Première mention d'une meute de loups à phénotype noir en Provence (sainte-baume, France) : enquête génétique sur un cas suspecté d'hybridation

DOI 10.15407/zoo2025.05.399
UDC 599.742.11:575.857(44-13)

FIRST MENTION OF A WOLF-PACK WITH BLACK PHENOTYPES IN PROVENCE (SAINTE-BAUME, FRANCE): GENETIC INVESTIGATION OF A SUSPECTED HYBRIDIZATION EVENT

F. Roda [*,1], **J.-N. Philibert** [2]

[1] Wildlife Scientific Interest Society — Wild SIS/ SIS Faune, Société d'Intérêt Scientifique pour la Faune sauvage, 757 chemin du Collet Redon, 83136 Rocbaron, France
[2] Fédération Départementale des Chasseurs du Var, Place Georges Clémenceau, 21 rue de Tielt, 83170 Brignoles, France
* Corresponding author

E-mail: roda_fabrice@yahoo.fr

Résumé
Nous documentons la première apparition d'une meute de loups à **phénotype noir** en France. Les loups à pelage noir sont extrêmement rares en Europe et sont généralement soupçonnés d'être des hybrides entre loups et chiens. Des pièges photographiques ont été utilisés pour caractériser les phénotypes des loups gris et noirs de la meute. Nous avons utilisé un chien de détection pour identifier rapidement et collecter de manière non invasive des excréments frais de loups. Le loup mâle du couple reproducteur présentait le phénotype typique d'un loup gris, tandis que la femelle reproductrice avait un pelage noir. Quatre des six louveteaux étaient noirs et deux étaient gris. L'analyse des marqueurs microsatellites, en utilisant les génotypes des loups Français comme référence, a révélé qu'aucun des loups n'était un hybride de première ou de deuxième génération. Conformément aux études précédentes, nous concluons que les phénotypes atypiques permettent de soupçonner une hybridation entre le loup et le chien, mais que des analyses génétiques restent nécessaires pour attribuer un canidé à une classe génétique.

Mots clés : *Canis lupus*, hybride (loup-chien), hybridation, grand carnivore, chien de détection, échantillons fécaux, pièges photographiques, génotype.

Points pratiques
Les loups à pelage noir sont extrêmement rares en Europe et sont généralement soupçonnés d'être des hybrides entre loups et chiens.

Nous avons utilisé un chien détecteur pour identifier rapidement et collecter de manière non invasive des excréments frais de loups. L'analyse des marqueurs microsatellites, en utilisant

les génotypes des loups Français comme référence, a révélé qu'aucun des loups n'était un hybride de première ou deuxième génération.

INTRODUCTION

Les loups recolonisent certaines parties de leur aire de répartition historique dans les Alpes Françaises, après la première confirmation officielle du retour de l'espèce au début des années 1990 dans cette région (Peillon & Carbone 1993 ; Valière et al. 2003). En France, le rétablissement du loup se produit dans des zones d'élevage intensif de moutons. Dans ces régions, les prédations sur le bétail attribuées aux loups peuvent être considérables (> 12 000 têtes en 2019), ce qui a un impact économique et social important (Données DDT(M)-DREAL Auvergne Rhône-Alpes 2019).

Le conflit autour des loups est particulièrement important dans les zones de recolonisation récente, car les populations ne sont pas habituées aux attaques contre les moutons et les troupeaux ne sont souvent pas bien protégés (Chapron et al., 2014).

Récemment, **l'hybridation** des loups est devenue un sujet très brûlant en France (Reportage France 3, 2017). L'hybridation entre loups et chiens est fréquente en Europe (Vilà et al., 2003 ; Godinho et al., 2011 ; Randi et al., 2014 ; Kusak et al., 2018) et 3,6% des loups Français sont des hybrides F1 et 7,2% supplémentaires sont porteurs de gènes canins, mais potentiellement avec une ascendance lointaine (Duchamp & Queney, 2018). Les autorités Européennes recommandent d'éliminer les hybrides entre loups et chiens, car l'introgression du génome canin dans la population de loups peut constituer un grave problème de conservation (Conseil de l'Europe, 2014).

Sur la base de cette recommandation Européenne, un collectif d'éleveurs ovins et de politiciens a contesté les résultats du suivi de la population de loups effectué par les autorités Françaises. Les opposants aux loups ont affirmé que tous les loups Français sont des hybrides (ON-CFS, 2018) ; les politiciens ont donc proposé de les éliminer (Sénat, 2017).

Dans ce **contexte politique**, les loups présentant des phénotypes atypiques sont généralement soupçonnés d'être des hybrides. **En général**, et selon le consensus Européen, un phénotype atypique peut suggérer l'existence d'une hybridation entre le loup et le chien, mais des analyses génétiques restent nécessaires pour attribuer de manière fiable un canidé à une classe génétique (loup, chien ou hybride ; Galaverni et al., 2017 ; Pilot et al., 2018 ; Donfrancesco et al., 2019). En Amérique du Nord, les phénotypes de loups noirs sont courants et peuvent représenter localement 50% ou plus de la population (Gibson et al., 2002 ; Hedrick et al., 2014). Contrairement à la situation en Amérique du Nord, le phénotype noir est rare en Europe : sur un échantillon de 700 loups prélevés en Russie, en Biélorussie, en Ukraine, en Lituanie et en Bulgarie, un seul loup présentait un pelage noir (W. Jedrzejewski, tel que rapporté dans Apollonio et al., 2004) ; dans une étude récente, Kusak et al. (2018) ont montré que quelques échantillons prélevés en Croatie correspondaient à des phénotypes noirs. Une exception est représentée par le nord des Apennins Italiens, où les loups noirs sont présents localement à une fréquence non négligeable (Apollonio et al., 2004 ; Caniglia et al., 2013). La base génétique de la robe noire chez les loups est une délétion de 3 nucléotides au niveau du gène *CDB103* de la β-defensine, qui pourrait provenir du chien

domestique et donc être un signe d'hybridation (Candille et al., 2007). Selon Galaverni et al. (2017), le pelage noir a également été observé chez des canidés dont les profils génomiques se rapprochaient de ceux des loups et ne présentaient aucun signe d'ascendance canine. Des analyses génétiques sont donc nécessaires pour déterminer si un individu noir présente une ascendance canine récente. De 1992 à 2016, les autorités Françaises (ONCFS, 2016) n'ont détecté aucun loup présentant un « phénotype atypique » (sensu Kusak et al., 2018). Entre 2016 et 2019, des bergers et des chasseurs ont signalé des observations sporadiques de loups présentant des phénotypes atypiques, mais aucune photographie n'est venue étayer ces observations.

En 2019, une louve **noire** a été abattue à « La Malle » (Alpes Maritimes) et le rapport d'expertise a conclu que le canidé était un loup sans aucun signe de mélange avec un chien (ONCF, 2019). Cette louve présentait un haplotype w22 (typique des loups Italiens) et il est probable qu'elle soit originaire du nord des Apennins Italiens.

