

Évaluation de la diversité génétique, de la structure de la population et de l'hybridation loup-chien dans la population de loups des Carpates Roumaines orientales

scientific reports



OPEN

Assessment of genetic diversity, population structure and wolf-dog hybridisation in the Eastern Romanian Carpathian wolf population

Anne Jarausch^{1,2✉}, Alina von Thaden^{1,3}, Teodora Sin^{4,5}, Andrea Corradini^{5,7,8}, Mihai I. Pop⁵, Silviu Chiriac⁶, Andrea Gazzola⁵ & Carsten Nowak^{1,3}

Scientific Reports | (2023) 13:22574

| <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48741-x>

Résumé

Les montagnes des Carpates ont toujours été habitées par des loups gris et constituent l'une des plus grandes zones de distribution en Europe, comprenant entre 2300 et 2700 individus en Roumanie. Aujourd'hui, cependant, on sait relativement peu de choses sur la population de loups Roumains. Notre objectif est de fournir une première évaluation de la diversité génétique, de la structure de la population et de l'hybridation entre loups et chiens, sur la base de 444 échantillons collectés de manière presque non invasive dans les Carpates Roumaines orientales. La reconstruction des meutes et l'analyse des paramètres génétiques de la population ont été réalisées à l'aide du séquençage de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial et du génotypage des microsatellites. Nous avons trouvé des niveaux relativement élevés de diversité génétique, qui sont similaires aux valeurs trouvées dans les études précédentes sur les loups des Carpates de Pologne et de Slovaquie, ainsi qu'à la population de loups de longue durée de Dinaric-Balkan. Nous n'avons pas trouvé de structure de population significative dans notre région d'étude, ce qui suggère une dispersion et un mélange efficaces. L'analyse de l'hybridation loup-chien à l'aide d'un panel de polymorphismes nucléotidiques simples optimisé pour la détection des hybrides a révélé de faibles taux de mélange entre les loups et les chiens domestiques. Nos résultats prouvent l'existence d'une population de loups génétiquement viable dans les Carpates Roumaines. Les données génétiques obtenues dans le cadre de cette étude peuvent servir d'informations de base précieuses pour l'élaboration de normes de surveillance et de plans de gestion pour les loups en Roumanie.

INTRODUCTION

Comme il est souvent difficile ou impossible d'obtenir un grand nombre d'échantillons génétiques de haute qualité, l'échantillonnage non invasif de diverses sources d'ADN, y compris les excréments, l'urine, les poils ou la salive, est de plus en plus utilisé pour étudier les paramètres des populations d'espèces rares ou insaisissables (examiné dans²). La

connaissance génétique **non invasive** constitue un élément clé de nombreuses activités de surveillance et de gestion pour évaluer l'état des populations sauvages. Par exemple, des études génétiques approfondies ont été mises en œuvre pour étudier la diversité génétique de populations de grands carnivores rares et insaisissables dans le monde entier, comme le lynx Ibérique *Lynx pardinus*³, le loup gris Mexicain *Canis lupus baileyi*⁴ ou l'ours brun des Apennins *Ursus arctos marsicanus*⁵. **Bien que les grands carnivores soient souvent considérés comme des menaces pour la sécurité humaine, le bétail et les espèces de gibier sauvage, ils sont de plus en plus reconnus comme des prédateurs de premier ordre jouant un rôle clé dans divers écosystèmes**⁶.

Le loup gris *Canis lupus* Linnaeus, 1758 a été éradiqué de la plupart des régions d'Europe et a connu la plus forte réduction de la taille de sa population et de son aire de répartition dans les années 1950-1970⁷. Grâce à une législation protectrice et à des changements socio-économiques, les loups recolonisent naturellement certaines parties de leur ancienne aire de répartition Européenne dans plusieurs paysages culturels dominés par l'homme en Europe occidentale et centrale⁸.

La diversité génétique est considérée comme essentielle pour le potentiel d'adaptation à long terme des populations de loups, en particulier pour leur capacité à répondre à l'évolution des conditions environnementales, à la résistance aux maladies et aux influences anthropiques, telles que les changements de climat ou d'habitat, les fluctuations dans la disponibilité des proies ou l'apparition de maladies transmissibles⁹. L'érosion de la diversité génétique et la consanguinité peuvent accroître le risque d'extinction des populations d'espèces sauvages, ce qui souligne l'importance de l'évaluation des paramètres de la diversité génétique pour les efforts de conservation¹⁰. Alors que les petites populations de loups nouvellement établies peuvent être confrontées à des goulets d'étranglement génétiques et démographiques ainsi qu'à d'autres problèmes tels que la consanguinité et la perte de diversité génétique¹¹, le flux génétique provenant des populations d'origine et des populations adjacentes soutient la viabilité à long terme de ces populations en expansion.

L'histoire de l'évolution des canidés de type loup est caractérisée par des flux de gènes interspécifiques à travers le genre *Canis*¹². Actuellement, l'hybridation entre les loups et les chiens domestiques est considérée comme une menace sérieuse pour la conservation, car elle peut éroder l'intégrité génétique et l'adaptation des populations de loups européens à long terme^{9,13}. Les populations régionales de loups en Europe du Sud et de l'Est sont particulièrement touchées, où les chiens sauvages et en liberté sont courants¹⁴. Il est donc urgent de mettre en œuvre une gestion appropriée des hybrides en intégrant les perspectives scientifiques, juridiques, sociales, éthiques et politiques pour réduire la propagation des chiens en liberté et des hybrides loups-chiens¹⁵.

La Roumanie est un État membre de l'Union Européenne (UE) depuis 2007. Le loup est donc inscrit aux annexes II et IV de la législation sur la conservation de la directive « Habitats » de l'UE (directive 92/43/CEE du Conseil), l'objectif global étant de maintenir un « état de conservation favorable » (article 2). La législation Roumaine prévoyait des dérogations au titre de l'article 16 autorisant un abattage limité par les chasseurs, qui ont été intégrées dans le système de gestion de la faune sauvage en vigueur depuis des décennies. **Toutefois, la chasse au loup a finalement été interdite par le gouvernement Roumain en**

octobre 2016¹⁶, des dérogations au cas par cas étant approuvées pour la prévention des dommages. En tant qu'État membre de l'UE, la Roumanie doit surveiller en permanence l'état de conservation du loup, qui est toujours basé sur l'interprétation des enquêtes menées dans les unités distinctes de gestion de la faune par le biais du suivi de la neige en hiver¹⁷⁻¹⁹. L'inconvénient de cette approche est que les loups ne sont pas identifiables individuellement, ce qui augmente le risque de double comptage. C'est pourquoi certaines études ont remis en question la robustesse de ces estimations de la taille de la population de loups^{16,18,19}.

