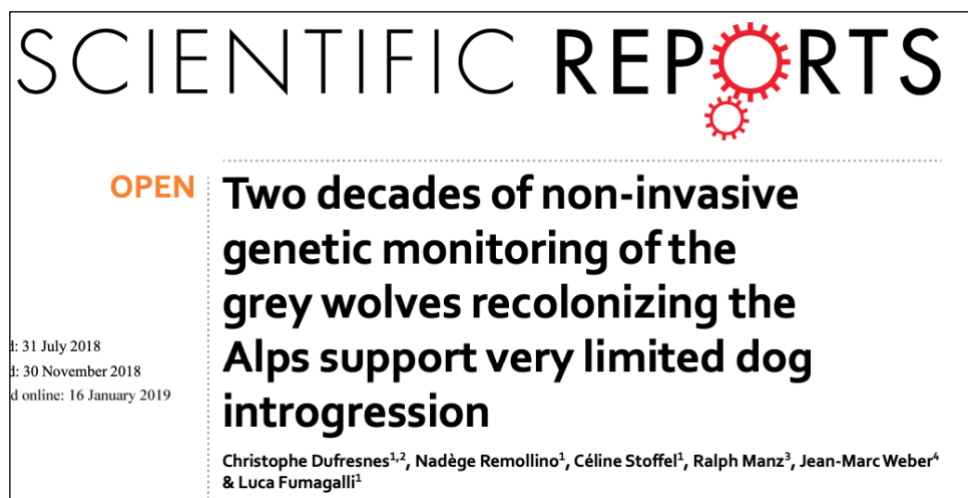


## Deux décennies de suivi génétique non invasif des loups gris recolonisant les Alpes permettent de conclure à une introgression canine très limitée



### Résumé

L'hybridation potentielle entre les loups et les chiens a alimenté le délicat débat politique et de conservation qui sous-tend le rétablissement du loup gris dans toute l'Europe. Nous fournissons ici la première analyse génétique du mélange loup-chien dans une région entièrement recolonisée, le nord-ouest des Alpes. Dans le cadre d'un programme de surveillance à long terme, nous avons effectué un dépistage génétique de milliers d'échantillons non invasifs collectés en Suisse et dans les territoires adjacents depuis le retour du loup au milieu des années 1990. **Nous avons identifié un total de 115 individus, dont 2 seulement présentaient des signes significatifs d'introgression provenant d'anciens croisements avec des chiens, suivis de rétrocroisements.** Ce faible taux **d'introgression** (<2% pour l'ensemble des loups détectés entre 1998 et 2017) correspond à celui d'autres populations Européennes, notamment en Europe occidentale (<7%). Malgré l'hybridation potentielle avec les chiens errants, le peu de fondateurs et les fortes pressions anthropiques, l'intégrité génétique de la population alpine est restée intacte tout au long du processus de recolonisation. Dans un contexte de désinformation généralisée, cette découverte devrait réduire les conflits entre les différents acteurs impliqués et faciliter la conservation des loups. Un suivi génétique en temps réel sera nécessaire pour identifier les hybrides potentiels et soutenir une gestion efficace de cette population emblématique.

### INTRODUCTION

L'hybridation anthropique entre les espèces sauvages et leurs homologues domestiqués est une préoccupation centrale en biologie de la conservation. L'introduction d'allèles sélectionnés artificiellement peut être bénéfique, en apportant une variation génétique adaptative dans les pools génétiques naturels<sup>1</sup>. Elle peut aussi menacer les populations sauvages en raison de l'homogénéisation génétique, des incompatibilités et/ou de la perturbation des combinaisons alléliques adaptées localement<sup>2-5</sup>. Dans tous les cas, les croisements et l'introgression subséquente mettent en danger l'intégrité génétique des populations sauvages, sur lesquelles des actions légales sont appliquées par les acteurs institutionnels.

Le loup gris (*Canis lupus*) et sa forme domestiquée, le chien (*C. l. familiaris*), constituent l'un des exemples les plus emblématiques et complexes de cette problématique. Après leur éradication presque totale dans de grandes parties de leur aire de répartition originelle au cours des derniers siècles, les loups se reconstituent et recolonisent certaines parties de leurs anciennes aires de répartition<sup>6</sup>, ce qui suscite de graves inquiétudes quant aux menaces pesant sur le bétail, au point que leur gestion est devenue un débat politique. L'hybridation loup-chien est un aspect central de ce débat. Des hybrides ont été signalés dans toute l'Europe (tableau 1), essentiellement issus de croisements asymétriques (chiens mâles × loups femelles), les individus rétrocroisés étant ensuite intégrés dans des meutes de loups<sup>7-11</sup> (mais voir<sup>12</sup>). Alors que le loup fait l'objet d'une protection stricte par plusieurs traités internationaux, avec toutefois des dérogations nationales pour réduire la prédation et les conflits avec l'élevage local, les individus croisés tombent dans un vide juridique. Il est recommandé de les éliminer pour protéger l'intégrité des populations sauvages<sup>13-16</sup>. Ainsi, la caractérisation de la nature génétique des loups en expansion est un aspect majeur de leur conservation, d'autant plus que les critères morphologiques potentiellement diagnostiques des hybrides (i.e. pelage noir, griffes blanches et éperon sur les pattes arrière) ne sont pas fiables pour identifier correctement les individus **métissés**<sup>17-19</sup>.

