



Diversité génétique de l'ADNmt dans la population de loups gris de Biélorussie menacée par le métissage loups-chiens

Theriologia Ukrainica, 25: 87–99 (2023)
p-ISSN 2616-7379 • e-ISSN 2617-1120
DOI: 10.53452/TU2508



GENETIC DIVERSITY OF mtDNA IN THE GREY WOLF POPULATION OF BELARUS THREATENED BY WOLF-DOG ADMIXTURE

Vladislav Molchan , Kanstantsin Homel , Arseni Valnisty , Mikhael Nikiforov , Ekaterina Kheidorova 

Résumé

L'hybridation avec des espèces domestiques est l'une des principales menaces pour la conservation de nombreuses espèces précieuses au Belarus, en particulier le loup gris (*Canis lupus* Linnaeus, 1758), dont la population a précédemment montré des génotypes exceptionnellement divergents, indiquant un métissage possible avec des chiens en liberté (*Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758). Un tel métissage pourrait menacer l'avenir de l'espèce, déjà affaiblie par la pression anthropique. Les rapports sur les hybrides en Biélorussie basés sur les caractéristiques morphologiques ont augmenté régulièrement en fréquence depuis 2010, ce qui peut être lié à une disponibilité croissante de nourriture pour les chiens sauvages et à une faible densité de population de loups gris facilitant l'hybridation. **Un nombre limité d'études génétiques avec un échantillonnage couvrant partiellement la Biélorussie n'a pas détecté de traces d'hybridation.** Nous présentons ici notre estimation de la diversité génétique de la population Biélorusse de loups gris d'après l'analyse de la séquence de l'ADNmt de la région de contrôle (boucle D). **Nous avons analysé des échantillons de tissus provenant de 35 spécimens récoltés lors de chasses légales dans 25 districts administratifs des 6 régions de Biélorussie entre 2009 et 2022, 9 de ces spécimens présentant des caractéristiques morphologiques d'hybrides loup-chien.** Nous avons détecté 6 haplotypes parmi ces 35 spécimens, dont 4 ont été trouvés parmi les hybrides loups-chiens probables. L'analyse des **clades** des séquences obtenues avec 100 séquences confirmées de loups, de chiens et de leurs hybrides de la base de données NCBI Genbank a montré la présence d'hybrides loup-chien possibles dans notre échantillon. **La population de loups du Belarus présente une faible diversité nucléotidique et une diversité haplotypique relativement élevée.** Les données relatives à la diversité génétique de la population de loups du Belarus sont pour la plupart conformes aux études portant sur des populations de loups similaires à travers l'Europe. La persistance de grandes **métapopulations** de loups en Europe de l'Est et en Russie, associée à la grande **mobilité** de l'animal, semble être la cause probable de la diversité génétique des populations de loups au Belarus, mais un certain degré d'hybridation entre loups et chiens pourrait également expliquer l'hétérogénéité génétique observée, ce qui invite à poursuivre les recherches sur la base de marqueurs nucléaires.

INTRODUCTION

Le loup gris (*Canis lupus* L., 1758) est l'une des espèces de mammifères les plus répandues dans le monde, avec une aire de répartition couvrant la majeure partie de l'Eurasie et de l'Amérique du Nord. Ses effectifs en Europe ont considérablement diminué en raison des efforts continus de chasse de l'homme [Bibikov 1985], ce qui a également entraîné une diminution de la diversité génétique au sein des populations, ainsi qu'une limitation du flux de gènes entre elles. En Biélorussie, le loup gris est l'un des grands prédateurs les plus répandus, avec une présence significative dans tout le pays. D'immenses zones forestières et une faible densité de population par rapport à l'Europe occidentale et centrale créent des conditions favorables à l'habitat du loup. Une étude de 2013 sur la structure génétique des populations de loups à travers l'Europe a rapporté les résultats d'une analyse SNP de 177 loups provenant de 11 pays Européens, complétée par des données ADNmt et microsatellites [Stronen *et al.* 2013]. **L'analyse a montré une diversité génétique anormalement élevée pour la partie de l'échantillon provenant du Belarus.** Comme le soulignent les auteurs, l'origine de cette diversité génétique n'est pas claire et nécessite une étude plus approfondie [Stronen *et al.* 2013]. Comme aucune étude sur la génétique des loups de Biélorussie n'a été réalisée depuis lors, bien que l'espèce joue un rôle crucial dans les écosystèmes locaux, nous considérons que cette population doit faire l'objet d'une étude plus approfondie de ses caractéristiques génétiques.

L'une des menaces les plus importantes pour la conservation du loup gris en Europe est l'hybridation avec les chiens en liberté, car l'introgession continue de gènes provenant des chiens peut conduire à une perte de génotype sauvage, mettant en danger la survie à long terme de la population [Gompert 2016]. Alors que l'hybridation naturelle peut être associée à de nombreux résultats positifs en termes d'évolution et de conservation, tels que le sauvetage génétique [Brennan *et al.* 2014] ou la spéciation [Lavrenchenko & Bulatova 2016], l'hybridation anthropogénique est largement considérée comme une menace pour la conservation des espèces. L'hybridation anthropogénique est généralement définie comme une hybridation causée par une interférence humaine délibérée ou accidentelle, telle que la destruction des barrières entre les populations interfertiles de différentes espèces, les invasions synanthropiques, les introductions ou les migrations dirigées par la perte d'habitat anthropogénique, et peut conduire à une perte de capacité d'adaptation dans la population hybride émergente [Rhymer & Simberloff 1996].