Alors que le prédateur apex a été historiquement éradiqué de vastes régions, les Carpates ont toujours été habitées par des loups et présentent l'une des plus grandes distributions en Europe, comprenant entre 2300 et 2700 individus en Roumanie (19,2-22,5% des loups en Europe)⁷. Bien que la population de loups des Carpates ait constitué un bastion important pour la persistance de l'espèce en Europe, on sait relativement peu de choses sur les loups des Carpates en Roumanie, y compris des estimations fiables du recensement de la population^{17,18}, de la structure de la meute, de l'hybridation potentielle avec les chiens ou de la différenciation génétique par rapport à d'autres populations Européennes. Les études génétiques précédentes portaient principalement sur des échantillons provenant de la partie nord-ouest de la population de loups des Carpates en Pologne, en Slovaquie ou en Ukraine²⁰⁻²⁶. Le manque de connaissances scientifiques approfondies sur la population de loups des Carpates orientales est encore plus frappant, car cette région est considérée comme importante pour la viabilité à long terme des loups en raison de sa vaste zone géographique non fragmentée, et constitue en outre un corridor entre les populations du Nord et du Sud⁹.

Afin d'analyser la diversité génétique, la structure de la population et l'hybridation dans cette partie importante mais peu étudiée de l'aire de répartition du loup en Europe, nous avons mené une première évaluation génétique des loups dans les montagnes des Carpates du centre-est de la Roumanie, en nous concentrant sur quatre zones d'étude centrales et la région environnante (PVS0 [Putna-Vrancea Natural Park, Soveja SCI, Oituz SCI], HHM [Herculian SCI, Harghita-Madaras SCI], MCGN National Park et VNT [Vanatori-Neamt Natural Park] ont été choisies comme zones d'étude pour une étude de terrain dans le cadre du projet LIFE13NAT/RO/000205 de Wolf Life visant à tester différentes méthodes de suivi des loups dans les montagnes des Carpates orientales). Plus précisément, nous avons cherché à savoir si les loups des Carpates Roumaines orientales présentaient (1) des niveaux de diversité génétique similaires à ceux que des études antérieures avaient mis en évidence pour les loups d'autres régions des Carpates, (2) une structure de population fournissant des preuves de l'existence de barrières de dispersion, et (3) si la présence connue de chiens en liberté, tels que les chiens errants ou les chiens de garde du bétail, pouvait avoir conduit à des taux d'hybridation élevés.

Pour répondre à ces questions, nous avons appliqué une combinaison de méthodes de séquençage de l'ADN mitochondrial ainsi que de méthodes de génotypage basées sur les microsatellites et les polymorphismes mononucléotidiques, à partir d'échantillons de loups collectés pour la plupart de manière non invasive.

MATERIEL ET METHODE

Zone d'étude et collecte d'échantillons

Les Carpates Roumaines orientales n'ont pas fait l'objet d'une surveillance fiable et des estimations fiables du nombre de loups ou de la répartition des meutes manquaient pour cette zone. Un **plan d'échantillonnage spatialement équilibré** a donc été mis en œuvre pour garantir la détection et la collecte d'un nombre représentatif d'échantillons. Conformément aux recommandations de l'UE d'utiliser une méthode de collecte de données spatialement normalisée dans toute l'Europe⁴⁸, six à douze unités d'échantillonnage de taille égale ont été sélectionnées en plaçant la grille de 10 × 10 km de l'AEE sur une carte topographique. L'étude génétique a été réalisée dans les Carpates Roumaines orientales, comprenant quatre zones d'étude centrales d'une superficie totale de 4 000 km² : (1) PVS0 [Putna-Vrancea Natural Park, Soveja SCI, Oituz SCI], 1200 km² avec 12 unités d'échantillonnage ; (2) HHM [Herculian SCI, Harghita-Madaras SCI], 1200 km² avec 12 unités d'échantillonnage ; (3) MCG [Muntii Calimani-Gurghiu SCI], 1000 km² avec 10 unités d'échantillonnage ; et (4) VNT [Vanatori-Neamt Natural Park], 600 km² avec 6 unités d'échantillonnage (Fig. 1).

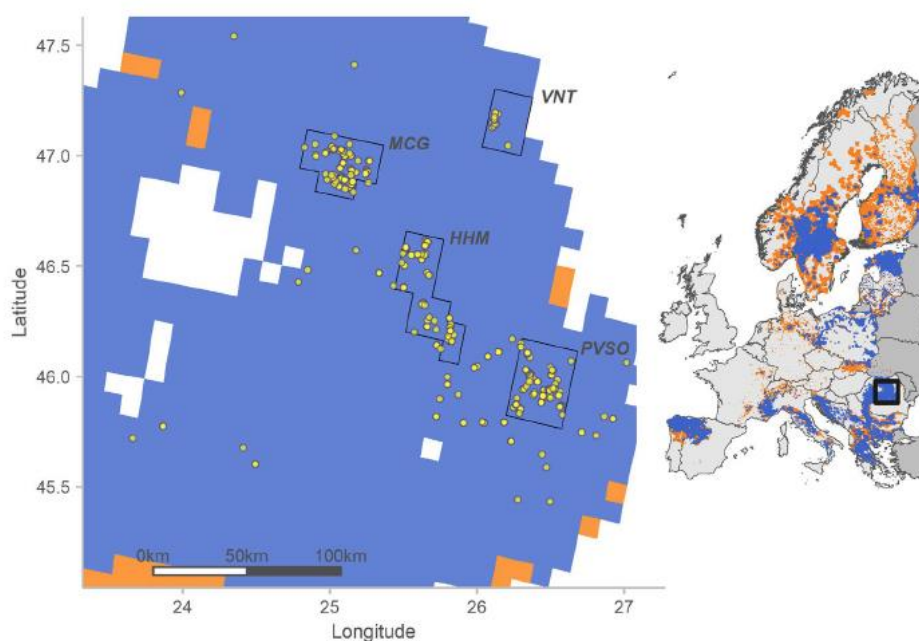


Figure 1. Échantillons de loups génétiquement identifiés ($n = 378$; cercles jaunes) collectés dans les quatre zones d'étude principales - PVS0, HHM, MCG, VNT (lignes noires) - et dans la zone environnante. La carte plus petite (à droite) montre la zone d'étude (cadre noir plein) dans les Carpates Roumaines orientales. La distribution des loups à travers l'Europe au cours de la période 2012-2016 avec une présence permanente (bleu) et une présence sporadique (orange) est présentée selon²⁷

