Des preuves génétiques révèlent une hybridation importante entre loups et chiens dans la péninsule Italienne : mise en garde contre une gestion inefficace

Biological Conservation 313 (2026) 111615

Contents lists available at ScienceDirect

Biological Conservation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biocon

Genetic evidence reveals extensive wolf-dog hybridisation in peninsular Italy: warnings against ineffective management

Rita Lorenzini [a], Antonella Pizzarelli [a], Lorenzo Attili [a,*], Massimo Biagetti [b], Carla Sebastiani [b], Paolo Ciucci [c]

[a] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri, Grosseto, Italy
[b] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati", Perugia, Italy
[c] Università di Roma La Sapienza, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Charles Darwin", Rome, Italy

Résumé

L'hybridation entre loups et chiens (WDH) - une forme d'hybridation introgressive anthropique - a pu se produire occasionnellement depuis l'époque de la domestication. Plus récemment, cependant, malgré le rétablissement continu des populations de loups en Europe, le nombre élevé de chiens domestiques et les conditions écologiques marginales peuvent présenter des risques accrus pour leur intégrité génétique. **En conséquence**, la WDH est actuellement reconnue comme l'une des plus grandes menaces pour les loups Européens, avec des effets potentiels en cascade sur les systèmes socio-écologiques. À partir d'ADN de haute qualité provenant de tissus de 748 loups retrouvés morts entre 2020 et 2024, ainsi que de 26 échantillons supplémentaires prélevés entre 1993 et 2003, nous avons évalué la WDH dans la population de loups de la péninsule Italienne. À l'aide de 23 loci STR autosomiques et de 5 loci liés au chromosome Y pour les mâles, nous avons détecté une forte proportion (46,7%) de loups croisés avec des chiens, dont 29,5% étaient des hybrides récents et 17,2% des générations de rétrocroisement plus anciennes. Si la plupart des hybridations initiales ont probablement eu lieu il y a environ 9 à 16 ans, quelques hybrides de première génération dans notre échantillon indiquent que le WDH se poursuit actuellement. Cela menace gravement l'intégrité génétique non seulement de la population de loups Italiens, mais aussi des populations de loups voisines par le biais de la dispersion. La situation que nous présentons, qui n'a **jamais** été signalée auparavant pour aucune population de loups dans le monde, sert d'exemple édifiant de la dynamique potentielle du WDH dans les paysages dominés par l'homme si le problème reste sans solution. Elle souligne également l'importance de prendre en compte la composition génétique des populations de loups lors de l'évaluation de leur statut de conservation, en particulier à la lumière du récent abaissement de leur statut de protection dans toute l'Europe.

Mots-clés : Hybridation anthropique, *Canis lupus*, ADN, Conservation, Responsabilité de gestion, Répétitions en tandem courtes (STR)

1. INTRODUCTION

Contrairement à l'hybridation naturelle, qui est une source de diversité et de nouveauté évolutive (Abbott et al., 2016), l'hybridation induite par l'homme (c'est-à-dire l'hybridation anthropique, Allendorf et al., 2001) est de plus en plus reconnue comme une menace pour la biodiversité (Mallet, 2005). **L'hybridation anthropique** peut entraîner la perte de l'intégrité génétique et des complexes génétiques coadaptés, la propagation de traits inadaptés et une dépression consanguine. Ces effets peuvent contribuer à la perte de biodiversité et, en cas d'introgression généralisée, pourraient entraîner l'extinction génomique par submersion génétique (Allendorf et al., 2001). Le croisement d'espèces domestiques avec leurs homologues sauvages constitue un exemple significatif d'hybridation anthropique (Todesco et al. 2016). Les formes domestiquées ont été sélectionnées artificiellement pour une série de traits morphologiques, physiologiques et comportementaux qui profitent aux humains, tels que la docilité et l'augmentation de la productivité. Cependant, ces traits peuvent être perturbateurs s'ils s'introgressent dans les populations de leurs ancêtres sauvages (Wilkins et al., 2014). Bien que l'on ait émis l'hypothèse que les traits introgressés des formes domestiquées pourraient aider les espèces parentales à s'adapter aux écosystèmes modifiés par l'homme (Grossen et al., 2014 ; Hindrikson et Tammeleht, 2025), la sélection positive des traits introgressés pourrait en réalité accélérer la perte de combinaisons génétiques uniques qui se sont développées au cours d'histoires évolutives distinctes (Bohling, 2016).

Le chien (*Canis lupus familiaris*) est le premier animal domestiqué à partir de lignées aujourd'hui éteintes de loups gris (*Canis lupus*), dont la domestication remonte à environ 40 000 ans, bien que la date exacte fasse encore l'objet de débats (Freedman et al., 2014). Si l'hybridation entre les loups et les chiens (ci-après WDH) a pu se produire depuis la domestication (Frantz et al., 2016 ; Pilot et al., 2018), la présence généralisée de chiens dans les paysages dominés par l'homme peut, dans certaines conditions, augmenter le risque de WDH (Randi, 2008). Paradoxalement, l'augmentation récente du nombre et de l'aire de répartition des loups en Europe (Di Bernardi et al., 2025) pourrait entraîner un risque accru de croisement avec les chiens, dont le nombre est estimé à environ 1 500 fois supérieur à celui des loups (Gompper, 2014).

L'hybridation se produit principalement entre les louves et les chiens mâles (Godinho et al., 2011 ; Lacolina et al., 2010), bien que l'inverse, à savoir l'accouplement de loups mâles avec des chiennes, puisse également se produire, mais rarement (Hindrikson et al., 2012). **Contrairement** aux prévisions théoriques antérieures (Vila et Wayne, 1999), les loups et les chiens se croisent lorsqu'ils en ont l'occasion, et leur progéniture fertile (F1s) peut facilement se rétrocroiser avec les populations parentales de loups. Des preuves à l'appui de cette théorie s'accumulent dans plusieurs pays Européens (Kusak et al., 2018 ; Pacheco et al., 2017 ; Salvatori et al., 2019 ; Tirronen et Kuznetsova, 2025). **En conséquence**, les loups Euro-Asiatiques sont, en moyenne, nettement plus introgressés que leurs homologues d'Asie de l'Est et d'Amérique du Nord, l'Europe présentant la plus forte fréquence d'individus métissés (Pilot et al., 2021). **En conséquence**, le WDH est désormais considéré comme l'une des principales menaces pour les loups en Europe (Hindrikson et al., 2017), et l'on craint que les variations génétiques et phénotypiques résultant de l'introgression canine aient un impact négatif sur le comportement et les caractéristiques du cycle de vie des loups (Randi, 2008), ainsi que sur le soutien des parties prenantes à la conservation des loups (Stronen et al., 2025).

Une gestion rapide et efficace des WDH est essentielle pour empêcher l'introgression canine de se propager davantage dans les populations de loups européennes. **Par conséquent**, même si la Convention de Berne et la directive Habitats ne font pas explicitement référence aux WDH, elles contiennent toutes deux des obligations légales pertinentes pour traiter cette question (Trouwborst, 2014). **En outre**, la recommandation n° 173/2014 de l'UE et un document d'orientation sur l'application des exigences strictes en matière de protection énoncées dans la directive « Habitats » de l'UE exigent des pays Européens qu'ils luttent contre les WDH par des mesures préventives et d'atténuation (Stronen et al., 2025). Le non-respect de ces exigences peut avoir un impact négatif sur l'évaluation et la conservation des populations de loups (Stronen et al., 2025).

Une gestion rapide et efficace des WDH est essentielle pour empêcher l'introgression canine de se propager davantage dans les populations de loups Européennes. **Par conséquent**, même si la Convention de Berne et la directive « Habitats » ne font pas explicitement référence aux WDH, elles contiennent toutes deux des obligations légales pertinentes pour traiter cette question (Trouwborst, 2014). **En outre**, la recommandation n° 173/2014 de l'UE et un document d'orientation sur l'application des exigences strictes en matière de protection énoncées dans la directive « Habitats » de l'UE exigent des pays Européens qu'ils luttent contre les WDH par des mesures préventives et d'atténuation (Stronen et al., 2025). Le non-respect de ces exigences peut avoir des répercussions négatives sur l'évaluation et la conservation des populations de loups (Stronen et al., 2025).

La gestion des WDH se heurte toutefois à des défis techniques, sociaux et politiques de taille, ce qui entraîne un retard dans sa mise en œuvre à travers l'Europe (Salvatori et al., 2020). Plusieurs facteurs contribuent à la complexité inhérente à la gestion des WDH, notamment les difficultés techniques liées à la détection des individus introgressés (Stronen et al., 2022*a*), le suivi insuffisant des populations (Salvatori et al., 2019), l'absence de consensus entre les scientifiques sur les mesures de gestion à prendre (Donfrancesco et al., 2019) et un cadre législatif peu clair aux niveaux national et international (Trouwborst, 2014). Pourtant, les modèles démographiques avertissent que l'inaction en matière de gestion, si les facteurs facilitant le WDH continuent sans contrôle, pourrait entraîner une introgression généralisée, voire un envahissement génétique des populations locales de loups (Santostasi et al., 2020, 2025).

À ce jour, aucune étude exhaustive n'a été menée pour évaluer et surveiller avec précision l'ampleur de l'introgression canine chez les loups à travers l'Europe, même si le phénomène a été signalé dans les neuf populations de loups existantes en Europe (Salvatori et al., 2020). **Néanmoins**, des études génétiques indépendantes menées dans certains pays Européens au cours des dernières décennies (revues dans Dziech, 2021) ont révélé une **faible** prévalence du métissage (c'est-à-dire la proportion d'individus métissés dans la population de loups). Une exception notable a récemment été signalée dans certaines localités du centre et du nord de l'Italie, où des enquêtes génétiques intensives non invasives ont révélé des niveaux d'introgression canine atteignant 50 à 70% (Salvatori et al., 2019 ; Santostasi et al., 2021).

Les loups en Italie ont été confrontés à un risque important d'extinction à la fin des années 1960 (Zimen et Boitani, 1975). Depuis lors, une série de mesures de conservation ont été adoptées en réponse à l'évolution des valeurs et des attitudes de la société à l'égard des loups,

notamment la protection juridique, la conservation de l'habitat et la gestion des conflits, qui ont contribué au rétablissement de la population (Boitani, 2003 ; Fabbri et al., 2007). La première preuve documentée sur le terrain de l'existence d'hybrides entre loups et chiens en Italie remonte au début des années 1970 (Boitani, 1986). Au cours des décennies suivantes, après le rétablissement des loups à l'échelle nationale, on a constaté une augmentation notable du nombre de loups présentant des traits morphologiques inhabituels (Boitani et Ciucci, 1993). **Cependant**, les études analysant des échantillons de tissus provenant de loups trouvés morts, à l'aide de marqueurs génétiques uniparentaux et biparentaux, n'ont pas révélé de niveaux significatifs de WDH (c'est-à-dire 2 à 6%) (Lorenzini et al., 2014 ; Lucchini et al., 2004 ; Randi et Lucchini, 2002 ; Verardi et al., 2006). Il est probable que, parallèlement à l'expansion de l'aire de répartition du loup en Italie, le WDH se soit effectivement propagé pendant cette période (Galaverni et al., 2017). **Cependant**, ces premières études, peut-être limitées par des marqueurs diagnostiques restreints et un échantillonnage spatial et temporel inadéquat, n'avaient pas la puissance statistique nécessaire pour détecter les individus métissés et leur répartition à l'échelle locale, régionale et nationale (Ciucci, 2012). Des études ultérieures, utilisant des ensembles de marqueurs génétiques plus informatifs, ont confirmé cette hypothèse (par exemple, Caniglia et al., 2013, 2014 ; Randi et al., 2014). **De plus**, sur la base de données génomiques, Galaverni et al. (2017) ont confirmé que des individus métissés étaient répartis dans toute la population de loups de la péninsule Italienne et que des hybridations récurrentes et une introgression profonde avaient très probablement eu lieu depuis le début du rétablissement de la population.