La question de l'hybridation loup-chien menaçant la fitness des populations de loups sauvages a été soulevée dans de nombreuses régions d'Europe, notamment au Portugal [Torres *et al.* 2017], en Bulgarie [Moura *et al.* 2014], en Lettonie [Andersone *et al.* 2002], en Italie et dans d'autres pays [Randi *et al.* 2000]. La détection et l'estimation en temps opportun des niveaux d'hybridation dans les populations de loups deviennent de plus en plus un instrument vital pour la conservation et la gestion de ce prédateur canidé. **A cette fin, la détection des hybrides basée sur des données génétiques moléculaires, telles que les marqueurs STR ou les séquences génomiques complètes, est actuellement la plus efficace et la plus fiable, comme le montrent les études menées en Italie** [Dolf *et al.* 2000] et en Fennoscandie [Smeds *et al.* 2021]. Parmi les études récentes sur le sujet, il est essentiel de souligner une enquête menée en 2022 sur la génétique de la population de loups Italiens par Lorenzini et ses collègues [Lorenzini *et al.* 2022], dans laquelle les auteurs ont proposé une

nouvelle méthode d'identification des hybrides loup-chien basée sur l'analyse bayésienne de 22 loci STR amplifiés dans une réaction PCR multiplex. La méthode permet une identification fiable des hybrides, y compris la classification des hybrides par génération, et nous travaillons actuellement à l'adoption de cette approche dans la recherche sur l'hybridation loup-chien en Biélorussie.

Les estimations quantitatives du degré et du taux d'hybridation loup-chien dans les populations de loups sauvages sont encore rares. De telles études ont été menées en Bulgarie [Moura *et al.* 2014], au Portugal [Torres *et al.* 2017], en Lettonie [Andersone *et al.* 2002] et dans la péninsule Ibérique [Ramirez *et al.* 2006 ; Godinho *et al.* 2011 ; Vilà & Wayne 1999], avec des résultats rapportant la présence d'hybrides à des fréquences comprises entre 0% et 10,9% de l'échantillon étudié. En Biélorussie, la question est particulièrement peu étudiée. Des cas probables d'hybridation loup-chien basés sur les caractéristiques morphologiques des animaux ont été relevés depuis les années 1980, mais des études génétiques limitées couvrant partiellement la Biélorussie, n'ont pas détecté de traces d'hybridation [Stronen *et al.* 2014]. Quoi qu'il en soit, les rapports sur les hybrides basés sur les caractéristiques morphologiques ont augmenté régulièrement en fréquence depuis 2010, ce qui peut être lié à une disponibilité croissante de nourriture pour les chiens sauvages et à une faible densité de population du loup gris facilitant l'hybridation [Sidorovich & Rotenko 2019]. La situation invite à une étude plus approfondie de la question de l'hybridation en Biélorussie.

Dans la présente étude, nous procédons à une estimation de la diversité génétique de la population de loups gris de Biélorussie ainsi qu'à une enquête préliminaire sur les signes possibles d'hybridation entre loups et chiens selon le polymorphisme de séquence de la région de contrôle de l'ADNmt (boucle D).

MATERIEL ET METHODE

Les échantillons de tissus utilisés dans la présente étude ont été prélevés sur 35 animaux tués lors de chasses légales ou d'accidents de la route entre 2009 et 2022 (matériel supplémentaire, [Tableau S1](#)). Nous avons utilisé des tissus mous prélevés avec des outils stériles et conservés dans de l'éthanol dans des conditions cryogéniques. La zone d'échantillonnage comprenait les six régions administratives (oblasts) et les 25 districts administratifs (rayons) ([Fig. 1](#)).

En outre, neuf des échantillons ont été prélevés sur des spécimens présentant des caractéristiques morphologiques atypiques, indiquant peut-être une ascendance métissée chien-loup (matériel supplémentaire, [Tableau S1](#), [Figure S1](#)). Aucun animal n'a été blessé ou tué spécifiquement pour l'échantillonnage.

Pour l'analyse des **clades**, nous avons rassemblé une sélection de 100 séquences de la région de contrôle de l'ADNmt du loup pour des spécimens prélevés en Europe et dans les régions adjacentes, ainsi qu'une séquence d'un hybride loup-chien confirmé (JN182126). Les séquences ont été regroupées en 8 régions - Europe de l'Est, Europe du Nord, Europe de l'Ouest, Europe du Sud, Asie de l'Est, Asie centrale, Asie de l'Ouest et Caucase - en fonction de leur lieu d'origine ([Fig. 2](#)).

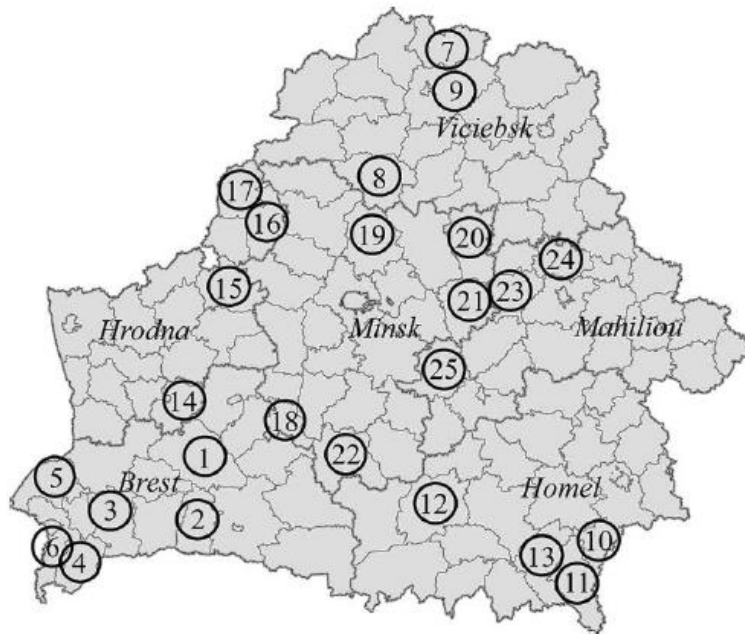


Fig. 1. Distribution des lieux d'échantillonnage des loups dans les districts administratifs du Belarus. Les cercles noirs indiquent que les échantillons prélevés dans ce district ont été utilisés dans la présente étude. Les numéros à l'intérieur du cercle correspondent aux numéros de localisation du Tableau S1 (colonne 'Location #')