**Tableau 1.** Résumé des études génétiques estimant les taux de métissage basés sur la population dans des échantillons de loups sauvages, ainsi que la confirmation d'hybrides suspectés à partir d'analyses morphologiques, comportementales et/ou génétiques préliminaires. Les taux de métissage dépendent du seuil de métissage Q choisi, qui varie entre 0,8 et 0,95 selon les études

Location	Period	Admixed/Confirmed	Resources	Remarks	Ref.
<b>Admixture estimation in wild populations</b>					
Italian Apennines (full range)	~1984–1999	1/107 (0.9%)	18 STRs	—	7
Italian Apennines (full range)	1987–2002	11/220 (5.0%)	16 linked-STRs	—	9
Italian Apennines (central-southern)	2000–2012	7/107 (6.5%)	18 STRs	—	53
Italian Apennines (northern)	2000–2009	16/430 (3.7%)	12 STRs + mtDNA CR + 4 Y-linked STRs	—	68
Italian Apennines (central, two areas)	2004–2013	14/47 (29.8%)	12 STRs + mtDNA CR + 2 Y-linked STRs	local hybridization events	21
Spain (north-western)	—	0/20 (0.0%)	13 STRs + mtDNA CR	—	69
Spain (north-western, one area)	2013	4/67 (6.0%)	18 STRs + mtDNA CR	three-months sampling	36
Spain + Portugal (full range)	1996–2009	8/212 (3.8%)	42 STRs + mtDNA CR + 6 Y-linked STRs	—	11
Portugal (central-western, one area)	2011–2014	1/21 (4.8%)	24 STRs + mtDNA CR	three packs studied	70
Georgia (full range)	2008–2012	14/102 (13.7%)	8 STRs + mtDNA CR	guarding dogs widespread	22
Bulgaria (full range) and Greece	2000–2011	10/102 (9.8%)	14 STRs + mtDNA CR	feral dogs widespread	71
Croatia (full range)	1996–2011	5/176 (2.8%)	12 STRs + mtDNA CR + 4 Y-linked STRs	hybrids restricted to anthropogenic areas	19
<b>Confirmation of presumptive hybrids</b>					
Italian Apennines	1996–2011	24/30	39 STRs		17
Italian Apennines	1992–2015	68/68	170 K SNPs		18
Italian Tuscany	1993–2001	3/3	18 STRs		72
Spain	2011	9/13	13 or 52 STRs + mtDNA CR		54
Latvia	1997–1999	12/12	16 STRs + mtDNA CR		8
Estonia and Latvia	2008–2009	8/8	11 STRs		12
Norway	1998–1999	1/1	18 STRs + mtDNA CR + 1 Y-linked STR		10
Iran	—	7/7	15 STRs		73

Ces dernières années, un grand nombre d'études ont suivi de manière exhaustive le taux et les modalités d'hybridation loup-chien dans les populations Européennes en expansion (résumées dans le tableau 1), qui semblent dépendre de leur niveau de perturbation (voir ci-dessous), en lien avec l'abondance de chiens sauvages (retournés à l'état sauvage) et errants (en liberté). En conséquence, le brassage reste faible en Europe occidentale (c'est-à-dire de 0 à 6,5 % dans les Apennins Italiens et en Ibérie, tableau 1), étant localement plus élevé dans les environnements anthropiques où les chiens errants sont courants<sup>19,20</sup>, et où les meutes résidentes sont introgressées<sup>21</sup>. On s'attend à ce que les chiffres soient plus élevés dans les pays de l'Est (10-14% en Géorgie, en Bulgarie et dans la Grèce voisine), où les chiens de garde de grande taille en liberté constituent un problème<sup>22</sup>. Toutes les études, cependant, se sont concentrées sur le rétablissement de populations qui n'ont jamais été confrontées à une éradication complète. **En revanche, le risque de croisement avec des chiens devrait être nettement plus élevé dans les zones récemment recolonisées.** Cela s'explique tout d'abord par le faible nombre de fondateurs impliqués : l'hybridation dans les premiers stades de la colonisation pourrait conduire à une introgression généralisée au fur et à mesure de l'expansion de la population. Deuxièmement, les zones où le loup a autrefois disparu sont généralement dominées par l'homme et peu acceptées par la population locale. Ces conditions, et notamment le taux potentiellement élevé de braconnage, peuvent perturber leur structure sociale, favorisant ainsi les croisements avec les chiens errants. Par exemple, en Croatie et en Italie, on trouve de nombreux hybrides près des établissements humains, avec un taux élevé de mortalité due à l'homme<sup>19,20</sup>.