À l'exception de deux projets pilotes cofinancés par le programme Life de l'UE (à savoir Ibriwolf, LIFE10-NAT-IT-000265 ; Mirco Lupo, LIFE13-NAT-IT-000728) et d'un projet de gestion d'un an mené par la région Toscane (G. Romeo, communication personnelle), aucune stratégie de gestion globale n'a été mise en œuvre en Italie pour prévenir et atténuer le WDH à l'échelle nationale. Dans cette étude, basée sur un nombre particulièrement important de loups systématiquement collectés par le réseau national des Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), nous avons étudié pour la première fois l'étendue actuelle du WDH dans la péninsule Italienne. Nous avons notamment distingué les loups non métissés, les hybrides récents (c'est-à-dire les F1, les F2 et les individus métissés des deux premières générations de rétrocroisement) et les individus introgressés (c'est-à-dire les troisième génération et les générations suivantes de rétrocroisements).

Les principaux objectifs de notre étude étaient les suivants : **i**) estimer la proportion d'individus ayant des ancêtres canins (c'est-à-dire la prévalence) parmi les loups présumés échantillonnés dans toute la péninsule Italienne entre 2020 et 2024. Comme il s'agit de la première enquête sur le WDH à l'échelle de la population de loups de la péninsule, les résultats obtenus sont utiles pour évaluer l'efficacité de la gestion passée et actuelle du WDH en Italie ; **ii**) évaluer si les hybrides récents et les loups introgressés étaient structurés spatialement ou répartis uniformément dans les zones d'échantillonnage régionales. Alors que le premier cas indiquerait une occurrence locale de WDH, probablement associée à des conditions écologiques et anthropiques spécifiques, le second serait révélateur d'un métissage largement répandu ; **iii**) comparer les estimations de la prévalence des WDH au fil du temps, en opposant l'échantillon 2020-2024 à 26 échantillons invasifs supplémentaires de loups présumés collectés entre 1993 et 2003. Cette comparaison permettrait d'approfondir l'hypothèse selon laquelle l'hybridation entre les loups de la péninsule Italienne a atteint son

apogée vers la fin des années 1990 (Galaverni et al., 2017) ; **iv**) évaluer si une composante génétique majeure du berger allemand a été révélée chez les hybrides que nous avons détectés, car une précédente analyse génomique suggérait que la principale contribution aux hybrides loup-chien en Italie provenait probablement de cette race (Galaverni et al., 2017).

En replaçant nos conclusions dans le contexte d'études antérieures portant sur la même population et d'autres populations de loups en Europe menacées par l'hybridation anthropique, nous inscrivons nos résultats dans un cadre de conservation plus large. Dans l'ensemble, notre objectif pratique est de sensibiliser les défenseurs de l'environnement, les praticiens, les administrateurs et le public aux risques potentiels liés au fait de négliger une gestion opportune et efficace des WDH, en particulier dans les paysages modifiés par l'homme récemment recolonisés par les loups (Di Bernardi et al., 2025). **Enfin**, nous discutons également des implications de nos conclusions par rapport au récent déclassement du statut de protection des loups en Europe, qui n'a pas tenu compte de l'intégrité génétique des populations de loups (Stronen et al., 2025). Bien que notre étude se concentre sur les loups de la péninsule Italienne, ses implications vont au-delà du loup en tant qu'espèce modèle, car l'hybridation anthropique non gérée de la faune sauvage est une menace de plus en plus préoccupante dans les paysages de plus en plus dominés par l'homme (Stronen et al., 2025).

2 MATERIEL et METHODES

2.1. Échantillons

Au total, 748 échantillons de tissus (ci-après dénommés « échantillons récents ») ont été prélevés de manière opportuniste sur des loups présumés morts ou sauvés vivants dans la péninsule italienne (Toscane, Ombrie/Marches, Latium, Abruzzes/Molise, Basilicate, Pouilles, Campanie, Calabre) entre 2020 et 2024 (détails dans l'annexe S1). Des échantillons supplémentaires provenant de 26 loups datant de la décennie 1993-2003 (« anciens échantillons ») ont également été prélevés dans les Abruzzes, zone historique et centrale de l'Italie où vit le loup.

La base de données de référence sur la population de loups, utilisée pour attribuer les génotypes des loups présumés inconnus à leur pool génétique d'origine, comprenait 100 loups prélevés dans les Apennins entre 2015 et 2017. Ils ont été sélectionnés comme individus de référence après avoir été classés comme loups non mélangés par des valeurs d'appartenance proportionnelle individuelle (q) supérieures à 0,990 dans une procédure d'attribution bayésienne des génotypes STR autosomiques, et par leurs haplotypes du chromosome Y du loup. **De plus**, l'absence de tout signe morphologique évident d'hybridation avec le chien a été confirmée par des zoologistes et des vétérinaires experts après inspection des carcasses ou des animaux vivants utilisés comme référence (voir Ciucci, 2012 ; Ciucci et al., 2003). Des prélèvements musculaires ou salivaires provenant de 185 chiens de taille moyenne et grande, tant de race pure (n = 58) que bâtards (n = 127) (annexe S1), ont également été collectés pour la constitution d'une base de données canine.

2.2. Méthode de laboratoire

La méthode de laboratoire utilisée pour obtenir les génotypes autosomiques à attribuer statistiquement aux pools génétiques respectifs, ou pour détecter les signaux de leur mélange génétique, a suivi un protocole validé qui a été décrit en détail dans Lorenzini et al. (2022).

En bref, l'ADN a été isolé à partir d'environ 15 mg de muscle ou d'un prélèvement salivaire à l'aide du QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) ou du Maxwell16 Instrument (Promega, Madison, WI, États-Unis) pour l'isolation automatisée de l'ADN génomique, puis quantifié à l'aide du Quantus Fluorometer (Promega). Vingt-trois loci STR autosomiques canins (Annexe S1), sélectionnés principalement en fonction de leur capacité à différencier de manière fiable les loups, les chiens et les hybrides (Lorenzini et al., 2014, 2022), ont été amplifiés pour chaque échantillon afin d'obtenir des profils multilocus individuels.

Les loups mâles ont également été génotypés à cinq loci STR sur le chromosome Y (annexe S1) et combinés en haplotypes (Tableau SI) afin d'évaluer l'origine sauvage ou domestique de leur lignée paternelle. Une délétion dominante de 3 pb dans le locus K codant pour le gène β-defensin CBD103 a été suggérée comme une mutation mélanistique d'origine domestique (Anderson et al., 2009), bien qu'il ait également été rapporté que cette délétion ne permet pas de diagnostiquer de manière certaine l'ascendance canine introgressée chez le loup d'Italie (Caniglia et al., 2013). Malgré cela, chaque échantillon de loup a été génotypé au locus K afin de trouver d'autres indices d'hybridation.

2.3. Attribution du génotype par analyse bayésienne

Des analyses statistiques visant à attribuer des individus inconnus à la population de loups Italiens et à identifier des génotypes mixtes loup-chien ont été réalisées à l'aide d'une base de données démographique comprenant 100 loups de référence et 185 chiens de référence, selon un **modèle de regroupement bayésien** mis en œuvre dans STRUCTURE v 2.3.4 (Falush et al., 2003). Les valeurs seuils appropriées de l'appartenance proportionnelle (q) pour attribuer des génotypes multilocus uniques aux groupes génétiques déduits par STRUCTURE ont été dérivées à partir des résultats d'études de simulation menées avec HYBRIDLAB (Nielsen et al., 2006) sur nos 285 échantillons de référence de loups et de chiens. Les détails des simulations et des procédures statistiques sont fournis dans l'annexe S1 et dans Lorenzini et al. (2014, 2022).

Des travaux de simulation approfondis (Lorenzini et al., 2014 ; Godinho et al., 2015 ; Caniglia et al., 2020 ; Santostasi et al., 2021) indiquent qu'il n'est pas réaliste de distinguer avec précision les générations mixtes individuelles sur la base des données STR, même en utilisant un nombre élevé de marqueurs (Stronen et al., 2022b). Cette limitation résulte de chevauchements importants dans leurs plages de valeurs q, à l'exception notable des individus F1 de première génération. Pour cette raison, selon les seuils obtenus dans les simulations avec notre ensemble de données de référence des classes parentales, trois catégories diagnostiques ont été définies pour attribuer des génotypes inconnus : (**i**) loups non mélangés, avec des valeurs q égales ou supérieures à 0,990 ; (**ii**) loups introgressés (anciens rétrocroisements avec une ascendance canine minimale), avec des valeurs q comprises entre 0,960 et 0,990 et/ou des haplotypes Y canins ; (**iii**) hybrides de génération récente (FI, F2, rétrocroisements de première et deuxième génération - BC1w et BC2w, respectivement), avec des valeurs g égales ou inférieures à 0,960 (Tableau 1). **En général**, aucun trait morphologique inhabituel permettant d'identifier le métissage n'était disponible, de sorte que l'attribution des individus était basée uniquement sur leurs génotypes.

À l'aide du package R Boot (Canty et Ripley, 2024), nous avons testé les différences dans les proportions d'individus hybrides entre les ensembles de données d'échantillons récents et anciens à l'aide d'intervalles de confiance bootstrappés à 95% (IC 95%) ; H_0 (c'est-à-dire aucune différence) était accepté si l'IC 95% bootstrappé incluait la valeur 0.

Tableau 1. Classes diagnostiques des génotypes multilocus individuels pour les loups italiens présumés, telles que définies par l'analyse bayésienne de 23 loci STR autosomiques et de 5 loci STR sur le chromosome Y des mâles (haplotype Y). q = appartenance proportionnelle individuelle

Diagnostic class	Definition	q	Dog Y-haplotype
Wolf	Individual with no or not diagnosable admixture with the dog	$q \geq 0.990$	No
Introgressed wolf	Individual with only Y-haplotype dog ancestry	$q \geq 0.990$	Yes
Introgressed wolf	Individual with minimal dog ancestry at autosomal STRs	$0.960 < q < 0.990$	No
Introgressed wolf	Individual with minimal dog ancestry at autosomal STRs and dog Y-haplotype	$0.960 < q < 0.990$	Yes
Recent hybrid	Individual recently admixed with the dog	$q \leq 0.960$	No
Recent hybrid	Individual recently admixed with the dog and dog Y-haplotype	$q \leq 0.960$	Yes

2.4. Composante génétique d'une race canine chez les hybrides loup-chien

Une fois les génotypes hybrides loup-chien identifiés par la procédure d'attribution bayésienne et les valeurs q individuelles dérivées, nous avons vérifié si la principale composante génétique canine chez les hybrides était représentée par le berger allemand, comme le suggéraient les données SNPs et les méthodes de reconstruction génomique de l'ascendance (Galaverni et al., 2017). À cette fin, nous avons utilisé notre ensemble de données précédent composé de 100 loups et 185 chiens, auquel nous avons ajouté 21 nouveaux échantillons de bergers allemands et 75 hybrides loup-chien, sélectionnés parmi l'échantillon de 219 hybrides (214 récemment collectés et 5 anciens) obtenu à l'aide de STRUCTURE et l'ensemble complet de 774 loups présumés (voir Résultats). Ces 75 hybrides ont été sélectionnés sur la base de leurs valeurs q inférieures à 0,900. Les hybrides présentant des valeurs q plus élevées (n = 144, comprises entre 0,901 et 0,960 ; voir Résultats) ne permettaient pas d'évaluer clairement la composante canine et ont été exclus des calculs.

