Données génomiques complètes pour étudier les modèles d'introgression récents et historiques chez les chiens dans les loups Italiens

Ecology and Evolution WILEY

Ecology and Evolution Open Access

RESEARCH ARTICLE OPEN ACCESS

Whole-Genome Data to Investigate Recent and Historical Dog Introgression Patterns in Italian Wolves

D. Battilani[1,2,3,4] | J. Ramos Madrigal[4] | L. M. Hennelly[4,5,6] | S. Gopalakrishnan[4] | C. Vernesi[7] | F. Mattucci[3] | E. Fabbri[3] | P. Ciucci[2] | R. Caniglia[3]

[1]Research and Innovation Centre, Fondazione Edmund Mach, San Michele All'adige, Italy | [2]Department of Biology and Biotechnologies "Charles Darwin", Università di Roma La Sapienza, Roma, Italy | [3]Area per la Genetica Della Conservazione, ISPRA, Ozzano dell'Emilia, Italy | [4]Center for Evolutionary Hologenomics, The Globe Institute, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark | [5]Department of Biosciences, Rice University, Houston, Texas, USA | [6]Center for Conservation Genomics, Smithsonian's National zoo and Conservation Biology Institute, Washington, DC, USA | [7]Institute of Biosciensces and Bioresources, Consiglio Nazionale Delle Ricerche, Sesto Fiorentino, Italy

Correspondence: D. Battilani (daniele.battilani@fmach.it)

Received: 28 October 2025 | **Accepted:** 1 November 2025

E. Fabbri, P. Ciucci, and R. Caniglia are co-last author.

Résumé

L'introgression résultant de l'hybridation anthropique peut façonner les traits phénotypiques des espèces sauvages, modifiant potentiellement l'écologie des espèces et les interactions entre les humains et la faune sauvage. Cela est particulièrement pertinent dans le cas des grands carnivores tels que les loups gris (*Canis lupus*) qui s'étendent dans des paysages dominés par l'homme. Un exemple notable est celui du loup Italien (*C. L. italicus*) qui, après s'être remis d'une quasi-extinction, est aujourd'hui confronté à des niveaux élevés d'hybridation locale avec le chien domestique (*C. L. familiaris*). Bien que l'hybridation entre le loup et le chien soit connue pour affecter la morphologie, son effet sur d'autres traits phénotypiques reste peu étudié. Nous avons analysé les **données génomiques complètes** de loups et de chiens répartis dans le monde entier afin d'évaluer l'étendue et le **moment** de l'ascendance canine dans un échantillon de 17 loups Italiens, et d'étudier l'introgression canine dans les gènes liés au comportement. Cinq loups Italiens, présentant des niveaux variables d'ascendance canine à l'échelle du génome (1% à 20%), ont été estimés comme résultant d'événements de métissage, survenus au moins 3 à 7 générations avant l'échantillonnage (2005-2012). Aucune surreprésentation d'introgressions canines récentes dans les gènes liés au comportement des loups Italiens métissés n'a été détectée. **Cependant**, nous avons identifié des signes d'introgression historique de chiens sous sélection putative, impliquant des gènes liés à la plasticité neuronale, au développement des photorécepteurs et aux réponses immunitaires. L'une de ces **introgressions** s'est probablement produite il y a environ 4 500 ans, pendant l'âge du bronze, et l'autre il y a environ 1 000 ans, pendant le Moyen Âge, ce qui suggère que le métissage historique pourrait avoir façonné les trajectoires évolutives du loup Italien. Bien que préliminaires et nécessitant des analyses supplémentaires,

nos résultats soulignent le potentiel de persistance des effets phénotypiques de l'hybridation entre loups et chiens à travers les générations, montrant que même une ascendance non indigène limitée peut laisser des empreintes génomiques significatives dans les populations sauvages.

Mots-clés : moment du métissage, hybridation anthropique, gènes liés au comportement, *Canis lupus italicus*, introgression canine, sélection

1. INTRODUCTION

L'hybridation peut jouer un rôle central dans le façonnement des processus évolutifs (Todesco et al. 2016 ; Taylor et Larson 2019 ; Moran et al. 2021 ; Porretta et Canestrelli 2023). Alors que l'hybridation naturelle se déroule généralement sur des échelles de temps évolutives prolongées, l'hybridation anthropique, induite par les changements provoqués par l'homme, peut se produire rapidement (McFarlane et Pemberton 2019 ; Ottenburghs 2021). **L'hybridation anthropique** peut entraîner un « envahissement génétique », où l'introgression d'ancêtres non indigènes compromet le patrimoine génétique des populations sauvages (Howard-McCombe et al. 2023 ; Nussberger et al. 2023), ou parfois une **introgression adaptative**, susceptible d'améliorer la condition physique grâce à l'acquisition d'allèles bénéfiques (Mary et al. 2022 ; Fabbri et al. 2023 ; Münger et al. 2024). En fin de compte, l'hybridation anthropique peut modifier les trajectoires évolutives des espèces, ce qui nécessite des mesures de conservation et de gestion (Allendorf et al. 2001 ; Bohling 2016 ; Quilodrán et al. 2020).

Un exemple notable d'hybridation anthropique concerne le loup gris (*Canis lupus*) et son homologue domestique, le chien (*Canis lupus familiaris*). Domestiqué il y a plus de 30 000 ans (vonHoldt et al. 2010 ; Thalmann et al. 2013 ; Bergström et al. 2022), les chiens ont d'abord été sélectionnés pour leurs aptitudes à aider les humains dans leurs tâches (chasse, garde de troupeaux, surveillance, etc.) (Coppinger et Coppinger 2002), puis, à partir de l'époque victorienne, pour leur esthétique et leur capacité à tenir compagnie (Olmert 2018). Les chiens et les loups peuvent se croiser, et leurs hybrides fertiles peuvent se rétrocroiser avec les deux lignées parentales, ce qui permet l'introgression de l'ascendance canine (c'est-à-dire l'introgression canine) dans les populations de loups (Vilà et Wayne 1999). Si des cas historiques d'hybridation entre loups et chiens (c'est-à-dire WDH) se sont probablement produits au cours des millénaires (Ciucani et al. 2023 ; Lobo et al. 2023), des cas récents de WDH ont été détectés génétiquement depuis la fin du XXème siècle (Vilà et Wayne 1999) dans plusieurs populations de loups Européens, ce qui soulève des préoccupations en matière de conservation (Hindrikson et al. 2017 ; Salvatori et al. 2020).

En Europe, l'Italie est depuis longtemps reconnue comme un point chaud de WDH (Boitani 1983 ; Boitani et Ciucci 1993 ; Ciucci et Boitani 1998). Le loup Italien (*Canis lupus italicus*) était au bord de l'extinction à la fin des années 1960, mais il a ensuite connu un rétablissement naturel (Zimen et Boitani 1975 ; Gervasi et al. 2024). **Cependant**, les séquelles du goulot d'étranglement, telles que la faible diversité génétique, les niveaux élevés de consanguinité et une charge génétique importante, pourraient encore affecter la survie à long terme de cette population (Battilani et al. 2024). Cet état génomique vulnérable, associé à l'absence de mesures de gestion proactives, à la présence généralisée de chiens en liberté et à des niveaux de braconnage toujours élevés, augmente le risque de WDH pour les loups Italiens. **En effet**, des études génétiques intensives non invasives ont révélé des proportions alarmantes de

WDH à l'échelle locale (Salvatori et al. 2019 ; Santostasi et al. 2021), ce qui soulève de nouvelles inquiétudes quant à l'impact potentiel de l'introgression canine. Cela est particulièrement pertinent compte tenu de l'expansion récente des loups dans les environnements semi-urbains et urbains, où des comportements modifiés pourraient affecter les interactions des loups avec leurs proies ou envers les humains, ainsi que les relations au sein des meutes (Zanni et al. 2023 ; Fardone et al. 2025 ; Di Bernardi et al. 2025). **Par conséquent**, comprendre si l'introgression canine pourrait avoir un impact sur des traits comportementaux tels que **l'audace**, la **prise de risque** ou la **tolérance sociale** n'est pas seulement une question d'évolution, mais aussi une priorité en matière de conservation et de gestion.

L'utilisation de **marqueurs génétiques** traditionnels s'est avérée efficace pour identifier les hybrides récents à travers l'Europe (Caniglia et al. 2013 ; Harmoinen et al. 2021 ; Stronen et al. 2022). **Ensuite**, le développement de puces SNP diagnostiques comprenant des milliers de marqueurs a permis d'obtenir une meilleure résolution quant à la pertinence de l'introgression canine (Galaverni et al. 2017 ; Pilot et al. 2018 ; Lobo et al. 2023). **En effet**, Galaverni et al. (2017) ont découvert que les loups Italiens **métissés** portaient plusieurs régions génomiques présentant un excès significatif d'ascendance canine, probablement résultant d'événements d'introgression survenus il y a jusqu'à **20 générations**. **Cependant**, comme cette étude s'appuyait sur une puce SNP ne couvrant qu'un sous-ensemble du génome et principalement conçue à partir de variations canines connues, sa résolution était peut-être limitée pour dater avec précision les événements d'introgression ou détecter des processus évolutifs plus complexes, tels que la sélection sur des régions génomiques spécifiques. Les données de séquençage du génome complet offrent une résolution plus élevée, nécessaire pour étudier la dynamique temporelle et fonctionnelle de l'introgression canine à une échelle fine. Cela est extrêmement important dans le contexte du WDH, car si l'introgression récente (probablement survenue au cours des dernières générations) a une pertinence pour la gestion actuelle, il est essentiel de comprendre l'introgression historique pour clarifier son rôle dans l'influence des trajectoires évolutives des populations locales de loups (Sarabia et al. 2025 ; Lobo et al. 2025).

La disponibilité de génomes de référence canins bien annotés permet de mieux comprendre les conséquences du WDH sur des traits phénotypiques particuliers (Lindblad-Toh et al. 2005 ; Wang et al. 2021 ; Hörtenhuber et al. 2024). Ces ressources ont déjà été utilisées pour établir un lien entre des mutations spécifiques et des traits morphologiques, physiologiques et liés à des maladies chez les chiens, dont certains pourraient faire l'objet d'une introgression chez les loups (Candille et al. 2007 ; Plassais et al. 2019 ; Dutrow et al. 2022).

Par exemple, plusieurs traits morphologiques observés chez les loups pourraient indiquer une WDH, tels que le mélanisme et les ergots (Ciucci et al. 2003 ; Caniglia et al. 2013 ; Galaverni et al. 2017), mais ces phénotypes ne reflètent pas nécessairement des introgressions récentes, comme le montre le mélanisme chez les loups d'Amérique du Nord, qui remonte à d'anciens événements d'introgression canine (Schweizer et al. 2018). **De plus**, les génomes canins annotés et les recherches croissantes sur la génétique comportementale canine peuvent offrir un cadre pour explorer les conséquences potentielles de l'introgression canine sur les comportements des loups sauvages (Kis et al. 2014 ; vonHoldt et al. 2017 ; MacLean et al. 2019 ; Shan et al. 2021 ; Tonoike et al. 2022 ; Morrill et al. 2022 ; Dutrow et al. 2022).

Plusieurs gènes ont été associés à des traits comportementaux spécifiques chez les chiens, notamment la sociabilité (von Holdt et al. 2017) et les comportements liés au gardiennage de troupeaux (Dutrow et al. 2022 ; Jeong et al. 2025). Il convient de noter que certaines variantes spécifiques aux chiens associées au comportement ont également été identifiées comme introgressées et soumises à une sélection dans la population de loups Ibériques (Sarabia et al. 2025 ; Lobo et al. 2025). Bien que tous les gènes annotés ne soient pas directement liés au comportement, les annotations fonctionnelles liées aux processus métaboliques et physiologiques (Peel et al. 2022 ; Park et al. 2023 ; Ma et al. 2025) peuvent offrir des informations précieuses sur les conséquences écologiques et comportementales potentielles de l'introgression canine dans les populations de loups sauvages.

Dans cette étude, nous avons analysé un total de 17 génomes complets de loups Italiens, dont 14 avaient déjà été publiés (Fan et al. 2016 ; Battilani et al. 2024) et trois, présentant des traits morphologiques atypiques potentiellement indicatifs d'un WDH, ont été séquencés pour la première fois. Nous avons **fusionné** ces génomes avec plus de 100 génomes de loups répartis dans le monde entier et près de 300 génomes de chiens, établissant ainsi un ensemble de données sur les canidés bien représentatif des ancêtres sauvages et domestiques. À l'aide de plusieurs approches de reconstruction génomique et locale de l'ascendance, nous nous sommes concentrés sur la population de loups Italiens afin de : (**i**) quantifier l'étendue de l'ascendance canine, (**ii**) déterminer si l'ascendance canine chez les loups métissés était plus élevée que prévu dans les gènes liés au comportement, (**iii**) identifier les introgressions canines historiques possibles et vérifier si celles-ci pourraient faire l'objet d'une sélection putative.

