

Normalisation d'un cadre méthodologique de haute qualité pour le suivi génétique à long terme de la population de loups en France

Ecology and Evolution

WILEY

Ecology and Evolution
Open Access

RESEARCH ARTICLE OPEN ACCESS

Standardization of a High-Quality Methodological Framework for Long-Term Genetic Monitoring of the French Wolf Population

Agathe Pirog^{1,2}  | Christophe Duchamp³ | Cécile Kaerle¹ | Caroline Dufaure de Citres¹ | Sabine Rousselot¹ | Juliette Lavarec¹ | Guillaume Queney¹¹ANTAGENE, Animal Genomics Laboratory, La Tour de Salvagny (Lyon), France | ²Department of Research and Expertise, French Agency for Biodiversity, Nantes, France | ³Department of Research and Expertise, French Agency for Biodiversity, Gap, FranceCorrespondence: Agathe Pirog (paper@antagene.com)

Received: 19 November 2024 | Revised: 20 March 2025 | Accepted: 11 April 2025

Funding: This study was partly funded by the Research and Development Contract No. OFB-23-1135 of the French Agency for Biodiversity and by the Public Contract for the Supply of Genetic Analysis for the Monitoring of Wolf (*Canis lupus*) Populations No. 2021-28.

Résumé

Depuis que le loup gris a été éradiqué d'une grande partie de l'Europe, cette espèce a recolonisé une grande partie de son ancienne aire de répartition, en particulier au cours des 30 dernières années. Les loups bénéficient d'une protection juridique Européenne en vertu de la directive « Habitats » et de la Convention de Berne, et la communication des données sur l'évolution de leurs populations dans chaque pays d'Europe est obligatoire. Afin de surveiller les populations de loups en France sur le long terme, un **cadre méthodologique standardisé** et de haute qualité a été développé pour analyser les données issues d'échantillons prélevés de manière non invasive et évaluer la diversité des populations. Nous avons défini chaque étape et mis en place une procédure de contrôle en laboratoire pour analyser 8 733 échantillons prélevés dans l'aire de répartition Française de l'espèce entre 2006 et 2022, et avons fourni des indicateurs clés de qualité et de diversité. Parmi ces échantillons, 82,8% ont été amplifiés et séquencés avec succès pour la région de contrôle mitochondriale. Par la suite, les échantillons de loup ont été génotypés au niveau de 22 loci microsatellites autosomiques et d'un locus sexuel répartis sur deux multiplexes indépendants à l'aide de l'approche multitube. Le taux de réussite moyen de la réaction en chaîne par polymérase par locus était de 64,2% sur l'ensemble des répliqués. Les taux d'erreur de génotypage résiduels étaient faibles par rapport à ceux d'autres études utilisant des échantillons prélevés de manière non invasive, avec des taux moyens de perte d'allèles résiduels de 5,8% par locus et des taux moyens d'allèles faux résiduels de 1,0% par locus. L'ensemble de données de haute qualité a permis d'identifier 1 735 individus au total au cours des 15 dernières années, dont 99,9% présentaient un seul mitotype Italo-Alpin. La diversité génétique était relativement faible, avec une hétérozygotie observée moyenne de 0,482 et une hétérozygotie attendue moyenne de 0,519. Cela confirme la colonisation naturelle des Alpes Françaises par quelques individus

issus des populations Italiennes restantes, qui a débuté il y a environ 30 ans. En établissant des normes de haute qualité et des processus de contrôle qualité, ce protocole améliore le rapport coût-efficacité du suivi des populations de loups en France et présente un grand intérêt pour les gestionnaires chargés de la gestion et de la conservation des populations de loups à long terme.

Mots-clés : *Canis lupus*, France, loup gris, suivi à long terme, microsatellite, région de contrôle mitochondriale, échantillons non invasifs

1. INTRODUCTION

Le loup gris, *Canis lupus*, était autrefois largement répandu en Europe. Après avoir frôlé l'extinction dans la partie occidentale du continent, les mesures de conservation mises en œuvre dans la seconde moitié du XX^{ème} siècle, associées à une augmentation des populations d'ongulés dont cette espèce se nourrit, ont favorisé la recolonisation progressive de plusieurs populations de loups en Europe occidentale (Chapron et al. 2014). L'espèce étant légalement protégée par la directive « Habitats » et la Convention de Berne, chaque pays Européen doit rendre compte de l'évolution des populations de loups gris sur son territoire, ce qui nécessite un suivi intensif et à long terme.

Dans les Alpes Françaises, les premiers individus ont été observés au début des années 1990, après avoir migré depuis la population Italo-Alpine (Valière et al. 2003 ; Fabbri et al. 2007). Depuis lors, la population fait l'objet d'un suivi étroit par les autorités Françaises afin d'évaluer l'évolution de sa taille et de sa répartition spatiale au fil du temps, ainsi que la survenue de prédateurs sur le bétail (Cubaynes et al. 2010 ; Louvrier et al. 2018 ; Grente et al. 2022). Des dérogations pour l'abattage légal sont accordées par les autorités dans des conditions spécifiques, conformément aux recommandations d'action nationales, principalement pour protéger le bétail contre la prédation (MTES MAPAAR 2019 ; https://www.auvergne-rhone-alpes.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/nap_wolf_and_stock-rearing_activities_2018-2023.pdf).

À cette fin, un échantillonnage à grande échelle est mené chaque année depuis plus de 30 ans afin de collecter des échantillons non invasifs (Duchamp et al. 2012). Les échantillons non invasifs, tels que les poils, les excréments, l'urine et la salive, sont de plus en plus reconnus comme des sources d'information importantes pour le suivi de la conservation de la faune sauvage. L'extraction d'ADN à partir de ces échantillons a permis de mieux comprendre la dynamique des populations et l'écologie d'espèces insaisissables, telles que les loups gris, tout en minimisant les perturbations de leur comportement et de leur habitat (Mills et al. 2000 ; Waits et Paetkau 2005 ; Schwartz et al. 2007). En particulier, l'échantillonnage non invasif a été largement utilisé pour mieux comprendre l'histoire phylogéographique des populations de loups gris (Valière et al. 2003), estimer la taille des populations (Creel et al. 2003 ; Petit et Valière 2006 ; Cubaynes et al. 2010 ; Caniglia et al. 2012), d'étudier l'hybridation avec les chiens (Sundqvist et al. 2008 ; Godinho et al. 2015) et de surveiller les populations réintroduites (Stenglein, Waits, et al. 2010). **Par conséquent, les échantillons non invasifs collectés en France au cours des 30 dernières années peuvent être utilisés pour répondre à ces questions concernant la population de loups gris Français.** Ils ont notamment servi à estimer la taille annuelle de la population à l'aide de méthodes de recapture (Cubaynes et al. 2010 ; Louvrier et al. 2018). **Cependant,** l'utilisation de ces échantillons nécessite des

protocoles standardisés pour réaliser des analyses spécifiques et maintenir un flux de travail cohérent dans le temps, tout en contrôlant les erreurs de génotypage.

L'ADN obtenu à partir d'échantillons non invasifs est souvent dégradé ou présent en très faibles quantités, ce qui augmente le risque d'erreurs de contamination, d'amplification et de génotypage de l'ADN (Taberlet et al. 1999 ; Broquet et Petit 2004 ; Waits et Paetkau 2005), qui nuisent à l'estimation de la dynamique des populations.

Les erreurs de génotypage sont bien connues et peuvent être classées en deux types : l'échec de l'amplification de l'un des deux allèles d'un individu (perte d'allèle ; AD) et les erreurs de polymérase, les artefacts d'amplification ou la contamination conduisant à un allèle supplémentaire (faux allèle ; FA), ce dernier cas étant moins fréquent que le premier (Gagneux et al. 1997). Pour surmonter ces difficultés, plusieurs méthodes et protocoles ont été proposés, qui mettent en évidence des étapes cruciales dans le traitement des données issues d'échantillons non invasifs (Frantz et al. 2003 ; Bonin et al. 2004 ; Beja-Pereira et al. 2009 ; Lampa et al. 2013). Ces étapes comprennent (i) la sélection des marqueurs moléculaires à utiliser, (ii) la limitation des erreurs de génotypage, et (iii) l'évaluation des taux d'erreur résiduels et de la qualité des données.

Les **loci microsatellites** sont encore largement utilisés pour la surveillance des espèces à partir d'échantillons non invasifs, en raison de leur fort polymorphisme (Selkoe et Toonen 2006), et le passage des loci microsatellites aux polymorphismes d'un seul nucléotide pose un défi pour les programmes de surveillance à long terme (Osborne et al. 2023). **Cependant**, l'utilisation des loci microsatellites nécessite le comptage des allèles, que ce soit manuellement ou par comptage automatisé et semi-automatisé des profils de fluorescence, un processus particulièrement sujet aux erreurs (Paetkau 2003 ; Pompanon et al. 2005). **Par conséquent**, plusieurs études ont recommandé que les allèles soient évalués de manière indépendante par plusieurs analystes formés (Beja-Pereira et al. 2009, Lampa et al. 2013).

Les erreurs de génotypage peuvent être réduites en effectuant des réactions en chaîne par polymérase (PCR) indépendantes avec plusieurs réplicats par échantillon, une méthode connue sous le nom **d'approche multitube** (Taberlet et al. 1996). **De plus**, diverses analyses statistiques peuvent être effectuées sur l'ensemble de données collecté pour évaluer les erreurs de génotypage et la qualité des données. **Tout d'abord**, les taux d'AD et de FA peuvent être estimés en comparant les génotypes répliqués au génotype consensuel (Valière 2002 ; Broquet et Petit 2004). **De même**, les taux résiduels d'AD et de FA peuvent être estimés en comparant les génotypes provenant de différents échantillons d'un même individu. Des méthodes utilisant des pedigrees reconstitués (Wang 2018) et des estimations de l'excès d'homozygotie au niveau d'un ou plusieurs marqueurs moléculaires (Van Oosterhout et al. 2004 ; Dabrowski et al. 2015) ont également été développées. La qualité des échantillons peut également être évaluée en calculant des indices de qualité standardisés basés sur des estimations du succès d'amplification et des erreurs de génotypage (Miquel et al. 2006). Ces analyses facilitent la quantification des taux d'erreur résiduels dans l'ensemble de données, l'identification des marqueurs ou des échantillons sujets à erreur, et l'évaluation de la performance de la méthodologie appliquée.

Bien que toutes ces procédures de contrôle aient déjà été documentées dans des études utilisant des échantillons non invasifs, en particulier dans des études portant sur les populations de loups gris (Creel et al. 2003 ; Scandura et al. 2006 ; Stenglein, Waits, et al. 2010 ; Caniglia et al. 2012 ; Nakamura et al. 2017 ; Stikarová et al. 2019), elles ont rarement été décrites dans le cadre d'un flux de travail unique et continu. **De plus**, les procédures de contrôle décrites dans la littérature devaient être adaptées à un échantillonnage non invasif à grande échelle en France (>11 000 échantillons non invasifs collectés entre 1992 et 2024) afin de fournir des **estimations annuelles** de la taille de la population sur de courtes périodes dans un cadre de surveillance rentable.

Cette étude visait à décrire les étapes essentielles et les procédures de contrôle nécessaires à la mise en place d'un cadre méthodologique standardisé et de haute qualité pour le suivi à long terme des loups et d'autres espèces insaisissables, à l'aide d'échantillons non invasifs. Nous avons appliqué ce cadre à la population de loups Française en tant qu'espèce exemplaire. **Nous avons décrit un panel de 22 loci microsatellites, ainsi qu'un marqueur de sexe, et des estimations d'indicateurs de qualité clés pour l'évaluation du cadre.** **Enfin**, nous avons utilisé ce panel pour estimer les indicateurs de base de la diversité génétique au sein de la population de loups Française.

2. Zone d'étude

La zone d'étude couvre l'ensemble du territoire Français, mais s'étend principalement des Pyrénées, au sud-est, jusqu'aux Vosges, dans le nord du pays (102 483 km²). Depuis la dernière phase de rétablissement du loup gris (Duchamp et al. 2012), les loups gris occupent divers types d'habitats et de paysages, allant des régions montagneuses des Alpes aux plaines. Les ongulés chassés par le loup gris sont principalement le chevreuil (*Capreolus capreolus*), le cerf élaphe (*Cervus elaphus*) et le sanglier (*Sus scrofa*) en plaine, ainsi que le chamois (*Rupicapra rupicapra*), le mouflon (*Ovis musimon*) et le cerf dans les régions montagneuses. La densité de population dans la zone d'étude varie entre 30 et 200 habitants au km² selon le département. Environ 1 500 000 moutons sont élevés chaque année dans la région pour la production de viande et de lait (IDELE 2018). En été, une grande partie de ces troupeaux pratique la transhumance et se déplace vers les pâturages d'altitude dans les Alpes. Des attaques de loups gris sur le bétail sont signalées chaque année, avec certains points chauds récurrents (Gervasi et al. 2021 ; Grente et al. 2022), en particulier dans la région Alpine, entraînant des pertes économiques importantes (Linnell et Cretois 2018).