La population de loups des Alpes reste une lacune majeure dans la littérature Européenne sur l'hybridation loup-chien. Exterminés dans les Alpes françaises et Suisses à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, et dans les Alpes Italiennes au début du 20<sup>ème</sup> siècle, les loups se sont rétablis dans cette région à partir de poches reliques des Apennins Italiens depuis le début des années 1990<sup>23-26</sup>. Leur diversité d'ADN mitochondrial, autrefois élevée, a maintenant été essentiellement remplacée par un seul haplotype de la région de contrôle (CR) (par la suite l'haplotype Italien), diagnostique de ces régions et jamais trouvé chez les chiens ou les loups ailleurs<sup>24,27-30</sup>. Cette nouvelle population constitue donc un système idéal pour tester si l'hybridation avec les chiens a eu des conséquences génétiques plus fortes dans les zones recolonisées. Répertoire comme « en danger » (sur la base de données de 2007<sup>31</sup>), la population de loups alpins est en constante augmentation, formant environ 65 meutes lors de la dernière mise à jour (2015-2016), principalement situées dans les parties occidentales entre la France et l'Italie<sup>32</sup>. Outre le manque d'habitat approprié et la persécution, l'hybridation potentielle avec les chiens est considérée comme une menace majeure<sup>33</sup>. En Suisse, seules trois meutes établies sont présentes, mais des dizaines d'individus itinérants migrent à travers le pays et les régions voisines. La présence du loup est très controversée dans ce pays : malgré son statut de protection stricte, l'espèce fait l'objet d'une gestion très rigoureuse par l'élimination sélective des individus vagabonds (lorsque l'impact de la prédation est jugé trop important), mais elle est confrontée à une forte pression des éleveurs, des chasseurs et des communautés locales<sup>34</sup>, qui véhiculent des rumeurs publiques telles que celle selon laquelle les hybrides loup-chien sont répandus. Par conséquent, déduire le taux d'hybridation introgressive loup-chien dans la population alpine est également crucial pour sa gestion future et sa perception sociale.

Dans cette étude, nous avons mené une enquête génétique sur tous les loups détectés dans les territoires Suisses et adjacents, dans le cadre d'une surveillance génétique non invasive continue depuis les premières étapes du processus de recolonisation entamé il y a plus de 20 ans<sup>24,25</sup>. Nous avons génotypé des milliers d'échantillons d'ADN non invasifs et effectué des analyses de

**métissage** de génotypes multilocus de loups putatifs et de chiens de référence, afin d'estimer le taux d'hybridation et de **métissage** dans la population alpine nouvellement colonisée.

## METHODES

### Zone d'étude et collecte des échantillons

L'étude a été menée en Suisse et dans les territoires voisins (France et Italie proches), couvrant une superficie d'environ 45 000 km<sup>2</sup>, dans le cadre d'un suivi génétique non invasif à long terme de l'espèce depuis sa recolonisation de l'aire de répartition alpine dans les années 1990. Un total de 3 486 échantillons a été analysé. Parmi eux, 3 463 échantillons non identifiés, comprenant 1 191 crottes (34,4%), 2 007 écouvillons salivaires prélevés sur des proies (58,0%), 106 poils (3,1%), 119 échantillons d'urine (3,4%), 7 régurgitations (0,2%) et 33 échantillons de sang (0,9%), qui ont été collectés de manière non invasive sur le terrain de novembre 1998 à décembre 2017 par des rangers et des gardes formés des offices régionaux Suisses de la faune et des chercheurs. En outre, les tissus de 23 loups morts (accidentellement, illégalement ou légalement tués) ont également été analysés. L'origine géographique des échantillons et leur nombre de détections sont indiqués dans le tableau S1. Les sites d'échantillonnage non invasif ont été choisis de manière opportuniste sur la base de la présence connue ou présumée de loups, de la mort documentée de proies ou d'observations directes aléatoires. Les échantillons de tissus, de crottes et de poils ont été conservés dans de l'éthanol à 80-95% à +4 ou -20 °C. Les échantillons d'écouvillons ont été stockés séchés et traités immédiatement après leur arrivée au laboratoire. Les échantillons de régurgitations et d'urine ont été conservés à -20 °C.

Aucune approbation éthique n'a été nécessaire pour travailler avec des échantillons non invasifs ou des tissus d'animaux morts. Les procédures de travail sur le terrain ont été spécifiquement approuvées par les offices régionaux de la faune et l'Office fédéral de l'environnement (OFEV) dans le cadre des activités de surveillance nationale du loup.