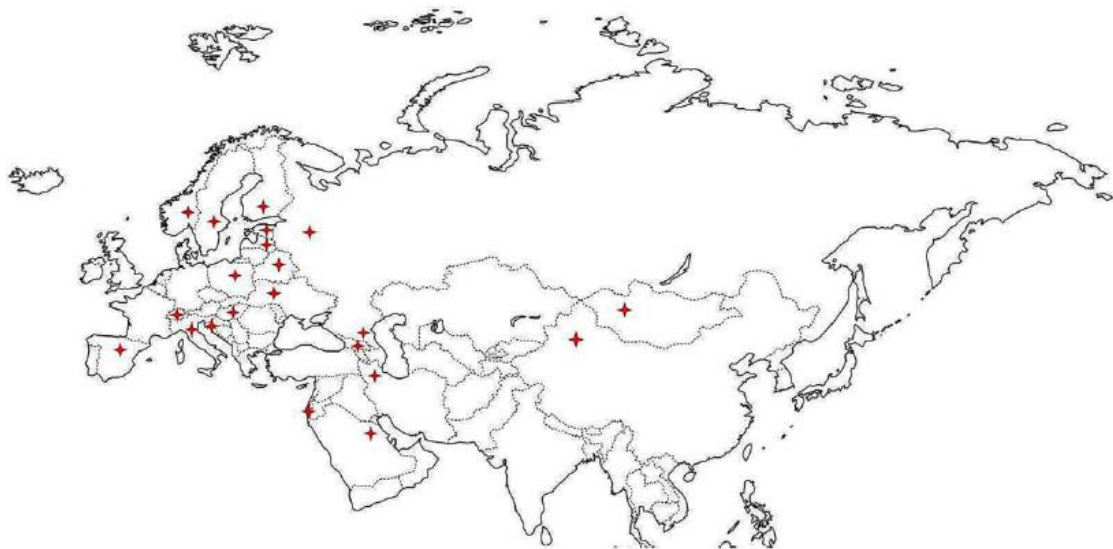


Fig. 2. Carte indiquant les lieux d'où ont été extraites les séquences de la région de la boucle D de l'ADNmt du loup provenant du NCBI

Pour l'extraction de l'ADN, nous avons utilisé le kit de préparation de l'ADN des animaux et des champignons (Jena Bioscience, Allemagne) en suivant le protocole du fabricant. La concentration des isolats d'ADN obtenus a été mesurée à l'aide du nanospectrophotomètre NanoPhotometer P 330UV/Vis (IMPLEN, Allemagne) et conservée à -2°C en vue d'une utilisation ultérieure. Nous avons ensuite amplifié le fragment HV1 de la région de contrôle à l'aide des amorces L16462 (CATACTAACGTGGGGGTAC) et H222 (AAACTATATGTCGAAACC) [Vilà *et al.* 1997] dans des réactions standard de $25\ \mu\text{l}$ avec la *Taq* polymérase en suivant le protocole suivant : 1 cycle de 4 minutes à 94°C ; 29 cycles de 30 secondes à 94°C , 45 secondes à 48°C , 1 minute à 72°C ; et 1 cycle final de 5 minutes à 72°C .

Les amplifications ont été réalisées avec un thermocycleur Bio-rad C1000 Touch (USA). Les amplicons obtenus ont été examinés à la recherche de sous-produits indésirables par électrophorèse sur gel dans un gel d'agrose à 1,4% à l'aide d'une chambre MiniGel de 15 cm (Bio-rad, États-Unis) et du système de documentation de gel Gel Doc™ XR+ (Bio-rad, États-Unis). Le séquençage Sanger dideoxy des fragments amplifiés a été effectué en utilisant la base de l'Institut de chimie bioorganique du NAS de Biélorussie. Les amplicons ont été séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 0,8%, les fragments cibles ont été découpés dans le gel et purifiés avec NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel, Allemagne). Les fragments d'ADN purifiés ont ensuite été utilisés dans une réaction de séquençage à l'aide du kit BrilliantDye3.1 (Nimagen, Pays-Bas). Les produits ont été purifiés par précipitation à l'éthanol/EDTA et séparés avec l'analyseur génétique ABI3130 (Thermo Fisher Scientific, USA). Nous avons ensuite interprété les graphes d'activité obtenus en séquences au format FASTA et les avons alignés avec l'algorithme ClustalW à l'aide de MEGA X v10.2.4. [Kumar *et al.* 2018].

Nous avons utilisé le même logiciel pour déterminer le nombre de sites polymorphes et parcimonieusement informatifs dans l'alignement obtenu. L'estimation des indicateurs de diversité génétique - diversité nucléotidique (π), nombre d'haplotypes (h), nombre moyen de différences nucléotidiques (k) et diversité des haplotypes (Hd) - a été réalisée dans DnaSP ver. 6.12.03 [Rozas *et al.* 2017].

Pour l'analyse des **clades**, nous avons aligné 100 séquences de la région de contrôle de l'ADNmt du loup pour des spécimens récoltés à travers l'Europe et les régions adjacentes (Fig. 2) avec les 35 séquences que nous avons obtenues pour la présente étude, et nous avons utilisé cet alignement pour construire un arbre phylogénétique avec MrBayes v3.2.7 [Huelsenbeck & Ronquist 2001]. Nous avons utilisé le modèle Hasegawa-Kishino-Yano avec une distribution Gamma et des sites invariants. Les recherches d'arbres ont été effectuées avec 4 chaînes de Markov (3 chaînes chauffées et 1 chaîne froide) sur 2 millions de générations, avec un échantillonnage toutes les 500 générations et en éliminant 25% des arbres brûlés. Nous avons ensuite visualisé cet arbre avec FigTree v1.4.41. Nous avons également construit un réseau d'haplotypes à partir du même alignement en utilisant l'algorithme de jonction médiane dans Network 4.6.1.1 [Bandelt *et al.* 1999].