Dans un premier temps, nous avons effectué une analyse discriminante exploratoire des composantes principales, DAPC (Jombart et al., 2010), à l'aide du package Adegenet 2.1.6 (Jombart, 2008) pour le logiciel R 4.2.1 sur l'interface web, afin de décrire qualitativement la variabilité génétique globale de notre ensemble de données au niveau de la population. La DAPC identifie des groupes discrets d'individus, maximisant la variation entre les groupes prédéfinis tout en minimisant la variation au sein des groupes, sans s'appuyer sur un modèle génétique sous-jacent. À la suite des résultats basés sur les STRs de Big et al. (2015), qui ont montré que les bergers allemands (GSD) et les chiens-loups Tchécoslovaques (CLW) partagent le même groupe génétique et sont clairement bien séparés des autres races de chiens de type loup/berger, nous avons entré quatre groupes prédéfinis dans les calculs, qui correspondaient aux loups, aux chiens, aux GSD + CLW et aux hybrides. **Deuxièmement**, afin de compléter l'analyse multivariée, STRUCTURE a été mis en œuvre sur le même ensemble de données pour une attribution bayésienne des génotypes individuels dans les mêmes conditions que dans les analyses précédentes (Annexe S1).

3. RESULTATS

Tous les individus ont été génotypés à 23 loci STR autosomiques. Un sous-échantillon de 229 mâles (voir ci-dessous) a également été génotypé à 5 STR sur le chromosome Y. Conformément à Salvatori et al. (2019), les génotypes multilocus individuels présentant plus de 8% d'allèles manquants ont été écartés de l'ensemble de données original de 774 loups présumés. En raison de la forte dégradation des carcasses et/ou de la mauvaise qualité de

l'ADN extrait, 22 échantillons présentaient quatre loci manquants ou plus dans leurs génotypes et ont été supprimés. Au total, 752 échantillons récents (n = 726, années 2020-2024) et anciens (n = 26, années 1993-2003) ont finalement été conservés pour les analyses en aval.

Conformément à la littérature, nos cinq loci liés au chromosome Y ont défini deux haplotypes (Tableau S1) propres au loup italien, absents chez le chien et les autres populations de loups en Europe (cette étude, Randi et al., 2014).

3. 1. Analyse des échantillons récents (2020-2024)

Sur la base des haplotypes du chromosome Y et des valeurs seuils dans le groupe des loups à partir d'un panel de 23 loci sur les autosomes, 387 individus (53,3%) dans l'ensemble des données des échantillons récents (n = 726) ont été classés comme des loups **non** métissés ($q \geq 0{,}990$, rapport des sexes 1,10 mâles/femelles). Les 125 autres individus (17,2%) ont été classés comme des loups introgressés, dont 122 présentaient $0{,}960 < q < 0{,}990$ et 3 présentaient des STRs de loup ($q \geq 0{,}990$) mais des haplotypes Y canins (voir ci-dessous et Tableau 1). Les 214 loups putatifs restants (29,5%) ont été classés comme hybrides de génération récente ($q \leq 0{,}960$).

Trois des 214 hybrides récents (1,4%, soit 0,4% de l'échantillon total) étaient très probablement des croisements F1 de première génération ($0{,}475 \leq q \leq 0{,}562$) et ont été collectés dans les régions des Abruzzes, de Calabre et du Latium. Alors que deux d'entre eux étaient des femelles, le mâle présentait un haplotype Y canin (H6, Tableau S1). Trois autres hybrides étaient probablement des F2 et/ou des rétrocroisements de première génération BC1w ($0{,}660 \leq q \leq 0{,}719$), tous provenant du Latium. L'un d'eux était un mâle portant un haplotype Y canin (H3). Tous les autres hybrides (97,2%) étaient probablement des rétrocroisements de deuxième génération (BC2w), bien que nous ne puissions exclure que des BC1w puissent également être inclus. Sur les 214 hybrides récents, 108 étaient des mâles et 96 des femelles (ratio sexuel de 1,13 mâle/femelle). Pour 10 individus, le sexe était inconnu ou les haplotypes Y mâles n'ont pas été identifiés. Vingt-trois (21,3%) des 108 hybrides mâles dont le génotype sexuel a été déterminé portaient des haplotypes Y non lupins, tandis que 85 (78,7%) portaient l'un des deux haplotypes (H1, H13) propres à la population lupine Italienne. Treize hybrides récents (6,1%) présentaient également une copie de l'allèle de délétion de 3 pb au locus K. Il est intéressant de noter que deux femelles des Marches, classées comme louves non métissées d'après leurs génotypes STR, étaient homozygotes pour la délétion de 3 pb, seule preuve d'une possible introgression passée provenant du chien. Cependant, comme la délétion n'est pas diagnostique, elle n'a pas contribué à classer les génotypes inconnus.

Sur les 125 individus classés comme introgressés, 3 ont été reconnus uniquement sur la base de leurs haplotypes Y canins. Sur les 125 individus, 58 étaient des femelles et 64 des mâles (ratio sexuel de 1,10 mâles/femelle), tandis que le sexe était inconnu pour 3 spécimens. Cinquante-cinq mâles (86,0%) portaient des haplotypes Y de loup, tandis que 9 (14,0%) présentaient les haplotypes canins H7 (n = 8) et H4 (n = 1). Dans notre base de données de référence sur les chiens, H7 était l'haplotype Y le plus fréquent et était largement partagé par de nombreux chiens de race pure et bâtards, ce qui rend cette information peu informative sur l'origine de la race canine pour les croisements passés. **En revanche**, H4 n'a été trouvé

que chez la race de chien-loup Tchécoslovaque. L'allèle de délétion de 3 pb au locus K n'était présent qu'en un seul exemplaire chez une femelle introgressée.

Afin de déterminer si l'introgression canine dans le pool génétique des loups pouvait être retracée exclusivement à partir des haplotypes Y, un sous-échantillon exploratoire de 60 mâles classés comme loups non métissés d'après leurs génotypes STR autosomiques a également été analysé au niveau des loci STR du chromosome Y. Cinquante-sept (95,0%) d'entre eux étaient porteurs d'haplotypes Y de loup, tandis que trois présentaient un haplotype de chien (H7) et ont finalement été diagnostiqués comme des loups introgressés (voir ci-dessus) sur la base de leur lignée paternelle, malgré leurs génotypes STR de loup.

3.2. Répartition géographique des échantillons

Les échantillons classés comme hybrides récents, loups introgressés et loups non métissés provenant de l'ensemble des données ont été répartis géographiquement en fonction des régions où ils ont été collectés. Leur répartition (Fig. 1, Tableau 2) suggère que la proportion d'hybrides récents était plus élevée dans les régions occidentales (Toscane, Latium, Campanie, Calabre), allant de 27,2 à 42,8%, par rapport aux régions orientales (Abruzzes/Molise, Ombrie/Marches, Basilicate, Pouilles), où la proportion variait de 15,8 à 25,8%. **À l'inverse**, le contraire semble s'appliquer aux loups introgressés, qui présentaient les proportions les plus faibles dans les régions occidentales de Campanie, du Latium et de Toscane, avec des pourcentages de 11,5, 12,2 et 16,8, respectivement.

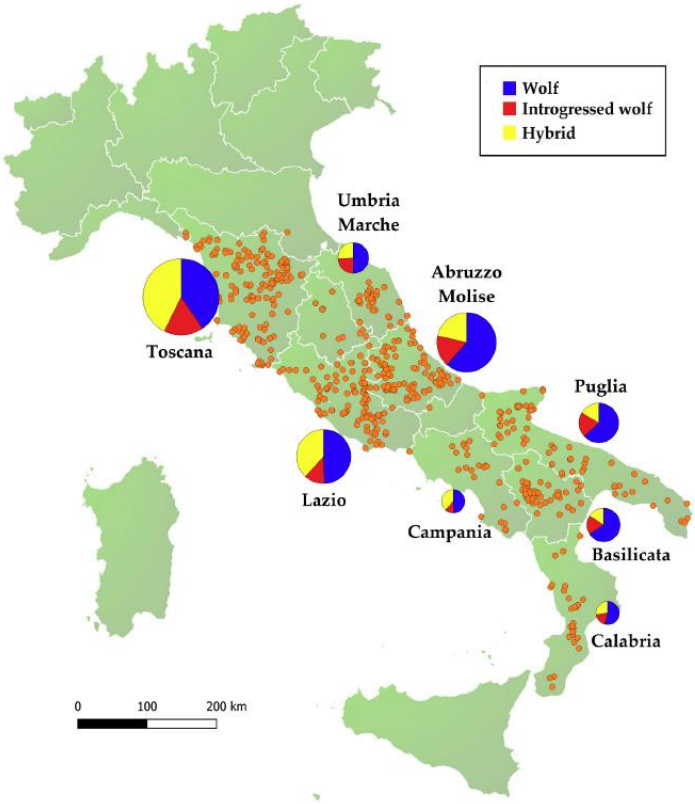

Fig. 1. Répartition spatiale des 726 échantillons analysés entre 2020 et 2024 dans la péninsule Italienne. Les diagrammes circulaires indiquent les proportions de loups non métissés (Loup), de loups introgressés (Loup introgressé) et d'hybrides récents (Hybride) à l'échelle régionale (voir également le Tableau 2 pour plus de détails). La taille des cercles représente la taille de l'échantillon dans chaque région. Les échantillons provenant de l'Ombrie et des Marches ont été regroupés, tout comme ceux provenant des Abruzzes et du Molise

Tableau 2. Classes diagnostiques et répartition par région des 726 loups présumés collectés dans la péninsule italienne au cours de la période 2020-2024. Entre parenthèses, le pourcentage de loups introgressés et d'hybrides récents

	Toscana	Umbria/Marche	Lazio	Abruzzo/Molise	Campania	Puglia	Basilicata	Calabria
Wolf	70	35	61	83	13	57	50	18
Introgressed wolf	29 (16.8 %)	17 (24.3 %)	15 (12.2 %)	23 (17.0 %)	3 (11.5 %)	18 (20.0 %)	14 (18.4 %)	6 (18.2 %)
Recent hybrid	74 (42.8 %)	18 (25.8 %)	47 (38.2 %)	29 (21.5 %)	10 (38.5 %)	15 (16.7 %)	12 (15.8 %)	9 (27.2 %)
	173	70	123	135	26	90	76	33

3.3. Analyse d'échantillons anciens (1993-2003)

Dix-sept (65,4%) des 26 échantillons présumés de loups prélevés dans l'aire de répartition historique des Apennins (Abruzzes) entre 1993 et 2003 ont été attribués à la population de loups (Tableau S2). Quatre étaient des loups introgressés et cinq étaient des hybrides récents. Deux individus ont été classés comme loups introgressés en raison de la présence d'haplotypes Y canins (H3, H7), mais pas en raison de leurs génotypes STR autosomiques. Deux hybrides, une femelle et un mâle, étaient très probablement des croisements F1 de première génération (valeurs q dans le groupe des loups = 0,407 et 0,587, respectivement), le mâle présentant également un haplotype Y canin (H6). Trois hybrides femelles étaient probablement BC1w et/ou BC2w (0,667 ≤ q ≤ 0,937).