3. METHODES

3.1. Échantillonnage

Depuis 1994, un suivi des loups gris est mené tout au long de l'année dans l'aire de répartition présumée de l'espèce en France, au moyen d'enquêtes de présence par repérage de traces. Une étude à deux échelles spatiales, avec des stratégies d'échantillonnage différentes, est menée chaque année de manière séquentielle (Duchamp et al. 2012). L'Office Français de la Biodiversité (OFB) supervise l'échantillonnage et est soutenu par des bénévoles formés, notamment des représentants de l'OFB, des gardes-chasse, des gestionnaires de parcs naturels, des chasseurs formés, des naturalistes, des éleveurs ovins et des professionnels de la montagne. Ce réseau de personnes a pour objectif de mener (i) un relevé de traces à grande échelle pour détecter la présence de nouveaux loups gris, et (ii) un relevé de traces intensif au sein d'un territoire connu de loups gris afin de surveiller la taille et la composition des

groupes (Duchamp et al. 2012). Toutes les données sont ensuite utilisées pour produire des mises à jour annuelles de la dynamique démographique et pour estimer la taille de la population (Cubaynes et al. 2010 ; Marescot et al. 2011). Tous les observateurs sont formés au prélèvement d'échantillons non invasifs tels que des excréments, de l'urine ou des poils. Les responsables au sein de la zone centrale (la zone connue pour abriter des loups gris) sont invités à sélectionner les échantillons les plus récents et à écarter les échantillons d'excréments qui semblent dater de plus de deux semaines. Les observateurs situés en dehors de la zone centrale sont tenus de collecter tous les échantillons suspects sans filtrage afin de maximiser la détection des événements de dispersion.

Les observateurs collectent les excréments et les poils principalement le long des sentiers ou des routes rurales, le long de transects ou de manière opportuniste. Les échantillons d'urine sont collectés le long des traces laissées par les loups gris dans les zones enneigées. **De plus**, des échantillons de tissus ou de sang sont prélevés sur des individus abattus lors d'opérations de contrôle menées par les autorités gouvernementales Françaises (échantillons frais) et sur les carcasses de loups gris morts à la suite d'accidents de la route, d'abattages illégaux ou d'autres causes.

Les échantillons de matières fécales et de tissus sont conservés dans des sachets hermétiques ZIPloc à -20°C dès leur retour du terrain, avant d'être stockés dans des conditions de laboratoire dans des piluliers contenant de l'éthanol à 96% de 20 ml. Des gants individuels et des outils stérilisés sont utilisés pour chaque échantillon afin d'éviter toute contamination. Les échantillons d'urine et de sang sont conditionnés selon la méthode décrite par Valiere et Taberlet (2000), et les échantillons de poils sont conservés dans une enveloppe à l'air sec. Tous les échantillons sont enregistrés dans une base de données nationale unique avec un numéro de référence unique afin d'assurer leur traçabilité.

Dans cette étude, 8 733 échantillons ont été analysés au cours de 45 sessions de laboratoire indépendantes, dont 7 316 échantillons de matières fécales (84%), 609 échantillons de tissus provenant de loups morts, 543 échantillons d'urine, 177 échantillons de poils et 88 échantillons de sang prélevés entre 2006 et 2022 (Figure 1). Les échantillons de tissus et de sang ont été inclus afin de comparer leur qualité à celle des échantillons non invasifs et de fournir une représentation complète de la population de loups gris en France. Chaque année, tous les échantillons provenant de la zone de colonisation sont sélectionnés en priorité pour détecter de nouveaux événements de dispersion ou de nouvelles meutes potentiels. Par la suite, des échantillons provenant de la zone centrale sont sélectionnés pour assurer le suivi annuel de chaque meute ou territoire de reproduction identifié.

3.2. Flux de travail

Un flux de travail unidirectionnel a été suivi pour chaque échantillon (Figure 2), avec des espaces dédiés à l'ADN rare et dégradé à chaque étape. **Tout d'abord**, les échantillons sont traités dès leur réception afin de vérifier la cohérence des informations avec le dossier correspondant. Ils sont ensuite préparés pour l'extraction d'ADN, qui a lieu dans une salle spéciale pour les échantillons non invasifs équipée d'un système de purification par lumière ultraviolette. Les échantillons d'ADN extraits sont conservés dans des congélateurs à -20°C. Les réactifs sensibles (enzymes et amorces d'ADN, etc.) utilisés pour l'amplification de l'ADN sont préparés dans une salle blanche à pression d'air positive, accessible via des sas

d'entrée et de sortie. L'ADN et les réactifs sont ensuite assemblés (travail manuel et automatisé ; étape pré-PCR) avant l'amplification et l'analyse de l'ADN amplifié (étape post-PCR). L'étape post-PCR est réalisée dans une grande salle blanche à pression d'air négative (accessible via deux sas d'entrée et de sortie), ce qui permet un recyclage continu de l'air (alimentation en air indépendante) ; elle est équipée de thermocycleurs et d'analyseurs d'ADN ABI-3730xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, États-Unis).

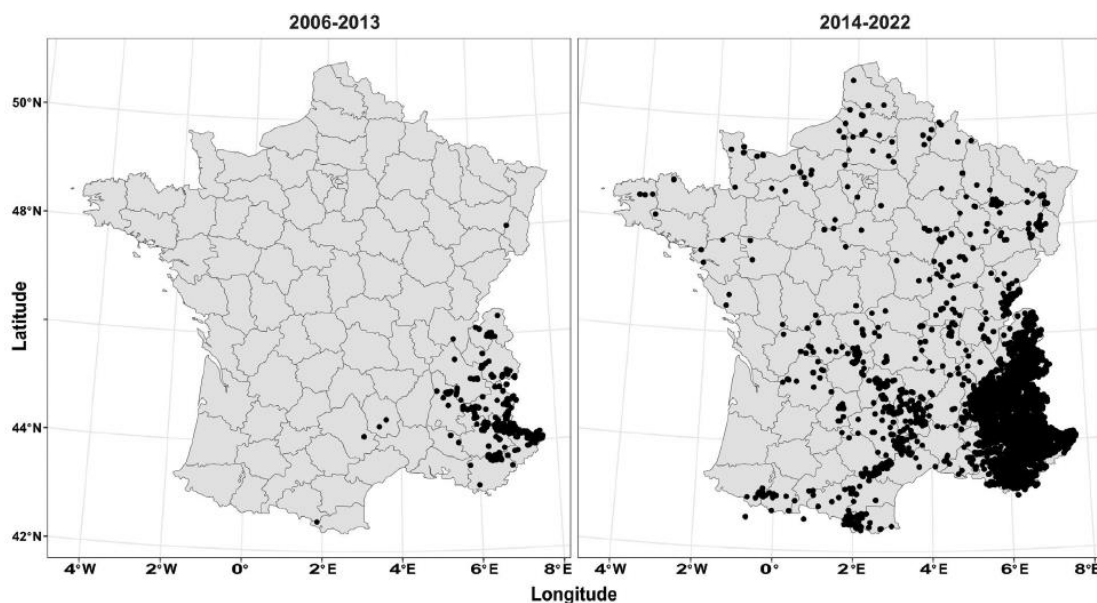


FIGURE 1. Évolution de la couverture de l'échantillonnage réalisé pour suivre la population de loups gris en France de 2006 à 2022 ($n = 8\,733$ échantillons)

3.3. Extraction de l'ADN

Des outils stériles à usage unique ont été utilisés pour manipuler les échantillons, et le poste de travail a été nettoyé à l'eau de Javel après le traitement de chaque échantillon afin d'éviter toute contamination croisée. Chaque échantillon de tissu a été transféré dans un microtube stérile et étiqueté en vue de l'extraction de l'ADN. Pour les selles, l'urine et le sang, le surnageant a d'abord été transféré dans un microtube numéroté, centrifugé pour éliminer l'éthanol, puis l'extraction de l'ADN a été réalisée à partir du culot. L'ADN des échantillons tissulaires et non invasifs a été extrait séparément. Deux contrôles d'extraction négatifs (blancs) et un contrôle d'extraction positif (échantillon, selles ou tissu, selon le type d'échantillon extrait, préalablement analysé et validé pour la qualité de l'ADN et le succès du génotypage à l'aide de marqueurs microsatellites) ont été ajoutés à chaque plaque à 96 puits. Les échantillons ont été lysés avec les contrôles d'extraction positifs et négatifs pendant une nuit à 56°C, conformément aux instructions du fabricant (kit Nucleospin 96 Tissue ; Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). L'ADN a été isolé et purifié à l'aide de colonnes de purification et d'une filtration sous vide (kit Nucleospin 96 Tissue).

Les échantillons d'ADN ont été conservés dans des plaques à 96 tubes étiquetées à -20°C dans un congélateur.

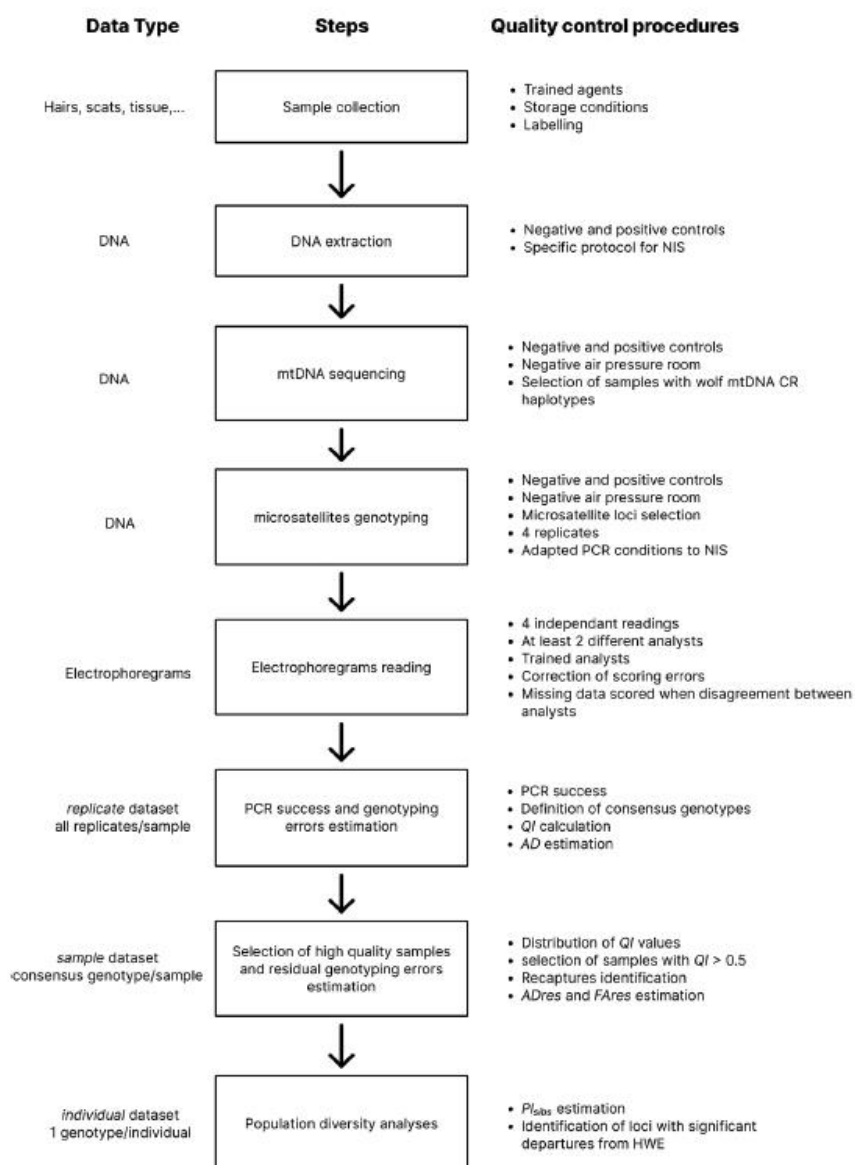


FIGURE 2. Organigramme des étapes clés et des procédures de contrôle appliquées au traitement des échantillons non invasifs de loup gris. AD, taux de perte d'allèles ; AD_{res}, taux résiduel de perte d'allèles ; FA_{res}, taux résiduel de faux allèles ; HWE, équilibre de Hardy-Weinberg ; MtDNA CR, région de contrôle mitochondriale ; NIS, échantillons non invasifs ; P_{Sibs}, probabilité d'identité entre frères et sœurs ; QI, indice de qualité

3.4. Séquençage mitochondrial et identification de la lignée

Afin d'identifier l'espèce et l'haplotype mitochondrial des échantillons de loup gris, un segment de 605 pb de la région de contrôle mitochondriale (mtDNA CR) a été amplifié par PCR à l'aide des amorces CR-Thr-L-15926-F et CR-DL-H-16340-R (Vilà et al. 1999).

