'étalonnage, à laquelle seront comparés les échantillons testés. En effet, à la lecture (ici réalisée par le robot FilterMax™ F3 Multi-Mode Microplate Reader), l'absorbance est mesurée grâce à la fluorescence de chaque échantillon, émise suite à l'intégration du Picogreen®. Les concentrations d'ADN des échantillons sont alors déterminées grâce à la droite d'étalonnage obtenue sur base des absorbances enregistrées pour chacun des différents standards. Le volume d'échantillon testé était de 1 µl et la précision de la mesure était de l'ordre du ng ; ainsi les concentrations obtenues étaient exprimées en ng/µl.

## 2. GENOTYPAGE DES MARQUEURS MOLECULAIRES SNPs

### 2.1. Aperçu de la technique

Cette technique de « Next-Generation-Sequencing » (NGS) ou de séquençage à haut débit, permet de créer une librairie de millions de fragments d'ADN d'une centaine de paires de base via : 1) une étape de digestion de l'ADN afin de réduire sa complexité grâce à une enzyme de restriction spécifique (ici PstI, fréquemment utilisée sur les mammifères et qui reconnaît le site de découpe complet CTGCAG (Cornell service pers. com. 2016), 2) une étape de sélection de la taille des fragments souhaitée et de couplage d'adaptateurs ainsi que de « barcodes » aux brins d'ADN digérés, et enfin 3) une étape de séquençage sur un « Illumina HiSeq 2000/2500 » (100 paires de base, méthode « single-end ») (Elshire et al., 2011; Imelfort et al., 2009). Les adaptateurs ajoutés aux fragments permettent la ligation physique des fragments digérés à la « flowcell », qui correspond au support physique utilisé lors du séquençage. Les « barcodes » quant à eux sont aussi constitués de nucléotides, en général au nombre de 4 à 8, et sont uniques à chaque spécimen, rajoutés artificiellement au début des fragments au cours d'un traitement en laboratoire appelé « library preparation ». L'ajout de ces « barcodes » permet de rassembler l'ensemble de nos échantillons avant séquençage, tout en gardant une traçabilité par spécimen. La technique du GBS est largement utilisée par les scientifiques actuellement et a initialement été décrite par Elshire et al. (2011).

Dans le cadre de ce mémoire, la « library preparation » ainsi que le séquençage ont été sous-traités auprès du centre de recherche « Cornell University Life Sciences Core Facility » (<http://www.biotech.cornell.edu/brc/genomic-diversity-facility>), ayant par ailleurs également développé la pipeline Tassel utilisée ultérieurement afin d'identifier les SNPs au sein de notre base de données (<http://www.maizegenetics.net/#!tassel/c17q9>). Ainsi, l'ensemble de cette technique

repose sur la création d'une librairie génétique appelée RRL pour « Reduced Representation Libraries » et qui permet d'obtenir une bonne couverture du génome pour chacun des spécimens intégrés dans la manipulation. Cependant, elle nécessite de rencontrer certains critères détaillés ci-après.

## 2.2. Choix des échantillons et reconcentrations d'ADN

### 2.2.1. Prérequis pour la technique du GBS

Le génotypage des « Single-Nucleotide Polymorphism » (SNPs), ou polymorphisme à un seul site, a été réalisé sur base de la méthode du GBS (Elshire et al., 2011). Comme il s'agit d'une technique innovante (méthode non intégrée dans le cadre du mémoire de Laura Bertrand (2013)), l'ensemble des échantillons a été intégré dans un premier temps afin de tester s'ils rencontraient tous les critères de qualité et de quantité d'ADN nécessaires pour cette technique, exception faite des 2 échantillons congolais, ainsi que de 3 échantillons tanzaniens et de 3 échantillons sud-africains, soit un total de 96 échantillons. En effet, chaque échantillon doit avoir une concentration d'ADN supérieure ou égale à 20 ng/μl, ainsi qu'un volume minimal de 50 μl. Parmi les échantillons, seulement 45 répondaient simultanément à ces deux critères. Les échantillons qui ne pouvaient être pris en compte pour un souci de concentration ont été re-extraits et re-dosés. Grâce à ce second round d'extractions, 9 échantillons supplémentaires ont pu être retenus.

### 2.2.2. Reconcentrations d'ADN

Afin d'accroître encore ce nombre, une autre option a été de procéder à une reconcentration de l'ADN des échantillons. Celle-ci a été effectuée à l'aide de colonnes spécifiques « Amicon® Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters » (Merck Millipore) destinées à la reconcentration, et selon le protocole associé. Le nombre de colonne étant limité (kit de 24 colonnes), les échantillons ayant une concentration d'ADN inférieure à 2 ng/μl n'ont pas été procédés. Afin de maximiser les chances de réussite, l'ADN a été recontrentre à partir de deux produits d'extractions d'ADN obtenus avec le kit Qiagen (en incluant les 2 éluions obtenus par extraction, soit 4 aliquotes au total par échantillon). A la fin de cette étape, et après avoir quantifié les ADNs, 19 échantillons sur les 24 présentaient les deux critères prérequis pour être inclus sur la plaque GBS (parmi eux 6 présentaient une concentration légèrement inférieure à 20 ng/μl d'ADN mais ont quand même été procédés).

Ainsi, un total de 73 échantillons a pu être retenu pour le génotypage SNPs (Elshire et al., 2011), à savoir : RCA2, RCA3, RCA4 pour la République Centrafricaine ; BEN1 pour le Bénin ; BUR1, BUR2, BUR5, BUR6, BUR7, BUR8, BUR12, BUR13, BUR14, BUR15, BUR16, BUR17, BUR18, BUR20 pour le Burkina Faso ; 1, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 24, 25, 27, 28, 29, 31, 33, 35, 36, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 72 et 74 pour la Tanzanie.

## 2.3. Préparation des échantillons et vérification des profils

### 2.3.1. *Digestion à la RNase*

Afin de purifier nos extraits d'ADN de tout brin d'ARN, les échantillons ont subi une digestion à la RNase. Pour ce faire, les 73 échantillons ont été répartis sur une plaque 96 puits auxquels nous avons ajouté 1  $\mu\text{l}$  de « PureLink™ RNase A (20 mg/ml) » (Life Technologies), et ont été laissés à digérer à température ambiante pendant 2h.

### 2.3.2. *Vérification des profils d'ADN par électrophorèse*

D'autre part, même si les deux prérequis de concentration et de volume étaient respectés pour chaque échantillon, le profil des échantillons, c'est-à-dire son état de dégradation, devait être jaugé afin de valider la qualité des ADN. Cette vérification s'est faite par électrophorèse à l'aide d'un gel d'agarose à 1% et du ladder «  $\lambda$  DNA/HindIII Marker » (0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), ce dernier étant imposé par la société de Cornell. 100 ng d'ADN pour chaque échantillon ont migrés au côté du marqueur de taille  $\lambda$  HindIII. Il a ainsi été possible de vérifier visuellement l'état de dégradation de l'ADN (e.g. présence de « smear »). Par ailleurs, 10 échantillons pris au hasard ont également été digérés avec l'enzyme de restriction HindIII (10u/ $\mu\text{l}$ , PROMEGA), afin de comparer leurs profils pré- et post-digestion. Pour cela, chacun des 10 échantillons a été incubé 2h à 37°C avec la recette présentée au *tableau 2*.

PRODUIT	VOLUME
HindIII (enzyme de restriction)	0,5 $\mu\text{l}$
BSA	0,2 $\mu\text{l}$
Buffer E	2 $\mu\text{l}$
ADN	Calcul du volume pour avoir 500 ng d'ADN
H <sub>2</sub> O	Calcul pour avoir un volume final de 20 $\mu\text{l}$

**Tableau 2** : Recette par échantillon pour la digestion avec l'enzyme HindIII.

Les profils ont été vérifiés par électrophorèse à l'aide d'un gel d'agarose à 0,8% et du ladder imposé «  $\lambda$  DNA/HindIII Marker » (migration de 20 min à 100 Volts). Après sélection finale des échantillons à inclure sur notre plaque GBS, une dernière étape a été nécessaire avant l'envoi final. En effet, les échantillons dont les concentrations excédaient les 100 ng/ $\mu\text{l}$  ont dû être dilués. Ceci concernait 3 échantillons, qui ont été dilués avec de l'eau ultra-pure afin d'obtenir une concentration finale de 80 ng/ $\mu\text{l}$ . Ainsi, 50  $\mu\text{l}$  de chaque échantillon (N = 73) ont finalement été répartis sur une plaque « Eppendorf® twin-tec PCR plates 96, semi-skirted », imposée, qui a ensuite été expédiée à l'Institut de Biotechnologies de l'Université de Cornell aux Etats-Unis, équipé d'un « Illumina HiSeq 2000/2500 ».

## 2.4. Identification des SNPs

Les séquences obtenues grâce à cette méthodologie mesurent une centaine de paires de bases (« barcodes » inclus) et se comptent par millions. Elles nécessitent donc d'être filtrées dans un premier temps, et ensuite d'être alignées à un génome de référence de qualité, lorsque ce dernier est disponible. Enfin, une fois les séquences alignées, il sera alors possible d'identifier des sites polymorphes, aussi appelés

« variations nucléotidiques qualitatives » (Imelfort et al., 2009), en les comparant les unes avec les autres. Ces différentes étapes ont été réalisées au sein de l'équipe du JEMU, pour « Joint Experimental Molecular Unit », du « Musée Royal de l'Afrique Centrale », localisé à Tervuren et disposant des facilités informatiques nécessaires pour le traitement de cette large base de données (PC de 16 Gigas de RAM, 6 cœurs Intel i7 tournant à 3.5 Ghz).

#### 2.4.1. *Filtrage et alignement des séquences*

La base de données a été dégrossie à l'aide du logiciel Tassel v.5.2.15 (Bradbury et al., 2007) en retirant dans un premier temps toutes les séquences non utilisables, à savoir : les séquences mal barcodées, les séquences de trop petite taille (< 20 pb au-delà du « barcode » et du site de découpe), les séquences de mauvaise qualité, c'est-à-dire n'ayant pas une bonne probabilité d'assignation de ses bases (score de qualité Phred (QS) < 20), les séquences chimères et enfin, les séquences présentes en trop peu de copies (< 10 copies). Inversément, les séquences présentes en trop grand nombre de copies ( $\geq 3$  fois la moyenne de la « sequencing depth ») ont également été retirées car il pourrait s'agir de régions présentes en multi-copies au sein du génome. Si le « sequence coverage » est le pourcentage du génome où des séquences se sont alignées, c'est-à-dire le recouvrement total du génome de référence lors de l'alignement ; la « sequence depth », elle, représente la profondeur d'alignement pour un locus donné, c'est-à-dire le nombre de séquences qui se sont alignées au même endroit (Sims et al., 2014). Ainsi, le dégrossissement de la base de données a notamment été permis en tolérant un nombre minimal et maximal de « sequencing depth ».

Le génome de référence choisi pour l'alignement, à défaut d'avoir le génome de l'espèce cible *Panthera leo*, était celui du chat domestique *Felis catus* publié sur le site du NCBI (GenBank : ACBE00000000.1, GenBank assembly accession : GCA\_000003115.1) ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA\\_000003115.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_000003115.1)). Cet assemblage se compose de 18 chromosomes autosomaux, d'1 chromosome sexuel et d'1 génome mitochondrial. Ce dernier a été sélectionné car il s'agit du génome le plus complet et le plus proche de l'espèce étudiée, *Panthera leo*. A défaut d'avoir un génome de référence, il est également possible d'aligner les séquences entre elles mais cette méthode est plus complexe car elle requiert une étape supplémentaire afin de filtrer toutes les séquences aliens, c'est-à-dire n'appartenant pas à notre espèce cible, et s'effectue en général avec des séquences de plus grande taille (autour de 1000 pb). L'alignement a ensuite été effectué avec le logiciel Bowtie2 v.2.2.9 (Langmead and Salzberg, 2012), sous l'option « very-sensitive ».

#### 2.4.2. *Identification et filtrage des sites polymorphes*

L'identification des sites polymorphes, ou « SNP calling », a également été réalisé avec le logiciel Tassel v.5.2.15 (Bradbury et al., 2007), en utilisant les paramètres par défaut, exception faite du « Minimum Allele Frequency » (mnMAF), ou fréquence de l'allèle mineur, qui a été ajustée à 0.05 afin d'éviter les erreurs de séquençage arrivant ponctuellement. Ce processus vise à ne garder que les SNPs fiables ; ainsi, ceux présentant les caractéristiques suivantes ont été retirés : les SNPs tri- et tétra-alléliques et les indels (insertion ou délétion). Par ailleurs, des filtres complémentaires visant à affiner notre sélection requéraient : 1) une présence d'un site polymorphe dans minimum 45 individus sur la totalité des 73 individus (présence au sein

d'approximativement 60% des échantillons), ce qui a permis de retirer tous les sites présentant un trop grand nombre de données manquantes (caractère N), et 2) une présence minimale de 40% d'SNPs par individu, permettant de retirer les échantillons n'ayant pas généré un assez grand nombre de séquences, ce qui peut être soit lié à la qualité de son ADN, soit à un artefact lors de la préparation de la librairie, ou encore à un artefact lors du séquençage lui-même.

Par ailleurs, tous les sites consécutivement polymorphes (dès 2 sites consécutifs) ont été identifiés et retirés. Au final, nous n'avons gardé qu'un seul site polymorphe par séquence afin de minimiser le risque de déséquilibre de liaison. Ceci a été réalisé à l'aide d'un script Python v.2.7.6 (van Rossum and de Boer, 1991) et du software VCFtools v.0.1.13 (Danecek et al., 2011). Enfin, le retrait des sites pour lesquels l'ensemble des spécimens étaient hétérozygotes, a été réalisée manuellement sur Tassel v.5.2.15 (Bradbury et al., 2007).

## 2.5. Analyses statistiques

Pour chacune des populations identifiées, une déviation à l'équilibre de Hardy-Weinberg a été testée avec Arlequin v.3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) (10 000 MCMC/10 000 dememorization steps). La présence d'un déséquilibre de liaison a également été testé entre chaque loci au sein de chacune des populations identifiées avec Tassel v.5.2.15 (Bradbury et al., 2007). Les seuils de significativité ont été corrigés suivant la règle de Bonferroni pour tous les tests incluant des comparaisons multiples. Enfin les SNPs « outliers », ou SNPs non neutres, ont été identifiés et retirés manuellement à l'aide du software BayeScan v.2.1 (Foll and Gaggiotti, 2008), en utilisant un « prior odds » (PO) de 100.

L'identification de la structure des populations au sein de notre échantillonnage a été réalisée avec Structure v.2.3.4 (Falush et al., 2003; Pritchard et al., 2000) avec un « burn-in » de 50 000 itérations et 100 000 MCMC. Ce dernier a permis d'identifier le nombre de population(s) K en regroupant les individus selon une probabilité d'affiliation au sein de chacun des clusters. Cette analyse a été réalisée sans a priori au niveau de l'origine géographique des échantillons. Afin de s'assurer de la fiabilité des résultats obtenus, l'analyse a été répétée 10 fois pour chaque K testé, avec K allant de 1 à 10 populations. Cette analyse a été répétée 3 fois sur différents jeux de données : 1) un test réalisé à l'échelle continentale, incluant l'ensemble de nos échantillons, 2) un test réalisé à l'échelle régionale incluant tous les échantillons de l'ouest et du centre de l'Afrique (Burkina Faso et République Centrafricaine), et enfin 3) un test réalisé à l'échelle régionale incluant tous les échantillons de l'est de l'Afrique (Tanzanie). La détermination du K ayant la meilleure probabilité a été réalisée selon la méthode d'Evanno (Evanno et al., 2005) et grâce au logiciel CLUMPAK « Cluster Markov Packager Across K » (Kopelman et al., 2015) disponible sur internet (<http://clumpak.tau.ac.il/index.html>), via l'option « find best K ». La visualisation graphique des différentes assignations a également été réalisée sur le serveur CLUMPAK (Kopelman et al., 2015). Une autre technique complémentaire utilisée afin de déterminer la structure des populations au sein de notre jeu de données est l'Analyse en Composantes Principales (ACP). Par ailleurs, un arbre généré par la méthode de Neighbor-Joining (NJ) a également permis de visualiser graphiquement les différentes populations identifiées. Les analyses d'ACPs et l'arbre en NJ ont été réalisées avec le logiciel Tassel v.5.2.15 (Bradbury et al., 2007). Enfin, une analyse de l'estimation de



l'évolution de la taille effective des populations en fonction du temps a été réalisée à l'aide du logiciel SNeP v.1.1 (Barbato et al., 2015), à l'échelle continentale et au sein de la Tanzanie. L'analyse a été répétée 10 fois sur différents subsets de 20 individus choisis au hasard et sur base des 9 184 SNPs identifiés au sein de notre étude.

Pour la suite des analyses démographiques, chaque paramètre a été estimé pour chacune des populations identifiées par le logiciel Structure, pour autant qu'elles comprennent un minimum de 5 individus, s'assurant ainsi une bonne représentativité de chaque population. Les F-statistiques, les hétérozygoties attendue et observée ainsi que les indices de différenciation entre populations permettent de décrire les diversités génétiques inter- et intra-population et d'estimer le degré de différenciation qui existe entre elles. Trois analyses ont été réalisées avec le programme Arlequin v.3.5 (Excoffier and Lischer, 2010), en commençant par une analyse moléculaire de la variance AMOVA (Excoffier et al., 1992; Weir and Cockerham, 1984) pour laquelle nous avons défini des lignées en incluant les individus selon l'axe Ouest-Centre *versus* Est de l'Afrique (Bertola et al., 2016) et des populations délimitées grâce aux analyses Structure. L'évaluation de la diversité moléculaire pour chaque population et les indices de différenciation  $F_{ST}$  entre chaque population identifiée, basés sur la méthode de distance, ont également été réalisés avec le software Arlequin v.3.5 (Excoffier and Lischer, 2010). La visualisation graphique du tableau des  $F_{ST}$ , ou « heatmap », a été faite avec le package « heatmap.plus » sur RStudio v.3.3.1 (R Core Team, 2016). Les estimations des hétérozygoties  $H_0$  et  $uH_E$  et de l'indice de consanguinité  $F_{IS}$  ont été effectuées avec GenAlex v.6.502 (Peakall and Smouse, 2012, 2006) à l'aide d'une base de données où l'on a retiré la majeure partie des données manquantes, et donc plus petite (3 097 SNPs sur les 9 184 totaux). En effet, seulement 9% de données manquantes ont été acceptées (contre 40% environ avec la base de données complète) car le calcul de ces indices avec ce software est sensible à ce paramètre.

Une analyse d'isolement par la distance (IBD pour Isolation-By-Distance) a été réalisée sur les échantillons tanzaniens en utilisant le service « Isolation By Distance Web Service » (IBDWS) v.3.23 (<http://ibdws.sdsu.edu/~ibdws/>), selon 10 000 randomisations et sur la base de données comprenant 3 097 SNPs. Lors de cette analyse, les profils sont déterminés en comparant les « pairwise  $F_{ST}/(1-F_{ST})$  » de chacun des clusters identifiés au logarithme de la distance géographique. Cette dernière est représentée par la médiane des distances géographiques entre chaque individu de chacune des populations de Tanzanie.

Enfin, la réalisation d'une analyse d'autocorrélation spatiale a été réalisée avec GenAlex v.6.502 (Peakall and Smouse, 2012, 2006) afin de détecter s'il existait une structure génétique « spatiale » plus fine. Le calcul du coefficient d'autocorrélation spatiale « r » a été effectué entre paires d'individus (option « Multiple Dclass ») en définissant 18 classes de distance géographique de 50 km chacune (50 km<sup>2</sup> étant la taille moyenne d'un territoire au sein de cette espèce). Une distribution nulle des valeurs de « r » pour chaque classe a été obtenue avec 9 999 permutations ; l'intervalle de confiance pour « r » ayant été estimé avec 9 999 « bootstrap ». Une structure génétique spatiale est considérée lorsque le coefficient « r » n'est plus significatif et qu'il y a intersection avec l'axe des abscisses.