La proportion d'hybrides **récents** dans l'ensemble de données d'échantillons anciens (5/26 = 0,192) (Tableau S2) était **inférieure** à celle de l'ensemble de données des échantillons récents (214/726 = 0,295), même si cette différence, basée sur 104 rééchantillonnages bootstrap, n'était pas significative (IC à 95% = -0,2840- 0,073). **En revanche**, la proportion d'hybrides F1 de première génération datant de la décennie 1993-2003 (2/26 = 0,077), qui représentait 40% de tous les hybrides récents, était significativement plus élevée que la proportion obtenue à partir des échantillons collectés entre 2020 et 2024 (3/726 = 0,004), qui représentaient 1,4% de tous les hybrides récents de la péninsule Italienne (IC à 95% bootstrappé de la différence entre les deux ensembles de données = 0,065-0,105).

3.4. Contribution du berger allemand aux hybrides loup-chien

La variabilité génétique globale a été décrite qualitativement à l'aide du DAPC, où quatre groupes prédéfinis ont été entrés dans les calculs, correspondant aux loups, aux chiens, aux GSD + CLW et aux hybrides.

La procédure de validation croisée a suggéré de conserver 10 composantes principales (PC) dans l'analyse comme proxy pour une description optimale des données originales, les deux premières PC résumant le mieux la plupart de la diversité allélique (Fig. 2). Le premier axe PC distinguait clairement la ou les populations de chiens des loups et des hybrides, ces derniers se chevauchant partiellement avec les loups, comme prévu. Le deuxième axe PC séparait les GSD + CLW des autres chiens, avec un chevauchement limité entre les deux groupes.

Sur la base du même ensemble de données que celui utilisé dans le DAPC, nous avons exécuté STRUCTURE en définissant K = 4 comme le nombre le plus approprié de groupes génétiques significatifs déduits de notre ensemble de données selon la méthode de Puechmaille (Tableau 3, Figure 3). Conformément au DAPC, les bergers allemands (n = 21) et les chiens-loups Tchécoslovaques (n = 8) partageaient le même groupe génétique (III, appartenance proportionnelle moyenne Q = 0,948) avec des valeurs q individuelles comprises entre 0,867 et 0,993. **À l'inverse**, les autres chiens de race pure et les bâtards de la base de données (n = 177) se répartissaient principalement en **deux clusters** alternatifs (I, IV, totalisant Q = 0,928), ce qui suggère également une certaine **sous-structuration** de la

population. Les loups ont été affectés à un seul groupe privé (II) avec une moyenne Q = 0,993 (plage des valeurs q 0,977-0,996). Les hybrides ne partageaient qu'une petite partie de leur ascendance avec les groupes de chiens (valeurs Q = 0,043, 0,028 et 0,054 dans les groupes I, II et IV, respectivement), tandis que la majeure partie de leur ascendance était commune avec le groupe des loups (Q = 0,874), comme le montre clairement le nuage de points DAPC. Cela confirme nos conclusions précédentes selon lesquelles la plupart des hybrides **n'étaient pas** des croisements de première génération.

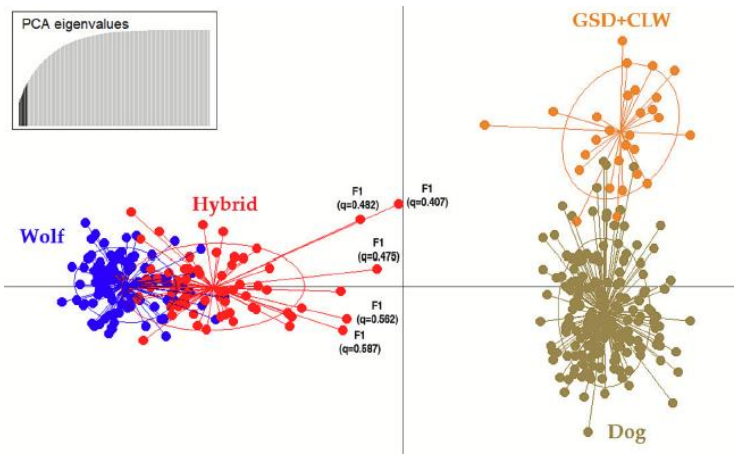

Fig. 2. Nuage de points DAPC basé sur 23 loci STR décrivant la variabilité génétique dans l'ensemble de données de 100 loups (Wolf), 75 hybrides loup-chien (Hybrid), 177 chiens bâtards et de race pure (Dog), 29 bergers allemands et chiens-loups Tchécoslovaques (GSD + CLW), représentés par les premières (axe X) et deuxième (axe Y) fonctions discriminantes. Le graphique représente les individus isolés par des points et les groupes par des ellipses d'inertie à 95%. Dans l'encart en haut à gauche, la proportion de variabilité expliquée par les 10 premières valeurs propres principales. Les hybrides de première génération (F1) obtenus à partir de l'analyse d'attribution bayésienne sont également indiqués avec leur proportion individuelle respective de valeurs d'appartenance (q) à la population de loups

Tableau 3. Probabilité moyenne d'appartenance (Q) pour les loups de référence, les chiens, les bergers allemands + les chiens-loups Tchécoslovaques (GSD + CLW) et les hybrides (avec des valeurs q < 0,900) dans les groupes génétiques déduits par STRUCTURE pour K = 4. Les fourchettes de probabilité d'appartenance aux groupes pertinents sont indiquées entre parenthèses. * Lorsqu'un hybride présumé F1 loup x berger allemand a été retiré de l'analyse, la valeur Q de la classe hybride dans le groupe III a diminué à 0,022, avec des valeurs individuelles comprises entre 0,001 et 0,154 (voir le texte pour plus de détails). N = taille de l'échantillon

	N	Cluster I	Cluster II	Cluster III	Cluster IV
Wolf	100	0.002	0.993 (0.977–0.996)	0.002	0.002
Dog	177	0.494	0.004	0.069	0.434
GSD + CLW	29	0.024	0.004	0.948 (0.867–0.993)	0.024
Hybrid	75	0.043 (0.002–0.451)	0.874 (0.407–0.992)	0.028 (0.001–0.518)*	0.054 (0.003–0.393)

Il est particulièrement intéressant de noter que l'ascendance canine moyenne la plus faible de la classe des hybrides se situait juste dans le groupe III (valeur Q = 0,028), ce qui suggère qu'en moyenne, la principale composante génétique des hybrides n'est commune ni aux bergers allemands ni aux chiens-loups Tchécoslovaques. La seule exception est un individu provenant des Abruzzes, collecté en 2001, avec une valeur q = 0,518 dans le cluster III, qui pourrait être un croisement avec un berger allemand. **De plus**, cet hybride présentait le même haplotype Y (H6) que tous les mâles bergers allemands (n = 9) de notre base de données, mais différent de celui des mâles chiens-loups Tchécoslovaques (H4, n = 4). Si cet individu était exclu de l'analyse, la valeur Q des hybrides du groupe III ne baissait que légèrement (0,022 contre 0,028), mais la fourchette des probabilités individuelles d'appartenance se rétrécissait considérablement (0,001-0,518 contre 0,001-0,154).

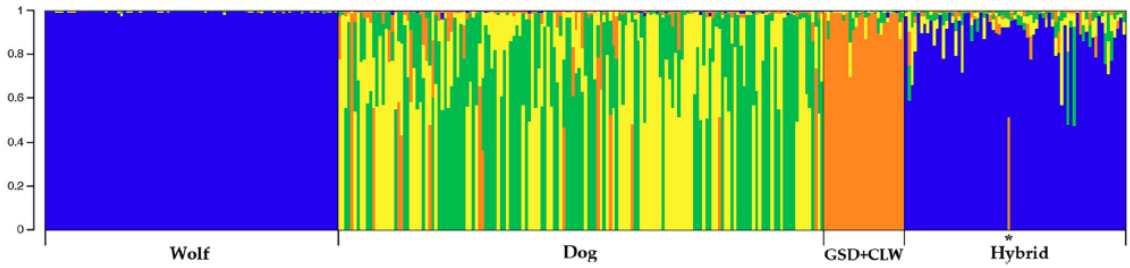

Fig. 3. Graphique à barres issu de STRUCTURE supposant quatre groupes génétiques (K = 4). Chaque barre verticale représente un individu et la longueur des sections de différentes couleurs est proportionnelle à l'appartenance (valeurs q) aux groupes génétiques déduits (I-IV, voir Tableau 3). L'étoile indique un possible F1 entre un loup (Q_{wolf} = 0,407) et un berger allemand ($_{qGSD+CLW}$ = 0,518). Ensemble de données comme dans la Figure 2. Le graphique à barres a été dessiné à l'aide de STRUCTURE PLOT (Ramasamy et al., 2014)

4. DISCUSSION

Nous avons détecté une proportion remarquablement élevée (46,7%) d'hybrides loup-chien dans notre échantillon de loups retrouvés morts dans toute la péninsule Italienne entre 2020 et 2024. Les loups hybrides comprenaient 29,5% d'hybrides récents, jusqu'aux rétrocroisements de première et deuxième génération, et 17,2% d'individus introgressés issus de générations de rétrocroisements plus anciennes. Bien que les loups hybrides aient été largement répartis dans toute la péninsule Italienne, les régions occidentales semblaient en compter une proportion plus élevée que les régions orientales. Sur une échelle temporelle, en tenant compte de la différence de taille des échantillons entre les ensembles de données de 1993-2003 et de 2020-2024, nous n'avons détecté aucune différence dans la proportion de loups hybrides entre les deux périodes d'échantillonnage, même si le premier ensemble de données présentait une proportion plus élevée de F1 par rapport à l'échantillon le plus récent. **Enfin**, nous n'avons pas trouvé de preuves étayant l'hypothèse précédente selon laquelle la race des bergers allemands contribuait le plus au métissage des loups Italiens (Galaverni et al., 2017). La situation que nous décrivons ici pour les loups de la péninsule Italienne présente des défis pratiques extraordinaires en matière de conservation. Après des décennies de gestion inefficace des WDH, elle sert d'exemple pour prévenir à temps des situations similaires dans d'autres populations de loups.