Les tests démographiques Fu's F_s , Tajima's D ont été calculés dans Arlequin ver. 3.5.2.2 [Excoffier & Lischer 2010], et les R_2 de Ramos-Onsins et Roza dans DnaSP ver. 6.12.03 [Rozas *et al.* 2017]. De faibles valeurs significatives de R_2 et des valeurs négatives de F_s et D indiquent une expansion de la population dans le passé [Ramos-Onsins & Rozas 2002]. Les valeurs P pour R_2 ont été déterminées par simulation de coalescence dans DnaSP. L'indice d'irrégularité (évaluation quantitative de la régularité de la distribution des disparités pour les scénarios démographiques d'expansion et de stabilité de la population dans le passé) et la somme des écarts quadratiques (SSD) par rapport au modèle d'expansion soudaine [Rogers & Harpending 1992 ; Harpend-ing 1994] ont été calculés dans Arlequin en générant 10 000 échantillons simulés [Excoffier & Lischer 2010]. Les tests démographiques susmentionnés ont porté sur un échantillon de 32 spécimens de loups, excluant les 3 hybrides loups-chiens les plus probables.

RESULTATS ET DISCUSSION

Nous avons réussi à obtenir des fragments de séquence de la région de contrôle pour les 35 spécimens de *C. lupus*, avec une longueur alignée de 302 paires de bases. L'alignement contenait 9 sites polymorphes, dont 7 étaient parcimonieusement informatifs. **L'échantillon présentait six haplotypes**. L'indice de diversité nucléotidique a montré une faible valeur, tandis que la diversité des haplotypes peut être caractérisée comme relativement élevée (Tableau 1). Le Tableau 2 présente une sélection d'estimations de la diversité génétique dans les populations de loups provenant d'un certain nombre d'études similaires.

En conclusion, le niveau de diversité génétique de la population de loups de Biélorussie est conforme aux données similaires issues d'études antérieures sur les populations de loups en Europe et peut être qualifié de modérément élevé.

Tableau 1. Diversité génétique et estimations de l'histoire démographique de la population de loups du Belarus en fonction du polymorphisme de la région de contrôle de l'ADNmt

Metric	Value	Metric	Value
N	35	Fu's Fs	2.497 NS
h	6	Tajima's D	1.59 NS
Hd ± SD	0.745±0.038	SSD	0.071 *
π ± SD	0.00977±0.00075	Hri	0.163 NS
k	2.931	Ramos-Onsin's and Roza's, R ₂	0.1893 NS

Note. N—sample size; h—number of haplotypes; k—average number of nucleotide differences; SD—standard deviation; Fu's Fs, Tajima's D, Ramos-Onsins and Rozas, R₂—population demography tests; SSD—sum of squared deviations from the sudden expansion model [Rogers & Harpending 1992]; Hri—Harpending's Raggedness index (r) [Harpending's 1994]; NS—statistically insignificant; *— $p < 0.05$.

Tableau 2. Comparaison des estimations de la diversité génétique des populations Européennes de loups en fonction du polymorphisme de la région de contrôle de l'ADNmt

N	Metric			Source
	h	Hd ± SD	π ± SD	
947	27	0.88	0.022	[Pilot <i>et al.</i> 2010]
192	6	0.775 ± 0.014	0.020 ± 0.011	[Djan <i>et al.</i> 2014]
643	1–11	0–0.84	0.017 ± 0.009	[Pilot <i>et al.</i> 2006]
91	4	0.711 ± 0.018	0.018 ± 0.0096	[Gomerčić <i>et al.</i> 2010]
259	34	–	0.026 ± 0.014	[Vilá & Wayne 1999]
11	7	0.88	0.014	[Osman <i>et al.</i> 2016]
43 (Caucasus)	9	0.87	0.012	[Pilot <i>et al.</i> 2014]
74 (Bulgaria)	11	0.87	0.016	[Pilot <i>et al.</i> 2014]
7 (Spain)	2	0.29	0.004	[Pilot <i>et al.</i> 2014]

Note. N—sample size; h—number of haplotypes; Hd—haplotype diversity; π —nucleotide diversity; SD—standard deviation.

L'analyse de **l'arbre phylogénétique** bayésien à l'échelle continentale a révélé deux **clades** principaux (Fig. 3). Le **premier** clade comprenait principalement des spécimens de loups confirmés, avec deux chiens de Pologne (GenBank : HM007199 et HM007196) et un hybride loup-chien confirmé d'Estonie (JN182126), tandis que le **second** clade était composé principalement de chiens confirmés, plus des loups de Mongolie (KU696392, KU696394, KU696395, et KU696396). Les 35 spécimens Biélorusses obtenus dans cette étude se sont retrouvés dans le premier clade, avec la plupart des loups, dont 8 spécimens signalés comme des hybrides probables en raison de leurs caractéristiques morphologiques. Un spécimen Biélorusse (CL87), également un hybride morphologiquement probable, a été assigné au clade 2. Deux de nos spécimens Biélorusses (CL54 et CL83) ont également été confirmés

comme étant des hybrides de loups par des données d'analyse microsatellites (données non publiées). Nous considérons la distribution des spécimens Biélorusses dans l'arbre comme un indicateur de la forte hétérogénéité génétique des lignées d'ADNmt dans la population de loups gris Biélorusses, et d'une origine mixte probable de la population. La position dans le clade du spécimen CL87 suggère également la présence d'une rare hybridation loup-chien avec une ascendance matrilinéaire de chien [Hindrikson *et al.* 2016].