### 3. GENOTYPAGE DES MARQUEURS MICROSATELLITES

#### 3.1. Choix des microsatellites

Les microsatellites sélectionnés étaient les mêmes que ceux inclus dans l'étude réalisée par Laura Bertrand (2013), choisis alors selon l'étude de Dubach et al. (2013). Ils étaient au nombre de 11, à savoir FCA014, FCA026, FCA030, FCA045, FCA077, FCA094, FCA096, FCA126, FCA132, FCA187 et FCA191, et ont été répartis en quatre mix. Les quatre mix ont été définis de sorte que les tailles théoriques des allèles ne se chevauchent pas (Bertrand, 2013). Le *tableau 3* détaille ces quatre mix, ainsi que les amorces (Menotti-Raymond et al., 1999) et les fluorochromes associés aux amorces « forward » utilisées pour l'amplification PCR.

MIX	NOMS	AMORCES	FLUOROCHROME	COLORATION	TAILLES THEORIQUES DES ALLELES (EN PB)	HETEROZYGOTIE
1	FCA014	F : AGCCAAGAGGGGAAACAAACT R : TGTCACAAATGGCAGGTTGT	VIC	vert	160 – 190	0,82
	FCA030	F : CTGTTGGAAGTGGGAGTAAAGG R : ACACATTTTCTCTGCCCCC	FAM	bleu	120 – 142	0,82
	FCA045	F : TGAAGAAAAGAATCAGGCTGTG R : GTATGAGCATCTCTGTGTTCTGTG	NED	noir	146 – 160	0,85
	FCA094	F : TCAAGCCCCATTTTACCTTC R : CACCTGAGCCAAAGGCTATC	PET	rouge	215 – 237	0,90
2	FCA026	F : GGAGCCCTTAGAGTCATGCA R : TGTACACGCACCAAAAAACAA	NED	noir	136 – 154	0,85
	FCA191	F : TCCTGTTCCCTATTCACCCCTACA R : GCATGGCACTTTTGTGTTGAGA	VIC	vert	137 – 147	0,76
3	FCA096	F : CACGCCAACTCTATGCTGA R : CAATGTGCCGTCCTCAAGAAC	FAM	bleu	184 – 224	0,76
	FCA132	F : ATCAAGGCCAACTGTCCG R : GATGCCTCATTAGAAAAATGGC	NED	noir	137 – 153	0,57
	FCA187	F : CCAACTGAACCACCCAGG R : TGGATGGTTGTATTCTCTCA	PET	rouge	162 – 172	0,80
4	FCA077	F : GGCACCTATAACTACCAGTGTGA R : ATCTCTGGGGAAATAAATTTGG	FAM	bleu	143 – 155	0,54
	FCA126	F : GCCCCTGATACCCTGAATG R : CTATCCTTGCTGGCTGAAGG	PET	rouge	139 – 145	0,71

**Tableau 3 :** Détail des 4 mix utilisés reprenant les 11 microsatellites avec leurs amorces F (forward) et R (reverse) décrites par Menotti-Raymond et al. (1999) pour *Felis catus*, les fluorochromes et la coloration qui leur sont associés, l'hétérozygotie et la taille théorique des allèles attendus.

#### 3.1. Amplifications PCR et vérification

##### 3.1.1. Amplification PCR

La recette pour chaque échantillon requiert les amorces « forward » et « reverse » à 10 µM pour l'amplification de chaque microsatellite inclus dans le mix, 5 µl de « multiplex » (Qiagen® « Taq PCR Master Mix Kit ») et d'eau ultra-pure afin d'ajuster le volume total à 10 µl. Ensuite, 3 µl d'ADN ont été ajoutés à cette préparation ; pour les échantillons ayant une faible quantité d'ADN (< 6 ng/µl), le volume ajouté pour l'amplification était de 5 µl. Ceci concernait 7 échantillons, à savoir BUR19, 48, 56, 57,

58, 66 et 73, ainsi que les trois échantillons provenant d'Afrique du Sud. Le *tableau 4* illustre les quantités nécessaires par échantillon de ces éléments.

	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 4	
AMORCES (10 µM) (FORWARD & REVERSE)	0,15 µl par amorce				} 10 µl
MULTIPLEX	5 µl				
H <sub>2</sub> O PURE	3,8 µl	4,4 µl	4,1 µl	4,4 µl	
ADN	3 ou 5 µl				

**Tableau 4** : Quantités de chacun des réactifs nécessaires par échantillon pour la réalisation de la PCR. Modifié à partir de Bertrand (2013).

Les 42 nouveaux échantillons (de BUR12 à BUR20 pour le Burkina Faso, de 48 à 74 pour la Tanzanie et de 1Ita à 6Ita pour les 6 échantillons fournis par Mario Melletti) ont été répartis sur des microplaques avec les 4 mix et amplifiés à l'aide du thermomixeur Mastercycler® gradient d'Eppendorf et du thermomixer VWR® Uno Cycler. Le programme utilisé pour les amplifications des microsatellites était le même que celui utilisé par Laura Bertrand en 2013 et est illustré par le *tableau 5*.

ETAPE	TEMPS	TEMPERATURE
Dénaturation	15 minutes	95°C
Dénaturation	} x 35 cycles	30 secondes
Hybridation		45 secondes
Elongation		45 secondes
Extension		30 minutes
		72°C

**Tableau 5** : Etapes du programme PCR utilisé pour l'amplification des microsatellites, selon Bertrand (2013).

### 3.1.2. *Electrophorèses*

Afin de vérifier la bonne amplification de nos marqueurs moléculaires, le profil des produits PCR a été vérifié par électrophorèse : lorsqu'à la lecture du gel le signal émis par les microsatellites amplifiés était trop fort, le produit PCR concerné était dilué avec de l'eau ultra-pure avant l'étape du génotypage. Les électrophorèses ont été réalisées sur des gels d'agarose à 2%. Une fois les puits chargés avec les échantillons (préalablement mélangés au colorant 5X Green GoTaq® Reaction Buffer, PROMEGA) et le marqueur de poids moléculaire ajouté (Bench Top 100 pb DNA ladder), la migration s'effectuait dans un tampon TAE 1x, pendant 20 minutes, à 100 Volts. La lecture s'est faite aux rayons ultra-violet et à l'aide du logiciel GeneSnap (Syngene, A Division of Synoptics).

## 3.2. Génotypage des microsatellites

Le volume de produits PCR de chaque échantillon requis pour le génotypage était de 2 µl auxquels ont été ajoutés 12 µl de formamide HiDi™ et 0,3 µl du standard ADN « GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard ». Le génotypage des microsatellites amplifiés a été réalisé à l'Université de Namur (Belgique) dans l'Unité de Recherche en Biologie

Environnementale (URBE), sur un séquenceur automatique 16 capillaires « 3130xl Genetic Analyzer » (Applied Biosystems). Les résultats ont été envoyés sous forme d'électrophérogrammes (fichiers informatiques .fsa) dont la lecture s'est faite avec le logiciel GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems). Pour chaque échantillon, les électrophérogrammes ont permis de déterminer la taille des allèles de chacun des microsatellites et leur homo- ou hétéro-zygotie.

### 3.3. Analyses statistiques

Afin de détecter et éventuellement corriger la présence d'allèles nuls dans le jeu de données, la première matrice reprenant la taille des allèles des 11 microsatellites testés (2 allèles/individus) a tout d'abord été soumise au programme Micro-Checker v.2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004).

Ensuite, la détection d'une éventuelle structure parmi les échantillons a été réalisée avec le programme Structure v.2.3.4 (Falush et al., 2003; Pritchard et al., 2000) en suivant la même procédure qu'avec les marqueurs SNPs. Ici, les paramètres définis étaient un « burn-in » de 100 000 itérations et un réplication de 1 000 000 MCMC ; et les valeurs de K testées allaient de 1 à 4 populations pour l'ensemble des échantillons et de 1 à 5 populations pour les échantillons tanzaniens.

Après vérification de l'équilibre d'Hardy-Weinberg ainsi que du déséquilibre de liaison via le programme Genepop v.4.2 (Raymond and Rousset, 1995), les F-statistiques ont été calculées à l'aide du logiciel Genetix v.4.05 (Belkir et al., 2004). Elles comprennent le coefficient de fixation  $F_{ST}$ , le coefficient de consanguinité  $F_{IS}$ , la richesse allélique  $A_R$  et les hétérozygoties attendue  $H_E$  et attendue non biaisée  $H_{NB}$ . Ce logiciel a également permis d'effectuer les Analyses Factorielles des Correspondances (AFC) sur l'échantillonnage continental et à l'échelle de la Tanzanie. Aussi, le nombre d'allèles  $N_A$  et le nombre d'allèles privés  $P_A$  par population ont été estimés avec le logiciel Genepop v.4.2 (Raymond and Rousset, 1995) selon la méthode de Weir & Cockerham (1984).

# RESULTATS

---

## 1. IDENTIFICATION DES SNPs

### 1.1. Filtrage et alignement des séquences

Le run GBS (Illumina HiSeq) incluant les 73 échantillons sélectionnés de Tanzanie, du Burkina Faso, du Bénin et de la République Centrafricaine, nous a permis d'obtenir 206 203 194 séquences. A l'aide du programme Tassel v.5.2.15 (Bradbury et al., 2007), et en utilisant les paramétrages décrits dans le matériel et méthode du présent travail (élimination des séquences chimères, exemptes de barcode complet, de trop petite taille (<20 pb), celles de mauvaise qualité (Phred QS<20), ainsi que les séquences sous- (<10 copies) ou sur-représentées (>3x la moyenne de la « sequencing depth »), un premier filtrage majeur a été réalisé. A ce stade, le nombre total de séquences ayant passé cette première étape de filtrage s'élève à 270 814.

Lors de l'étape d'alignement de ces 270 814 séquences avec le génome de référence choisi *Felis catus* (Bowtie2 v.2.2.9 (Langmead and Salzberg, 2012)), 65% ont pu être alignées exactement une fois, 21,22% se sont alignées plus d'une fois et 13,77% ne se sont pas alignées du tout et n'ont pas été retenues pour la suite des analyses. Les séquences ayant le potentiel de s'aligner plus d'une fois, c'est-à-dire à plusieurs endroits distincts du génome, ont également été retirées de la base de données car il pourrait s'agir de régions présentes en multi-copies au sein du génome. Ainsi, le nombre de séquences correctement alignées s'élevait à 176 029.

### 1.2. Identification des SNPs et filtrage

Lors du « SNP calling » réalisé avec Tassel v.5.2.15 (Bradbury et al., 2007) et à la suite des premières étapes de filtrage (retrait des sites tri- et tétra-alléliques, des indels, des sites avec un mauvais score de qualité Phred, ainsi que des sites avec une fréquence de l'allèle mineur trop faible), le nombre de SNPs s'élevait à 66 033 pour l'ensemble des échantillons intégrés.

Après l'application des filtres complémentaires améliorant la qualité de notre base de données via l'élimination des sites ainsi que des échantillons présentant un trop grand nombre de données manquantes (code IUPAC « N »), 23 138 SNPs ont pu être retenus pour 66 individus. Par ailleurs, ce nombre est descendu à 9 250 SNPs suite à l'application de notre script ayant pour but de ne garder qu'un seul polymorphisme par séquences. Enfin, le retrait manuel des sites hétérozygotes pour l'ensemble des individus intégrés dans notre étude, a réduit ce nombre à 9 195 SNPs utilisés pour la suite des analyses. Notons enfin que le ratio transition *versus* transversion moyen,  $T_s : T_v$ , au sein de notre base de données était de 2,83. Un ratio substantiellement inférieur à 2 peut être indicatif d'erreurs de séquençage.

### 1.3. Tests préliminaires

#### 1.3.1. *Marqueurs microsatellites*

Tout comme lors de notre précédentes études sur le lion (Bertrand, 2013), le programme Micro-Checker v.2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) a indiqué la présence d'allèles nuls au sein de 5 microsatellites. Afin d'éviter tout biais, la base de données initiale a été ajustée selon ces résultats avant de poursuivre les analyses.

#### 1.3.2. *Marqueurs SNPs*

Chacune des populations identifiées sur base des analyses de « clustering » étaient à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Quelques SNPs se sont montrés en déséquilibre de liaison au sein d'une seule des populations de Tanzanie (Sud-ouest dénommée ci-après Cluster 3). Ils n'ont pas été retirés car ce déséquilibre n'apparaît qu'au sein de cette population. Ce déséquilibre disparaît au sein de la population lorsque l'analyse est refaite en excluant les 4 individus originaires du nord de la Tanzanie (géographiquement plus proche du Cluster 2 mais génétiquement intermédiaires aux deux clusters). Il s'agissait des échantillons 15 de Maswa Kimali, du 7 et 25 de Loliondo ainsi que du 46 du Serengeti. L'analyse lancée sur l'ensemble de la base de données afin de détecter les « outliers » nous a permis d'identifier 11 SNPs qui pourraient être sous sélection. Ils ont été retirés, laissant un total final de 9 184 SNPs pour 66 individus disponibles pour les analyses statistiques suivantes. Les 7 individus sur les 73 qui ont été retirés suite à l'application des filtres complémentaires étaient RCA3 pour la République Centrafricaine, BEN1 pour le Bénin, BUR13 pour le Burkina Faso et 5, 36, 42 et 59 pour la Tanzanie.

## 2. STRUCTURE DE L'ÉCHANTILLONNAGE

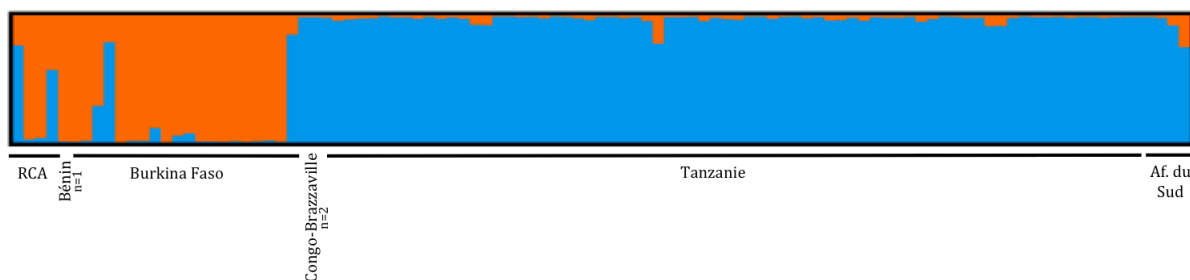
### 2.1. Sur base des microsatellites

L'analyse de la variabilité génétique sur base des microsatellites a été réalisée sur 103 échantillons, et non 104. En effet l'amplification des 11 microsatellites n'a pas été fructueuse pour l'échantillon tanzanien 57 (tissu), cet échec est probablement dû à sa faible concentration en ADN et/ou lié à la qualité de son ADN.

#### 2.1.1. *Echelle continentale*

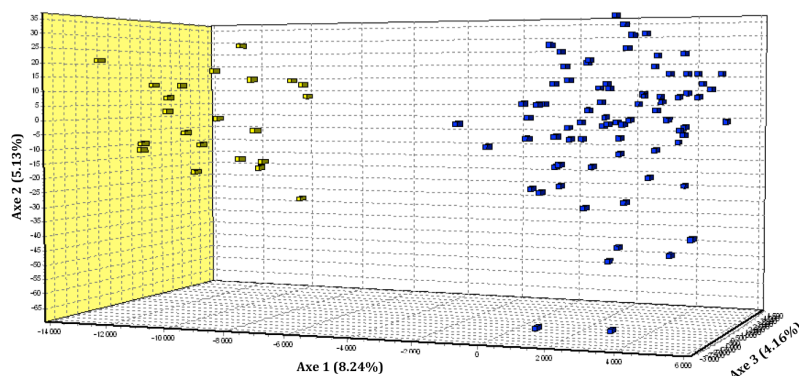
Les résultats obtenus grâce aux logiciels Structure v.2.3.4 (Falush et al., 2003; Pritchard et al., 2000) et CLUMPAK (Kopelman et al., 2015) suivant la méthode d'Evanno et al. (2005), semblent supporter l'existence de 2 lignées distinctes au niveau continental (*annexe 3*) : une première lignée regroupant 18 des 20 individus du Burkina Faso, 2 des 4 individus de République Centrafricaine et l'unique individu du Bénin ; et une seconde lignée regroupant 2 des 20 individus du Burkina Faso (BUR4 et BUR20), les 2 autres individus de la République Centrafricaine (RCA1 et RCA4), les 2 individus du Congo, les 73 individus de Tanzanie et les 3 individus d'Afrique du Sud (*figure 7*).





**Figure 7** : Graphique représentant la structure ( $K=2$ ) identifiée au niveau continental, incluant 103 échantillons (Structure v.2.3.4) et réalisée sur base de 11 microsatellites. Chaque barre verticale représente un individu et chaque couleur représente sa probabilité d'appartenir à chacun des clusters identifiés.

L'Analyse Factorielle des Correspondances (AFC) faite avec Genetix v.4.05 (Belkir et al., 2004) supporte également la séparation de notre échantillonnage en 2 lignées distinctes comme le montre la *figure 8*. Les 3 axes cumulés expliquent seulement 17,53% de la variabilité génétique totale (l'axe 1 en explique 8,24%, l'axe 2 en explique 5,13% et l'axe en explique 4,16%).



**Figure 8** : Graphique issu de l'Analyse Factorielle des Correspondances (Genetix v.4.05) effectuée à l'échelle continentale sur base des 11 microsatellites de l'étude. En jaune : la lignée Ouest/Centre, en bleu : la lignées Est/Sud.

### 2.1.1. *Echelle nationale au sein de la Tanzanie*

Au sein de la Tanzanie, le logiciel Structure v.2.3.4 (Falush et al., 2003; Pritchard et al., 2000) lancé pour des  $K$  population(s) allant de 1 à 5, n'a pas pu identifier de structuration plus fine. Le meilleur scénario supportait l'existence d'une seule population incluant l'ensemble des échantillons de Tanzanie. Notons que le meilleur  $K$  selon la méthode d'Evanno (Evanno et al., 2005) proposait l'existence 3 populations, mais ces dernières n'avaient aucun sens d'un point de vue biogéographique. En effet, la visualisation graphique des probabilités d'affiliation de chacun des échantillons pour  $K=3$  indique une probabilité égale de chaque échantillon d'appartenir à chacun des 3 clusters (soit une probabilité d'approximativement  $1/3$ , ou 0,333, pour chaque individu d'appartenir à chaque cluster). Les différents scénarios pour  $K$  allant de 1 à 5 sont illustrés à l'*annexe 4*. L'AFC faite avec Genetix v.4.05 (Belkir et al., 2004) n'a montré aucune structuration pour la Tanzanie non plus.

## 2.2. Sur base des SNP's

### 2.2.1. *Echelle continentale*

Tout comme sur base des microsatellites, le programme Structure v.2.3.4 (Falush et al., 2003; Pritchard et al., 2000) supporte à nouveau l'existence de 2 lignées à

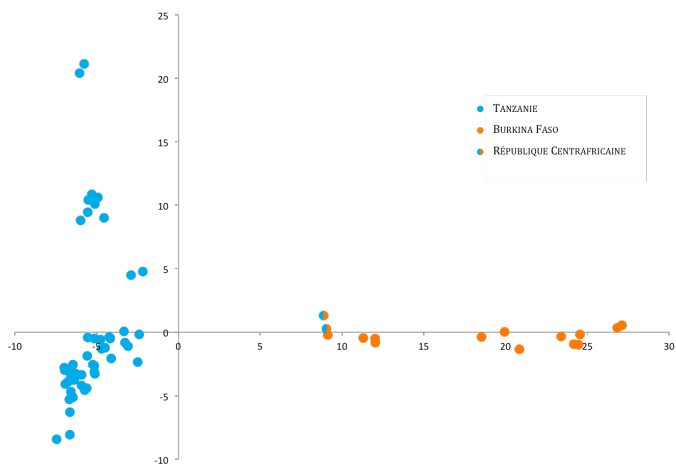
l'échelle continentale : une lignée regroupant les échantillons de Tanzanie et une lignée regroupant les échantillons du Burkina Faso (*figure 9*). Par ailleurs, le statut intermédiaire des 2 échantillons de la République Centrafricaine (probabilités d'appartenance équivalentes pour chacune des 2 lignées) semble indiquer un certain degré d'admixture. La méthode d'Evanno (Evanno et al., 2005) supporte l'existence des 2 lignées (*annexe 5*).