Les zones d'étude principales ont été étudiées exclusivement pendant la saison hivernale (c'est-à-dire de novembre à avril) au cours des années suivantes : PVS0 2014-2015, HHM 2015-2016, MCG et VNT 2016-2017. L'hiver a été choisi car la structure sociale des meutes de loups et donc la population de loups est relativement stable à cette période de l'année (la mortalité des petits est élevée au cours des premiers mois de vie et les petits ont gagné en taille et se déplacent ensemble ; l'évaluation des territoires des loups (par exemple, l'identification des marques olfactives, le suivi de la neige, la collecte d'échantillons d'ADN). **Un effort d'échantillonnage cohérent et spatialement normalisé a été assuré en fixant une longueur cumulative minimale de transect de 20 km dans chaque unité d'échantillonnage (cellule de grille de 10 × 10 km).** Les transects ont été sélectionnés le long des routes forestières et des sentiers existants et ont été étudiés à pied. Chaque transect a été couvert au

moins trois fois par saison d'étude en divisant les saisons d'étude de six mois en trois saisons d'étude de deux mois (novembre-décembre, janvier-février et mars-avril, respectivement). Au total, 444 échantillons de loups, pour la plupart non invasifs, ont été collectés (226 excréments, 102 échantillons d'urine, 39 poils et un échantillon de salive provenant d'un animal tué). D'autres échantillons ont été collectés de manière opportuniste dans les environs entre 2011 et 2017, y compris 66 échantillons de tissus obtenus à partir de loups récoltés légalement et d'un animal tué sur la route. Dix échantillons de chiens domestiques (trois échantillons de salive, trois échantillons d'excréments et quatre échantillons de tissus) ont été collectés entre janvier 2016 et mars 2017 afin de détecter les hybrides putatifs loup-chien dans l'ensemble des données.

Les échantillons d'urine ont été conservés dans 33 ml d'éthanol à 96% en ajoutant 15 ml de mélange urine-neige. Les échantillons d'excréments et de tissus ont été conservés dans de l'éthanol à 96%. Les échantillons de salive ont été conservés dans des tubes Eppendorf de 2 ml contenant de l'éthanol à 96% ou recueillis dans du papier filtre et stockés au sec dans un sac en plastique. Tous les échantillons ont été conservés dans des conditions sèches, à température ambiante et à l'abri de la lumière directe du soleil, jusqu'à l'extraction de l'ADN.

Aucun animal n'a été manipulé ou tué pour cette étude. Les échantillons non invasifs ont été collectés conformément aux lois locales et nationales en vigueur. Aucune approbation éthique n'a été nécessaire pour travailler avec des échantillons non invasifs ou des tissus provenant d'animaux morts.

Analyses génétiques...

Analyses de données pour évaluer la diversité génétique et la structure de la population...

Identification des hybrides

Nous avons testé l'hybridation entre les loups et les chiens en utilisant un panel de 96 SNP informatifs sur l'ascendance³². La cohérence du génotypage a été évaluée en comparant les résultats de 14 échantillons répliqués (10% de tous les individus). Nous avons exécuté l'algorithme de regroupement bayésien mis en œuvre dans STRUCTURE 2.3.465, combiné les données dans CLUMPP 1.1.266 et utilisé STRUCTURE HARVESTER 0.6.9468 avec les mêmes paramètres que ceux décrits ci-dessus pour déduire la structure de la population. Nous avons effectué une PCoA mise en œuvre dans GenAlEx 6.559,60 pour déduire le nombre de groupes d'individus génétiquement proches. Pour évaluer plus avant les individus qui ont montré des signes de mélange dans les analyses STRUCTURE et PCoA, nous avons utilisé le logiciel NewHybrids 1.172. Ce logiciel a été utilisé pour calculer la probabilité d'appartenir à huit catégories généalogiques : loup, chien, F1, F2, **backcross** de **première** génération avec le loup (BCW), **backcross** de **deuxième** génération avec le loup (BCW2), backcross de première génération avec le chien (BCD) et backcross de deuxième génération avec le chien (BCD2). Nous avons effectué un rodage de 100 000 pas, suivi de 500 000 balayages dans des conditions préalables uniformes.

RESULTATS

Diversité génétique

Nous avons analysé 444 échantillons, pour la plupart non invasifs, collectés entre 2011 et 2017 dans les Carpates Roumaines orientales au sein de la région étudiée (quatre zones d'étude centrales et la zone environnante, Fig. 1). Des assignations génotypiques individuelles basées sur 13 loci microsatellites ont été obtenues pour 296 échantillons de 126 individus de loups (50 femelles, 75 mâles, RW016 sexe non identifié).

Chaque loup a été génotypé 2,35 fois en moyenne (gamme = 1-17 génotypes par individu, 64 des 126 individus génotypés une fois). Les échantillons ont montré un succès moyen élevé d'amplification par PCR (taux de 91,1%). Les taux moyens d'abandon allélique et de faux allèles étaient faibles (5,7% et 0,8%, respectivement). Pour les 13 loci microsatellites, aucun signe de distorsion de fréquence due à des pertes importantes d'allèles ou à des pics de bégalement n'a été identifié. La présence potentielle d'allèles nuls a été constatée pour les loci FH2017, FH2096 et vWF. La probabilité d'identité (PID) était de $1,2 \times 10^{-13}$ et la probabilité d'identité entre frères et sœurs (PIDSib) était de $1,2 \times 10^{-05}$ pour tous les individus loups identifiés, ce qui indique que l'ensemble des loci microsatellites était suffisant pour l'individualisation, même entre frères et sœurs. Les valeurs PID et PIDSib $< 0,0001$ ont été atteintes avec au moins cinq et onze marqueurs, respectivement.

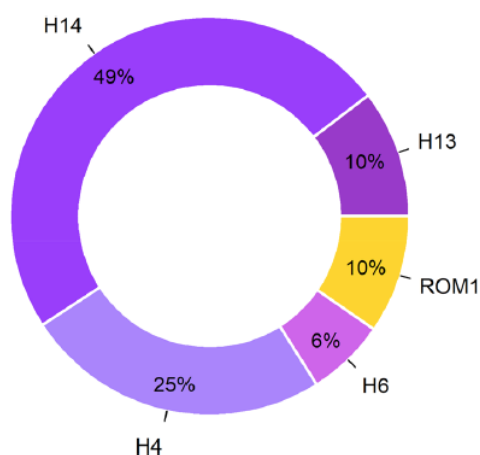


Figure 2. Fréquences des cinq haplotypes de la région de contrôle de l'ADNmt identifiés chez les 125 loups des Carpates Roumaines orientales

Entre trois et 15 allèles ont été génotypés parmi les 13 loci avec une moyenne de 7,31 allèles par locus sur l'ensemble des individus loups ($n = 126$). L'hétérozygotie moyenne observée (H_o) était de $0,69 \pm 0,04$ et l'hétérozygotie moyenne attendue sans biais (uHe) était de $0,73 \pm 0,04$. En testant tous les loups génotypés, trois des 13 loci (vWF, FH2137 et FH2161) s'écartaient significativement de l'HWE ($p < 0,05$).