Les amplifications par PCR ont été réalisées dans des microplaques à 96 puits avec un volume final de 10 µl contenant 5 µl de Mastermix Taq polymérase (kit Type-It PCR ; Qiagen, Hilden, Allemagne), 0,20 µM d'une paire d'amorces CR non fluorescentes et 3 µl d'extrait d'ADN. Le cycle thermique était le suivant : 95°C pendant 5 min, suivi de 40 cycles à 95°C pendant 30 s, 52°C pendant 90 s et 72°C pendant 45 s, puis une extension à 60°C pendant 10 min. Trois blancs de contrôle PCR et trois échantillons d'ADN de contrôle positif ont été ajoutés à chaque microplaque à 96 puits.

Les produits de la PCR ont été séquencés bidirectionnellement par la méthode Sanger à l'aide d'un kit de séquençage cyclique BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, États-Unis) avec les mêmes amorces. Après purification, les séquences ont été analysées à l'aide d'un séquenceur capillaire ABI PRISM 3130 XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, États-Unis), et les électrophérogrammes ont été interprétés à l'aide de SeqMan Pro (DNASTAR, Madison, WI, États-Unis).

Pour chaque échantillon, la séquence consensuelle obtenue a été comparée à la fois aux bases de données publiques et aux haplotypes de la lignée des loups (Pilot et al. 2010) à l'aide de BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Les scores d'identité et les valeurs E ont ensuite été analysés afin de déterminer à quelle espèce appartenait chaque échantillon et quels haplotypes présentaient les échantillons de loups gris. Seuls les échantillons présentant des haplotypes spécifiques aux loups gris ont été conservés. Les échantillons dont les haplotypes ont été identifiés par Pilot et al. (2010) et dont on sait qu'ils sont partagés par le chien domestique, *Canis familiaris*, et le loup gris, *C. lupus*, ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *Canis*. Comme nous ne pouvions pas confirmer avec certitude que ces échantillons provenaient de loups et qu'ils pouvaient provenir de chiens errants, nous avons choisi de ne pas les inclure dans les analyses ultérieures.

3.5. Génotypage par microsatellites

L'ADN a été génotypé à l'aide de 22 microsatellites autosomiques et d'un marqueur d'identification du sexe (amélogénine, hétérozygote chez les mâles et homozygote chez les femelles ; Ji et al. 2007) répartis en deux multiplexes (Annexe 1). L'ensemble des 22 microsatellites comprenait 11 loci sélectionnés car ils permettent de détecter des événements d'hybridation entre le chien domestique et le loup gris (Godinho et al. 2015), tandis que les loci restants sont couramment utilisés dans les études génétiques sur les populations de loups gris en Europe (Lucchini et al. 2002, 2004 ; Pilot et al. 2006 ; Fabbri et al. 2007 ; Sastre et al. 2011 ; Jansson et al. 2012 ; Hindrikson et al. 2013).

Les mélanges réactionnels pour la PCR ont été préparés selon le protocole unidirectionnel décrit ci-dessus. Après la préparation des réactifs sensibles (enzymes et amorces d'ADN), l'ADN et les réactifs ont été mélangés à l'aide d'embouts filtrés dans une salle de pré-PCR. Trois blancs de contrôle PCR et trois échantillons d'ADN de contrôle positif ont été ajoutés à chaque microplaque à 96 puits. Les amplifications par PCR ont été réalisées dans la salle post-PCR désignée, dans un volume final de 10 ml contenant 5 ml de mélange maître Taq Polymerase (kit Type-It Microsatellite PCR ; Qiagen, Hilden, Allemagne), 0,63 ou 0,66 ml de l'un des deux pools de 12 paires d'amorces (pour chacun des deux multiplexes) à une concentration de 0,05 à 0,8 M selon le multiplex, et 3 µl d'ADN. Une amorce de chaque paire était couplée à un colorant fluorescent (Annexe 1).

Le cycle thermique était le suivant : 95°C pendant 5 min, suivi de 40 cycles à 95°C pendant 30 s, 58°C pendant 90 s et 72°C pendant 45 s, puis une extension à 60°C pendant 30 min. Pour les échantillons de tissus frais, le nombre de cycles a été réduit à 35. Les produits de la PCR ont été séparés à l'aide d'un séquenceur capillaire ABI PRISM 3130 XL (Applied Biosystems) dans des conditions dénaturantes (formamide) avec un marqueur de taille interne, en une seule migration pour chaque multiplex. Les électrophérogrammes de chaque échantillon ont été analysés à l'aide de GENEMAPPER V.4.1 (Applied Biosystems).

Quatre réplicats ont été systématiquement réalisés pour chaque échantillon non invasif et deux pour les échantillons de tissus provenant de loups récemment abattus. En effet, des simulations ont montré que l'augmentation du nombre de réplicats au-delà de quatre pour les échantillons non invasifs n'améliorait la précision du génotypage que pour les échantillons de qualité moyenne.

Les échantillons de mauvaise qualité restaient de mauvaise qualité quel que soit le nombre de réplicats, tandis que quatre réplicats étaient suffisants pour les échantillons de bonne qualité (données non présentées). Au moins deux analystes différents ont vérifié indépendamment les électrophorogrammes de chaque réplicat. En cas de divergence entre les analystes sur un locus, les résultats étaient contestés. Si, après discussion, aucun consensus ne pouvait être atteint, une donnée manquante était enregistrée pour le locus en question. Ces analystes ont été formés pour attribuer avec précision des allèles aux loci sélectionnés en se basant sur des échantillons de tissus précédemment analysés et validés pour la qualité de l'ADN et la réussite du génotypage, ainsi que sur des échantillons présentant un ADN dégradé. Ils étaient capables de distinguer les allèles réels des artefacts éliminés lors de l'évaluation. Si deux allèles réels étaient observés au niveau d'un locus dans l'une des réplifications ou dans l'ensemble des réplifications d'un échantillon, celui-ci était considéré comme contaminé et n'était pas utilisé pour les analyses ultérieures. Un accord total entre les analystes sur l'ensemble des loci était requis pour valider l'évaluation du génotypage.

Un génotype consensuel pour chaque échantillon a été créé sur la base des génotypes observés dans chaque réplicat. Nous avons considéré chaque allèle amplifié qui a été conservé par les analystes comme un allèle véritable et l'avons retenu dans le génotype consensuel (l'amplification par fausse positive a été corrigée lors de l'évaluation), c'est-à-dire une amplification pour chaque allèle requis pour les loci hétérozygotes et homozygotes.

3.6. Analyses de qualité

Des analyses statistiques ont été réalisées sur les trois ensembles de données (Figure 2) afin d'estimer les indicateurs de qualité et les statistiques de diversité de la population.

- *Ensemble de données des réplicats d'échantillons* : une ligne par réplicat et par échantillon.
- *Ensemble de données des génotypes consensuels d'échantillons* : une ligne par génotype consensuel issu de 2 à 4 réplicats.
- *Ensemble de données des génotypes consensuels individuels* : une ligne par individu.

3.6.1. Réussite de la PCR, qualité des échantillons et identification des individus

Tout d'abord, l'ensemble de données des réplicats d'échantillons a été utilisé pour évaluer le taux de réussite de la PCR et la qualité des échantillons. La réussite de la PCR par locus a été calculée en divisant le nombre d'amplifications réussies par le nombre total d'amplifications tentées.

Ensuite, la qualité des échantillons a été évaluée en calculant un indice de qualité (IQ) pour chaque locus et en comparant le génotype observé dans chaque réplicat avec le génotype consensuel (Miquel et al. 2006). Une note de 1 a été attribuée à la réplique si son génotype pour le locus considéré correspondait au génotype consensuel ; 0,5 si un AD était présent ; et 0 si le génotype était manquant (c'est-à-dire absence d'amplification, contamination ou

désaccord entre les analystes). La moyenne de ces scores a été calculée pour le locus sur l'ensemble des réplicats. **Ensuite**, la moyenne de ces scores a été calculée sur l'ensemble des loci pour chaque échantillon, ce qui a donné un IQ compris entre 0 (mauvaise qualité) et 1 (excellente qualité).

Ensuite, l'ensemble de données contenant uniquement les génotypes consensuels pour chaque échantillon (*ensemble de données consensuel des échantillons*) a été utilisé pour examiner la distribution des scores IQ moyens par échantillon. Les échantillons de haute qualité, c'est-à-dire ceux présentant des valeurs de $QI > 0,5$ (seuil choisi après des analyses préliminaires ; données non présentées), ont été utilisés pour identifier les différents individus. Les échantillons présentant des génotypes consensuels identiques (les données manquantes au niveau d'un locus ont été considérées comme une similitude) et partageant au moins 12 loci sans données manquantes ont été attribués à un seul individu. **De plus**, les échantillons provenant d'un même individu peuvent présenter des discordances d'allèles dues à l'AD ou à la FA. La probabilité d'observer une discordance suit une distribution binomiale $B(n, s, p)$, où n est le nombre de loci, s le nombre de discordances et p le taux moyen de perte d'allèle pour les échantillons de haute qualité. La probabilité d'observer au moins une erreur sur 12 loci était de 0,587, 99% des erreurs se situant dans la fourchette de une à trois discordances. Sur la base de ces analyses, les échantillons présentant trois discordances alléliques ou moins ont été attribués au même individu. Des informations supplémentaires telles que la qualité de l'échantillon, la date et le lieu de prélèvement ont été utilisées pour confirmer si les deux échantillons devaient être attribués au même individu. Nous avons retenu un génotype consensuel pour chaque individu afin de définir les génotypes multilocus individuels.

Enfin, l'ensemble de données consensuelles individuelles a été utilisé pour estimer la performance de l'ensemble de loci microsatellites dans l'identification d'individus distincts. Nous avons calculé la probabilité que deux individus présentent le même génotype multilocus par hasard, c'est-à-dire la probabilité d'identité entre frères et sœurs (PI_{sibs}) (Waits et al. 2001)), pour chaque combinaison de loci, qui variait entre 2 et 22 loci.

3.6.2. Estimation des erreurs de génotypage

L'ensemble de données « Sample replicate » a été utilisé pour estimer le taux initial de perte d'allèles pour chaque échantillon et chaque locus, comme décrit dans l'équation 1 de Broquet et Petit (2004), c'est-à-dire en divisant le nombre d'AD observés par le nombre de PCR réussies, en ne considérant que les réplicats provenant d'échantillons présentant des génotypes consensuels hétérozygotes. Nous n'avons estimé que les taux d'AD à ce stade, car les analystes ont corrigé la FA lors de la lecture des électrophérogrammes. Cette opération a été effectuée avec les réplicats de tous les échantillons (AD) et après avoir sélectionné uniquement les réplicats d'échantillons de haute qualité (AD_{high}). L'ensemble de données « Sample consensus » et les génotypes consensuels des individus recapturés ont ensuite été utilisés pour estimer les taux résiduels d'AD (AD_{res}) et de FA (FA_{res}). Les génotypes provenant de différents échantillons attribués au même individu ont été comparés au génotype consensuel retenu pour cet individu. Pour l' AD_{res} , l'équation 1 de Broquet et Petit (2004) a été utilisée, comme pour *l'ensemble de données des réplicats* d'échantillons, tandis que la FA a été estimée en divisant le nombre de FA observés par le nombre d'amplifications réussies pour chaque locus (Equation 3 de Broquet et Petit 2004). Ces indicateurs ont permis

de quantifier les pertes d'allèles et les faux allèles restants dans l'ensemble de données après correction de ceux détectés dans les réplicats de chaque échantillon.

Enfin, l'AD restante dans *l'ensemble de données de consensus individuel* a été évaluée à l'aide de Micro-Checker (Van Oosterhout et al. 2004) et de ML_NullFreq (Kalinowski et Taper 2006).