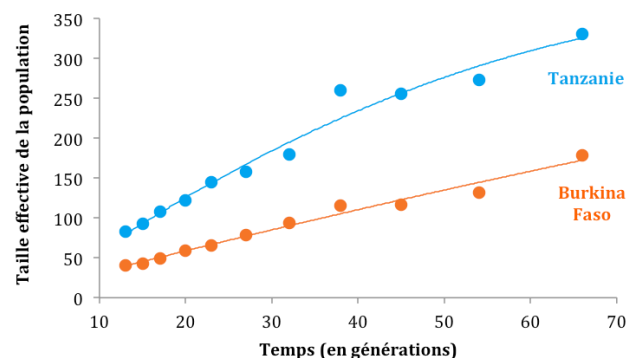
**Figure 9** : Graphique représentant la structure (K=2) observée au sein des 66 échantillons à l'échelle continentale d'après le programme Structure v.2.3.4 et sur base des 9 184 SNPs génotypés. Chaque barre verticale représente un individu et chaque couleur représente sa probabilité d'appartenir à chacun des clusters identifiés.

La représentation graphique de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) permet aussi de distinguer nettement ces 2 lignées (*figure 10*). La composante principale 1 explique 12,1% de la variabilité génotypique, alors que la composante principale 2 n'en explique que 3,6% au niveau Tanzanien.

L'analyse visant à estimer l'évolution de la taille effective des populations montre un déclin régulier progressif en nombre d'individus effectifs au fil des générations de lions (*figure 11*). Selon notre échantillonnage, les populations de Tanzanie et du Burkina Faso comptaient respectivement environ 330 et 175 individus il y a 65 générations, et en comptaient environ 75 et 40 individus il y a 10 générations.



**Figure 10** : Graphique de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) réalisée sur base des 9 184 SNPs et illustrant les deux lignées structurant les 66 échantillons, analyse. En orange : lignée Ouest/Centre, en bleu : lignée Est, en orange/bleu : échantillons intermédiaires de République Centrafricaine.

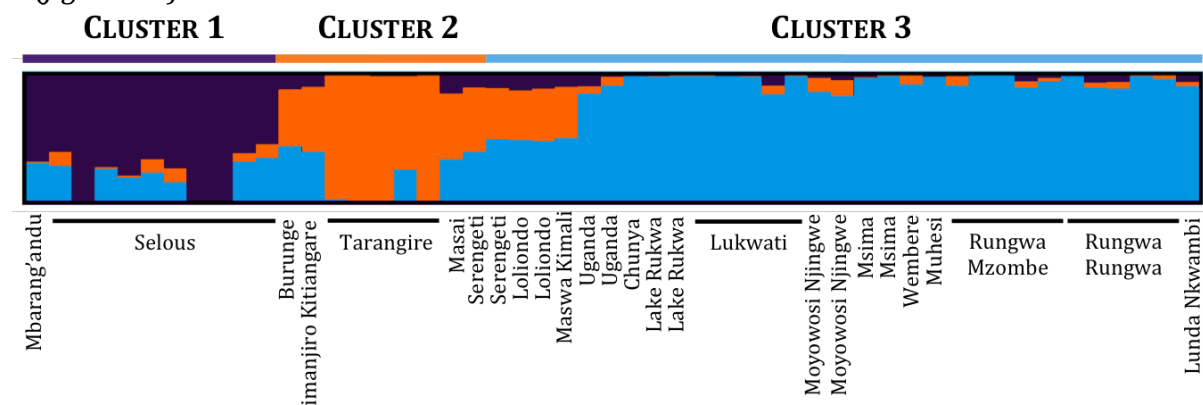


**Figure 11** : Courbes représentant l'évolution de la taille effective des populations au fil des générations de lions en Tanzanie (bleu) et au Burkina Faso (orange), selon les 9 184 SNPs de l'étude et grâce au logiciel SNeP v1.1.

### 2.2.1. Echelle régionale

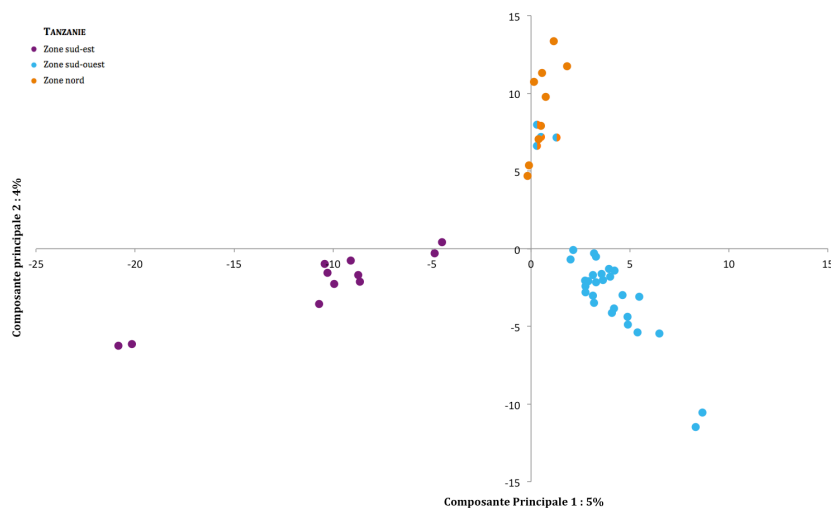
Suite à la distinction de 2 lignées à l'échelle continentale, un deuxième round d'analyses avec Structure v.2.3.4 (Falush et al., 2003; Pritchard et al., 2000) a permis de tester la structure à l'échelle régionale au sein de chacune de ces deux lignées : Ouest/centre (Burkina Faso et République Centrafricaine) et Est (Tanzanie).

Au sein de la lignée Ouest-centrale, la méthode d'Evanno et al. (2005) indique l'existence d'une structuration en 3 populations : une population incluant les 2 échantillons de la République Centrafricaine, une population incluant 11 des 13 échantillons du Burkina Faso et enfin une population incluant les 2 derniers individus du Burkina Faso, à savoir BUR1 et BUR5 de la zone de chasse d'Ougarou. Comme nous avons décidé de garder les populations de minimum 5 individus pour les analyses statistiques afin d'avoir une bonne représentativité des populations, les 2 échantillons de République Centrafricaine et les 2 échantillons d'Ougarou (Burkina Faso) n'ont pas été pris en compte pour la suite des analyses. Concernant la lignée Est, c'est-à-dire les échantillons de Tanzanie, la structuration supportée par la méthode d'Evanno et al. (2005) compte également 3 populations (*annexe 6*) : une population géographiquement localisée au sud-est que nous appellerons cluster 1, une population au nord que nous appellerons cluster 2 et enfin une population au sud-ouest que nous appellerons cluster 3 (*figure 12*).

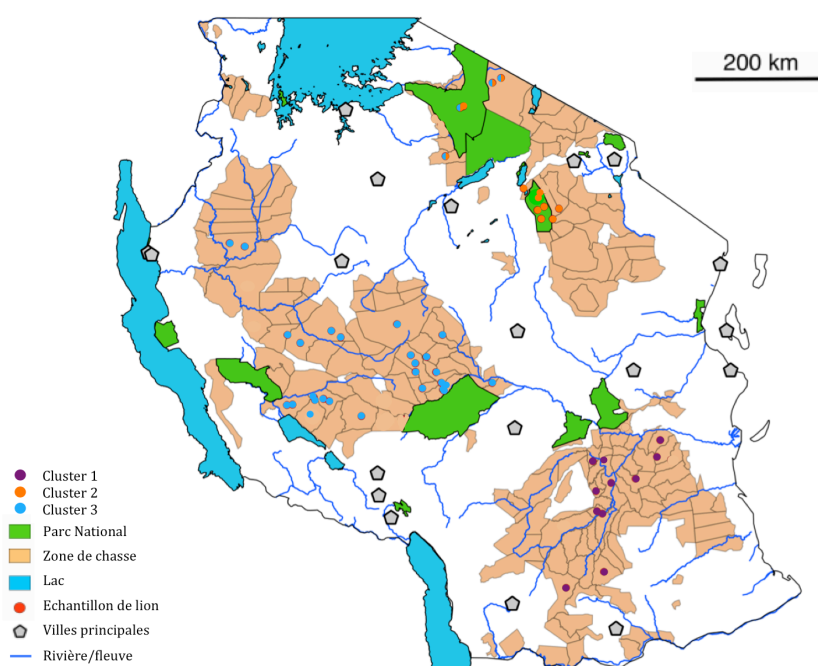


**Figure 12** : Graphique obtenu à l'aide du programme CLUMPAK reflétant la structuration existant en Tanzanie. L'analyse a été effectuée sur base de 9,184 SNPs. Cluster 1 : zone sud-est, cluster 2 : zone nord et cluster 3 : zone sud-ouest. Chaque barre verticale représente un individu et chaque couleur représente sa probabilité d'appartenir à chacun des clusters identifiés.

L'ACP réalisée sur les individus tanzaniens supporte l'existence de ces 3 populations bien distinctes (*figure 13*). La composante principale 1 explique 5% de la variabilité génotypique entre le cluster 1 et le cluster 3 tandis que la composante principale 2 explique 4% de la variabilité génotypique entre les 3 clusters. Ces trois populations correspondent aux clusters définis par l'analyse Structure, exception faite de 4 échantillons du groupe sud-ouest (en bleu et orange - cluster 3) qui semblent se rapprocher du groupe nord (en orange - cluster 2). Ces 4 échantillons correspondent aux échantillons 7, 15, 25 et 46. Ils sont géographiquement plus proches du groupe nord (Loliondo, Maswa Kimali et Serengeti) comme le montre la *figure 14* alors qu'ils présentent un profil génétique intermédiaire (admixture) comme le montre la *figure 12*. Ces échantillons ont des probabilités génétiques d'appartenance au cluster 3 légèrement plus élevées que 0,5, qui ne sont pas aussi discriminantes que celles des autres individus, c'est pour cela que l'on propose une possibilité d'admixture.



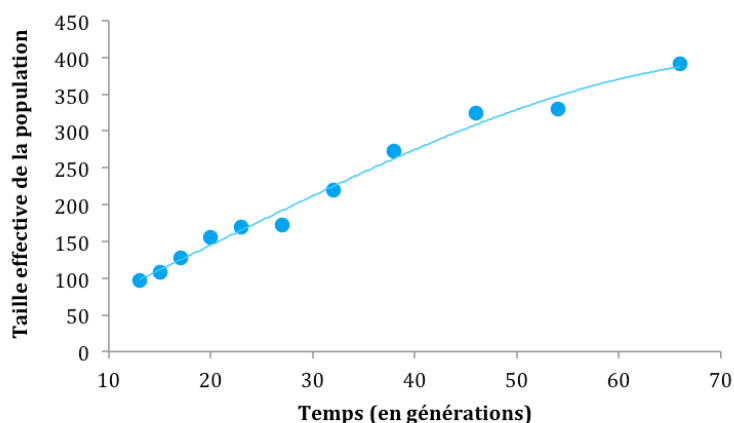
**Figure 13** : Graphique de l'ACP réalisée avec Tassel permettant de visualiser la structuration existant au sein des échantillons tanzanien (n=51 et 9 184 SNPs).



**Figure 14** : Carte de la Tanzanie illustrant la répartition géographique des 66 échantillons analysés sur base des 9184 SNPs de l'étude, et structurés selon les 3 clusters définis.

Enfin, l'arbre généré par le programme Tassel avec la méthode de Neighbor-Joining semble bien confirmer l'existence de ces 3 populations mises en évidence par Structure (*annexe 7*). On observe cependant un sous-groupe de 5 individus qui se détache en premier, avant les sous-groupes correspondant aux 3 clusters identifiés, à savoir les échantillons 7, 15, 25, 46 et 47. On peut notamment remarquer que l'on retrouve parmi eux les 4 individus de la zone sud-ouest qui se rattachaient au groupe nord sur le graphique de la structure tanzanienne illustrée à la *figure 13*.

L'analyse visant à estimer l'évolution de la taille effective des populations montre également un déclin régulier en nombre d'individus au fil des générations de lions au sein des 3 clusters identifiés en Tanzanie, comme le montre la *figure 15* pour le cas de la région sud-ouest (cluster 3). Selon notre échantillonnage, les 3 populations de Tanzanie identifiées comptaient respectivement 60, 59 et 127 individus pour les clusters 1 (Sud-Est), 2 (Nord) et 3 (Sud-Ouest) il y a 17 générations, et en comptaient 47, 46 et 97 il y a 13 générations.



**Figure 15** : Courbe représentant l'évolution de la taille effective de la population Sud-Ouest (cluster 3) de Tanzanie au fil des générations de lions, selon les 9 184 SNPs de l'étude et grâce au logiciel SNeP v1.1.

### 3. DIVERSITE GENETIQUE

#### 3.1. Sur base des microsatellites

Après vérification via la méthode de Fisher, l'échantillonnage semble respecter l'équilibre de Hardy-Weinberg ( $p$ -value > 0,05) et le test de déséquilibre de liaison confirme que les microsatellites sont bien neutres et donc non-associés entre eux ( $p$ -value > 0,05). Cependant, pour la suite des analyses basées sur les microsatellites, 4 des 103 échantillons ont été retirés car leur probabilité d'affiliation à l'un ou l'autre cluster ne permettait pas de les classer avec certitude. Il s'agit de RCA1 ( $p=0,230$ ) et de RCA4 ( $p=0,427$ ) pour la République Centrafricaine et de BUR4 ( $p=0,207$ ) et BUR20 ( $p=0,150$ ) pour le Burkina Faso. Le nombre d'individus génotypés s'élève donc à 99 individus : 21 représentant la lignée Ouest/Centre et 78 représentant la lignée Est/Sud.

Les estimations des  $F$ -statistiques étaient dans l'intervalle de confiance à 95% et donc significatifs. L'analyse de la diversité génétique existant entre les 2 lignées indique un indice de fixation  $F_{ST}$  moyen de 0,144 (valeurs de 0,102 à 0,185). Les valeurs de  $F_{ST}$  varient entre 0 et 1 et plus la valeur est proche de 0, plus la ressemblance entre les populations est importante. Ici, le  $F_{ST}$  indique une différenciation génétique modérée entre les 2 lignées. Plus précisément, 85,6% de la variabilité génétique totale est expliquée par la variation intra-lignée et donc 14,4% de cette variabilité est attribuée aux différences entre les 2 lignées. Par ailleurs, un autre indice de fixation, le  $G_{ST}$ , a donné une valeur de 0,089. La distance génétique existant entre les 2 populations a été estimée par la distance de Cavalli-Sforza et a donné une valeur de 0,161.

L'indice de consanguinité  $F_{IS}$  pour les 2 lignées regroupées était de 0,086. Or, plus le  $F_{IS}$  est proche de 0, plus la population est proche de la situation de panmixie. La valeur du  $F_{IS}$  global est donc indicative d'un léger excès en homozygotes. En revanche, les indices  $F_{IS}$  moyen calculés pour chacune des lignées a révélé une valeur plus conséquente pour la lignée Ouest/centre (0,138) que pour la lignée Est/Sud (0,064). L'excès en homozygote apparaît dès lors beaucoup plus important dans la lignée Ouest/centre qu'au sein de la lignée Est, bien qu'elle ne soit tout de même pas négligeable. Ces valeurs sont reprises dans le *tableau 6*. Logiquement, la valeur moyenne d'hétérozygotie observée  $H_0$  est inférieure à la valeur moyenne d'hétérozygotie attendue non biaisée  $H_{NB}$  au sein des deux lignées. Ceci traduit un écart positif qui montre un déficit en hétérozygotes dans les 2 lignées. Les valeurs des résultats obtenus sont résumées dans le *tableau 6*.

La richesse allélique, ou nombre d'allèles présents à un locus donné, apparaît nettement meilleure pour la lignée Est/Sud ( $A_R$  moyenne pour tous les loci = 7,273) que pour la lignée Ouest/Centre ( $A_R = 5,091$ ) (*tableau 6*). Les chances d'obtenir de nouveaux allèles augmentant en fonction de l'échantillonnage, cette différence pourrait s'expliquer par un nombre d'individus analysés nettement moindre pour la lignée Ouest/Centre ( $n=21$ ) par rapport à la lignée Est/Sud ( $n=78$ ). Les nombres d'allèles privés confirment ce résultat avec un nombre d'allèles privés 4 fois plus important dans la lignée Est/Sud par rapport à la lignée Ouest/Centre. Cependant, ce résultat pourrait aussi s'expliquer par une réalité biologique et des populations beaucoup isolées et fragmentées dans la région Ouest/Centre.

	NOMBRE INDIVIDUS N	NOMBRE ALLELES TOTAL $N_A$	NOMBRE ALLELES PRIVES $P_A$	NOMBRE ALLELES PAR LOCUS $A_R$	HETEROZYGOTIE OBSERVEE $H_O$	HETEROZYGOTIE ATTENDUE (NON BIAISEE) $H_{NB}$	COEFFICIENT DE CONSANGUINITE $F_{IS}$
OUEST/CENTRE	21	56	8	5,091	0,558 ± 0,153	0,655 ± 0,126	0,138 ± 0,033
EST/SUD	78	80	32	7,273	0,681 ± 0,094	0,731 ± 0,083	0,064 ± 0,017

**Tableau 6** : Tableau récapitulatif des statistiques descriptives illustrant la variabilité génétique pour chaque lignée calculée à l'aide de Genetix v.4.05 ( $A_R$ ,  $H_O$ ,  $H_{NB}$ ,  $F_{IS}$ ) et de Genepop v.4.2 ( $N_A$ ,  $P_A$ ) estimée à partir des 11 microsatellites inclus dans la présente étude.

### 3.2. Sur base des SNP's

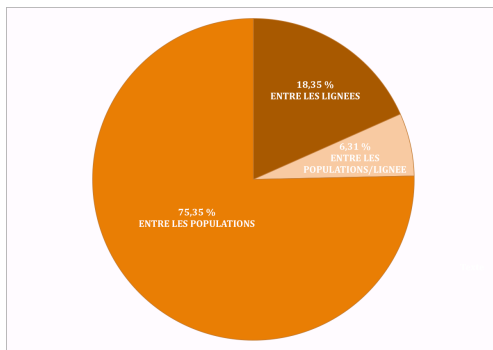
Le *tableau 7* reprend les résultats de l'analyse moléculaire de la variance AMOVA réalisée avec le programme Arlequin v.3.5 Ainsi, 75% de la variabilité génétique totale est expliquée par les différences entre les 4 populations ( $n > 5$ ), alors qu'environ 18% de cette variabilité est expliquée par les différences entre les lignées Ouest/Centre et Est. Le plus faible pourcentage (environ 6%) s'observe entre les populations au sein de chacune des lignées (*tableau 7* et *figure 16*).

TYPE DE VARIATION	d.f.	SOMME DES CARRES	VARIANCE DES COMPOSANTS	% DE VARIATION	INDICE DE FIXATION	P-VALUE
ENTRE LES LIGNEES	1	3098,391	52,873	18,35	$F_{CT} = 0,183$	0,089 ± 0,010
ENTRE LES POPULATIONS/LIGNEE	4	2125,872	18,172	6,31	$F_{SC} = 0,077$	0,000 ± 0,000
ENTRE LES POPULATIONS	126	27357,836	217,126	75,35	$F_{ST} = 0,247$	0,000 ± 0,000
TOTAL	131	32582,098	288,171			

**Tableau 7** : Résultats de l'analyse AMOVA réalisée avec Arlequin sur base des 9 184 SNPs et des lignées et populations identifiées à l'aide du logiciel Structure.