La diversité des haplotypes de l'ADN mitochondrial a été évaluée en séquençant de courts fragments de la région de contrôle de l'ADNmt à l'aide de deux ensembles différents d'amorces, ce qui a permis d'obtenir des tronçons d'une longueur de 250 ou 390 pb. La détermination de l'espèce a été réussie pour un total de 406 échantillons sur 444 (91,4%), avec 378 échantillons de loups et 32 échantillons de chiens et sept autres espèces de mammifères (voir les résultats supplémentaires et les Tableaux S1-S5 pour plus de détails).

Cinq haplotypes d'ADNmt de loups ont été identifiés chez 125 individus (aucun haplotype n'a pu être identifié pour le loup RW052m) : H14 (le plus fréquent, 49%), suivi de H4 (25%)

et H13 (10%) selon²⁸ ainsi qu'un haplotype précédemment **non décrit** en Roumanie (ici typé comme ROM1, 10%) (Fig. 2). Il est intéressant de noter que **l'haplotype ROM1** correspond à des séquences (361 pb ; ID : MH89161629 et 356 pb ; ID : MK129178 & MK12917930) obtenues à partir de spécimens de musée se rapportant à la population de loups éteinte de **Sicile** et à une séquence obtenue à partir d'un individu découvert dans le sud de la **France en 1954 CE** (361 pb ; ID : OM74338831). Un autre haplotype, H628, a été trouvé dans huit échantillons de loups (6%) prélevés dans les environs mais pas dans les quatre zones d'étude principales.

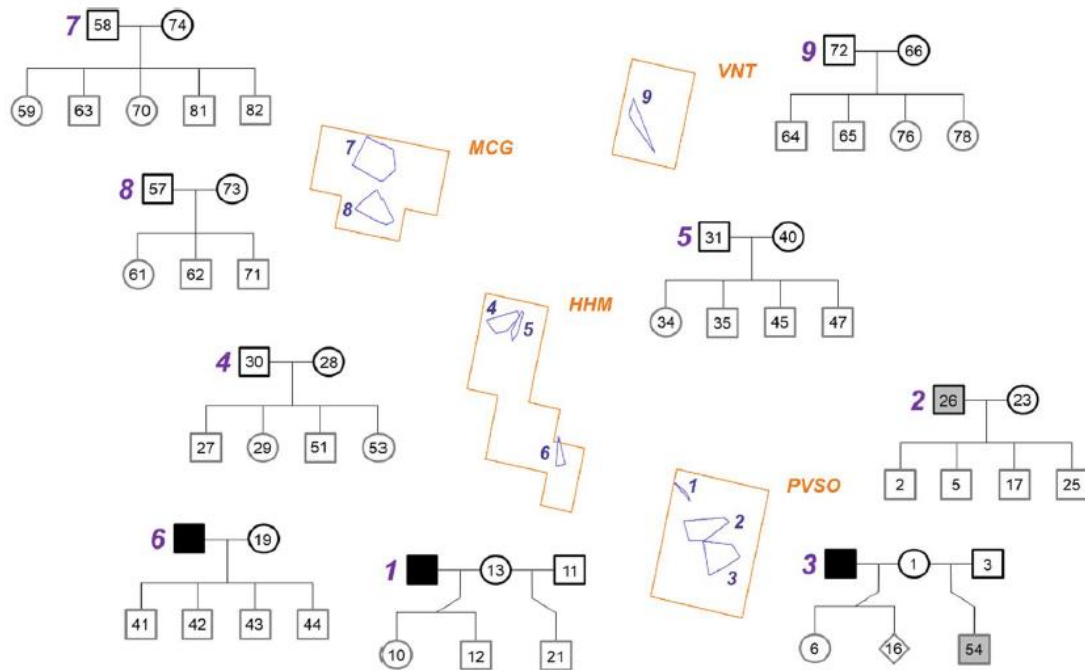


Figure 3. Distribution spatiale des meutes (polygones violets numérotés) dans les quatre zones d'étude principales - PVSO, HHM, MCG et VNT (lignes orange). Les polygones convexes minimaux comprennent tous les échantillons d'individus de chaque meute identifiée. Pedigrees des meutes inférées (étiquetées avec les numéros violets des meutes respectives) comprenant les individus reproducteurs (contours noirs) et leurs petits (contours gris). Les mâles sont représentés par des carrés, les femelles par des cercles et l'individu pour lequel le sexe n'a pas réussi est représenté par un losange. Les mâles non échantillonnés sont indiqués en noir et les mâles qui ont été collectés au cours de l'hiver suivant sont indiqués en gris

Parenté et structure de la population

L'analyse génétique de la parenté dans COLONY a permis de résoudre onze relations parents/progéniture consistant en un ou deux parents et entre un et cinq petits dans les quatre zones d'étude principales (Fig. 3, meutes 1-9). Les résultats de COLONY ont été vérifiés par comparaison manuelle des génotypes en combinaison avec le nombre de détections de chaque individu, étant donné que les animaux reproducteurs d'une meute marquent à l'odeur leur domaine vital (territoire) et sont généralement identifiés plus souvent que leur progéniture. Sur la base du regroupement spatial des individus, les différents territoires de loups ont été identifiés et séparés des meutes adjacentes. La reconstitution des meutes et la cartographie spatiale des échantillons ont révélé neuf territoires habités par des meutes de loups (Fig. 3). Dans deux territoires, un mâle et une femelle ont été identifiés à plusieurs reprises (RW008m et RW004f ; RW060m et RW080f), ce qui suggère que ces individus ont probablement habité ces zones en tant que couples de loups sans progéniture. L'analyse du pedigree a révélé que les mâles reproducteurs avaient changé dans les meutes 1 et 3 au fil du temps, tandis que les femelles reproductrices avec leur progéniture de

l'accouplement précédent habitaient toujours les territoires. Nous avons également détecté 23 individus dans VNT, HHM et MCG, qui semblaient ne pas avoir de lien de parenté ou qui ont été échantillonnés le long des frontières entre les territoires ou dans des zones plus éloignées de toute meute ou paire présumée. Ces individus ont été considérés comme des **flotteurs** ou des membres d'autres meutes ou paires.

Un ensemble réduit de données de loups non apparentés pour les analyses de la structure de la population contenait 47 individus, comprenant à la fois des loups des zones centrales de l'étude et des loups prélevés dans la zone environnante (voir les ensembles de données à l'appui pour plus de détails). Les génotypes des loups de ce sous-ensemble étaient en équilibre de Hardy-Weinberg (HWE ; $p > 0,05$). Les analyses STRUCTURE et GENELAND ainsi que le critère d'information bayésien n'ont révélé aucune structure de population (Fig. S1).