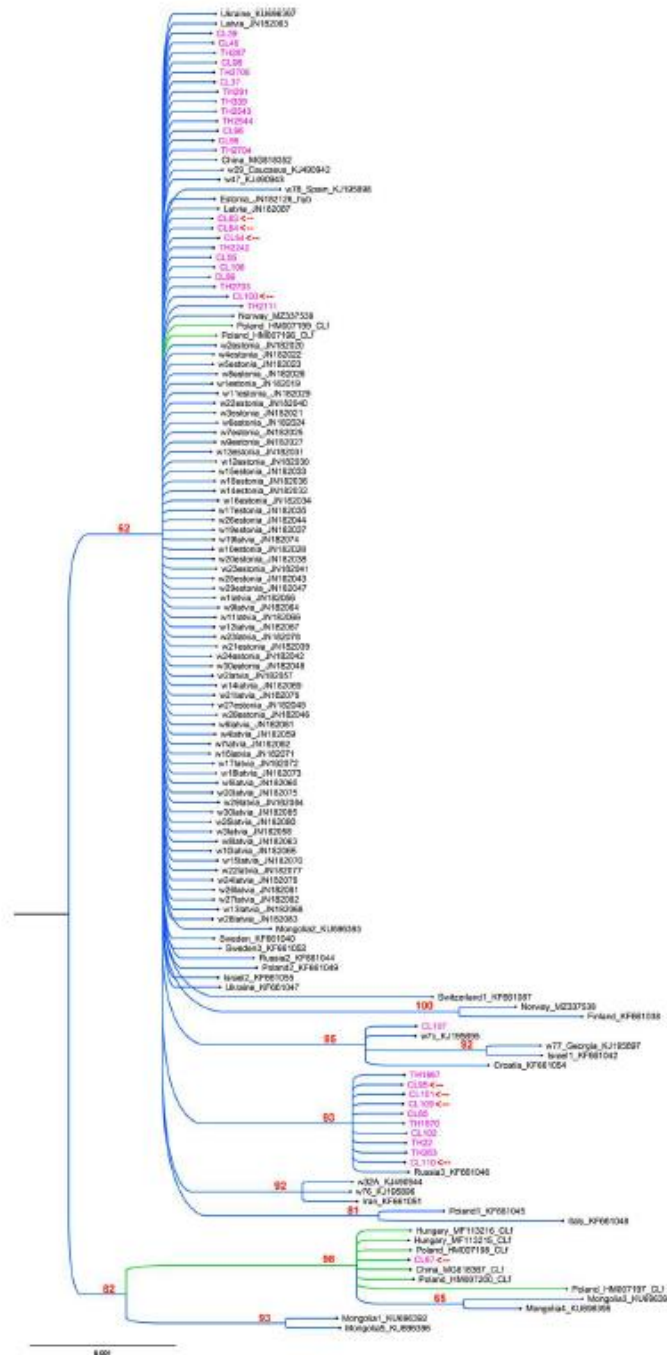


Fig. 3. Arbre phylo-génétique bayésien des loups, des chiens et des hybrides potentiels loup-chien basé sur l'analyse des séquences de la région de contrôle de l'ADNmt.

Couleurs :
vert-chiens, bleu-loups, flèches rouges-hybrides potentiels basés sur des caractéristiques morphologiques ; étiquettes violettes-échantillons de cette étude

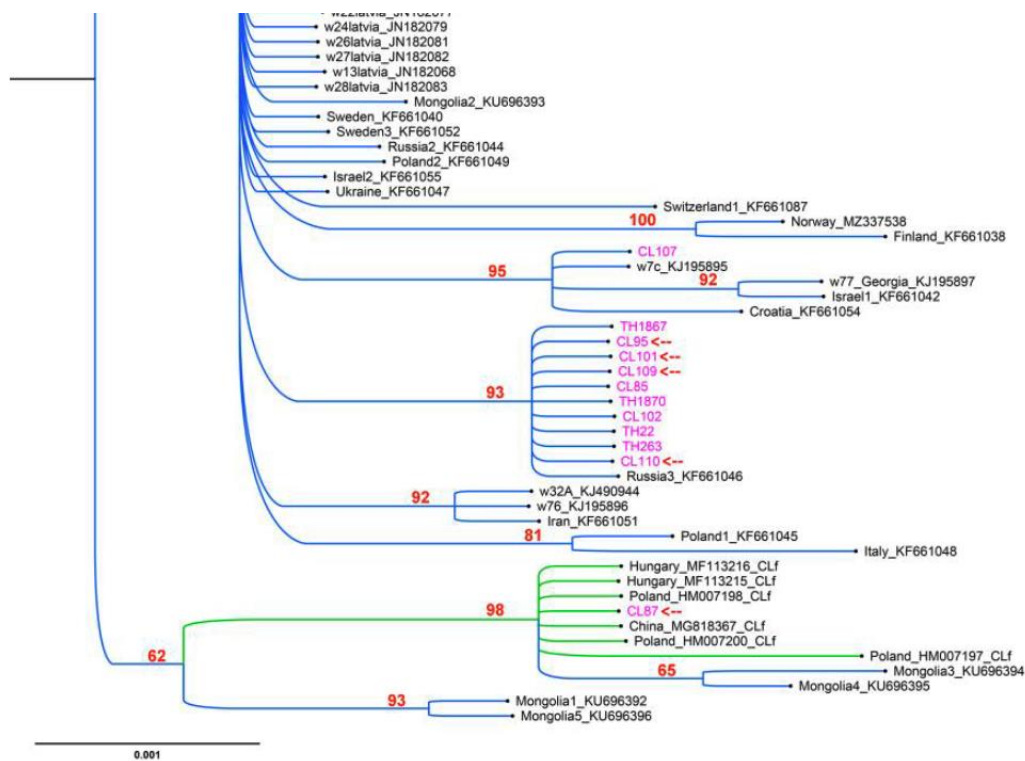


Fig 3 : Zoom ; Couleurs :

vert-chiens, bleu-loups, flèches rouges-hybrides potentiels basés sur des caractéristiques morphologiques ; étiquettes violettes-échantillons de cette étude