La valeur de  $F_{ST}$  entre les lignées Ouest/Centre et Est/Sud donne une valeur de 0,126. La comparaison des  $F_{ST}$  des populations deux à deux a été faite avec Arlequin v.3.5. Toutes les p-values des  $F_{ST}$  étaient significatives (p-values < 0,05) (*tableau 8*). Ce tableau illustre bien que les populations les moins différenciées entre elles sont les plus proches géographiquement, avec les valeurs les plus faibles observées entre les 3



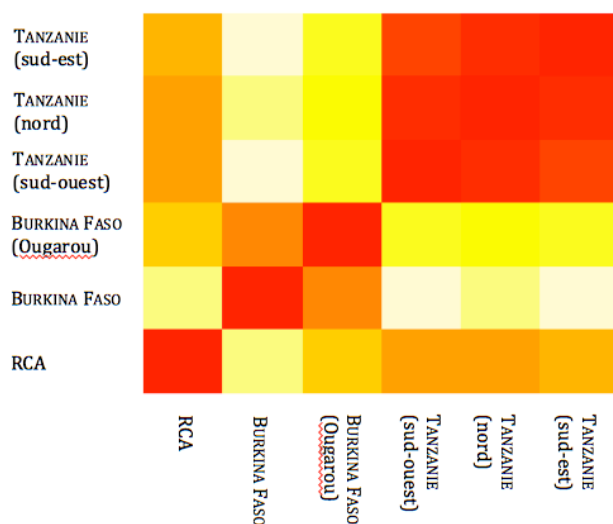


**Figure 16 :** Secteurs graphiques représentant les pourcentages de variance moléculaire qui expliquent la variabilité génétique des 62 individus analysés sur base des 9 184 SNPs selon l'indice de fixation considéré  $F_{CT}$ ,  $F_{SC}$  ou  $F_{ST}$ .

populations de Tanzanie. Cependant, on peut tout de même remarquer que la population du Nord de la Tanzanie semble plus éloignée de la population du Sud-Est ( $F_{ST} = 0,083$ ) que de celle du Sud-Ouest ( $F_{ST} = 0,046$ ). Les différenciations entre ces populations sont graphiquement représentées par la *figure 17*, où plus la couleur tend vers le rouge, plus les populations sont proches. Les populations comprenant les 2 individus de République Centrafricaine et les 2 individus d'Ougarou au Burkina Faso sont présentes dans le *tableau 8* et la *figure 17* et montrent des valeurs plus importantes ; mais ces populations sont à prendre avec beaucoup de précaution puisqu'elles ne représentent que 2 individus chacune.

	TANZANIE (sud-est)	TANZANIE (sud-ouest)	TANZANIE (nord)	BURKINA FASO	BURKINA FASO (Ougarou)	RCA
TANZANIE (sud-est)	0	***	***	***	*	**
TANZANIE (sud-ouest)	0,057	0	***	***	**	***
TANZANIE (nord)	0,083	0,046	0	***	*	*
BURKINA FASO	0,286	0,246	0,282	0	*	**
BURKINA FASO (Ougarou)	0,335	0,300	0,328	0,153	0	ns
RCA	0,193	0,160	0,178	0,220	0,295	0

**Tableau 8 :** Pairwise  $F_{ST}$  avec (\*) p-value < 0,05, (\*\*) p-value < 0,01 et (\*\*\*) p-value < 0,001.



**Figure 17 :** Représentation visuelle du tableau des  $F_{ST}$  (tableau 8) réalisée avec le package « heatmap.plus » sur RStudio v.3.3.1 (R Core Team, 2016). Plus la couleur tend vers le rouge, plus les populations sont proches.

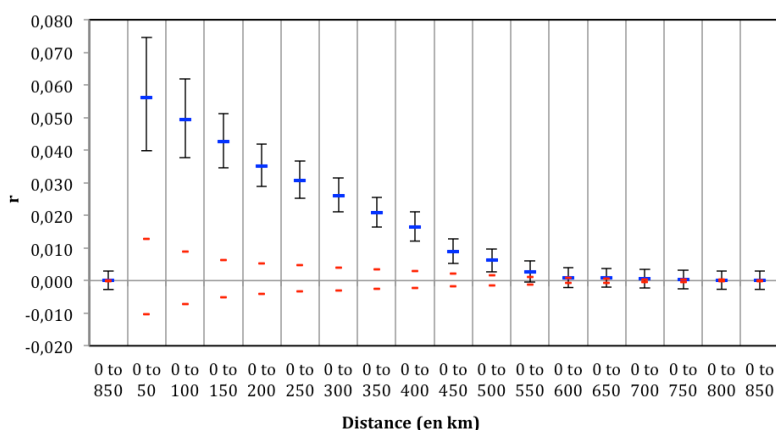
L'analyse d'isolement par la distance basée sur les 3 097 SNPs (base de données avec 9% de données manquantes) n'a montré aucun profil significatif en Tanzanie ( $r = -0,071$ , p-value = 0,660) pour les échantillons analysés.

Pour le calcul des statistiques descriptives suivantes, 2 des 6 populations, à savoir les individus de RCA et les individus d'Ougarou (Burkina Faso), ont été retirées car le nombre d'individus était inférieur à 5 et ne pouvait pas être considéré comme représentatif d'une population. L'indice de consanguinité  $F_{IS}$  global calculé avec GenAlix sur base des 3 097 SNPs de la base de données réduite a donné une valeur de  $0,189 \pm 0,004$ . Dans chacun des clusters, l'hétérozygotie observée  $H_0$  au sein des populations étudiées est plus faible que l'hétérozygotie attendue  $uH_E$  (tableau 9). Cet excès en homozygotes est également illustré par les valeurs des coefficients de consanguinité  $F_{IS}$ . La population tanzanienne « Nord » (cluster 2) présente un risque non négligeable (0,210), suivie de la population « Sud-Ouest » (cluster 3) avec un risque plus moyen mais non négligeable également. Enfin, la population tanzanienne « Sud-Est » (cluster 1) présente les valeurs les plus faibles (0,078).

	NOMBRE D'INDIVIDUS N	HETEROZYGOTIE OBSERVEE $H_0$	HETEROZYGOTIE ATTENDUE (NON BIAISEE) $uH_E$	COEFFICIENT DE CONSANGUINITE $F_{IS}$
TANZANIE sud-est (cluster 1)	10,530 $\pm$ 0,012	0,239 $\pm$ 0,004	0,275 $\pm$ 0,003	0,078 $\pm$ 0,007
TANZANIE sud-ouest (cluster 3)	30,209 $\pm$ 0,016	0,257 $\pm$ 0,003	0,299 $\pm$ 0,003	0,124 $\pm$ 0,005
TANZANIE nord (cluster 2)	8,527 $\pm$ 0,012	0,203 $\pm$ 0,003	0,285 $\pm$ 0,003	0,210 $\pm$ 0,007
BURKINA FASO (hors Ougarou)	9,538 $\pm$ 0,020	0,165 $\pm$ 0,003	0,240 $\pm$ 0,004	0,242 $\pm$ 0,007

**Tableau 9** : Hétérozygoties et indices de consanguinité calculés avec GenAlix v.6.502 sur une base de données acceptant 9% de données manquantes parmi les SNPs génotypés, soit un nombre de 3 097 SNPs après réduction.

L'analyse d'autocorrélation spatiale met en évidence une diminution des relations entre individus en fonction de l'augmentation des distances géographiques les séparant. Cependant, même si les valeurs approchent sensiblement zéro à une distance d'environ 750 km, les coefficients d'autocorrélation restent proches de 0 pour toutes les classes de distances. Même si on trouve une corrélation, ces résultats ne montrent pas de relation statistiquement claire entre les distances géographique et génétique (uniquement 2 échantillons distants de plus 750 km). Il n'existe donc pas de structuration plus fine au sein des clusters et ces résultats supportent les résultats obtenus via l'analyse d'IBD.



**Figure 18** : Corrélogramme représentant la moyenne des coefficients d'autocorrélation « r » en fonction des 18 classes de 50 en 50 km. Les tirets bleus représentent les valeurs moyennes de « r ». Les tirets rouges représentent les limites supérieures et inférieures de 95% de la distribution nulle, c'est-à-dire sans structure spatiale. Les barres d'erreur représentent 95% de l'intervalle de confiance pour « r ».

# DISCUSSION

---

## 1. COMPARAISON DES 2 MARQUEURS UTILISES POUR CETTE ETUDE

Les résultats de cette étude montrent clairement une différence entre les marqueurs microsatellites et les marqueurs moléculaires SNPs. En effet, tout comme lors de notre précédente étude (Bertrand, 2013), et malgré un échantillonnage important pour la Tanzanie ( $n = 73$ ), il n'a pas été possible de détecter une quelconque structure génétique pour les animaux de cette région ( $K=1$ ). Au contraire, les analyses développées sur base des SNPs montrent quant à elles l'existence de 3 populations bien distinctes. Puisque les microsatellites rendent compte généralement d'une diversité génétique plus récente que les SNPs, il n'est pas logique que l'on ne retrouve pas une structuration tanzanienne identique sur base des microsatellites. Les marqueurs SNPs sembleraient donc donner un résultat nettement plus fin pour la structuration des populations, ce qui a déjà été observé lors d'autres études (Helyar et al., 2011; Liu et al., 2005). A titre d'exemple, Karlsson et al. (2007) ont montré une structure nettement plus complexe chez le chien domestique sur base de marqueurs SNPs, par rapport aux données obtenues sur base de microsatellites, et Rašić et al. (2014) ont obtenu un résultat similaire chez le moustique *Aedes aegypti*.

Cette différence de structure observée pour chacun des marqueurs pourrait être tout simplement liée à la différence du nombre de marqueurs utilisés, à savoir 11 microsatellites *versus* 9184 SNPs. En effet, ces marqueurs possédant des caractéristiques différentes (e.g. taux de mutation, nombre d'allèles), il est généralement admis qu'il faille plus de marqueurs SNPs pour obtenir une information génétique similaire à celle obtenue sur base des microsatellites (Fabbri et al., 2012; Kalinowski, 2002; Liu et al., 2005; Morin et al., 2004). En général, il est considéré qu'un marqueur microsatellite correspondrait à la variabilité observée pour 3 SNPs (Kruglyak 1997, Fernandez et al. 2013). En revanche, Kalinowski (2002) a proposé que la puissance d'analyse obtenue avec 100 SNPs neutres serait assez proche de celle obtenue avec 10 à 20 microsatellites. Liu et al. (2005) postule même que les SNPs ayant les plus grandes variations de fréquences alléliques seraient équivalents, voire supérieurs, à un seul microsatellite. Ainsi, les SNPs, malgré un taux d'évolution moins rapide ( $10^{-8}$  à  $10^{-9}$  contre  $10^{-4}$  pour les microsatellites (Brumfield et al., 2003)) et donc une information génétique propre plus faible, apparaissent donner une information plus précise par rapport aux marqueurs microsatellites, principalement par le fait qu'ils sont généralement utilisés en plus grand nombre et qu'ils sont représentatifs de tout le génome. Même en considérant un facteur de 10 entre les microsatellites et les SNPs, notre analyse de 9 184 SNPs équivaldrait à la puissance de 918 microsatellites, contre 11 utilisés dans notre étude. Suivant cette hypothèse, le nombre de microsatellites de la présente étude pourrait être considéré comme étant trop faible pour mettre en évidence une structure fine des populations de lions tanzanienne.

On peut ainsi supposer que l'utilisation d'un plus grand nombre de microsatellites augmenterait la finesse de l'analyse et que celle-ci donnerait une structure similaire à celle observée avec les marqueurs SNPs. A titre d'exemple, une récente étude portant sur la structuration des populations de buffles africains (*Syncerus caffer*) a montré des résultats similaires pour les microsatellites et les SNPs (Smitz

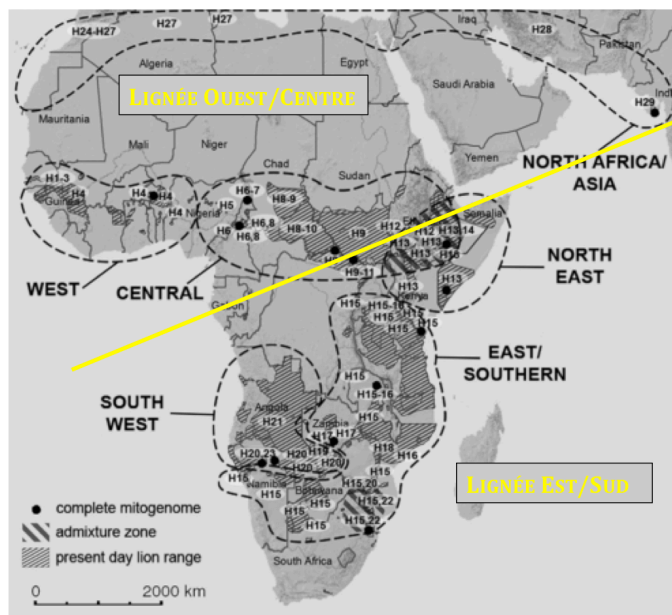
2016, unpublished data). Dans ce cas de figure, le nombre de marqueurs microsatellites était plus important et leur polymorphisme était également plus important. La finesse d'analyse de ces marqueurs microsatellite a ainsi été beaucoup plus puissante. Celle-ci varie en effet en fonction du nombre de marqueurs mais également en fonction du niveau de variabilité de chacun d'entre eux. Les 11 microsatellites utilisés pour notre étude sur le lion étaient les mêmes que ceux utilisés par Laura Bertrand en 2013, qui s'était basée alors sur l'étude de Dubach et al. (2013). Ces 11 microsatellites correspondaient à différents chromosomes du chat domestique *Felis catus*, étant par ailleurs l'espèce utilisée pour l'alignement des séquences lors des analyses SNPs. Le fait que ces marqueurs microsatellites n'aient pas été sélectionnés sur le lion mais sur une espèce proche, a pu diminuer leur polymorphisme et dès lors, leur finesse d'analyse.

En ce qui concerne les estimations des F-statistiques, on retrouve des valeurs d'indice de consanguinité  $F_{IS}$  sur base des microsatellites du même ordre de grandeur que ceux de l'étude de Laura Bertrand (2013). Même si cet indice n'est pas comparable entre différents marqueurs pour des raisons mathématiques (e.g. différents taux de mutations, différentes hétérozygoties)(Helyar et al., 2011), les estimations des indices  $F_{IS}$  sur base des SNPs ont montré une sensibilité élevée aux pourcentage de données manquantes accepté parmi les SNPs. En effet, avec la base de données initiale, c'est-à-dire avec 9 184 SNPs, le pourcentage de données manquantes était d'environ 40% et il en résultait des valeurs de  $F_{IS}$  très élevées. Une rectification a été apportée avec une deuxième analyse où seulement 9% de données manquantes ont été acceptés (ce qui correspondait à 3 097 SNPs), et les estimations des valeurs de  $F_{IS}$  étaient nettement meilleures. En ce qui concerne les valeurs de  $H_E$  et  $H_O$ , les deux analyses ont montré des valeurs comparables, les données manquantes ne semblent donc pas les affecter. De plus, les SNPs étant des marqueurs bi-alléliques, les hétérozygoties ne peuvent pas dépasser 0,5 (Helyar et al., 2011; Tokarska et al., 2009). Ainsi, l'estimation de certaines F-statistiques semble être plus exigeante avec les marqueurs SNPs.

## 2. STRUCTURATION ET DIVERSITE GENETIQUE DE L'ESPECE

### A l'échelle continentale

Les résultats des analyses de structure de cette étude supportent une fois encore nettement la structuration de la sous-espèce *Panthera leo leo* en minimum 2 lignées distinctes au sein de l'Afrique : une lignée Ouest/Centre et une lignée Est/Sud. Les analyses F-statistiques, quant à elles, donnent un indice de fixation  $F_{ST}$  reflétant une différenciation modérée entre les 2 lignées sur base des microsatellites ( $F_{ST} = 0,144$ ) et une différenciation du même ordre de grandeur sur base des SNPs ( $F_{ST} = 0,126$ ). Ce résultat soutient l'existence des deux lignées Ouest/Centre et Est/Sud, déjà identifiée au sein de précédentes études dont Antunes et al. (2008); Barnett et al. (2006a); Barnett et al. (2006b); Barnett et al. (2014); Bauer & Nowell (2004); Bauer & Van Der Merwe (2004); Bertola et al. (2015); Bertola et al. (2011); Chardonnet (2002); Bertrand (2013), soutient que le statut taxonomique de la sous-espèce est à revoir. Récemment, Bertola et al. (2016) parlent même de 3 clades sous-structurant chacune des 2 grandes lignées : les clades Nord/Asie, Ouest et Centre pour la lignée nord, et les clades Nord/Est, Est/Sud et Sud/Ouest pour la lignée sud (*figure 19*). Cependant, la présente étude ne peut pas confirmer cette sous-structuration au sein de chacune des 2 lignées puisque la majorité de l'échantillonnage est situé en Tanzanie et ne représente pas le continent de manière homogène.



**Figure 19 :** Carte représentant la limite approximative qui distinguerait les lignées Ouest/Centre et Est/Sud (en jaune) et les 3 clades identifiés dans chacune des 2 lignées (en pointillés noirs) par Bertola et al. (2016). Modifié depuis Bertola et al. (2016).

La distinction entre les clades Ouest et Centre avait aussi déjà été proposée par Barnett et al. (2006b; 2006a; 2014). D'après Bertola et al. (2016), cette différenciation semblerait avoir été influencée par le fleuve Niger, 3<sup>ème</sup> plus long fleuve d'Afrique et qui encadre presque totalement l'ouest africain. Ce fleuve serait également une barrière permanente pour d'autres espèces (e.g. Antilope rouanne)(Bertola et al. 2016). Les résultats de structure obtenus sur base des SNPs montrent des probabilités d'appartenance équivalentes pour chacune des 2 lignées pour la République Centrafricaine, suggérant ainsi une présence d'admixture pour ces 2 échantillons. Les résultats basés sur les microsatellites, eux, divisent les 4 échantillons de République Centrafricaine deux à deux dans chacune des 2 lignées (*figure 7*). Ce cas n'est pas comparable à celui observé sur base des SNPs car dans le cas des microsatellites, les probabilités d'appartenance ne sont pas intermédiaires et indiquent une forte appartenance pour les échantillons concernés dans chacune des 2 lignées. Ce résultat reste à ce jour inexplicé et pourrait provenir d'un biais lié à la taille de l'échantillonnage. En revanche, l'arbre effectué par Neighbor-Joining montre clairement la séparation entre les individus de République Centrafricaine et les individus du Burkina Faso. De manière intéressante, l'analyse de structure effectuée sur base des marqueurs SNPs et réalisée uniquement sur la lignée Ouest/Centre suggère l'existence de trois sous-populations pour cette région : une correspondant aux animaux de la République Centrafricaine et deux autres populations situées au Burkina Faso (une de 11 individus, provenant de Pagou-Tandougou, de Singou, de Kourtiagou, de Koakrana, de Konkombouri et de Pama ; et une de 2 individus, provenant d'Ougarou). Ce résultat pourrait ainsi suggérer l'existence d'une sous-structuration au niveau de cette région. Cependant, la région d'Ougarou et les autres zones étudiées du Burkina Faso telles que Singou et Pagou-Tandougou sont très proches géographiquement et ne forment qu'un écosystème (P. Chardonnet, pers. com. 2016). Une étude plus poussée effectuée sur un échantillonnage plus important permettrait de vérifier si une telle sous-structuration existe au sein de cette région. Notre étude ne permet donc pas de soutenir la distinction des clades Ouest et Centre.

Par ailleurs, les 2 échantillons du Congo-Brazzaville semblent totalement se rapprocher de la lignée Est/Sud, pourtant très éloignée géographiquement. Etant donné que les ADNs de ces échantillons provenaient de dents collectées sur des individus tués en 2005 (et donc avec des possibilités d'ADNs de mauvaise qualité) et de seulement 2

individus (derniers lions de la forêt primaire du Parc National d'Odzala), les résultats les concernant sont à prendre avec précaution (Bertrand, 2013). De plus, les extractions d'ADN ayant combiné avec ces 2 échantillons des échantillons tanzaniens plus récents et avec des ADNs de meilleure qualité, les risques de contamination sont à envisager (Bertrand, 2013). Une étude effectuée sur des échantillons de meilleure qualité ou sur d'autres individus permettra de confirmer ou d'infirmer ce résultat.