### Extraction d'ADN, séquençage et génotypage

#### Analyses génétiques standard

#### Analyses de métissage

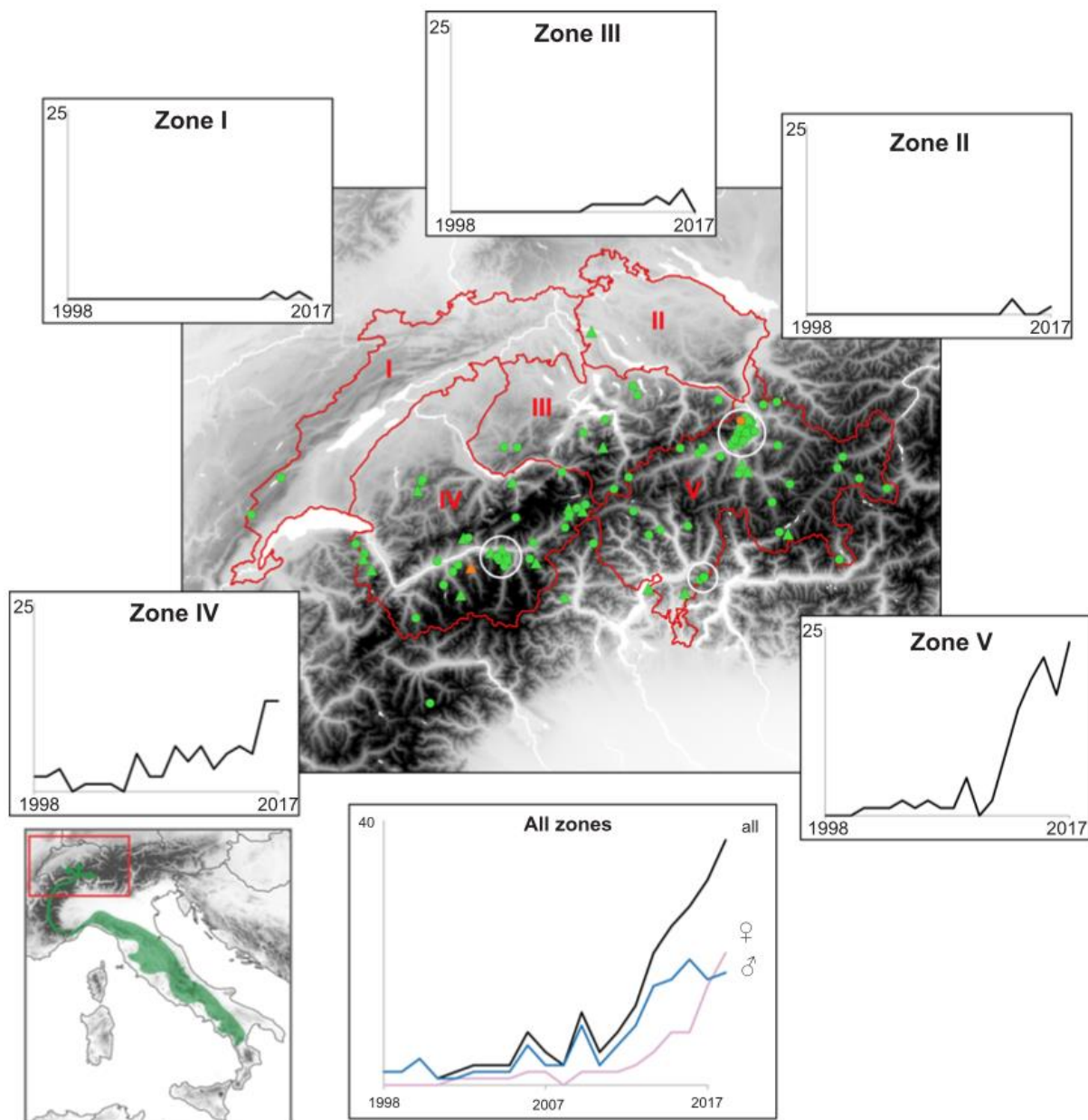
## RESULTATS

### Dépistage génétique

Nous avons séquencé le domaine gauche de la région de contrôle (RC) hypervariable mitochondriale (ADNmt) dans un total de 3 463 échantillons non invasifs non identifiés et 23 tissus de loups morts (359-360 pb ou 235-236 pb, voir Méthodes). Au total, 1 645 échantillons ont pu être attribués à l'haplotype privé du loup Italien (47,2%), 409 à des haplotypes de chiens typiques (*C. l. familiaris* ; 11,7%), 709 à des renards roux (*Vulpes vulpes* ; 20,3%), 361 à d'autres mammifères (10,4%) et 362 (10,4%) n'ont pu être ni amplifiés par PCR ni séquencés (en raison de la contamination par plusieurs taxons, par exemple des échantillons de salive sur des proies). Les 68 chiens de référence ne portaient pas l'haplotype CR du loup Italien, mais seulement celui du chien typique (Tableau S2).