Dans l'ensemble, l'analyse des **clades** semble indiquer une ascendance hétérogène des loups Biélorusses, ainsi qu'une hybridation probable. Mais en raison des limites inhérentes aux données de l'ADNmt, nous suggérons qu'une enquête plus approfondie utilisant des marqueurs nucléaires est nécessaire pour résoudre la question de l'hybridation dans la population étudiée, ainsi que pour modéliser sa structure génétique avec une précision et une résolution suffisante à des fins de conservation.

Notre analyse de la diversité des **haplotypes** montre la présence de 6 haplotypes parmi les 35 spécimens échantillonnés (Fig. 4, matériel supplémentaire, Tableau S2), ce qui est largement en accord avec des études antérieures sur la diversité des haplotypes de l'ADNmt dans les populations de loups d'Europe [Pilot *et al.* 2010]. Les haplotypes H1 (fréquence de 37%), H6 (28%), et H8 (23%) sont les plus communs, tandis que tous les autres haplotypes ont des taux d'occurrence compris entre 3% et 6%. Les trois haplotypes communs sont présents dans la majeure partie du Belarus, tandis que les haplotypes rares H2 et H11 n'étaient présents que dans les parties sud-est et sud-ouest du pays, respectivement, et que l'haplotype H9 a été détecté dans deux localités. La taille limitée de l'échantillon ne permet pas de considérer la variété et la distribution des haplotypes présentées comme complètes pour la région étudiée, mais elle indique un degré élevé de diversité et probablement un manque de structuration dans la population de l'espèce.

D'après les caractéristiques morphologiques, les hybrides présumés appartenaient à quatre des haplotypes découverts : H6, H8, H9 et H11 (Fig. 4). La distribution de ces derniers haplotypes est principalement liée à la partie centrale de la Biélorussie, mais elle ne montre

guère la présence réelle d'animaux hybrides et reflète plutôt les données sur les hybrides loup-chien possibles basées sur les informations fournies par les chasseurs.

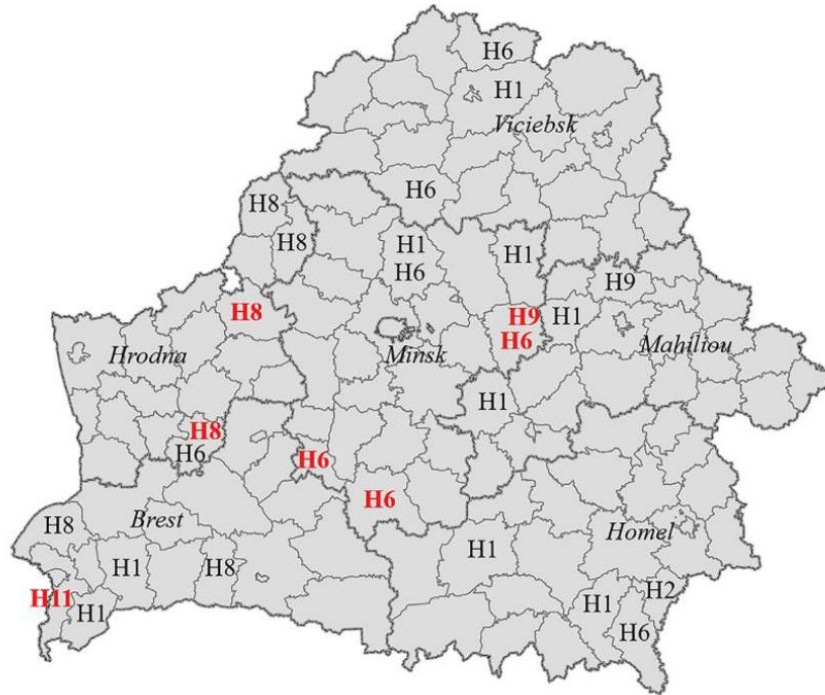


Fig. 4. Distribution des haplotypes de loups et d'hybrides présumés par localité d'échantillonnage. Les haplotypes des hybrides probables sont indiqués en rouge gras