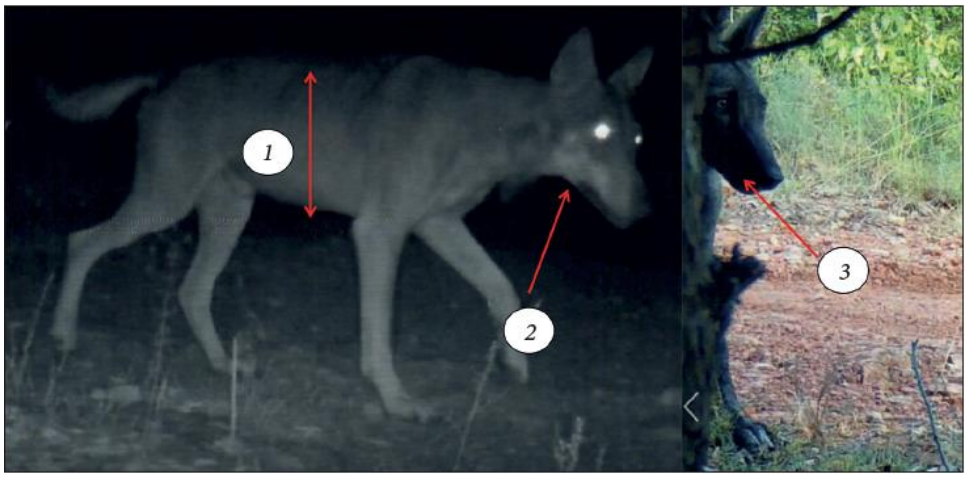

Fig. 1. Premières photographies des adultes reproducteurs de la meute Sirius Black. À gauche, le mâle présente une coloration typique du loup gris, avec un contraste entre le dos foncé (1) et le ventre plus clair et le masque facial blanc (2). La femelle a un pelage noir et n'a pas de masque facial blanc (3). Le phénotype seul de la femelle ne permet pas de déterminer s'il s'agit d'un loup au pelage atypique, d'un chien de type berger ou d'un hybride loup-chien. © Jean-Noël Philibert

Au cours de l'été 2021, des loups mâles et femelles non répertoriés auparavant ont été photographiés dans le parc régional de la Sainte-Baume. Le mâle présentait un phénotype typique du loup gris, tandis que la femelle avait un pelage noir (Fig. 1). L'analyse visuelle des photographies disponibles du phénotype féminin ne permettant pas de distinguer de manière fiable entre un loup, un chien de type berger ou un hybride chien × loup, la Fédération Départementale des Chasseurs du Var a installé un ensemble de pièges photographiques (CT) dans la zone afin de surveiller la présence du couple de loups et d'identifier d'éventuels événements de reproduction. Dans une étude précédente (Roda et al., 2022), les pièges photographiques n'ont capturé aucun chien en liberté pendant les 9 mois de surveillance (ou pendant cette étude), nous avons donc supposé qu'il n'y avait pas de chiens en liberté dans le parc. Grâce aux enquêtes, à la fin du mois d'août, six jeunes louveteaux ont été détectés sur le territoire du parc régional de la Sainte-Baume, dont quatre présentaient un pelage noir atypique (Fig. 2). Au sein d'une même portée, des animaux présentant le pelage gris typique du loup coexistaient avec d'autres présentant un pelage mélanique (Fig. 3).

C'était la première fois, en France, qu'une meute composée de plusieurs loups présentant des phénotypes atypiques était identifiée et étudiée.

Nous avons utilisé un chien dressé pour détecter les excréments de loups afin de collecter rapidement et de manière non invasive des échantillons de matières fécales fraîches pour les analyser génétiquement et mener une étude plus approfondie et plus précise de la meute nouvellement établie, baptisée « Sirius Black ». Afin d'éviter toute polémique et de permettre des comparaisons avec les génotypes publiés par les autorités françaises, nous avons choisi d'envoyer nos échantillons à ANTAGENE, le même laboratoire privé utilisé par l'Office national de la chasse et de la faune sauvage (ONCFS, 2018 ; Duchamp & Queney, 2018).

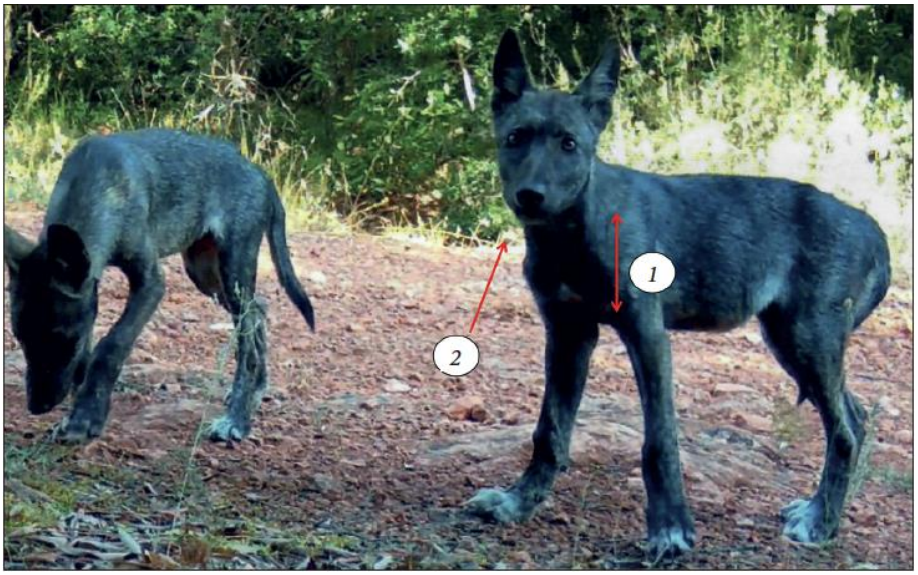

Fig. 2. Deux petits avec un pelage noir atypique (meute Sirius Black). La couleur noire du pelage (1) est uniforme chez ces petits, il n'y a pas de contraste entre le dos et le ventre et le masque blanc (2) est absent chez ces petits, comme chez leur mère louve. Le pelage peut être décrit comme « gris bleuté » (petit de droite) ou « noir argenté » (petit de gauche). © Jean-Noël Philibert