Les indices de consanguinité  $F_{IS}$  calculés sur base des microsatellites indiquent une valeur de 0,138 pour la lignée Ouest/Centre et une valeur de 0,064 pour la lignée Est/Sud. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus par Laura Bertrand (2013) et corroborent un risque de consanguinité pour la lignée Ouest/Centre. Le  $F_{IS}$  calculé sur base des SNPs donne une valeur 0,242 pour la lignée Ouest/Centre et de 0,189 pour la lignée Est/Sud. Cette valeur ne peut pas être comparée au  $F_{IS}$  obtenu sur base des microsatellites mais elle pourrait conforter les résultats obtenus avec les microsatellites et donc, l'hypothèse d'un risque de consanguinité plus important au sein de la lignée Ouest/Centre qu'au sein de la lignée Est/Sud. Le fait que la lignée Ouest/Centre semble présenter une diversité génétique plus faible que la lignée Est/Sud, à savoir une richesse allélique et une hétérozygotie observée plus faibles pour la lignée Ouest/Centre ( $A_R = 5,10$  et  $H_O = 0,56$ ) que pour la lignée Est/Sud ( $A_R = 7,30$  et  $H_O = 0,68$ ) peut être expliqué par deux hypothèses. La première est tout simplement liée à l'échantillonnage qui était nettement moindre pour la région Ouest/Centre. Cette hypothèse ne pourra être vérifiée que par l'étude d'un plus grand nombre d'individus pour cette région. Par exemple, Bertola et al. (2015) ne relèvent pas une faible diversité génétique en Afrique centrale et de l'ouest, comme cela pourrait être attendu. Cependant, leur étude comprend pour cette région une majorité d'échantillons provenant des pays du Centre et non de l'Ouest, comme c'est le cas dans notre étude avec une majorité d'échantillons provenant du Burkina Faso pour la lignée Ouest/Centre. La deuxième hypothèse est que notre résultat pourrait également s'expliquer par une réalité biologique. Celle-ci repose sur une hypothèse d'extinction locale, due au climat hyperaride de l'Ouest de l'Afrique au Pléistocène tardif ayant conduit à la disparition du lion dans cette région. Les populations ayant trouvé refuge au Moyen-Orient auraient plus tard recolonisé la zone, ce qui expliquerait la faible diversité génétique des individus originaires de cette lignée (Bertola et al., 2016; Dubach et al., 2013). Cette hypothèse est également supportée par d'autres études mais qui proposent plutôt une recolonisation depuis les régions Sud et Est de l'Afrique (Antunes et al., 2008; Barnett et al., 2006a; Bertola et al., 2016, 2011). Ceci expliquerait aussi la dichotomie entre l'Ouest/Centre africain et l'Est/Sud africain pour d'autres espèces (Bertola et al., 2016; Lorenzen et al., 2012).

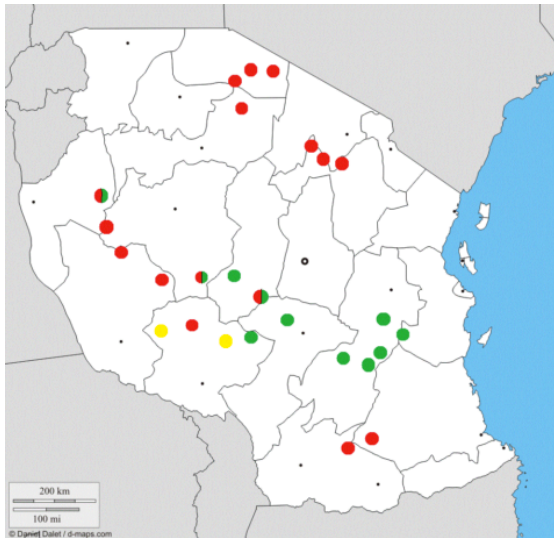
### **A l'échelle de la Tanzanie**

La structuration des échantillons de Tanzanie montre sur base des SNPs une structure bien délimitée en 3 populations : une au Sud-Est (cluster 1), une au Nord (cluster 2) et une au Sud-Ouest (cluster 3) (*figure 12*). Ces résultats sont inédits puisqu'aucune étude n'avait encore analysé la structure d'une population à l'échelle d'un pays sur base des SNPs. Seuls 4 échantillons, à savoir 7, 15, 25 et 46, présentent un profil intermédiaire : en effet, ils paraissent être géographiquement plus proches du Nord (cluster 2) et présentent pourtant une probabilité d'appartenance sur base d'analyses de structure légèrement plus élevée à la population du Sud-Ouest (cluster 3). Ils ont ainsi été assignés au côté du cluster 3, mais leurs probabilités d'appartenance,



n'étant pas aussi discriminantes que pour les autres échantillons, en feraient des échantillons que nous nommerons « intermédiaires ». La première hypothèse à ce statut serait la présence d'admixture, c'est-à-dire l'existence d'un flux génique entre les 2 clusters. Seulement, même si les lions mâles ont des capacités de dispersion parfois assez grandes, il s'agirait d'un déplacement de plus de 400 km, ce qui est peu probable. Ce résultat pourrait cependant s'expliquer par des échanges anciens entre ces groupes de lions qui devaient probablement appartenir à une population panmictique. La deuxième hypothèse à ce statut « intermédiaire » serait la présence d'un artéfact lors de l'appel des SNPs.

En revanche, la structure tanzanienne sur base des microsatellites ne révèle aucune structure ( $K=1$ ), comme cela avait déjà été le cas lors de l'étude de Laura Bertrand (2013). Cependant, celle-ci avait tout de même identifié une certaine structuration, sur base de séquences du gène mitochondrial *cyt b* (ADNmt) malgré le fait que son échantillonnage ne comprenait que la moitié (26/51) des échantillons analysés sur base des SNPs. Cependant, cette structure, peu marquée et basée uniquement sur la distribution de trois haplotypes différents (*figure 20*), ne semble pas correspondre aux 3 clusters identifiés sur base des SNPs. Même si l'ADN mitochondrial reflète la philopatrie des femelles, et pourrait constituer un biais pour l'analyse de la structure, le fait que les individus analysés dans l'étude de Bertrand (2013) soient tous des mâles devrait pourtant indiquer une structuration prenant en compte leur caractère dispersif. Cependant, puisque parmi les 3 marqueurs utilisés sur ces échantillons et sur nos 2 études, l'ADN mitochondrial est celui qui permet de rendre compte de la structure la plus ancienne dans le temps, cette répartition pourrait illustrer une séparation que les microsatellites et les SNPs ne peuvent aujourd'hui plus illustrer.

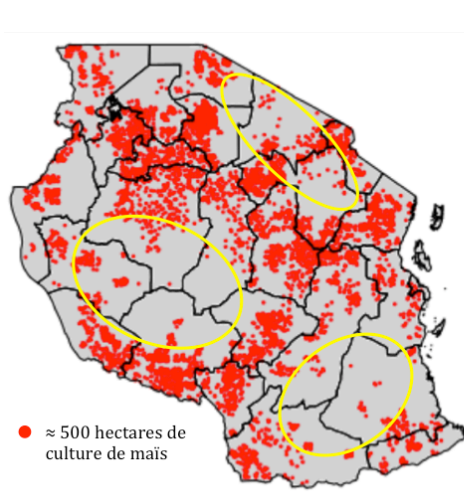


**Figure 20** : Structure géographique des échantillons tanzaniens en fonction des 3 haplotypes identifiés pour la Tanzanie sur base de l'analyse des séquences de *cyt b* (ADNmt). En rouge : haplotype 2, en vert : haplotype 13 et en jaune haplotype 17 (Bertrand, 2013).

La structuration observée en 3 clusters distincts sur base des SNPs laisse à penser que les populations sont délimitées par des barrières biogéographiques. Si le fleuve Niger est une hypothèse pour la séparation des populations Ouest et Centre de l'Afrique (Bertola et al., 2016), aucun fleuve en Tanzanie ne semble constituer un obstacle assez large pour les lions. Par exemple, si le fleuve Rufiji au nord de la réserve de Selous semble constituer une barrière biogéographique pour la girafe et le guépard (présence uniquement sur la rive gauche), on trouve pourtant des lions sur les 2 rives du fleuve (P. Chardonnet, pers. com. 2016). Cependant, les échantillons du Selous dont nous disposons proviennent tous de la rive droite du fleuve ; ainsi, nous n'avons pas pu analyser les lions de la rive gauche (réserve de Mikumi) pour savoir dans quelle mesure

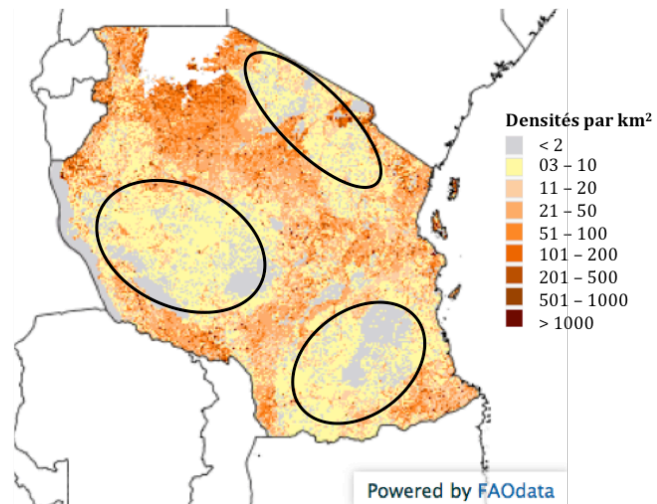
ce fleuve constituerait un obstacle. En revanche, il se trouve que les 3 clusters semblent être séparés par des zones avec des densités humaines importantes, liées à des activités agricoles et pastorales. Par exemple, entre le cluster 1 (Sud-Est) et le cluster 3 (Sud-Ouest) se trouve la vallée de Kilombero, caractérisée par d'importantes activités humaines (e.g. cultures de canne à sucre, de riz ou de maïs, routes, villages) (P. Chardonnet pers. com. 2016). En 2009, la Tanzanie était en 11<sup>ème</sup> place du classement des plus grandes croissances démographiques du monde estimé selon la Banque Mondiale, avec un taux de croissance démographique de 2,91%. La *figure 22*, illustrant les différentes densités humaines présentes en Tanzanie, permet justement d'identifier nos 3 clusters là où les densités humaines sont les plus faibles. De plus, si les cartes illustrent souvent l'espace occupé par les Hommes, elles n'illustrent pas toujours l'espace occupé par l'agriculture et le pastoralisme ; or ces activités sont en grande expansion actuellement en Tanzanie (Chardonnet et al., 2010). Par exemple, la FAO a estimé en 2013 la surface utilisée pour l'agriculture à 396 500 km<sup>2</sup>, ce qui représente un peu moins de la moitié du pays (947 300 km<sup>2</sup>). De plus, 73% de la population active serait employée dans l'agriculture (<http://gfc.ucdavis.edu/profiles/rst/tza.html>), où le maïs est la ressource la plus cultivée (*figure 21*). Comme le lion n'est pas une espèce migratrice (les mâles dispersent souvent vers des territoires voisins du lieu de naissance ou un peu plus loin (Packer et al., 1991)), les pressions anthropiques auxquelles il fait face en Tanzanie a pu conduire les populations à se différencier génétiquement, par dérive génétique. De plus, les analyses d'isolement par la distance et d'autocorrélation spatiale menées dans cette étude ne permettant pas d'expliquer cette structure en 3 clusters, l'hypothèse d'une dérive suite aux pressions anthropiques est d'autant plus renforcée. Cependant, ces deux analyses ayant été effectuées seulement sur des individus mâles, les résultats sont à prendre avec précaution, puisque leur caractère dispersif pourrait donner une structure différente de celle basée sur des femelles, à caractère philopatric.

L'analyse AMOVA donne une valeur de  $F_{SC}$  de 0,077, ce qui indique une différenciation modérée entre ces 3 populations. Le tableau des pairwise  $F_{ST}$  (*tableau 8*), montre en revanche que les 2 populations les plus différenciées parmi les 3 clusters sont celles du Sud-Est (cluster 1) et du Nord (cluster 2) avec une valeur de 0,085. En effet, la population Nord (cluster 2) se montre plus proche de celle du Sud-Ouest (cluster 3) avec une valeur de 0,057. Enfin les deux populations les plus proches se trouvent être celles du Sud-Est (cluster 1) et du Sud-Ouest (cluster 3) avec une valeur de 0,046. Ces indices de fixation sont de manière générale assez faibles (inférieurs à 0,1) et soutiennent une différenciation récente des populations, et donc l'hypothèse d'une dérive génétique sous les pressions anthropiques. Il serait intéressant de conduire une analyse de datation afin de déterminer si la différenciation de ces 3 populations est corrélée avec les activités humaines et/ou l'apparition de l'agriculture entre ces écosystèmes, ou bien si elle remonte à des évènements plus anciens (e.g. climatiques). La population du Selous (cluster 1) semble être la population la plus diversifiée des 3 ( $F_{IS} = 0,078$ ). Une étude de recensement menée récemment sur 26% (environ 1 300 000 hectares) du territoire de la réserve de Selous confirme que cette population est un « lion stronghold » d'une grande taille effective et avec une forte densité de lions, sûrement la plus grande de Tanzanie (P. Chardonnet, unpublished yet). Si la population du Serengeti est comparable en terme de taille effective (ou nombre d'animaux capables de se reproduire au niveau d'une population), l'écosystème qui y est associé est plus



**Figure 21 :** Carte de la Tanzanie représentant la localisation des cultures de maïs au sein du pays. Les 3 zones encerclées font référence aux 3 clusters identifiés sur base des 9,184 SNPs lors des analyses de structure.

Modifié depuis <http://gfc.ucdavis.edu>.



**Figure 22 :** Carte de la Tanzanie représentant les différences de densités humaines au sein du pays. Les 3 zones encerclées font référence aux 3 clusters identifiés sur base des 9,184 SNPs lors des analyses de structure.

Modifié depuis <http://www.fao.org>.

hétérogène (e.g. vallée du Rift, Parc National, zones villageoises) et implique ainsi des densités de lions radicalement différentes d'un endroit à un autre. L'écosystème du Selous, plus régulier (e.g. faune et bush), permet des densités plus homogènes (5/100 km<sup>2</sup>) (W. Crosmarty, pers. com. 2016). Pour notre étude, la population du Selous pourrait donc servir de référence puisque c'est celle-ci apparaît la plus saine et la plus homogène.

En ce qui concerne la diversité génétique, l'analyse de la lignée Est sur base des microsatellites, comprenant également les 2 échantillons du Congo-Brazzaville et les 3 échantillons d'Afrique du Sud, donne un indice de consanguinité de 0,064 ce qui indique un bon état de santé en général au sein de la Tanzanie. L'estimation du  $F_{IS}$  global pour la Tanzanie sur base des SNPs donne une valeur de 0,189. Il semblerait qu'avec ce marqueur, cette valeur ne soit pas négligeable, mais cette interprétation reste incertaine. En revanche, au sein de chacun des clusters, les indices de consanguinité calculés sur base des SNPs montrent tout de même des valeurs non négligeables pour le Nord (cluster 2) avec un  $F_{IS}$  de 0,210 et le Sud-Ouest (cluster 3) avec un  $F_{IS}$  de 0,124. On remarque notamment que la population du Nord de la Tanzanie a un  $F_{IS}$  relativement similaire à celui du Burkina Faso (0,242). Malheureusement, puisqu'aucune autre étude n'a été faite sur le lion sur base des SNPs, ou même d'autres félins, on peut difficilement interpréter ces valeurs. De manière intéressante, Bertola et al. (2015) estime un  $F_{IS}$  pour un échantillonnage au Serengeti et au cratère de Ngorongoro de 0,019 sur base des microsatellites, ce qui indiquerait un faible risque de consanguinité. Ainsi, la valeur sur base des SNPs de 0,210 pour le cluster 2 (qui pourrait être assimilé à cet échantillonnage) n'est peut-être pas alarmante, mais reflèterait la différence d'estimation du  $F_{IS}$  entre les deux marqueurs. Cependant, même sans autres repères, les 3 populations de cette étude font partie des plus grandes d'Afrique (notamment les populations du Selous et du Serengeti). On peut ainsi supposer que leurs valeurs de

diversité génétique peuvent servir de référence, comme valeurs-témoin, aux autres populations africaines de lions, plus petites ou fragmentées. Dans ce cas, les présentes valeurs de  $F_{IS}$  seraient à relativiser, en attendant de pouvoir les comparer avec d'autres études basées sur les SNPs ou continuer les investigations de la présente études dans les semaines à venir.

### 3. PROPOSITIONS POUR LA CONSERVATION DU LION EN TANZANIE

#### A l'échelle continentale

La différenciation génétique existant entre les 2 lignées Ouest/Centre et Est/Sud suggère qu'elles doivent être considérées comme deux unités de gestion distinctes, et ne devraient donc pas être mélangées. Même si les lions de l'Ouest et du Centre africains font face à un sérieux déclin, due à la fragmentation du territoire et à la chasse non contrôlée, les problèmes de taille de population ou de consanguinité qui en découleraient ne doivent pas être remédiés par la translocation de lions provenant de l'autre lignée. Ces deux lignées sont en effet séparées depuis plusieurs milliers d'années (118 000 ans d'après Antunes et al. (2008)) ayant probablement conduit à donner des adaptations écologiques locales particulières associées par exemple au climat, à l'environnement ou encore aux proies potentielles. La présence de 32 allèles privés dans la lignée Est/Sud contre 8 dans la lignée Ouest/Centre souligne la différence de diversité allélique entre les 2 lignées, et donne une estimation de l'information propre à chacune. En raison, du déclin rapide observé ces dernières années au sein des populations de lions d'Afrique, des efforts de conservation doivent être instaurés afin de ne pas augmenter le phénomène de fragmentation sévère des populations, ce qui est particulièrement le cas en Afrique de l'ouest.

Les résultats obtenus concernant l'évolution démographique des populations de lions étudiées (*figure 11*) permettent, à l'échelle de notre échantillonnage, d'avoir un aperçu de l'évolution réelle de la taille effective des populations. Selon notre échantillonnage, les populations de Tanzanie et du Burkina Faso comptaient respectivement 331 et 179 individus effectifs il y a 66 générations (c'est-à-dire il y a environ 460 ans, en tenant compte d'un temps de génération de 6,98 ans (IUCN, 2016)), et en comptaient environ 83 et 40 individus il y a 13 générations (c'est-à-dire environ 90 ans). Ainsi, cette estimation montrerait un déclin de 75% en Tanzanie et de 78% au Burkina Faso de la taille effective des populations de lions en 370 ans. En partant de cette hypothèse, et en prenant en compte les estimations des dernières études (Bauer et al., 2015; Henschel et al., 2014) qui montrent un déclin d'environ 60% en Afrique de l'est ces dernières décennies, voire plus en Afrique de l'ouest, l'urgence de la mise en place de stratégies de conservation efficaces apparaît de première importance. De plus, Peterson et al., (2014) ont simulé récemment la possible évolution des territoires des lions africains sous l'influence du réchauffement climatique, et conseillent que les futures mesures de conservation prennent ces modèles en compte, afin de mieux préserver les lions des futures menaces.

#### A l'échelle de la Tanzanie

Au niveau de la Tanzanie, la différenciation de la population en 3 clusters permet de porter notre réflexion sur 2 stratégies de conservation opposées, à savoir : doit-on gérer ces trois populations en tant qu'unités de gestion indépendantes ou bien doit-on

mélanger ces 3 populations entre elles afin d'augmenter leur diversité génétique et leur donner une meilleure chance de survie à long terme ?

Dans un premier temps, tant que les populations présentent un nombre important et suffisant d'individus pour conserver une bonne santé génétique, il serait préférable de préserver la diversité génétique propre à chacune. En faveur de cela, l'analyse de structure, délimitant très bien les 3 clusters, pourrait laisser penser que déjà en temps normal il y a peu de mouvements d'individus mâle entre ces clusters ; le modèle de l'étude de Dolrenry et al. (2014) confirme cette faible capacité de dispersion des mâles. Cette stratégie de conservation serait intéressante car elle permettrait de garder les caractéristiques propres à chaque population ainsi que leurs adaptations locales. Cependant, baser une stratégie de conservation sur les adaptations locales d'une population n'est pas forcément judicieux puisque ces adaptations sont souvent dues à une plasticité écologique et ne reflètent pas une diversité génétique propre. Par ailleurs, une telle gestion pourrait conduire à un risque de diminution de la diversité génétique. Il serait prudent de surveiller l'état de santé de chacune des populations (e.g. monitoring) afin d'intervenir en cas de danger pour une population, comme par exemple un risque de consanguinité suite à une dérive génétique. Ce risque potentiel peut être évité si deux facteurs majeurs sont conservés :

- Les territoires au sein des clusters identifiés doivent rester connectés les uns aux autres, sans subir davantage de dégradation et de fragmentation. En effet la dispersion de seulement quelques individus à travers les aires non protégées est suffisante pour maintenir le flux génique dans une population (Dolrenry et al., 2014). Une étude sur le risque de la consanguinité chez le lion préconise même de maintenir une population d'au minimum 50 à 100 troupes continues, c'est-à-dire sans interruption de dispersion des mâles, pour éviter un risque de consanguinité (Björklund, 2003). Par exemple, le « monitoring participatif » aurait un effet sur la tolérance du lion par les communautés locales.