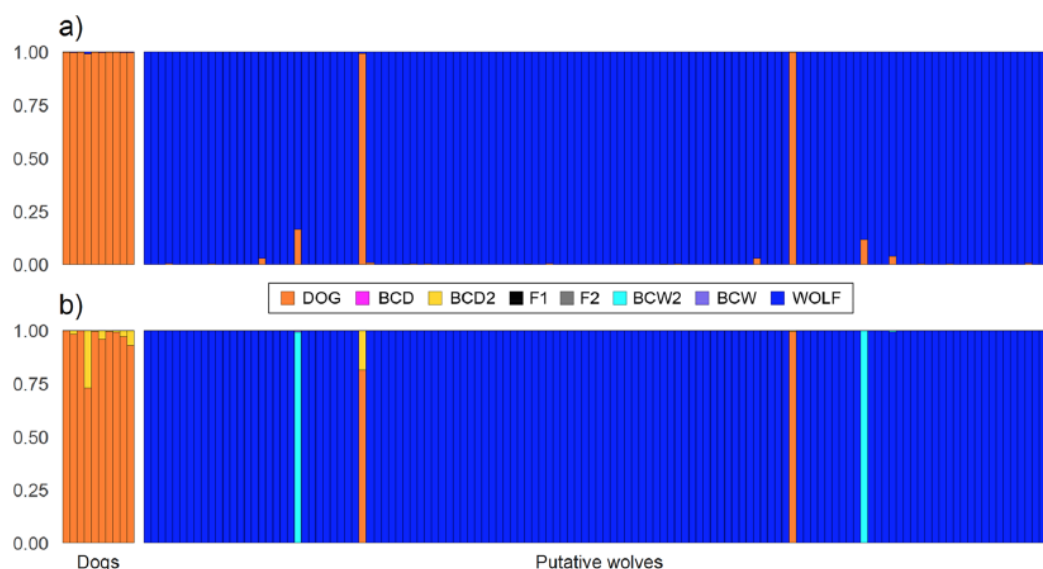


Figure 4. Discrimination entre chiens ($n = 10$), loups putatifs ($n = 127$) et détection d'hybrides possibles sur la base des données SNP en utilisant **a)** STRUCTURE pour $K = 2$ (DOG et WOLF) et **b)** NewHybrids avec huit catégories généalogiques (WOLF, DOG, F1, F2, backcross de première génération avec le loup (BCW), backcross de deuxième génération avec le loup (BCW2), backcross de première génération avec le chien (BCD) et backcross de deuxième génération avec le chien (BCD2)). Chaque individu est représenté par une barre verticale divisée en segments colorés en fonction **a)** des proportions d'appartenance aux deux groupes déduits et **b)** de sa catégorie parentale ou hybride. Les catégories hybrides F1, F2, BCW et BCD ne sont pas représentées par des segments colorés dans les barres car les individus présentaient des probabilités d'affectation $< 0,008$

Hybridation loup-chien

L'ADN de 127 loups putatifs (52 échantillons de tissus et 75 échantillons non invasifs) et de dix chiens de référence (4 échantillons de tissus et 6 échantillons non invasifs) identifiés par l'analyse microsatellite précédente a été génotypé à l'aide d'un panel de 96 marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism) informatifs sur l'ascendance afin de différencier clairement les loups, les chiens et les hybrides potentiels entre loups et chiens. Trois individus (RW025m, RW042m et RW043m) n'ont pas été inclus dans l'analyse SNP en raison de la qualité insuffisante des génotypes SNP (génotypes avec des taux d'appel $< 0,60$). Deux des 96 SNP (BICF2P995528 et BICF2P1334457) ont été éliminés de l'ensemble de données final en raison d'un faible taux de génotypage ($< 0,60$). Le taux moyen de réussite du génotypage (proportion de loci génotypés avec succès sur les 94 SNPloci pour les échantillons analysés) était de 0,97. La cohérence des génotypes était également élevée. En comparant les résultats d'un sous-ensemble de 14 échantillons répliqués (10% de tous les individus), des données

manquantes ont été obtenues pour 1 à 17 loci par échantillon (taux de 2,51%) et des allèles manquants dans les répliques d'un échantillon de chien (taux de 1,44%).

L'analyse bayésienne STRUCTURE des 127 loups putatifs et des dix chiens de référence a indiqué que le nombre le plus probable de groupes génétiques était $K = 2$ (Fig. 4a). Tous les chiens de référence ont été assignés à un groupe avec une probabilité moyenne de 0,997 allant de 0,991 à 0,999. Parmi les 127 génotypes de loups putatifs détectés dans la région étudiée, 120 individus ont été clairement assignés au groupe des loups et deux au groupe des chiens, tous avec des probabilités $> 0,99$, respectivement. Trois individus ont montré des probabilités d'affectation au groupe des loups légèrement inférieures mais toujours significatives, allant de 0,96 à 0,971, conformément aux connaissances antérieures³².

La différenciation entre les loups et les chiens dans la région étudiée a été confirmée par une analyse en coordonnées principales (PCoA), qui a séparé les loups putatifs et les chiens de référence en deux groupes le long du premier axe PC1 (59,35% de la variation totale, Suppl. Fig. S2). Les deux individus considérés comme des chiens dans l'analyse STRUCTURE ont été regroupés avec les échantillons de chiens de référence, tandis que les deux individus montrant des signes de mélange ont été placés près du groupe des loups. Les résultats des analyses PCoA et STRUCTURE ont été confirmés par l'assignation bayésienne des génotypes individuels à l'aide de NewHybrids (Fig. 4b). La plupart des loups putatifs ont été assignés à la catégorie loup avec une probabilité $> 0,995$, deux individus ont été assignés à la catégorie chien avec des probabilités de 0,814-0,997, tandis que deux individus (RO022m dans un échantillon de tissu et RW056m dans un échantillon d'excréments) avaient les probabilités les plus élevées d'être des rétrocroisements de deuxième génération avec le loup (BCW2 ; 0,992-1,0).

DISCUSSION

Cette étude est la première évaluation génétique des loups dans les Carpates Roumaines orientales utilisant le séquençage des haplotypes de l'ADNmt, le génotypage des microsatellites et l'identification des hybrides loup-chien basée sur les SNP. Les mesures de la diversité microsatellitaire des loups Roumains ($H_o = 0,69$) sont comparables à d'autres études sur les loups des Carpates en Pologne et en Slovaquie ($H_o = 0,69,23$; $H_o = 0,67,25$) et similaires à la population de loups de longue durée du Dinaric-Balkan ($H_o = 0,73,33$). Nos résultats correspondent aux tendances spatiales à grande échelle de la diversité génétique à travers l'Europe⁹ avec les niveaux les plus bas de diversité génétique trouvés dans les populations de loups du sud-ouest quelque peu isolées (population Italienne/Alpine, $H_o = 0,57,34$ et population Ibérique, $H_o = 0,52,35$) et une diversité génétique croissante vers le nord-est (Estonie et Lettonie, $H_o = 0,75,36$; Russie européenne, $H_o = 0,74,37$).