2. MATERIEL et METHODES

2.1. Ensemble de données génomiques sur les canidés

Des échantillons de tissus ont été prélevés sur trois loups péninsulaires Italiens (*Canis lupus italicus*) trouvés morts dans le nord (2005-2008) et le centre (2012) des Apennins. Tous présentaient des traits morphologiques atypiques pouvant indiquer une WDH : deux étaient mélaniques (W893 et W1023), et donc porteurs du locus *K* dérivé du chien (Candille et al. 2007 ; Anderson et al. 2009), ce que nous avons confirmé à l'aide du protocole analytique développé par Caniglia et al. (2013) ; le troisième (W1456) présentait une griffe accessoire, c'est-à-dire un cinquième doigt désarticulé dans les pattes arrière), un autre trait dérivé du chien associé au WDH (Ciucci et al. 2003 ; Galaverni et al. 2017). Les protocoles de stockage des échantillons, d'extraction d'ADN, de préparation des bibliothèques et de séquençage du génome entier ont suivi ceux de Battilani et al. (2024). Les 14 génomes de loups Italiens publiés précédemment appartenaient à des loups prélevés dans les Apennins centraux (n = 13) et méridionaux (n = 1) (Fan et al. 2016 ; Battilani et al. 2024). Quatre d'entre eux avaient déjà été signalés comme étant mélangés à des chiens sur la base d'analyses individuelles de la proportion d'ascendance à l'échelle du génome (Battilani et al. 2024). **De plus**, nous avons utilisé les données génomiques des bases de données publiques ENA et NCBI GenBank afin d'inclure des loups provenant de l'ensemble de l'aire de répartition de leur espèce, ainsi qu'un large ensemble de génomes de chiens appartenant à des races de taille moyenne à grande susceptibles de se croiser avec des loups sauvages. Nous avons ainsi garanti une large représentation des ancêtres canins et lupins, ce qui était essentiel pour identifier des individus de référence fiables grâce à des analyses génomiques et pour les analyses ultérieures d'inférence de l'ascendance locale. Notre ensemble de données final comprenait 130 loups

gris (*Canis lupus*) (17 provenant d'Italie, 35 d'autres pays Européens, 30 d'Asie et 48 d'Amérique du Nord), 282 chiens domestiques modernes (*Canis lupus familiaris*) (représentant 98 races différentes) et un coyote (*Canis latrans*) utilisé comme groupe externe (Tableau S1).

2.2. Contrôle qualité, attribution et traitement des génotypes

Nous avons appliqué une procédure de contrôle qualité aux lectures de séquençage, en utilisant FastQC (Andrews 2010) pour vérifier d'éventuels problèmes tels que des scores de qualité faibles et une teneur en GC anormale, et nous avons utilisé multiOC Ewels et al. 2016) pour les visualiser. Les lectures ont été mappées sur le génome de référence du chien (Can Fam3.1 ; Lindblad-To et al. 2005) à l'aide du pipeline automatisé PALEOMIX BAM (Schubert et al. 2014), en utilisant l'algorithme BWA « mem » recommandé pour les échantillons modernes (Li et Durbin 2009), et en fixant la qualité minimale de mappage à 0 afin de conserver toutes les lectures à cette étape. Nous avons ensuite utilisé SAMtools (Danecek et al. 2021) pour supprimer les lectures d'alignement non primaires (samtools view - F 256). Nous avons utilisé GATK v 4.3.0.0 et nous nous sommes référés au GATK Best Practice Workflow pour appeler des génotypes de haute qualité (Van Der Auwera et al. 2013). Suivant Battilani et al. (2024), nous avons appliqué les deux mêmes outils GATK supplémentaires pour le « filtrage dur » de nos génotypes, puis nous avons utilisé VCFtools (Danecek et al. 2011) pour le « filtrage doux » de nos génotypes. Nous avons appliqué ces filtres GATK et VCFtools à différents ensembles de données en fonction des hypothèses des analyses en aval, les filtres pour chaque analyse étant indiqués dans le tableau S2. De plus, nous avons utilisé NgsRelate2 pour identifier et finalement supprimer les individus étroitement apparentés (Hanghøj et al. 2019) en appliquant des seuils de parenté KING-robuste $\geq 0{,}20$, RO $< 0{,}1$ et R1 $\geq 0{,}5$ (Waples et al. 2019). Toutes les analyses en aval ont été effectuées sur les autosomes.

2.3. Analyses d'inférence génomique de l'ascendance

Nous avons exploré les modèles de différenciation génétique entre les échantillons à l'aide de l'analyse en composantes principales (ACP) mise en œuvre dans PLINK v 1.90b6.21 (Chang et al. 2015). Pour estimer les proportions de mélange individuelles, nous avons utilisé une approche de vraisemblance maximale dans ADMIXTURE v 1.3.0 (Alexander et al. 2009), qui teste un nombre donné d'ascendances (K) pour chaque individu. Nous avons effectué trois analyses ADMIXTURE séquentielles. Lors de la première analyse, nous avons utilisé l'ensemble complet des données et testé des valeurs K comprises entre 2 et 10 afin de distinguer les loups métissés (c'est-à-dire les individus auxquels a été attribuée une proportion quelconque d'ascendance canine au meilleur K), les loups non métissés (c'est-à-dire ceux auxquels aucune ascendance canine n'a été attribuée) et les chiens non métissés (c'est-à-dire ceux auxquels aucune ascendance canine n'a été attribuée). Lors de la deuxième analyse, nous avons inclus tous les loups Italiens et un représentant non croisé par race canine, en testant $K = 2$. Cela nous a permis de valider le statut ancestral des loups Italiens et d'identifier un panel réduit et équilibré de chiens non croisés pouvant servir de référence. Lors de la troisième analyse, nous avons inclus tous les loups Européens non croisés et le même ensemble de chiens que lors de la deuxième analyse, en testant à nouveau $K = 2$. Cette analyse a été utilisée à la fois pour valider les loups européens non métissés et pour confirmer davantage le statut des références canines. Pour les loups Italiens métissés détectés dans nos analyses ADMIXTURE, nous avons estimé à quelle génération remontait le métissage, allant de F1 à backcross 3 (BC3w), à l'aide de la version GUI d'apoh (Garcia-Erill et al. 2023).

Afin d'évaluer l'introgression génomique entre les loups et les chiens, nous avons testé le partage excessif d'allèles dérivés à l'aide de statistiques D, telles qu'implémentées dans « qpDstat » de ADMIXTOOLS2 5.1 (Durand et al. 2011 ; Maier et al. 2023). Nous avons testé **deux** topologies différentes sous la forme (((P1, P2), P3), P4) : (**i**) le flux génétique entre chaque loup Italien (X) et chaque chien non mélangé par rapport aux loups Italiens non mélangés (NWIT), en utilisant *Canis latrans* comme groupe externe (OUT) (X, NWIT, DOG, OUT) pour tester l'introgression canine au sein de chaque loup Italien par rapport aux autres loups italiens non mélangés ; (**ii**) le flux génétique entre chaque loup Européen non mélangé (X) et chien non mélangé par rapport à tous les autres loups Européens non mélangés (WEU) (X, WEU, DOG, OUT) afin de tester l'introgression canine chez les loups européens non mélangés. L'individu focal (X) a toujours été exclu de P2 afin d'éviter toute circularité dans les analyses. Nous avons choisi d'utiliser le coyote comme groupe externe, car aucun flux génétique actuel ni aucune introgression passée n'ont été détectés entre les loups d'Eurasie occidentale et le coyote (Bergström et al. 2022). Un score D-statistique négatif indique un flux génétique entre P2 et P3, et/ou P1 et P4, tandis qu'un score D-statistique positif indique un flux génétique entre P1 et P3, et/ou P2 et P4. Les erreurs types et les scores z ont été obtenus par la méthode block-jackknife, selon Durand et al. (2011) et Patterson et al. (2012), et un score $z > 3$ a été considéré comme la preuve d'un flux génétique significatif (Durand et al. 2011).

2.4. Analyses d'inférence de l'ascendance locale

Afin d'identifier les régions d'ascendance canine dans les génomes des loups Italiens, nous avons appliqué admixfrog (Peter 2020) en utilisant une taille de bin de 10 kb. Les populations sources représentant les populations de chiens et de loups non mélangées ont été définies sur la base d'analyses d'inférence de l'ascendance à l'échelle du génome. Nous avons testé deux scénarios. **Tout d'abord**, pour évaluer l'introgression récente (c'est-à-dire les événements d'hybridation survenus au cours des 6-7 dernières générations, représentés ici par les loups italiens mélangés obtenus au paragraphe 2.3), nous avons testé chaque loup italien individuel en utilisant tous les autres loups Italiens non mélangés et les chiens non mélangés comme populations sources. **Deuxièmement**, pour évaluer l'introgression historique (c'est-à-dire les événements d'hybridation plus anciens survenus avant « l'introgression récente »), nous avons utilisé chaque loup Italien (c'est-à-dire croisé et non croisé) et chaque loup Européen non croisé en utilisant tous les autres loups Italiens non croisés, loups Européens non croisés et chiens non croisés comme populations sources. Nous avons conservé les attributions de classes avec une probabilité a posteriori > 0,9 pour les états homozygotes (ici WOLF et DOG) et hétérozygotes (ici DOGWOLF), en reconstruisant les profils d'ascendance locale pour chaque individu. Afin de réduire les faux positifs et de nous concentrer sur les introgressions historiques candidates susceptibles d'avoir été maintenues dans la population de loups italiens, nous n'avons conservé que les 10% supérieurs des régions canines (DOG et DOGWOLF) partagées entre les loups Italiens dans le deuxième scénario, mais absentes chez les loups européens non métissés, et donc potentiellement exclusives à la population péninsulaire. Ce seuil statistique conservateur a été choisi pour valider les introgressions cohérentes dans l'ensemble de la population, tout en excluant les signaux rares ou spécifiques à certains individus qui pourraient résulter d'une recombinaison stochastique ou d'un métissage récent.

Pour nos introgressions historiques candidates de chiens, nous avons effectué des analyses supplémentaires à l'aide de statistiques D locales et F_{st} afin de mieux valider l'ascendance canine. Tout d'abord, nous avons phasé les haplotypes à l'aide de SHAPEIT2 (Delaneau et al. 2008), en tirant parti de la carte de recombinaison canine de (Auton et al. 2013) et en fixant une taille de fenêtre de 0,5 Mb. Nous avons ensuite utilisé Dsuite (Malinsky et al. 2021) pour estimer les statistiques D locales à l'aide d'une approche de balayage de fenêtre (taille de la fenêtre = 100 kb ; taille du pas = 10 kb), en conservant les régions dans le premier centile pour les statistiques df et f_{dM}, en utilisant des loups et des chiens Européens non mélangés comme populations sources. Nous avons ensuite estimé F_{st} à l'aide de VCFtools (Danecek et al. 2011) en utilisant une approche de balayage de fenêtre (taille de fenêtre = 100 kb ; taille de pas = 10 kb). Nous avons validé les régions où tous les loups italiens présentaient un F_{st} nettement inférieur à celui des chiens par rapport aux loups Européens non métissés, en ne conservant que celles qui se situaient dans le 1% inférieur des différences à l'échelle du chromosome. Nous n'avons pas appliqué le filtrage des régions partagées, les statistiques d'introgression locale et les analyses F_{st} aux introgressions récentes candidates du premier scénario, en raison de la puissance statistique limitée fournie par le nombre réduit d'individus métissés.

2.5. Évaluation et brassage des gènes liés au comportement

Nous avons développé une approche exploratoire et ciblée pour évaluer si les loups Italiens métissés présentaient une sous-représentation ou une surreprésentation de l'ascendance canine dans les gènes liés au comportement. Afin de définir les gènes candidats, nous avons effectué une recherche bibliographique des études rapportant des associations génétiques avec des traits comportementaux chez les canidés (Tableau S3). Ces associations étant largement basées sur des études portant sur les chiens domestiques, cet ensemble de gènes doit être considéré comme une référence provisoire plutôt que comme un catalogue définitif des loci comportementaux des loups. Nous avons ensuite utilisé VCFtools (Danecek et al. 2011) pour estimer le F_{st} par SNP afin de détecter les gènes liés au comportement qui contenaient des SNPs fortement différenciés (c'est-à-dire au moins un SNP avec $F_{st} > 0,95$) entre les loups italiens non métissés et les chiens non métissés. Pour générer une distribution nulle, nous avons utilisé la fonction « shuffle » (n = 1000 répétitions) de bedtools (Quinlan et Hall 2010). Cette méthode consistait à mélanger aléatoirement les régions génomiques correspondant à la taille (en pb) des gènes liés au comportement contenant des SNPs hautement différenciés.