- La pratique du braconnage doit être absolument gérée afin de maintenir un nombre suffisant d'individus capables de se disperser. Björklund (2003) déclare que si le nombre de mâles ayant la possibilité de disperser ne représente qu'une petite fraction de la population, la consanguinité peut vite augmenter également. Aussi, si une localité peut se trouver temporairement quasi éteinte, celle-ci a souvent la possibilité de redevenir occupée par des lions, grâce à la dispersion des mâles. En effet, le caractère philopatrique des femelles ne permettant pas la recolonisation des territoires lointains, une localité qui deviendrait possiblement vide de lions le resterait, et marquerait une extinction locale (Dolrenry et al., 2014). Il est donc intéressant de considérer les populations mitoyennes aux parcs nationaux (e.g. zones de chasse) car les échanges entre individus restent possibles, puisque ces zones ne sont pas clôturées, et permettent de maintenir un flux génique. Les dispersions des mâles peuvent donc se faire dans un sens ou dans l'autre, même si les mouvements depuis les parcs nationaux vers les zones de chasse sont plus fréquents (on parle de « *vacuum effect* »), puisque ces derniers présentent des densités de lions beaucoup plus faibles et donc une facilité d'acquisition de territoire (Croes et al., 2011; Davidson et al., 2011; Kiffner, 2008; Loveridge et al., 2007).

Ainsi, dans un deuxième temps, si la diversité génétique d'une population venait à diminuer dangereusement, ou si le nombre d'individus d'une population devenait trop réduit (inférieur à la « Population Minimale Viable ») pour assurer un maintien de la

population, une stratégie par « renforcement de population » serait alors à adopter afin de ne pas nuire au maintien de la population. L'hypothèse d'un mélange entre les clusters est justifiée par les valeurs de  $F_{ST}$  assez faibles (inférieures à 0,1) qui supportent une séparation récente des populations. Deux stratégies permettraient cette remise en contact entre les lions des différents clusters identifiés :

- La première serait de recréer un *continuum* naturel entre les trois populations, afin que des contacts naturels puissent s'effectuer entre celles-ci. Une telle gestion correspondrait probablement à la situation naturelle existant il y a encore quelques siècles, lorsque les populations de lions n'étaient pas fragmentées par les activités anthropiques. Des contacts naturels entre ces populations permettraient de retrouver dans le futur une connectivité et la mise en place d'une structure en métapopulation (Dolrenry et al., 2014). Ceci pourrait être permis par la création de corridors écologiques, permettant aux individus de se répartir librement entre eux ou non, selon l'environnement dont ils ont besoin. Cependant, selon une estimation de 2009, parmi les 7 corridors qui étaient utiles aux lions présents en Tanzanie à l'époque, il semblerait que 4 étaient en danger en 2009 (2 au degré critique, c'est-à-dire espérance  $\leq 3$  ans ; et 2 au degré extrême, c'est-à-dire espérance  $\leq 1$  an ou déjà fermé) (<http://www.tzwildlifecorridors.org>). La dégradation et la fragmentation de l'aire de répartition du lion en Tanzanie ayant encore fortement augmentées depuis, il est probable que l'état de dégradation de ces corridors ne se soit pas amélioré. Par ailleurs, la pression anthropique étant actuellement très forte en Tanzanie, il est peu probable que de nouveaux corridors écologiques puissent être créés ;

- Dès lors, la seconde stratégie serait un renforcement d'une population basé sur des translocations artificielles d'individus ou de groupes d'individus d'un cluster à l'autre, depuis une population abondante et génétiquement proche vers la population à renforcer. Cependant, cette stratégie pourrait être sensible vis-à-vis du lion pour différentes raisons :

- la structure sociale des troupes, avec des liens entre les individus et des formations de groupes par fission-fusion, limite l'intégration des nouveaux venus (Abell et al., 2013) ou donne lieu à des affrontements entre individus indigènes et exogènes (P. Chardonnet, pers. com. 2016). Des précautions devront donc être prises, comme par exemple effectuer un apport d'individu(s) sur des sites particuliers, en marge, et sans lions indigènes ;
- des différences morphologiques semblent exister entre les animaux appartenant aux trois clusters, leur donnant actuellement une spécificité particulière, en lien probable avec des adaptations écologiques locales plus anciennes. Un mélange artificiel entre animaux présentant des différences morphologiques provoquerait probablement une perte des spécificités et adaptations locales des animaux issus de ces mélanges et donc une diminution de la fitness pour les animaux non adaptés. Les lions du Selous (cluster 1) constituent à ce propos un cas intéressant. Ils présentent en effet des distinctions morphologiques propres, à savoir des crânes apparaissant plus petits par rapport aux autres lions tanzaniens (P. Chardonnet, pers. com. 2016). Cette différence de morphologie rend compte d'une différenciation plutôt ancienne et supporterait l'hypothèse que les lions du Selous constituent une population différente des autres. D'autres observations rapportent qu'ils sont de constitution plus petite, qu'ils n'ont presque pas de crinière et que le nombre d'individus dans une troupe est plus faible (P. Chardonnet, pers. com. 2016). De plus, les lions du Selous vivent dans un environnement différent par rapport aux lions du Nord et du Sud-

Ouest de la Tanzanie. En effet, si la savane (zones semi-arides) constitue la plupart des territoires de la Tanzanie, la région Sud-Est est plus caractérisée par des forêts et les lions de cette zone apparaissent adaptés à ce milieu. Les pairwise  $F_{ST}$  confirment une proximité entre les populations de savane avec une valeur de 0,057 entre le Sud-Ouest et le Nord de la Tanzanie contre une valeur de 0,085 entre le Sud-Est et le Nord. Cependant, les observations de ces différences morphologiques devraient faire l'objet de futures analyses afin de confirmer la distinction morphologique des lions du Selous vis-à-vis des 2 autres populations. En attendant, il serait préférable d'éviter les transferts d'animaux depuis/vers le Selous (cluster 1). Récemment, à titre d'exemple, une étude ayant montré une sous-structuration des lions de Zambie en 2 populations a suivi la première stratégie et a proposé de ne pas mélanger les animaux appartenant à ces deux groupes (Curry et al., 2015).

Enfin, la carte illustrant la répartition géographique des 5 LCUs présentent en Tanzanie ne semble pas refléter les 3 populations définies dans nos analyses de structure (*figure 5*). Les 5 LCUs ont été définies par le SSC Cat Specialist Group de l'IUCN et leur création remonte à 2006, soit il y a 10 ans. Les LCUs de Tanzanie nécessiteraient ainsi probablement une révision. Mais dans le cas où leur redéfinition ne corrobore pas avec les résultats de la présente étude, il sera difficile de proposer ces 3 populations comme les LCUs de Tanzanie sur lesquelles baser les stratégies de conservation. Aussi, il est important de continuer dans ce but les analyses sur les lions tanzaniens, en élargissant si possible l'échantillonnage au maximum, tant en nombre d'individus qu'en diversité des lieux de provenance, afin d'avoir une idée au plus proche de la réalité des états géographique et génétique des populations de lions en Tanzanie.



## CONCLUSIONS

---

Premièrement, à l'échelle continentale, cette étude a permis de confirmer la distinction génétique des lions africains en deux lignées : une lignée Ouest/Centre et une lignée Est/Sud. Cette distinction avait préalablement été démontrée par d'autres études ces dernières années et démontre une fois encore la nécessité d'une révision taxonomique de la sous-espèce *Panthera leo leo*. En attendant, ces deux lignées devraient être considérées comme des unités de gestion différentes pour les stratégies de conservation, afin d'éviter le mélange des individus par translocation.

Ensuite, à l'échelle régionale de la Tanzanie, les marqueurs SNPs ont mis en évidence 3 populations (une au Nord, une au Sud-Ouest et une au Sud-Est) rendant compte de la diversité génétique existant au sein des lions tanzaniens. Ces populations semblent être en bonne santé génétique, ce qui est rassurant puisqu'elles font partie des plus grandes populations de lions d'Afrique. Les niveaux de différenciation génétique entre ces populations sont très faibles et montrent que des flux géniques existaient encore jusqu'à il y a peu de temps. Ainsi, cette différenciation semble encore assez récente, et laisserait penser qu'elle résulte des pressions anthropiques récentes en Tanzanie. Or cette pression anthropique, en Tanzanie, continue d'augmenter rapidement. Ainsi, il est essentiel de mettre en place une stratégie de conservation efficace afin de préserver les lions tanzaniens. Une stratégie séparant les trois populations mises en évidence en trois unités de gestion distinctes permettrait de conserver la diversité génétique propre à chacune. Si, à l'avenir, la conservation de ces 3 populations de manière distincte conduit à une faible diversité génétique, ou à un trop faible effectif d'individus au sein d'une population, une stratégie visant à remettre en contact les trois populations permettrait de limiter les futures conséquences d'un isolement trop marqué, comme un risque de consanguinité. De tels échanges pourraient être effectués artificiellement en renforçant les populations en difficulté par des translocations d'individus ou de groupes d'individus. Néanmoins, l'augmentation des menaces pesant généralement sur l'espèce, telles que la fragmentation de l'aire de répartition suite aux activités anthropiques ou au braconnage, et aussi bien présentes en Tanzanie, pourraient nuire à de tels efforts de conservation. Ainsi, un manque de législation et de gestion des populations de lions en Tanzanie pourrait dans le futur mettre en danger une grande partie de la population totale des lions africains.

Enfin, d'un point de vue méthodologique nos résultats ont démontré que les deux marqueurs moléculaires utilisés présentent une sensibilité différente pour l'étude de la structure fine des populations. Dans notre étude, les marqueurs SNPs apparaissent donner des résultats beaucoup plus précis par rapport aux microsatellites. La structure plus fine obtenue avec les SNPs apparaît d'autant plus fiable qu'elle est explicable écologiquement. La moins grande sensibilité des marqueurs microsatellites est peut-être corrélée à un nombre limité de marqueurs utilisés dans notre étude. Les marqueurs SNPs apparaissent ainsi donner des informations nettement plus précises. Cependant, notre étude a également montré qu'un jeu de données contenant trop de données manquantes pourrait influencer l'estimation de certaines F-statistiques, telles que l'indice  $F_{IS}$ . L'utilisation de tels marqueurs est ainsi à développer avec une série de précautions, sous peine d'estimations biaisées.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abell, J., Kirzinger, M.W.B., Gordon, Y., Kirk, J., Kokeš, R., Lynas, K., Mandinyenya, B., Youldon, D., 2013. A Social Network Analysis of Social Cohesion in a Constructed Pride: Implications for Ex Situ Reintroduction of the African lion (*Panthera leo*). *PLoS One* **8**, e82541.
- Antunes, A., Troyer, J.L., Roelke, M.E., Pecon-Slattery, J., Packer, C., Winterbach, C., Winterbach, H., Hemson, G., Frank, L., Stander, P., Siefert, L., Driciru, M., Funston, P.J., Alexander, K.A., Prager, K.C., Mills, G., Wildt, D., Bush, M., O'Brien, S.J., Johnson, W.E., 2008. The Evolutionary Dynamics of the Lion *Panthera leo* Revealed by Host and Viral Population Genomics. *PLoS Genet.* **4**, e1000251.
- Awise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C., 1987. INTRASPECIFIC PHYLOGEOGRAPHY: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst. Ecol. Syst.* **18**, 489–522.
- Banerjee, K., Jhala, Y.V., Chauhan, K.S., Dave, C.V., 2013. Living with Lions: The Economics of Coexistence in the Gir Forests, India. *PLoS One* **8**, e49457.
- Barbato, M., Orozco-terWengel, P., Tapio, M., Bruford, M.W., 2015. SNeP: a tool to estimate trends in recent effective population size trajectories using genome-wide SNP data. *Front. Genet.* **6**.
- Barnett, R., Shapiro, B., Barnes, I., Ho, S.Y.W., Burger, J., Yamaguchi, N., Higham, T.F.G., Wheeler, H.T., Rosendahl, W., Sher, A. V., Sotnikova, M., Kuznetsova, T., Baryshnikov, G.F., Martin, L.D., Harington, C.R., Burns, J. a., Cooper, A., 2009. Phylogeography of lions (*Panthera leo* ssp.) reveals three distinct taxa and a late Pleistocene reduction in genetic diversity. *Mol. Ecol.* **18**, 1668–1677.
- Barnett, R., Yamaguchi, N., Barnes, I., Cooper, A., 2006a. The origin, current diversity and future conservation of the modern lion (*Panthera leo*). *Proc. R. Soc. B.* **273**, 2119–2125.
- Barnett, R., Yamaguchi, N., Barnes, I., Cooper, A., 2006b. Lost populations and preserving genetic diversity in the lion *Panthera leo*: Implications for its ex situ conservation. *Conserv. Genet.* **7**, 507–514.
- Barnett, R., Yamaguchi, N., Shapiro, B., Ho, S.Y.W., Barnes, I., Sabin, R., Werdelin, L., Cuisin, J., Larson, G., 2014. Revealing the maternal demographic history of *Panthera leo* using ancient DNA and a spatially explicit genealogical analysis. *BMC Evol. Biol.* **14**, 70.
- Bauer, H., 2003. Lion Conservation in West and Central Africa. Integrating Social and Natural Science for Wildlife Conflict Resolution around Waza National Park, Cameroon. Leiden University, The Netherlands.

- Bauer, H., Chapron, G., Nowell, K., Henschel, P., Funston, P., Hunter, L.T.B., Macdonald, D.W., Packer, C., 2015. Lion (*Panthera leo*) populations are declining rapidly across Africa, except in intensively managed areas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 14894–14899.
- Bauer, H., de Iongh, H.H., 2005. Lion (*Panthera leo*) home ranges and livestock conflicts in Waza National Park, Cameroon. *Afr. J. Ecol.* **43**, 208–214.
- Bauer, H., Nowell, K., 2004. West African lion population classified as regionally Endangered. *CATnews* **41**, 35–36.
- Bauer, H., Van Der Merwe, S., 2004. Inventory of free-ranging lions *Panthera leo* in Africa. *Oryx* **38**, 26–31.
- Becker, M., McRobb, R., Watson, F., Droge, E., Kanyembo, B., Murdoch, J., Kakumbi, C., 2013. Evaluating wire-snare poaching trends and the impacts of by-catch on elephants and large carnivores. *Biol. Conserv.* **158**, 26–36.
- Belkir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Montpellier (France).
- Bertola, L.D., Jongbloed, H., Van Der Gaag, K.J., De Knijff, P., Yamaguchi, N., Hooghiemstra, H., Bauer, H., Henschel, P., White, P.A., Driscoll, C.A., Tende, T., Ottosson, U., Saidu, Y., Vrieling, K., De Iongh, H.H., 2016. Phylogeographic Patterns in Africa and High Resolution Delineation of Genetic Clades in the Lion (*Panthera leo*). *Nature Scientific*, 1–11.
- Bertola, L.D., Tensen, L., van Hooft, P., White, P.A., Driscoll, C.A., Henschel, P., Caragiulo, A., Dias-Freedman, I., Sogbohossou, E.A., Tumenta, P.N., Jirmo, T.H., de Snoo, G.R., de Iongh, H.H., Vrieling, K., 2015. Autosomal and mtDNA Markers Affirm the Distinctiveness of Lions in West and Central Africa. *PLoS One* **10**, e0137975.
- Bertola, L.D., van Hooft, W.F., Vrieling, K., Uit de Weerd, D.R., York, D.S., Bauer, H., Prins, H.H.T., Funston, P.J., Udo de Haes, H. a., Leirs, H., van Haeringen, W. a., Sogbohossou, E., Tumenta, P.N., De Iongh, H.H., 2011. Genetic diversity, evolutionary history and implications for conservation of the lion (*Panthera leo*) in West and Central Africa. *J. Biogeogr.* **38**, 1356–1367.
- Bertrand, L., 2013. Génétique de la conservation du lion ("*Panthera leo*") à l'échelle continentale et locale (Tanzanie). University of Liege, Belgium.
- Björklund, M., 2003. The risk of inbreeding due to habitat loss in the lion (*Panthera leo*). *Conserv. Genet.* **4**, 515–523.
- Black, S.A., Fellous, A., Yamaguchi, N., Roberts, D.L., 2013. Examining the Extinction of the Barbary Lion and Its Implications for Felid Conservation. *PLoS One* **8**, 2–13.
- Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y., Buckler, E.S., 2007. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* **23**, 2633–2635.

- Brown, E.W., Yuhki, N., Packer, C., Brien, S.J.O., 1994. A Lion Lentivirus Related to Feline Immunodeficiency Virus: Epidemiologic and Phylogenetic Aspects. *J. Virol.* **68**, 5953–5968.
- Bruche, S., Gusset, M., Lippold, S., Barnett, R., Eulenberger, K., Junhold, J., Driscoll, C., Hofreiter, M., 2013. A genetically distinct lion (*Panthera leo*) population from Ethiopia. *Eur. J. Wildl. Res.* **59**, 215–225.
- Brugière, D., Chardonnet, B., Scholte, P., 2015. Large-scale extinction of large carnivores (lion *Panthera leo*, cheetah *Acinonyx jubatus* and wild dog *Lycaon pictus*) in protected areas of West and Central Africa. *Trop. Conserv. Sci.* **8**, 513–527.
- Brumfield, R.T., Beerli, P., Nickerson, D.A., Edwards, S.V., 2003. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *TRENDS Ecol. Evol.* **18**, 249–256.
- Burger, J., Rosendahl, W., Loreille, O., Hemmer, H., Eriksson, T., Götherström, A., Hiller, J., Collins, M.J., Wess, T., Alt, K.W., 2004. Molecular phylogeny of the extinct cave lion *Panthera leo spelaea*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **30**, 841–849.
- Ceballos, G., Ehrlich, P.R., Barnosky, A.D., García, A., Pringle, R.M., Palmer, T.M., 2015. Accelerated modern human – induced species losses: entering the sixth mass extinction. *Sci. Adv.* **1**, e1400253.
- Chardonnet, P., 2002. Conservation of the African Lion: Contribution to a Status Survey., International Foundation for the Conservation of Wildlife, France & Conservation Force, USA.
- Chardonnet, P., Soto, B., Fritz, H., Crosmary, W., Drouet-Hoguet, N., Mesochina, P., Pellerin, M., Mallon, D., Bakker, L., Boulet, H., Lamarque, F., 2010. Managing the conflicts between people and lion. Review and insights from the literature and field experience. *Wildl. Manag. Work. Pap.* **13**.
- Christiansen, P., 2008. On the distinctiveness of the Cape lion (*Panthera leo melanochaita* Smith, 1842), and a possible new specimen from the Zoological Museum, Copenhagen. *Mamm. Biol.* **73**, 58–65.
- Craigie, I.D., Baillie, J.E.M., Balmford, A., Carbone, C., Collen, B., Green, R.E., Hutton, J.M., 2010. Large mammal population declines in Africa's protected areas. *Biol. Conserv.* **143**, 2221–2228.
- Croes, B.M., Funston, P.J., Rasmussen, G., Buij, R., Saleh, A., Tumenta, P.N., de Iongh, H.H., 2011. The impact of trophy hunting on lions (*Panthera leo*) and other large carnivores in the Bénoué Complex, northern Cameroon. *Biol. Conserv.* **144**, 3064–3072.
- Curry, C.J., White, P.A., Derr, J.N., 2015. Mitochondrial haplotype diversity in Zambian lions: Bridging a gap in the biogeography of an iconic species. *PLoS One* **10**, 1–15.