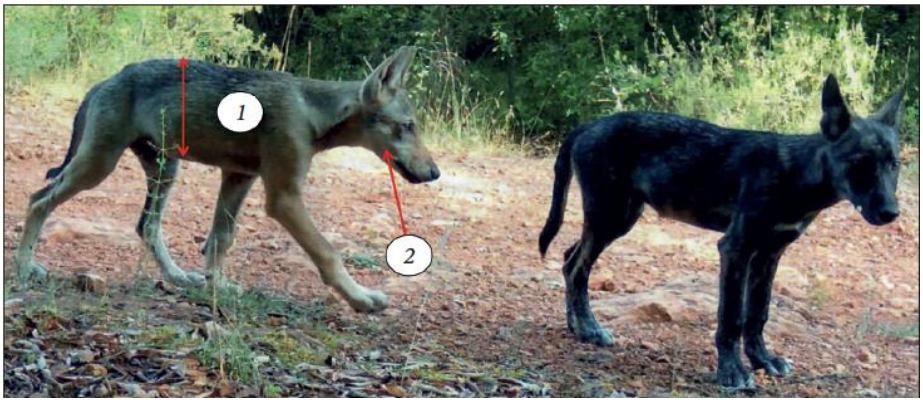

Fig. 3. Deux petits de la même portée présentant des phénotypes différents (meute Sirius Black ; photo prise en août). Le petit de gauche présente un phénotype typique du loup gris, avec un contraste marqué entre le dos et le ventre (1) et un masque facial blanc (2). Le deuxième petit (à droite) présente un pelage noir uniforme atypique. © Jean-Noël Philibert

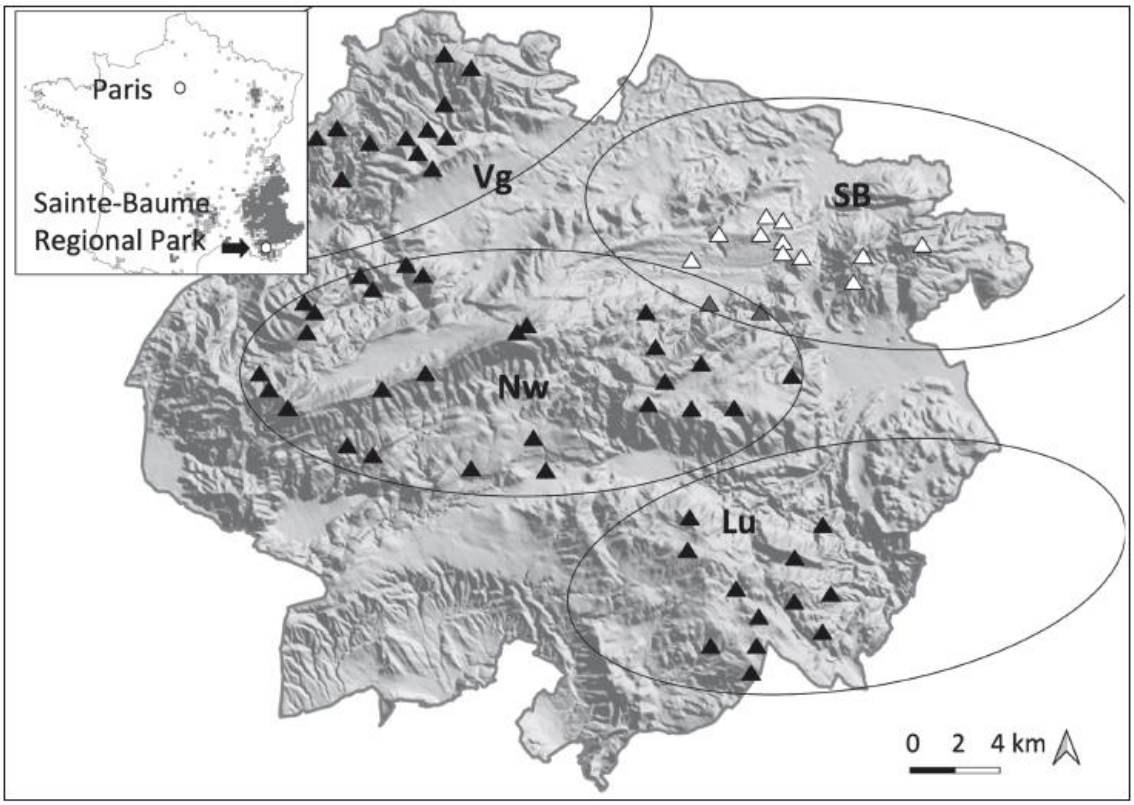

Fig. 4. Zone d'étude, montrant le territoire des quatre meutes de loups présentes dans le Parc régional de la Sainte-Baume. Les limites administratives du parc sont indiquées en gris clair. Les triangles blancs indiquent les sites de marquage où des excréments de la meute de loups « Sirius Black » ont été collectés, les triangles noirs indiquent les sites de marquage de trois meutes de loups adjacentes. Les triangles rouges indiquent les sites de marquage à la limite de deux meutes de loups adjacentes (Sirius Black et Neowise) où des excréments ont été collectés. Nw : meute de loups Neowise ; Lu : meute de loups Lupi ; SB : meute de loups Sirius Black ; Vg : meute de loups V.ga. Les sites de marquage des meutes Lu, SB et Vg situés en dehors des limites du parc ne sont pas indiqués

MATERIEL et METHODES

Nous avons utilisé un chien dressé pour détecter les excréments frais, en suivant un protocole décrit précédemment dans Roda et al., 2021 et Rod et al., 2022. **En bref**, l'équipe a étudié des transects de préférence circulaires pour des raisons logistiques (retour au véhicule). Le parc régional de la Sainte-Baume (43°32 N ; 5°83 E ; https://inpn.mnhn.fr/espace/protege/FR8000053) abrite trois meutes de loups référencées (Lupi, Neowise, Vega), en plus de la meute de loups récemment établie (Sirius Black). L'abondance des sangliers varie considérablement dans l'ensemble du massif (Roda & Roda, 2024), avec un nombre élevé d'animaux abattus (6,3 sangliers tués/km²/an). **En revanche**, les chevreuils (*Capreolus capreolus*) sont plus rares (0,9 animal tué/km²/an). Un petit groupe d'environ 50 à 100 daims (*Dama dama*) et cerfs élaphes (*Cervus elaphus*) a récemment été introduit par les gestionnaires de la chasse (Krammer, 2016 ; Roda, 2016). Il n'y a pas d'animaux d'élevage dans la zone prospectée. La première reproduction de loups a eu lieu en 2020 (Poulard et al., 2021). Les sites de marquage des meutes de loups sont bien connus (Fig. 4), ont fait l'objet d'études approfondies (Roda et al., 2022) et des loups individuels ont récemment été identifiés génétiquement (données non publiées). Vingt échantillons d'excréments ont été prélevés à deux dates (les 26 et 30 octobre 2021), conservés individuellement dans des sacs plastiques scellés et congelés, puis analysés pour **22 marqueurs**. Les analyses génétiques ont été réalisées par un laboratoire privé sous-traitant (ANTAGENE, https://www.antagene.com/en). Nous avons choisi de faire appel à ce laboratoire car c'est celui qui est utilisé depuis des années par l'Office Français de la Biodiversité en France, afin