Nous avons appliqué la fonction « intersect » de bedtools (Quinlan et Hall 2010) pour croiser chaque mélange aléatoire et les gènes fortement différenciés liés au comportement avec le résultat de l'inférence de l'ascendance locale issu du premier scénario testé des « analyses d'intersection de l'ascendance locale ». Dans ce contexte, nous avons pris en compte toutes les régions attribuées à DOG et DOGWOLF, car notre objectif était de rendre compte de la proportion totale d'ascendance canine chez les loups italiens métissés. **Enfin**, nous avons calculé la proportion d'ascendance canine dans les shuffles et les gènes hautement différenciés, en les regroupant en 100 intervalles d'ascendance canine croissante afin de tracer une distribution normale pour les loups italiens métissés, avec le nombre de shuffles par intervalle sur l'axe « y ».

2.6. Signatures de sélection chez les loups Italiens

Nous avons évalué les signatures de sélection lors des introgressions historiques de chiens identifiées chez les loups italiens (c'est-à-dire métissés et non métissés). **Tout d'abord**, nous avons calculé le D de Tajima (Tajima 1989) dans des fenêtres non chevauchantes de 50 kb à l'aide du logiciel VCFtools (Danecek et al. 2011), et les introgressions canines ont été identifiées comme des valeurs aberrantes statistiques dans le premier centile des valeurs à l'échelle du chromosome. Dans le contexte de la sélection, les valeurs positives de Tajima's D suggèrent une sélection équilibrée, tandis que les valeurs négatives peuvent indiquer une sélection positive. Ensuite, nous avons visualisé les haplotypes autour des régions aberrantes de Tajima D, en nous attendant à une hétérozygotie sous sélection équilibrée ou à une homozygotie sous sélection positive. Afin d'explorer plus en détail les signes de sélection équilibrée, nous avons estimé les statistiques de déviation non centrale (NCD) qui détectent les déviations des fréquences alléliques par rapport à la neutralité et permettent d'identifier les régions génomiques où plusieurs allèles peuvent être maintenus (Bitarello et al. 2018). Nous avons notamment calculé les statistiques NCD2 afin de cibler la sélection équilibrée à long terme sur les introgressions historiques de chiens à l'aide du package « baselsr » (Bitarello et al. 2018) dans des fenêtres de 50 kb et en détectant les valeurs aberrantes du premier centile le long du chromosome. Afin d'explorer plus en détail les signes de sélection positive, nous avons estimé le score haplotype intégré (iHS), une mesure de l'homozygotie haplotype étendue (EHH) qui compare les allèles ancestraux et dérivés à un SP donné. Nous avons détecté les valeurs aberrantes sur la base du score z (α = 0,01) et du premier centile des valeurs p logarithmiques le long de chaque chromosome. Pour chacune de nos introgressions historiques de chiens avec des valeurs aberrantes identifiées lors des tests de sélection précédents, nous avons sélectionné le SNP le plus élevé et effectué le test d'homozygotie haplotype étendue (EHH) à locus unique, évaluant la relation entre la fréquence d'un allèle focal et l'étendue du déséquilibre de liaison environnant. Les tests iHS et EHH ont été utilisés à partir du package « rehh » (Gautier et Vitalis 2012).

2.7. TMRCA des introgressions historiques de chiens sous sélection positive

Nous avons estimé le moment des introgressions historiques de chiens à l'aide d'une approche de chaîne de Markov Monte Carlo (MCMC) mise en œuvre dans STARTMRCA (Smith et al. 2018). Cette méthode s'appuie sur la décroissance du déséquilibre de liaison entre l'allèle sélectionné et les sites voisins pour calculer le temps jusqu'à l'ancêtre commun le plus récent (TMRCA), en supposant une sélection positive. Nous nous sommes donc concentrés sur 1 Mb autour des SNPs présentant les valeurs iHS les plus élevées et les profils EHH à locus unique dans les introgressions historiques de chiens sous sélection positive. Pour le panel de référence, nous avons utilisé des haplotypes provenant de loups Européens non métissés. Nous avons extrait le taux de recombinaison pour chaque introgression historique de chien à partir de la carte de recombinaison (Auton et al. 2013) et nous avons testé deux taux de mutation couramment utilisés pour les chiens et les loups : 4×10^{-9} (Skoglund et al. 2015) et $4{,}5 \times 10^{-9}$ (Koch et al. 2019). Nous avons exécuté 10 chaînes MCMC indépendantes, chacune comprenant 50 000 itérations avec un écart type de 10 pour la distribution de proposition. Les distributions TMRCA postérieures ont été générées à partir des 10 000 dernières itérations de chaque chaîne. Les estimations TMRCA ont été converties en années en utilisant un temps de génération de 4,4 ans, représentant la moyenne des valeurs dérivées de deux études indépendantes (Vonholdt et al. 2008 ; Mech et al. 2016).

2.8. Ontologie génétique

Nous avons effectué des analyses de génontologie (GO) à l'aide de la base de données STRING (Szklarczyk et al. 2023) *Canis lupus familiaris* afin d'étudier à la fois l'enrichissement fonctionnel et les clusters de réseaux génétiques concernant toutes les introgressions historiques de chiens validées par des « analyses d'inférence d'ascendance locale ». Les gènes situés à l'intérieur et en aval de ces introgressions historiques de chiens ont été annotés avec des termes GO liés aux processus biologiques, aux fonctions moléculaires, aux composants cellulaires et aux clusters de réseaux locaux. Nous avons identifié les catégories GO significativement enrichies à l'aide d'une correction du taux de fausses découvertes (FDR) afin de garantir la robustesse statistique. Afin d'explorer les interactions génétiques, nous avons fixé la taille par défaut du réseau à un maximum de 10 interacteurs par gène et avons appliqué un score de confiance élevé requis de 0,7 afin de garantir la fiabilité des interactions prédites. Si nous ne parvenions pas à trouver un réseau génétique significatif, nous avons réduit le score de confiance requis à la valeur par défaut (confiance moyenne = 0,4).

3. RESULTATS

Les trois loups Italiens péninsulaires présentant des traits morphologiques présumés WDH avaient une couverture moyenne de 25×. **Dans l'ensemble**, les génomes complets que nous avons inclus dans notre ensemble de données avaient une couverture comprise entre 4,8 et 52,2× (Tableau S1). Après avoir aligné notre ensemble de données total de 413 génomes sur le génome de référence CanFam3.1 et la procédure d'appel de génotype, nous avons obtenu 7 397 906 SNPs. Nous n'avons trouvé aucune paire étroitement apparentée parmi les 17 loups Italiens. **Cependant**, afin d'éviter tout biais d'inférence lié au métissage et à l'introgression, nous avons exclu un individu qui présentait deux des trois indices de parenté supérieurs aux seuils et dont la qualité du génotype était faible. **De plus**, nous avons retiré 2 loups Européens et 4 loups nord-Américains en raison de leur forte parenté.

3.1. Analyses pangénomiques de l'ascendance canine chez les loups Italiens

Dans les analyses PCA, la première composante principale expliquait la majeure partie de la variabilité génétique (PC1 : 44,43%) et séparait les loups des chiens, tandis que la deuxième composante (PC2 : 10,57%) distinguait les populations de loups à l'échelle continentale, les loups Italiens étant les plus différenciés de tous les loups européens (Figure 1A). Aucun individu n'était positionné entre les chiens et les loups, ce qui suggère que les hybrides de première génération (F1) étaient absents de l'ensemble de données. Dans les premières analyses ADMIXTURE, $K = 10$ a été identifié comme le K optimal et, surtout, il était suffisant pour distinguer l'ascendance du loup et du chien chez chaque individu (Figure S1A). Nous avons identifié 5 loups Italiens métissés, 11 loups Italiens non métissés et 13 loups Européens non métissés (provenant de Scandinavie) (Figure S1B). Tous les loups Italiens métissés présentaient plus de 1% d'ascendance canine (jusqu'à 20%), tandis que 30 loups Européens provenant d'autres pays en présentaient moins de 1%. Parmi ceux-ci, seuls 13 loups Scandinaves ne présentaient aucune ascendance canine.

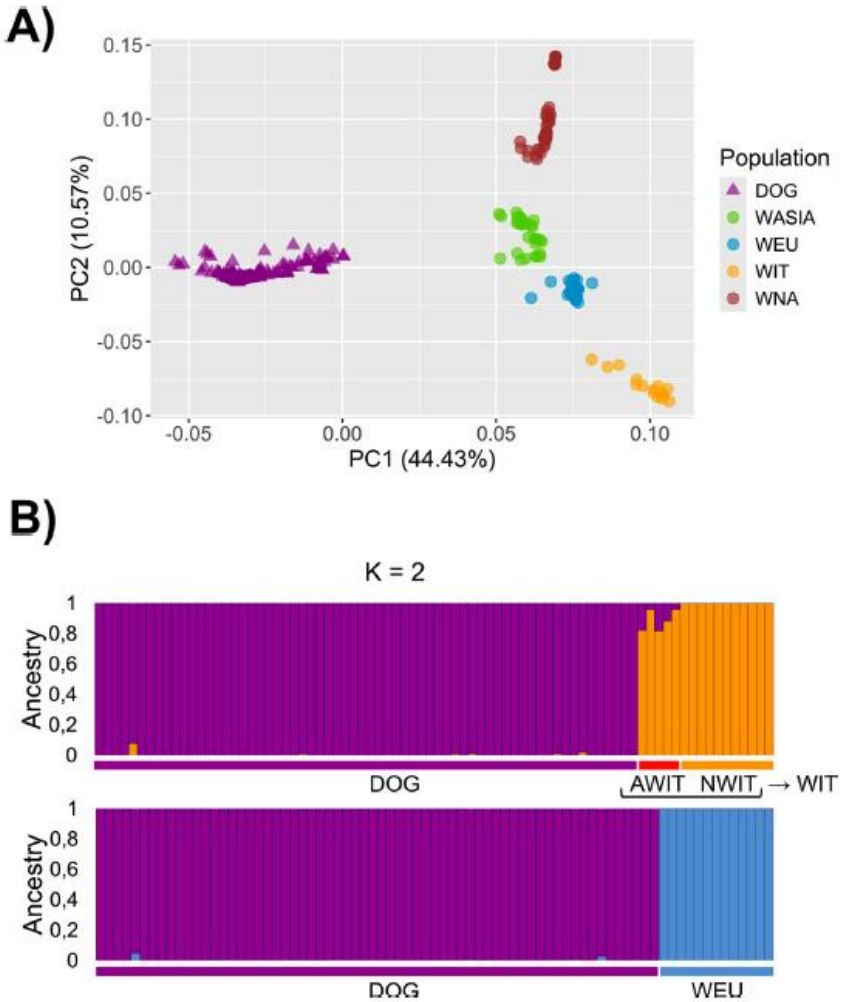

FIGURE 1. (**A**) Analyse en composantes principales (ACP) montrant les schémas de différenciation génétique entre les échantillons, y compris les races de chiens de taille moyenne à grande (DOG), les loups Italiens (WIT), les loups Européens (WEU), les loups Asiatiques (WASIA) et les loups nord-Américains (WNA). (**B**) Analyse ADMIXTURE avec K = 2 sur un sous-ensemble d'échantillons à valider (i) loups italiens métissés (AWIT) et loups Italiens non métissés (NWIT) (Figure supérieure), (ii) WEU non métissés (Figure inférieure), et obtention d'un panel de référence de DOG non métissés en croisant ces deux analyses ADMIXTURE

Les deuxième et troisième cycles d'ADMIXTURE ont confirmé la présence d'ascendance canine chez les loups Italiens métissés précédemment identifiés, l'absence d'ascendance canine chez les loups Européens non métissés précédemment identifiés et un ensemble de 53 chiens de référence sans aucune ascendance lupine (Figure 1B). Quatre des cinq loups Italiens métissés correspondaient aux individus déjà identifiés par Battilani et al. (2024). Parmi les trois loups Italiens présentant des traits morphologiques atypiques, seul l'individu doté de griffes accessoires s'est révélé métissé (17,6% d'ascendance canine attribuée à K = 4), tandis que les deux loups mélaniques **n'étaient pas** métissés. Les analyses « apoh » ont permis de déduire que 4 des 5 loups Italiens métissés l'étaient depuis 3 ou 4 générations (à savoir un BC2w, un BC3w et deux intermédiaires entre BC2w et BC3w) (Figure S2). Le cinquième individu métissé présentait une distance généalogique (d = 0,13) plus proche de la distance généalogique indépendante (d = 0,07), ce qui suggère que le métissage pourrait avoir eu lieu il y a plus de quatre générations. Cela correspondait globalement aux résultats d'ADMIXTURE basés sur la proportion observée d'ascendance canine, indiquant un événement de croisement survenu il y a environ 6-7 générations (Tableau S4).