- Cushman, S.A., Elliot, N.B., Macdonald, D.W., Loveridge, A.J., 2015. A multi-scale assessment of population connectivity in African lions (*Panthera leo*) in response to landscape change. *Landsc. Ecol.*
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C.A., Banks, E., DePristo, M.A., Handsaker, R.E., Lunter, G., Marth, G.T., Sherry, S.T., McVean, G., Durbin, R., 2011. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* **27**, 2156–2158.
- Davidson, Z., Valeix, M., Loveridge, A.J., Madzikanda, H., Macdonald, D.W., 2011. Socio-spatial behaviour of an African lion population following perturbation by sport hunting. *Biol. Conserv.* **144**, 114–121.
- Davis, B.W., Li, G., Murphy, W.J., 2010. Supermatrix and species tree methods resolve phylogenetic relationships within the big cats, *Panthera* (Carnivora: *Felidae*). *Mol. Phylogenet. Evol.* **56**, 64–76.
- DeMenocal, P.B., 1995. Plio-Pleistocene African climate. *Science*. **270**, 53–59.
- Dolrenry, S., Stenglein, J., Hazzah, L., Lutz, R.S., Frank, L., 2014. A Metapopulation Approach to African Lion (*Panthera leo*) Conservation. *PLoS One* **9**, e88081.
- Dubach, J., Patterson, B.D., Briggs, M.B., Venzke, K., Flaman, J., Stander, P., Scheepers, L., Kays, R.W., 2005. Molecular genetic variation across the southern and eastern geographic ranges of the African lion, *Panthera leo*. *Conserv. Genet.* **6**, 15–24.
- Dubach, J.M., Briggs, M.B., White, P.A., Ament, B.A., Patterson, B.D., 2013. Genetic perspectives on “Lion Conservation Units” in Eastern and Southern Africa. *Conserv. Genet.* **14**, 741–755.
- Edwards, C.T.T., Bunnefeld, N., Balme, G.A., Milner-Gulland, E.J., 2014. Data-poor management of African lion hunting using a relative index of abundance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 539–543.
- Elshire, R.J., Glaubitz, J.C., Sun, Q., Poland, J.A., Kawamoto, K., Buckler, E.S., Mitchell, S.E., 2011. A robust, simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One* **6**, 1–10.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol. Ecol.* **14**, 2611–2620.
- Excoffier, L., 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.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479–491.

- Fabbri, E., Caniglia, R., Mucci, N., Thomsen, H.P., Krag, K., Pertoldi, C., Loeschcke, V., Randi, E., 2012. Comparison of single nucleotide polymorphisms and microsatellites in non-invasive genetic monitoring of a wolf population. *Arch. Biol. Sci.* **64**, 320–336.
- Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**, 1567–1587.
- Foll, M., Gaggiotti, O.E., 2008. A genome scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A Bayesian perspective. *Genetics* **180**, 977–993.
- Goldman, M.J., de Pinho, J.R., Perry, J., 2013. Beyond ritual and economics: Maasai lion hunting and conservation politics. *Oryx* **47**, 490–500.
- Grinnell, J., Packer, C., Pusey, A.E., 1995. Cooperation in male lions: kinship, reciprocity or mutualism? *Anim. Behav.* **49**, 95–105.
- Haas, S.K., Hayssen, V., Krausman, P.R., 2005. *Panthera leo*. *Mamm. Species* **762**, 1–11.
- Hazzah, L., Borgerhoff Mulder, M., Frank, L., 2009. Lions and Warriors: Social factors underlying declining African lion populations and the effect of incentive-based management in Kenya. *Biol. Conserv.* **142**, 2428–2437.
- Hazzah, L., Dolrenry, S., Naughton, L., Edwards, C.T.T., Mwebi, O., Kearney, F., Frank, L., 2014. Efficacy of Two Lion Conservation Programs in Maasailand, Kenya. *Conserv. Biol.* **28**, 851–860.
- Heller, R., Lorenzen, E.D., Okello, J.B.A., Masembe, C., Siegismund, H.R., 2008. Mid-Holocene decline in African buffaloes inferred from Bayesian coalescent-based analyses of microsatellites and mitochondrial DNA. *Mol. Ecol.* **17**, 4845–4858.
- Helyar, S.J., Hemmer-Hansen, J., Bekkevold, D., Taylor, M.I., Ogden, R., Limborg, M.T., Cariani, A., Maes, G.E., Diopere, E., Carvalho, G.R., Nielsen, E.E., 2011. Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: New opportunities and challenges. *Mol. Ecol. Resour.* **11**, 123–136.
- Hemson, G., MacLennan, S., Mills, G., Johnson, P., Macdonald, D., 2009. Community, lions, livestock and money: A spatial and social analysis of attitudes to wildlife and the conservation value of tourism in a human-carnivore conflict in Botswana. *Biol. Conserv.* **142**, 2718–2725.
- Henschel, P., Azani, D., Burton, C., Malanda, G.U.Y., Saidu, Y., Sam, M., Hunter, L., 2010. Lion status updates from five range countries in West and Central Africa. *CATnews* **52**, 34–39.
- Henschel, P., Coad, L., Burton, C., Chataigner, B., Dunn, A., MacDonald, D., Saidu, Y., Hunter, L.T.B., 2014. The Lion in West Africa Is Critically Endangered. *PLoS One* **9**, e83500.

- Holmern, T., Nyahongo, J., Roskaft, E., 2007. Livestock loss caused by predators outside the Serengeti National Park, Tanzania. *Biol. Conserv.* **135**, 518–526.
- Imelfort, M., Duran, C., Batley, J., Edwards, D., 2009. Discovering genetic polymorphisms in next-generation sequencing data. *Plant Biotechnol. J.* **7**, 312–317.
- IUCN, 2016. The IUCN RedList of Threatened Species. Version 2016-1. <http://www.iucnredlist.org>.
- Kalinowski, S.T., 2002. How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? *Heredity* **88**, 62-65.
- Karlsson, E.K., Baranowska, I., Wade, C.M., Salmon Hillbertz, N.H.C., Zody, M.C., Anderson, N., Biagi, T.M., Patterson, N., Pielberg, G.R., Kulbokas, E.J., Comstock, K.E., Keller, E.T., Mesirov, J.P., von Euler, H., Kämpe, O., Hedhammar, Å., Lander, E.S., Andersson, G., Andersson, L., Lindblad-Toh, K., 2007. Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nat. Genet.* **39**, 1321–1328.
- Kiffner, C., 2008. African lions and the trophy hunting dilemma. *Endanger. Species Updat.* **25**, 3–8.
- Kissui, B.M., 2008. Livestock predation by lions, leopards, spotted hyenas, and their vulnerability to retaliatory killing in the Maasai steppe, Tanzania. *Anim. Conserv.* **11**, 422–432.
- Kissui, B.M., Packer, C., 2004. Top-down population regulation of a top predator: lions in the Ngorongoro Crater. *Proc. R. Soc. London B.* **271**, 1867–1874.
- Kopelman, N.M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., Mayrose, I., 2015. Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol. Ecol. Resour.* **15**, 1179–1191.
- Kruglyak, L., 1997. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nat. Genet.* **17**, 21–24.
- Kushnir, H., Leitner, H., Ikanda, D., Packer, C., 2010. Human and Ecological Risk Factors for Unprovoked Lion Attacks on Humans in Southeastern Tanzania. *Hum. Dimens. Wildl.* **15**, 315–331.
- Lacy, C.R., 1997. Importance of Genetic Variation To the Viability of Mammalian Populations. *J. Mammal.* **78**, 320–335.
- Langmead, B., Salzberg, S., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **9**, 357–359.



- Lindsey, P.A., Balme, G., Becker, M., Begg, C., Bento, C., Bocchino, C., Dickman, A., Diggle, R.W., Eves, H., Henschel, P., Lewis, D., Marnewick, K., Mattheus, J., Weldon McNutt, J., McRobb, R., Midlane, N., Milanzi, J., Morley, R., Murphree, M., Opyene, V., Phadima, J., Purchase, G., Rentsch, D., Roche, C., Shaw, J., van der Westhuizen, H., Vliet, N.V., Zisadza-Gandiwa, P., 2013a. The bushmeat trade in African savannas: Impacts, drivers, and possible solutions. *Biol. Conserv.* **160**, 80–96.
- Lindsey, P.A., Balme, G.A., Funston, P., Henschel, P., Hunter, L., Madzikanda, H., Neil Midlane, N., Nyirenda, V., 2013b. The Trophy Hunting of African Lions: Scale, Current Management Practices and Factors Undermining Sustainability. *PLoS One* **8**, e73808.
- Liu, N., Chen, L., Wang, S., Oh, C., Zhao, H., 2005. Comparison of single-nucleotide polymorphisms and microsatellites in inference of population structure. *BMC Genet.* **6**, 26–30.
- Lorenzen, E.D., De Neergaard, R., Arctander, P., Siegismund, H.R., 2007. Phylogeography, hybridization and Pleistocene refugia of the kob antelope (*Kobus kob*). *Mol. Ecol.* **16**, 3241–3252.
- Lorenzen, E.D., Heller, R., Siegismund, H.R., 2012. Comparative phylogeography of African savannah ungulates. *Mol. Ecol.* **21**, 3656–3670.
- Loveridge, A.J., Searle, A.W., Murindagomo, F., Macdonald, D.W., 2007. The impact of sport-hunting on the population dynamics of an African lion population in a protected area. *Biol. Conserv.* **134**, 548–558.
- MacLennan, S.D., Groom, R.J., Macdonald, D.W., Frank, L.G., 2009. Evaluation of a compensation scheme to bring about pastoralist tolerance of lions. *Biol. Conserv.* **142**, 2419–2427.
- Meena, V., Macdonald, D.W., Montgomery, R.A., 2014. Managing success: Asiatic lion conservation, interface problems and peoples' perceptions in the Gir Protected Area. *Biol. Conserv.* **174**, 120–126.
- Menotti-Raymond, M., David, V.A., Lyons, L.A., Schäffer, A.A., Tomlin, J.F., Hutton, M.K., O'Brien, S.J., 1999. A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics* **57**, 9–23.
- Mésouchina, P., Mbangwa, O., Chardonnet, P., Moshia, R., Mtui, B., Drouet, N., Crosmar, W., Kissui, B., 2010. Conservation status of the lion (*Panthera leo* Linnaeus, 1758) in Tanzania.
- Morin, P.A., Luikart, G., Wayne, R.K., 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *TRENDS Ecol. Evol.* **19**, 208–216.
- Mosser, A., Packer, C., 2009. Group territoriality and the benefits of sociality in the African lion, *Panthera leo*. *Anim. Behav.* **78**, 359–370.

- Munson, L., Brown, J.L., Bush, M., Packer, C., Janssen, D., Reiziss, S.M., Wildt, D.E., 1996. Genetic diversity affects testicular morphology in free-ranging lions (*Panthera leo*) of the Serengeti Plains and Ngorongoro Crater. *J. Reprod. Fertil.* **108**, 11–15.
- Munson, L., Terio, K.A., Kock, R., Mlengeya, T., Roelke, M.E., Dubovi, E., Summers, B., Sinclair, A.R.E., Packer, C., 2008. Climate extremes promote fatal co-infections during canine distemper epidemics in African lions. *PLoS One* **3**, 1–7.
- Nelson, F., Lindsey, P., Balme, G., 2013. Trophy hunting and lion conservation: a question of governance? *Oryx* **47**, 501–509.
- Nowell, K., Jackson, P., 1996. Wild cats: status survey and conservation action plan.
- O'Brien, S.J., 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 5748–5755.
- Packer, C., Brink, H., Kissui, B.M., Maliti, H., Kushnir, H., Caro, T., 2011. Effects of Trophy Hunting on Lion and Leopard Populations in Tanzania. *Conserv. Biol.* **25**, 142–153.
- Packer, C., Gilbert, D.A., Pusey, A.E., O'Brien, S.J., 1991. A molecular genetic analysis of kinship and cooperation in African lions. *Nature* **351**, 562–565.
- Packer, C., Ikanda, D., Kissui, B., Kushnir, H., 2005. Conservation biology: lion attacks on humans in Tanzania. *Nature* **436**, 927–928.
- Packer, C., Kosmala, M., Cooley, H.S., Brink, H., Pintea, L., Garshelis, D., Purchase, G., Strauss, M., Swanson, A., Balme, G., Hunter, L., Nowell, K., 2009. Sport hunting, predator control and conservation of large carnivores. *PLoS One* **4**, e5941.
- Packer, C., Loveridge, A., Canney, S., Caro, T., Garnett, S.T., Pfeifer, M., Zander, K.K., Swanson, A., MacNulty, D., Balme, G., Bauer, H., Begg, C.M., Begg, K.S., Bhalla, S., Bissett, C., Bodasing, T., Brink, H., Burger, A., Burton, A.C., Clegg, B., Dell, S., Delsink, A., Dickerson, T., Dloniak, S.M., Druce, D., Frank, L., Funston, P., Gichohi, N., Groom, R., Hanekom, C., Heath, B., Hunter, L., Deiongh, H.H., Joubert, C.J., Kasiki, S.M., Kissui, B., Knocker, W., Leathem, B., Lindsey, P.A., MacLennan, S.D., McNutt, J.W., Miller, S.M., Naylor, S., Nel, P., Ng'weno, C., Nicholls, K., Ogutu, J.O., Okot-Omoya, E., Patterson, B.D., Plumptre, A., Salerno, J., Skinner, K., Slotow, R., Sogbohossou, E.A., Stratford, K.J., Winterbach, C., Winterbach, H., Polasky, S., 2013. Conserving large carnivores: Dollars and fence. *Ecol. Lett.* **16**, 635–641.
- Patterson, B.D., Kasiki, S.M., Selempo, E., Kays, R.W., 2004. Livestock predation by lions (*Panthera leo*) and other carnivores on ranches neighboring Tsavo National Parks, Kenya. *Biol. Conserv.* **119**, 507–516.
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* **6**, 288–295.
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* **28**, 2537–2539.

- Peterson, A.T., Radocy, T., Hall, E., Kerbis Peterhans, J.C., Celesia, G.G., 2014. The potential distribution of the Vulnerable African lion *Panthera leo* in the face of changing global climate. *Oryx* **48**, 555–564.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945–959.
- R Core Team, 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna (Austria).
- Rašić, G., Filipović, I., Weeks, A.R., Hoffmann, A.A., 2014. Genome-wide SNPs lead to strong signals of geographic structure and relatedness patterns in the major arbovirus vector, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics* **15**, 275.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. GENEPOP (Version1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J. Hered.* **86**, 248–249.
- Riggio, J., Jacobson, A., Dollar, L., Bauer, H., Becker, M., Dickman, A., Funston, P., Groom, R., Henschel, P., de Iongh, H., Lichtenfeld, L., Pimm, S., 2013. The size of savannah Africa: a lion's (*Panthera leo*) view. *Biodivers. Conserv.* **22**, 17–35.
- Rosenblatt, E., Becker, M.S., Creel, S., Droge, E., Mweetwa, T., Schuette, P.A., Watson, F., Merkle, J., Mwape, H., 2014. Detecting declines of apex carnivores and evaluating their causes: An example with Zambian lions. *Biol. Conserv.* **180**, 176–186.
- Schaller, G.B., 2009. The Serengeti Lion: A Study of Predator-Prey Relations.
- Schuette, P., Creel, S., Christianson, D., 2013. Coexistence of African lions, livestock, and people in a landscape with variable human land use and seasonal movements. *Biol. Conserv.* **157**, 148–154.
- Sims, D., Sudbery, I., Ilott, N.E., Heger, A., Ponting, C.P., 2014. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 121–32.
- Singh, H.S., Gibson, L., 2011. A conservation success story in the otherwise dire megafauna extinction crisis: The Asiatic lion (*Panthera leo persica*) of Gir forest. *Biol. Conserv.* **144**, 1753–1757.
- Smitz, N., 2016. Study of the genetic structure of the African buffalo populations (*Syncerus caffer*): Impact of its high mobility and of the population fragmentation on its distribution and its interactions with humans. University of Liege.
- Smitz, N., Berthouly, C., Cornelis, D., Heller, R., van Hooft, P., Chardonnet, P., Caron, A., Prins, H., van Vuuren, B.J., de Iongh, H., Michaux, J., 2013. Pan-African Genetic Structure in the African Buffalo (*Syncerus caffer*): Investigating Intraspecific Divergence. *PLoS One* **8**, e56235.
- Smitz, N., Cornélis, D., Chardonnet, P., Caron, A., de Garine-Wichatitsky, M., Jori, F., Mouton, A., Latinne, A., Pigneur, L.-M., Melletti, M., Kanapeckas, K.L., Marescaux, J., Pereira, C., Michaux, J., 2014. Genetic structure of fragmented southern populations of African Cape buffalo (*Syncerus caffer caffer*). *BMC Evol. Biol.* **14**, 203.

- Spong, G., Stone, J., Creel, S., Björklund, M., 2002. Genetic structure of lions (*Panthera leo* L.) in the Selous Game reserve: implications for the evolution of sociality. *J. Evol. Biol.* **15**, 945–953.
- The IUCN SSC Cat Specialist Group, 2006a. Conservation Strategy for the Lion in West and Central Africa.
- The IUCN SSC Cat Specialist Group, 2006b. Conservation Strategy for the Lion in Eastern and Southern Africa.
- Tokarska, M., Marshall, T., Kowalczyk, R., Wójcik, J.M., Pertoldi, C., Kristensen, T.N., Loeschcke, V., Gregersen, V.R., Bendixen, C., 2009. Effectiveness of microsatellite and SNP markers for parentage and identity analysis in species with low genetic diversity: the case of European bison. *Heredity* **103**, 326–332.
- Trinkel, M., Cooper, D., Packer, C., Slotow, R., 2011. Inbreeding depression increases susceptibility to bovine tuberculosis in lions: an experimental test using an inbred-outbred contrast through translocation. *J. Wildl. Dis.* **47**, 494–500.
- Trinkel, M., Funston, P., Hofmeyr, M., Hofmeyr, D., Dell, S., Packer, C., Slotow, R., 2010. Inbreeding and density-dependent population growth in a small, isolated lion population. *Anim. Conserv.* **13**, 374–382.
- Troyer, J.L., Pecon Slattery, J., Black, L., O'Brien, S.J., Roelke, M.E., Packer, C., 2004. Patterns of Feline Immunodeficiency Virus Multiple Infection and Genome Divergence in a Free-Ranging Population of African Lions. *J. Virol.* **78**, 3777–3791.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. Micro-Checker: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data. *Mol. Ecol. Notes* **4**, 535–538.
- van Rossum, G., de Boer, J., 1991. Interactively Testing Remote Servers Using the Python Programming Language. *CWI Q.* **4**, 283–303.
- Vignieri, S., 2014. Vanishing Fauna. *Science* **345**, 392–395.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* **38**, 1358–1370.
- Whitman, K., Starfield, A.M., Quadling, H.S., Packer, C., 2004. Sustainable trophy hunting of African lions. *Nature* **428**, 175–178.
- Yamaguchi, N., Macdonald, D.W., Cooper, A., Werdelin, L., 2004. Evolution of the mane and group-living in the lion (*Panthera leo*): a review. *Zool. Soc. London* **263**, 329–342.

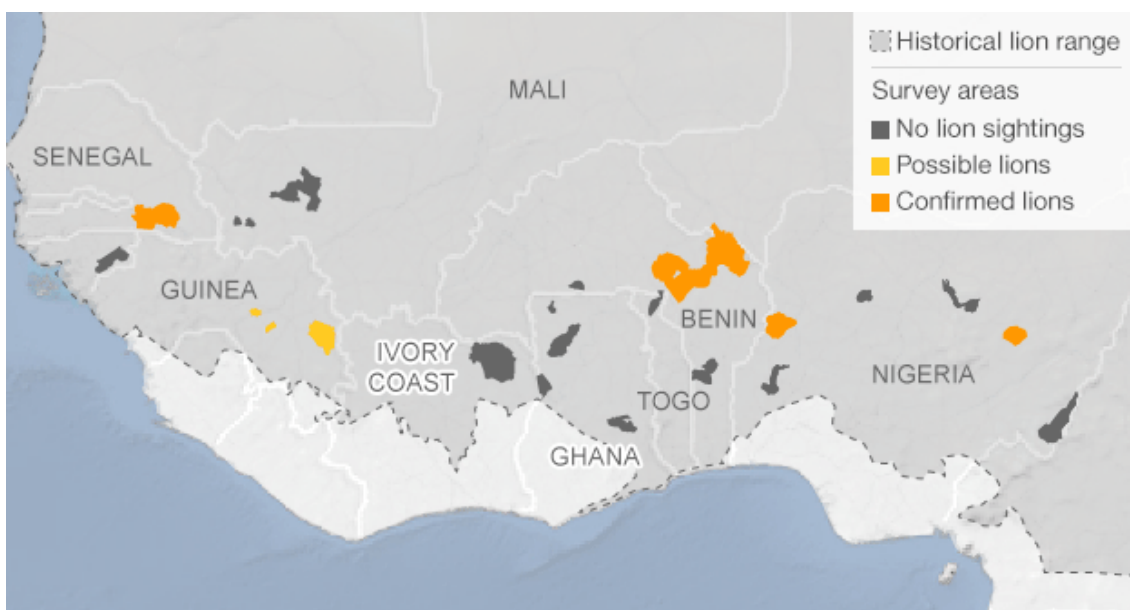
# ANNEXE 1

---

## CARTE REPRESENTANT LA POSSIBLE REPARTITION DE *PANTHERA LEO* EN AFRIQUE DE L'OUEST DANS LES AIRES PROTEGEES

En gris : considérés absents, en jaune : possiblement présents, en orange : présence confirmée.