4.1. Mises en garde

Notre classification des « **hybrides de génération récente** » (c'est-à-dire avec des valeurs q < 0,960) est conforme à l'approche décrite par Caniglia et al. (2020) et reflète la définition opérationnelle d'un hybride loup-chien récemment proposée à des fins de conservation (Stronen et al., 2025). Cette catégorie comprend les individus métissés dont la **composante génétique** canine est importante (c'est-à-dire ≥ 12,5%) et qui ont donc été considérés comme préoccupants sur le plan de la gestion (Caniglia et al., 2020 ; Stronen et al., 2022*a*). Une question cruciale lorsqu'il s'agit d'estimer un paramètre de population, tel que la prévalence des individus métissés, concerne la représentativité de l'échantillon utilisé pour tirer des conclusions au niveau de la population (Ciucci et al., 2007). Étant donné que la récupération des loups **trouvés morts** représente une forme d'échantillonnage opportuniste, nous ne pouvons exclure que certaines sources de biais puissent affecter notre estimation de la prévalence du métissage. **Cependant**, grâce au réseau interrégional dense des IZSs et à leur vigilance, le système systématique de récupération des carcasses qui a contribué à notre ensemble de données s'est révélé particulièrement efficace. Il nous a permis d'analyser pour la première fois un ensemble remarquable d'échantillons invasifs provenant de la péninsule Italienne, représentant environ un tiers de la population estimée de loups vivants en 2020-

2021 (2127-2844 loups ; Gervasi et al., 2024**). En outre**, en se référant à une période de 5 ans (soit un peu plus d'une génération de loups ; Mech et al., 2016), notre échantillon couvre un laps de temps biologiquement significatif, évitant ainsi les problèmes d'estimation liés à un cadre temporel multigénérationnel. **En outre**, alors que la plupart des évaluations WDH impliquent généralement des échantillons non invasifs (par exemple, Godinho et al., 2015 ; Jarausch et al., 2023 ; Pacheco et al., 2017), notre ensemble de données est basé sur des échantillons invasifs qui produisent généralement un ADN de meilleure qualité.

Nous avons donc pu utiliser un nombre relativement plus élevé de marqueurs génétiques pour détecter les hybrides loup-chien, ce qui nous a permis d'obtenir une puissance statistique plus élevée tout en évitant les problèmes techniques généralement associés aux échantillons non invasifs (par exemple, Godinho et al., 2015). **Néanmoins**, nous attirons l'attention sur le fait que nos conclusions reposent sur l'hypothèse que les probabilités qu'un loup meure, puis soit retrouvé et récupéré par le réseau IZS, sont comparables entre les loups métissés et non métissés.

Bien que des recherches supplémentaires soient nécessaires pour comparer les taux de survie entre ces deux formes, dans la seule étude dont nous avons connaissance qui ait abordé cette question, la survie apparente des loups croisés était soit égale, soit supérieure à celle des loups non croisés, selon le modèle utilisé pour estimer la taille de la population (Santostasi et al., 2021). Selon cette étude, et dans le pire des cas, à savoir une survie plus élevée des loups métissés, notre échantillon devrait **sous-estimer** et non surestimer la prévalence des individus métissés dans la population.

4.2. Hybridation entre loups et chiens dans la péninsule Italienne

Le degré de métissage que nous avons détecté chez les loups de la péninsule Italienne est nettement plus élevé que les estimations obtenues au cours des décennies précédentes, qui variaient entre 2% et 6% (Lorenzini et al., 2014 ; Lucchini et al., 2004 ; Randi et Lucchini, 2002 ; Verardi et al., 2006). Elle est également supérieure à l'estimation plus récente (2020-2021) obtenue en marge d'une enquête nationale basée sur un échantillonnage génétique non invasif (Gervasi et al., 2024). Ici, 22,5% de métissage ont été signalés pour les loups de la péninsule Italienne, dont 9,6% d'hybrides récents et 12,9% d'individus introgressés (n = 622 génotypes uniques). Le recalcul de ces chiffres en excluant les chiens, initialement inclus dans le calcul de la prévalence, donne un métissage de 27,3%, comprenant 11,7% d'hybrides récents et 15,6% d'individus introgressés (n = 513 génotypes uniques ; recalculé à partir de Aragno et al., 2022, et Gervasi et al., 2024, informations complémentaires). Par rapport à cette dernière estimation, la nôtre est beaucoup plus élevée, surtout si l'on considère la proportion d'hybrides récents (29,5% contre 11,7%). Bien que les deux approches ne soient pas strictement comparables en raison des différences dans les types d'échantillons, les techniques d'échantillonnage et la puissance statistique pour détecter les hybrides, les deux ensembles de données indiquent clairement que la population de loups de la péninsule Italienne est fortement mélangée avec des chiens, dans une mesure beaucoup plus importante qu'on ne le pensait auparavant. Ces résultats suggèrent que, contrairement aux prévisions théoriques antérieures (Vilà et Wayne, 1999), le croisement entre loups et chiens se produit effectivement dans certaines conditions anthropiques.

Paradoxalement, les loups qui ont été sauvés de l'extinction démographique en Italie au début des années 1970 grâce à des campagnes de conservation efficaces (Boitani, 2003) sont aujourd'hui menacés d'extinction génomique, malgré les avertissements de longue date concernant la menace que représente le WDH pour la conservation (Boitani, 1984 ; Boitani et Ciucci, 1993 ; Ciucci et Boitani, 1998 ; Boitani, 2003). **Néanmoins**, le fait qu'environ 53% des loups que nous avons échantillonnés n'étaient pas mélangés indique que, si la population de loups de la péninsule Italienne présente une introgression généralisée (c'est-à-dire une hybridation anthropique de type 5 au sens d'Allendorf et al., 2001), il n'y a pas encore eu de mélange complet (c'est-à-dire de submersion génomique), du moins d'après les preuves génétiques et génomiques actuelles issues de cette recherche et de recherches antérieures (Galaverni et al., 2017 ; Caniglia et al., 2020 ; Stronen et al., 2022*b* ; Battilani et al., 2025). Cela ne doit toutefois pas être interprété comme une preuve que des barrières comportementales ou écologiques empêchent efficacement l'introgression de se transformer en submersion génomique. **D'une part**, il convient de reconnaître que les loups non mélangés peuvent comprendre un nombre inconnu d'individus introgressés issus de générations plus anciennes de rétrocroisements qui échappent à la détection génétique ; **d'autre part**, à mesure que l'hybridation introgressive se poursuit, le ratio entre loups non mélangés et loups mélangés est susceptible de diminuer, réduisant de plus en plus la capacité de la population de loups à diluer les variants canins introgressés.

En termes pratiques de **conservation**, nous pensons que toute réponse de gestion réactive, telle que l'élimination ou la neutralisation et la remise en liberté (Donfrancesco et al., 2019), serait actuellement largement impraticable dans ces conditions et susciterait une opposition sociale et éthique importante. Se concentrer sur des interventions préventives et proactives semble être la seule solution viable qui reste pour la population de loups de la péninsule Italienne, dans le but de minimiser toute nouvelle augmentation du WDH et d'empêcher un mélange complet.

4.3. Répartition géographique des hybrides

Les loups hybrides identifiés dans notre étude étaient largement répartis dans les régions de la péninsule Italienne, bien que leur prévalence semblait plus élevée dans les zones occidentales. **Cependant**, en raison de la nature de notre ensemble de données, les lieux où les loups morts ont été retrouvés ne peuvent être considérés comme représentatifs de leur zone natale ou des zones où les hybridations ont eu lieu. Les loups et les hybrides probables entre loups et chiens possèdent des capacités de dispersion importantes, en particulier à l'échelle de la péninsule Italienne (Fabbri et al., 2007 ; Ciucci et al., 2009). **Néanmoins**, nos résultats suggèrent que les régions occidentales telles que le Latium, la Toscane et la Campanie pourraient être des points chauds pour l'hybridation entre loups et chiens récente et toujours en cours.

En effet, par rapport aux régions orientales, telles que les Pouilles et l'Ombrie/les Marches, elles présentent le plus grand nombre d'hybrides récents et, à l'inverse, le plus faible nombre de rétrocroisements de génération plus ancienne. En l'absence de données sur les densités relatives des loups et des chiens, ainsi que sur les conditions facilitant leur comportement affiliatif, nous ne pouvons que supposer que les différences régionales observées peuvent être attribuées à des facteurs anthropiques. Il peut s'agir notamment de la dégradation des conditions écologiques, du niveau élevé d'abattage illégal de loups et de l'abondance de chiens

en liberté. Des recherches supplémentaires sur cette question sont nécessaires pour favoriser une compréhension mécanistique de l'apparition des WDHs, sur la base de laquelle des modèles prédictifs de probabilité de WDH pourraient être développés dans le but pratique d'informer et de hiérarchiser la gestion préventive à l'échelle du paysage.

La forte proportion d'hybrides non issus de la première génération que nous avons détectée confirme l'idée que la population de loups de la péninsule Italienne n'en est pas à un stade précoce de WDH. Cela est également indiqué par le diagramme de dispersion DAPC et par le fait que la plupart des ancêtres des loups hybrides appartenaient au groupe des loups. En fait, nous avons détecté quelques F1, alors que la majorité (97,2%) des individus croisés étaient très probablement des rétrocroisements de deuxième génération avec des loups. Sur la base d'une durée de génération de 3 à 4 ans pour les loups (Mech et al., 2016 ; Skoglund et al., 2011), cela signifie que la plupart des hybridations initiales que nous avons détectées se sont produites environ 9 à 16 ans avant l'échantillonnage (c'est-à-dire entre 2004 et 2015) ou plus tôt. Sur la base d'échantillons prélevés dans toute la péninsule Italienne entre 1992 et 2015 et de données génomiques, Galaverni et al. (2017) ont suggéré que, même si quelques cas de WDH ont pu se produire dans les années 1940 et 1970, le phénomène a connu une forte augmentation dans les années 1980 et a atteint son apogée à la fin des années 1990, probablement en raison d'une expansion marquée des loups dans des zones de plus en plus dominées par l'homme.

En effet, d'après nos conclusions, le nombre de F1 dans les Abruzzes (centre de l'Italie) semblait plus élevé entre 1993 et 2003, où ils représentaient 40% de tous les hybrides récents, que dans toute la péninsule Italienne entre 2020 et 2024, où ils représentaient 1,4% de tous les hybrides récents. **Par conséquent**, la proportion plus élevée de F1 dans les échantillons plus anciens pourrait refléter un pic des événements d'hybridation originaux à la fin des années 1990, comme le suppose l'hypothèse de Galaverni et al. (2017). **Cependant**, bien que nous ayons contrôlé les effets liés à la taille de l'échantillon, la taille assez réduite de l'échantillon pour l'ensemble de données plus ancien (n = 26) suggère de faire preuve de prudence dans l'interprétation de ces résultats. **Néanmoins**, la présence de F1 et d'autres hybrides récents dans notre ensemble de données plus récent indique que des hybridations originales ont toujours lieu, bien que probablement à une fréquence réduite par rapport au passé récent. Cela suggère à son tour que les facteurs et les conditions facilitant le croisement entre les loups et les chiens sont toujours présents.