Conformément aux analyses PCA et ADMIXTURE, les cinq loups Italiens **métissés** présentaient un partage significatif d'allèles dérivés avec les chiens par rapport aux loups Italiens non métissés (Figure 2A). Nous avons également identifié un autre loup Italien (WIT7) présentant des signes significatifs de partage d'allèles dérivés avec les chiens, ce qui pourrait indiquer un événement de métissage **plus ancien**. Conformément aux analyses PCA et ADMIXTURE, les deux individus mélaniques ont été confirmés comme **non** métissés. Lors du test visant à détecter des preuves d'introgression canine chez les loups à travers l'Europe, aucun des 13 loups Européens non métissés n'a présenté de partage significatif d'allèles avec les chiens (Figure S3).

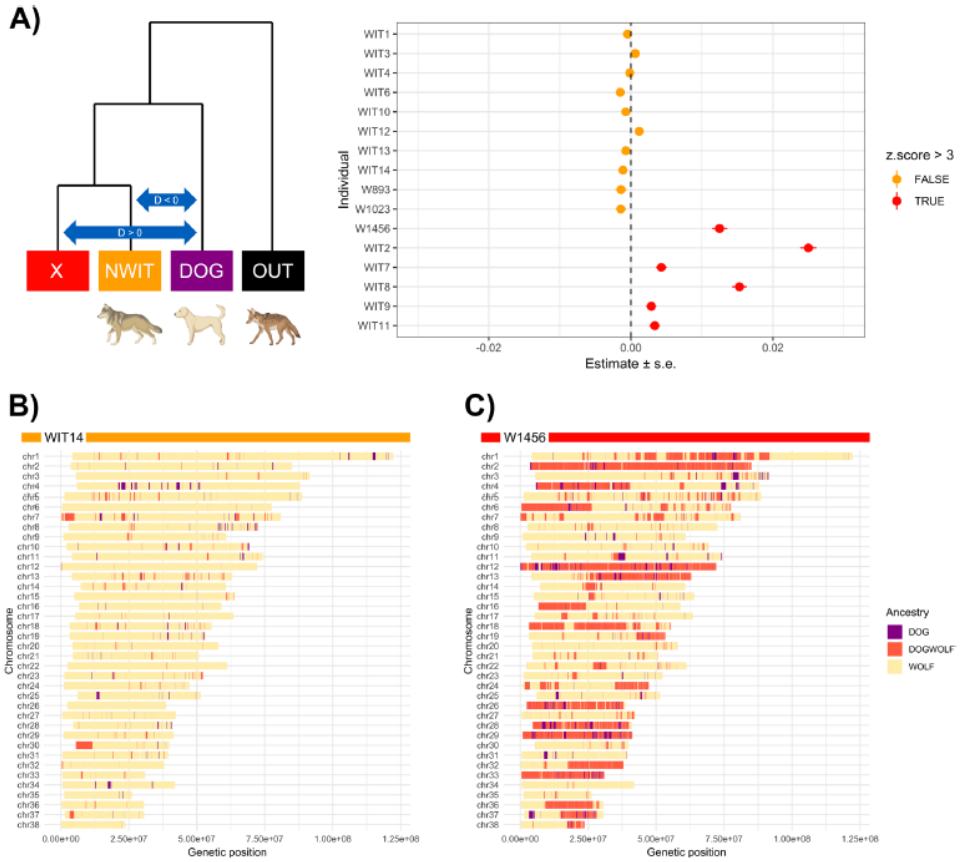

FIGURE 2. (**A**) Topologie et résultats de l'analyse statistique D testant le flux génétique potentiel entre chaque individu loup Italien (X) et les chiens non métissés (DOG) par rapport aux loups Italiens non métissés (NWIT), en utilisant *Canis latrans* comme groupe externe (OUT) ((X, NWIT), DOG, OUT). Les individus ayant un score z > 3 (points rouges) sont considérés comme présentant un partage d'allèles excessif avec DOG par rapport à NWIT. (**B**) Analyse d'inférence de l'ascendance locale affichant l'ensemble du génome d'un loup italien non métissé (WIT14) et (C) d'un loup Italien récemment métissé (W1456)

3.2. Inférence de l'ascendance locale et introgressions canines partagées

À l'aide d'analyses d'inférence de l'ascendance locale dans le cadre de notre deuxième scénario (c'est-à-dire l'évaluation de l'ascendance canine partagée due à l'introgression historique chez les loups Italiens), nous avons détecté 22 introgressions canines historiques candidates chez les loups italiens. Ces régions couvraient un total de 2 453 884 pb et étaient absentes chez les loups Européens non mélangés. Dix des 22 régions chevauchaient au moins un gène, et quatre se trouvaient dans la région régulatrice d'au moins un gène ; un total de 24 gènes ont donc été explorés plus en détail. La validation de l'introgression locale à l'aide des statistiques df et f_{dM} a confirmé que sept de ces régions indiquaient une introgression canine dans les génomes des loups Italiens, présentant des valeurs aberrantes significatives.

Six de ces régions ont montré une forte différenciation entre les loups Italiens et les loups Européens non métissés, et une faible différenciation entre les loups Italiens et les chiens, comme le démontrent les valeurs aberrantes les plus élevées dans les analyses F_S et window-scan (Figure 3). Pour ces raisons, nous avons procédé à des analyses de signature de sélection sur ces régions. **De plus**, nous avons confirmé que les deux loups mélaniques avaient une ascendance canine détectée dans la région du locus *K*, bien qu'ils aient été identifiés comme non mélangés grâce à nos approches pangénomiques.

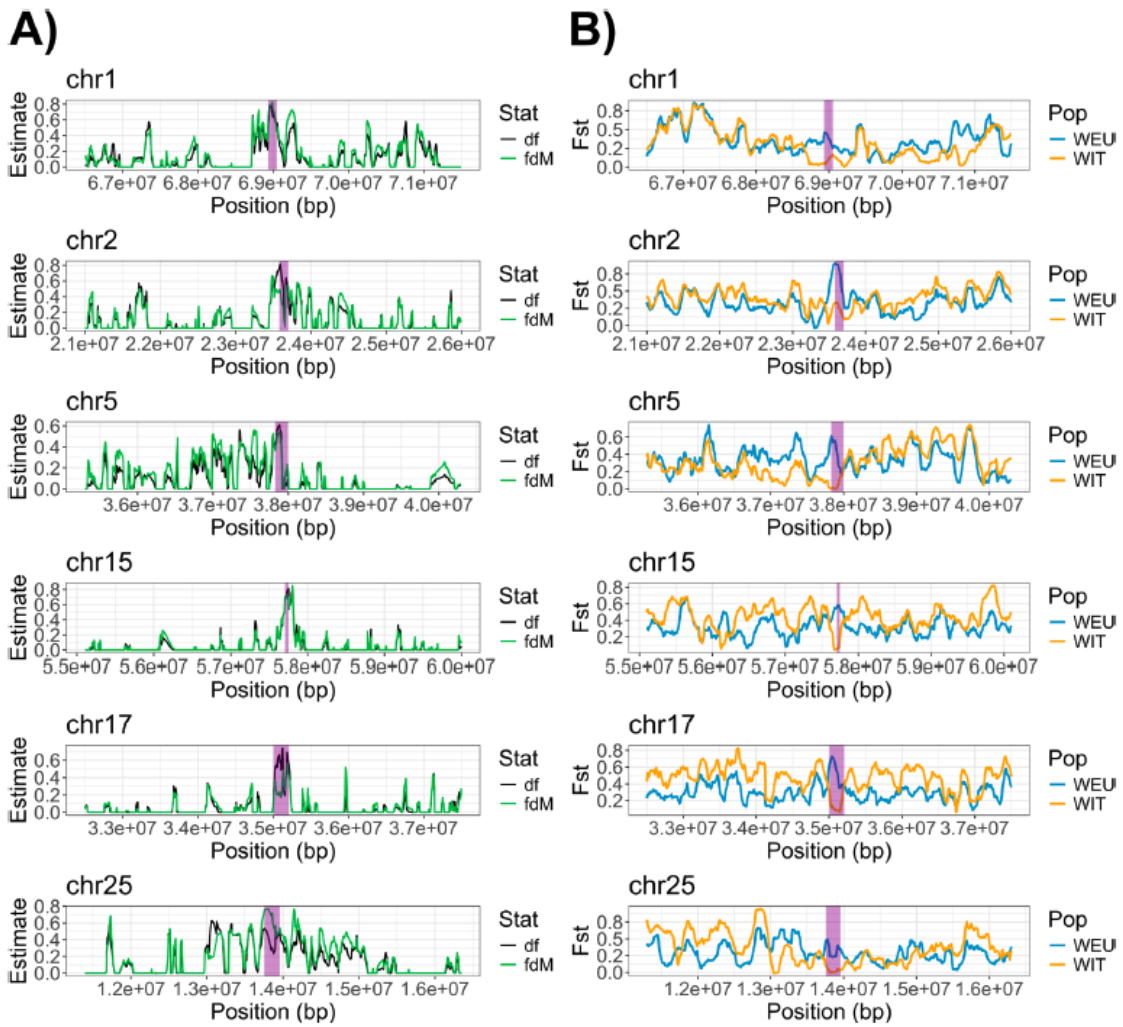

FIGURE 3. Régions introgressées validées dans le 10e centile supérieur des loups italiens (c'est-à-dire mélangés et non mélangés, WIT) partageant des régions, dans une région de 5 Mb entourant chaque région introgressée. (**A**) Statistiques D locales df et f_{dM} où une valeur df ou f_{dM} élevée indique un flux génétique entre les chiens et les WIT. (**B**) Résultats F_{st} window-scan où une valeur F élevée indique une forte différenciation génétique par rapport aux chiens. Les zones ombrées en violet représentent les 0,1% des valeurs aberrantes les plus élevées concordantes entre les statistiques D locales (df et f_{dM}) dans chaque région canine et les 1% des valeurs aberrantes les plus élevées dans l'analyse F_{st} window-scan

3.3. Ascendance canine dans les gènes ciblés liés au comportement

À partir de la littérature, nous avons identifié 599 gènes candidats précédemment associés à des **traits comportementaux** chez les canidés (Tableau S3). Notre analyse par SNP F_{st} entre les loups Italiens non métissés et les chiens non métissés a permis de trouver 6927 SNPs les plus élevés (Fst > 0,95) dans 340 de ces 599 gènes liés au comportement. Les analyses de réarrangement des gènes liés au comportement effectuées sur des loups Italiens métissés ont montré que la proportion d'ascendance canine dans les gènes fortement différenciés liés au comportement ne différait pas des prévisions dans un contexte de neutralité. Cela indique

que nous n'avons pas trouvé de sous-représentation ou de surreprésentation significative de l'ascendance canine dans les gènes liés au comportement par rapport aux réarrangements génomiques aléatoires (Figure 4).

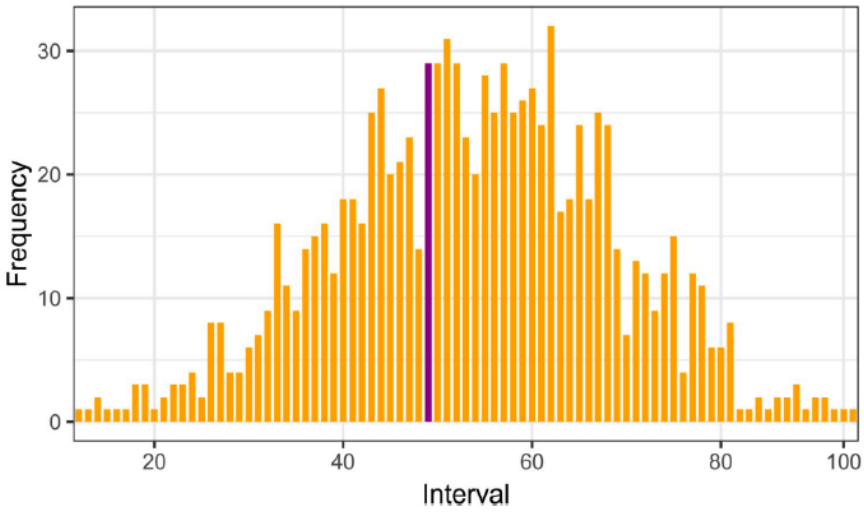

FIGURE 4. Distribution normale de 1 000 permutations génomiques pour des loups italiens métissés, basée sur la taille des gènes fortement différenciés liés au comportement et leur ascendance canine. L'axe des x représente les intervalles d'ascendance canine croissante, tandis que l'axe des y montre

3.4. Signes d'équilibre et de sélection positive dans les introgressions historiques de chiens

Nous avons identifié des introgressions **historiques** de chiens présentant des schémas compatibles avec des signatures de sélection. Nous avons trouvé une région (chr2:23583224-23699763) avec des valeurs Tajimas D positives significatives, suggérant une possible sélection équilibrée (Figure S4A), chez tous les loups Italiens. **De plus**, trois introgressions canines chez les loups Italiens (chr15:57654252-57793236 ; chr17:35055609-35277373 ; chr25:13578063-13957991) présentaient des valeurs Tajima's D négatives significatives, indiquant une possible sélection positive dans ces segments (Figures 5A et S5). À l'aide des statistiques NCD, l'introgression canine identifiée chez tous les loups Italiens (chr2:23583224-23699763) contenait une valeur aberrante maximale dans le premier centile pour NCD2 (Figure S4C). Lorsque l'on utilise l'iHS pour évaluer les scores haplotypes des SNPs dans les introgressions canines chez les loups Italiens, seuls chr15:57654252-57793236 et chr17:35055609-35277373 contenaient des SNPs qui étaient des valeurs aberrantes significatives selon le score z et se situaient dans le premier centile (Figure 4B). Les analyses de l'EHH à locus unique sur les valeurs aberrantes les plus élevées dans ces régions ont révélé des schémas compatibles avec une sélection positive (Figure 5C).