3.7. Diversité génétique des populations

À partir de l'ensemble de données « Individual consensus », l'hétérozygotie observée et attendue (H_o et H_e), l'indice de fixation (F_{IS}) et le nombre d'allèles par locus ont été évalués à l'aide du package R hierfstat (Goudet et Jombart 2015). Les écarts significatifs par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE) ont été calculés en permutant les allèles au sein de la population à l'aide de 1 000 permutations (Goudet et Jombart 2015).

Les analyses statistiques (à l'exception de celles réalisées avec Micro-Checker et ML_NullFreq) ont été effectuées à l'aide de R (R Core Team 2023) et de RStudio (Posit Team 2024).

4. RESULTATS

4.1. Séquençage mitochondrial et identification des lignées

Des séquences complètes de l'ADNmt CR ont été obtenues pour 7 234 échantillons (82,8% ; **Figure 3**) sur les 8 733 échantillons analysés (1 499 échantillons sans espèce attribuée). Parmi ces 7 234 échantillons, 5 840 ont été attribués sans ambiguïté à *C. lupus* (66,8% des échantillons collectés ; **Figure 3**). Sur les 117 échantillons attribués à *Canis* sp. (1,4% des échantillons collectés), sept présentaient des mitotypes communs au chien domestique et au loup gris (un mitotype w2, quatre w7 et deux w14, tels que définis par Pilot et al. [2010]), tandis que la séquence CR mitochondriale de 110 autres échantillons n'était pas de qualité suffisante pour permettre l'identification de l'espèce.

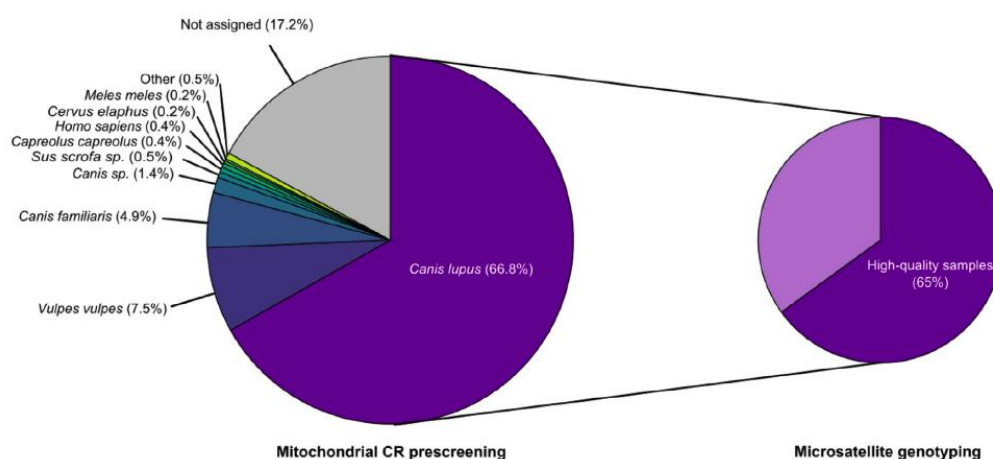


FIGURE 3. Proportion d'échantillons prélevés dans le cadre du suivi de la population de loups gris en France qui ont pu être analysés avec succès à l'aide de la région de contrôle mitochondriale et du panel de 22 loci microsatellites. CR : région de contrôle. La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'échantillons prélevés (cercle de gauche, $n = 8 733$ échantillons) et au nombre d'échantillons présentant un haplotype de loup gris (cercle de droite, $n = 5 840$). Le cercle de gauche indique le pourcentage d'échantillons pour lesquels une espèce a pu être identifiée lors du séquençage de la région de contrôle mitochondriale, et le cercle de droite indique le pourcentage d'échantillons de loup gris présentant un indice de qualité (QI) $> 0,5$ et n'ayant pas été contaminés lors du génotypage à l'aide du panel de 22 loci microsatellites

Parmi les 5 840 échantillons de loups gris, la lignée Italo-Alpine a été identifiée dans 5 832 échantillons (99,9%), présentant le mitotype w22 identifié par Pilot et al. (2010). Six autres

échantillons ont été attribués à la lignée d'Europe de l'Est, présentant le mitotype w1, tel qu'identifié par Pilot et al. (2010). Les deux échantillons restants présentaient le même mitotype, qui correspondait à une séquence référencée dans GenBank (numéro d'accès KF661072) et avait été obtenue à partir d'un échantillon prélevé en Alaska. Ces échantillons correspondaient à un individu qui s'était échappé de captivité après une tempête et avait été détecté à l'état sauvage au cours des deux années suivantes, mais jamais depuis.

4.2. Analyses de qualité

4.2.1. Réussite de la PCR, qualité des échantillons et identification des individus

L'ensemble de données des répliquats d'échantillons comprenait des répliquats de 5 840 échantillons génotypés. À partir de cet ensemble de données, le taux moyen de réussite de la PCR par locus était de 64,1% (Figure 4 ; Annexe 2), et la valeur moyenne de l'indice de qualité (QI) par locus était de 0,64 (Figure 4 ; Annexe 2).

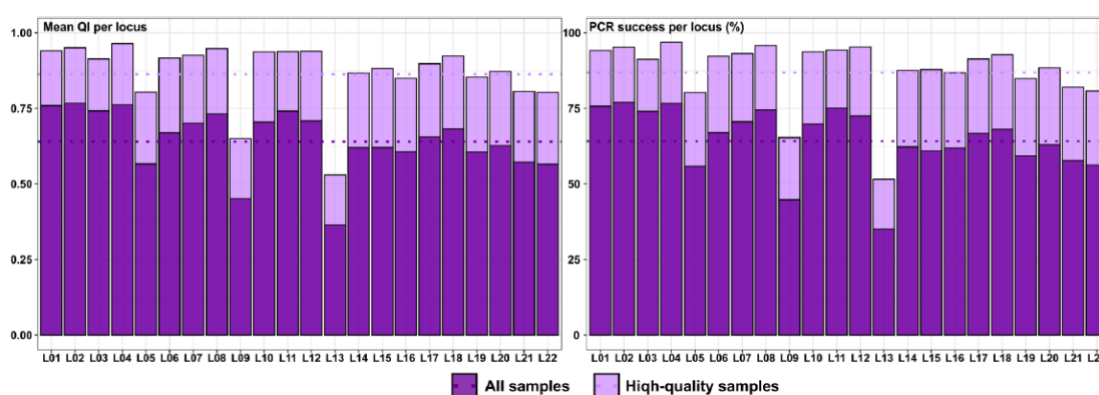


FIGURE 4. Valeurs de l'indice de qualité et taux de réussite de la PCR par locus pour les échantillons de loup gris prélevés en France. Pour chaque indicateur, les barres violet foncé indiquent les valeurs estimées à partir de l'ensemble des échantillons génotypés ($n = 5840$), tandis que les barres violet clair indiquent les valeurs estimées à partir des seuls échantillons présentant des valeurs de l'indice de qualité (QI) supérieures à 0,5 et exempts de contamination ($n = 3797$). La moyenne de l'indicateur sur l'ensemble des loci est représentée par la ligne pointillée

À partir de l'ensemble de données de consensus des échantillons, aucune amplification n'a été observée dans 473 échantillons (8,1% des échantillons génotypés), principalement constitués de crottes (Figure 5). De plus, 122 échantillons présentaient une contamination possible (2,1% des échantillons génotypés). Les valeurs moyennes de l'indice de qualité (QI) par échantillon variaient entre 0 et 1, 50% des échantillons présentant des valeurs de QI supérieures à 0,76 et 25% supérieures à 0,96 (Figure 5). Les échantillons de tissus et de sang ont généralement présenté une meilleure qualité que les autres types d'échantillons, avec des valeurs moyennes de QI de 0,96 et 0,88, respectivement (Figure 5), bien que certains échantillons de tissus aient été dégradés, comme l'indiquaient des valeurs moyennes de QI $< 0,75$ (27 échantillons ; 4,8% des échantillons de tissus). Ces échantillons correspondaient principalement à ceux prélevés sur des loups retrouvés morts et déjà dégradés (seuls quatre échantillons de tissus frais parmi eux).

Nous avons conservé les échantillons présentant des valeurs moyennes d'QI $> 0,5$ et ne présentant aucun signe de contamination pour effectuer les analyses ultérieures, car nous avons estimé que ce seuil de QI constituait un bon compromis entre l'amélioration de la qualité des échantillons conservés et la nécessité de ne pas écarter un trop grand nombre d'échantillons (les analyses précédentes montrant en moyenne moins de quatre loci

manquants par génotype). Ces échantillons ($n = 3\,797$; 65,0% des échantillons génotypés) présentaient un taux de réussite moyen de la PCR par locus de 87,3% et une valeur moyenne de QI par locus de 0,87 (Annexe 2). Ils ont été utilisés pour déterminer le nombre d'individus distincts.

Sur ces 3 797 échantillons, le seuil de trois mésappariements a permis d'identifier 1 735 individus distincts échantillonnés sur 15 ans, dont 1 054 n'ont été échantillonnés qu'une seule fois et 681 ont été échantillonnés entre 2 et 35 fois, avec une moyenne de 4,03 échantillons par individu.

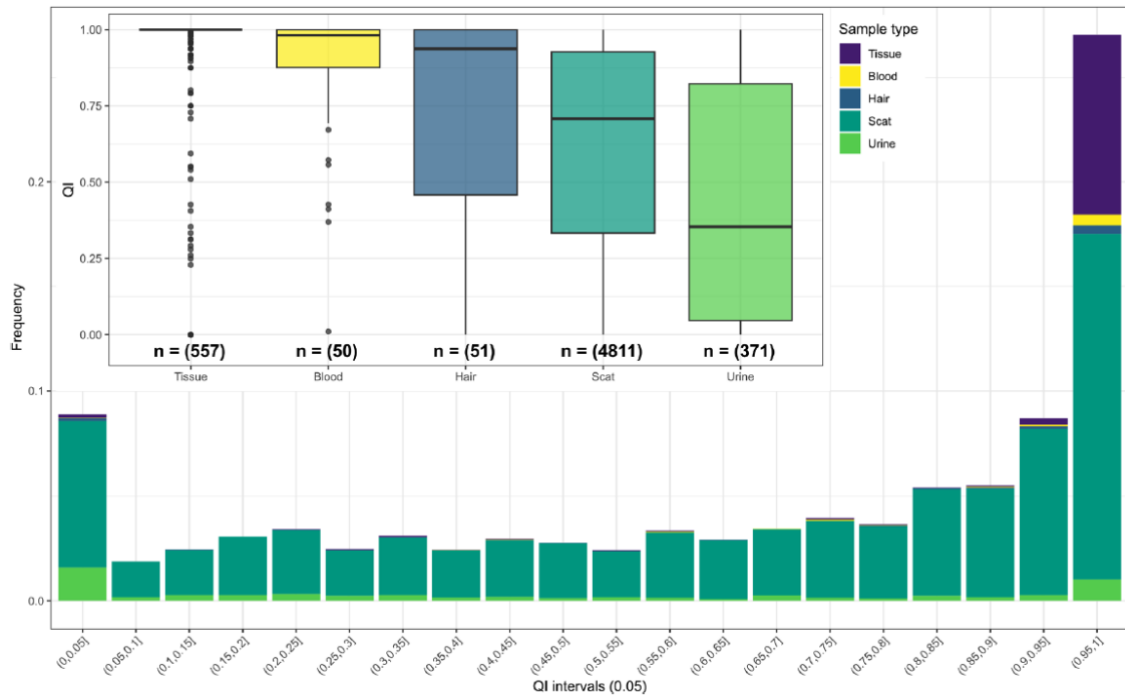


FIGURE 5. Répartition des indices de qualité parmi les échantillons de loup gris prélevés en France ($n = 5\,840$). Les diagrammes en boîte indiquent les valeurs moyennes de l'indice de qualité (IQ) par type d'échantillon, et les couleurs correspondent au type d'échantillon (tissu, sang, poils, excréments ou urine).