4.5. Contribution génétique du berger allemand aux hybrides loup-chien

Nos résultats n'ont pas confirmé l'hypothèse selon laquelle le berger allemand, en tant que race la plus répandue au cours des dernières décennies, constituerait la majeure partie de l'ascendance canine des loups métissés Italiens (Galaverni et al., 2017). À l'exception d'un individu métissé dans notre ensemble de données, nous n'avons pas pu identifier le pool génétique du berger allemand comme la principale composante canine chez les loups métissés (F1 inclus). **Cependant**, nos données ne nous permettent pas de tirer des conclusions sur les contributions de races canines spécifiques, car notre base de données canine a été construite comme un mélange de variabilité canine, englobant à la fois des chiens de race pure et des chiens de race mixte, sans subdivision en groupes distincts. Il est raisonnable d'émettre l'hypothèse qu'il n'existe probablement pas de race unique plus encline

à l'hybridation, mais plutôt un groupe de races ou de types canins qui sont les plus répandus localement (c'est-à-dire les chiens de village).

4.6. Implications pour les autres populations de loups Européennes

La dynamique, l'étendue et la propagation récentes de la WDH que nous avons détectées chez les loups de la péninsule Italienne ont non seulement un impact profond sur leur statut de conservation, mais représentent également un risque sérieux pour l'intégrité génétique des populations de loups voisines. Les loups sont capables de se disperser sur de longues distances, ce qui permet à des populations géographiquement disjointes à l'échelle Européenne de devenir génétiquement connectées (Razen et al., 2016 ; Morales-González et al., 2022 ; Konec et al., 2024). **En particulier**, la population alpine, recolonisée au début des années 1990 par des loups provenant du nord des Apennins, est reliée à ces derniers par un taux de migration d'environ 1,25 à 2,5 loups/génération (Fabbri et al., 2007). **Néanmoins**, la surveillance génétique non invasive à long terme de la population de loups alpins n'a jusqu'à présent révélé qu'une introgression limitée (Dufresnes et al., 2019). Cela a été confirmé par une étude génétique non invasive menée dans les Alpes Italiennes en 2020-2021, qui a estimé à environ 134 le nombre de meutes de loups, dont seulement deux étaient d'origine récente et métissées (Marucco et al., 2023). La faible proportion de croisements avec des chiens chez les loups Alpins pourrait indiquer soit une moindre tendance à la dispersion à longue distance des loups métissés, soit leur moindre capacité à établir leur propre meute ou à s'intégrer dans des meutes existantes.

À l'instar des Alpes, d'autres populations de loups Européennes présentent également une proportion faible ou très faible d'individus métissés (Dinaric-Balkan : Moura et al., 2014 ; Scandinavie : Stengien et al., 2021 ; Carélie : Smeds et al., 2021 ; mais voir Tirronen et Kuznetsova, 2025). **Cependant**, plusieurs problèmes techniques et d'échantillonnage peuvent compromettre la fiabilité et la comparabilité des estimations du WDH entre les populations de loups et, par conséquent, nous avons encore une compréhension limitée de la prévalence des hybrides loup-chien et de leur dynamique à travers l'Europe (Salvatori et al., 2020 ; Stronen et al., 2025). **Quoi qu'il en soit**, une évaluation précise et continue des WDH devrait être un élément fondamental de la stratégie de conservation des populations de loups en Europe, afin de garantir des mesures de gestion opportunes lorsque cela est nécessaire. Comme l'illustre efficacement la propagation incontrôlée des WDHs dans la péninsule Italienne au cours des dernières décennies, en l'absence d'une gestion efficace, il suffit de quelques générations de loups pour que les WDHs atteignent des niveaux ingérables.

4.7. Implications pour la conservation

La situation que nous décrivons ici a des implications importantes pour la gestion de la conservation. **Tout d'abord**, de nombreux experts s'accordent à dire que les hybrides loup-chien doivent être considérés comme une menace sérieuse pour la conservation des loups (Donfrancesco et al., 2019). Outre les risques souvent mentionnés de perte d'identité génétique, de dépression consanguine et de perte de variants génétiques coadaptés (par exemple, Allendorf et al., 2001), les différences attendues en matière de physiologie et de comportement chez les loups métissés, bien que difficiles à détecter, peuvent avoir un impact profond sur les caractéristiques du cycle de vie des loups, la dynamique des populations et l'écologie, y compris les interactions avec les humains (Ciucci et al., 2025). Les données préliminaires suggèrent que la physiologie reproductive et le comportement social peuvent

différer dans les meutes de loups métissés (par exemple, Crispino et al., 2021), et que même de petites variantes génétiques d'origine canine pourraient avoir des effets comportementaux pertinents chez les loups (par exemple, Pilot et al., 2018).

Deuxièmement, le degré de métissage avec les chiens que nous avons signalé chez les loups de la péninsule Italienne illustre de manière frappante les dangers liés au fait de négliger la gestion des WDHs lorsque cela est nécessaire. Nos conclusions constituent un avertissement, indiquant que des dynamiques similaires de WDH peuvent apparaître dans d'autres populations de loups en expansion si les obligations de gestion sont systématiquement négligées. Si certains peuvent considérer le report de la gestion d'une question aussi complexe comme une tactique politiquement opportune à court terme, cette approche ne fait que retarder la résolution du problème et exacerber les défis existants à long terme. En Italie, l'absence de mesures de gestion depuis les premières preuves de WDH a caractérisé l'attitude dominante en matière de gestion à l'échelle locale, régionale et nationale, tant de la part des organismes gouvernementaux que non gouvernementaux. **En conséquence**, aucune campagne médiatique sérieuse n'a jamais été lancée et la sensibilisation à ce phénomène a été très limitée parmi les spécialistes, les journalistes et le grand public. La négligence en matière de gestion du WDH peut provenir de l'hypothèse non vérifiée selon laquelle les croisements entre loups et chiens sont rares (Vilà et Wayne, 1999). **Cependant**, même lorsque la situation est devenue plus évidente en Italie, tant au niveau local (par exemple, Salvatori et al., 2019 ; Santostasi et al., 2021) qu'au niveau national (par exemple, Caniglia et al., 2020 ; Galaverni et al., 2017 ; Gervasi et al., 2024), aucune mesure de gestion n'a été mise en œuvre, contribuant ainsi à l'augmentation et à la propagation incontrôlées de ce phénomène (Santostasi et al., 2020, 2025). Outre une gestion inefficace, plusieurs autres facteurs peuvent faciliter la WDH dans les paysages anthropiques. Il s'agit notamment d'un nombre relativement élevé de chiens en liberté (Lorenzini et al., 2014) et d'une mortalité élevée et persistante causée par l'homme, qui augmente le risque de perturbation des meutes (Rutledge et al., 2010), ce qui peut à son tour encourager les rencontres affiliatives entre les louves et les chiens mâles (Bohling et Waits, 2015). **De plus**, la grande disponibilité de subventions alimentaires anthropiques (Ciucci et al., 2020) peut soutenir nutritionnellement les louves qui s'accouplent avec des chiens pendant la gestation et la lactation, ce qui augmente les chances de survie de leur progéniture métissée. En particulier, la perturbation de la cohésion sociale des meutes de loups due à la mortalité causée par l'homme pourrait être un phénomène relativement courant mais sous-déclaré dans les environnements dominés par l'homme. Bien que les loups en Italie soient depuis longtemps strictement protégés par la loi, la mortalité causée par l'homme reste très répandue, notamment en raison d'un braconnage important (Lovari et al., 2007 ; Boitani et Ciucci, 2009 ; Musto et al., 2021). Cette étude, rendue possible grâce au grand nombre de loups morts récupérés par le réseau IZS, en est la preuve. Par rapport à la population estimée de loups dans la péninsule en 2021 (Gervasi et al., 2024), cela correspond à un taux de mortalité connu minimum d'environ 6% par an.

Troisièmement, nos conclusions ont également des implications pertinentes pour les autres populations Européennes, compte tenu du récent déclassement du statut de protection des loups par la Convention de Berne et la directive Habitats (Parlement Européen 2025). Malheureusement, cette décision n'a pas tenu compte de la composition génétique - y compris les WDHs - des populations de loups Européens. Ignorer cet aspect lors de l'évaluation de leur statut de conservation augmente le risque de surestimer l'abondance des

individus non mélangés. Cette omission pourrait à son tour avoir deux conséquences négatives : une évaluation incorrecte de leur statut de conservation favorable (FCS ; Linnell et Boitani, 2025) et un retard dans les mesures de gestion nécessaires pour atténuer le risque de WDH (Stronen et al., 2025). Par exemple, d'après nos conclusions, un statut de protection moins strict pour les loups dans la péninsule Italienne n'est pas justifié et est hautement impraticable, car les loups non métissés, les hybrides récents et les individus introgressés ne forment pas des populations distinctes et vivent souvent dans des meutes mixtes (Crispino et al., 2021 ; Salvatori et al., 2019 ; Santostasi et al., 2021). Si cela complique considérablement l'évaluation du FCS, la chasse aux loups pourrait détériorer davantage leur constitution génétique, tout en augmentant le risque de propagation du WDH (Moura et al., 2014 ; Tirronen et Kuznetsova, 2025). **De plus**, la chasse sélective à distance des loups métissés n'est pas pratique, car les indices morphologiques (par exemple, la couleur du pelage) ne sont pas considérés comme des indicateurs fiables du métissage (Lorenzini et al., 2014 ; Stronen et al., 2025).

Bien que cela semble contre-intuitif, nous réaffirmons que les hybrides loup-chien, lorsqu'ils sont détectés, devraient bénéficier du même statut de protection juridique que les loups afin d'éviter les lacunes juridiques (Peltola et Heikkilä, 2018 ; Sonne et al., 2019), et que leur gestion devrait être placée sous la responsabilité des agences gouvernementales (Trouwborst, 2014). **Dans ce contexte**, il semble essentiel de redoubler d'efforts pour détecter les hybrides loup-chien et évaluer systématiquement leur présence dans les populations de loups Européennes à l'aide de procédures génétiques fiables et comparables (Stronen et al., 2025). L'objectif devrait être de maintenir les populations de loups Européennes exemptes de WDH ou dans des limites permettant des interventions de gestion pratiques, tout en empêchant la propagation des WDHs aux niveaux que nous signalons ici pour la péninsule Italienne. Dans le même temps, il est essentiel de favoriser un débat international au sein de la communauté scientifique, ainsi qu'entre les parties prenantes et le public, sur les moyens les plus efficaces et les plus acceptables socialement pour faire face aux difficultés et aux défis considérables que les WDH posent à la conservation des loups.

Déclaration de contribution des auteurs CRediT

Rita Lorenzini : Rédaction - révision et édition, Rédaction - version originale, Analyse formelle, Conceptualisation. Antonella Pizzarelli : Méthodologie. Lorenzo Attili : Rédaction - révision et édition, Méthodologie, Curation des données. Massimo Biagetti : Méthodologie. Carla Sebastiani : Méthodologie. Paolo Ciucci : Rédaction - révision et édition, Rédaction - version originale, Conceptualisation.

Financement

Ce travail a été soutenu par un financement institutionnel de l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri. P.C. a été financé par l'Union Européenne - NextGenerationEU National Biodiversity Future Center.

References

Abbott, R.J., Barton, N.H., Good, J.M., 2016. Genomics of hybridization and its evolutionary consequences. Mol. Ecol. 25, 2325–2332. https://doi.org/10.1111/mec.13685.

Allendorf, F.W., Leary, R.F., Spruell, P., Wenburg, J.K., 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. Trends Ecol. Evol. 16, 613–622.

Anderson, T.M., vonHoldt, B.M., Candille, S.I., Musiani, M., Greco, C., Stahler, D.R., Smith, D.W., Padhukasahasram, 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. https://doi.org/10.1126/science.1165448.