Les génotypes microsatellites de tous les loups s'écartaient significativement de l'équilibre génétique et H_o était inférieur à uHe , probablement en raison de la composition de l'ensemble de l'échantillon comprenant des individus étroitement apparentés des différentes meutes de loups.

Quatre des haplotypes ADNmt identifiés ont déjà été décrits pour la Roumanie (H14 et H4) ou sont au moins connus pour être répandus en Europe de l'Est et du Sud-Est (H14, H13, H6 et H4)^{26,28}. Le fait que l'haplotype ROM1 corresponde aux séquences obtenues à partir

de spécimens de musées se rapportant à la population de loups éteinte de Sicile a été plus surprenant^{29,30}. Cependant, 30 et 29 ont montré que cet haplotype de loup appartient à l'haplogroupe 2 décrit dans²⁸. Le fragment de 361 pb de l'haplotype ROM1 correspondait entièrement à un haplotype Sicilien (ID : MH89161629) et à un haplotype Français (ID : OM74338831), mais ne différait que par une seule substitution d'un haplotype Français (ID : OM74338531), Bulgare (ID : KU696388), Polonais (ID : KF661045) et de l'haplotype de loup H6 (cette étude et²⁸). En outre, nos résultats indiquent que l'haplotype ROM1 a été partagé entre différentes régions à travers l'Europe avant les extinctions locales induites par l'homme et la forte perte de diversité génétique en Europe occidentale s'est produite au cours des 200 dernières années, ce qui a déjà été suggéré pour la plupart des autres haplotypes de loups Européens^{31,38}. De futures études portant sur des séquences d'ADNmt plus longues ou, idéalement, sur des **mitogénomes** complets de toutes les populations de loups de **l'haplogroupe 2** pourraient aider à mieux comprendre la dynamique évolutive et la structure phylogéographique des loups d'Europe.

Nous avons trouvé des modèles clairs de structure sociale dans la zone d'étude, les analyses de parenté suggérant la présence de neuf meutes de loups. Une meute de loups est généralement organisée comme une unité familiale comprenant un couple reproducteur et sa progéniture de l'année en cours et de l'année précédente³⁹. Il est également connu que la plupart des mâles immigrent dans des meutes préexistantes, devenant le nouveau mâle reproducteur, tandis que la progéniture femelle occupe souvent des territoires proches de leur meute natale ou que le territoire est repris par la progéniture femelle du couple reproducteur parental (par exemple,⁴¹⁻⁴⁴). Comme la dissolution des paires de loups a été constatée après la mort d'un ou des deux reproducteurs⁴⁰, nous supposons que les reproductions avec de nouveaux mâles reproducteurs dans PVS0 (meute 1 et 3) n'étaient pas le résultat d'un choix actif de partenaire par la femelle, mais plutôt une réaction à la perte de son partenaire.

Les résultats des analyses de la structure de la population basées sur des loups non apparentés ($n = 47$) étaient cohérents et n'ont révélé aucune structure génétique, ce qui est en accord avec une étude génétique précédente sur les loups en Roumanie⁴⁵, suggérant une dispersion et une diversité élevées dues à l'existence de vastes habitats naturels avec peu de perturbations anthropogéniques, telles que des colonies ou des infrastructures de circulation. Il faut cependant tenir compte du fait que notre étude a été réalisée à l'échelle locale et que nous n'avons donc probablement pas pris en compte les barrières ou les filtres potentiels du paysage à des échelles spatiales plus grandes, par exemple en raison de l'isolement dû à la distance.

L'hybridation des loups et des chiens domestiques est considérée comme une menace sérieuse pour l'intégrité génétique à long terme de plusieurs populations Européennes de loups⁹. Une estimation antérieure de la taille de la population¹⁸ suggère que la population Roumaine de loups pourrait subir des pertes importantes en raison de la mortalité anthropogénique (chasse, braconnage, animaux tués sur la route et maladies transmises par les chiens). Ces pertes fatales perturbent la structure sociale intacte des meutes de loups, les obligeant à accepter des individus extérieurs à la meute⁴², ce qui peut augmenter le risque d'hybridation.

Nous avons utilisé 94 SNP informatifs sur l'ascendance pour l'identification des hybrides possibles afin d'atteindre une haute résolution dans la discrimination loup-chien-hybride. Dans cette étude, tous les individus (à l'exception de RW025m, RW042m et RW043m, voir « Résultats ») ont été identifiés comme des loups, à l'exception de deux individus identifiés comme des chiens **et seulement deux individus identifiés comme des hybrides de dernière génération** (backcross de deuxième génération avec le loup). Dans l'étude de ³², un nombre sélectionné d'individus comprenant des échantillons de loups, de chiens et d'un hybride ont été analysés, y compris un ensemble plus large de loups échantillonnés à travers l'Europe, ainsi que des chiens et des hybrides suspectés d'être des loups et des chiens. Dans cette étude plus complète, les échantillons ont été classés dans la même catégorie parentale/hybride, ce qui confirme le statut non hybride des individus considérés comme des loups ou des chiens et le statut hybride des deux individus suspectés.

La présence de chiens sauvages et de chiens en liberté (chiens errants ou chiens de garde du bétail) dans les habitats des loups peut augmenter le risque d'hybridation entre loups et chiens. **Notamment, les analyses du régime alimentaire des loups et de la sélection des proies effectuées dans la zone d'étude PVSO ont révélé que les chiens représentent une source de nourriture importante pour les loups, en particulier pendant l'été lorsque les chiens sont présents dans les pâturages de haute altitude pour défendre les troupeaux de moutons (principalement un ou deux chiens de garde du bétail et plusieurs chiens de petite taille de races mixtes par troupeau)⁴⁶. Le fait que les chiens restent à l'intérieur ou à proximité des villages pendant l'hiver rend plus difficile pour les loups d'atteindre les chiens en tant que source de nourriture mais aussi en tant que partenaires de reproduction potentiels, ce qui peut expliquer le faible taux d'hybridation observé malgré la présence fréquente de chiens en liberté dans la région étudiée.** D'autres échantillons provenant d'une zone plus large doivent être collectés dans l'aire de distribution des loups pour obtenir des estimations fiables des taux d'hybridation entre loups et chiens en Roumanie.