3.5. Calendrier des introgressions historiques de chiens

Nous avons estimé le calendrier et la propagation dans la population de deux introgressions historiques de chiens présentant de multiples signatures de sélection positive. En utilisant deux taux de mutation, le TMRCA pour la région entourant chr15:57753031 variait de 1031 à 1054 (IC à 95 % : 942-1167) générations auparavant, tandis que pour la région entourant chr17:35133607, il variait de 224 à 230 (IC à 95% : 196-260) générations. En faisant la moyenne des deux taux de mutation et en supposant une durée de génération moyenne de 4,4 ans pour les loups (Vonholdt et al. 2008 ; Mech et al. 2016), le TMRCA pour la région

chr15: 57753031 était de 4587 (IC à 95% : 4161-5032) ans, et pour la région chr17:35133607, de 998 (IC à 95 % : 871-1133) ans (Figure 5D).

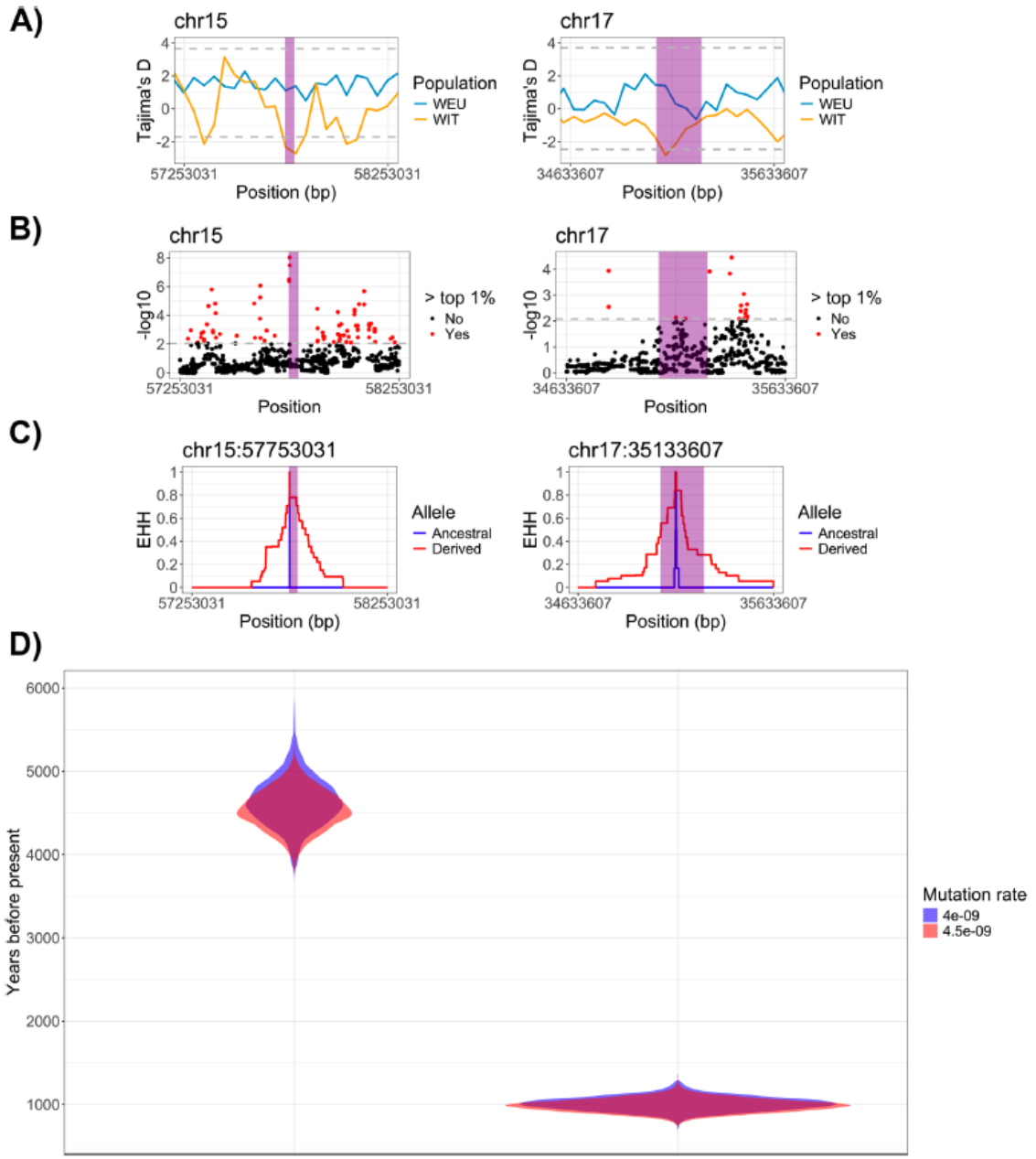

FIGURE 5. Un Mb autour des deux régions introgressées du chien au sein de la population de loups Italiens présentant des signatures de sélection positives (zones ombrées en violet) montrant : (**A**) les estimations de Tajima's D, basées sur des fenêtres de 50 kb. Les lignes grises en pointillés représentent les 1 % supérieurs des estimations positives et négatives ; (**B**) les 1% supérieurs des valeurs aberrantes des estimations iHS ; (**C**) EHH autour des valeurs aberrantes iHS supérieures ; (**D**) TMRCA pour le moment de la sélection, centré sur la valeur aberrante iHS supérieure sur la base de deux taux de mutation différents (Skoglund et al. 2015 ; Koch et al. 2019)

3.6. Enrichissements fonctionnels et réseaux génétiques

Parmi les six introgressions historiques de chiens identifiées chez les loups Italiens, huit gènes ont été classés avec un niveau de confiance élevé et un avec un niveau de confiance moyen (Tableau S5 ; Figure S6). Le SNP le plus éloigné pour la sélection positive sur chr15:57654252-57793236, trouvé avec iHS et confirmé par EHH, était situé à 193 kb en amont de FSTL5, un gène impliqué dans la régulation des protéoglycanes héparane sulfate (HSPG), la composition de la membrane cellulaire et les mécanismes de transport ionique.

Le SNP le plus éloigné pour la sélection positive sur chr17:35055609-35277373, trouvé avec iHS et confirmé avec EHH, était situé dans NPHP1, qui est associé au développement des cellules photoréceptrices et aux fonctions ciliaires. Cette région intro-régressée comprenait également les gènes BUB1, TPC3 et ACOXL, enrichis respectivement en mécanismes de progression mitotique et de contrôle des points de contrôle, en modulation de l'activité synaptique dans les voies GABAergiques et en bêta-oxydation des acides gras. Le **gène** ATP8A2, situé dans chr25:13578063-13957991, a été identifié comme ayant subi une sélection positive uniquement par le D de Tajima et était enrichi pour le transport des lipides dépendant de l'ATP à travers les membranes. Le **gène** CAMK1D (chr2:23583224-23699763), identifié comme faisant l'objet d'une sélection équilibrée par le D de Tajima et présentant une valeur aberrante NCD2 dans le premier centile, participe à la liaison des ions calcium, à la jonction serrée tricellulaire et à la régulation positive des rafales régulatrices. Parmi les gènes présents dans les introgressions canines sans signatures de sélection significatives, EPB41L2 (en aval de chr1:68933941-69051712) était le seul à présenter un enrichissement de confiance moyenne, contribuant à l'organisation cytosquelettique et à la signalisation synaptique. De plus, COX10 (chr5:37827522-37994324) était lié au métabolisme de l'hème et à l'assemblage du complexe IV de la chaîne respiratoire.

4. DISCUSSION

L'introgression de l'ascendance canine représente une menace importante pour la conservation en raison de son potentiel à modifier le comportement, l'écologie et l'évolution des populations de loups (Leonard et al. 2013 ; Hindrikson et al. 2017 ; McFarlane et Pemberton 2019 ; Ottenburghs 2021). Les indices d'introgression WDH peuvent provenir de certains traits morphologiques atypiques parfois détectés chez les loups métissés (Caniglia et al. 2013 ; Galaverni et al. 2017), même si ceux-ci ne reflètent **pas toujours** un métissage ou une WDH récente (Stronen et al. 2025). **Cependant**, la quantification de l'étendue de l'introgression canine à l'aide de **génomes complets** et l'évaluation de son impact potentiel sur les traits phénotypiques autres que la morphologie restent largement inexplorées. Nous avons tenté de combler cette lacune en analysant les données du **génome complet** d'un échantillon de 17 loups Italiens.

Les analyses génomiques de l'ascendance ont confirmé que le WDH est en cours en Italie, puisque nous avons identifié cinq individus récemment métissés (3 à 7 générations avant l'échantillonnage) sur 17. Nous avons estimé que ces individus métissés résultaient d'événements de croisement survenus entre 1980 et 1999, une période qui concorde avec l'hypothèse d'un **pic** d'hybridation pendant la reconstitution de la population dans la péninsule italienne (Lucchini et al. 2002 ; Fabbri et al. 2007 ; Galaverni et al. 2017). Nous **n'avons pas** détecté de loups Européens récemment métissés provenant d'autres pays représentés dans notre ensemble de données (à savoir la Croatie, la Grèce, la Norvège, le Portugal et l'Espagne). Bien que 17 loups Européens présentent moins de 1% d'ascendance canine, nous avons sélectionné les 13 loups Scandinaves sans ascendance canine comme population de référence. Leur pertinence en tant que loups de référence a été confirmée à la fois par la large représentation de notre panel de chiens et par des recherches antérieures démontrant leur ascendance canine minimale et leur patrimoine génétique distinct (Smeds et al. 2021). Bien que la population de loups Scandinaves soit connue pour être fortement consanguine, elle provient de la lignée Finno-Russe (c'est-à-dire Carélienne) et présente des preuves d'un **flux génétique bidirectionnel** avec cette population, ce qui la rend

phylogénétiquement pertinente dans le contexte plus large des loups Eurasiens (Ellegren et al. 1996 ; Linnell et al. 2005 ; Smeds et al. 2021). **Néanmoins**, nous reconnaissons que la diversité génétique réduite de la population et le déséquilibre de liaison prolongé pourraient limiter la résolution de l'inférence de l'ascendance locale et conduire à une sous-estimation des segments introgressés rares ou fragmentés.

Parmi les trois loups Italiens présentant des traits morphologiques atypiques, seul celui qui présentait des ergots montrait une signature génomique claire d'un métissage récent (c'est-à-dire il y a 3-4 générations). **En revanche**, les deux loups mélaniques ne présentaient aucun métissage génomique apparent, bien que l'inférence de l'ascendance locale ait révélé que la région contenant le locus *K* était d'origine canine. Cela confirme l'hypothèse selon laquelle la variante mélanique a été introgressée chez les loups Italiens par le biais d'événements historiques de WDH, comme le suggèrent également des études antérieures basées sur un ensemble de données de 170 k SNP (Galaverni et al. 2017). Un schéma similaire a été rapporté chez les loups d'Amérique du Nord, où la mutation mélanique du locus *K* aurait été introgressée à partir de chiens il y a environ 1600 à 7200 ans (Schweizer et al. 2018) et dont la fréquence a depuis augmenté en raison d'une sélection positive, probablement grâce à un camouflage amélioré dans les forêts sombres et à une immunité au virus de la maladie de Carré (Schweizer et al. 2018 ; Cubaynes et al. 2022). **Néanmoins**, on ne peut exclure que la variante du locus *K* se ségrégait déjà à faible fréquence chez les loups avant leur domestication, comme le suggère sa détection chez des loups anciens pré-domestication (Bergström et al. 2022). Nos résultats soulignent donc la nécessité de mener des recherches supplémentaires à partir de jeux de données génomiques plus importants sur les loups et les chiens mélaniques afin de clarifier l'origine et la propagation du mélanisme.