Aragno, P., Salvatori, V., Caniglia, R., De Angelis, D., Fabbri, E., Gervasi, V., La Morgia, V., Marucco, F., Mucci, N., Velli, E., 2022. La popolazione di lupo nelle regioni dell'Italia peninsulare 2020/2021. Relazione Tec. Realiz. Nell'ambito Della Conv. ISPRA-Minist. Della Transizione Ecol. "Attività Monit. Naz. Nell'ambito Piano Azione Lupo" ISPRA.

Battilani, D., Gargiulo, R., Caniglia, R., Fabbri, E., Madrigal, J.R., Fontsere, C., Ciucani, M.M., Gopalakrishnan, S., Girardi, M., Fracasso, I., Mastroiaco, M., Ciucci, P., Vernesi, C., 2025. Beyond population size: whole-genome data reveal bottleneck legacies in the peninsular Italian wolf. J. Hered. 116, 10–23. https://doi.org/10.1093/jhered/esae041.

Bigi, D., Marelli, S.P., Randi, E., Polli, M., 2015. Genetic characterization of four native Italian shepherd dog breeds and analysis of their relationship to cosmopolitan dog breeds using microsatellite markers. Animal 9, 1921–1928.

Bohling, J.H., 2016. Strategies to address the conservation threats posed by hybridization and genetic introgression. Biol. Conserv. 203, 321–327.

Bohling, J.H., Waits, L.P., 2015. Factors influencing red wolf–coyote hybridization in eastern North Carolina, USA. Biol. Conserv. 184, 108–116. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.01.013.

Boitani, L., 1984. Genetic considerations on wolf conservation in Italy. Bolletino Zool. 51, 367–373. https://doi.org/10.1080/11250008409439476.

Boitani, L., 1986. Dalla parte del lupo. I libri di Airone. G Mondadori E Assoc. Spa Milano.

Boitani, L., 2003. Wolf conservation and recovery. In: Wolves: Behaviour, Ecology and Conservation. University of Chicago Press, pp. 317–340.

Boitani, L., Ciucci, P., 1993. Wolves in Italy: critical issues for their conservation. In: Wolf in Europe: Status and Perspectives. Wildbiologische Gesel, pp. 75–90.

Boitani, L., Ciucci, P., 2009. Wolf conservation across Europe: species conservation without boundaries. In: Musiani, M., Boitani, L., Paquet, P.C. (Eds.), A New Era for Wolves and People: Wolf Recovery, Human Attitudes and Policy. The University of Calgary Press, Calgary, Alberta, Canada, pp. 15–39. ISBN 978-1-55238-270-7.

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. https://doi.org/10.1007/s10344-013-0703-1.

Caniglia, R., Fabbri, E., Galaverni, M., Milanesi, P., Randi, E., 2014. Noninvasive sampling and genetic variability, pack structure, and dynamics in an expanding wolf population. J. Mammal. 95, 41–59.

Caniglia, R., Galaverni, M., Velli, E., Mattucci, F., Canu, A., Apollonio, M., Mucci, N., Scandura, M., Fabbri, E., 2020. A standardized approach to empirically define reliable assignment thresholds and appropriate management categories in deeply introgressed populations. Sci. Rep. 10, 2862. https://doi.org/10.1038/s41598-020-59521-2.

Canty, A., Ripley, B.D., 2024. boot: Bootstrap R (S-Plus) Functions. Funct. R Package Version 13-31.

Ciucci, P., 2012. Ibridazione con il cane come minaccia per la conservazione del lupo: status delle conoscenze e criteri per l'identificazione degli ibridi. Tech. Rep. Action A2 LIFE IBRIWOLF Proj. LIFE10NATIT265 Sapienza Univ. Rome Ital..

Ciucci, P., Boitani, L., 1998. Il Lupo. Elementi di biologia, gestione e ricerca. Istituto Nazionale della Fauna Selvatica "Alessandro Ghigi", Technical Reports no. 23. Ozzano Emilia, Italy. (In Italian).

Ciucci, P., Lucchini, V., Boitani, L., Randi, E., 2003. Dewclaws in wolves as evidence of admixed ancestry with dogs. Can. J. Zool. 81, 2077–2081. https://doi.org/10.1139/z03-183.

Ciucci, P., Chapron, G., Guberti, V., Boitani, L., 2007. Estimation of mortality parameters from (biased) samples at death: are we getting the basics right in wildlife field studies? A response to Lovari et al. (2007). J. Zool. 273, 125–127.

Ciucci, P., Reggioni, W., Maiorano, L., Boitani, L., 2009. Long-distance dispersal of a rescued wolf from the Northern Apennines to the Western Alps. J. Wildl. Manag. 73, 1300–1306. https://doi.org/10.2193/2008-510.

Ciucci, P., Mancinelli, S., Boitani, L., Gallo, O., Grottoli, L., 2020. Anthropogenic food subsidies hinder the ecological role of wolves: insights for conservation of apex predators in human-modified landscapes. Glob. Ecol. Conserv. 21, e00841. https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00841.

Ciucci, P., Sand, H., Åkesson, M., Kusak, J., 2025. Wolf Canis lupus Linnaeus, 1758. In: Hackländer, K., Zachos, F.E. (Eds.), Handbook of the Mammals of Europe, Handbook of the Mammals of Europe. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–62. https://doi.org/10.1007/978-3-319-65038-8_118-2.

Crispino, F., Costanzo, M., Lucia, A., Gervasio, G., 2021. Early and double breeding in a pack of hybrid wolves in Calabria (Southern Italy). Biodivers J 12, 379–384.

Di Bernardi, C., Chapron, G., Kaczensky, P., Álvares, F., Andrén, H., Balys, V., Blanco, J. C., Chiriac, S., Ćirović, D., Drouet-Hoguet, N., 2025. Continuing recovery of wolves in Europe. PLoS Sustain. Transform. 4, e0000158.

Donfrancesco, V., Ciucci, P., Salvatori, V., Benson, D., Andersen, L.W., Bassi, E., Blanco, J.C., Boitani, L., Caniglia, R., Canu, A., 2019. Unravelling the scientific debate on how to address wolf-dog hybridization in Europe. Front. Ecol. Evol. 7, 175. https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00175.

Dufresnes, C., Remollino, N., Stoffel, C., Manz, R., Weber, J.-M., Fumagalli, L., 2019. Two decades of non-invasive genetic monitoring of the grey wolves recolonizing the Alps support very limited dog introgression. Sci. Rep. 9, 148.

Dziech, A., 2021. Identification of wolf-dog hybrids in Europe–an overview of genetic studies. Front. Ecol. Evol. 9, 760160.

Fabbri, E., Miquel, C., Lucchini, V., Santini, A., Caniglia, R., Duchamp, C., Weber, J., 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. Mol. Ecol. 16, 1661–1671. https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03262.x.

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

Grossen, C., Keller, L., Biebach, I., Consortium, I.G.G, Croll, D., 2014. Introgression from domestic goat generated variation at the major histocompatibility complex of Alpine ibex. PLoS Genet. 10, e1004438.

Hindrikson, M., Tammeleht, E., 2025. Introgression—friend or foe? Mol. Ecol. 34, e17810.

Hindrikson, M., Männil, P., Ozolins, J., Krzywinski, A., Saarma, U., 2012. Bucking the trend in wolf-dog hybridization: first evidence from Europe of hybridization between female dogs and male wolves. PLoS One 7, e46465. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046465.

Hindrikson, M., Remm, J., Pilot, M., Godinho, R., Stronen, A.V., Baltrūnaitė, L., Czarnomska, S.D., Leonard, J.A., Randi, E., Nowak, C., Åkesson, M., López-Bao, J.V., Álvares, F., Llaneza, L., Echegaray, J., Vilà, C., Ozolins, J., Rungis, D., Aspi, J., Paule, L., Skrbinšek, T., Saarma, U., 2017. Wolf population genetics inEurope: a systematic review, meta-analysis and suggestions for conservation and management. Biol. Rev. 92, 1601–1629. https://doi.org/10.1111/brv.12298.

Iacolina, L., Scandura, M., Gazzola, A., Cappai, N., Capitani, C., Mattioli, L., Vercillo, F., Apollonio, M., 2010. Y-chromosome microsatellite variation in Italian wolves: a contribution to the study of wolf-dog hybridization patterns. Mamm. Biol. 75, 341–347. https://doi.org/10.1016/j.mambio.2010.02.004.

Jarausch, A., von Thaden, A., Sin, T., Corradini, A., Pop, M.I., Chiriac, S., Gazzola, A., Nowak, C., 2023. Assessment of genetic diversity, population structure and wolf-dog hybridisation in the Eastern Romanian Carpathian wolf population. Sci. Rep. 13, 22574.

Jombart, T., 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics 24, 1403–1405.

Jombart, T., Devillard, S., Balloux, F., 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. BMC Genet. 11, 1–15.

Konec, M., Collet, S., Nowak, C., Skrbinšek, T., Stronen, A.V., 2024. Dispersal of a wolf with complex ancestry from the Dinaric-Alpine region to Germany demonstrates the value of transboundary monitoring networks. Conserv. Sci. Pract. 6 (9), e13181.

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

Linnell, J.D.C., Boitani, L., 2025. Developing methodology for setting Favourable Reference Values for large carnivores in Europe. In: Report to the European Commission under contract N° 09.0201/2023/907799/SER/ENV.D.3 "Support for Coexistence with Large Carnivores. Task B.3 – Assessment of large carnivores' conservation status". https://brage.nina.no/nina-xmlui/bitstream/handle/11250/3175288/LinnellDevelopingFRV%20REPORT%20FINAL2025diamant.pdf?sequence=2&isAllowed=y. (Accessed 8 August 2025).

Lorenzini, R., Fanelli, R., Grifoni, G., Scholl, F., Fico, R., 2014. Wolf–dog crossbreeding: "Smelling" a hybrid may not be easy. Mamm. Biol. 79, 149–156. https://doi.org/10.1016/j.mambio.2013.07.080.

Lorenzini, R., Attili, L., Tancredi, C., Fanelli, R., Garofalo, L., 2022. A validated molecular protocol to differentiate pure wolves, dogs and wolf x dog hybrids through a panel of multiplexed canine STR markers. Diversity 14, 511. https://doi.org/10.3390/d14070511.

Lovari, S., Sforzi, A., Scala, C., Fico, R., 2007. Mortality parameters of the wolf in Italy: does the wolf keep himself from the door? J. Zool. 272, 117–124. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2006.00260.x.

Lucchini, V., Galov, A., Randi, E., 2004. Evidence of genetic distinction and long-term

Frantz, L.A.F., Mullin, V.E., Pionnier-Capitan, M., Lebrasseur, O., Ollivier, M., Perri, A., Linderholm, A., Mattiangeli, V., Teasdale, M.D., Dimopoulos, E.A., Tresset, A., Duffraisse, M., McCormick, F., Bartosiewicz, L., Gál, E., Nyerges, É.A., Sablin, M.V., Bréhard, S., Mashkour, M., Bălăşescu, A., Gillet, B., Hughes, S., Chassaing, O., Hitte, C., Vigne, J.-D., Dobney, K., Hänni, C., Bradley, D.G., Larson, G., 2016. Genomic and archaeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs. Science 352, 1228–1231. https://doi.org/10.1126/science.aaf3161.