que les génotypes identifiés dans notre étude puissent alimenter la base de données et le modèle de population de l'OFB. Tous les échantillons ont été analysés à l'aide d'un test d'identification des espèces par ADN mitochondrial (ADNm), ainsi que d'une approche multitube par réaction en chaîne par polymérase (PCR) basée sur **22 marqueurs microsatellites** : AHT103, AHT111, AHTk211, CPH02, C09.173, CPH05, CFX30371, CXX.279, FH2161, FH2054, Dbarl, REN162C04, FH2010 et C27.442 (Godinho et al., 2015) ; FH2096, FH2088, FH2004, FH2140 et FH2137 (Francisco et al., 1996), C09.250 (Ostrander et al., 1993), PEZ17 (Neff et al., 1999), INU030 (Ji et al., 2007) et un marqueur spécifique au sexe pour l'identification individuelle du genre (AMEL, Ji et al., 2007). Les méthodes d'extraction, les protocoles PCR et la procédure d'identification individuelle ainsi que les tests de fiabilité des génotypes sont décrits en détail dans Valière et al., 2003. Un indice de qualité (QI) a été calculé pour chaque échantillon en comparant chaque génotype répliqué sur chaque marqueur au génotype consensuel (Miquel et al., 2006). Les QI ont ensuite été moyennés sur toutes les répétitions pour chaque locus, puis sur tous les loci pour un individu afin d'obtenir un QI par échantillon.

Afin d'attribuer les profils génétiques individuels à leur taxon (loup, chien), une approche de regroupement bayésien a été mise en œuvre. Le programme informatique STRUCTURE v.3.4 (Pritchard et al., 2000 ; Falush et al., 2003) a été utilisé pour regrouper les individus en fonction de leur espèce à l'aide du modèle de mélange, des fréquences alléliques corrélées et des a priori sur les populations de référence (POPINFO = 1), avec un burn-in de 100 000 et 500 000 itérations de la chaîne MCMC. Vingt répétitions ont été effectuées avec le nombre de clusters K fixé à 2 et les probabilités et les intervalles de crédibilité ont été moyennés sur les 20 répétitions. À titre de référence, ANTAGENE a inclus dans l'analyse des chiens domestiques (races et chiens de village) et des loups gris de la population Française. Les hybrides ont été détectés sur la base des probabilités d'attribution obtenues avec STRUCTURE (Bohling & Waits, 2011). Les individus dont l'intervalle de crédibilité à 95% englobait soit 0 soit 1 ont été considérés comme des individus sans mélange, et les autres individus ont été considérés comme des hybrides. Toutes les procédures et analyses génétiques sont détaillées dans le document supplémentaire S1.

Les génotypes obtenus dans cette étude ont été comparés à ceux de la base de données de l'OFB afin d'examiner la proximité génétique des loups Sirius Black avec d'autres loups Français. Pour cette analyse (différente de l'analyse avec STRUCTURE fournie par le laboratoire ANTAGENE, car les données utilisées par ANTAGENE ne sont pas librement accessibles), nous avons utilisé l'ensemble de données fourni gratuitement dans Duchamp & Queney (2018), ONCFS (2019) et OFB (2021) à des fins de comparaison. L'échantillon comprenait 41 génotypes de chiens, 17 génotypes d'hybrides loup-chien F1, 62 génotypes de rétrocroisement et 579 génotypes de loups (OFB, 2021).

Des pièges photographiques ont été installés simultanément dans les territoires des meutes de loups « Neowise » et « Sirius black » du 1er juin 2021 au 1er janvier 2022, à l'aide de 5 caméras. L'utilisation de pièges photographiques a permis de caractériser les phénotypes des loups. Des caméras activées à distance par le mouvement ont été placées sur les chemins forestiers empruntés par les loups. Chaque piège photographique était actif 24 heures sur 24, 7 jours sur 7, et était contrôlé par des observateurs à intervalles variables (de 2 à 20 jours)

afin de changer les piles et les cartes SD. Toutes les caméras étaient équipées d'un capteur infrarouge passif et d'un flash LED.

Les documents supplémentaires (SI : Méthodes et S2 : Génotypes) peuvent être téléchargés sur le référentiel Figshare : https://figshare.com/ndownloader/files/51849224.

RESULTATS

Phénotypes des loups

Les CT ont permis de capturer régulièrement des images des loups des deux meutes adjacentes (Sirius Black et Neowise). Des photographies de bonne qualité ont permis de caractériser les changements phénotypiques liés au vieillissement des individus noirs. Avec l'âge, le pelage noir des jeunes s'est légèrement éclairci, affichant une palette de couleurs allant de l'argent foncé au gris-bleu noir. Un contraste important est apparu entre la couleur à l'intérieur des pattes (beige comme chez les loups gris typiques) et le reste du pelage, beaucoup plus foncé. Le ventre était également plus clair que le dos, tendant vers le beige ou le rouge (Fig. 5).

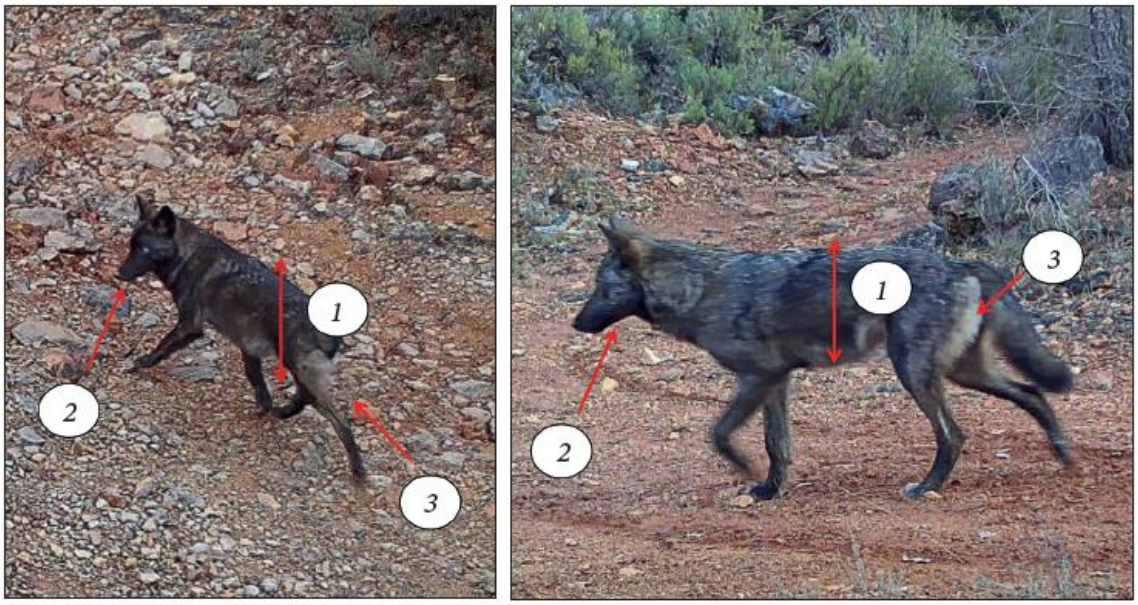

Fig. 5. Deux photographies montrant de jeunes loups ayant atteint leur taille adulte (meute Sirius Black). Malgré l'apparence générale atypique de leur pelage noir, on observe (1) une différence de couleur entre le dos (plus foncé) et le ventre (plus clair, tirant vers le beige/rouge). Les individus adultes n'ont (2) pas de masque facial blanc ; l'intérieur de leurs pattes est (3) beige, comme chez les individus présentant le phénotype caractéristique du loup gris (comparer avec les figures 3 et 4). © Frédéric Gervais