À partir de *l'ensemble de données de consensus individuel* (1 735 individus distincts), le pouvoir discriminant des 22 loci microsatellites pour l'identification d'individus distincts était élevé, avec un PI_{Sibs} de $1,87 \times 10^{-6}$ (Figure 6). Après avoir testé toutes les combinaisons possibles de loci, un génotypage réussi d'au moins neuf loci était nécessaire pour garantir que la valeur moyenne du PI_{Sibs} soit inférieure au seuil de 10^{-2} . **Cependant**, pour rester systématiquement en dessous de ce seuil, quels que soient les loci inclus, un génotypage réussi d'au moins 12 loci a permis d'obtenir un PI_{Sibs} maximal de $7,22 \times 10^{-3}$ pour la combinaison la moins variable (Figure 6 et Annexe 3). **De plus**, les 3 797 échantillons utilisés pour l'identification des individus ont donné lieu à environ 7,2 millions de comparaisons, dont 6 756 (0,09%) concernaient des génotypes présentant 12 loci partagés sans données manquantes. Avec un PI_{Sibs} moyen de $6,35 \times 10^{-3}$ pour les 12 loci génotypés avec succès, le seuil de 12 loci sans données manquantes utilisé pour attribuer les échantillons à un seul individu a donc été adapté. **De plus**, en exigeant au moins 16 loci partagés sans données manquantes entre les échantillons attribués au même individu (c'est-à-dire un PI_{Sibs} moyen de $6,52 \times 10^{-5}$ pour les frères et sœurs), le nombre estimé d'individus est resté pratiquement inchangé, avec une

diminution inférieure à 0,9%. Cela indique un faible niveau d'incertitude dans l'identification des échantillons provenant du même individu.

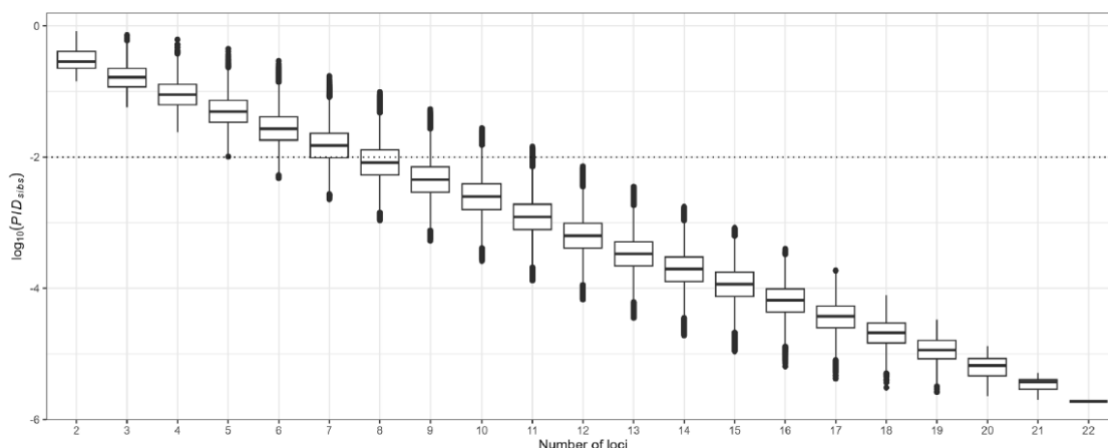


FIGURE 6. Valeurs de la probabilité d'identité entre frères et sœurs (PI_{sibs}) calculées à partir des 1 735 individus distincts identifiés. La ligne pointillée délimite le seuil de $1,00 \times 10^{-2}$

4.2.2. Estimation des erreurs de génotypage

À partir de l'ensemble de données des réplicats d'échantillons, le taux d'AD initial moyen par locus était de 11,0%, variant entre 5,73% et 18,92% (Figure 7 ; Annexe 2). En filtrant uniquement les réplicats provenant d'échantillons présentant un QI moyen $> 0,5$ et sans contamination, le taux d'AD_{high} moyen a chuté à 7,1%, avec une fourchette par locus comprise entre 1,67% et 16,82% (Figure 7).

En utilisant l'ensemble de données de consensus des échantillons et en filtrant les génotypes de consensus des échantillons provenant d'individus capturés à plusieurs reprises, l'AD_{res} est tombé à une moyenne de 5,8% (fourchette par locus comprise entre 0,5 % et 18,7 %), soit près du double de l'AD moyen initial par locus (Figure 7 ; Annexe 2). Le FA_{res} était faible, variant entre 0,2% et 1,7%, avec une moyenne de 1,0% (Figure 7 ; Annexe 2). Le taux de FA_{res} était faible, oscillant entre 0,2% et 1,7%, avec une moyenne de 1,0% (Figure 7 ; Annexe 2).

Les valeurs QI par locus étaient négativement corrélées avec la proportion de données manquantes par locus (test de corrélation de Kendall, $f = -0,73$, $p = 2,1 \times 10^{-6}$), les valeurs AD_{res} (test de corrélation de Kendall, $f = -0,42$, $p = 0,006$), mais pas avec les valeurs FA_{res} (test de corrélation de Kendall, $f = -0,30$, $p = 0,05$). **Par conséquent, le QI est un bon indicateur de la réussite de la PCR et vient compléter les indicateurs d'erreur de génotypage.**

En utilisant l'ensemble de données de consensus individuel et en supprimant le génotype de l'individu présentant un mitotype CR nord-Américain, Micro-Checker a détecté des allèles nuls aux loci 3, 10 et 11. En testant les excès d'homozygotes et les écarts par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE), ML_NullFreq a détecté des allèles nuls sur huit loci (locus 03, locus 5, locus 9, locus 10, locus 11, locus 13, locus 15 et locus 22 ; $p < 0,001$, 10 000 randomisations), avec des fréquences $> 5\%$ (c'est-à-dire supérieures à la moyenne AD_{res}) dans quatre de ces loci (Locus 3, Locus 9, Locus 10 et Locus 11 ; Annexe 2).

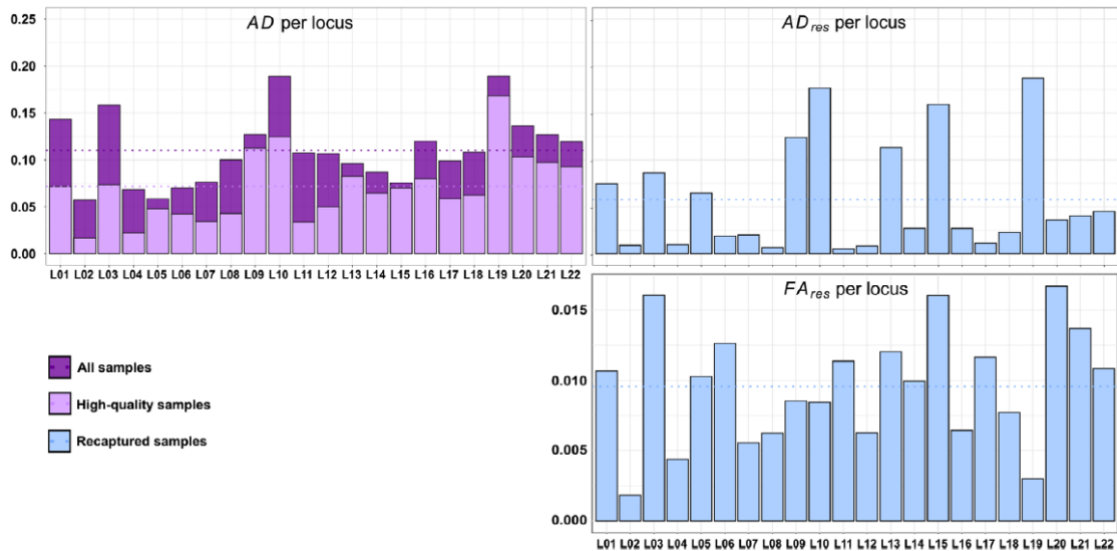


FIGURE 7. Fréquences des erreurs de génotypage par locus dans les échantillons de loups. Pour chaque indicateur, les barres violet foncé indiquent les valeurs estimées à partir de l'ensemble des échantillons génotypés ($n = 5840$), tandis que les barres violet clair indiquent les valeurs estimées à partir des seuls échantillons présentant un indice de qualité (QI) $> 0,5$ et exempts de contamination ($n = 3797$) ; les barres bleu clair correspondent aux valeurs estimées à partir des échantillons provenant d'individus recapturés ($n = 2743$). La moyenne de l'indicateur sur l'ensemble des loci est représentée par la ligne pointillée

4.3. Diversité génétique des populations

Parmi les 1 735 individus distincts échantillonnés, le rapport des sexes de 0,55 était significativement biaisé en faveur des mâles (test χ^2 , score $\chi^2 = 16,46$, $p = 4,9 \times 10^{-5}$).

La richesse allélique par locus variait entre 4 et 16 allèles/locus, avec un total de 188 allèles (Tableau 1). L'hétérozygotie observée (H_o) par locus variait entre 0,054 et 0,789, avec une moyenne de 0,482, tandis que l'hétérozygotie attendue (H_e) par locus variait entre 0,056 et 0,796, avec une moyenne de 0,519 (Tableau 1). Nous avons observé des valeurs de F_{IS} significativement élevées ($> 0,1$) pour cinq loci (Tableau 1), indiquant un écart significatif par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE). La valeur de F_{IS} sur l'ensemble des loci était de 0,072 et différait légèrement de 0 (intervalle de confiance à 95 % [IC], 0,065-0,080 ; test t , $P = 0,034$). Une fois les cinq loci présentant des valeurs F_{IS} élevées (probablement dues à des allèles nuls) retirés, le F_{IS} global est tombé à 0,005 et n'était pas significativement différent de 0 (IC à 95%, $-0,004$ à 0,013). Un résultat similaire a été obtenu lors de l'estimation des valeurs F_{IS} annuelles, qui n'étaient pas significativement différentes de 0 une fois les cinq loci présentant des allèles nuls putatifs retirés. Aucune variation d'une année à l'autre n'a été observée pour l'hétérozygotie ou la richesse allélique (Annexe 4).

5. DISCUSSION

Cette étude a décrit un protocole standardisé et fiable permettant d'analyser des échantillons prélevés de manière non invasive afin de surveiller les populations de loups en France et de fournir certains indices génétiques de base sur la diversité de ces populations.

5.1. Cadre méthodologique visant à garantir des données génétiques de haute qualité

Il est urgent de disposer de protocoles standardisés pour réaliser des analyses spécifiques et maintenir un flux de travail continu et cohérent dans le temps, tout en contrôlant les pertes de données et/ou les allèles erronés afin d'éviter un génotypage incorrect. Le protocole décrit dans cette étude s'est appuyé sur l'identification des étapes clés essentielles à l'analyse

d'échantillons non invasifs (Creel et al. 2003 ; Scandura et al. 2006 ; Stenglein, Waits, et al. 2010 ; Caniglia et al. 2012 ; Nakamura et al. 2017 ; Stikarova et al. 2019). Ces étapes comprenaient (i) l'échantillonnage, qui devait couvrir de manière exhaustive l'aire de répartition de l'espèce étudiée et s'accompagner de procédures de haute qualité pour le prélèvement et le stockage des échantillons, (ii) la sélection des loci utilisés, (iii) la réussite de la PCR, (iv) la lecture précise des électrophérogrammes, et (v) l'évaluation des taux d'erreur de génotypage résiduels et de la fiabilité des génotypes. Une fois ces étapes identifiées, nous avons appliqué des procédures de contrôle à chacune d'entre elles dans le cadre d'un flux de travail unique et continu afin d'analyser un nombre significatif d'échantillons. À notre connaissance, il s'agit de la première étude utilisant des échantillons non invasifs de loups gris collectés à une échelle temporelle et spatiale aussi vaste et appliquant cet ensemble de procédures de contrôle.

TABLEAU 1. Statistiques sur la diversité génétique de la population de loups en France, basées sur 22 marqueurs microsatellites ($n = 1\,735$ individus)

Locus	Name	Na	H_o	H_e	F_{IS}
L01	AHT103	7	0.137	0.138	0.019
L02	AHT111	8	0.572	0.578	0.008
L03	AHTk211	8	0.128	0.505	0.758**
L04	FH2096	6	0.557	0.554	-0.013
L05	CPH02	8	0.553	0.583	0.041*
L06	FH2088	7	0.596	0.602	0.017
L07	C09.173	5	0.606	0.626	0.032
L08	CPH05	6	0.646	0.633	-0.02
L09	FH2004	15	0.63	0.724	0.105*
L10	CFX30371	4	0.068	0.13	0.508**
L11	CXX279	8	0.455	0.646	0.306**
L12	C09.250	7	0.734	0.714	-0.031*
L13	FH2161	15	0.673	0.754	0.08*
L14	FH2140	13	0.613	0.619	0.004
L15	INU030	6	0.148	0.151	0.016
L16	FH2137	16	0.779	0.795	0.011
L17	FH2054	9	0.789	0.77	-0.024*
L18	C27.442	6	0.299	0.306	0.025
L19	Dbar1	11	0.051	0.053	0.024
L20	REN162C04	9	0.413	0.4	-0.032
L21	PEZ17	8	0.642	0.653	0.006
L22	FH2010	6	0.446	0.48	0.057*
Total		188	0.479	0.519	0.072*

Note: Asterisks indicate loci with significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).
Abbreviations: F_{IS} , Inbreeding coefficient; H_e , Expected heterozygosity; H_o , Observed heterozygosity; Na, Number of alleles.