Un génotypage fiable par microsatellite (11 loci) selon l'approche multitube a été réussi dans 874 des 1 645 échantillons de loups putatifs (53% ; excréments : 60% ; salive : 50% ; poils : 22% ; urine : 22% ; régurgitations : 100% ; sang : 43% ; tissu : 100%), identifiant 115 individus différents de 1998

à 2017 (79 mâles, 36 femelles), avec un nombre de détections allant de 1 à 62 (moyenne : 7,6 ; tableau S1). Le taux d'abandon d'allèles et de faux allèles sur l'ensemble des loci était en moyenne de 5,8% et 0,9% respectivement. Le nombre de loups a augmenté au fil des années, les mâles en premier (Fig. 1 et Tableau S1). Le maximum de détection consécutive d'un seul individu a atteint au moins sept ans (2011-2017), et 21 loups ont finalement été trouvés morts ou retirés légalement de la population. Deux autres sont morts en Allemagne.

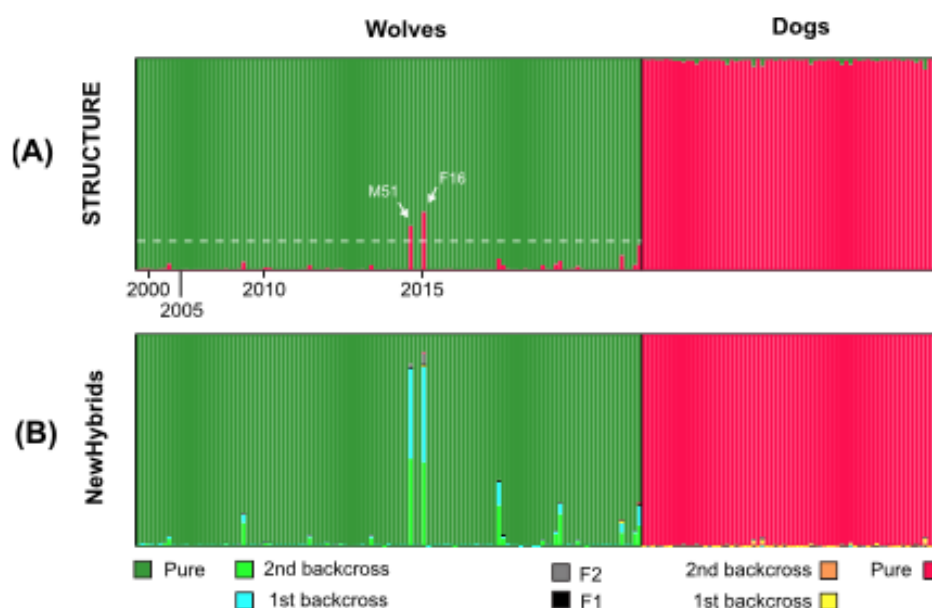


**Figure 1.** Évolution du nombre de loups détectés en Suisse dans l'espace et le temps. Le lieu de la dernière détection génétique (cercles) ou de la mort (triangles) est indiqué sur la carte. Les couleurs distinguent les loups purs (vert) des loups mélangés (orange). Les emplacements approximatifs des trois meutes résidentes sont encerclés en blanc. Les compartiments de gestion du loup tels que définis par l'OFEV sont délimités en rouge. Le panneau inférieur gauche encadre la zone d'étude (rouge) et la principale voie de recolonisation vraisemblablement empruntée par le loup depuis la population des Apennins (flèches vertes) selon<sup>24-26</sup>



## Analyses génétiques des populations et de métissage

Les loups Suisses ont satisfait à l'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE) et apparaissent **panmictiques** parmi les trois compartiments de gestion principalement occupés définis pour la Suisse ( $n = 73$ ,  $F_{st}$  par paire non significatif) ; à noter que cette analyse exclut les louveteaux présumés des trois meutes, connus par les observations de terrain et confirmés par leurs profils génétiques. Nous avons trouvé des niveaux de diversité similaires entre ces compartiments (hétérozygotie observée,  $H_e = 0,62-0,64$  ; richesse allélique,  $A_r \sim 2,4$ , échelle sur deux individus). Cette absence de structure génétique est également corroborée par les fréquents déplacements d'individus entre les cantons Suisses (c'est-à-dire les états ; tableau S1). L'ensemble complet de données sur les loups avait une probabilité d'identité (PID) de  $2,2 \times 10^{-8}$  et une PID de  $3,8 \times 10^{-4}$ .