Résultats génétiques

Au total, 20 échantillons de crottes de loups présumés ont été détectés et collectés, 17 dans la zone de la meute Sirius Black et trois à la limite du territoire avec la meute Neowise. Dix-huit (90%) des 20 génotypes analysés ont été attribués à l'espèce du loup gris (probabilité postérieure moyenne de 0,998 ; erreur type : 0,001) ; les deux derniers échantillons étaient de très mauvaise qualité et aucune espèce n'a pu être identifiée. Quatorze échantillons (70%) ont donné lieu à des génotypes multilocus fiables (voir matériel supplémentaire S2). **Sept** loups différents ont été identifiés. Les trois échantillons trouvés à la limite du territoire de Sirius Black/Neowise étaient des recaptures de deux loups déjà connus, la femelle dominante et le mâle dominant de la meute voisine de Neowise. Tous les autres génotypes (11 sur 14) ont été identifiés comme appartenant à cinq loups jusqu'alors inconnus de la nouvelle meute

Sirius Black. Tous les haplotypes étaient déjà connus. L'association entre les données des pièges photographiques et le génotypage des excréments a permis d'identifier les individus dominants et les petits. **En particulier**, quatre échantillons ont été identifiés comme appartenant au mâle dominant et deux échantillons à la femelle dominante de Sirius Black. Les 5 derniers échantillons (sur 14) ont été identifiés comme appartenant à trois petits de la meute Sirius Black (Tableau 1).

Les analyses n'ont révélé aucune hybridation récente (F1 ou F2). Aucun échantillon n'était associé à une race de chien domestique (*Canis lupus familiaris*). Le génotype de la femelle reproductrice à pelage noir de la meute Sirius Black était très proche de celui d'une autre louve noire abattue légalement dans les Alpes Françaises (ONCFS, 2019 ; voir matériel supplémentaire S2).

Tableau 1. Résumé des résultats génétiques

Identification	Wolfpack	Sexe	Status	Nb. samples	QI	Assignment	Haplotype	P wolf	<Cl95	>Cl95
Neo 01	Neowise	XY	Dominant	1	0.82	Wolf	w22	0.999	0.985	1.000
Neo 02	Neowise	XX	Dominant	2	0.98	Wolf	w22	0.998	0.978	1.000
SB01	Sirius Black	XY	Dominant	4	0.93	Wolf	w22	0.999	0.986	1.000
SB02	Sirius Black	XX	Dominant	2	0.96	Wolf	w22	0.998	0.972	1.000
SB03	Sirius Black	XY	Pup	1	0.66	Wolf	w22	0.999	0.983	1.000
SB04	Sirius Black	XX	Pup	2	0.99	Wolf	w22	0.995	0.930	1.000
SB05	Sirius Black	XY	Pup	2	0.95	Wolf	w22	0.999	0.985	1.000

Remarque. Identification : nom de chaque loup individuel. nb. échantillons : nombre d'échantillons génétiques de crottes trouvés pour chaque loup individuel. QI : indice de qualité de l'échantillon. Si plusieurs échantillons sont disponibles pour chaque loup individuel, la meilleure valeur QI est indiquée. Hybridation : diagnostic d'hybridation (voir méthodes) ; aucun hybride n'a été trouvé dans cette étude. Haplotype : diagnostic haplotype. Tous les loups étaient issus de la lignée italo-alpine (haplotype w22, sensu Pilot et al., 2010). P wolf : probabilités d'attribution obtenues avec STRUCTURE (Bohling & Waits, 2011). < CI95 : intervalle de crédibilité inférieur à 95 %. > CI95 : intervalle de crédibilité supérieur.

DISCUSSION

L'apparition de loups noirs dans la région Provence met en évidence la question de l'hybridation entre loups et chiens en France. L'association du phénotype « pelage noir » avec l'hybridation a été confirmée dans une récente étude génomique menée par Caniglia et al. (2013) dans l'Italie voisine, conformément aux hypothèses précédentes dérivées des loups nord-Américains suggérant l'introduction ancienne du génome canin autour de la région génomique du gène β-defensin (Anderson et al., 2009). Ce phénotype est probablement le signe d'une introgression génétique dérivée du chien dans le pool génétique du loup. D'autres études ont montré que les individus à pelage noir étaient génétiquement des loups (Galaverni et al., 2017).

Il faut garder à l'esprit que nos résultats ne montrent pas que les loups noirs ne sont pas des hybrides, mais qu'ils ne sont pas des hybrides de première ou de deuxième génération. L'interprétation des résultats des données est très sensible à la taille de l'échantillon des populations de chiens et de loups utilisées comme référence (voir la discussion dans Harmoinen et al., 2021 ; Vik Stronen et al., 2022). Dans cette étude, nous avons utilisé la base de données des loups Français, des chiens en liberté et des hybrides fournie par l'Office Français de la Biodiversité (OFB, 2021). La méthodologie utilisée dans notre étude ne permet pas de distinguer de manière fiable les hybrides issus de rétrocroisements des loups non métissés (VonHoldt et al., 2013) ; cette affirmation fait consensus en Europe (Duchamp & Queney, 2018 ; Pilot et al., 2018). **En d'autres termes**, l'origine canine de ce phénotype

(noir) suffit à soupçonner un événement d'hybridation, mais une évaluation génétique est nécessaire pour classer un individu dans la catégorie des loups ou des hybrides ; et le calendrier de l'introgression du génome canin reste spéculatif au-delà des deux premières générations. Cela suggère que l'hybridation a eu lieu il y a plusieurs générations et que la plupart des allèles dérivés du chien chez ces individus ont été perdus, ce qui a donné lieu à un profil génétique de loup sans mélange (Galaverni et al., 2017 ; Pilot et al., 2018). Une analyse des données récentes (périodes 2008-2018) montre que les hybridations en France se sont produites dans trois zones sensibles des Alpes Françaises : l'une à Tinée, une autre en Maurienne et la dernière dans le Vercors (Duchamp & Queney, 2018). Les loups ont colonisé la France depuis l'Italie voisine à la suite de l'expansion de l'aire de répartition de la population italienne (Fabbri et al., 2007 ; Ciucci et al., 2009). Jusqu'à récemment, il n'y avait pas de loups à pelage noir en France, il semble donc raisonnable d'émettre l'hypothèse que l'apparition de ce phénotype en Provence est une conséquence du flux génétique provenant d'Italie ; il est également possible que l'hybridation ait eu lieu relativement récemment dans les Alpes Françaises. La diffusion du pelage noir pourrait s'expliquer par une forte sélection positive et des adaptations très rapides liées à l'habitat (Caniglia et al., 2013) ou à l'immunité (Cubaynes et al., 2022), ou aux deux.