Alors que la population de loups des Carpates représente un bastion important pour la persistance à long terme de l'espèce en Europe⁹, les données pertinentes sur la diversité et la structure génétiques des loups des Carpates en Roumanie sont encore rares. **Notre première évaluation génétique régionale des loups dans les Carpates Roumaines orientales montre des niveaux relativement élevés de diversité génétique en raison de la structure sociale des meutes et de la forte dispersion des loups dans la région étudiée.** Nous n'avons trouvé aucune preuve de risques génétiques, par exemple en raison d'une introgression élevée de chiens. En conclusion, notre étude confirme l'importance de la population de loups Roumaine pour la conservation des loups en Europe.

Puisque le nombre minimum de loups et le nombre de meutes peuvent être utilisés pour d'autres estimations de population⁴⁷, les données de notre étude pourraient être utiles pour générer des estimations fiables de la taille de la population de loups en Roumanie. Nous espérons que la gestion des loups en Roumanie pourra bénéficier de nos résultats, aidant à prendre des décisions bien informées en intégrant des analyses génétiques complètes basées sur un échantillonnage génétique non invasif lors de l'estimation future de la taille de la population et du statut génétique. D'autres études sur les loups dans les Carpates sont nécessaires pour obtenir des informations plus solides requises pour une bonne planification de la conservation, en particulier sur la structure de la population à grande échelle, la

distribution temporelle et spatiale de la diversité génétique et les taux d'hybridation entre loups et chiens.

References

1. Kershaw, F. *et al.* The Coalition for Conservation Genetics: Working across organizations to build capacity and achieve change in policy and practice. *Conserv. Sci. Pract.* **4**, e12635 (2022).
2. Waits, L. P. & Paetkau, D. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *J. Wildl. Manage.* **69**, 1419–1433 (2005).
3. Kleinman-Ruiz, D. *et al.* Genetic evaluation of the Iberian lynx ex situ conservation programme. *Heredity* **123**, 647–661 (2019).
4. Fitak, R. R., Rinkevich, S. E. & Culver, M. Genome-wide analysis of SNPs is consistent with no domestic dog ancestry in the endangered Mexican Wolf (*Canis lupus baileyi*). *J. Hered.* **109**, 372–383 (2018).
5. Ciucci, P. *et al.* Estimating abundance of the remnant Apennine brown bear population using multiple noninvasive genetic data sources. *J. Mammal.* **96**, 206–220 (2015).
6. Ripple, W. J. *et al.* Status and ecological effects of the world's largest carnivores. *Science* **343**, 1241484 (2014).
7. Chapron, G. *et al.* Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes. *Science* **346**, 1517–1519 (2014).
8. Cimatti, M. *et al.* Large carnivore expansion in Europe is associated with human population density and land cover changes. *Divers. Distrib.* **27**, 602–617 (2021).
9. Hindrikson, M. *et al.* Wolf population genetics in Europe: a systematic review, meta-analysis and suggestions for conservation and management. *Biol. Rev.* **92**, 1601–1629 (2017).
10. Reed, D. H. & Frankham, R. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv. Biol.* **17**, 230–237 (2003).
11. Frankham, R. Genetics and extinction. *Biol. Conserv.* **126**, 131–140 (2005).
12. Gopalakrishnan, S. *et al.* Interspecific gene flow shaped the evolution of the genus *Canis*. *Curr. Biol.* **28**, 3441–3449 (2018).
13. Randi, E. Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. *Mol. Ecol.* **17**, 285–293 (2008).
14. Boitani, L. *et al.* Key actions for large carnivore populations in Europe. In *Institute of Applied Ecology (Rome, Italy). Report to DG Environment, European Commission, Bruxelles. Contract no. 07.0307/2013/654446/SER/B3* (2015).
15. Stronen, A. V. *et al.* Wolf-dog admixture highlights the need for methodological standards and multidisciplinary cooperation for effective governance of wild x domestic hybrids. *Biol. Conserv.* **266**, 109467 (2022).
16. Popescu, V., Pop, M., Chiriac, S. & Rozyłowicz, L. Romanian carnivores at a crossroads. *Science* **364**, 1041 (2019).
17. Kaczensky, P. *et al.* Status, management and distribution of large carnivores – bear, lynx, wolf & wolverine – in Europe. In *IUCN/SSC Large Carnivore Initiative for Europe* (2012).
18. Popescu, V., Artelle, K. A., Pop, M. I., Manolache, S. & Rozyłowicz, L. Assessing biological realism of wildlife population estimates in data-poor systems. *J. Appl. Ecol.* **53**, 1248–1259 (2016).
19. Cristescu, B., Domokos, C., Teichman, K. J. & Nielsen, S. E. Large carnivore habitat suitability modelling for Romania and associated predictions for protected areas. *PeerJ* **7**, e6549 (2019).
20. Pilot, M. *et al.* Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Mol. Ecol.* **15**, 4533–4553 (2006).
21. Czarnomska, S. D. *et al.* Concordant mitochondrial and microsatellite DNA structuring between Polish lowland and Carpathian Mountain wolves. *Conserv. Genet.* **14**, 573–588 (2013).
22. Stronen, A. V. *et al.* North-South differentiation and a region of high diversity in European wolves (*Canis lupus*). *PLoS ONE* **8**, e76454 (2013).
23. Hulva, P. *et al.* Wolves at the crossroad: Fission-fusion range biogeography in the Western Carpathians and Central Europe. *Divers. Distrib.* **24**, 179–192 (2018).
24. Pilot, M. *et al.* Widespread, long-term admixture between grey wolves and domestic dogs across Eurasia and its implications for the conservation status of hybrids. *Evol. Appl.* **11**, 662–680 (2018).
25. Szewczyk, M. *et al.* Dynamic range expansion leads to establishment of a new, genetically distinct wolf population in Central Europe. *Sci. Rep.* **9**, 19003 (2019).
26. Šnjegota, D. *et al.* The role of the Caucasus, Carpathian, and Dinaric-Balkan regions in preserving wolf genetic diversity. *Mamm. Biol.* **103**, 303–315 (2023).
27. Kaczensky, P. *et al.* Distribution of large carnivores in Europe 2012–2016: Distribution maps for Brown bear, Eurasian lynx, Grey wolf, and Wolverine. *Dryad*. <https://datadryad.org/stash/dataset/doi:10.5061/dryad.pc866t1p3> (2021).
28. Pilot, M. *et al.* Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Evol. Biol.* **10**, 104 (2010).
29. Reale, S. *et al.* Biodiversity lost: The phylogenetic relationships of a complete mitochondrial DNA genome sequenced from the extinct wolf population of Sicily. *Mamm. Biol.* **98**, 1–10 (2019).
30. Angelici, F. M. *et al.* The Sicilian wolf: genetic identity of a recently extinct insular population. *Zool. Sci.* **36**, 189–197 (2019).
31. Doan, K. *et al.* Evolutionary history of the extinct wolf population from France in the context of global phylogeographic changes throughout the Holocene. *Mol. Ecol.* **00**, 1–21 (2023).
32. Harmoinen, J. *et al.* Reliable wolf-dog hybrid detection in Europe using a reduced SNP panel developed for non-invasively collected samples. *BMC Genom.* **22**, 473 (2021).
33. Šnjegota, D. *et al.* Population genetic structure of wolves in the northwestern Dinaric-Balkan region. *Ecol. Evol.* **11**, 18492–18504 (2021).
34. Fabbri, E. *et al.* Genetic structure of expanding wolf (*Canis lupus*) populations in Italy and Croatia, and the early steps of the recolonization of the Eastern Alps. *Mamm. Biol.* **79**, 138–148 (2014).
35. Sastre, N. *et al.* Signatures of demographic bottlenecks in European wolf populations. *Conserv. Genet.* **12**, 701–712 (2011).
36. Hindrikson, M. *et al.* Spatial genetic analyses reveal cryptic population structure and migration patterns in a continuously harvested grey wolf (*Canis lupus*) population in North-Eastern Europe. *PLoS ONE* **8**, e75765 (2013).