Les inférences sur l'ascendance locale ont révélé que les loups Italiens récemment métissés ne présentaient pas de surreprésentation ou de sous-représentation significative de l'ascendance canine dans les gènes fortement différenciés liés au comportement. Ces résultats suggèrent que, chez les loups métissés que nous avons séquencés, ces gènes ne présentaient pas de perméabilité ou de résistance particulière à l'introgression canine récente. Bien qu'il ne puisse être exclu que nos résultats soient dus à une recombinaison aléatoire, nous **ne** trouvons **aucune** preuve indiquant que l'ascendance canine à ces loci confère un avantage significatif. **Cependant**, ces résultats doivent être interprétés avec prudence. **Premièrement**, le nombre d'individus métissés dans notre ensemble de données était limité. **Deuxièmement**, l'ensemble de gènes provenait d'études sur les chiens domestiques et pourrait ne pas s'appliquer directement au comportement des loups sauvages. **Enfin**, aucun phénotype comportemental n'était disponible pour les loups que nous avons analysés, ce qui ne nous a pas permis de tester l'impact **fonctionnel** de ces gènes dans un environnement naturel.

Outre les introgressions récentes, nous avons détecté six introgressions historiques de chiens chez les loups Italiens, situées dans des gènes dont l'enrichissement fonctionnel suggère des effets potentiels sur la physiologie et le comportement. Deux de ces introgressions historiques de chiens présentaient de multiples signatures de sélection positive, ce qui nous a permis d'estimer leur chronologie à l'aide de l'approche décrite par Smith et al. (2018). Une région, située à 193 kb en amont du gène FSTL5, aurait subi une introgression il y a environ 4500 ans, pendant l'âge du bronze, une période où les chiens étaient déjà intégrés dans la

société humaine, comme le montre leur présence fréquente dans les sites funéraires (Bartosiewicz 2013 ; Morey et Jeer 2022).

De manière cohérente, une étude génomique récente a rapporté une ascendance canine datant de l'âge du bronze chez le loup Sicilien aujourd'hui disparu (Ciucani et al. 2023), ce qui confirme davantage la présence du WDH en Italie à cette époque. Le gène FSTL5 est associé à la signalisation neuronale et membranaire chez les chiens (Lisboa et al. 2019) et a été lié à des orientations logiques par opposition à des orientations affectives chez les humains (Kao et al. 2023). Comme ces associations indiquent un **rôle neurocomportemental** possible, une interprétation provisoire est que l'ancêtre canin du gène FSTL5 pourrait influencer la régulation cognitive ou émotionnelle, favorisant potentiellement des réponses plus réactives à la présence humaine. La **deuxième région introgressée** est située dans le gène NPHP1 et a été datée d'il y a environ 1 000 ans, une période qui coïncide avec la fin du Moyen Âge et les transformations sociopolitiques qui ont suivi les invasions barbares de la péninsule Italienne. À cette époque, les chiens étaient très appréciés, comme en témoigne la première classification des races connue, enregistrée dans les Leges Barbarorum (Luffrida 2012). Étant donné que le NPHP1 est essentiel à la structure des photorécepteurs et à la **fonction visuelle** (Datta et al. 2021), ce fragment introgressé pourrait provenir de chiens de travail médiévaux qui ont été sélectionnés artificiellement pour effectuer des tâches telles que la chasse, le gardiennage ou la garde, où une acuité visuelle ou une détection des mouvements améliorées pouvaient être avantageuses. Outre NPHP1, cette région introgressée comprend également BUB1, TPC3 et ACOXL, des gènes impliqués respectivement dans la régulation du cycle cellulaire, la signalisation synaptique et le métabolisme lipidique. Bien qu'ils ne soient pas soumis au signal de sélection le plus fort, leur conservation pourrait refléter des avantages neurophysiologiques subtils, tels qu'une modulation neuronale ou un métabolisme énergétique améliorés.

Pour les introgressions historiques chez les chiens, dont nous n'avons pas estimé la date exacte, mais qui se sont produites il y a plus de sept générations (c'est-à-dire notre **seuil** arbitraire pour distinguer les introgressions récentes des introgressions historiques), nous avons détecté une région présentant de multiples signatures de sélection équilibrée, comme l'indiquent une valeur aberrante maximale dans le D de Tajima et une fenêtre NCD2 dans le premier centile. Cette région comprend CAMK1D, un gène codant pour un modulateur clé de la résistance immunitaire intrinsèque des tumeurs chez l'homme (Volpin et al. 2020), qui pourrait être bénéfique pour les loups exposés à des niveaux élevés de substances cancérigènes produites par les activités anthropiques (Kravchenko et al. 2015 ; Madia et al. 2019). Nous avons finalement identifié une introgression historique supplémentaire de chien présentant un signe de sélection positive, mais uniquement sur la base du D de Tajima. Cette région introgressée comprend l'ATP8A2, un gène impliqué dans la plasticité neuronale (Xu et al. 2012) et associé à « l'excitabilité » dans une étude GWAS exploitant les données comportementales et génomiques de plus de 1 000 chiens (MacLean et al. 2019). La taille limitée de nos introgressions historiques chez le chien sous plusieurs signatures de sélection (~100-200 kb) semble exclure le rôle du dernier goulot d'étranglement historique, subi par les loups Italiens à la fin des années 1960, dans l'explication de ces schémas (Battilani et al. 2024). **Cependant**, une seule valeur aberrante de Tajima D pourrait ne pas refléter exclusivement la sélection, mais pourrait également résulter de contractions démographiques survenues au cours des derniers siècles. **Par conséquent**, de futures études devraient valider

les signatures de sélection que nous avons identifiées, par exemple en mettant en œuvre des simulations démographiques.

Nous avons également identifié deux régions historiquement introgressées qui ne présentaient pas de signatures claires de sélection, mais qui affichaient une perméabilité prononcée à l'ascendance canine. Par exemple, des gènes tels que EPB41L2 et COX10, situés dans ces régions, pourraient jouer un rôle dans les réponses aux facteurs de stress environnementaux ou dans l'amélioration de l'efficacité énergétique (Schüll et al. 2015 ; Voges et al. 2024). Bien que ces hypothèses n'aient pas encore été testées, toutes les régions historiquement introgressées détectées dans notre étude méritent une étude fonctionnelle afin d'évaluer leur pertinence phénotypique potentielle. Idéalement, ces analyses devraient être menées à partir d'échantillons plus importants et de panels plus complets de loups mélangés et non mélangés.

Des études récentes sur les loups Ibériques utilisant des données génomiques complètes ont également fait état d'introgressions canines remontant à l'Antiquité (Sarabia et al. 2025 ; Lobo et al. 2025). Ces résultats sont cohérents avec les travaux antérieurs, renforçant l'hypothèse selon laquelle le WDH n'est pas seulement un problème de conservation contemporain, mais un impact anthropique de longue date capable de façonner le paysage génomique des populations de loups et, par conséquent, d'influencer leurs trajectoires évolutives (Skoglund et al. 2015 ; Pilot et al. 2018 ; Bergström et al. 2022). Il est à noter que, si les gènes spécifiques révélant l'introgression canine diffèrent entre les loups Ibériques et Italiens, les enrichissements fonctionnels convergent vers les voies neurodéveloppementales, immunitaires et métaboliques, qui pourraient affecter le comportement et l'adaptabilité aux environnements modifiés par l'homme (Sarabia et al. 2025 ; Lobo et al. 2025). Cela **suggère** que les résultats du WDH sont probablement influencés par les conditions écologiques **locales**, les pressions sélectives et les architectures génomiques spécifiques à chaque population, qui ont toutes pu être perturbées ou modifiées par les activités anthropiques. **De plus**, les régions introgressées différaient entre les deux études consacrées aux loups Ibériques, ce qui suggère que les approches analytiques fondamentales, telles que les inférences sur l'ascendance locale, peuvent également avoir une forte incidence sur les résultats détectés. **Cela souligne** la nécessité de mener des recherches génomiques à l'échelle locale, méthodologiquement cohérentes et adaptées, afin de comprendre pleinement les implications possibles de l'introgression canine chez les loups en termes d'évolution et de conservation.

5. Conclusion

Cette étude fournit la première enquête **génomique** complète sur l'introgression canine chez les loups Italiens. À l'aide de multiples approches d'inférence génomique et d'ascendance locale, nous avons détecté différents niveaux d'ascendance canine à l'échelle du génome chez les loups métissés. **De plus**, nous avons exploré une approche innovante pour évaluer l'ascendance canine récemment introgressée sur les gènes liés au **comportement**, indiquant que ces gènes n'étaient pas particulièrement perméables à l'introgression canine récente. Nous avons également identifié des introgressions historiques de chiens chez les loups Italiens, avec des enrichissements fonctionnels qui pourraient être interprétés dans le contexte d'effets physiologiques, écologiques et comportementaux. Ces introgressions

historiques représentent très probablement l'héritage d'un flux génétique de longue date causé par l'homme entre les loups Italiens et les chiens, et pourraient avoir affecté non seulement la composition génomique du loup Italien, mais aussi ses interactions avec les environnements naturels et anthropiques. Nous avons montré que de multiples approches génomiques peuvent constituer un outil efficace pour mettre en évidence la nature complexe de l'introgression canine, ce qui est particulièrement pertinent dans les populations génétiquement érodées et isolées. Si l'introgression récente a des implications directes en matière de gestion en raison de son potentiel de propagation au sein de la population, l'introgression historique n'est pas exploitable sur le plan de la gestion. Elle reste néanmoins pertinente à étudier, car elle pourrait avoir façonné les trajectoires évolutives et le potentiel d'adaptation de l'espèce aux environnements modifiés par l'homme. Dans ce contexte, il est essentiel de comprendre les implications comportementales et liées à la condition physique de l'ascendance canine introgressée afin de préserver l'intégrité génétique des loups Italiens et de gérer leur coexistence avec les humains. De futures études intégrant des ensembles de données plus importants sur des individus sauvages et métissés, et combinant des analyses du génome entier avec des analyses **transcriptomiques** et **épigénomiques**, aideront à élucider le **rôle adaptatif** possible et les effets phénotypiques potentiels des variants canins introgressés.

References

Alexander, D. H., J. Novembre, and K. Lange. 2009. "Fast Model-Based Estimation of Ancestry in Unrelated Individuals." *Genome Research* 19: 1655–1664. https://doi.org/10.1101/gr.094052.109.

Allendorf, F. W., R. F. Leary, P. Spruell, and J. K. Wenburg. 2001. "The Problems With Hybrids: Setting Conservation Guidelines." *Trends in Ecology & Evolution* 16: 613–622. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02290-X.

Anderson, T. M., B. M. vonHoldt, S. I. Candille, et al. 2009. "Molecular and Evolutionary History of Melanism in North American Gray Wolves." *Science* 323: 1339–1343. https://doi.org/10.1126/science.1165448.

Andrews, S. 2010. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data.

Auton, A., Y. Rui Li, J. Kidd, et al. 2013. "Genetic Recombination Is Targeted Towards Gene Promoter Regions in Dogs." *PLoS Genetics* 9: e1003984. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003984.

Bartosiewicz, L. 2013. *Animals in Bronze Age Europe*. Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780199572861.013.0018.

Battilani, D., R. Gargiulo, R. Caniglia, et al. 2024. "Beyond Population Size: Whole-Genome Data Reveal Bottleneck Legacies in the Peninsular Italian Wolf." *Journal of Heredity* 116: esae041. https://doi.org/10.1093/jhered/esae041.

Bergström, A., D. W. G. Stanton, U. H. Taron, et al. 2022. "Grey Wolf Genomic History Reveals a Dual Ancestry of Dogs." *Nature* 607: 313–320. https://doi.org/10.1038/s41586-022-04824-9.

Bitarello, B. D., C. De Filippo, J. C. Teixeira, et al. 2018. "Signatures of Long-Term Balancing Selection in Human Genomes." *Genome Biology and Evolution* 10: 939–955. https://doi.org/10.1093/gbe/evy054.

Bohling, J. H. 2016. "Strategies to Address the Conservation Threats Posed by Hybridization and Genetic Introgression." *Biological Conservation* 203: 321–327. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.10.011.

Boitani, L. 1983. "Wolf and Dog Competition in Italy." *Acta Zoologica Fennica* 174: 259–264.