En marge de notre étude, nous notons que la combinaison des CTs et de l'utilisation de chiens de détection pour collecter des échantillons non invasifs de loups permet de mener rapidement et efficacement une enquête génétique sur les cas d'hybridation présumés, et de mener des projets de surveillance sur des espèces sauvages et insaisissables, comme le loup. La combinaison des CTs et de l'analyse génétique de matériel biologique non invasif n'est pas nouvelle. Dans la plupart des cas, les deux méthodes sont utilisées en parallèle afin de collecter autant de données que possible (Karanth et al., 2006 ; Mattioli et al., 2018). L'analyse des excréments produits par des individus identifiables visuellement peut fournir des informations détaillées sur la structure des meutes locales et la nature des couples reproducteurs (Canu et al., 2017). Dans notre étude, nous avons obtenu les échantillons génétiques en deux demi-journées de travail sur le terrain grâce à l'utilisation d'un chien de détection.

Dans un contexte de fortes tensions liées au sujet brûlant de l'hybridation en France, la rapidité d'obtention des résultats est fondamentale. **En effet**, le ministère Français de l'Environnement a souligné dans un rapport récent que les résultats génétiques doivent être partagés rapidement, sans quoi certains acteurs continueront à semer la confusion dans l'esprit du public avec de fausses informations (Rapport CGED/ CGAAER, 2019).

En conclusion, cette étude est la première à détailler les phénotypes des loups à pelage noir en France. Les analyses génétiques suggèrent que tous les canidés échantillonnés étaient des loups sans aucun signe de mélange avec des chiens, ou bien que le génome canin était trop dilué pour être détectable. Au cours des hivers 2021-2022, tous les jeunes loups présentant des phénotypes noirs se sont dispersés. Il n'y a pas eu de reproduction au cours de l'été 2022 dans la meute de loups Sirius Black, mais une nouvelle meute comprenant des louveteaux au phénotype noir s'est formée au cours de l'été 2022 à 60 km de la région de Sainte-Baume. Le suivi génétique de ces loups à pelage noir et de leur progéniture présente un intérêt scientifique et permettra de mieux comprendre le flux génétique au sein des

populations de loups sauvages Français. En marge de notre étude, nous concluons que la combinaison de caméras pièges et de relevés canins pour collecter des échantillons d'ADN constitue un bon outil pour réagir rapidement aux situations d'urgence liées à des soupçons d'hybridation.

Remerciements
Nous remercions tout particulièrement la Fédération Départementale des Chasseurs du Var qui a financé les pièges photographiques et les analyses génétiques : cette étude n'aurait pas pu voir le jour sans son soutien logistique et financier. Le chien de détection Newt a été initialement dressé (par F. Roda) et utilisé pendant trois ans par l'OFB ; nous sommes donc particulièrement reconnaissants à l'OFB sans lequel une partie de ce travail n'aurait pas été possible.

Le laboratoire ANTAGENE a développé et validé le panel de 22 microsatellites et marqueurs de détermination du sexe et a mis en place la méthodologie d'analyse statistique. Nous remercions Frédéric Gervais qui a gracieusement fourni des photographies de bonne qualité de la meute de loups Sirius Black. Nous remercions Gaetan Ayache et le Parc régional de la Sainte-Baume qui nous ont apporté leur aide cartographique. Nous remercions Alice Cheylan pour la relecture et la révision de la version anglaise. Nous sommes reconnaissants à Gilles Cheylan qui a relu une première version de ce manuscrit. Nous sommes particulièrement reconnaissants aux relecteurs anonymes qui ont contribué à améliorer ce manuscrit. Et bien sûr, nous remercions « Newt des Gardens de Cendril-lon » : bon chien, bon travail !

Déclarations éthiques
Tous les auteurs approuvent le contenu du manuscrit et sa soumission à la revue. Ni le manuscrit ni aucune partie de son contenu ne sont actuellement à l'étude ou publiés dans une autre revue. Tous les auteurs déclarent tout conflit d'intérêts potentiel avec d'autres personnes ou organisations qui pourraient influencer de manière inappropriée leur travail. La Fédération départementale des chasseurs du Var a financé les pièges photographiques et les analyses génétiques.

Disponibilité des données
Les données étayant les conclusions de cette étude seront disponibles dans le dépôt numérique Figshare.

Contribution des auteurs : Fabrice Roda : conceptualisation (responsable), analyse formelle (responsable), enquête sur le terrain (à parts égales), méthodologie (à parts égales), ressources (soutien), rédaction du projet original (responsable), rédaction - révision et édition (responsable). Jean-Noël Philibert : enquête sur le terrain (à parts égales), méthodologie (à parts égales), ressources (responsable), rédaction du projet original (soutien).

REFERENCES

Anderson, T. M., Vonholdt, B. M., Candille, S. I., Musiani, M., Greco, C., Stahler, D. R., Smith, D. W., Padhukasahasran, B., Randi, E., Leonard, J. A., Bustamante, C. D., Ostrander, E. A., Tang, H., Wayne, R. K. & Barsh, G. S. 2009. Molecular and evolutionary history of melanism in North American gray wolves. *Science*, 323, 1339–1343.

Apollonio, M., Mattioli, L. & Scandura, M. 2004. Occurrence of black wolves in the Northern Apennines, Italy. *Acta Theriologica*, **49** (2), 281–285.

Bohling, J. H., & Waits, L. P. 2011. Assessing the prevalence of hybridization between sympatric Canis species surrounding the red wolf (*Canis rufus*) recovery area in North Carolina. *Molecular Ecology*, **20** (10), 2142–2156.

Candille, S. I., Kaelin, C. B., Cattanach, B. M., Yu, B., Thompson, D. A., Nix, M. A., Kerns, J. A., Schmutz, S. M., Milhauser, G. L. & Barsh, G. S. 2007. A β-defensin mutation causes black coat color in domestic dogs. *Science*, 318, 1418–1423.

Caniglia, R., Fabbri, E., Greco, C., Galaverni, M., Manghi, L., Boitani, L., Sforzi, A. & Randi E. 2013. Black coats in an admixed wolf + dog pack is melanism an indicator of hybridization in wolves? *Eur J Wildl Res.*, 59, 543–555.