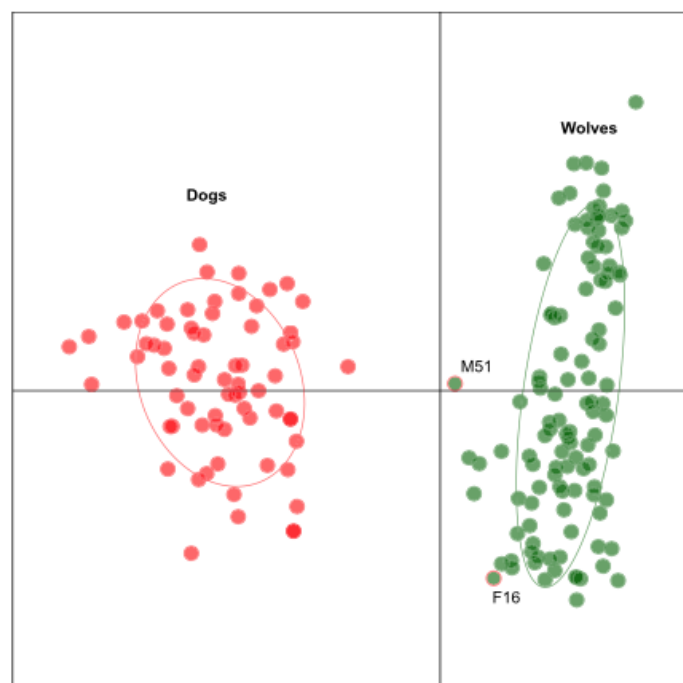
**Figure 2.** Regroupement bayésien des génotypes individuels de loups et de chiens (A) avec STRUCTURE en deux groupes, et (B) avec NewHybrids en huit classes de génotypes, dont six classes hybrides et deux classes parentales ( $n = 99$  loups purs et 55 chiens purs). Les individus sont classés selon le moment de leur première détection. La ligne pointillée montre le seuil calculé à partir des analyses d'hybrides simulés (Fig. S1). Les deux individus au-dessus de ce seuil sont représentés

Les analyses de regroupement bayésien des 115 loups putatifs et des 68 chiens de référence (obtenus en Suisse) par STRUCTURE<sup>35</sup> discriminent sans ambiguïté les deux groupes ( $K = 2$ ,  $\Delta K = 1485,0$ ) (Fig. 2A). L'analyse en composantes principales (ACP) sur les génotypes individuels retrouve également les deux groupes correspondants le long du premier axe (Fig. 3). Cependant, au moins quatre individus n'ont pas été parfaitement assignés à leur groupe correspondant, c'est-à-dire des coefficients d'admixture STRUCTURE ( $Q$ ) inférieurs à 1,0 et des positions intermédiaires sur le premier axe de l'ACP (Fig. 3). L'un des défis consiste à interpréter si un tel schéma résulte d'un flux génétique récent ou d'un regroupement imparfait dû à un polymorphisme partagé (c'est-à-dire un faux positif), qui est limité par le nombre et le caractère informatif du marqueur génétique utilisé<sup>19,36</sup>. Pour aborder cette question, nous avons simulé différentes classes d'hybrides, en utilisant comme références parentales les génotypes qui ont été correctement assignés à leurs clusters (loups et chiens « purs »,  $Q > 0,99$ ), sur lesquels nous avons mené des analyses similaires (Fig. S1). Les F1, F2 et les rétrocroisements de première génération de loups ont reçu des valeurs moyennes de  $Q_w$  ascendance de loup de 0,48 (IC 95% : 0,28-0,72), 0,50 (IC 95% : 0,26-0,79), 0,73 (IC 95% : 0,50-0,94) respectivement, et englobent donc marginalement celles des individus purs (IC 95% :

$Q_w = 0,90-1,0$  ; Fig. S1). Cependant, la distinction devient difficile avec les rétrocroisements de deuxième génération ( $Q_w$  moyen = 0,89, IC 95% : 0,61-0,96 ; Fig. S1). Suivant la méthodologie des études précédentes<sup>19,36</sup>, nous avons utilisé la valeur minimale de  $Q_w$  des individus purs (0,86) comme seuil ad-hoc pour considérer les individus comme métissés.

Dans l'ensemble des données empiriques, seuls deux loups putatifs (sur 115 ; 1,7%) ont été assignés avec une probabilité inférieure à  $Q_w = 0,86$  et ont donc très probablement été introgressés par des chiens (Fig. 2) : les individus M51 ( $Q_w = 0,72$  ; mâle, 9% de données manquantes) et F16 ( $Q_w = 0,79$  ; femelle, aucune donnée manquante). L'inspection des intervalles de confiance à 90% pour  $Q_w$  n'englobe pas 1,0 pour M51 (0,40-0,96), confirmant sa nature métisse, mais elle l'englobe pour F16 (0,54-1,0). Deux individus supplémentaires ont reçu un  $Q_w$  faible ( $< 0,95$ ), à savoir M83 ( $Q_w = 0,88$  ; mâle), M80 ( $Q_w = 0,93$  ; mâle), bien que ces génotypes présentent respectivement 31% et 18% de données manquantes.