Boitani, L., and P. Ciucci. 1993. "Wolves in Italy: Critical Issues for Their Conservation." Presented at the Wolves in Europe – Current Status and Prospects, STAMPA, Oberammergau, Germany, pp. 75–90.

Candille, S. I., C. B. Kaelin, B. M. Cattanach, et al. 2007. "A β-Defensin Mutation Causes Black Coat Color in Domestic Dogs." *Science* 318: 1418–1423. https://doi.org/10.1126/science.1147880.

Caniglia, R., E. Fabbri, C. Greco, et al. 2013. "Black Coats in an Admixed Wolf × Dog Pack Is Melanism an Indicator of Hybridization in Wolves?"

European Journal of Wildlife Research 59: 543–555. https://doi.org/10.1007/s10344-013-0703-1.

Chang, C. C., C. C. Chow, L. C. Tellier, S. Vattikuti, S. M. Purcell, and J. J. Lee. 2015. "Second-Generation PLINK: Rising to the Challenge of Larger and Richer Datasets." *GigaScience* 4: 7. https://doi.org/10.1186/s13742-015-0047-8.

Ciucani, M. M., J. Ramos-Madrigal, G. Hernández-Alonso, et al. 2023. "The Extinct Sicilian Wolf Shows a Complex History of Isolation and Admixture With Ancient Dogs." *iScience* 26: 107307. https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107307.

Ciucci, P., and L. Boitani. 1998. *Il Lupo. Elementi di Biologia, Gestione e Ricerca*. Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica.

Ciucci, P., V. Lucchini, L. Boitani, and E. Randi. 2003. "Dewclaws in Wolves as Evidence of Admixed Ancestry With Dogs." *Canadian Journal of Zoology* 81: 2077–2081. https://doi.org/10.1139/z03-183.

Coppinger, R., and L. Coppinger. 2002. *Dogs: A New Understanding of Canine Origin, Behavior and Evolution*. University of Chicago Press.

Cubaynes, S., E. E. Brandell, D. R. Stahler, et al. 2022. "Disease Outbreaks Select for Mate Choice and Coat Color in Wolves." *Science* 378: 300–303. https://doi.org/10.1126/science.abi8745.

Danecek, P., A. Auton, G. Abecasis, et al. 2011. "The Variant Call Format and VCFtools." *Bioinformatics* 27: 2156–2158. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330.

Danecek, P., J. K. Bonfield, J. Liddle, et al. 2021. "Twelve Years of SAMtools and BCFtools." *GigaScience* 10: giab008. https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008.

Datta, P., J. T. Cribbs, and S. Seo. 2021. "Differential Requirement of NPHP1 for Compartmentalized Protein Localization During Photoreceptor Outer Segment Development and Maintenance." *PLoS One* 16: e0246358. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246358.

Delaneau, O., C. Coulonges, and J.-F. Zagury. 2008. "Shape-IT: New Rapid and Accurate Algorithm for Haplotype Inference." *BMC Bioinformatics* 9: 540. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-540.

Di Bernardi, C., G. Chapron, P. Kaczensky, et al. 2025. "Continuing Recovery of Wolves in Europe." *PLOS Sustainability and Transformation* 4: e0000158. https://doi.org/10.1371/journal.pstr.0000158.

Durand, E. Y., N. Patterson, D. Reich, and M. Slatkin. 2011. "Testing for Ancient Admixture Between Closely Related Populations." *Molecular Biology and Evolution* 28: 2239–2252. https://doi.org/10.1093/molbev/msr048.

Dutrow, E. V., J. A. Serpell, and E. A. Ostrander. 2022. "Domestic Dog Lineages Reveal Genetic Drivers of Behavioral Diversification." *Cell* 185: 4737–4755.e18. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.003.

Ellegren, H., P. Savolainen, and B. Rosén. 1996. "The Genetical History of an Isolated Population of the Endangered Grey Wolf *Canis Lupus*: A Study of Nuclear and Mitochondrial Polymorphisms." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 351: 1661–1669. https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0148.

Ewels, P., M. Magnusson, S. Lundin, and M. Käller. 2016. "MultiQC: Summarize Analysis Results for Multiple Tools and Samples in a Single Report." *Bioinformatics* 32: 3047–3048. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354.

Fabbri, E., C. Miquel, V. Lucchini, et al. 2007. "From the Apennines to the Alps: Colonization Genetics of the Naturally Expanding Italian Wolf (*Canis lupus*) Population." *Molecular Ecology* 16: 1661–1671. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03262.x.

Fabbri, G., L. Molinaro, N. Mucci, L. Pagani, and M. Scandura. 2023. "Anthropogenic Hybridization and Its Influence on the Adaptive Potential of the Sardinian Wild Boar (*Sus scrofa meridionalis*)." *Journal of Applied Genetics* 64: 521–530. https://doi.org/10.1007/s13353-023-00763-x.

Fan, Z., P. Silva, I. Gronau, et al. 2016. "Worldwide Patterns of Genomic Variation and Admixture in Gray Wolves." *Genome Research* 26: 163–173. https://doi.org/10.1101/gr.197517.115.

Fardone, L., M. Forlani, L. Canova, M. De Luca, and A. Meriggi. 2025. "Can the Wolf (*Canis lupus*) Thrive in Highly Anthropised Lowlands? First Habitat Suitability Analysis of the Po Plain, Italy." *Animals* 15: 546. https://doi.org/10.3390/ani15040546.

Galaverni, M., R. Caniglia, L. Pagani, E. Fabbri, A. Boattini, and E. Randi. 2017. "Disentangling Timing of Admixture, Patterns of Introgression, and Phenotypic Indicators in a Hybridizing Wolf Population." *Molecular Biology and Evolution* 34: 2324–2339. https://doi.org/10.1093/molbev/msx169.

Garcia-Erill, G., K. Hanghøj, R. Heller, C. Wiuf, and A. Albrechtsen. 2023. "Estimating Admixture Pedigrees of Recent Hybrids Without a Contiguous Reference Genome." *Molecular Ecology Resources* 23: 1604–1619. https://doi.org/10.1111/1755-0998.13830.

Gautier, M., and R. Vitalis. 2012. "*Rehh*: An R Package to Detect Footprints of Selection in Genome-Wide SNP Data From Haplotype Structure." *Bioinformatics* 28: 1176–1177. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts115.

Gervasi, V., P. Aragno, V. Salvatori, et al. 2024. "Estimating Distribution and Abundance of Wide-Ranging Species With Integrated Spatial Models: Opportunities Revealed by the First Wolf Assessment in South-Central Italy." *Ecology and Evolution* 14: e11285. https://doi.org/10.1002/ece3.11285.

Hanghøj, K., I. Moltke, P. A. Andersen, A. Manica, and T. S. Korneliussen. 2019. "Fast and Accurate Relatedness Estimation From High-Throughput Sequencing Data in the Presence of Inbreeding." *GigaScience* 8, no. 5: giz034. https://doi.org/10.1093/gigascience/giz034.

Harmoinen, J., A. Von Thaden, J. Aspi, et al. 2021. "Reliable Wolf-Dog Hybrid Detection in Europe Using a Reduced SNP Panel Developed for Non-Invasively Collected Samples." *BMC Genomics* 22: 473. https://doi.org/10.1186/s12864-021-07761-5.

Hindrikson, M., J. Remm, M. Pilot, et al. 2017. "Wolf Population Genetics in Europe: A Systematic Review, Meta-Analysis and Suggestions for Conservation and Management." *Biological Reviews* 92: 1601–1629. https://doi.org/10.1111/brv.12298.

Hörtenhuber, M., M. K. Hytönen, A. K. Mukarram, et al. 2024. "The DoGA Consortium Expression Atlas of Promoters and Genes in 100 Canine Tissues." *Nature Communications* 15: 9082. https://doi.org/10.1038/s41467-024-52798-1.

Howard-McCombe, J., A. Jamieson, A. Carmagnini, et al. 2023. "Genetic Swamping of the Critically Endangered Scottish Wildcat Was Recent and Accelerated by Disease." *Current Biology* 33: 4761–4769.e5. https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.10.026.

Iuffrida, M. 2012. *Il Cane e L'uomo Nella Cultura e Nel Diritto Dell'Alto Medioevo (Dottorato di Ricerca in Storia Medievale)*. Alma Mater Studiorum – Università di Bologna.

Jeong, H., E. A. Ostrander, and J. Kim. 2025. "Genomic Evidence for Behavioral Adaptation of Herding Dogs." *Science Advances* 11: eadp4591. https://doi.org/10.1126/sciadv.adp4591.

Kao, P.-Y., M.-H. Chen, W.-A. Chang, et al. 2023. "A Genome-Wide Association Study (GWAS) of the Personality Constructs in CPAI-2 in Taiwanese Hakka Populations." *PLoS One* 18: e0281903. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281903.

Kis, A., M. Bence, G. Lakatos, et al. 2014. "Oxytocin Receptor Gene Polymorphisms Are Associated With Human Directed Social Behavior in Dogs (*Canis familiaris*)." *PLoS One* 9: e83993. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083993.

Koch, E. M., R. M. Schweizer, T. M. Schweizer, et al. 2019. "De Novo Mutation Rate Estimation in Wolves of Known Pedigree." *Molecular Biology and Evolution* 36: 2536–2547. https://doi.org/10.1093/molbev/msz159.

Kravchenko, J., E. Corsini, M. A. Williams, et al. 2015. "Chemical Compounds From Anthropogenic Environment and Immune Evasion Mechanisms: Potential Interactions." *CARCIN* 36: S111–S127. https://doi.org/10.1093/carcin/bgv033.

Leonard, J. A., J. Echegaray, E. Rand, and C. Vilà. 2013. "Impact of Hybridization With Domestic Dogs on the Conservation of Wild Canids." In *Free-Ranging Dogs and Wildlife Conservation*, edited by M. E. Gompper, 170–184. Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/acprof:osobl/9780199663217.003.0007.

Li, H., and R. Durbin. 2009. "Fast and Accurate Short Read Alignment With Burrows–Wheeler Transform." *Bioinformatics* 25: 1754–1760. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324.

Lindblad-Toh, K., C. M. Wade, T. S. Mikkelsen, et al. 2005. "Genome Sequence, Comparative Analysis and Haplotype Structure of the Domestic Dog." *Nature* 438: 803–819. https://doi.org/10.1038/nature04338.

Linnell, J. D. C., H. Brøseth, E. J. Solberg, and S. M. Brainerd. 2005. "The Origins of the Southern Scandinavian Wolf *Canis lupus* Population: Potential for Natural Immigration in Relation to Dispersal Distances, Geography and Baltic Ice." *Wildlife Biology* 11: 383–391. https://doi.org/10.2981/0909-6396(2005)11[383:TOOTSS]2.0.CO;2.

Lisboa, B. C. G., K. C. Oliveira, A. C. Tahira, et al. 2019. "Initial Findings of Striatum Tripartite Model in OCD Brain Samples Based on Transcriptome Analysis." *Scientific Reports* 9: 3086. https://doi.org/10.1038/s41598-019-38965-1.

Lobo, D., J. V. López-Bao, and R. Godinho. 2023. "The Population Bottleneck of the Iberian Wolf Impacted Genetic Diversity but Not Admixture With Domestic Dogs: A Temporal Genomic Approach." *Molecular Ecology* 32: 5986–5999. https://doi.org/10.1111/mec.17171.

Lobo, D., H. E. Morales, C. Van Oosterhout, et al. 2025. "Ancient Dog Introgression Into the Iberian Wolf Genome May Have Facilitated Adaptation to Human-Dominated Landscapes." *Genome Research* 35: 432–445. https://doi.org/10.1101/gr.279093.124.

Lucchini, V., E. Fabbri, F. Marucco, S. Ricci, L. Boitani, and E. Randi. 2002. "Noninvasive Molecular Tracking of Colonizing Wolf (*Canis lupus*) Packs in the Western Italian Alps." *Molecular Ecology* 11: 857–868. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01489.x.

Ma, R., R. Kuang, J. Zhang, et al. 2025. "Annotation and Assessment of Functional Variants in Livestock Through Epigenomic Data." *Journal of Genetics and Genomics*: S1673852725000864. https://doi.org/10.1016/j.jgg.2025.03.013.

MacLean, E. L., N. Snyder-Mackler, B. M. vonHoldt, and J. A. Serpell. 2019. "Highly Heritable and Functionally Relevant Breed Differences in Dog Behaviour." *Proceedings of the Royal Society B* 286: 20190716. https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0716.

Madia, F., A. Worth, M. Whelan, and R. Corvi. 2019. "Carcinogenicity Assessment: Addressing the Challenges of Cancer and Chemicals in the Environment." *Environment International* 128: 417–429. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.067.