37. Korabiev, M. P., Korabiev, N. P. & Korabiev, P. N. Genetic diversity and population structure of the grey wolf (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) and evidence of wolf × dog hybridisation in the centre of European Russia. *Mamm. Biol.* **101**, 91–104 (2021).
38. Duffresnes, C. *et al.* Howling from the past: Historical phylogeography and diversity losses in European grey wolves. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* **285**, 1884 (2018).
39. Mech, L. D. & Boitani, L. Wolf social ecology. In *Wolves: behavior, ecology, and conservation* (ed. Mech, L. D. & Boitani, L.) 1–34 (University of Chicago Press, 2003).
40. Milleret, C. *et al.* Let's stay together? Intrinsic and extrinsic factors involved in pair bond dissolution in a recolonizing wolf population. *J. Anim. Ecol.* **86**, 43–54 (2017).
41. Jarausch, A., Harms, V., Kluth, G., Reinhardt, I. & Nowak, C. How the west was won: genetic reconstruction of rapid wolf recolonization into Germany's anthropogenic landscapes. *Heredity* **127**, 92–126 (2021).
42. Jędrzejewski, W. *et al.* Genetic diversity and relatedness within packs in an intensely hunted population of wolves *Canis lupus*. *Acta Theriol.* **50**, 3–22 (2005).
43. VonHoldt, B. M. *et al.* The genealogy and genetic viability of reintroduced Yellowstone grey wolves. *Mol. Ecol.* **17**, 252–274 (2008).
44. Caniglia, R., Fabbri, E., Galaverni, M., Milanesi, P. & Randi, E. Noninvasive sampling and genetic variability, pack structure, and dynamics in an expanding wolf population. *J. Mammal.* **95**, 41–59 (2014).
45. Ericson, H. S. *et al.* Genome-wide profiles indicate wolf population connectivity within the eastern Carpathian Mountains. *Genetica* **148**, 33–39 (2020).
46. Sin, T., Gazzola, A., Chiriac, S. & Rîşnoveanu, G. Wolf diet and prey selection in the South-Eastern Carpathian Mountains, Romania. *PLoS ONE* **14**, e0225424 (2019).
47. Stenglein, J. L., Waits, L. P., Ausband, D. E., Zager, P. & Mack, C. M. Efficient, noninvasive genetic sampling for monitoring reintroduced Wolves. *J. Wildl. Manage.* **74**, 1050–1058 (2010).
48. Annoni, A., Bernard, L., Lillethun, A., Ihde, J. & Gallego, J. Short proceedings of the 1st European workshop on reference grids. In *1st workshop on European reference grids, Ispra, Italy, 2003*. (JRC-Institute for Environment and Sustainability, 2004).
49. Lesniak, I. *et al.* Population expansion and individual age affect endoparasite richness and diversity in a recolonising large carnivore population. *Sci. Rep.* **7**, 41730 (2017).
50. Caniglia, R., Fabbri, E., Mastrogiuseppe, L. & Randi, E. Who is who? Identification of livestock predators using forensic genetic approaches. *Forens. Sci. Int. Genet.* **7**, 397–404 (2013).
51. Taberlet, P. & Bouvet, J. Mitochondrial-DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* **255**, 195–200 (1994).
52. Fumagalli, L., Taberlet, P., Favre, L. & Hausser, J. Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 31–46 (1996).
53. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410 (1990).
54. Tvedebrink, T., Eriksen, P. S., Curran, J. M., Mogensen, H. S. & Morling, N. Analysis of matches and partial-matches in a Danish STR data set. *Forens. Sci. Int. Genet.* **6**, 387–392 (2012).
55. Lonsinger, R. C. & Waits, L. P. ConGenR: rapid determination of consensus genotypes and estimates of genotyping errors from replicated genetic samples. *Conserv. Genet. Resour.* **7**, 841–843 (2015).
56. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing* (Vienna, Austria, 2021). <https://www.R-project.org/>.
57. van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M. & Shipley, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* **4**, 535–538 (2004).
58. Waits, L. P., Luikart, G. & Taberlet, P. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Mol. Ecol.* **10**, 249–256 (2001).
59. Peakall, R. & Smouse, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Resour.* **6**, 288–295 (2006).
60. Peakall, R. & Smouse, P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* **28**, 2537–2539 (2012).
61. Kalinowski, S. T., Taper, M. L. & Marshall, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* **16**, 1099–1106 (2007).
62. Raymond, M. & Rousset, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* **86**, 248–249 (1995).
63. Rousset, F. Genepop'007: a complete reimplementations of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* **8**, 103–106 (2008).
64. Jones, O. R. & Wang, J. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol. Ecol. Resour.* **10**, 551–555 (2010).
65. Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945–959 (2000).
66. Jakobsson, M. & Rosenberg, N. A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* **23**, 1801–1806 (2007).
67. Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* **14**, 2611–2620 (2005).
68. Earl, D. A. & vonHoldt, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* **4**, 359–361 (2012).
69. Guillot, G., Mortier, F. & Estoup, A. GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Mol. Ecol. Notes* **5**, 712–715 (2005).
70. Schwarz, G. Estimating the dimension of a model. *Ann. Stat.* **6**, 461–464 (1978).
71. Jombart, T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* **24**, 1403–1405 (2008).
72. Anderson, E. C. & Thompson, E. A. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* **160**, 1217–1229 (2002).