Freedman, A.H., Gronau, I., Schweizer, R.M., Ortega-Del Vecchyo, D., Han, E., Silva, P. M., Galaverni, M., Fan, Z., Marx, P., Lorente-Galdos, B., Beale, H., Ramirez, O., Hormozdiari, F., Alkan, C., Vilà, C., Squire, K., Geffen, E., Kusak, J., Boyko, A.R., Parker, H.G., Lee, C., Tadigotla, V., Siepel, A., Bustamante, C.D., Harkins, T.T., Nelson, S.F., Ostrander, E.A., Marques-Bonet, T., Wayne, R.K., Novembre, J., 2014. Genome sequencing highlights the dynamic early history of dogs. PLoS Genet. 10, e1004016. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004016.

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

Gervasi, V., Aragno, P., Salvatori, V., Caniglia, R., De Angelis, D., Fabbri, E., La Morgia, V., Marucco, F., Velli, E., Genovesi, P., 2024. Estimating distribution and abundance of wide-ranging species with integrated spatial models: opportunities revealed by the first wolf assessment in south-central Italy. Ecol. Evol. 14. https://doi.org/10.1002/ece3.11285.

Godinho, R., Llaneza, L., Blanco, J.C., Lopes, S., Álvares, F., García, E.J., Palacios, V., Cortés, Y., Talegón, 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. https://doi.org/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. Mol. Ecol. Resour. 15, 317–328. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12313.

Gompper, M.E., 2014. Free-ranging Dogs and Wildlife Conservation. Oxford University Press, USA.

admixture between grey wolves and domestic dogs across Eurasia and its implications for the conservation status of hybrids. Evol. Appl. 11, 662–680. https://doi.org/10.1111/eva.12595.

Pilot, M., Moura, A.E., Okhlopkov, I.M., Mamaev, N.V., Manaseryan, N.H., Hayrapetyan, V., Kopaliani, N., Tsingarska, E., Alagaili, A.N., Mohammed, O.B., Ostrander, E.A., Bogdanowicz, W., 2021. Human-modified canids in human-modified landscapes: the evolutionary consequences of hybridization for grey wolves and free-ranging domestic dogs. Evol. Appl. 14, 2433–2456. https://doi.org/10.1111/eva.13257.

Ramasamy, R.K., Ramasamy, S., Bindroo, B.B., Naik, V.G., 2014. STRUCTURE PLOT: a program for drawing elegant STRUCTURE bar plots in user friendly interface. SpringerPlus 3, 1–3.

Randi, E., 2008. Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. Mol. Ecol. 17, 285–293. https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03417.x.

Randi, E., Lucchini, V., 2002. Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (*Canis lupus*) populations by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation. Conserv. Genet. 3, 29–43. https://doi.org/10.1023/a:1014229610646.

Randi, E., Hulva, P., Fabbri, E., Galaverni, M., Galov, A., Kusak, J., Bigi, D., Bolfíková, B.Č., Smetanova, M., Caniglia, R., 2014. Multilocus detection of wolf x dog hybridization in Italy, and guidelines for marker selection. PLoS One 9, e86409.

Ražen, N., Brugnoli, A., Castagna, C., Groff, C., Kaczensky, P., Kljun, F., Potočnik, H., 2016. Long-distance dispersal connects Dinaric-Balkan and Alpine grey wolf (*Canis lupus*) populations. Eur. J. Wildl. Res. 62, 137–142.

Rutledge, L.Y., Patterson, B.R., Mills, K.J., Loveless, K.M., Murray, D.L., White, B.N., 2010. Protection from harvesting restores the natural social structure of eastern wolf packs. Biol. Conserv. 143, 332–339.

Salvatori, V., Godinho, R., Braschi, C., Boitani, L., Ciucci, P., 2019. High levels of recent wolf × dog introgressive hybridization in agricultural landscapes of central Italy. Eur. J. Wildl. Res. 65, 73. https://doi.org/10.1007/s10344-019-1313-3.

Salvatori, V., Donfrancesco, V., Trouwborst, A., Boitani, L., Linnell, J.D., Alvares, F., Åkesson, M., Balys, V., Blanco, J.C., Chiriac, S., 2020. European agreements for nature conservation need to explicitly address wolf-dog hybridisation. Biol. Conserv. 248, 108525.

Santostasi, N.L., Ciucci, P., Bearzi, G., Bonizzoni, S., Gimenez, O., 2020. Assessing the dynamics of hybridization through a matrix modelling approach. Ecol. Model. 431, 109120.

Santostasi, N.L., Gimenez, O., Caniglia, R., Fabbri, E., Molinari, L., Reggioni, W., Ciucci, P., 2021. Estimating admixture at the population scale: taking imperfect detectability and uncertainty in hybrid classification seriously. J. Wildl. Manag. 85, 1031–1046. https://doi.org/10.1002/jwmg.22038.

Santostasi, N.L., Bauduin, S., Grente, O., Gimenez, O., Ciucci, P., 2025. Simulating the efficacy of wolf–dog hybridization management with individual-based modeling. Conserv. Biol. 39, e14312. https://doi.org/10.1111/cobi.14312.

population decline in wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines. Mol. Ecol. 13, 523–536. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2004.02077.x.

Mallet, J., 2005. Hybridization as an invasion of the genome. Trends Ecol. Evol. 20, 229–237.

Marucco, F., Boiani, M.V., Dupont, P., Milleret, C., Avanzinelli, E., Pilgrim, K., Schwartz, M.K., Von Hardenberg, A., Perrone, D.S., Friard, O.P., Menzano, A., Bisi, F., Fattori, U., Tomasella, M., Calderola, S., Carolfi, S., Ferrari, P., Chioso, C., Truc, F., Bombieri, G., Pedrotti, L., Righetti, D., Acutis, P.L., Guglielmo, F., Hauffe, H.C., Rossi, C., Caniglia, R., Aragno, P., La Morgia, V., Genovesi, P., Bischof, R., 2023. A multidisciplinary approach to estimating wolf population size for long-term conservation. Conserv. Biol. 37. https://doi.org/10.1111/cobi.14132.

Mech, L.D., Barber-Meyer, S.M., Erb, J., 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.

Morales-González, A., Fernández-Gil, A., Quevedo, M., Revilla, E., 2022. Patterns and determinants of dispersal in grey wolves (*Canis lupus*). Biol. Rev. 97 (2), 466–480.

Moura, A.E., Tsingarska, E., Dąbrowski, M.J., Czarnomska, S.D., Jędrzejewska, B., Pilot, M., 2014. Unregulated hunting and genetic recovery from a severe population decline: the cautionary case of Bulgarian wolves. Conserv. Genet. 15 (2), 405–417.

Musto, C., Cerri, J., Galaverni, M., Caniglia, R., Fabbri, E., Apollonio, M., Mucci, N., Bonilauri, P., Maioli, G., Fontana, M.C., 2021. Men and wolves: anthropogenic causes are an important driver of wolf mortality in human-dominated landscapes in Italy. Glob. Ecol. Conserv. 32, e01892. https://doi.org/10.1016/j.gecco.2021.e01892.

Nielsen, E.E., Bach, L.A., Kotlicki, P., 2006. HYBRIDLAB (version 1.0): a program for generating simulated hybrids from population samples. Mol. Ecol. Notes 6, 971–973. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01433.x.

Pacheco, C., López-Bao, J.V., García, E.J., Lema, F.J., Llaneza, L., Palacios, V., Godinho, R., 2017. Spatial assessment of wolf-dog hybridization in a single breeding period. Sci. Rep. 7, 42475.

Peltola, T., Heikkilä, J., 2018. Outlaws or protected? DNA, hybrids, and biopolitics in a Finnish wolf-poaching case. Soc. Anim. 26, 197–216.

Pilot, M., Greco, C., vonHoldt, B.M., Randi, E., Jędrzejewski, W., Sidorovich, V.E., Konopiński, M.K., Ostrander, E.A., Wayne, R.K., 2018. Widespread, long-term

Skoglund, P., Gotherstrom, A., Jakobsson, M., 2011. Estimation of population divergence times from non-overlapping genomic sequences: examples from dogs and wolves. Mol. Biol. Evol. 28, 1505–1517. https://doi.org/10.1093/molbev/msq342.

Smeds, L., Aspi, J., Berglund, J., Kojola, I., Tirronen, K., Ellegren, H., 2021. Whole-genome analyses provide no evidence for dog introgression in Fennoscandian wolf populations. Evol. Appl. 14, 721–734. https://doi.org/10.1111/eva.13151.

Sonne, C., Hansen, H.P., Alstrup, A.K.O., Olsen, K., Jensen, T.H., Haugaard, L., Sunde, P., 2019. Discussion: illegal kills of protected wolves call for public reasoning. Sci. Total Environ. 665, 617–619. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.432.

Stenøien, H.K., Sun, X., Martin, M.D., Scharff-Olsen, C.H., Alonso, G.H., Martins, N.F.G., Lanigan, L., Ciucani, M.M., Sinding, M.-H.S., Gopalakrishnan, S., Gilbert, M.T.P., 2021. Genetisk opphav til den norsksvenske ulvestammen (*Canis lupus lupus*) – NTNU Vitenskapsmuseet naturhistorisk rapport 2021–11, pp. 1–53.

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

Stronen, A.V., Mattucci, F., Fabbri, E., Galaverni, M., Cocchiararo, B., Nowak, C., Godinho, R., Ruiz-González, A., Kusak, J., Skrbinšek, T., 2022b. A reduced SNP panel to trace gene flow across southern European wolf populations and detect hybridization with other *Canis* taxa. Sci. Rep. 12, 4195.

Stronen, A.V., Birkenhain, C.S., Caniglia, R., Djan, M., Fabbri, E., Fumagalli, L., Galaverni, M., Godinho, R., Lobo, D., Mattucci, F., 2025. European conservation policy needs a clear definition of 'wolf-dog hybrid.'. Biol. Conserv. 308, 111254.

Tirronen, K.F., Kuznetsova, A.S., 2025. Wolf-dog hybrids in the eastern fringe Northern European wolf population on the background of increased hunting pressure. Polar Biol. 48 (1), 1.

Todesco, M., Pascual, M.A., Owens, G.L., Ostevik, K.L., Moyers, B.T., Hübner, S., 2016. Hybridization and extinction. Evol. Appl. 892–908.

Trouwborst, A., 2014. Exploring the legal status of wolf-dog hybrids and other dubious animals: international and EU law and the wildlife conservation problem of hybridization with domestic and alien species. Rev. Eur. Comp. Int. Environ. Law 23, 111–124. https://doi.org/10.1111/reel.12052.

Verardi, A., Lucchini, V., Randi, E., 2006. Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. Mol. Ecol. 15, 2845–2855. https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2006.02995.x.

Vilà, C., Wayne, R.K., 1999. Hybridization between wolves and dogs. Conserv. Biol. 13, 195–198. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1999.97425.x.

Wilkins, A.S., Wrangham, R.W., Fitch, W.T., 2014. The "domestication syndrome" in mammals: a unified explanation based on neural crest cell behavior and genetics. Genetics 197, 795–808.

Zimen, E., Boitani, L., 1975. Number and Distribution of Wolves in Italy.