Canu, A., Mattioli, L., Santini, A., Apollonio, M. & Scandura, M. 2017. "Video-scats": combining camera trapping and non-invasive genotyping to assess individual identity and hybrid status in gray wolf. *Wildlife biology*, 1. Doi:10.2981/wlb.00355

Chapron, G., Kaczensky, P., Linnell, J. D. C., Arx, von, M., Huber, D., Andrén, H., López-Bao, J.V., Adamec, M., Álvares, F., Anders, O., Balčiauskas, L., Balys, V., Bedő, P., Bego, F., Blanco, J.C., Breitenmoser, U., Brøseth, H., Bufka, L., Bunikyte, R., Ciucci, P., Dutsov, A., Engleder, T., Fuxjäger, C., Groff, C., Holmala, K., Hoxha, B., Iliopoulos, Y., Ionescu, O., Jeremić, J., Jerina, K., Kluth, G., Knauer, F., Kojola, I., Kos, I., Krofel, M., Kubala, J., Kunovac, S., Kusak, J., Kutal, M., Liberg, O., Majić, A., Männil, P., Manz, R., Marboutin, E., Marucco, F., Melovski, D., Mersini, K., Mertzanis, Y., Mysłajek, R. W., Nowak, S., Odden, J., Ozolins, J., Palomero, G., Paunović, M., Persson, J., Potočnik, H., Quenette, P.-Y., Rauer, G., Reinhardt, I., Rigg, R., Ryser, A., Salvatori, V., Skrbinšek, T., Stojanov, A., Swenson, J. E., Szemethy, L., Trajçe, A., Tsingarska-Sedefcheva, E., Váňa, M., Veeroja, R., Wabakken, P., Wölfl, M., Wölfl, S., Zimmermann, F., Zlatanova, D. & Boitani, L. 2014. Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes. *Science*, 346, 1517–1519. doi:10.1126/science.1257553

Ciucci, O., Reggioni, W., Maiorano, L. & Boitani, L. 2009. Long-distance dispersal of a rescued wolf from the northern Apennines to the western Alps. *J. Wildlife Management*, 73 (8), 1300–1306.

Council of Europe. 2014. Recommandation n°173 du Comité permanent, adoptée le 5 décembre 2014, sur les croisements entre les Loups gris sauvages (*Canis lupus*) et les chiens domestique (*Canis lupus familiaris*). https://rm.coe.int/1680746989

Cubaynes, S., Brandell, E. E., Stahler, D. R., Smith, D. W., Almberg, E. S., Schindler, S., Wayne, R. K., Dobson, A. P., VonHoldt, B. M., MacNulty, D. R., Cross, P. C., Hudson, P. J. & Coulson, T. 2022. Disease outbreaks select for mate choice and coat color in wolves. *Science*, 378, 300–303. DOI: 10.1126/science.abi8745

Données DDT(M)-DREAL Auvergne Rhône Alpes. 2019. Données sur les dommages: comparatif 2017–2018–2019. http://www.auvergne-rhone-alpes.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/20200327_donnees_dommages_2019.pdf

Donfrancesco, V., Ciucci, P., Salvatori, V., Benson, D., Andersen, L.W., Bassi, E., Blanco, J.C., Boitani, L., Caniglia, R., Canu, A., Capitani, C., Chapron, G., Czarnomska, S.D., Fabbri, E., Galaverni, M., Galov, A., Gimenez, O., Godinho, R., Greco, C., Hindrikson, M., Huber, D., Hulva, P., Jedrzejewski, W., Kusak, J., Linnell, J. D. C., Llaneza, L., Lopez-Bao, J. V., Mänill, P., Marucco, F., Mattioli, L., Milanesi, P., Milleret, C., Myslajek, R. W., Ordiz, A., Palacios, V., Pedersen, H. C., Pertoldi, C., Pilot, M., Randi, E., Rodriguez, A., Saarma, U., Sand, H., Scandura, M., Stronen, A. V., Tsingarska, E. & Mukherjee, N. 2019. Unravelling the scientific debate on how to address Wolf-Dog hybridization in Europe. *Front. Ecol. Evol.*, 7, 175. doi: 10.3389/fevo.2019.00175.

Duchamp, C. & Queney G. 2018. Le suivi génétique des loups en 2018. Bilan de la 1ère année de mise en œuvre du nouveau marché public. 1–19. https://www.loupfrance.fr/wp-content/uploads/LE-SUIVI-GENETIQUE-DES-LOUPS-EN-2018_201903.pdf

Fabri, E., Miquel, C., Lucchini, V., Santini,A., Caniglia, R., Duchamps, C., Weber, J-M., Lequette, B., Marucco, F., Boitani, L., Fumagalli, L., Taberlet, P. & Randi, E. 2007. From the Apennines to the Alps: colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Molecular Ecology*, 16, 1661–1671.

Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K. 2003. Inference of population structureusing multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567–1587.

Francisco, L. V., Langston, A. A., Mellersh, C. S., Neal, C. L. & Ostrander, E. A. 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, 7 (5), 359–362.

Galaverni, M., Caniglia, R., Pagani, L., Fabbri, E., Boattini, A. & Randi, E. 2017. Disentangling timing admixture, patterns of introgression, and phenotypic indicators in a hybridizing wolf population. *Mol. Biol. Evol.*, **34** (9), 2324–2339.

Gibson, P. S., Bangs, E. E., Bailey, T. N., Boyd, D. K., Cluff, H. D., Smith, D. W. & Jiminez, M. D., 2002. Color patterns among wolves in Western North America. *Wildlife Bulletin Society*, **30** (3), 821–830.

Godinho, R., Llaneza, L., Blanco, J. C., Lopes, S., Álvares, F., García, E. J., Palacios, V., Cortés, Y., Telegon, J. & Ferrand, N. 2011. Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Mol. Ecol.* 20, 5154–5166. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05345.x

Godinho, R., López-Bao, J. V., Castro, D., Llaneza, L., Lopes, S., Silva, P. & Ferrand, N. 2015. Real-time assessment of hybridization between wolves and dogs: combining noninvasive samples with ancestry informative markers. *Molecular ecology resources*, **15** (2), 317–328.

Harmoinen, J., von Thaden, A., Aspi, J., Kvist, L., Cocchiararo, B., Jarausch, A., Gazzola, A., Sin, T., Lohi, H., Hytonen, M. K., Kojola, I., Vik Stronen, A., Caniglia, R., Mattucci, F., Galaverni, M., Godinho, R., Ruiz-Gonzalez, A., Randi, E., Munoz-Fuentes, V. & Nowak, C. 2021. Reliable wolf-dog hybrid detection in Europe using a reduced SNP panel developed for non-invasively collected samples. *BMC Genomics*, 22, 473.

Hedrick, P. W., Stahler, D. R. & Dekker, D. 2014. Heterozygote advantage in a finite population: black color in wolves. *Journal of heredity*, **105** (4), 457–465.

Ji, H., Kim, E. H., Lee, K. K., Kang, T. Y., Lee, J. M., Shin, H. D., & Kim, L. H. 2007. Beagle dogs parentage testing by using 22 ISAG microsatellite markers. *Korean Journal of Veterinary Research*, **47** (4), 457–460.

Karanth, K. U., Nichols, J. D., Kumar, N. S. & Hines, J. E. 2006. Assessing tiger population dynamics using photographic capture-recapture sampling. *Ecology*, 87, 2925–2937. doi :10.1890/0012-9658(2006)87[2925 :ATPDUP]2.0.CO ;2

Krammer, M. 2016. Le Daim européen. *Biotope, Mèze*, 210–211.