Maier, R., P. Flegontov, O. Flegontova, U. Işıldak, P. Changmai, and D. Reich. 2023. "On the Limits of Fitting Complex Models of Population History to f-Statistics." *eLife* 12: e85492. https://doi.org/10.7554/eLife.85492.

Malinsky, M., M. Matschiner, and H. Svardal. 2021. "Dsuite – Fast *D*-Statistics and Related Admixture Evidence From VCF Files." *Molecular Ecology Resources* 21: 584–595. https://doi.org/10.1111/1755-0998.13265.

Mary, N., N. Iannuccelli, G. Petit, et al. 2022. "Genome-Wide Analysis of Hybridization in Wild Boar Populations Reveals Adaptive Introgression From Domestic Pig." *Evolutionary Applications* 15: 1115–1128. https://doi.org/10.1111/eva.13432.

McFarlane, S. E., and J. M. Pemberton. 2019. "Detecting the True Extent of Introgression During Anthropogenic Hybridization." *Trends in Ecology & Evolution* 34: 315–326. https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.12.013.

Mech, L. D., S. M. Barber-Meyer, and J. Erb. 2016. "Wolf (*Canis lupus*) Generation Time and Proportion of Current Breeding Females by Age." *PLoS One* 11: e0156682. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156682.

Moran, B. M., C. Payne, Q. Langdon, D. L. Powell, Y. Brandvain, and M. Schumer. 2021. "The Genomic Consequences of Hybridization." *eLife* 10: e69016. https://doi.org/10.7554/eLife.69016.

Morey, D. F., and R. Jeger. 2022. "When Dogs and People Were Buried Together." *Journal of Anthropological Archaeology* 67: 101434. https://doi.org/10.1016/j.jaa.2022.101434.

Morrill, K., J. Hekman, X. Li, et al. 2022. "Ancestry-Inclusive Dog Genomics Challenges Popular Breed Stereotypes." *Science* 376: eabk0639. https://doi.org/10.1126/science.abk0639.

Münger, X., M. Robin, L. Dalén, and C. Grossen. 2024. "Facilitated Introgression From Domestic Goat Into Alpine Ibex at Immune Loci." *Molecular Ecology* 33: e17429. https://doi.org/10.1111/mec.17429.

Nussberger, B., S. Barbosa, M. Beaumont, et al. 2023. "A Common Statement on Anthropogenic Hybridization of the European Wildcat (*Felis silvestris*)." *Frontiers in Ecology and Evolution* 11: 1156387. https://doi.org/10.3389/fevo.2023.1156387.

Olmert, M. D. 2018. "Genes Unleashed: How the Victorians Engineered Our Dogs." *Nature* 562: 336–337. https://doi.org/10.1038/d41586-018-07039-z.

Ottenburghs, J. 2021. "The Genic View of Hybridization in the Anthropocene." *Evolutionary Applications* 14: 2342–2360. https://doi.org/10.1111/eva.13223.

Park, S., J. Lee, J. Kim, et al. 2023. "Benchmark Study for Evaluating the Quality of Reference Genomes and Gene Annotations in 114 Species." *Frontiers in Veterinary Science* 10: 1128570. https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1128570.

Patterson, N., P. Moorjani, Y. Luo, et al. 2012. "Ancient Admixture in Human History." *Genetics* 192: 1065–1093. https://doi.org/10.1534/genetics.112.145037.

Peel, E., L. Silver, P. Brandies, et al. 2022. "Best Genome Sequencing Strategies for Annotation of Complex Immune Gene Families in Wildlife." *GigaScience* 11: giac100. https://doi.org/10.1093/gigascience/giac100.

Peter, B. M. 2020. "100,000 Years of Gene Flow Between Neandertals and Denisovans in the Altai Mountains." bioRxiv 2020.03.13.990523. https://doi.org/10.1101/2020.03.13.990523.

Pilot, M., C. Greco, B. M. vonHoldt, et al. 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. https://doi.org/10.1111/eva.12595.

Plassais, J., J. Kim, B. W. Davis, et al. 2019. "Whole Genome Sequencing of Canids Reveals Genomic Regions Under Selection and Variants Influencing Morphology." *Nature Communications* 10: 1489. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09373-w.

Porretta, D., and D. Canestrelli. 2023. "The Ecological Importance of Hybridization." *Trends in Ecology & Evolution* 38: 1097–1108. https://doi.org/10.1016/j.tree.2023.07.003.

Quilodrán, C. S., J. I. Montoya-Burgos, and M. Currat. 2020. "Harmonizing Hybridization Dissonance in Conservation." *Communications Biology* 3: 391. https://doi.org/10.1038/s42003-020-1116-9.

Quinlan, A. R., and I. M. Hall. 2010. "BEDTools: A Flexible Suite of Utilities for Comparing Genomic Features." *Bioinformatics* 26: 841–842. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033.

Salvatori, V., V. Donfrancesco, A. Trouwborst, et al. 2020. "European Agreements for Nature Conservation Need to Explicitly Address Wolf-Dog Hybridisation." *Biological Conservation* 248: 108525. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108525.

Salvatori, V., R. Godinho, C. Braschi, L. Boitani, and P. Ciucci. 2019. "High Levels of Recent Wolf × Dog Introgressive Hybridization in Agricultural Landscapes of Central Italy." *European Journal of Wildlife Research* 65: 73. https://doi.org/10.1007/s10344-019-1313-3.

Santostasi, N. L., O. Gimenez, R. Caniglia, et al. 2021. "Estimating Admixture at the Population Scale: Taking Imperfect Detectability and Uncertainty in Hybrid Classification Seriously." *Journal of Wildlife Management* 85: 1031–1046. https://doi.org/10.1002/jwmg.22038.

Sarabia, C., I. Salado, A. Fernández-Gil, et al. 2025. "Potential Adaptive Introgression From Dogs in Iberian Grey Wolves (*Canis lupus*)." *Molecular Ecology* 34, no. 12: e17639. https://doi.org/10.1111/mec.17639.

Schubert, M., L. Ermini, C. D. Sarkissian, et al. 2014. "Characterization of Ancient and Modern Genomes by SNP Detection and Phylogenomic and Metagenomic Analysis Using PALEOMIX." *Nature Protocols* 9: 1056–1082. https://doi.org/10.1038/nprot.2014.063.

Schüll, S., S. D. Günther, S. Brodesser, et al. 2015. "Cytochrome c Oxidase Deficiency Accelerates Mitochondrial Apoptosis by Activating Ceramide Synthase 6." *Cell Death & Disease* 6: e1691. https://doi.org/10.1038/cddis.2015.62.

Schweizer, R. M., A. Durvasula, J. Smith, et al. 2018. "Natural Selection and Origin of a Melanistic Allele in North American Gray Wolves." *Molecular Biology and Evolution* 35: 1190–1209. https://doi.org/10.1093/molbev/msy031.

Shan, S., F. Xu, and B. Brenig. 2021. "Genome-Wide Association Studies Reveal Neurological Genes for Dog Herding, Predation, Temperament, and Trainability Traits." *Frontiers in Veterinary Science* 8: 693290. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.693290.

Skoglund, P., E. Ersmark, E. Palkopoulou, and L. Dalén. 2015. "Ancient Wolf Genome Reveals an Early Divergence of Domestic Dog Ancestors and Admixture Into High-Latitude Breeds." *Current Biology* 25: 1515–1519. https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.019.

Smeds, L., J. Aspi, J. Berglund, I. Kojola, K. Tirronen, and H. Ellegren. 2021. "Whole-Genome Analyses Provide no Evidence for Dog Introgression in Fennoscandian Wolf Populations." *Evolutionary Applications* 14: 721–734. https://doi.org/10.1111/eva.13151.

Smith, J., G. Coop, M. Stephens, and J. Novembre. 2018. "Estimating Time to the Common Ancestor for a Beneficial Allele." *Molecular Biology and Evolution* 35: 1003–1017. https://doi.org/10.1093/molbev/msy006.

Stronen, A. V., C. S. Birkenhain, R. Caniglia, et al. 2025. "European Conservation Policy Needs a Clear Definition of 'Wolf-Dog Hybrid'." *Biological Conservation* 308: 111254. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2025.111254.

Stronen, A. V., F. Mattucci, E. Fabbri, et al. 2022. "A Reduced SNP Panel to Trace Gene Flow Across Southern European Wolf Populations and Detect Hybridization With Other Canis Taxa." *Scientific Reports* 12: 4195. https://doi.org/10.1038/s41598-022-08132-0.

Szklarczyk, D., R. Kirsch, M. Koutrouli, et al. 2023. "The STRING Database in 2023: Protein–Protein Association Networks and Functional Enrichment Analyses for Any Sequenced Genome of Interest." *Nucleic Acids Research* 51: D638–D646. https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000.

Tajima, F. 1989. "Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism." *Genetics* 123: 585–595. https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.585.

Taylor, S. A., and E. L. Larson. 2019. "Insights From Genomes Into the Evolutionary Importance and Prevalence of Hybridization in Nature." *Nature Ecology & Evolution* 3: 170–177. https://doi.org/10.1038/s41559-018-0777-y.

Thalmann, O., B. Shapiro, P. Cui, et al. 2013. "Complete Mitochondrial Genomes of Ancient Canids Suggest a European Origin of Domestic Dogs." *Science* 342: 871–874. https://doi.org/10.1126/science.1243650.

Todesco, M., M. A. Pascual, G. L. Owens, et al. 2016. "Hybridization and Extinction." *Evolutionary Applications* 9: 892–908. https://doi.org/10.1111/eva.12367.

Tonoike, A., K. Otaki, G. Terauchi, et al. 2022. "Identification of Genes Associated With Human-Canine Communication in Canine Evolution." *Scientific Reports* 12: 6950. https://doi.org/10.1038/s41598-022-11130-x.

Van Der Auwera, G. A., M. O. Carneiro, C. Hartl, et al. 2013. "From FastQ Data to High-Confidence Variant Calls: The Genome Analysis Toolkit Best Practices Pipeline." *CP in Bioinformatics* 43, no. 1110: 11.10.1–11.10.33. https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1110s43.

Vilà, C., and R. K. Wayne. 1999. "Hybridization Between Wolves and Dogs." *Conservation Biology* 13: 195–198. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1999.97425.x.

Voges, T.-S., E. B. Lim, A. MacKenzie, et al. 2024. "Phenotypic Assessment of Cox10 Variants and Their Implications for Leigh Syndrome." *BMC Research Notes* 17: 228. https://doi.org/10.1186/s13104-024-06879-5.

Volpin, V., T. Michels, A. Sorrentino, et al. 2020. "CAMK1D Triggers Immune Resistance of Human Tumor Cells Refractory to Anti–PD-L1 Treatment." *Cancer Immunology Research* 8: 1163–1179. https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0608.

vonHoldt, B. M., J. P. Pollinger, K. E. Lohmueller, et al. 2010. "Genome-Wide SNP and Haplotype Analyses Reveal a Rich History Underlying Dog Domestication." *Nature* 464: 898–902. https://doi.org/10.1038/nature08837.

vonHoldt, B. M., E. Shuldiner, I. J. Koch, et al. 2017. "Structural Variants in Genes Associated With Human Williams-Beuren Syndrome Underlie Stereotypical Hypersociability in Domestic Dogs." *Science Advances* 3: e1700398. https://doi.org/10.1126/sciadv.1700398.

Vonholdt, B. M., D. R. Stahler, D. W. Smith, D. A. Earl, J. P. Pollinger, and R. K. Wayne. 2008. "The Genealogy and Genetic Viability of Reintroduced Yellowstone Grey Wolves." *Molecular Ecology* 17: 252–274. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03468.x.

Wang, C., O. Wallerman, M.-L. Arendt, et al. 2021. "A Novel Canine Reference Genome Resolves Genomic Architecture and Uncovers Transcript Complexity." *Communications Biology* 4: 185. https://doi.org/10.1038/s42003-021-01698-x.

Waples, R. K., A. Albrechtsen, and I. Moltke. 2019. "Allele Frequency-Free Inference of Close Familial Relationships From Genotypes or Low-Depth Sequencing Data." *Molecular Ecology* 28: 35–48. https://doi.org/10.1111/mec.14954.

Xu, Q., G.-Y. Yang, N. Liu, et al. 2012. "P_4 -ATPase ATP8A2 Acts in Synergy With CDC50A to Enhance Neurite Outgrowth." *FEBS Letters* 586: 1803–1812. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.018.

Zanni, M., R. Brogi, E. Merli, and M. Apollonio. 2023. "The Wolf and the City: Insights on Wolves' Conservation in the Anthropocene." *Animal Conservation* 26: 766–780. https://doi.org/10.1111/acv.12858.

Zimen, E., and L. Boitani. 1975. "Number and Distribution of Wolves in Italy." *Zeitschrift Saeugetierkunde* 40: 102–112.