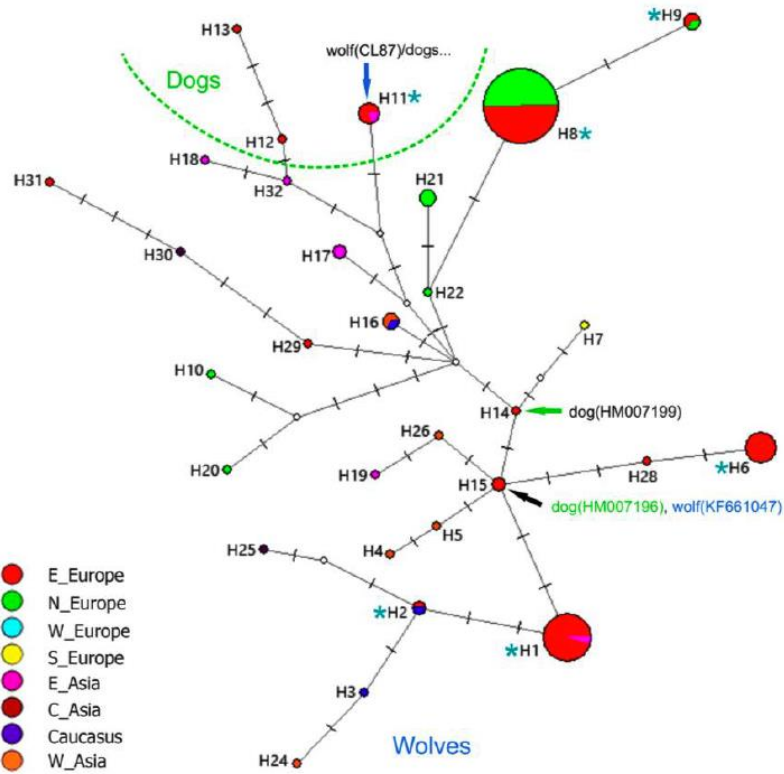


Fig. 5. Réseau de jonction médian d'haplotypes construit à partir d'un alignement de 135 séquences de la région de contrôle du loup et du chien

L'analyse de l'alignement élargi augmenté d'une sélection continentale de séquences de la région de contrôle de l'ADNmt de *C. lupus*, obtenues à partir de la base de données Genbank de NCBI a montré une distribution d'haplotypes similaire à celle montrée dans des études antérieures sur la phylogéographie du loup gris [Ersmark *et al* 2016]. Nous avons observé 32 haplotypes dans l'alignement, 19 d'entre eux étant limités à l'Europe, 10 à l'Asie et 3 étant présents dans les deux régions (Fig. 5, matériel supplémentaire, Tableau S2). Comme l'arbre phylogénétique, le réseau d'haplotypes créé à partir de l'alignement n'indique pas de structure ancestrale claire pour les loups gris de Biélorussie ou les loups d'Europe de l'Est en général, car la plupart des haplotypes en question sont répartis dans plusieurs régions. Nous interprétons cela comme un autre indicateur de l'ascendance mixte de la population de loups du Belarus.

Les résultats des tests démographiques pour la population de loups du Belarus montrent de manière concluante l'absence d'événements de croissance drastique de la population dans le passé, comme l'indiquent les valeurs de test non significatives du F de F_u , du D de Tajima et du R_2 , et une déviation significative pour le modèle d'expansion soudaine (Tableau 1), en accord avec la structure du réseau d'haplotypes obtenu.

Nous suggérons que la population Biélorusse moderne de *C. lupus*, issue d'un mélange progressif à partir de sources multiples constitue l'explication la plus probable des caractéristiques présentées. De plus, alors que les grandes **métapopulations** de *C. lupus* habitant les régions voisines pourraient être la source principale de ce métissage, nos données n'excluent pas la possibilité que les chiens sauvages contribuent à une partie significative du pool génétique des loups gris contemporains en Biélorussie. **En fait, même les conclusions limitées qui peuvent être tirées des données de l'ADNmt semblent soutenir la possibilité d'une hybridation significative entre loups et chiens en Biélorussie.** D'autres études utilisant des marqueurs nucléaires permettraient de conclure de manière décisive sur le degré d'hybridation dans la population et sur la gravité du problème. L'augmentation de la pression anthropogénique sur la population de loups et la fragmentation de l'habitat rendent plus probables les métissages avec les chiens et la menace qu'ils représentent pour la stabilité de la population de loups. Dans cette optique, une gestion efficace du loup gris en Europe de l'Est nécessitera un suivi génétique plus poussé afin de conserver le niveau actuel de fitness et de diversité de l'espèce.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier tous les chasseurs qui nous ont fourni des échantillons de loups, en particulier le professeur Dr. Vadim Sidorovich qui a partagé avec nous ses propres échantillons de loups. Nous remercions également les deux arbitres anonymes pour leurs commentaires importants, Igor Zagorodniuk pour l'édition et Zoltán Barkaszi pour la relecture de l'article. L'étude a été soutenue par l'Académie nationale des sciences du Belarus dans le cadre de la thèse de doctorat de V. Molchan intitulée « Évaluation de la structure génétique de la population de loups gris (*Canis lupus*), occurrence et distribution des hybrides loup-chien au Belarus ».