5.1.1. Échantillonnage

Tout d'abord, la stratégie d'échantillonnage mise en œuvre en France se distingue par un suivi très intensif des populations de loups gris à grande échelle sur l'ensemble du territoire national (voir toutefois le suivi de la population de loups gris d'Europe centrale ; [Jarausch et al. 2021]). Alors que seuls quelques individus avaient été observés en 1994, la population de loups en France est actuellement estimée à environ 1 100 individus (Duchamp et al. 2023), avec une aire de répartition s'étendant des Alpes Françaises à d'autres chaînes de montagnes

en France, comme le Massif central (Louvrier et al. 2018). L'intensité de la stratégie d'échantillonnage s'est accrue avec la croissance de la population, avec environ 1 300 à 1 750 échantillons par an soumis à une analyse génétique depuis 2017. **Par conséquent**, le grand nombre d'échantillons à analyser nécessite un protocole spécifique et standardisé afin de limiter les coûts en temps et en argent tout en obtenant un ensemble de données de haute qualité (Payne et al. 2018).

La **présélection** des échantillons par séquençage du CR de l'ADNmt a pour double objectif d'identifier les espèces non ciblées au stade le plus précoce et de détecter les échantillons présentant des quantités insuffisantes ou un ADN dégradé, ce qui pourrait entraver la réussite de l'amplification des loci autosomiques. **Dans cette étude, nous avons réussi à séquencer l'ADNmt de 82,8% des échantillons collectés, un taux de réussite conforme à ceux observés dans des études précédentes et confirmant la haute qualité de la collecte, du stockage et du traitement des échantillons avant l'extraction de l'ADN** (Annexe 5). Des espèces autres que le loup gris (*C. lupus*) ont été détectées dans les échantillons collectés, en particulier le renard (*Vulpes vulpes*, 7,5% des échantillons) et le chien domestique (*C. familiaris*, 4,9% des échantillons), principalement en dehors de l'aire de répartition connue. **En effet**, le protocole d'échantillonnage en France conseille aux observateurs de collecter tous les échantillons de type loup en dehors de l'aire de répartition connue afin d'assurer la meilleure couverture possible des individus dispersés sans filtrer trop d'échantillons ni passer à côté de certaines détections, compensant ainsi l'expérience limitée des observateurs.

5.1.2. Sélection des loci

Le nombre de loci microsatellites utilisés dans cette étude était supérieur à celui utilisé dans d'autres études sur les loups (Annexe 5). Cela a permis d'améliorer la discrimination entre les différents individus, comme le montre la faible probabilité d'identité entre frères et sœurs. Bien que ce nombre élevé de loci puisse également augmenter la proportion de marqueurs présentant des erreurs de génotypage (Mills et al. 2000 ; McKelvey et Schwartz 2004 ; Waits et Paetkau 2005), **les taux d'erreur de génotypage estimés ici se situaient dans une fourchette inférieure à ceux d'études similaires sur les loups, bien que relativement peu de loci microsatellites aient été utilisés** (Annexe 5). **De plus**, relativement peu d'échantillons ont été écartés, comme le montre la possibilité de conserver des échantillons présentant jusqu'à 50% de loci manquants tout en obtenant une valeur $PI_{sibs} < 10^{-2}$.

Alors que les microsatellites ont été l'un des types de marqueurs moléculaires les plus couramment utilisés pour les programmes de surveillance génétique au cours des trois dernières décennies, les nouvelles méthodes de séquençage et de génotypage à haut débit sont devenues de plus en plus abordables, permettant la transition vers des loci de polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) (Campbell et al. 2015 ; von Thaden et al. 2017 ; Eriksson et al. 2020). Contrairement aux microsatellites, ces loci ne nécessitent pas d'étalonnage entre différents laboratoires, ne reposent pas sur la lecture d'électrophorèmes et sont moins affectés par des décisions de notation subjectives (von Thaden et al. 2017), ce qui les rend très utiles pour la surveillance génétique. Néanmoins, la transition des microsatellites vers les loci SNP n'est pas toujours simple, en particulier dans les programmes de surveillance à long terme utilisant des échantillons non invasifs, et soulève des questions

quant à la continuité et la cohérence entre les séries chronologiques (Osborne et al. 2023) ainsi qu'à la quantité et la qualité suffisantes de l'ADN disponible (Ogden 2011).

5.1.3. Succès de la PCR

Le taux de réussite moyen de la PCR était de 64,2%, ce qui se situait dans la fourchette des taux observés dans d'autres études utilisant des échantillons non invasifs de loups gris, et illustre la haute qualité des procédures de laboratoire (Annexe 5). Cela valide également le processus de notation, même si nous n'avons pas pu déterminer combien d'échantillons ont été écartés en raison de désaccords entre les analystes lors de la notation des électrophorèmes. Des taux de réussite relativement élevés ont été observés principalement dans les études portant sur des échantillons de qualité relativement élevée, tels que ceux filtrant des excréments de moins de 5 jours, ou dans les études comportant un nombre relativement important de réplicats par échantillon (Annexe 5).

Le nombre de réplicats varie d'une étude à l'autre. La recommandation initiale pour l'approche multitube était d'effectuer huit réplicats par échantillon (Taberlet et al. 1996), ce qui reposait également sur un faible nombre de loci ; **cependant**, un nombre relativement élevé de réplicats était nécessaire pour garantir la qualité du génotypage. L'augmentation du nombre de réplicats est chronophage et coûteuse. Plusieurs études ont souligné la nécessité de mettre en balance le risque entre un nombre élevé de marqueurs avec peu de réplicats et un nombre faible avec un nombre élevé de réplicats (Frantz et al. 2003 ; Paetkau 2003 ; Schwartz et al. 2007). Dans les études utilisant des échantillons non invasifs de loups gris, le nombre de réplicats se situe généralement entre 2 et 4 par échantillon (Annexe 5), bien que dans certaines études, les réactions PCR aient été répétées jusqu'à 12 fois pour les échantillons de mauvaise qualité (Jarausch et al. 2021). Compte tenu du grand nombre d'échantillons analysés dans cette étude, ajuster le nombre de réplicats après PCR à la qualité de chaque échantillon (éventuellement estimée par une étape de présélection sur 3 à 4 loci) serait extrêmement chronophage. **Des tests supplémentaires ont également montré que les échantillons présentant un génotypage de mauvaise qualité dans quatre réplicats restaient généralement de mauvaise qualité avec des réplicats supplémentaires.** Nous avons donc décidé d'effectuer quatre réplicats pour les échantillons non invasifs et deux pour les échantillons de tissus frais à titre de référence, et d'écarter tous les échantillons de mauvaise qualité ($QI < 0,5$) pour l'analyse ultérieure. Cette stratégie permet d'optimiser les coûts sans investir trop d'efforts dans un échantillon de mauvaise qualité ; au contraire, une analyse supplémentaire sur un nouvel échantillon provenant de la même zone peut fournir un génotype de qualité relativement bonne.

Il convient de noter que le prélèvement direct d'échantillons de tissus peut entraîner une mauvaise qualité de l'ADN s'ils proviennent d'animaux morts depuis plusieurs jours ou semaines (89% des échantillons de tissus présentant des valeurs de $QI < 0,5$).

5.1.4. Évaluation de la qualité des échantillons et des erreurs de génotypage

Nous avons déterminé la fiabilité des génotypes et sélectionné des échantillons de haute qualité en calculant le QI , comme proposé par Miquel et al. (2006). Nous avons fait la distinction entre les pertes d'allèles et les données manquantes lors de l'évaluation, car les pertes d'allèles fournissent toujours des informations sur le génotype multilocus d'un échantillon. Bien que ces indices omettent des informations importantes sur le type et le

nombre d'erreurs au sein d'un échantillon ou d'un locus (Lampa et al. 2013), ils facilitent les comparaisons entre différents échantillons et études. Nous avons fixé un seuil de QI à 0,5 pour exclure les échantillons de mauvaise qualité, sur la base d'analyses antérieures et de l'expérience du laboratoire de génétique dans le traitement d'échantillons non invasifs. Ce seuil correspond au nombre minimum de loci requis pour fournir des valeurs $PI_{sibs} < 10^{-2}$, ce qui justifie ce choix et garantit la fiabilité des attributions individuelles.

Nous avons évalué les erreurs de génotypage à chaque étape de l'analyse des données des loci microsatellites : **Tout d'abord**, pour l'ensemble de données comprenant toutes les réplicats, **puis** pour l'ensemble de données ne contenant que les génotypes échantillonnés plusieurs fois, et **enfin**, pour l'ensemble de données avec un génotype par individu. Nous n'avons pas évalué la proportion d'allèles faux dans les réplicats au début de l'étude, ce qui aurait été intéressant, mais ceux-ci étaient extrêmement rares (valeurs FAres comprises entre 0,2% et 1,7%). **À notre connaissance, il s'agit de la première étude à présenter l'ensemble de ces estimations, qui prêtent généralement à confusion lors de la comparaison des résultats entre différentes études.** Bien que nous ayons estimé des taux de perte d'allèles à partir de l'ensemble de données des réplicats (AD moyen par locus, 11%) comparables à ceux d'autres études sur les loups (variant entre 5% et 18%), les erreurs résiduelles après filtrage des échantillons présentant des valeurs $QI > 0,5$ (moyenne de 7,1% pour l'AD et de 5,8% pour l'AD_{res}) figuraient parmi les valeurs les plus faibles rapportées pour les études moléculaires sur les loups gris utilisant des échantillons non invasifs (Annexe 5).

Bien que les taux d'erreur de génotypage restants aient été faibles, nous avons tout de même détecté des allèles nuls dans l'ensemble de *données de consensus individuel* (un génotype par individu), trois loci (AHTk211, CFX30371 et CXX279) présentant un déficit hétérozygote significatif et des fréquences estimées d'allèles nuls $> 10\%$. Un autre locus (FH2004) présentait des fréquences estimées $> 5\%$. Ces déficits en hétérozygotes pourraient être dus à des allèles nuls, et ces loci pourraient donc être exclus des analyses ultérieures de la diversité génétique des populations, car les loci restants présentaient une variabilité suffisante. Une fois ces loci retirés, les valeurs F_{IS} moyennes et d'une année sur l'autre ne présentaient plus de différence significative par rapport à 0. **Cependant, ces déficits en hétérozygotes pourraient également être dus à des mécanismes de population, tels que l'organisation sociale ou la sous-structure de la population, qui ont déjà été observés chez les populations de loups d'Eurasie** (Lucchini et al. 2004 ; Pilot et al. 2006). Des analyses plus approfondies de la diversité génétique des populations, tenant compte des structures spatiales et temporelles, devraient être menées pour étudier ces processus plus en détail.

5.2. Diversité génétique de la population de loups Française

Les prélèvements et les procédures de laboratoire menés au cours des 15 dernières années ont visé à décrire les principales caractéristiques de la population de loups Française. Bien que des analyses supplémentaires soient nécessaires pour décrire pleinement la structure de la population de loups gris en France, certains indicateurs et caractéristiques de base ont été identifiés.

Tout d'abord, tous les échantillons sauf six, représentant 99,9% des échantillons de loups, présentaient un seul mitotype, le **w22** (Pilot et al. 2010). Le mitotype w22 identifié par Pilot

et al. (2010) est spécifique à la lignée Italo-Alpine. Sa prédominance au sein de la population de loups gris Français confirme la colonisation naturelle continue des Alpes Françaises par des individus originaires des Alpes Italiennes et des Apennins (Lucchini et al. 2002, 2004 ; Valière et al. 2003 ; Fabbri et al. 2007).