Kusak, J., Fabbri, E., Galov, A., Gomerčić, T., Arbanasić, H., Caniglia, R., Galaverni M., Reljic, S., Huber, D. & Randi, E. 2018. Wolf-dog hybridization in Croatia. *Vet. Arh.*, 88, 375–395. doi: 10.24099/vet.arhiv.170314

Mattioli, L., Canu, A., Passilongo, D., Scandura, M. & Apollonio, M. 2018. Estimation of pack density in grey wolf (*Canis lupus)* by applying spatial explicit capture-recapture models to camera trap data supported by genetic monitoring. *Frot Zool*, 15, 38. Doi:10.1186/s12983-018-0281-x

Miquel, C., Bellemain, E., Poillot, C., Bessière, J., Durand, A. & Taberlet, P. 2006. Quality indexes to assess the reliability of genotypes in studies using noninvasive sampling and multiple-tube approach. *Molecular Ecology Notes*, 6, 985–988.

Neff, M. W., Broman, K. W., Mellersh, C. S., Ray, K., Acland, G. M., Aguirre, G. D., Ziegle, J. S., Ostrander, E. A. & Rine, J. 1999. A second-generation genetic linkage map of the domestic dog, Canis familiaris. *Genetics*, **151** (2), 803–820.

OFB. 2021. Flash n°14. Flash données génétiques. https://www.loupfrance.fr/wp-content/uploads/FLASH_DONNEES_GENETIQUES_2021.pdf

ONCFS. 2016. Observations de loups noirs : des informations un peu obscures ! Bulletin du Réseau Loup n°34. https://www.loupfrance.fr/pdf/Bulletin-Reseau-Loup-2016-N34_loup.noir;fiabilite;hybridation.pdf

ONCFS. 2018. Hybridation de la population de loups en France : l'ONCFS assume les méthodes avec lesquelles il travaille. Communiqué de presse. https://www.loupfrance.fr/wp-content/uploads/Communiqué-de-presse-03-07-2018-Hybridation-de-la-population-de-loups-en-France-l'ONCFS-assume-les-méthodes-avec-lesquelles-il-travaille.pdf

ONCFS. 2019. Rapport d'expertise. https://www.loupfrance.fr/wp-content/uploads/expertise-_Genet_D0619010_def.pdf

ONCFS. 2020. Rapport d'expertise. https://www.loupfrance.fr/wp-content/uploads/Rapport-expertise-génétique-OFB-dépouille-Montmeyran-8.08.2019.pdf

Ostrander, E. A., Sprague, G. F. & Rine, J. 1993. Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA) n markers for genetic mapping in dog. *Genomics*, 16, 207–213.

Peillon, A. & Carbone, G. 1993. Bienvenue aux loups. *Terre Sauvage*, 73, 23–43.

Pilot, M., Greco, C., VonHoldt, B. M., Randi E., Jedrzejewski, W., Sidorovich, V. E., Konopinski, M. K., Ostrander, E. A. & Wayne, R. K. 2018. Widespread, long-term admixture between grey wolves and domestic dogs across Eurasia and its implications for the conservation status of hybrids. *Evolutionary applications*, 11, 662–680.

Pilot, M., Branicki, W., Jedrzejewski, W., Goszczynski, J., Jedrzejewska, B., Dykyv, I., Shkvyrya, M. & Tsingarska, E. 2010. Phylogeographic history of the grey wolves in Europe. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 104, 1–11.

Poulard, F., Dietrich, R., Nasi, N. & Roda, F. 2021. Suivi d'une meute de loups au Coeur de la Provenceà l'aide d'un chien de detection et de pièges photographiques: predation, utilization de l'espace, et comportement de marquage par les loups en function des saisons. *Faune PACA Publication*, 108, 1–27 + Annexes.

Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.

Randi, E., Hulva, P., Fabbri, E., Galaverni, M., Galov, A., Kusak, J., Bigi, D., Bolfikova, B. C·, Smetanova, M. & Caniglia, R. 2014. Multilocus detection of wolf × dog hybridization in italy, and guidelines for marker selection. *PLoS One* 9:e86409.

Rapport CGEDD/CGAAER. 2019. Rapport CGEDD n°012414-P, CGAAER n°18097. Le loup et les activités d'élevage: comparaison européenne dans le cadre du plan national d'action 2018/2023. https://www.vie-publique.fr/sites/default/files/rapport/pdf/271785.pdf

Reportage France 3, 2017. Reportage France 3 des publications des résultats des analyses AND de loups. https://www.youtube.com/watch?v=CRGF1L2BlIg

Roda, F. 2016. Le Cerf élaphe. *In: LPO PACA, GECEM & GCP. Les mammifères de Provence-Alpes-Côte d'Azur. Biotope, Mèze*, 206–207.

Roda, F., Sentilles, J., Molins, C., Duchamp, C., Hansen, É. & Jean, N., 2021. Wolf scat detection dog improves wolf genetic monitoring in new French colonized areas. *Journal of Vertebrate Biology*, **69** (3).

Roda, F., Poulard, F., Ayache, G., Nasi, N., D'Antuoni, C., Mathieu, R. & Cheylan, G. 2022. How do seasonal changes in adult wolf defecation patterns affect scat detection probabilities. *Journal of Vertebrate Biology*, **71** (22043), 22043. 1–12.

Roda, F. & Roda, J. M., 2024. Signs of foraging by wild boar as an indicator to monitor wild boar impact on ground nesting birds. *Journal of vertebrate Biology*, **73** (23103), 1–16.

Sénat, 2017. Question écrite n°02075 de mme Martine Berthet (Savoie–Les Républicains). *Journal Officiel du Sénat du* 16/11/2017. 3558. https://www.senat.fr/questions/base/2017/qSEQ171102075.html

Valière, N., Fumagalli, L., Gielly, L., Miquel, C., Lequette, B., Poulle, M. L., Weber, J. M., Arlettaz, R. & Taberlet, P. 2003. Long-distance wolf recolonization of France and Switerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years. *Animal conservation*, 6, 83–92.

Vik Stronen, A., Aspi, J., Caniglia, R., Fabbri, E., Galaverni, M., Godinho, R., Kvist, L., Mattucci, F., Nowak, C., von Thaden, A. & Harmoinen, J. 2022. Wolf-dog admixture highlights the need for methodological standards and multidisciplinary cooperation for effective governance of wild x domestic hybrids. *Biological Conservation*, 266, 109467.

Vilà, C., Walker, C., Sundqvist, A.-K., Flagstad, Ø., Andersone, Z., Casulli, A., Casulli A., Valdmann H., Halverson, J. & Hellegren H. 2003. Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf–dog hybrids. *Heredity*, 90, 17–24. doi: 10.1038/sj.hdy.6800175

VonHoldt, B. M., Pollinger, J. P., Earl, D. A., Parker, H. G., Ostrander, E. A. & Wayne, R. K. 2013. Identification of recent hybridization between gray wolves and domesticated dogs by SNP genotyping. *Mamm Genome*, 24, 80–88.