References

- Andersone, Ž., V. Lucchini, J. Ozoliņš. 2002. Hybridisation between wolves and dogs in Latvia as documented using mitochondrial and microsatellite DNA markers. *Mammalian Biology*, **67**: 79–90. [CrossRef](#)
- Bandelt, H. J., P. Forster, A. Rohl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**: 37–48. [CrossRef](#)
- Bibikov, D.I. 1985. *The Wolf. History, Systematics, Morphology, Ecology*. Nauka, Moscow, 1–608. [In Russian]
- Brennan, A. C., G. Woodward, O. Seehausen, V. Muñoz-Fuentes, C. Moritz, [et al.]. 2014. Hybridization due to changing species distributions: adding problems or solutions to conservation of biodiversity during global change? *Evolutionary Ecology Research*, **16**: 475–491.
- Djan, M., V. Maletić, I. Trbojević, D. Popović, N. Veličković, [et al.]. 2014. Genetic diversity and structuring of the grey wolf population from the Central Balkans based on mitochondrial DNA variation. *Mammalian Biology*, **79**: 277–282. [CrossRef](#)
- sula. *Molecular Ecology*, **20**: 5154–5166. [CrossRef](#)
- Gomerčić T., M. Sindičić, A. Galov, H. Arbanasić, J. Kusak, [et al.]. 2010. High genetic variability of the grey wolf (*Canis lupus* L.) population from Croatia as revealed by mitochondrial DNA control region sequences. *Zoological Studies*, **49**: 816–823.
- Gompert, Z., C. A. Buerkle. 2016. What, if anything, are hybrids: enduring truths and challenges associated with population structure and gene flow. *Evolutionary Applications*, **9**: 909–923. [CrossRef](#)
- Harpending, H. C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* **66**: 591–600.
- Hindrikson, M., J. Remm, M. Pilot, R. Godinho, A. V. Stronen, [et al.]. 2017. Wolf population genetics in Europe: a systematic review, meta-analysis and suggestions for conservation and management: Wolf population genetics in Europe. *Biological Reviews*, **92**: 1601–1629. [CrossRef](#)
- Huelsenbeck, J. P., F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **17**: 754–755. [CrossRef](#)
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, **35**: 1547–1549. [CrossRef](#)
- Lavrenchenko, L. A., N. Sh. Bulatova. 2016. The role of hybrid zones in speciation: A case study on chromosome races of the house mouse *Mus domesticus* and common shrew *Sorex araneus*. *Biology Bulletin Reviews*, **6**: 232–244. [CrossRef](#)
- Lorenzini, R., L. Attili, C. Tancredi, R. Fanelli, L. Garofalo. 2022. A validated molecular protocol to differentiate pure wolves, dogs and wolf x dog hybrids through a panel of multiplexed canine STR markers. *Diversity*, **14**: 511. [CrossRef](#)
- Moura, A. E., E. Tsingarska, M. J. Dąbrowski, S. D. Czarnomska, B. Jędrzejewska, M. Pilot. 2014. Unregulated hunting and genetic recovery from a severe population decline: the cautionary case of Bulgarian wolves. *Conservation Genetics*, **15**: 405–417. [CrossRef](#)
- Osman İ., E. Aksöyek, S. Özcan, A. Keten, T. Yorulmaz, C. Tez. 2016. Genetic analysis of the Turkish gray wolf (*Canis lupus*) based on partial mitochondrial DNA sequences. *Vertebrate zoology*, **66**: 427–435.
- Pilot, M., M. J. Dąbrowski, V. Hayrapetyan, E. G. Yavruyan, N. Kopaliani, [et al.]. 2014. Genetic variability of the grey wolf *Canis lupus* in the Caucasus in comparison with Europe and the Middle East: distinct or intermediary population? *PLoS ONE*, **9**: e93828. [CrossRef](#)
- Pilot, M., W. Branicki, W. Jędrzejewski, J. Goszczyński, B. Jędrzejewska, [et al.]. 2010. Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Evolutionary Biology*, **10**: article #100. [CrossRef](#)
- Dolf, G., J. Schläpfer, C. Gaillard, E. Randi, V. Lucchini, U. Breitenmoser, N. Stahlberger-Saitbekova. 2000. Differentiation of the Italian wolf and the domestic dog based on microsatellite analysis. *Genetics Selection Evolution*, **32**: 533–541. [CrossRef](#)
- Ersmark, E., C. F. C. Klütsch, Y. L. Chan, M.-H. S. Sinding, S. R. Fain, [et al.]. 2016. From the Past to the Present: Wolf Phylogeography and Demographic History Based on the Mitochondrial Control Region. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **4** (134): 1–10. [CrossRef](#)
- Excoffier L., H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**: 564–567.
- Godinho, R., L. Llaneza, J. C. Blanco, S. Lopes, F. Álvares, [et al.]. 2011. Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *BMC Evolutionary Biology*, **10**: article #100. [CrossRef](#)
- Pilot, M., W. Jędrzejewski, W. Branicki, V. E. Sidorovich, B. Jędrzejewska, [et al.]. 2006. Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Molecular Ecology*, **15**: 4533–4553. [CrossRef](#)
- Ramirez, O., L. Altet, C. Enseñat, C. Vilà, A. Sanchez, A. Ruiz. 2006. Genetic assessment of the Iberian wolf *Canis lupus signatus* captive breeding program. *Conservation Genetics*, **7**: 861–878. [CrossRef](#)
- Ramos-Onsins, S. E., J. Rozas. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, **19**: 2092–2100.
- Randi, E., V. Lucchini, M. F. Christensen, N. Mucci, S. M. Funk, G. Dolf, V. Loeschke. 2000. Mitochondrial DNA variability in Italian and east European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conservation Biology*, **14**: 464–473. [CrossRef](#)
- Rhymer, J. M., D. Simberloff. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **27**: 83–109. [CrossRef](#)
- Rogers, A. R., H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**: 552–569. [CrossRef](#)
- Rozas, J., A. Ferrer-Mata, J. C. Sánchez-DelBarrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, [et al.]. 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, **34**: 3299–3302. [CrossRef](#)
- Sidorovich, V., I. Rotenko. 2019. *Reproduction biology in grey wolves Canis lupus in Belarus: Common beliefs versus reality*. Second edition, Chatyry chverci, Minsk, 1–223.
- Smeds, L., J. Aspi, J. Berglund, I. Kojola, K. Tironen, H. Ellegren. 2021. Whole-genome analyses provide no evidence for dog introgression in Fennoscandian wolf populations. *Evolutionary Applications*, **14**: 721–734. [CrossRef](#)
- Stronen, A. V., B. Jędrzejewska, C. Pertoldi, D. Demontis, E. Randi, [et al.]. 2013. North-South Differentiation and a Region of High Diversity in European Wolves (*Canis lupus*). *PLoS ONE*, **8**: e76454. [CrossRef](#)
- Torres, R. T., E. Ferreira, R. G. Rocha, C. Fonseca. 2017. Hybridization between wolf and domestic dog: first evidence from an endangered population in central Portugal. *Mammalian Biology*, **86**: 70–74. [CrossRef](#)
- Vilà, C., P. Savolainen, J. E. Maldonado, I. R. Amorim, J. E. Rice, [et al.]. 1997. Multiple and Ancient Origins of the Domestic Dog. *Science*, **276**: 1687–1689. [CrossRef](#)
- Vilà, C., R. K. Wayne. 1999. Hybridization between wolves and dogs. *Conservation Biology*, **13**: 195–198. [CrossRef](#)