Les six échantillons restants présentaient le mitotype w1 identifié par Pilot et al. (2010), qui est spécifique à la lignée d'Europe de l'Est. Ces échantillons ont été prélevés en dehors des Alpes Françaises, principalement au cours des cinq dernières années de la période d'étude, et dans le nord de la France. Ces individus (au moins deux individus, mais quatre échantillons étaient de qualité insuffisante pour permettre l'identification individuelle) semblaient avoir migré depuis des meutes en Allemagne, comme l'a confirmé le Laboratoire génétique de référence Allemand (<https://www.senckenberg.de/en/institutes/senckenberg-research-institute-natural-history-museum-frankfurt/division-river-ecology-andconservation/cewolf-consortium/>). La fréquence croissante de ces détections ces dernières années suggère une nouvelle voie naturelle de colonisation provenant des populations d'Europe de l'Est.

La colonisation naturelle des Alpes Françaises a été initiée par quelques individus, ce qui a entraîné un goulot d'étranglement modéré et une perte de diversité génétique (Lucchini et al. 2002 ; Fabbri et al. 2007). En effet, la diversité génétique globale estimée dans la présente étude était relativement faible. La comparaison des indices de diversité obtenus à partir de loci microsatellites dans différentes études peut s'avérer difficile en raison des variations dans les loci utilisés (de Groot et al. 2016) ; mais voir Jan et al. 2023). Néanmoins, dans cette étude, nous avons utilisé plusieurs loci microsatellites déjà rapportés. Hindrikson et al. (2013) ont rapporté une hétérozygotie observée et attendue plus élevée pour les populations de loups gris en Estonie et en Lettonie (respectivement entre 0,708-0,831 et 0,706-0,807) au niveau de cinq loci microsatellites communs que celle observée dans la présente étude ($H_o = 0,599$ et $H_e = 0,606$, respectivement). Nous avons observé une tendance similaire pour les six loci microsatellites communs utilisés en Pologne et en Biélorussie, avec une hétérozygotie attendue de 0,733 (Jedrzejewski et al. 2005) comparée à la valeur de 0,667 obtenue dans notre étude. D'autres études portant sur la population de loups gris Italiens ont mis en évidence des indices de diversité (H_e compris entre 0,440 et 0,603 et H_o entre 0,490 et 0,595) (Lucchini et al. 2002 ; Randi et Lucchini 2002 ; Fabbri et al. 2007) similaires à ceux rapportés ici. Plusieurs études ont également documenté des indices de diversité plus faibles pour les populations de loups gris Italiens que pour d'autres populations Européennes (Lucchini et al. 2004 ; Randi et al. 2014 ; Jan et al. 2023), probablement en raison d'un long isolement génétique de la lignée Italo-Alpine et d'un goulot d'étranglement récent. La dynamique de la population Française n'a pas modifié cette tendance. Bien que la population Française semble bien se porter sur le plan démographique, de nouveaux événements de migration en provenance des populations orientales pourraient accroître sa diversité génétique, comme cela a déjà été observé dans certaines localités de la République Tchèque (Jedrzejewski et al. 2005 ; Akesson et al. 2016 ; Hulva et al. 2024).

6. Conclusions

Les échantillons prélevés de manière non invasive sont précieux pour l'étude d'espèces insaisissables et rares ; par conséquent, les gestionnaires s'appuient de plus en plus sur ces données pour élaborer des plans de gestion adaptés. Le protocole étape par étape que nous

avons développé vise à standardiser l'analyse d'un grand nombre de ces échantillons. Il répond aux défis liés à la qualité des échantillons tout en assurant le suivi de l'échantillonnage génétique non invasif et améliore le rapport coût-bénéfice du suivi de la population de loups en France sur une longue période. En fournissant des données de haute qualité, ce protocole permet des analyses ultérieures, notamment l'estimation de la taille de la population, l'évaluation de l'hybridation avec les chiens et l'évaluation de la connectivité des populations.

Contributions des auteurs

Agathe Pirog : analyse formelle (à parts égales), visualisation (principale), rédaction - version originale (principale), rédaction - révision et édition (principale). **Christophe Duchamp** : conceptualisation (à parts égales), obtention de financement (à parts égales), administration du projet (à parts égales), ressources (à parts égales), rédaction - révision et édition (à parts égales). **Cécile Kaerle** : analyse formelle (à parts égales), ressources (à parts égales), rédaction - révision et édition (à parts égales). **Caroline Dufaure de Citres** : analyse formelle (à parts égales), ressources (à parts égales), rédaction – révision et édition (à parts égales). **Sabine Rousselot** : analyse formelle (à parts égales), ressources (à parts égales), rédaction – révision et édition (à parts égales). **Juliette Lavarec** : analyse formelle (à parts égales), ressources (à parts égales), rédaction - révision et édition (à parts égales). **Guillaume Queney** : conceptualisation (à parts égales), analyse formelle (à parts égales), obtention de financement (à parts égales), administration du projet (à parts égales), ressources (à parts égales), rédaction - révision et édition (à parts égales).

Remerciements

Les auteurs remercient tous les bénévoles et coordinateurs du réseau Français Loup-Lynx pour la collecte des données et le travail de terrain. Nous remercions également les techniciens d'ANTAGENE qui ont effectué les travaux de laboratoire et les lectures des électrophérogrammes. Cette étude a été partiellement financée par le contrat de recherche et développement n° OFB-23-1135 de l'Agence Française pour la Biodiversité et par le marché public de fourniture d'analyses génétiques pour le suivi des populations de loups (*Canis lupus*) n° 2021-28. Nous remercions Sophie Verzelloni pour son soutien administratif.

References

- Åkesson, M., O. Liberg, H. Sand, P. Wabakken, S. Bensch, and Ø. Flagstad. 2016. "Genetic Rescue in a Severely Inbred Wolf Population." *Molecular Ecology* 25: 4745–4756.
- Beja-Pereira, A., R. Oliveira, P. C. Alves, M. K. Schwartz, and G. Luikart. 2009. "Advancing Ecological Understandings Through Technological Transformations in Noninvasive Genetics." *Molecular Ecology Resources* 9: 1279–1301.
- Bonin, A., E. Bellemain, P. Bronken Eidesen, F. Pompanon, C. Brochmann, and P. Taberlet. 2004. "How to Track and Assess Genotyping Errors in Population Genetics Studies." *Molecular Ecology* 13: 3261–3273.
- Broquet, T., and E. Petit. 2004. "Quantifying Genotyping Errors in Noninvasive Population Genetics." *Molecular Ecology* 13: 3601–3608.
- Campbell, N. R., S. A. Harmon, and S. R. Narum. 2015. "Genotyping-In-Thousands by Sequencing (GT-Seq): A Cost Effective SNP Genotyping Method Based on Custom Amplicon Sequencing." *Molecular Ecology Resources* 15: 855–867.

- Caniglia, R., E. Fabbri, S. Cubaynes, O. Gimenez, J.-D. Lebreton, and E. Randi. 2012. "An Improved Procedure to Estimate Wolf Abundance Using Non-Invasive Genetic Sampling and Capture–Recapture Mixture Models." *Conservation Genetics* 13: 53–64.
- 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.
- Caniglia, R., E. Fabbri, L. Mastrogiuseppe, and E. Randi. 2013. "Who Is Who? Identification of Livestock Predators Using Forensic Genetic Approaches." *Forensic Science International: Genetics* 7: 397–404.
- Canu, A., L. Mattioli, A. Santini, M. Apollonio, and M. Scandura. 2017. "'Video-Scats': Combining Camera Trapping and Non-Invasive Genotyping to Assess Individual Identity and Hybrid Status in Gray Wolf." *Wildlife Biology* 2017: wlb.00355.
- Chapron, G., P. Kaczensky, J. D. C. Linnell, et al. 2014. "Recovery of Large Carnivores in Europe's Modern Human-Dominated Landscapes." *Science* 346: 1517–1519.
- Creel, S., G. Spong, J. L. Sands, et al. 2003. "Population Size Estimation in Yellowstone Wolves With Error-Prone Noninvasive Microsatellite Genotypes." *Molecular Ecology* 12: 2003–2009.
- Cubaynes, S., R. Pradel, R. Choquet, et al. 2010. "Importance of Accounting for Detection Heterogeneity When Estimating Abundance: The Case of French Wolves." *Conservation Biology* 24: 621–626.
- Dąbrowski, M. J., S. Bornelöv, M. Kruczyk, N. Baltzer, and J. Komorowski. 2015. "'True' Null Allele Detection in Microsatellite Loci: A Comparison of Methods, Assessment of Difficulties and Survey of Possible Improvements." *Molecular Ecology Resources* 15: 477–488.
- de Groot, G. A., C. Nowak, T. Skrbinšek, et al. 2016. "Decades of Population Genetic Research Reveal the Need for Harmonization of Molecular Markers: The Grey Wolf *Canis lupus* as a Case Study." *Mammal Review* 46: 44–59.
- Duchamp, C., S. Baudouin, N. Jean, O. Gimenez, and R. N. Simon. 2023. "Monitoring Large Carnivores Over Large Scale: What's Next for the Successful Recovery of Wolves in France?" In *Conference Monitoring Large Carnivores Over Large Scale: What's Next for the Successful Recovery of Wolves in France?* L. W. EU.
- Duchamp, C., J. Boyer, P.-E. Briaudet, et al. 2012. "Wolf Monitoring in France: A Dual Frame Process to Survey Time- and Space-Related Changes in the Population." *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 23: 14–28.
- Dufresnes, C., N. Remollino, C. Stoffel, R. Manz, J.-M. Weber, and L. Fumagalli. 2019. "Two Decades of Non-Invasive Genetic Monitoring of the Grey Wolves Recolonizing the Alps Support Very Limited Dog Introgression." *Scientific Reports* 9: 148.
- Eriksson, C. E., J. Ruprecht, and T. Levi. 2020. "More Affordable and Effective Noninvasive Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Using High-Throughput Amplicon Sequencing." *Molecular Ecology Resources* 20: 1505–1516.
- Fabbri, E., R. Caniglia, N. Mucci, et al. 2012. "Comparison of Single Nucleotide Polymorphisms and Microsatellites in Non-Invasive Genetic Monitoring of a Wolf Population." *Archives of Biological Sciences* 64: 321–335.
- 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.
- Francisco, L. V., A. A. Langsten, C. S. Mellersh, C. L. Neal, and E. A. Ostrander. 1996. "A Class of Highly Polymorphic Tetranucleotide Repeats for Canine Genetic Mapping." *Mammalian Genome* 7: 359–362.
- Frantz, A. C., L. C. Pope, P. J. Carpenter, et al. 2003. "Reliable Microsatellite Genotyping of the Eurasian Badger (*Meles meles*) Using Faecal DNA." *Molecular Ecology* 12: 1649–1661.