(Carte modifiée depuis Henschel et al. 2014)



# ANNEXE 2 : ECHANTILLONS DE L'ETUDE

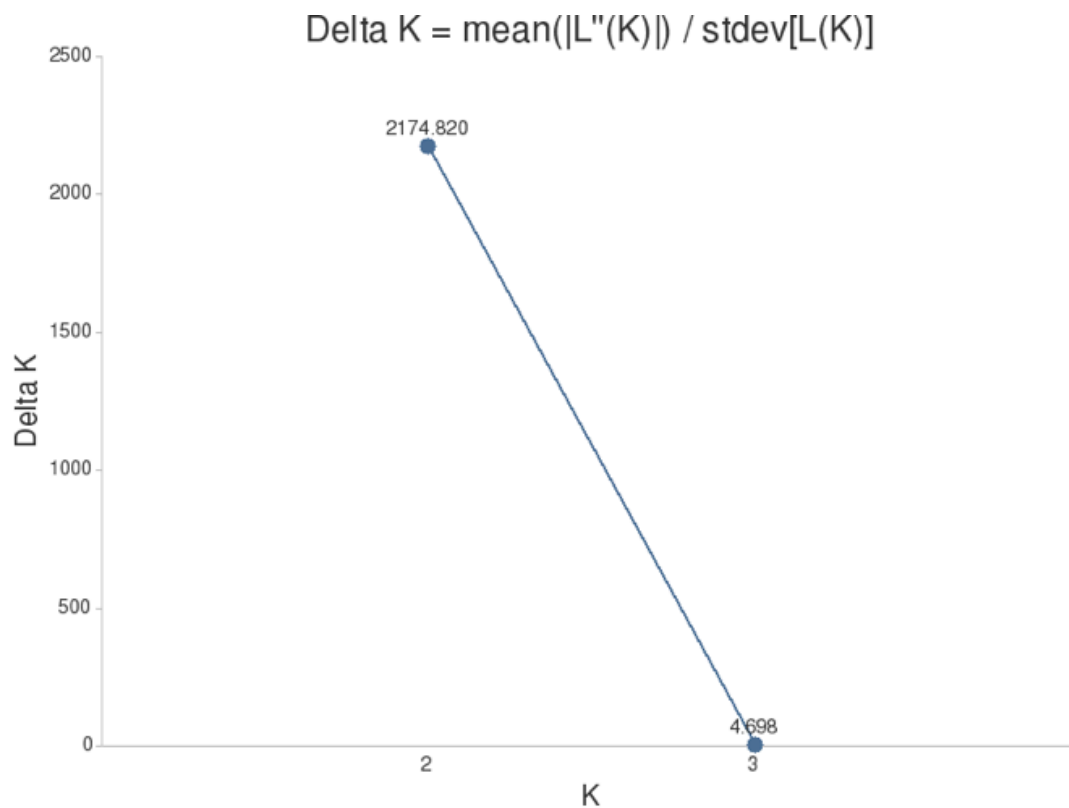
NOM	PROVENANCE	REGION	TYPE	NOM	PROVENANCE	REGION	TYPE	NOM	PROVENANCE	REGION	TYPE
RCA1	Centrafrique	ZC de Goumbiri	Tissu	10	Tanzanie	Selous GR LU2	Tissu	47	Tanzanie	Parc National du Serengeti	Poil
RCA2	Centrafrique	ZCV Idongo	Tissu	11	Tanzanie	Lukwati GR nord	Tissu	48	Tanzanie	Rungwa GR Mpera	Tissu
RCA3	Centrafrique	Secteur de chasse	Tissu	12	Tanzanie	Chunya OA ouest	Tissu	49	Tanzanie	Rungwa GR Rungwa ouest	Tissu
RCA4	Centrafrique	ZCV Bamingui-Bangoran	Tissu	13	Tanzanie	Moyowosi Njingwe GR sud	Tissu	50	Tanzanie	Muhesi GR ouest	Tissu
BEN1	Bénin	ZC d'Atakora-Mékrou	Tissu	14	Tanzanie	Moyowosi Njingwe GR sud	Tissu	51	Tanzanie	Lukwati GR nord	Tissu
BUR1	Burkina Faso	ZC d'Ougarou	Tissu	15	Tanzanie	Maswa OA Kimali	Tissu	52	Tanzanie	Lukwati GR nord	Tissu
BUR2	Burkina Faso	ZC de Pagou-Tandougou	Tissu	16	Tanzanie	Wembere OA sud	Tissu	53	Tanzanie	Selous GR MA1	Tissu
BUR3	Burkina Faso	ZC de Konkombouri	Tissu	17	Tanzanie	Selous GR K1	Tissu	54	Tanzanie	Selous GR MA1 et U3	Tissu
BUR4	Burkina Faso	ZC de Konkombouri	Tissu	18	Tanzanie	Lolkisale	Tissu	55	Tanzanie	Msima GCA est	Tissu
BUR5	Burkina Faso	ZC d'Ougarou	Tissu	19	Tanzanie	Lukwati GR sud	Tissu	56	Tanzanie	Rungwa GR Ikili	Tissu
BUR6	Burkina Faso	Réserve de Singou	Tissu	20	Tanzanie	Lukwati GR nord	Tissu	57	Tanzanie	Lukwati GR sud	Tissu
BUR7	Burkina Faso	ZC de Pagou-Tandougou	Tissu	21	Tanzanie	Rungwa GR Mzombe	Tissu	58	Tanzanie	Lukwati GR sud	Tissu
BUR8	Burkina Faso	ZC de Pagou-Tandougou	Tissu	23	Tanzanie	Rungwa GR Mpera	Tissu	59	Tanzanie	Selous GR LR3	Tissu
BUR9	Burkina Faso	ZC de Pama nord	Tissu	24	Tanzanie	Rungwa GR Rungwa	Tissu	60	Tanzanie	Masai OA est	Tissu
BUR10	Burkina Faso	ZC de Pama sud	Tissu	25	Tanzanie	Loliondo GCA	Tissu	61	Tanzanie	Rungwa GR Rungwa ouest	Tissu
BUR11	Burkina Faso	ZC de Pama sud	Tissu	26	Tanzanie	Luganzo GCA	Tissu	62	Tanzanie	Rungwa GR Rungwa ouest	Tissu
BUR12	Burkina Faso	Réserve de Kourtiagou	Tissu	27	Tanzanie	Mbarang'andu OA	Tissu	63	Tanzanie	Selous GR LR2	Tissu
BUR13	Burkina Faso	ZC de Koakrana	Tissu	28	Tanzanie	Ugunda GCA	Tissu	64	Tanzanie	Simanjiro Kitiangare GCA	Tissu
BUR14	Burkina Faso	ZC de Koakrana	Tissu	29	Tanzanie	Ugunda GCA	Tissu	65	Tanzanie	Lac Rukwa GR	Tissu
BUR15	Burkina Faso	ZC de Pama centre sud	Tissu	30	Tanzanie	Rungwa GR Mzombe	Tissu	66	Tanzanie	Rungwa Mzombe OA	Tissu
BUR16	Burkina Faso	Réserve de Kourtiagou	Tissu	31	Tanzanie	Rungwa GR Mzombe	Tissu	67	Tanzanie	Rungwa Mzombe OA	Tissu
BUR17	Burkina Faso	ZC de Pagou-Tandougou	Tissu	33	Tanzanie	Burunge	Tissu	68	Tanzanie	Rungwa Mzombe OA	Tissu
BUR18	Burkina Faso	ZC de Konkombouri	Tissu	34	Tanzanie	Inyonga GCA ouest	Tissu	69	Tanzanie	Selous GR LU5	Tissu
BUR19	Burkina Faso	ZC de Pagou-Tandougou	Tissu	35	Tanzanie	Msima GCA ouest	Tissu	70	Tanzanie	Rungwa GR Rungwa est	Tissu
BUR20	Burkina Faso	ZC de Pama sud	Tissu	36	Tanzanie	Maswa OA nord	Tissu	71	Tanzanie	Lunda Nkwambi GCA	Tissu
CON2	Congo-Brazzaville	Parc National d'Odzala	Dent	37	Tanzanie	Maswa OA nord	Tissu	72	Tanzanie	Selous GR LU5	Tissu
CON3	Congo-Brazzaville	Parc National d'Odzala	Dent	38	Tanzanie	Maswa OA nord	Tissu	73	Tanzanie	Rungwa GR Rungwa est	Tissu
1	Tanzanie	Selous GR N1	Tissu	39	Tanzanie	Lac Rukwa GR	Tissu	74	Tanzanie	Selous GR	Tissu
2	Tanzanie	Rungwa GR Mpera	Tissu	40	Tanzanie	Parc National de Tarangire	Poil	11ta	Tanzanie	Selous GR	Tissu
3	Tanzanie	Rungwa GR Mzombe	Tissu	41	Tanzanie	Parc National de Tarangire	Poil	21ta	Tanzanie	Selous GR	Tissu
5	Tanzanie	Selous GR LA1	Tissu	42	Tanzanie	Parc National de Tarangire	Poil	31ta	Tanzanie	Selous GR	Tissu
6	Tanzanie	Selous GR RU1	Tissu	43	Tanzanie	Parc National de Tarangire	Poil	41ta	Afrique du Sud	Parc National du Kruger	Tissu
7	Tanzanie	Loliondo GCA	Tissu	44	Tanzanie	Parc National de Tarangire	Poil	51ta	Afrique du Sud	Parc National du Kruger	Tissu
8	Tanzanie	Selous GR IH1	Tissu	45	Tanzanie	Parc National de Tarangire	Poil	61ta	Afrique du Sud	Parc National du Kruger	Tissu
9	Tanzanie	Selous GR LU4	Tissu	46	Tanzanie	Parc National de Serengeti	Poil				

## ANNEXE 3

---

### **MEILLEUR SCENARIO POSSIBLE POUR LA STRUCTURATION DES ECHANTILLONS DE LIONS A L'ECHELLE CONTINENTALE ET SUR BASE DES 11 MICROSATELLITES DE L'ETUDE, POUR K ALLANT DE 1 A 4, SELON LA METHODE D'EVANNO ET AL. (2005)**

Analyse réalisée grâce aux logiciels Structure v.2.3.4 (Falush et al., 2003; Pritchard et al., 2000) et CLUMPAK (Kopelman et al., 2015)

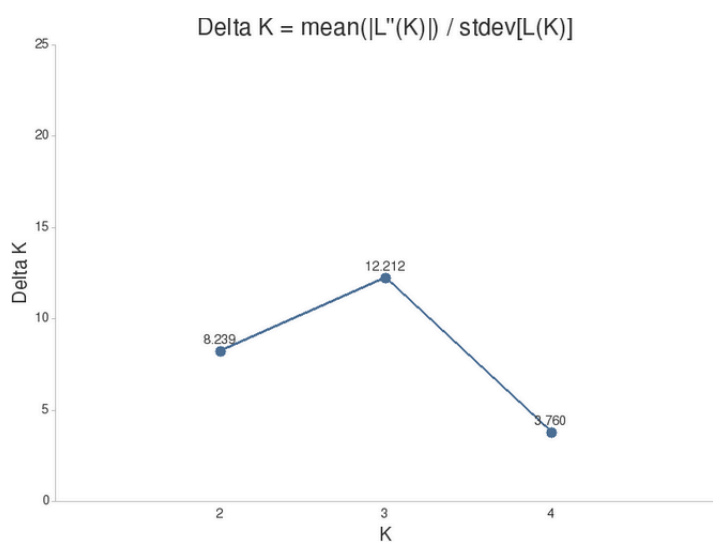




# ANNEXE 4

## PROPOSITION DE STRUCTURE A L'ECHELLE DE LA TANZANIE POUR K ALLANT DE 1 A 5 SUR BASE DES 11 MICROSATELLITES DE L'ETUDE SELON LA METHODE D'EVANNO ET AL. (2005)

Analyse réalisée avec Structure v.2.3.4 (Falush et al., 2003; Pritchard et al., 2000) et CLUMPAK (Kopelman et al., 2015)



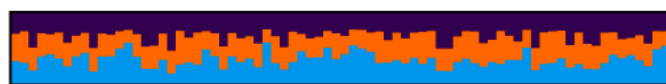
K=1



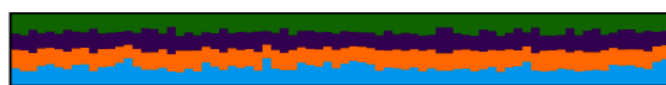
K=2



K=3



K=4



K=5

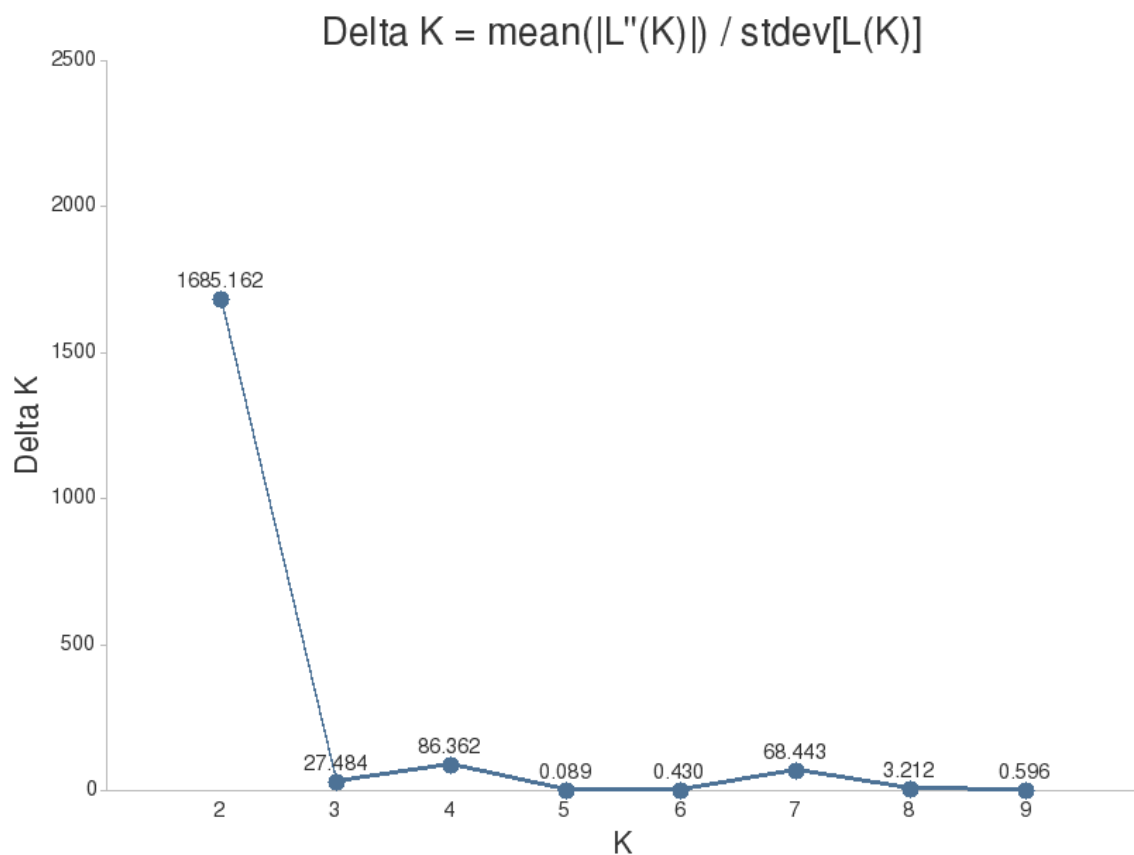


# ANNEXE 5

---

## MEILLEUR SCENARIO POSSIBLE POUR LA STRUCTURATION DES ECHANTILLONS DE LIONS A L'ECHELLE CONTINENTALE ET SUR BASE DES SNPs DE L'ETUDE, POUR K ALLANT DE 1 A 10, SELON LA METHODE D'EVANNO ET AL. (2005)

Analyse réalisée grâce aux logiciels Structure v.2.3.4 (Falush et al., 2003; Pritchard et al., 2000) et CLUMPAK (Kopelman et al., 2015)

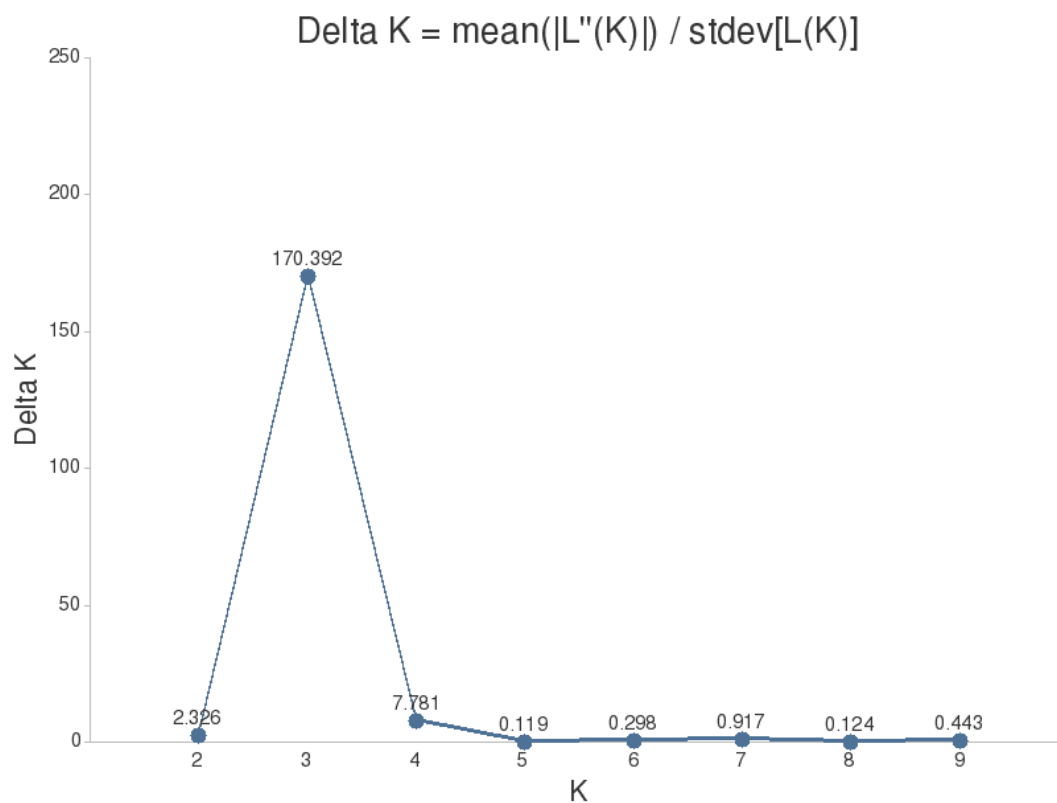


## ANNEXE 6

---

### MEILLEUR SCENARIO POSSIBLE POUR LA STRUCTURATION DES ECHANTILLONS DE LIONS A L'ECHELLE DE LA TANZANIE ET SUR BASE DES SNPs DE L'ETUDE, POUR K ALLANT DE 1 A 10, SELON LA METHODE D'EVANNO ET AL. (2005)

Analyse réalisée grâce aux logiciels Structure v.2.3.4 (Falush et al., 2003; Pritchard et al., 2000) et CLUMPAK (Kopelman et al., 2015)



# ANNEXE 7

## ARBRE DECRIVANT LA STRUCTURATION DES 51 ECHANTILLONS TANZANIENS, OBTENU PAR NEIGHBOR-JOINING

Réalisé à l'aide du programme Tassel et sur base des 9 184 SNPs analysés