De plus, l'assignation bayésienne des génotypes empiriques aux classes d'hybrides (F1, F2, première et deuxième génération de backcross dans chaque direction) avec NewHybrids<sup>37</sup> a confirmé que presque tous les loups alpins avaient les meilleures probabilités d'être des animaux de race pure, à l'exception de M51 et F16, qui partageaient une probabilité égale d'être des backcross de première ou deuxième génération (Fig. 2B). Cinq autres individus avaient des probabilités cumulées supérieures à 0,1 d'être des rétro-croisements, bien qu'ils aient toujours été principalement assignés à la classe des loups parentaux, plutôt qu'à toute autre classe.



**Figure 3.** Analyse en composantes principales (ACP) sur les génotypes individuels de loups (vert) et de chiens (rouge). Les deux loups métissés identifiés par les analyses d'admixture sont représentés par des bordures rouges. Les ellipses correspondent à l'inertie de 80 % de chaque groupe.

## DISCUSSION

Notre suivi génétique à long terme confirme que l'hybridation et l'introggression loup-chien sont très limitées dans les Alpes Suisses et les environs, ce qui confirme l'intégrité génétique de cette population de loups récemment établie au fil du temps. Au cours des deux dernières décennies, aucun hybride F1 n'a été détecté et seuls deux loups (sur 115) présentaient des signes significatifs d'introggression par les chiens, probablement issus de rétrocroisements. **Ils ont donc été classés comme loups rétrocroisés de première ou deuxième génération.** Nous ne pouvons exclure que d'autres individus descendent d'événements d'hybridation plus anciens, le peu d'ascendance canine qu'ils ont hypothétiquement conservé se confondant avec la variation standard partagée par les deux génomes parentaux sur notre ensemble limité de loci. Comme ces croisements sont très rares, le patrimoine génétique du loup se reconstitue rapidement grâce au flux génétique des individus purs. Bien que notre résolution semble suffisante pour détecter les premiers rétrocroisements (comme dans d'autres études, tableau 1), des faux positifs pourraient survenir si les génotypes individuels sont peu informatifs ou incomplets<sup>17,19</sup>. Ici, les deux individus M80 et M83, avec  $Q_w < 0,95$ , étaient parmi les très rares avec  $> 15\%$  de données manquantes, et donc des estimations peu fiables (Tableau S1 et Méthodes).

Le taux anecdotique de mélange chez les loups Alpains depuis leur tout premier établissement ( $< 2\%$  en considérant tous les individus depuis 1998) est en ligne avec d'autres populations Européennes, bien que celles-ci aient été principalement étudiées sur des périodes plus courtes (Tableau 1). Elle est également soutenue par une évaluation récente dans les Alpes Italiennes, qui n'a identifié aucun hybride ([www.lifewolfalps.eu](http://www.lifewolfalps.eu)). Les chiens sauvages et errants sont censés être absents en Suisse, et les loups évitent généralement le voisinage immédiat des établissements humains. Tous les chiens détectés ici sont sans doute des animaux de compagnie, des chiens de chasse ou de garde, les montagnes Suisses étant largement parcourues et exploitées pour le pastoralisme. Bien que des croisements locaux ne puissent être exclus, ces rares événements d'hybridation pourraient plutôt avoir eu lieu dans les Apennins, la population source des loups Alpains<sup>24,25</sup>. Environ un million de chiens en liberté ont été signalés en Italie selon des estimations peut être dépassées (10% des individus sauvages<sup>38,39</sup>). Si le taux global d'introggression de chiens chez les loups Italiens reste faible ( $< 7\%$ , tableau 1), certaines zones localisées accueillent des meutes introgressées<sup>21</sup>. Parmi elles, la Toscane occidentale, à la limite nord-ouest de la population des Apennins, semble être un point chaud d'hybridation loup  $\times$  chien<sup>20</sup>, à proximité du corridor reliant les Apennins et les Alpes. Les loups Alpains semblent donc avoir évité le flux génétique avec les chiens et les individus métissés, ce qui est remarquable étant donné le faible nombre de fondateurs efficaces arrivés dans cette région dominée par l'homme ( $\sim 15^{25}$ ). **Le taux de mortalité élevé en Suisse (21 sur les 115 individus analysés) pourrait également avoir entravé l'établissement rapide de structures sociales stables, favorisant plutôt l'accouplement avec les chiens** (comme le montre l'hybridation loup-coyote<sup>40</sup>) ; la première meute Suisse s'est installée  $> 16$  ans après l'arrivée de l'espèce. Par conséquent, et malgré ces conditions initiales non optimales, la population Alpine désormais établie a jusqu'à présent résisté aux risques d'hybridation.