- Gagneux, P., C. Boesch, and D. S. Woodruff. 1997. "Microsatellite Scoring Errors Associated With Noninvasive Genotyping Based on Nuclear DNA Amplified From Shed Hair." *Molecular Ecology* 6: 861–868.
- Galaverni, M., D. Palumbo, E. Fabbri, R. Caniglia, C. Greco, and E. Randi. 2012. "Monitoring Wolves (*Canis lupus*) by Non-Invasive Genetics and Camera Trapping: A Small-Scale Pilot Study." *European Journal of Wildlife Research* 58: 47–58.
- Gervasi, V., J. D. C. Linnell, T. Berce, et al. 2021. "Ecological Correlates of Large Carnivore Depredation on Sheep in Europe." *Global Ecology and Conservation* 30: e01798.
- Godinho, R., J. V. López-Bao, D. Castro, et al. 2015. "Real-Time Assessment of Hybridization Between Wolves and Dogs: Combining Noninvasive Samples With Ancestry Informative Markers." *Molecular Ecology Resources* 15: 317–328.
- Goudet, J., and T. Jombart. 2015. "hierfstat: Estimation and tests of hierarchical F-statistics". R package version 0.04-22.
- Grete, O., T. Saubusse, O. Gimenez, E. Marboutin, and C. Duchamp. 2022. "Wolf Depredation Hotspots in France: Clustering Analyses Adjusting for Livestock Availability." *Biological Conservation* 267: 109495.
- Hausknecht, R., R. Gula, B. Pirga, and R. Kuehn. 2007. "Urine — A Source for Noninvasive Genetic Monitoring in Wildlife." *Molecular Ecology Notes* 7: 208–212.
- Hausknecht, R., Á. Szabó, G. Firmánszky, R. Gula, and R. Kuehn. 2010. "Confirmation of Wolf Residence in Northern Hungary by Field and Genetic Monitoring." *Mammalian Biology* 75: 348–352.
- Hindrikson, M., J. Remm, P. Männil, J. Ozolins, E. Tammeleht, and U. Saarma. 2013. "Spatial Genetic Analyses Reveal Cryptic Population Structure and Migration Patterns in a Continuously Harvested Grey Wolf (*Canis lupus*) Population in North-Eastern Europe." *PLoS One* 8: e75765.
- Hulva, P., S. Collet, L. Baránková, et al. 2024. "Genetic Admixture Between Central European and Alpine Wolf Populations." *Wildlife Biology* 2024, no. 6: e01281.
- IDELE. 2018. "Ovins 2017 Productions Lait et Viande, Les Chiffres Clés du GEB."
- Jan, M., A. V. Stronen, B. Boljte, et al. 2023. "Wolf Genetic Diversity Compared Across Europe Using the Yardstick Method." *Scientific Reports* 13: 13727.
- Jansson, E., M. Ruokonen, I. Kojola, and J. Aspi. 2012. "Rise and Fall of a Wolf Population: Genetic Diversity and Structure During Recovery, Rapid Expansion and Drastic Decline." *Molecular Ecology* 21: 5178–5193.
- Jarusch, A., V. Harms, G. Kluth, I. Reinhardt, and C. Nowak. 2021. "How the West Was Won: Genetic Reconstruction of Rapid Wolf Recolonization Into Germany's Anthropogenic Landscapes." *Heredity* 127: 92–106.
- Jarusch, A., A. von Thaden, T. Sin, et al. 2023. "Assessment of Genetic Diversity, Population Structure and Wolf-Dog Hybridisation in the Eastern Romanian Carpathian Wolf Population." *Scientific Reports* 13: 22574.
- Jędrzejewski, W., W. Branicki, C. Veit, et al. 2005. "Genetic Diversity and Relatedness Within Packs in an Intensely Hunted Population of Wolves *Canis lupus*." *Acta Theriologica* 50: 3–22.
- Ji, H.-J., E.-h. Kim, K.-k. Lee, et al. 2007. "Beagle Dogs Parentage Testing by Using 22 ISAG Microsatellite Markers." *Korean Journal of Veterinary Research* 47: 457–460.
- Kalinowski, S. T., and M. L. Taper. 2006. "Maximum Likelihood Estimation of the Frequency of Null Alleles at Microsatellite Loci." *Conservation Genetics* 7: 991–995.
- Lampa, S., K. Henle, R. Klenke, M. Hoehn, and B. Gruber. 2013. "How to Overcome Genotyping Errors in Non-Invasive Genetic Mark-Recapture Population Size Estimation—A Review of Available Methods Illustrated by a Case Study." *Journal of Wildlife Management* 77: 1490–1511.
- Linnell, J., and B. Cretots. 2018. "Research for AGRI Committee – The Revival of Wolves and Other Large Predators and Its Impact on Farmers and Their Livelihood in Rural Regions of Europe." European Parliament, Brussels.
- Louvier, J., C. Duchamp, V. Lauret, et al. 2018. "Mapping and Explaining Wolf Recolonization in France Using Dynamic Occupancy Models and Opportunistic Data." *Ecography* 41: 647–660.
- 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.
- Lucchini, V., A. Galov, and E. Randi. 2004. "Evidence of Genetic Distinction and Long-Term Population Decline in Wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines." *Molecular Ecology* 13: 523–536.
- Marescot, L., R. Pradel, C. Duchamp, et al. 2011. "Capture–Recapture Population Growth Rate as a Robust Tool Against Detection Heterogeneity for Population Management." *Ecological Applications* 21: 2898–2907.
- McKelvey, K. S., and M. K. Schwartz. 2004. "Genetic Errors Associated With Population Estimation Using Non-Invasive Molecular Tagging: Problems and New Solutions." *Journal of Wildlife Management* 68: 439–448.
- Mills, L. S., J. J. Citta, K. P. Lair, M. K. Schwartz, and D. A. Tallmon. 2000. "Estimating Animal Abundance Using Noninvasive DNA Sampling: Promise and Pitfalls." *Ecological Applications* 10: 283–294.
- Miquel, C., E. Bellemain, C. Poillot, J. Bessière, A. Durand, and P. Taberlet. 2006. "Quality Indexes to Assess the Reliability of Genotypes in Studies Using Noninvasive Sampling and Multiple-Tube Approach." *Molecular Ecology Notes* 6: 985–988.
- Nakamura, M., R. Godinho, H. Rio-Mator, et al. 2017. "Evaluating the Predictive Power of Field Variables for Species and Individual Molecular Identification on Wolf Noninvasive Samples." *European Journal of Wildlife Research* 63: 53.
- Nakamura, M., H. Rio-Mator, R. Godinho, F. Petrucci-Fonseca, and F. Álvares. 2021. "Source-Sink Dynamics Promote Wolf Persistence in Human-Modified Landscapes: Insights From Long-Term Monitoring." *Biological Conservation* 256: 109075.
- Neff, M. W., K. W. Broman, C. S. Mellersh, et al. 1999. "A Second-Generation Genetic Linkage Map of the Domestic Dog, *Canis familiaris*." *Genetics* 151: 803–820.
- Ogden, R. 2011. "Unlocking the Potential of Genomic Technologies for Wildlife Forensics." *Molecular Ecology Resources* 11: 109–116.
- Osborne, M. J., G. Caeiro-Dias, and T. F. Turner. 2023. "Transitioning From Microsatellites to SNP-Based Microhaplotypes in Genetic Monitoring Programmes: Lessons From Paired Data Spanning 20 Years." *Molecular Ecology* 32: 316–334.
- Ostrander, E. A., G. F. Sprague, and J. Rine. 1993. "Identification and Characterization of Dinucleotide Repeat (CA)_n Markers for Genetic Mapping in Dog." *Genomics* 16: 207–213.
- Pacheco, C., J. V. López-Bao, E. J. García, et al. 2017. "Spatial Assessment of Wolf-Dog Hybridization in a Single Breeding Period." *Scientific Reports* 7: 42475.
- Paetkau, D. 2003. "An Empirical Exploration of Data Quality in DNA-Based Population Inventories." *Molecular Ecology* 12: 1375–1387.
- Payne, K., S. P. Gavan, S. J. Wright, and A. J. Thompson. 2018. "Cost-Effectiveness Analyses of Genetic and Genomic Diagnostic Tests." *Nature Reviews Genetics* 19: 235–246.

- Petit, E., and N. Valière. 2006. "Estimating Population Size With Noninvasive Capture-Mark-Recapture Data." *Conservation Biology* 20: 1062–1073.
- Pilot, M., W. Branicki, W. Jędrzejewski, et al. 2010. "Phylogeographic History of Grey Wolves in Europe." *BMC Evolutionary Biology* 10: 104.
- Pilot, M., W. Jędrzejewski, W. Branicki, et al. 2006. "Ecological Factors Influence Population Genetic Structure of European Grey Wolves." *Molecular Ecology* 15: 4533–4553.
- Pompanon, F., A. Bonin, E. Bellemain, and P. Taberlet. 2005. "Genotyping Errors: Causes, Consequences and Solutions." *Nature Reviews Genetics* 6: 847–859.
- Posit Team. 2024. "Posit Software." PBC, Boston, MA.
- R Core Team. 2023. "R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria."
- Randi, E., P. Hulva, E. Fabbri, et al. 2014. "Multilocus Detection of Wolf × Dog Hybridization in Italy, and Guidelines for Marker Selection." *PLoS One* 9: e86409.
- Randi, E., and V. Lucchini. 2002. "Detecting Rare Introgression of Domestic Dog Genes Into Wild Wolf (*Canis lupus*) Populations by Bayesian Admixture Analyses of Microsatellite Variation." *Conservation Genetics* 3: 29–43.
- Salvatori, V., R. Godinho, C. Braschi, L. Boltani, 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.
- Santini, A., V. Lucchini, E. Fabbri, and E. Randi. 2007. "Ageing and Environmental Factors Affect PCR Success in Wolf (*Canis lupus*) Excremental DNA Samples." *Molecular Ecology Notes* 7: 955–961.
- Sastre, N., C. Vilà, M. Salinas, et al. 2011. "Signatures of Demographic Bottlenecks in European Wolf Populations." *Conservation Genetics* 12: 701–712.
- Scandura, M. 2005. "Individual Sexing and Genotyping From Blood Spots on the Snow: A Reliable Source of DNA for Non-Invasive Genetic Surveys." *Conservation Genetics* 6: 871–874.
- Scandura, M., C. Capitani, L. Iacolina, and A. Marco. 2006. "An Empirical Approach for Reliable Microsatellite Genotyping of Wolf DNA From Multiple Noninvasive Sources." *Conservation Genetics* 7: 813–823.
- Schwartz, M. K., G. Luikart, and R. S. Waples. 2007. "Genetic Monitoring as a Promising Tool for Conservation and Management." *Trends in Ecology & Evolution* 22: 25–33.
- Selkoe, K. A., and R. J. Toonen. 2006. "Microsatellites for Ecologists: A Practical Guide to Using and Evaluating Microsatellite Markers." *Ecology Letters* 9: 615–629.
- Stansbury, C. R., D. E. Ausband, P. Zager, et al. 2014. "A Long-Term Population Monitoring Approach for a Wide-Ranging Carnivore: Noninvasive Genetic Sampling of Gray Wolf Rendezvous Sites in Idaho, USA." *Journal of Wildlife Management* 78: 1040–1049.
- Stenglein, J. L., M. De Barba, D. E. Ausband, and L. P. Waits. 2010. "Impacts of Sampling Location Within a Faeces on DNA Quality in Two Carnivore Species." *Molecular Ecology Resources* 10: 109–114.
- Stenglein, J. L., L. P. Waits, D. E. Ausband, P. Zager, and C. M. Mack. 2010. "Efficient, Noninvasive Genetic Sampling for Monitoring Reintroduced Wolves." *Journal of Wildlife Management* 74: 1050–1058.
- Štikarová, R., J. Vašek, D. Čilová, and P. Vějl. 2019. "Estimation of Genotyping Errors of STR Markers in Dogs and Wolves." *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 7: 901–902.
- Sundqvist, A.-K., H. Ellegren, and C. Vilà. 2008. "Wolf or Dog? Genetic Identification of Predators From Saliva Collected Around Bite Wounds on Prey." *Conservation Genetics* 9: 1275–1279.
- Szewczyk, M., S. Nowak, N. Niedźwiecka, et al. 2019. "Dynamic Range Expansion Leads to Establishment of a New, Genetically Distinct Wolf Population in Central Europe." *Scientific Reports* 9: 19003.
- Taberlet, P., S. Griffin, B. Goossens, et al. 1996. "Reliable Genotyping of Samples With Very Low DNA Quantities Using PCR." *Nucleic Acids Research* 24: 3189–3194.
- Taberlet, P., L. P. Waits, and G. Luikart. 1999. "Noninvasive Genetic Sampling: Look Before You Leap." *Trends in Ecology & Evolution* 14: 323–327.
- Valière, N. 2002. "GIMLET: A Computer Program for Analysing Genetic Individual Identification Data." *Molecular Ecology Notes* 2: 377–379.
- Valière, N., L. Fumagalli, L. Gielly, et al. 2003. "Long-Distance Wolf Recolonization of France and Switzerland Inferred From Non-Invasive Genetic Sampling Over a Period of 10 Years." *Animal Conservation* 6: 83–92.
- Valiere, N., and P. Taberlet. 2000. "Urine Collected in the Field as a Source of DNA for Species and Individual Identification." *Molecular Ecology* 9: 2150–2152.
- Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills, and P. Shipley. 2004. "Micro-Checker: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data." *Molecular Ecology Notes* 4: 535–538.
- Vilà, C., I. R. Amorim, J. A. Leonard, et al. 1999. "Mitochondrial DNA Phylogeography and Population History of the Grey Wolf *Canis lupus*." *Molecular Ecology* 8: 2089–2103.
- von Thaden, A., B. Cocchiararo, A. Jarausch, et al. 2017. "Assessing SNP Genotyping of Noninvasively Collected Wildlife Samples Using Microfluidic Arrays." *Scientific Reports* 7: 10768.
- Waits, L. P., G. Luikart, and P. Taberlet. 2001. "Estimating the Probability of Identity Among Genotypes in Natural Populations: Cautions and Guidelines." *Molecular Ecology* 10: 249–256.
- Waits, L. P., and D. Paetkau. 2005. "Noninvasive Genetic Sampling Tools for Wildlife Biologists: A Review of Applications and Recommendations for Accurate Data Collection." *Journal of Wildlife Management* 69: 1419–1433.
- Wang, J. 2018. "Estimating Genotyping Errors From Genotype and Reconstructed Pedigree Data." *Methods in Ecology and Evolution* 9: 109–120.