Il convient de noter que, comme nous avons identifié des loups putatifs à partir d'échantillons non invasifs sur la base de l'ADNmt transmis par la mère (c'est-à-dire l'haplotype Italien diagnostique CR), nous n'avons testé que le mélange résultant du croisement entre des loups femelles et des chiens mâles. En conséquence, toutes les études génétiques sur les loups d'Italie et des Alpes publiées à ce jour (comprenant des milliers d'échantillons) n'ont pas permis de détecter l'inverse



(introgression mitochondriale de chiens dans les populations de loups ; revue dans<sup>41</sup>). Les raisons potentielles de cette asymétrie sont multiples, par exemple, une moindre agressivité des loups femelles envers les chiens (alors que les loups mâles les attaquent), une plus longue activité de recherche de partenaires par les loups femelles, une disponibilité physiologique continue des chiens mâles pour l'accouplement, de plus grandes chances de survie des petits élevés par des mères louves dans la nature<sup>(12 et références)</sup>. En conséquence, tous les tissus de loups morts identifiés ici présentaient l'haplotype CR Italien (n = 23). Avec la reconnexion des populations, d'autres haplotypes de loups ont été récemment découverts dans les Alpes orientales (originaires des Balkans et d'Europe centrale<sup>42,43</sup>) et même dans le sud de l'Italie<sup>44,45</sup>, mais n'ont pas encore atteint notre zone d'étude<sup>30,41</sup>. L'absence de différenciation nucléaire entre les loups Suisses confirme également que la recolonisation de l'arc Alpin provient d'une source unique, comme cela a été suggéré précédemment<sup>24,25</sup>. De plus, elle indique que les conditions environnementales en Suisse sont suffisamment favorables pour que les loups itinérants et résidents restent panmictiques, ce qui implique une bonne connectivité, comme le suggèrent également les schémas de migration des individus entre les cantons (Tableau S1).

L'idée parfois propagée que les loups Alpains sont des « hybrides », largement basée sur des preuves peu convaincantes et non publiées, n'est donc pas soutenue par nos données génétiques. Cette idée fautive brouille le débat public entre les différents acteurs concernés, par exemple les éleveurs, les chasseurs et les acteurs institutionnels. Les loups et les chiens partagent évidemment une histoire évolutive commune, entrelacée par des croisements récurrents depuis les premiers stades de la domestication, il y a entre 35 000 et 11 000 ans<sup>46</sup>. Par conséquent, les anciennes races de chiens présentent des traces de mélange avec les loups et, réciproquement, la plupart des populations de loups d'Eurasie ont acquis des allèles de chiens par le biais d'événements d'introgression passés, qui peuvent se confondre avec les polymorphismes ancestraux maintenus entre ces taxons récemment divergés<sup>47-49</sup>. Bien que ce phénomène ne doive pas être confondu avec l'hybridation contemporaine, il conditionne la raison pour laquelle la détection des hybrides loup-chien à des fins de gestion est loin d'être triviale, étant donné la limitation des ressources (c'est-à-dire le nombre et la nature des loci génétiques analysables) imposée par le profilage génétique des individus sauvages à partir d'échantillons non invasifs de faible qualité. Les nouvelles méthodologies et technologies (par exemple, le génotypage à haut débit par microsatellite<sup>50</sup>; les SNP<sup>51,52</sup>) permettront une meilleure résolution pour détecter les rétrocroisements hybrides à partir d'individus purs dans les futurs cribles génétiques.

En Suisse, les loups recolonisés ont donc conservé leur intégrité génétique. Les deux individus rétro-croisés confirmés ne sont plus dans le pays. La femelle F16 est arrivée et s'est installée dans les Alpes centrales de juin 2014 à février 2017, date à laquelle elle a finalement été braconnée (tableau S1). Le mâle M51 n'a été détecté qu'à neuf reprises de février à août 2015 dans l'est et le sud du pays. Aucun des parents, et par extension leur progéniture, des trois meutes résidentes ne présente de signes d'introgression canine. Afin de protéger cette population, nous soulignons la nécessité de prévenir le vagabondage des chiens dans l'aire d'expansion de l'espèce, ainsi que de retirer légalement tout hybride F1 dès qu'il est détecté par un dépistage génétique en temps réel et/ou une suspicion à partir de caractères morphologiques. En l'absence présumée de chiens, ces hybrides F1, migrant potentiellement depuis l'Italie, sont la cause immédiate de l'introgression ultérieure de chiens dans le pool génétique du loup et devraient être la cible principale des réglementations légales. En revanche, la gestion des individus mélangés au-delà des F1 ne semble ni pertinente ni efficace, puisque le génome du loup est en cours de restauration et que le traçage

efficace d'un tel niveau de mélange reste difficile. Les critères externes sont en effet peu fiables pour identifier les rétrocroisements, même à partir d'animaux morts : malgré son introgression canine, aucune question n'a été soulevée concernant la femelle F16. Réciproquement, cela remet en question la validité des loups dits « de référence » identifiés par la morphologie ; les loups putatifs ne devraient être sélectionnés que sur la base d'analyses moléculaires (e.g.<sup>21,36,53,54</sup>, cette étude). Enfin, nous soulignons le rôle crucial joué par ce suivi génétique, qui fournit une base empirique pour faire avancer le débat public, et espérons améliorer les relations tendues entre les nombreux acteurs discutant du sort des grands prédateurs qui revendiquent leurs anciennes aires de répartition.